

心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子変異による肥大型心筋症の分子遺伝学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9481

心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子変異による肥大型心筋症の 分子遺伝学的研究

金沢大学医学部医学科内科学第二講座 (主任: 馬淵 宏教授)

松 山 徹

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) は心筋の一部または全体の異常肥大とそれに伴う心室の拡張障害を主徴とする原因不明の心筋疾患と定義されてきたが, 約半数に常染色体優性遺伝形式に従う家族内発症がみられることは以前より知られていた。最近の分子遺伝学的解析により, 現在までに9種類の心室サルコメア構成蛋白の遺伝子変異が原因遺伝子として報告されている。このうち心筋ミオシン結合蛋白C (myosin binding protein-C, MyBP-C) 遺伝子変異によるHCMは遅発性, 低浸透率, 壁肥厚は軽度, 拡張相への移行は稀, 比較的予後良好と報告されている。しかしながら, その遺伝子変異部位によっては臨床病型が異なることも予想される。本研究では, 北陸地方におけるHCM家系を対象に新しいMyBP-C遺伝子変異の検索を行い, その臨床的特徴について検討した。対象者の末梢白血球より抽出したDNAを用い, ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) によりDNA断片を増幅させた後PCR一本鎖構成体多型 (PCR - single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法および直接塩基配列決定 (direct sequencing) 法にて遺伝子変異を同定し, PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法により遺伝子変異を確認した。臨床的にHCMと診断された150家系の検討の結果, 8家系において4種類のMyBP-C遺伝子変異を見出した。このうち2種類; エクソン6の236番目のアミノ酸セリン (serine, Ser) をコードするコドンAGCがグリシン (glycine, Gly) をコードするGGCへと変化する変異: Ser236Gly, エクソン17の507番目のアミノ酸GlyをコードするコドンGGGがアルギニン (arginine, Arg) をコードするAGGへと変化する変異: Gly507Arg は木村らによりアミノ酸変化を伴う遺伝的多型と報告されているものであったが, 残りの2種類; イントロン (intron, Int) 17のスプライス供与部位 (donor site, DS) の1番目のGがAに変化する変異: Int17DSG+1A, エクソン25の820番目のアミノ酸ArgをコードするコドンCGGがグルタミン (glutamine, Gln) をコードするCAGへと変化する変異: Arg820Gln は今までに報告のない新しいMyBP-C遺伝子変異であった。Int17DSG+1A, Arg820GlnによるHCMにおいては若年発症例, 非対称性中隔肥厚 (asymmetrical septal hypertrophy, ASH) や閉塞性肥大型心筋症 (hypertrophic obstructive cardiomyopathy, HOCM) 症例, さらには拡張相への移行例および心不全発症例, 突然死例が存在し従来の報告とは臨床病型が異なっていた。今回, 北陸地方におけるHCM150家系において5家系 (3.3%) に2つの新しいMyBP-C遺伝子変異が認められた。これらによるHCMでは, 従来の報告通り心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異や心筋トロポニンT遺伝子変異に比し予後は良好であったが, 中には若年発症しHOCMから拡張相に移行する症例や突然死する例も存在することが示された。今後遺伝子型と臨床病型のさらなる知見の集積が必要あるが, 従来比較的予後が良いと報告されているMyBP-C遺伝子変異によるHCM症例でも, 特に男性症例においては, その治療に際して慎重な経過観察が必要であることが示唆された。

Key words hypertrophic cardiomyopathy, cardiac myosin binding protein-C gene, asymmetrical septal hypertrophy, dilated form of hypertrophic cardiomyopathy, gene mutation

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) は, 高血圧や心臓弁膜症など心筋肥大を引き起こす明らかな原因疾患がないにもかかわらず, 心筋の一部または全体の異常肥大を呈する心筋疾患である。臨床的に本症が注目されるようになったのは, 1958年にTeareにより報告された若年成人例の非対称性心室中隔肥大の剖検例¹⁾や, 1960年にBraunwaldら²⁾が左室流出路の狭窄ないし閉塞をもつ症例を特発性肥大型大動脈弁下狭窄

症 (idiopathic hypertrophic subaortic stenosis, IHSS) として報告して以来であり, この頃から独立した疾患として扱われるようになった。HCMでは左室壁の肥厚は不均等に, 特に心室中隔を中心に起こることが多く, 心臓超音波像上拡張末期の心室中隔厚と左室後壁厚との比が1.3以上のものは非対称性中隔肥厚 (asymmetrical septal hypertrophy, ASH) と定義され, 本症の特徴的な形態学的所見^{1) 3)}である。その形態について, Maronら⁴⁾

平成12年5月29日受付, 平成12年6月28日受理

Abbreviations: Arg, arginine; α -TM, α -tropomyosin; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; β -MHC, β -myosin heavy chain; D-HCM, dilated form of hypertrophic cardiomyopathy; DS, donor site; FS, fractional shortening; Gln, glutamine; Gly, glycine; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; HOCM, hypertrophic obstructive cardiomyopathy; Int,

は僧帽弁レベルでの左室短軸断面心臓超音波像所見より4型に分類している。また、この他に本邦で1976年に報告された心尖部のみに肥大が強く、心電図上巨大陰性T波を特徴とする心尖部肥大型心筋症も存在する⁵⁾。

このようにHCMは形態学的に大きな多様性を示す。形態学的多様性は同一家系内でも認められ、ASHを認める症例や心尖部肥大型心筋症を示す症例が混在するHCM家系も報告されている⁶⁾。一方、本症では一般に左室の拡大や収縮障害はみられない⁷⁾が、その経過中に左室拡大、壁菲薄化、収縮機能障害が進展し、拡張型心筋症と類似の様相を示す症例があり、拡張相肥大型心筋症 (dilated form of hypertrophic cardiomyopathy, D-HCM) として注目されている^{8)~13)}。また病理学的には心筋の錯綜配列や心筋の線維化所見が特徴である¹⁴⁾。このHCMの臨床病型の多様性は経年変化のみでは説明できない。

HCMが虚血性心疾患や高血圧性心疾患などに比べると比較的まれな疾患であるにもかかわらず臨床的・社会的にも注目されている理由として、若年者の突然死の原因の多くを本症が占めていることが挙げられる。Maronら¹⁵⁾は突然死したスポーツ競技者158例の検討をおこない、心血管系の異常により死亡した134例の平均年齢は17歳で、うち48例(36%)はHCMであったと報告している。若年発症の突然死例の多くは生前無症状で¹⁶⁾、HCMと診断されていない例が多い。最近の研究では若年一般人口におけるHCMの発症頻度は約500人に1人と比較的高いと報告されており¹⁷⁾、HCM患者の85%には何らかの心電図異常が認められること¹⁸⁾から、スポーツ競技者では心電図や心臓超音波検査などで本症をできる限り早期に診断し、運動制限をおこなう必要があると思われる。

HCMの原因は1980年代前半までは不明であったが、本症の多くに家族内発症が認められ、常染色体優性遺伝を示す場合が多いことは知られていた¹⁹⁾。1980年代半ば頃より、他の遺伝性疾患と同様に連鎖検定を用いた原因遺伝子の解明に向けた研究が進められ、1989年にHCMの病因遺伝子が第14染色体の長腕に位置することが示され²⁰⁾、1990年には本症多発家系において心筋βミオシン重鎖(β-myosin heavy chain, β-MHC)の変異が報告された²¹⁾。その後わずか5~6年の間にαトロポミオシン(α-tropomyosin, α-TM)²²⁾、心筋トロポニンT(troponin T, TnT)²³⁾、心筋ミオシン結合蛋白C(myosin binding protein-C, MyBP-C)²³⁾²⁴⁾の遺伝子変異が相次いで報告された。これらが全て心筋のサルコメアを構成する蛋白であることより、サルコメアを構成する他の蛋白の遺伝子に対する候補遺伝子アプローチが行われ、心室/骨格筋型ミオシンアルカリ軽鎖遺伝子²⁵⁾、心室型ミオシン調節軽鎖遺伝子²⁵⁾、心筋トロポニンI遺伝子²⁶⁾、心筋αアクチン遺伝子²⁷⁾、タイチン遺伝子変異²⁸⁾も見いだされ、HCMの約50~60%の症例で遺伝子レベルでの病因解明が可能となった。

このような分子遺伝学的解析の進歩に伴い、遺伝子型と臨床病型との関係が注目されるようになった。欧米においてβ-MHC遺伝子変異は家族性肥大型心筋症家系の約25%の病因であるとされ、40種類以上のミスセンス変異と1種類の挿入欠

失(insertion-deletion)変異が報告されている^{21)29)~49)}。TnT遺伝子については、13種類の変異が報告されており、約15%の家系の病因であると報告されている^{8)22)50)~52)}。その他、α-TM、MyBP-C、心室/骨格筋型ミオシンアルカリ軽鎖、心室型ミオシン調節軽鎖、心筋トロポニンI遺伝子の変異については、それぞれ病因の約3%、10%、1%以下、1%以下、3%を占めるといわれているが、この頻度には地域差があり、いまだ詳細は明らかではない^{22)~26)53)~56)}。

このうちMyBP-C遺伝子変異によるHCMは遅発性、低浸透率、壁肥厚は軽度で、拡張相への移行は稀であり、比較的子後が良いと報告されている⁵⁵⁾⁵⁶⁾。しかしながら、その遺伝子変異部位によっては臨床病型が異なることも予想される。そこで本研究では、北陸地方におけるHCM家系を対象にMyBP-C遺伝子変異の検索を行い、その臨床的特徴について検討した。

対象および方法

I. 対象

対象は、心電図、心臓超音波所見上Fisch⁵⁷⁾やFeigenbaumら⁵⁸⁾の診断基準を満たし、金沢大学第二内科およびその関連施設に通院あるいは入院している北陸地方のHCM患者発端者150名である。これら対象者および正常対照者100名に、検査に先立って同意を得た後に以下の検討をおこなった。

1. 北陸地方におけるMyBP-C遺伝子変異の頻度を調査し、さらに新しいMyBP-C遺伝子変異の有無を検討すること
2. 新しいMyBP-C遺伝子変異に伴うHCM患者の臨床病型について検討すること

II. 方法

1. 高分子DNA抽出

対象者の末梢静脈血10mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送し-20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後Triton X-100融解変法⁵⁹⁾にて高分子DNAを単離した。すなわち融解液(320mMショ糖液、1% Triton X-100、5mM MgCl₂、10mM Tris-HCl, pH 7.6)にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼ(Sigma, St. Louis, USA)にて消化後、フェノール-クロロホルム(1:1)で1回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)にて2回抽出し、最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH 8.0)に溶解の上260nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

2. ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)

Carrierら⁶⁰⁾の報告を参考に、ジーンバンクのデータベースに登録されているヒトMyBP-C遺伝子配列から、エクソン6, 7, 14-15, 17, 23, 25, 30, 31について約20塩基長のプライマー計8組を作成した(CEX 6-5, 6-3; CEX 7-5, 7-3; CEX 14-15-5, 14-15-3; CEX 17-5, 17-3; CEX 23-5, 23-3; CEX 25-5, 25-3; CEX 30-5, 30-3; CEX 31-5, 31-3)。(表1) Tm値はRoboCycler™40(Stratagene, USA)を用い、温度を52℃~70℃まで2℃づつ変えてPCRをおこない、最もよくDNAが増幅さ

intron; IHSS, idiopathic hypertrophic subaortic stenosis; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; Met, methionine; MyBP-C, myosin binding protein-C; PCR, polymerase chain reaction; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; SAM, systolic anterior movement; Ser, serine; TBE, tris-boric acid-EDTA; TnT, troponin T

Table 1. Oligonucleotide primers flanking the exons of the cardiac myosin binding protein-C gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
6	CEX 6-5	5'-ATTACAGGCCTGAGCCACCG-3'
	CEX 6-3	5'-AGACCAGGACCCATGGGGAG-3'
7	CEX 7-5	5'-TCTGAAGCCCCTTCCCCAT-3'
	CEX 7-3	5'-GGCTCCTGTGGGGGTTAGACT-3'
14-15	CEX 14-15-5	5'-CTCTCCTTTTGTCTCGGGGCT-3'
	CEX 14-15-3	5'-GGGTGAGCATGAGGGTTGGC-3'
17	CEX 17-5	5'-GTTCCAGAAGCACGGGGCA-3'
	CEX 17-3	5'-GTGGGGTGGGGGCTGAGG-3'
23	CEX 23-5	5'-TCCTGGGGTCTGACTTGA-3'
	CEX 23-3	5'-CTGAATGAGCGAACGGATG-3'
25	CEX 25-5	5'-AACAGATCCGAGGGAAGGTGG-3'
	CEX 25-3	5'-TTTTTAACTGGGGAGGGGGC-3'
30	CEX 30-5	5'-TGGTTGGCAGGGGTGGGGTGG-3'
	CEX 30-3	5'-GCCTAGGCAGGGTGCACGTGGG-3'
31	CEX 31-5	5'-GACCCCTCACCCCTCCCTCTGCTG-3'
	CEX 31-3	5'-AGCCCTGGTTGGAAGAATGAG-3'

Oligonucleotide primers complementary to DNA sequences flanking exons of the human cardiac myosin binding protein-C gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

れた温度をTm値として各エクソンごとに決定した。なお、スプライス部位の変異検出のため各プライマーはエクソンに隣接するイントロンを少なくとも5塩基含むものとした。

プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA) を用いベータシアノエチルホスホアミダイド法⁽¹⁾にて合成した。アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却、真空下で遠心して乾燥、再滅菌蒸留水1mlに溶解しカラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通して精製した。そこで200倍に希釈し260nmでの吸光度より濃度を測定し10pMになるように濃度を調整した。

DNA断片の増幅にはSaikiら⁽²⁾によるPCR法を用いた。高分子DNA 1μgを鋳型DNAとして40pMのプライマー1セットと終濃度200μMの各デオキシヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)と2.5単位のTaqポリメラーゼ(東洋紡, 東京)を、0.01%ゼラチンを含む緩衝液(終濃度10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂)に加え再滅菌蒸留水を計50μlとなるように加え攪拌した。遠心して反応液を集めミネラルオイル(Sigma)を適量滴下して蒸発を防ぎ、94℃1分、それぞれのプライマーのTm値(エクソン6, 62℃; エクソン7, 58℃; エクソン14-15, 54℃; エクソン17, 66℃; エクソン23, 58℃; エクソン25, 58℃; エクソン30, 66℃; エクソン31, 66℃)で1分、72℃1分を基本にそれぞれのセットごとに決定した温度条件のもと、30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は1%の通常のアガロースゲルに鎖長マ

ーカーとしてSuperladder-Low dsDNA Marker Kit (Gen Sura Laboratories, San Diego, USA) とともに泳動して断片長を確認した。

3. PCR一本鎖構成体多型(PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)法

泳動用緩衝液としてTris-HCl 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M EDTA 20mlに蒸留水を加え3lにしたものを保存用の5×Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液とし泳動直前に1×の濃度に希釈した。

0.5mM EDTA 2μl, 5N NaOH 10μl, 滅菌再蒸留水 88μlを混合しアルカリ溶液を作り、PCR産物8μlにアルカリ溶液2μlを加え42℃3分、95℃2分加熱後、0℃に急冷し一本鎖に変性させた。そのうえで、10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(アトー, 東京)を用いてTBE緩衝液中で4℃のもと80Vで18時間泳動した。

染色にはBio-Rad銀染色キット(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)を用い、プロトコルに従って銀染色をおこなった。すなわち10%エタノール, 5%酢酸混合液200mlにて15分間ゲルの固定を行い、酸化剤100mlにて5分間酸化させた。蒸留水で15分間に3回水を換えながらすすぎ余分な酸化剤を除き、銀染色溶液を加え20分間振盪させた。その後蒸留水で1分間洗浄し現像液を加えバンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなった時点で蒸留水で1分間すすいだ後、5%酢酸100mlを加え反応を停止させた。30%エタノール, 5%酢酸混合液200mlを保存液とし、30分以上保存液内にゲルを浸した

後、ゲルをセルロースフィルム2枚ではさみ密封して保存した。

1本鎖に変性させたDNAはヘアピンループなどの分子内高次構造を形成する。この分子構造は1塩基の変異によっても大きく影響を受け、高次構造が大きく変化する。この構造の違いは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の違いとして検出できる。これを利用し、正常DNAとともに電気泳動することによりそれと異なるバンドを認めたものを変異DNAとして検出した。

4. 自動化直接塩基配列決定 (direct sequencing) 法

PCRで増幅したDNA断片を1%通常アガロースゲルに鎖長マーカーとともに泳動し、断片長を確認した上で目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。マイクロピュアとマイクロコン-50 (Amicon) を組み合わせてこのDNA断片を10000rpmで10分間遠心した。再滅菌蒸留水20 μ lを加えて再度遠心し、濃縮すると同時に余分なプライマーおよびヌクレオチドを除去し、それを直接塩基配列決定法の鋳型DNAとした。これにダイ・ターミネーター・サイクルシークエンス・キット (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いダイ・ターミネーター法にて反応をおこなった。

自動化直接塩基配列決定法としてABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation) を用いた。これはキャピラリー型の塩基配列解析装置で、読みとられたデータはパーソナルコンピュータ Power Macintosh G3 (Apple, Cupertino, USA) 本体に蔵の固定ディスクに数値データとして保存された。反応終了後に塩基配列解析を自動的におこない、配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した。

5. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法

変異配列が決定された後、変異の存在の確認およびスクリーニングのため変異の存在下でのみ切断部位が生じるように各変異ごとに特定の制限酵素を決定した。ピペットにてミネラルオイルの下層より取り出したPCR産物に各変異ごとに特定の制限酵素とその反応緩衝液を加え酵素の至適温度条件下にて6時間反応させた。反応産物を10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルに鎖長マーカーとともに泳動して切断の有無で変異の検出をおこなった。

6. 家系内調査

MyBP-C遺伝子変異が認められた家系においては家系図を作成した後、可能な限り家族の来院を依頼した。さらに来院した家族に対して同意を得た後に心電図、心臓超音波検査ならびにDNA採集のための採血を施行した。

成 績

I. MyBP-C遺伝子解析

1. PCR-SSCPの結果

HCM発端者150例に対するPCR-SSCP法による検討の結果、MyBP-C遺伝子エクソン6において1人、エクソン17において3人、エクソン25において4人に異常バンドが検出された。異常バンドが検出されたエクソンについては、引き続き直接塩基配列決定法による変異の同定をおこなった。

2. エクソン6塩基配列の決定

1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン6のスクリーニングで、HCM発

端者064において異常バンドが検出された(図1)。

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定 (HCM発端者064)

HCM発端者064のMyBP-C遺伝子エクソン6における塩基配列解析の結果、236番目のアミノ酸セリン (serine, Ser) をコードするコドンAGCがグリシン (glycine, Gly) をコードするGGCへと変化する変異: Ser236Glyが認められた(図2)。なお、変異したGのバンドは正常なAのバンドと共存しておりヘテロ合体であった。しかし、この変異は木村らによりアミノ酸変化を伴う遺伝的多型として報告されている変異であった。

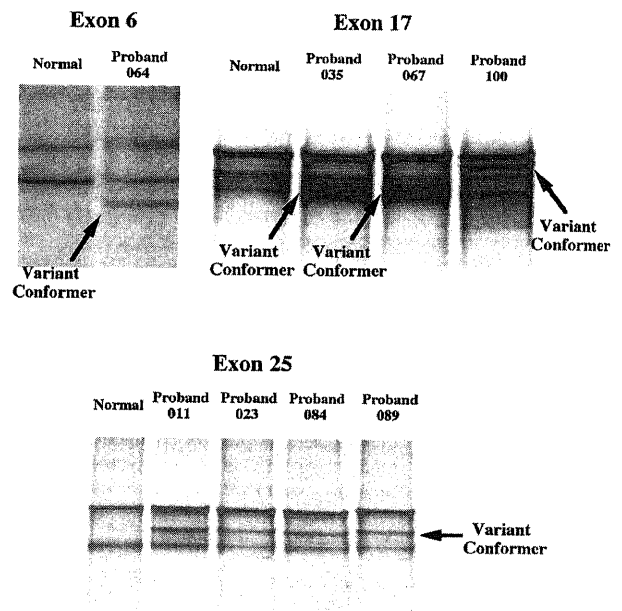


Fig. 1. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 6 (proband 064), exon 17 (proband 035, 067, and 100) and exon 25 (proband 011, 023, 084, and 089) of the cardiac myosin binding protein-C gene. The bars along the left side indicate the wild pattern (normal). The probands show the mutational patterns with variant conformer.

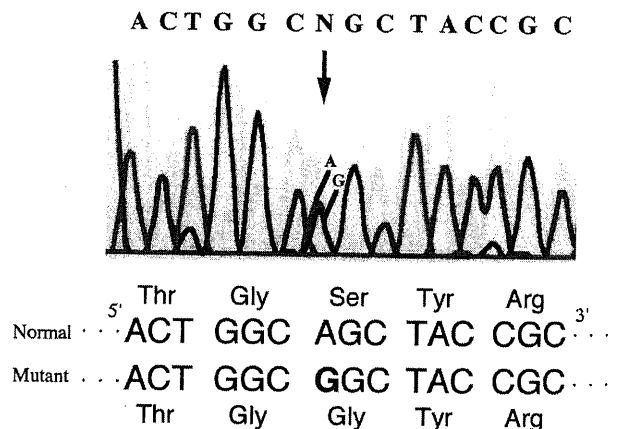


Fig. 2. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 6 of the cardiac myosin binding protein-C gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 064. The arrow indicates G peak of the mutant and A peak of the wild type.

3. エクソン17塩基配列の決定

1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン17のスクリーニングで、HCM発端者035, 067, 100において異常バンドが検出され(図1)、発端者035と067の異常バンドは同一パターンであった。

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定 (HCM発端者035, 067, 100)

HCM発端者035, 067のMyBP-C遺伝子エクソン17における塩基配列解析の結果、507番目のアミノ酸GlyをコードするコドンGGGがアルギニン(arginine,Arg)をコードするAGGへと変化する変異: Gly507Argが認められた(図3)。なお、変異したAのバンドは正常なGのバンドと共存しておりヘテロ接合体であった。発端者035の長女は心電図および心臓超音波検査上HCMであり、同様の変異が認められた。また発端者067の長女は、心電図および心臓超音波検査上正常者であり同様の変異は認められなかった。これよりこの遺伝子変異が病因である可能性が疑われたが、この変異も木村らによりアミノ酸変化を伴う遺伝的多型と報告されている変異であった。

HCM発端者100のMyBP-C遺伝子エクソン17における塩基配列解析の結果、イントロン(intron, Int)17のスプライス供与

部位(donor site, DS)の1番目のGがAに変化する変異: Int17DSG+1Aが認められた(図4)。なお、変異したAのバンドは正常なGのバンドと共存しておりヘテロ接合体であった。この変異は、エクソン17のエクソンスキッピングを起こしうる変異であり、同様の変異がMyBP-C遺伝子のイントロン23, 30において報告されているが、イントロン17についての報告はなく、新しい変異であった。

3) Int17DSG+1A変異によるHCMの臨床病型の検討

表2に発端者100の心臓超音波所見を示す。変異Int17DSG+1Aを認める発端者100は23歳時にHCMと診断されているが、30歳時の心臓超音波像上心室中隔壁厚、左室後壁厚がそれぞれ20 mm, 13 mmとASHを呈し、さらに僧帽弁の収縮期前方運動(systolic anterior movement, SAM)を認め閉塞性肥大型心筋症(hypertrophic obstructive cardiomyopathy, HOCM)であった。左室内径短縮率(fractional shortening, FS)は41%で左室収縮能は保たれており、左室拡張末期径(left ventricular end-diastolic dimension, LVDd)32 mmと左室内腔の拡大は認められなかった。表3に発端者100の心電図所見を示す。発端者100の心電図では、II, III, aVF, V4-5でQSパターン、V1-3でrSパターンであり、I,aVLで陰性T、I,aVL,V5-6でST低下を認めた。特にこの異常Q波は著明な中隔肥厚により中隔興奮による初期ベクトルが増大するためと考えられており^{63)~65)}、若年例に多い傾向があり、本例もそれと合致する。図5

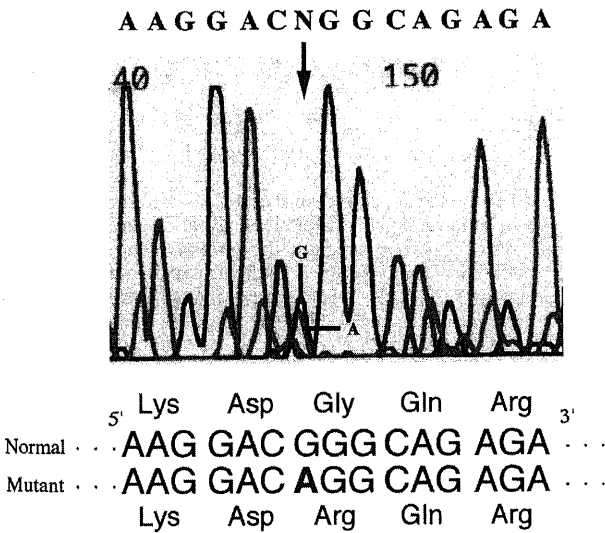


Fig. 3. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 17 of the cardiac myosin binding protein-C gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 035 and 067. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

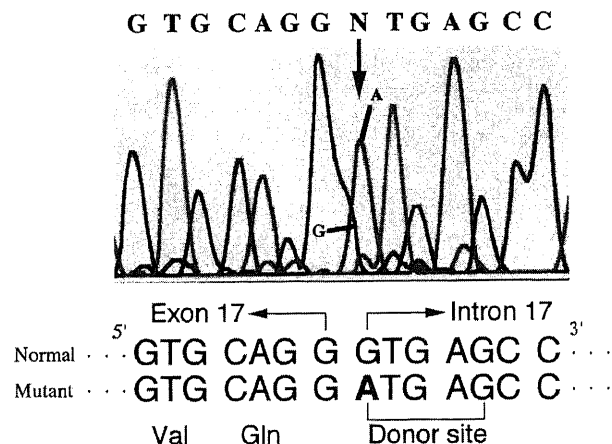


Fig. 4. Automated fluorescent direct sequencing of the intron 17 of the cardiac myosin binding protein-C gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 100. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

Table 2. Echocardiographic findings in the affected individuals with Int17DSG+1A in the cardiac myosin binding protein-C gene

Family	No.	Gender	Age (year)	IVST (mm)	PWT (mm)	IVST/PWT	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	ASH	SAM	D-HCM
100	II-1	M	30	20	13	1.5	32	19	41	+	+	-

IVST indicates interventricular septal wall thickness; PWT, left ventricular posterior wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; SAM, systolic anterior movement; D-HCM, dilated form of hypertrophic cardiomyopathy; M, male; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

Table 3. Electrocardiographic findings in the affected individuals with Int17DSG+1A in the cardiac myosin binding protein-C gene

Family	No.	Gender	Age (year)	Rhythm/HR (bpm)	PR Intervals (second)	QRS			ST-T change
						Width (sec)	Abnormal Q wave	SV1+RV5 (mV)	
100	II-1	M	30	SR/68	0.14	0.10	+	3.1	ST depression in I,aVL,V5,6 negative T in I,aVL

HR indicates heart rate; bpm, beat per minute; SV1, amplitude of S wave in V1 lead; RV5, amplitude of R wave in V5 lead; M, male; SR, sinus rhythm; +, presence of a finding.

Pedigree 100

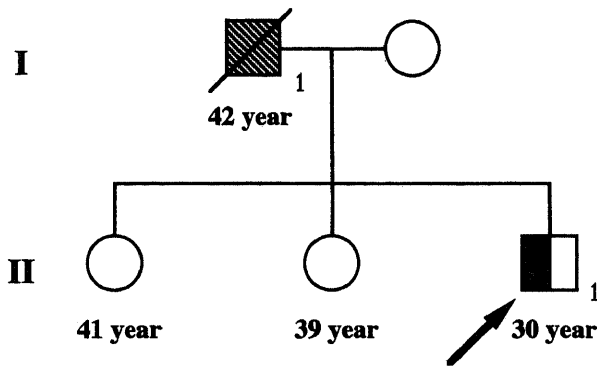
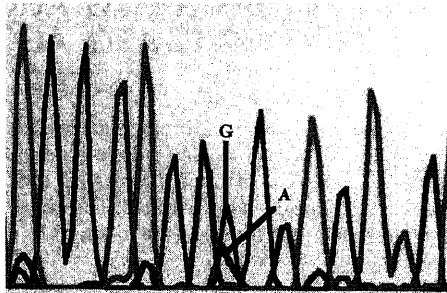


Fig. 5. The pedigree of family 100. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II indicate generations; \square , sudden death; \circ , not investigated; \blacksquare , mutation (heterozygote) present, clinically affected.

T G G A T G C N G C T G A A C



5' Trp Met Arg Leu Asn 3'
 Normal . . . TGG ATG CGG CTG AAC . . .
 Mutant . . . TGG ATG CAG CTG AAC . . .
 Trp Met Gln Leu Asn

Fig. 6. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 25 of the cardiac myosin binding protein-C gene. Each curve indicates A, adenine; C, cytosine; G, guanine; and T, thymine. The graph is the result of proband 011, 023, 084, and 089. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

Pedigree 011

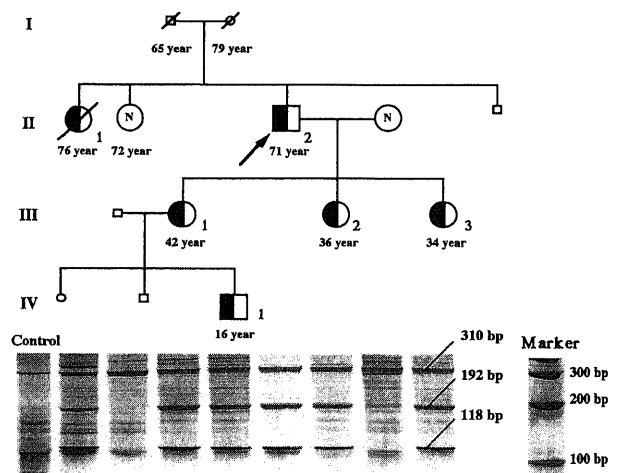


Fig. 7. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of family 011. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III, IV indicate generations; \square , \circ , deceased; \square , \circ , not investigated; \blacksquare , \bullet , heterozygous patient with Arg820Gln mutation in the exon 25 of the cardiac myosin binding protein-C gene; \otimes , mutation absent; Digestion of the PCR products with *Pvu* II generates polymorphic restriction fragments of 118 bp and/or 192 bp. All of the individuals with Arg820Gln mutation show 118 bp, 192 bp, and 310 bp fragments which indicate the heterozygotes for the mutation in the exon 25 of the cardiac myosin binding protein-C gene. Control, control patient; Marker, the molecular size marker.

に家系100の家系図を示す。この家系では父親 (I-1) が42歳で突然死していた。

4. エクソン25塩基配列の決定

1) PCR-SSCP法による異常バンドの検出

PCR-SSCP法によるエクソン25のスクリーニングで、HCM発端者011, 023, 084, 089において異常バンドが検出され (図1)、これらの異常バンドはいずれも同一パターンであった。

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定 (HCM発端者011, 023, 084, 089)

HCM発端者011, 023, 084, 089のMyBP-C遺伝子エクソン25における塩基配列解析の結果、820番目のアミノ酸ArgをコードするCGGがグルタミン (glutamine, Gln) をコードするCAG

Table 4. Echocardiographic findings in the affected individuals with Arg820Gln in the cardiac myosin binding protein-C gene

Family	No.	Gender	Age (year)	IVST (mm)	PWT (mm)	IVST/PWT	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	ASH	SAM	D-HCM
011	II-1	F	76	14	11	1.3	36	22	39	+	-	-
	II-2	M	71	16	10	1.6	58	45	22	+	-	+
	III-2	F	36	10	9	1.1	44	29	34	-	-	-
	III-3	F	34	10	9	1.1	42	24	41	-	-	-
	IV-1	M	16	19	10	1.9	42	25	40	+	+	-
023	I-1	F	75	11	10	1.1	50	38	24	-	-	-
	II-1	M	55	25	14	1.8	38	22	42	+	-	-
084	II-1	F	70	10	10	1.0	50	30	40	-	-	-
089	II-3	M	69	11	10	1.1	43	24	44	-	-	-
	II-4	F	68	12	10	1.2	40	26	35	-	-	-
	II-5	M	64	21	12	1.8	47	26	45	+	-	-

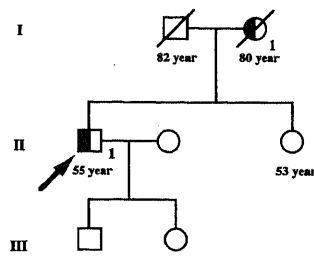
IVST indicates interventricular septal wall thickness; PWT, left ventricular posterior wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; SAM, systolic anterior movement; D-HCM, dilated form of hypertrophic cardiomyopathy; M, male; F, female; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

Table 5. Electrocardiographic findings in the affected individuals with Arg820Gln in the cardiac myosin binding protein-C gene

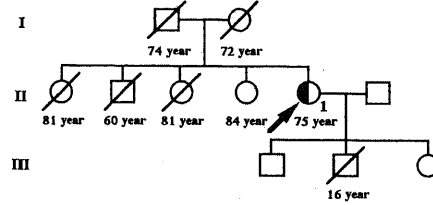
Family	No.	Gender	Age (year)	Rhythm/HR (bpm)	PR Intervals (second)	QRS			ST-T change
						Width (sec)	Abnormal Q wave	SV1+RV5 (mV)	
011	II-1	F	76	SR/89	0.11	0.08	-	3.3	ST ↓ in V5-6
	II-2	M	71	Af, PM	*	0.11	-	5.4	ST ↓ in II, III, aVF, V3-6 negative T in I, aVL
	III-1	F	42	SR/67	0.16	0.10	-	2.5	-
	III-2	F	36	SR/65	0.12	0.08	-	3.5	-
	III-3	F	34	SR/62	0.15	0.10	-	1.5	-
023	I-1	F	75	Af	*	0.12	+	2.8	negative T in I, aVL, V4-6
	II-1	M	55	SR/56	0.18	0.11	-	3.5	ST ↑ in V2-3, ST ↓ in II, III, aVF, V3-6 negative T in I, aVL, V2-6
084	II-1	F	75	SR/65	0.13	0.10	-	7.7	ST ↓ in I, II, aVL, V3-6 negative T in I, aVL, V3-6
089	II-2	F	77	SR/54	0.18	0.10	-	5.8	ST ↓ in I, II, aVL, V3-6 negative T in I, aVL, V2-6
	II-3	M	69	SR/55	0.18	0.12	+	2.7	ST ↑ in II, III, aVF, ST ↓ in I, aVL, V4-6 negative T in I, aVL, V5-6
	II-4	F	68	SR/55	0.18	0.10	-	2.4	ST ↑ in II, III, aVF, V5-6 negative T in aVL, V5-6
	II-5	M	64	SR/52	0.18	0.11	-	5.0	ST ↑ in III, aVF, V1-2, ST ↓ in I, aVL, V3-6 negative T in I, aVL, V2-6

HR indicates heart rate; bpm, beat per minute; SV1, amplitude of S wave in V1 lead; RV5, amplitude of R wave in V5 lead; M, male; F, female; SR, sinus rhythm; Af, atrial fibrillation; PM, pace maker; *, impossible to measure; -, absence of a finding; +, presence of a finding; ↓, depression; ↑, elevation.

Pedigree 023



Pedigree 084



Pedigree 089

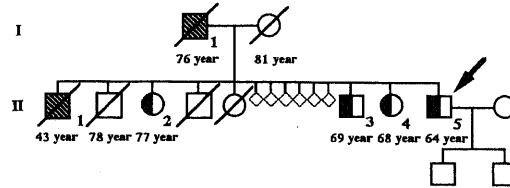


Fig. 8. The pedigrees of family 023, 084, and 089. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations; \square , \circ , \circledast deceased; \square , \circ not investigated; \blacksquare , \bullet mutation (heterozygote) present, clinically affected; \circ , mutation absent, clinically unaffected; \boxtimes , sudden death; \diamond , sex unknown.

へと変化する変異: Arg820Glnが認められた(図6)。なお、変異したAのバンドは正常なGのバンドと共存しておりヘテロ接合体であった。この変異もこれまでに報告がなく、新変異であった。

3) PCR-RFLP法による家系内での変異の確認(家系011)

プライマー CEX 25-5とCEX 25-3の組み合わせによるPCR産物(310 bp)は、遺伝子変異Arg820Glnがある場合にのみ制限酵素 *Pvu*IIにより118bpと192bpに切断される。図7に発端者011の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。発端者(II-2)を含めて6名(II-1, II-2, III-1, III-2, III-3, IV-1)に正常バンドと切断されたバンドの両方が認められ、いずれも変異Arg820Glnのヘテロ接合体であることが確認された。

4) Arg820Gln変異によるHCMの臨床病型の検討

図7で遺伝子変異が確認された家系011内の6名のうち発端者とその姉、次女、三女、孫の5人と、同一変異Arg820Glnが確認された家系023の発端者およびその母、家系084の発端者、家系089の発端者およびその兄と姉の合計11名の心臓超音波所見を表4に示す。11名中5名(45%)がASHを呈した。家系011の71歳の発端者はFSが25%未満と左室収縮能が低下し、かつLVDdが55mm以上と左室内腔が拡大する拡張型心筋症様病態を示していた。この家系011のII-2は30歳で心肥大を指摘されたが、この時左室収縮能は保たれていた。56歳時にHOCMと診断され、64歳時に非持続性心室頻拍が認められ、70歳時には心不全を発症して拡張相への移行を認めた。家系011の症例IV-1は、16歳と若年であるがすでに発症しており、Maron分類Ⅲ型の左室肥大とSAMを認めHOCMであった。なお、このII-2, IV-1両人も心臓カテーテル検査が施行されており、冠動脈には有意な器質的狭窄のないことが確認されている。家系011の症例II-1は、ASHは呈するものの壁肥厚は比較的軽度で高齢になっても拡張相への移行はなく、左室収縮能は保たれていた。また家系011の発端者の次女、三女にも遺伝子変異が認

められたが、心臓超音波検査上はまだHCMは顕性化していなかった。家系084の発端者は心尖部よりの中隔から心尖部にかけて肥大が強く、いわゆる心尖部肥大型心筋症であり、形態学的多様性が認められた。次に、この11名に家系011の発端者の長女(III-1)と家系089の長姉(II-2)を加えた計13名の心電図所見を表5に示す。13名中2名(15%)に心房細動、3名(23%)に異常Q波、7名(54%)に左室肥大、10名(77%)にST-T異常の所見が認められた。

以上の遺伝子検索と臨床像との結果をふまえ、図8に家系023, 084, 089の家系図を示す。家系089においては突然死症例が2例(I-1, II-1)認められた。

II. 新しいMyBP-C遺伝子変異の頻度調査

北陸地方の独立したHCM患者150名とその家系を対象とし、MyBP-C遺伝子変異の検索を行った結果、5家系(3.3%)に2種類の新しいMyBP-C遺伝子変異を発見した。なお、正常対照者100名において、これらと同様の遺伝子変異は認められなかった。またアミノ酸変化を伴う遺伝的多型2種類が150家系中3家系(2.0%)に認められた。

考 察

β -MHC遺伝子の変異がHCMの病因であると報告されて以来²¹⁾、現在までにTnT²²⁾、 α -TM²²⁾、MyBP-Cなど²³⁾合計9種類の遺伝子がHCMの原因遺伝子として同定、報告されている^{25)~28)}。これらはいずれも心筋のサルコメアを構成する蛋白をコードする遺伝子であることから、HCMはサルコメア病であると考えられるようになった。このうちMyBP-Cは細胞内免疫グロブリンスーパーファミリーに属するサルコメア蛋白であり、構造的および制御的役割をになっている。本研究では、このMyBP-Cの遺伝子変異について検討した。

近年、病因遺伝子とその臨床病型との関連が明らかにされ、HCMの遺伝子診断によって病因遺伝子から臨床病型および生

命予後の推測がある程度可能となった。また遺伝子変異を有していても肥大が顕性化していない症例も存在しており、遺伝子変異が判明した家系では変異の有無を確認することで特に若年者の発症前診断をすることが可能となった。

Nimuraら⁵⁵⁾は、 β -MHC遺伝子変異によるHCMは10歳代で90%以上の浸透率であり、TnTでも30歳代ではほぼ100%の浸透率を示すのに対し、MyBP-Cでは60歳以上になって初めて浸透率が90%を越えると報告している。またCharronら⁵⁶⁾は、MyBP-C遺伝子変異によるHCMでは発症年齢が 40.9 ± 19 歳と β -MHC遺伝子変異によるHCMの 34.6 ± 17 歳に比し有意に遅く、30歳以下での浸透率は β -MHC遺伝子変異によるHCMが62%であるのに対し41%と有意に低いと報告している。今回、同定された2つの新しいMyBP-C遺伝子変異においても30歳以下での浸透率は25%と低かったが、16歳、23歳という若年ですでに発症している症例も認められた。壁厚に関してCharronら⁵⁶⁾は、 β -MHC遺伝子変異によるHCMの最大壁厚が 16 ± 7 mmであるのに対し、MyBP-C遺伝子変異によるHCMの最大壁厚は 12 ± 4 mmと有意に薄いと報告している。さらに、他の報告においても中隔厚は β -MHC遺伝子変異では 21 ± 7 mm、MyBP-C遺伝子変異では 17 ± 7 mmと壁厚は軽度であるとされている。今回の症例においても心室中隔厚は平均15mmと壁厚は軽度であり、これまでの報告と合致していた。またTnT遺伝子変異で拡張相への移行が比較的多いのに対し、MyBP-C遺伝子変異では稀であると報告されている。このD-HCMについては、ten Cateら⁸⁾が初めて報告している。一般に、HCMでは拡張障害が特徴的所見として認められるものの、左室の拡大や収縮機能障害はみられない。しかしながら、本症にはその経過中に左室拡大、壁菲薄化、収縮機能障害が進展し、拡張型心筋症と類似の様相を呈する症例がある¹¹⁾⁻¹⁵⁾。頻度としては、文献的にはHCMの2~16%(平均8%)にみられると報告されており、今回の研究では5家系12名中1名(8%)に認められた。この移行について問題となるのは、はたして何歳頃にD-HCMへと移行するのか、さらにいかなる症例がD-HCMへと移行するのかということである。今回の1名では、家系011 II-2の男性で長期にわたる経過観察がなされている。30歳で心肥大を指摘され、56歳時にはHOCMと診断されたが、左室内腔の拡大を認めず、左室収縮能も保たれていた。しかしながら、70歳時にはD-HCMへと移行し、心不全症状を発症した。この発症者の姉は76歳で肺癌で死亡しているが、74歳の時点で中隔厚14mm、LV Dd 36mm、FS 39%であり、拡張相への移行はなく収縮能も保たれていた。また家系023のI-1や家系084のII-1は、いずれも70歳以上の女性であるが中隔厚の肥大は軽度で、拡張相への移行も認められなかった。これらの結果より、変異Arg820Glnでは女性よりも男性のほうが壁厚が高度で拡張型心筋症様病態へ移行しやすい可能性も推測される。今後、特に家系011において、発症者の娘(III-1,2,3)やその孫(IV-1)の心肥大の形態的变化を慎重に見守り加療していくことが重要である。

臨床像の多様性の1つとして、予後の違いがあげられるが、Watkinsら³⁰⁾やAnanら³⁸⁾は遺伝子変異におけるアミノ酸の荷電変化の有無が予後に関与していると報告している。 β -MHCの場合、荷電変化を伴うArgからGlnへの変異Arg403Glnの家系では70歳時の生存率が0であるのに対して、同じく β -MHC遺伝子の荷電変化を伴わないValin (Valine, Val) からメチオニ

ン (methionine, Met) への変異Val606Metでは0.95と荷電変化の有無がその予後に大きく関わることを示された。しかしながら、今回新しく見いだされたMyBP-C遺伝子変異Arg820Glnは荷電変化を伴っていたが、いずれの発症者の両親も長命であり、比較的予後良好と考えられた。このことから単に荷電変化の有無だけでは説明し難いように思われる。これに対し最近では、予後の違いに関して荷電変化よりも変異部位と機能との関係が注目されている。たとえば、 β -MHC遺伝子変異例では、変異がATP結合ドメイン、アクチン結合ドメイン、ミオシン軽鎖結合ドメインにあれば、比較的心肥大発現率が高く、拡張相への移行が見られ、予後不良と報告されている。MyBP-C遺伝子においてはタイチンやミオシンとの結合部位やリン酸化部位などが重要部位と考えられるが、Arg820Gln変異はその部位にはなく、このためおむね予後が良好であったのかもしれない。今回新しく見いだされたもう一つの変異Int17DSG+1A変異は、エクソン17のエクソンスキッピングが起こり、大きな構造変化を伴う変異である。発症者は30歳とまだ若く、また父親が42歳で突然死していることから今後さらに家系調査を進め、長期に渡る経過観察が必要であると考えられた。

以上のように病因遺伝子によって浸透率、肥大の程度や様式、生命予後が異なることが明らかにされてきているが、MyBP-C遺伝子変異によるHCMの中にも症例によっては従来の報告とは異なり、若年発症したり、拡張相へ移行したり、突然死する症例などもあり注意を要するものと考えられた。

今回の研究により、MyBP-C遺伝子イントロン17のInt17DSG+1Aが1家系、エクソン25のArg820Glnが4家系に、合計2種類の新しい遺伝子変異が認められた。これにより北陸地方のHCMの3.3%を説明できる。但し、欧米ではMyBP-C遺伝子変異はHCMの病因の約10%を説明するといわれている。今回はこれまでに遺伝子変異の報告の多いエクソン、いわゆるホットスポットと考えられるエクソン6,7,14-15,17,23,25,30,31の9エクソンについて検討を行ったが、MyBP-C遺伝子には35のエクソンがあり、今後残りのエクソンに関しても詳細に検索を進める必要がある。

結 論

日本人HCM患者において、新しいMyBP-C遺伝子変異をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検索し以下の結果を得た。

1. 1家系において、MyBP-C遺伝子Int17のDSの1番目のGがAに変化する変異Int17DSG+1Aを検出した。この変異はこれまでに報告がなく新変異であった。
2. 4家系13名において、MyBP-C遺伝子エクソン25の820番目のアミノ酸ArgをコードするコドンCGGがGlnをコードするコドンCAGへと変化する変異Arg820Glnを検出した。この変異もこれまでに報告がなく新変異であった。
3. 今回新しく見つかったMyBP-C遺伝子変異Arg820GlnによるHCMは、比較的予後良好と考えられたが、家系内に若年発症例、拡張相への移行例、突然死例が存在し、特に臨床病型と性差につき、さらに検討が必要と考えられた。またInt17DSG+1A変異では、壁厚が著明で若年発症や突然死例も認められ、従来の報告とは異なり慎重な対応が必要と考えられた。
4. 臨床診断されたHCM150症例を対象として、MyBP-C遺

伝子エクソン6,7,14-15,17,23,25,30,31の検討を行い、5家系に2種類の新しい遺伝子変異を検出した。これにより、北陸地方のHCMの3.3%が説明された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師馬淵宏教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座清水賢巳助教授に心から謝意を表します。また御助言、御協力を戴きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座岡田俊英講師、井野秀一講師に厚く御礼申し上げます。また多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座第四研究室の各位ならびに高分子DNAの採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、池多亜沙子氏、谷口尊子氏に感謝いたします。

本研究の一部は第63回日本循環器学会学術集会(1999年, 東京)および、第64回日本循環器学会学術集会(2000年, 大阪)において発表した。

文 献

- 1) Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* 20: 1-8, 1958
- 2) Braunwald E, Morrow AG, Cornell WP, Aygen MM, Hilbish TF. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis: Clinical, hemodynamic and angiographic manifestations. *Am J Med* 29: 924-945, 1960
- 3) Henry WL, Clark CE, Epstein SE. Asymmetric septal hypertrophy (ASH): Echocardiographic identification of the pathognomonic anatomic abnormality of IHSS. *Circulation* 47: 225-233, 1973
- 4) Maron BJ, Gottdiener JS, Epstein SE. Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients. *Am J Cardiol* 48: 418-428, 1981
- 5) Sakamoto T, Tei C, Murayama M, Ichiyasu H, Hada Y, Hayashi T, Amano K. Giant T wave inversion as a manifestation of asymmetrical apical hypertrophy (AAH) of the left ventricle: Echocardiographic and ultrasono-cardiotomographic study. *Jpn Heart J* 17: 611-629, 1976
- 6) Forissier JF, Carrier L, Farza H, Bonne G, Bercovici J, Richard P, Hainque B, Townsend PJ, Yacoub MH, Fauré S, Dubourg O, Millaire A, Hagege AA, Desnos M, Komajda M, Schwartz K. Codon 102 of the cardiac troponin T gene is a putative hot spot for mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 94, 3069-3073, 1996
- 7) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, J. O'Connell, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842, 1996
- 8) ten Cate FJ, Roelandt J. Progression to left ventricular dilatation in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Am Heart J* 97: 762-765, 1979
- 9) Spirito P, Maron BJ, Bonow RO, Epstein SE. Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 59: 123-129, 1987
- 10) Shite J, Yokota Y, Takeuchi Y, Ueno H, Nakatani M, Tsumura Y, Kawai H, Kawashima T, Fukuzaki H. Clinical and pathological assessment in patients with hypertrophic cardiomyopathy simulating dilated cardiomyopathy (abstr). *Jpn Circ J* 54: 787, 1990
- 11) Kawashima T, Yokota Y, Yokoyama M, Itoh H. Pathological analysis of hypertrophic cardiomyopathy simulating dilated cardiomyopathy. *Acta Pathol Jpn* 43: 304-312, 1993
- 12) Adachi K, Tanaka H, Ogata M, Yamashita Y, Sugi K, Terasawa M, Ohta K, Koga Y, Toshima H, Umezu T, Morimatsu M, Takahashi N. An advanced form of familial hypertrophic cardiomyopathy showing massive myocardial fibrosis with intramural small arterial thickening: An autopsy case. *Jpn Heart J* 26: 867-877, 1985
- 13) Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 8: 545-557, 1986
- 14) St. John Sutton MG, Lie JT, Anderson KR, O' Brien PC, Frye RL. Histopathological specificity of hypertrophic obstructive cardiomyopathy: Myocardial fibre disarray and myocardial fibrosis. *Br Heart J* 44: 433-443, 1980
- 15) Maron BJ, Roberts WC, Epstein SE. Sudden Death in hypertrophic Cardiomyopathy: A profile of 78 patients. *Circulation* 65: 1388-1394, 1982
- 16) McKenna W, Deanfield J, Faruqui A, England D, Oakley C, Goodwin J. Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: Role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol* 47: 532-538, 1981
- 17) Wynne J, Braunwald E. The cardiomyopathies and myocarditides. In E Braunwald (eds), *Heart Disease*, 5th ed, p1404-1463, Saunders WB, Philadelphia, 1997
- 18) Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kuroski TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation* 92: 785-789, 1995
- 19) Maron BJ, Nichols III PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: Assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 53: 1087-1094, 1984
- 20) Jarcho JA, McKenna W, Pare P, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, Levi T, Donis-Keller H, Seidman JG, Seidman CE. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 321:1372-1378, 1989
- 21) Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62: 999-1006, 1990
- 22) Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. α -tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic

- cardiomyopathy : A disease of the sarcomere. *Cell* 77: 701-712, 1994
- 23) Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet* 11: 434-437, 1995
- 24) Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J, Weissenbach J, Vosberg HP, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet* 11: 438-440, 1995
- 25) Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nature Genet* 13: 63-69, 1996
- 26) Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 16: 379-382, 1997
- 27) Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD. α -cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 103: 39-43, 1999
- 28) Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy : Identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 411-417, 1999
- 29) Rosenzweig A, Watkins H, Hwang DS, Miri M, McKenna W, Traill TA, Seidman JG, Seidman CE. Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med* 325: 1753-1760, 1991
- 30) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326: 1108-1114, 1992
- 31) Nishi H, Kimura A, Harada H, Toshima H, Sasazuki T. Novel missense mutation in cardiac β myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 379-387, 1992
- 32) Watkins H, Thierfelder L, Hwang DS, McKenna W, Seidman JG, Seidman CE. Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *J Clin Invest* 90: 1666-1671, 1992
- 33) Epstein ND, Cohn GM, Cyran F, Fananapazir L. Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the β -myosin heavy chain gene; A 908Leu \rightarrow Val mutation and a 403Arg \rightarrow Gln mutation. *Circulation* 86: 345-352, 1992
- 34) Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F, Cohn G, Epstein ND. Missense mutations in the β -myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3993-3997, 1993
- 35) Dausse E, Komajda M, Fetler L, Dubourg O, Dufour C, Carrier L, Wisniewsky C, Bercovici J, Hengstenberg C, Al-Mahdawi S, Isnard R, Hagege A, Bouhour JB, Desnos M, Beckmann J, Weissenbach J, Schwartz K, Guichney P. Familial hypertrophic cardiomyopathy : Microsatellite haplotyping and identification of a hot spot for mutations in the β -myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 92: 2807-2813, 1993
- 36) Harada H, Kimura A, Nishi H, Sasazuki T, Toshima H. A missense mutation of cardiac β -myosin heavy chain gene linked to familial hypertrophic cardiomyopathy in affected Japanese families. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 791-798, 1993
- 37) Dufour C, Dausse E, Fetler L, Dubourg O, Bouhour JB, Vosberg HP, Guicheney P, Komajda M, Schwartz K. Identification of a mutation near a functional site of the β cardiac myosin heavy chain gene in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1241-1247, 1994
- 38) Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, Vecchio C, Shono H, Nakao S, Tanaka H, Mares A Jr., Towbin JA, Spirito P, Roberts R, Seidman JG, Seidman CE. Prognostic implications of a novel β cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 93: 280-285, 1994
- 39) Consevage MW, Salada GC, Baylen BG, Ladda RL, Rogen PK. A new missense mutation, Arg719Gln, in the β -cardiac heavy chain myosin gene of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 3: 1025-1026, 1994
- 40) Nishi H, Kimura A, Harada H, Adachi K, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H. Possible gene dose effect of a mutant cardiac β -myosin heavy chain gene on the clinical expression of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 549-556, 1994
- 41) Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Eguchi N, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. A novel deletion mutation in the β -myosin heavy chain gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2607-2612, 1995
- 42) Kato M, Takazawa K, Kimura A, Ruegg JC, Amano K, Wang Y, Sakaki Y, Toyo-oka T. Altered actin binding with myosin mutation in hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *Lancet* 345: 1247, 1995
- 43) Arai S, Matsuoka R, Hirayama K, Sakurai H, Tamura M, Ozawa T, Kimura M, Inamura S, Furutani Y, Joh-o K, Kawana M, Takao A, Hosoda S, Momma K. Missense mutation of the β -cardiac myosin heavy-chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 58: 267-276, 1995
- 44) Moolman JC, Brink PA, Corfield VA. Identification of a novel Ala797Thr mutation in exon 21 of the β -myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 6: 197-198, 1995
- 45) Nishi H, Kimura A, Harada H, Koga Y, Adachi K,

- Matsuyama K, Koyanagi T, Yasunaga S, Imaizumi T, Toshima H, Sasazuki T. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91: 2911-2915, 1995
- 46) Kuang SQ, Yu JD, Lu L, He LM, Gong LS, Chen SJ, Chen Z. Identification of a novel missense mutation in the cardiac β -myosin heavy chain gene in a Chinese patient with sporadic hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1879-1883, 1996
- 47) Cuda G, Perrotti N, Perticone F, Mattioli PL. A previously undescribed de novo insertion-deletion mutation in the β myosin heavy chain gene in a kindred with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 76: 451-452, 1996
- 48) Kimura A, Symposium on gene abnormalities in medical diseases. 3. Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Japan. *Intern Med* 36: 152-154, 1997
- 49) Marian AJ, Yu QT, Mares A Jr., Hill R, Roberts R, Perryman MB. Detection of a new mutation in the β -myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 90: 2156-2165, 1992
- 50) Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O' Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the genes for cardiac troponin T and α -tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 332: 1058-1064, 1995
- 51) Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 29: 549-555, 1997
- 52) Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Fujio Y, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Novel missense mutation in cardiac troponin T gene found in Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 29: 839-843, 1997
- 53) Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Novel missense mutation in α -tropomyosin gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2053-2058, 1995
- 54) Yamauchi-Takahara K, Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Fujio Y, Kunisada K, Nagata S, Kishimoto T. Clinical implications of hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations in the α -tropomyosin gene. *Heart* 76: 63-65, 1996
- 55) Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 338: 1248-1257, 1998
- 56) Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagege A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation* 97: 2230-2236, 1998
- 57) Fisch C. Electrocardiography. In E Braunwald (eds), *Heart Disease*, 5th ed, p108-152, Saunders WB, Philadelphia, 1997
- 58) Feigenbaum H. Echocardiography. In E Braunwald (eds), *Heart Disease*, 5th ed, p53-107, Saunders WB, Philadelphia, 1997
- 59) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridisation analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984
- 60) Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege AA, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 80: 427-434, 1997
- 61) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1981
- 62) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 63) Maron BJ, Wolfson JK, Ciró E, Spirito P. Relation of electrocardiographic abnormalities and patterns of left ventricular hypertrophy identified by 2-dimensional echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 51: 189-194, 1983
- 64) Estes EH Jr., Whalen RE, Roberts SR Jr., McIntosh HD. The electrocardiographic and vectorcardiographic findings in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. *Am Heart J* 65: 155-161, 1963
- 65) Braudo M, Wigle ED, Keith JD. A distinctive electrocardiogram in muscular subaortic stenosis due to ventricular septal hypertrophy. *Am J Cardiol* 14: 599-607, 1964

Molecular Genetic Analysis of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy With Mutations in the Cardiac Myosin Binding Protein-C Gene Toru Matsuyama, The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Jusen Med Soc., **109**, 203 - 215 (2000)

Key words hypertrophic cardiomyopathy, cardiac myosin binding protein-C gene, asymmetrical septal hypertrophy, dilated form of hypertrophic cardiomyopathy, gene mutation

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by a disproportionate left and/or right ventricular hypertrophy with particular involvement of the interventricular septum. Previously HCM was defined as a heart muscle disease of unknown etiology. However, HCM is familial in the majority of cases and is transmitted as an autosomal-dominant trait. Recently, molecular genetic studies have shown that familial HCM is a disease of the sarcomere involving mutations in nine different genes encoding proteins of the myofibrillar apparatus. This study was performed to examine the prevalence of the myosin binding protein-C (MyBP-C) gene mutation in patients with HCM in the Hokuriku district. The MyBP-C gene was amplified by PCR, and variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Subsequent direct sequencing of the PCR products determined the mutations. The mutations were confirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). One new truncation mutation and one new missense mutation in the MyBP-C gene were identified in five probands with HCM. The first mutation was a G-to-A transition in the donor site (DS) of intron (Int) 17 (Int17DSG+1A) found in one individual from one family. The second mutation was a G-to-A transition in exon 25, resulting in amino acid substitution of Gln for Arg at codon 820 (Arg820Gln). Two novel mutations (Int17DSG+1A, Arg820Gln) in the MyBP-C gene were identified in five (3.3%) of the 150 HCM probands. The prognosis of patients with these novel mutations of the MyBP-C gene is better than that associated with the β -myosin heavy chain gene and the cardiac troponin T gene. However, some patients with Int17DSG+1A and Arg820Gln have early onset and progress to the state of hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM) and dilated form of hypertrophic cardiomyopathy (D-HCM) and, additionally, there are several cases of sudden death among family members. Therefore, patients with these mutations, especially males, need careful long-term management and observation.