

心筋トロポニンT遺伝子変異に伴う家族性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/2297/9400

心筋トロポニンT遺伝子変異に伴う家族性肥大型心筋症の 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)

藤 野 陽

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy) は心筋の異常な肥大と心室の拡張期コンプライアンスの低下を基本病態とする原因不明の心筋疾患であると定義されてきたが、約半数が家族性であり、常染色体優性遺伝形式を示すことが知られていた。最近の分子遺伝学的解析により、心筋 β ミオシン重鎖、心筋トロポニンT、 α -トロポミオシン、心筋ミオシン結合蛋白-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の7種類の遺伝子変異がその原因であると報告されている。しかしながら、本症における遺伝子変異の頻度、地域差、遺伝型と臨床病型の関係など、未だ十分には解明されていない。本研究では、北陸地方における家族性肥大型心筋症家系の遺伝子変異について、心筋トロポニンT遺伝子変異を中心に検討した。対象者の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて、心筋トロポニンT遺伝子のエクソン8, 9のそれぞれに対応したプライマーを設計しPCRによりDNA断片を増幅させ、PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism) 法および直接塩基配列決定法 (direct sequence) を用いて遺伝子変異の確定を行った。さらにPCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法により遺伝子変異を確認した。臨床的に診断された家族性肥大型心筋症140症例の検討の結果、2症例の家系10名において心筋トロポニンT遺伝子エクソン9の92番目のアミノ酸アルギニンをコードするコドンCGGがトリプトファンをコードするコドンTGGへと変化する変異, Arg 92 Trpを見出した。これらの2家系内には、その家族歴において突然死が3名認められた。遺伝子変異を認めた10名中、拡張型心筋症様病態を示す例が3名、非対称性中隔肥厚 (asymmetrical septal hypertrophy, ASH) を示す例が5名、心電図異常のみを示す例が1名、臨床症状を示さない例が1名認められた。本遺伝子変異においては、突然死例、及び拡張型心筋症様病態を示し心不全を呈する症例が合計6名存在し、予後不良な遺伝子変異と考えられた。また、他の1症例の家系において同じくエクソン9の110番目のアミノ酸フェニルアラニンにコードするコドンTTTがイソロイシンをコードするコドンATTへと変化する変異, Phe 110 Ileを、別の1症例の家系においてエクソン8の85番目のアミノ酸バリンをコードするコドンGTGがロイシンをコードするコドンTTGへと変化する新たな変異, Val 85 Leuを見出した。これら2家系の発端者はいずれもASHを示した。この他、1つのサイレント変異Ile 106 Ileを41症例 (ホモ接合体, 3症例; ヘテロ接合体, 38症例) に認めたが、正常対照者より高頻度とはいえなかった。4家系の家族性肥大型心筋症において、新たな変異Val 85 Leuを含めArg 92 Trp, Phe 110 Ileと合計3種類の心筋トロポニンT遺伝子 (エクソン8, エクソン9) の変異を認め、北陸地方の家族性肥大型心筋症患者の2.9%が説明された。なかでも、心筋トロポニンT遺伝子変異Arg 92 Trpに伴う家族性肥大型心筋症家系では、突然死例、及び拡張型心筋症様病態を示す例が多く、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 familial hypertrophic cardiomyopathy, cardiac troponin T gene, dilated cardiomyopathy-like feature, gene mutation

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) は、大動脈弁狭窄症や高血圧など心筋肥大を引き起こす原因疾患を合併することなく心室壁の著明な肥厚を示し、心室拡張期流入障害を呈する疾患である¹⁾。心臓超音波像上拡張末期の心室中隔と左室後壁の比が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である^{2,3)}。その形態について、Maronら⁴⁾は僧帽弁レベルでの左室短軸断層心臓超音波像所見より4型に分

類している。その他に、日本人肥大型心筋症患者に特有の、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。この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家系が報告されている⁶⁾。本症では一般に心筋収縮能は正常であるかまたは亢進しており、左室内腔は正常であるかまたは縮小している⁷⁾。

平成10年11月30日受付, 平成10年1月14日受理

Abbreviations: Arg, arginine; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; bp, base pair; DCM, dilated cardiomyopathy; DCM-like features, dilated cardiomyopathy-like features; dd, dideoxy; FS, fractional shortening; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; Ile, isoleucine; Leu, leucine; LVDD, left ventricular end-diastolic dimension; PCR-RFLP, PCR-

しかしながら、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、拡張型心筋症様病態を示すHCMとして注目されている⁴⁹⁻⁵³。また、病理学的には心筋の錯綜配列、及び心筋線維化所見が特徴である¹⁰。

HCMの死因の過半数が突然死であり、若年者、特に運動競技者の突然死の原因の第1位がHCMである¹⁰。さらに、本症の突然死は前駆症状に欠ける場合が多い¹⁰。HCM患者の85%には何らかの心電図異常がみられること¹²、最近の研究にて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たこと¹⁰より本症の早期診断が重要となっている。

HCMの病因は1980年代前半まで不明であったが、約50~60%に家族発症が認められ、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¹⁰。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年に心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異がその病因であることが示された²¹。さらに、心筋トロポニンT遺伝子²²、 α -トロポミオシン遺伝子²³、心筋ミオシン結合蛋白-C遺伝子²⁴、2種類のみオシン軽鎖遺伝子²⁵ (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²⁶の遺伝子変異が病因の家系も報告された。これら7種類の遺伝子はすべて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。

このような分子遺伝学的解析の進歩に伴い、それぞれの病因遺伝子の頻度、遺伝子型-臨床病型連関の解析が進みつつある。心筋 β ミオシン重鎖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、38種類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, 40}。心筋トロポニンT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^{22, 42, 49}。臨床病型については、心筋トロポニンT遺伝子変異によるHCM患者では左室最大壁厚の平均が、 β ミオシン重鎖遺伝子変異によるHCM患者に比べて有意に低値を示すことが報告されている³⁷。その他、 α -トロポミオシン、心筋ミオシン結合蛋白-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3%、10%、1%、1%、3%を占めるといわれているが地域差があり、未だ詳細は明らかではない。^{23, 25, 50, 52}

したがって、本邦特に北陸地方におけるHCM患者家系についても遺伝子解析を行い、遺伝子型と臨床病型との関連を調べ、その頻度、それぞれの遺伝型に特異的な臨床像をつきとめHCM患者とその家族の加療、経過観察の指標とする必要がある。

本研究では臨床的にHCMと診断された患者を対象として心筋トロポニンT遺伝子変異を検索し、その病因としての頻度、遺伝子変異に伴う臨床像について検討した。

対象及び方法

I. 対象

対象は、心電図、心臓超音波所見上Fisch⁵⁴やFeigenbaum⁵⁰の診断基準を満たす、金沢大学第二内科及びその関連施設

に通院、入院している北陸地方のHCM患者発端者140名である。これら臨床診断されたHCM患者を以下の検討の対象とした。

1. 心筋トロポニンT遺伝子変異に伴うHCMの臨床病型についての検討
2. 北陸地区HCM患者における、心筋トロポニンT遺伝子変異の頻度の検討

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、-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⁵⁵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. PCR

Nakajimaら⁴⁹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心筋トロポニンT遺伝子配列から、エクソン8とエクソン9について20塩基長のプライマー計2組を作成した (TEX 8-5, 8-3, TEX 9-5, 9-3; 表1)。Tm値の解析にはMacMeltTMソフトウェア (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を使用した。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⁵⁶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10 μ Mになるように濃度を調整した。

DNA断片の増幅にはSaikiら⁵⁷によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 μ gを鋳型DNAとして40 μ Mのプライマー1セットと終濃度200 μ Mの各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, TTP) と2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA) 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50 μ lとなるように加え攪拌した。遠心して反応液を集め50 μ lのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ、94℃1分、それぞれのプライマーのTm (エクソン8、55℃; エクソン9、60℃) で1分、74℃1分を基本にそれぞれのセット毎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

restriction fragment length polymorphism; PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; Phe, phenylalanine; Trp, tryptophan; Val, valine

ーカーとしてΦ-X174/HaeIII消化物(東洋紡, 東京)と共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3000mlにしたものを保存用の5×Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA) 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 2 μl, 5N NaOH 10 μl, 滅菌再蒸留水 88 μlを混合しアルカリ溶液を作り, PCR産物 8 μlにアルカリ溶液 2 μl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40V, 24時間で泳動した。

染色にはBIO-RAD銀染色キット(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)を用い, プロトコールに従って銀染色を行った。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30秒以内に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内に入れて保存した。

4. 非ラジオアイソトープ直接塩基配列決定法(direct sequencing)

PCRで増幅したDNA断片を1%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとしてΦ-X174/HaeIII消化物(東洋紡, 東京)と共に泳動し, 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25 μl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, 及びスクレオチドを除去し鋳型DNAとした。

Higuchiら²⁰⁾のプロトコールに従ってTthポリメラーゼを用いた非ラジオアイソトープDNAシーケンシングキット(シーケンシングハイプラス, 東洋紡)で反応を行った。

すなわち鋳型DNA 0.2-4 μg, 1 μMプライマー 2 μl, サイク

ルシーケンシング反応用緩衝液 3 μl, デオキシ (deoxy, d) NTP溶液 1-2 μl, 反応直前に希釈用緩衝液で4単位/μlとしたTthポリメラーゼ 1 μlに再滅菌蒸留水を総量 17 μlとなるように追加し攪拌の上遠心したものを4 μlずつとり, 反応用マイクロチューブにとり冷却しておいた各デオキシジデオキシ (dideoxy, dd) GTP, デオキシデオキシATP, デオキシデオキシTTP (Mg⁺), デオキシデオキシCTP (Mg⁺) 溶液 2 μlずつに加えた。この際デオキシデオキシTTP, デオキシデオキシCTPにはそれぞれデオキシデオキシTTP : MgCl₂ = 1 : 1, デオキシデオキシCTP : MgCl₂ = 3 : 1の割合でMgCl₂を調整した。これに50 μlのミネラルオイルを上に加えた。エクソン8の場合, 95℃, 30秒, 55℃, 15秒, 60℃240秒で30回反応, エクソン9の場合, 95℃, 30秒, 60℃, 255秒で30回反応させ終了後に反応停止液 4 μlを加え-20℃に保存し, 泳動直前に80℃, 2分に続き0℃に急冷し泳動した。

その上で, 8%のポリアクリルアミドで電圧1500V, 100分の電気泳動を行い, 終了後ゲルに専用メンブラン (Hybond™-N⁺, Amersham) を貼付し8時間以上ブロッキングした。ブロッキング終了後デオキシデオキシ系による標識系とアルカリフォスファターゼ-PPDによる検出系を利用した非ラジオアイソトープ検出キット(イメージングハイケルミー, 東洋紡)を用いてデオキシデオキシDNAを化学発光させ, X線フィルムに2-3時間露光しオートラジオグラムを得た。

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特定の制限酵素で切断部位が生じるようにプライマーを設計した(TEX 9-5-NF, 表1)。一側に通常のプライマーを, 反対側に変異プライマーを用い, 温度条件を再度調節したうえでPCR法により強制的に変異配列を導入したDNA断片を増幅した。その上でピペットにてミネラルオイルの下層よりPCR産物を取り出し, 切断部位に応じた制限酵素とその反応用緩衝液を加え酵素の最適温度条件下にて6時間反応させた。反応産物を10-20%濃度勾配アクリルアミドゲルに適当な大きさの鎖長マーカーと共に泳動して切断の有無で変異の検出を行った。

6. 家系内調査

心筋トロポニンT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, 可能な限りの家族に来院してもらい, 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

Table 1. Oligonucleotide primers flanking the exons of the cardiac troponin T gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
8	TEX 8-5	5'-TGCTGACTATTCCTCTCTCC-3'
	TEX 8-3	5'-AAATCTCTGTCAGTGGCC-3'
9	TEX 9-5	5'-TGA CTCTGTGTGGCAGCCT-3'
	TEX 9-3	5'-TGTTAGGTGGGCAGACTGGA-3'
	TEX 9-5-NF	5'-TCCACCCACAGGACATCCCC-3'

Oligonucleotide primers complementary to DNA sequences flanking exons of the human cardiac troponin T gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

した。

成 績

I. 心筋トロポニンT遺伝子解析

1. PCR-SSCPの結果

HCM発端者140例に対するPCR-SSCP法による検討の結果、図1に示すように心筋トロポニンT遺伝子エクソン9において3

人、エクソン8において1人、異常バンドが認められた。異常バンドが認めら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行った。

2. エクソン9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9のスクリーニングで、HCM発端者004、022において異常バンドが検出された(図1)。発端者

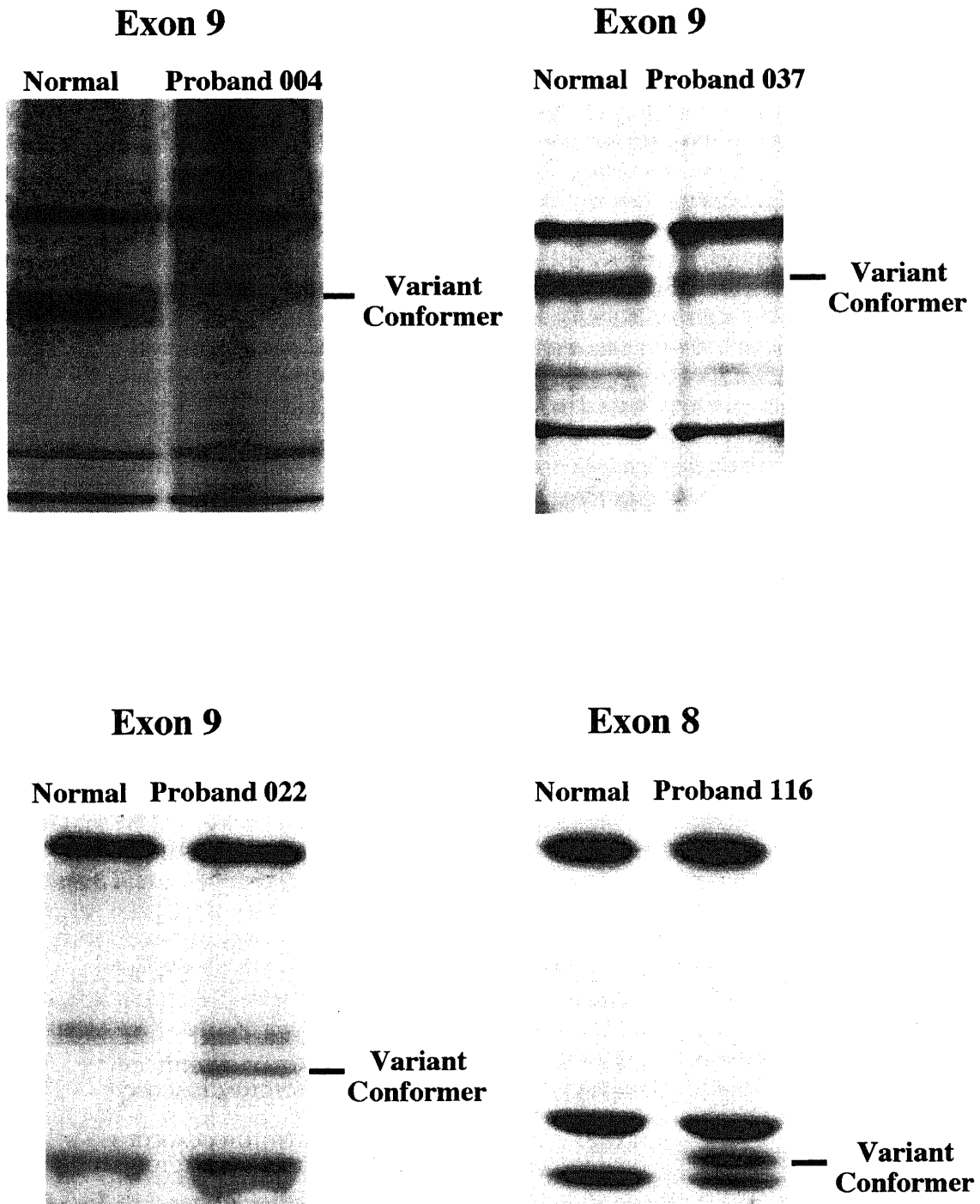


Fig. 1. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 9 (proband 004, 037 and 022) and exon 8 (proband 116) of cardiac troponin T gene. The bars along the left side indicate the wild pattern (normal). The probands show the mutational patterns with variant conformer.

037においても、発端者004と同様の異常バンドが検出された。

2) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定 (家系004, 037)

発端者004の心筋トロポニンT遺伝子エクソン9における塩基配列解析の結果、92番目のアルギニン (arginine, Arg) をコードするCGGがトリプトファン (tryptophan, Trp) をコードするTGGへと変化していた (図2)。変異したTのバンドと正常なCのバンドが共存しており、変異Arg92Trpのヘテロ接合体であった。家系004において、発端者を含めて8名に同一の変異が

認められた。同一の変異が、発端者037にも認められた。

3) PCR-RFLP法による家系内での変異の確認 (家系004)

プライマーTEX 9-5-NFとTEX 9-3の組み合わせによるPCR産物 (155塩基対 (base pair, bp)) は、遺伝子変異Arg92Trpがある場合のみ制限酵素Mva-1により135bpと20bpに切断される。図3に発端者004の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。発端者を含めて8名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Arg92Trpのヘテロ接合体であることが確認された。

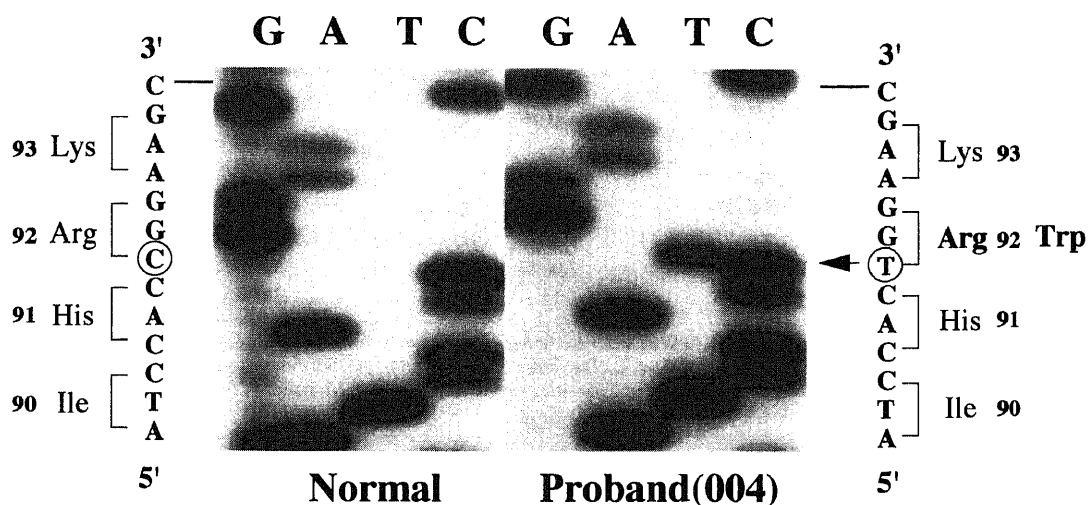


Fig. 2. Sequencing analysis in the exon 9 of cardiac troponin T gene. The circles at the both sides indicate the position of C to T mutation at the codon 92. Proband (004) shows the coexistence of the mutational band (T) and wild band (C), indicating the heterozygote of this mutation. Lys, lysine; Arg, arginine; Trp, tryptophan; His, histidine; Ile, isoleucine.

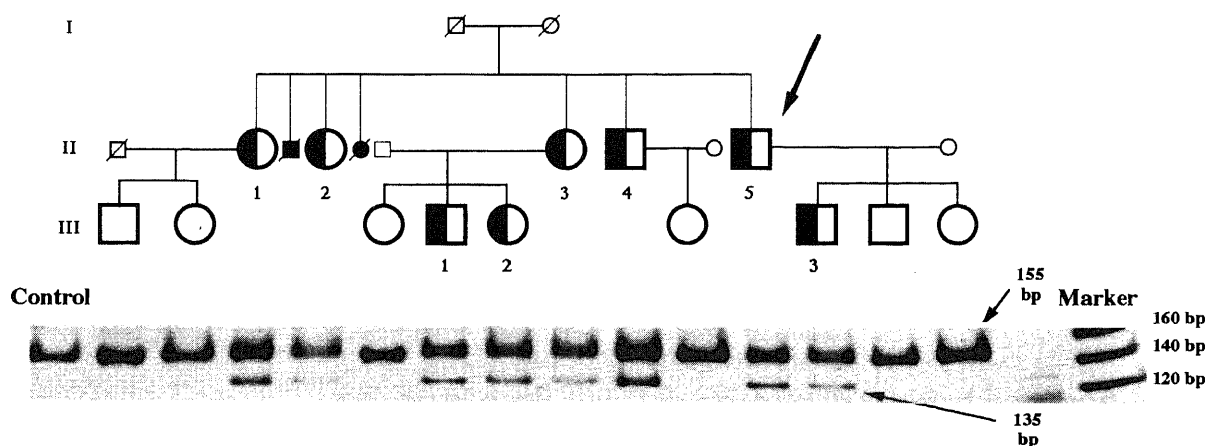


Fig. 3. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of 004 family. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. \blacksquare , heterozygous patient with Arg 92 Trp mutation in the exon 9 of cardiac troponin T gene; \square , deceased; \blacksquare , sudden death; Digestion of the PCR products with Mva-I generates polymorphic restriction fragments of 155 bp and / or 135 bp. All of the individuals with Arg 92 Trp mutation show both 155 bp and 135 bp fragments which indicate the heterozygotes for the mutation in the exon 9 of cardiac troponin T gene. Control, control patient; Marker, the molecular size marker.

4) 同変異での臨床像の検討

図3で遺伝子変異が確認された家系004内の8名と、同一変異Arg92Trpが確認された家系037内で遺伝子変異を認めた2人(発端者II-1とその妹II-2)を含めた合計10名の、1998年現在の心臓超音波所見を表2に示す。10名中左室内径短縮率(fractional shortening, FS)が25%未満と左室収縮能が低下し、左室拡張末期径(left ventricular end-diastolic dimension, 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す症例が3名認められた(家系004のII-1, II-4, II-5)。この3名のうち、症例II-1は、47歳時にはASHを示し左室収縮能が保

たれていた。それが60歳時には心不全を発症し、心臓超音波像上拡張型心筋症様病態を呈していた。以後、65歳現在まで少しずつ心不全症状が増悪しつつある。症例II-4は、ASHを呈する時期はとらえられていないものの、50歳時には既に拡張型心筋症様病態を示し以後現在56歳まで心不全症状が増悪しつつある。症例II-5は、45歳時の心臓超音波所見では心室中隔12mmと軽度の左室肥大を認めるもののASHは呈していなかった。左室収縮能は軽度の低下を認めるのみで左室の拡大も認めなかった。51歳時心不全発症時には拡張型心筋症様病態を呈しており、54歳現在まで少しずつ心不全症状が増悪しつつある。

Table 2. Echocardiographic findings in the affected individuals with Arg92Trp in cardiac troponin T gene

Family	No.	Gender	Age (year)	IVSth (mm)	PWth (mm)	IVSth/PWth	Max LVWT	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	ASH	D-HCM like Features
004	II-1	F	65	10	11	0.9	11	66	61	8	-	+
	II-2	F	62	19	10	1.9	19	47	30	36	+	-
	II-3	F	58	19	10	1.9	24	48	35	27	+	-
	II-4	M	56	6	8	0.8	8	72	66	8	-	+
	II-5	M	54	8	8	1.0	8	68	55	19	-	+
	III-1	M	32	8	10	0.8	10	48	35	27	-	-
	III-2	F	27	8	8	1.0	8	51	33	35	-	-
037	II-1	F	64	16	8	2.0	16	46	32	30	+	-
	II-2	F	49	17	8	2.1	17	52	33	37	+	-

IVSth indicates interventricular septal wall thickness; PWth, left ventricular posterior wall thickness; Max LVWT, maximal left ventricular wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; D-HCM like Features, dilated cardiomyopathy-like features; M, male; F, female; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

Table 3. Electrocardiographic findings in the affected individuals with Arg92Trp in cardiac troponin T gene

Family	No.	Gender	Age (year)	Rhythm/HR (bpm)	PR Intervals (second)	QRS				ST-T Change
						Width (sec)	SV1 (mV)	RV5 (mV)	SV1+RV5 (mV)	
004	II-1	F	65	Af, PMR/83	*	*	*	*	*	*
	II-2	F	62	SR/60	0.24	0.07	0.4	2.2	2.6	Negative T in III, aVF
	II-3	F	58	SR/68	0.22	0.10	0.3	2.0	2.3	Negative T in III, V1, V2
	II-4	M	56	Af, PMR/70	*	*	*	*	*	*
	II-5	M	54	SR/58	0.26	0.12	1.5	2.2	3.7	0.1mV sagging ST depression in V5, V6
	III-1	M	32	SR/52	0.14	0.08	0.4	1.8	2.2	Negative T in III, aVF, flat T in II
	III-2	F	27	SR/61	0.18	0.08	0.3	0.6	0.9	Normal
037	II-1	F	64	SR/75	0.14	0.08	0.7	3.0	3.7	Giant negative T in V3, V4, negative T in II, III, aVF, V2, V5, V6
	II-2	F	49	SR/51	0.15	0.09	0.6	1.3	1.9	Negative T in V1, V2, V3, flat T in III

HR indicates heart rate; bpm, beats 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; PMR, pace maker rhythm; *impossible to measure.

Table 4. Echocardiographic finding in the affected individual with Phe110Ile in cardiac troponin T gene

Family	Gender	Age (year)	IVSth (mm)	PWth (mm)	IVSth/PWth	Max LVWT	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	ASH	D-HCM like Features
022	M	49	21	13	1.6	21	40	26	35	+	-

IVSth indicates interventricular septal wall thickness; PWth, left ventricular posterior wall thickness; Max LVWT, maximal left ventricular wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; D-HCM like Features, dilated cardiomyopathy-like features; M, male; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

ASHを示し、FSが25%以上と左室収縮能が保たれ、LVDdが55mm未満と左室内腔拡大を認めない症例が5名認められた(家系004のⅡ-2, Ⅱ-3, Ⅲ-3, 家系037のⅡ-1, Ⅱ-2)。このうち家系037の症例Ⅱ-2の1例のみがMaron分類Ⅰ型を呈し、他の4名はMaron分類Ⅲ型を示した。心臓超音波像上異常を示さない症例が2名認められた(家系004のⅢ-1, Ⅲ-2)。この10名において、左室最大壁厚の平均は14.2±6.0(̄±SD)mmであり、左室肥大の程度は比較的軽度であった。次に、この10名の心電図所見を表3に示す。拡張型心筋症様病態を示す2人(Ⅱ-1, Ⅱ-4)が、徐脈性心房細動のためペースメーカー植え込み術をそれぞれ59歳と44歳時に施行されていた。心臓超音波像上異常を認めなかった2人のうち、Ⅲ-1の32歳男性は、Ⅲ, aVFにおいて陰性T波を認め心電図上異常を示した。Ⅲ-2の27歳女性は、心臓超音波のみならず心電図上も異常を認めなかった。症例Ⅲ-2とペースメーカー植え込み後の2人以外は、全て陰性T波を認めた。

以上の遺伝子検索と臨床像との結果をふまえ、図4に家系004と家系037の家系図を示す。いずれの家系にも突然死症例を認めた。家系004の症例Ⅱ-1, Ⅱ-5, Ⅲ-3, 家系037の症例Ⅱ-1については心臓カテーテル検査が施行されており、いずれも冠動脈疾患は認めなかった。

5) 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定(家系022)

エクソン9のPCR-SSCP法で別の異常バンドを認めた(図1)発端者022にて施行した直接塩基配列決定法の結果、図5に示

すとおり、110番目のフェニルアラニン(phenylalanine, Phe)をコードするコドンTTTがイソロイシン(isoleucine, Ile)をコードするコドンATTに変化していた。変異したAのバンドと正常なTのバンドが共存しており、変異Phe110Ileのヘテロ接合体であった。

6) 同変異での臨床像の検討

表4に発端者022の心臓超音波所見を示す。変異Phe 110 Ileを認める発端者022においては心臓超音波像上、心室中隔壁厚、左室後壁厚がそれぞれ21 mm, 13 mmとASHを認め、FS35%と左室収縮能も保たれていた。LVDd 40 mmと左室内腔の拡大も認めなかった。表5に発端者022の心電図所見を示す。発端者022の心電図では、Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, aVL, aVF, V5, V6に陰性T波を認め、左室肥大の所見が著明であった。図6に家系022の家系図を示す。本家系内には突然死は認めなかった。

7) エクソン9におけるサイレント変異の検討

エクソン9の検索において、106番目のアミノ酸IleをコードするコドンATTが同じくIleをコードするコドンATCへと変化するサイレント変異Ile106Ileを140症例中41例(29.3%)と、比較的高頻度に認めた。41名中3名の変異はホモ接合体であり、38名の変異はヘテロ接合体であった。

3. エクソン8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8のスクリーニングで、HCM発端者116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

Table 5. Electrocardiographic finding in the affected individual with Phe110Ile in cardiac troponin T gene

Family	Gender	Age (year)	Rhythm/HR (bpm)	PR Intervals (second)	QRS				ST-T Change
					Width (sec)	SV1 (mV)	RV5 (mV)	SV1+RV5 (mV)	
022	M	49	SR/53	0.16	0.08	0.8	2.5	3.3	Negative T in Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, aVL, aVF, V5, V6

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

Table 6. Echocardiographic finding in the affected individual with Val85Leu in cardiac troponin T gene

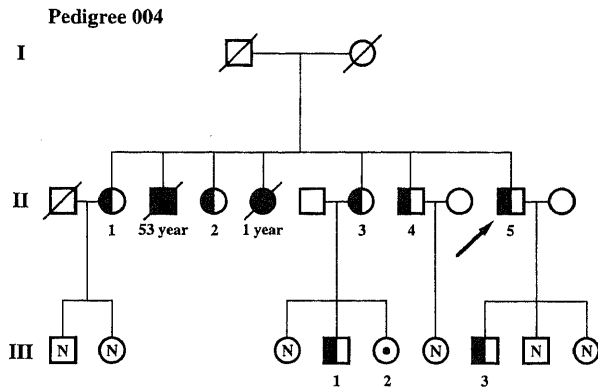
Family	Gender	Age (year)	IVSth (mm)	PWth (mm)	IVSth/PWth	Max LVWT	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	ASH	D-HCM like Features
116	M	66	23	12	1.9	23	48	34	29	+	-

IVSth indicates interventricular septal wall thickness; PWth, left ventricular posterior wall thickness; Max LVWT, maximal left ventricular wall thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; D-HCM like Features, dilated cardiomyopathy-like features; M, male; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

Table 7. Electrocardiographic finding in the affected individual with Val85Leu in cardiac troponin T gene

Family	Gender	Age (year)	Rhythm/HR (bpm)	PR Intervals (second)	QRS				ST-T Change
					Width (sec)	SV1 (mV)	RV5 (mV)	SV1+RV5 (mV)	
116	M	66	SR/60	0.12	0.09	0.9	3.4	4.3	Negative T in Ⅰ, aVL, V1-V6

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



Pedigree 037

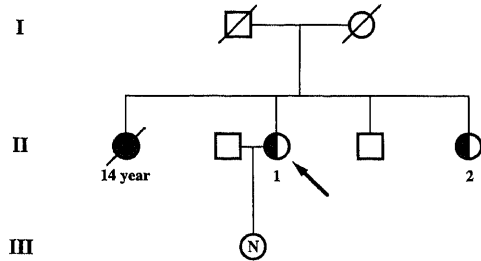


Fig. 4. The pedigree of 004 and 037 family. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. ☒, deceased; □, not investigated; □, mutation absent, clinically unaffected; ◻, mutation present, clinically unaffected; ◼, mutation (heterozygote) present, clinically affected; ☒, sudden death, the age of death is indicated.

発端者116の心筋トロポニンT遺伝子エクソン8における塩基配列解析の結果を図7に示した。85番目のバリン (valine, Val) をコードするGTGがロイシン (leucine, Leu) をコードするTTGへと変化していた。変異したTのバンドが正常なGのバンドと共存しており、変異 Val85Leuのヘテロ接合体であった。本変異はこれまでに報告がなく新変異であった。

3) 同変異での臨床像の検討

表6に示す発端者116の心臓超音波所見では、心室中隔壁厚、左室後壁厚がそれぞれ23mm, 12mmとASHを認め、FS29%と左室収縮能も保たれていた。LVDD 48 mmと左室内腔の拡大も認めなかった。表7に示す発端者116の心電図では、I, aVL, V1~V6に陰性T波を認め、左室肥大の所見が著明であった。図8に家系116の家系図を示す。本家系内には突然死は認めなかった。

4. 心筋トロポニンT遺伝子変異の頻度調査

Pedigree 022

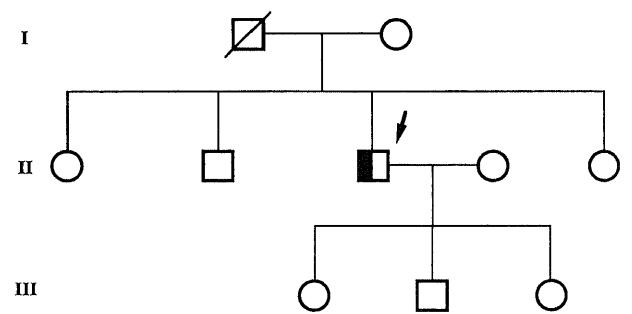


Fig. 6. The pedigree of 022 family. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations; ☒, deceased; □, not investigated; ◻, mutation (heterozygote) present, clinically affected.

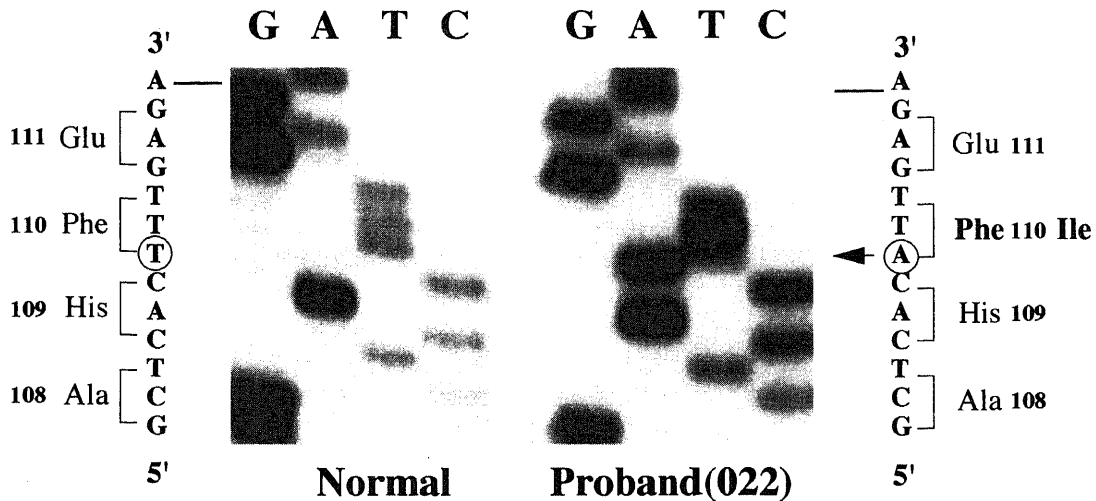


Fig. 5. Sequencing analysis in the exon 9 of cardiac troponin T gene. The circles at the both sides indicate the position of T to A mutation at the codon 110. Proband (022) shows the coexistence of the mutational band (A) and wild band (T), indicating the heterozygote of this mutation. Glu, glutamic acid; Phe, phenylalanine; Ile, isoleucine; His, histidine; Ala, alanine.

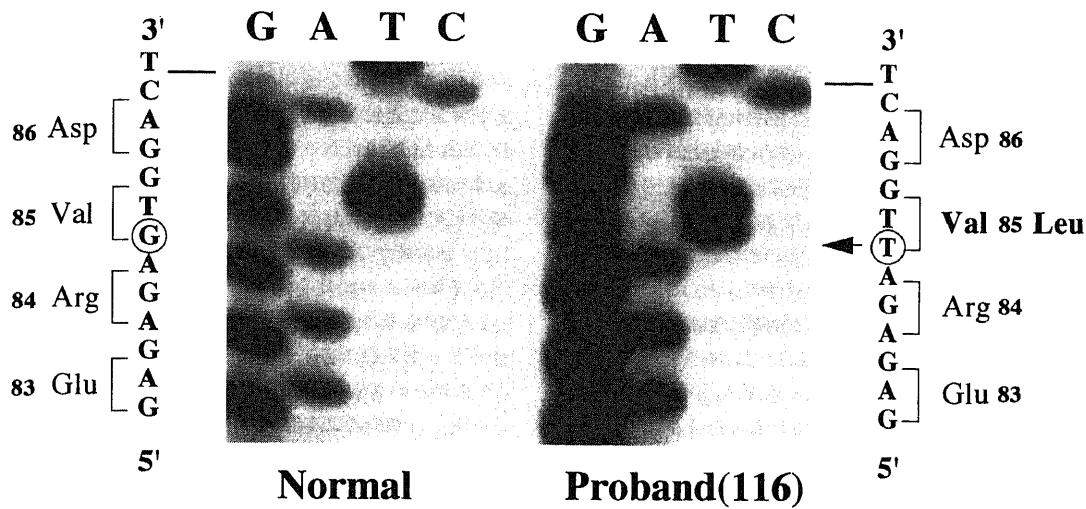


Fig. 7. Sequencing analysis in the exon 8 of cardiac troponin T gene. The circles at the both sides indicate the position of G to T mutation at the codon 85. Proband (116) shows the coexistence of the mutational band (T) and wild band (G), indicating the heterozygote of this mutation. Asp, aspartic acid; Val, valine; Leu, leucine; Arg, arginine; Glu, glutamic acid.

Pedigree 116

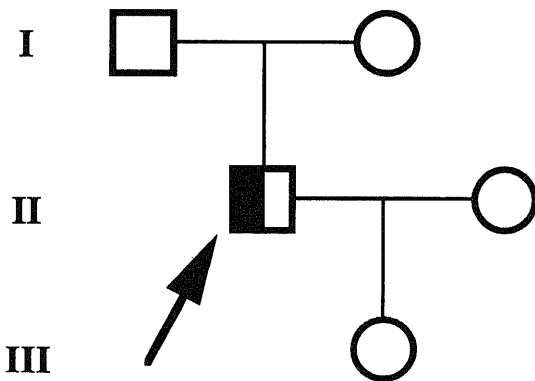


Fig. 8. The pedigree of 116 family. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations; □, not investigated; ■, mutation (heterozygote) present, clinically affected.

以上、北陸地方の独立したHCM140症例を対象とし、心筋トロポニンT遺伝子変異の頻度調査を行った結果、4症例(2.9%)に3種類の同変異を確認した。また、HCMの発症とは関係のないサイレント変異Ile106Ileを140症例中41名(29.3%)と、比較的高頻度に認めた。なお、別に調査した正常対照者50名においても、このサイレント変異は32名(64.0%)と、高頻度に認められた。

考 察

心筋βミオシン重鎖遺伝子の変異がHCMの病因であると報告されて以来²¹⁾、心筋トロポニンT遺伝子²²⁾、α-トロポニン²³⁾、心筋ミオシン結合蛋白-Cなど²⁴⁾、合計7種類の遺伝子変

異がHCMの原因であると報告されている²⁴⁾²⁵⁾。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り、HCMはサルコメア病であると考えられる。本研究では、これらの遺伝子変異のうち、特に心筋トロポニンT遺伝子について検討した。

現在、HCMの遺伝子診断の最大の目的は病因遺伝子とその臨床症状との関連を調べ、病因遺伝子から臨床症状及び予後の推測を可能にすることにある。

HCMの形態学的特徴として、左室肥大が著明でその肥大が特に心室中隔に強いことがあげられる。遺伝子型-臨床病型連関の1つとして、病因遺伝子から左室肥大の程度や特徴を推測出来るか否かという問題がある。Watkinsら²⁶⁾は、心筋βミオシン重鎖遺伝子変異によるHCM患者では左室最大壁厚が 23.7 ± 7.7 (平均±SD) mmであったのに対して、心筋トロポニンT遺伝子変異によるHCM患者では、 16.7 ± 5.5 mmと有意に($p < 0.001$) 低値を示していたと報告している。すなわち、心筋βミオシン重鎖遺伝子と心筋トロポニンT遺伝子という病因遺伝子の違いから、左室最大壁厚という臨床病型に違いを来すという報告である。今回の研究で北陸地方の2家系10名に認めた心筋トロポニンT遺伝子エクソン9の変異、Arg92Trpでも、変異をもつ10名の左室最大壁厚の平均は 14.2 ± 6.0 mmと左室肥大の程度は比較的軽度であり、この報告と合致しているといえる。他のエクソン9の変異Phe110Ileとエクソン8の変異Val85Leuでは、左室最大壁厚はそれぞれ21 mm、23 mmと、心筋βミオシン重鎖遺伝子変異に類似する所見であった。この様に同じ心筋トロポニンT遺伝子変異のなかでも臨床像が異なっているが、これはHCMの特徴の1つである機能的及び形態学的多様性によるものと考えられた⁵⁹⁾。今回のPhe110IleとVal85Leuについては、それぞれの遺伝子変異につき発端者のみしか遺伝子変異者が見つかっておらず、病因遺伝子からの臨床症状及び予後の推測を可能にするためには、今後さらに家系調査を進める必要があると考えられた。

今回我々が2家系に検出した心筋トロポニンT遺伝子エクソン9の変異Arg92Trpは、Moolmanら⁴⁸⁾が2家系で報告した遺

伝子変異と同一である。本変異の臨床的特徴として、Moolmanらは、左室肥大が 11.3 ± 5.4 mmと軽度であること、若年(平均 17 ± 9 歳、全員30歳以下)で高い突然死発生率を示し予後不良であること、疾患浸透率が40%と低いことをあげている。これと我々の2家系10名を比較すると、我々の症例では上述のとおり、左室最大壁厚の平均は 14.2 ± 6.0 mmと左室肥大が比較的軽度であり、この点では、Moolmanら⁴⁸⁾の報告と一致した。突然死が1歳女性、14歳女性、53歳男性に認められた点も、年齢に多少の差が認められるものの、突然死が多いという点では一致していた。予後不良という点については、我々の症例10名のうち、3名が拡張型心筋症様病態を示し、心不全に陥っている点からも合致すると考えられる。しかしながら、Moolmanら⁴⁸⁾の報告には拡張型心筋症様病態を認めるという記載はなく、拡張型心筋症様病態を示すという点が日本人でのArg92Trp変異の特徴といえるかもしれない。また、疾患浸透率に関しては、我々の2家系では遺伝子変異をもつ10名中、心電図異常のみの症例Ⅲ-1を含め9名がHCMを発症しており、疾患浸透率が90%と高いのに対して、Moolmanら⁴⁸⁾の報告では、約40%とかなり低い結果だった。Fanapazirら⁶⁰⁾は、心筋 β ミオシン重鎖遺伝子のうち、異なった遺伝子変異間で臨床像、予後に差がみられるのみでなく、同じ遺伝子変異であっても、家系や人種により臨床像に違いがみられることを報告した。同じ心筋トロポニンT遺伝子変異を示すMoolmanら⁴⁸⁾の家系と我々の家系とで、拡張型心筋症様病態の有無や疾患浸透率の点で違いが生ずる点も、このような同一変異内の臨床像の違いを裏付けるものと考えられた。

拡張型心筋症様病態については、ten Cateら⁶¹⁾が初めて報告している。一般にHCMでは拡張障害は特徴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り、HCMの拡張型心筋症様病態といわれる^{11)・12)}。頻度としては、HCMの4~12%にみられるといわれており、今回の研究では2家系10名中3名(30%)に認めた点で、変異Arg92Trpは拡張型心筋症様病態へ移行しやすい変異であるといえる。この移行について問題となるのは、はたして何歳頃に拡張型心筋症様病態へと移行するか、そしてどのような症例が拡張型心筋症様病態へと移行するかである。今回の3名では、家系004II-1の女性で19年の長期経過観察がなされている。45歳時にはASHを認め、左室内腔の拡大を認めず、左室収縮能も保たれていたが、60歳時には拡張型心筋症様病態へと移行し心不全症状を発症した。その後65歳現在まで心不全が進行中である。それに対して、家系004 II-4の男性では、6年前50歳時に既に拡張型心筋症様病態への移行が確認されており、やはり心不全症状が進行中である。家系004 II-5の男性では、45歳時軽度左室収縮能の低下が認められたものの左室内腔の拡大は認めなかったが、51歳時には拡張型心筋症様病態を呈して心不全となり、同じく心不全症状が進行している(表2)。これらの結果より、変異Arg92Trpでは女性(60歳代前半)よりも男性のほうが若年(40歳代後半から50歳代前半)で拡張型心筋症様病態へ移行すると考えられた。今後、特に家系004 II-2(62歳女性)、及び家系037 II-1(64歳女性)が家系004 II-1(65歳女性)の年齢に近くなっていくため、その形態の変化を慎重に見守り加療していくことが重要である。

拡張型心筋症様病態の診断は、拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy, DCM)と類似の臨床像を呈し、経過中の典型的なHCMの病期を確認するか、同胞内に典型的HCM症例を確認することによりなされる。したがってHCMの病期中無症状でHCMと確認されないまま拡張型心筋症様病態へ移行し、かつ同胞内に典型的HCM症例が認められない場合、DCMと診断されて加療される可能性がある。このような場合、その症例をHCMと診断する手段は遺伝子診断以外になく、HCMにおける遺伝子解析の重要性を示唆するものと思われる。故に、DCMとして加療中の患者についても、今後HCM遺伝子解析のスクリーニングを行う必要がある。

HCMとの鑑別診断が困難な疾患の1つに、高血圧性左室肥大がある。HCMに高血圧が合併した症例では高血圧性左室肥大との形態学的な鑑別はかなり困難であるが、このような場合にも遺伝子解析はその診断に有用であると考えられる。今後、HCMを疑わせる所見があり、高血圧性左室肥大と診断されている症例にもHCM遺伝子解析のスクリーニングを施行すべきと考えられる。

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²⁷⁾やAnanら³⁵⁾はこれには遺伝子変異におけるアミノ酸の荷電変化の有無が関与していると報告している。心筋 β ミオシンの場合、荷電変化を伴うArgからグルタミン(glutamine, 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、同じく心筋 β ミオシン遺伝子の荷電変化を伴わない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が示された。今回検出した心筋トロポニンT遺伝子変異Arg92Trpは荷電変化を伴っている。突然死や拡張型心筋症様病態に陥るといふ点から予後不良の変異と考えられ、Watkinsら²⁷⁾やAnanら³⁵⁾の報告通り荷電変化の存在との関連が示唆された。一方、今回検出したPhe110Ileについて、Ananら⁶¹⁾は心筋トロポニンT遺伝子において、予後良好と考えられる変異の初めての例であると報告した。これ以前の報告では、心筋トロポニンTの遺伝子変異は全て予後が不良であるとされていた^{27)・35)}。発端者022についても心機能はよく保たれ、家系内に突然死を認めないことより、予後は良好であると推測される。この変異では荷電変化は認められず、荷電変化を伴わない変異では比較的予後がよいという報告と合致する。今後、この発端者022を長期経過観察すること、及び家系調査の推進が重要である。

今回検出した心筋トロポニンT遺伝子変異はエクソン9のArg92Trpが2家系、Phe110Ileが1家系、エクソン8のVal85Leuが1家系で、合計3種類の遺伝子変異を4家系に認めたことになる。これにより北陸地方のHCMの2.9%を説明できる。但し、Spiritoら⁵⁹⁾は心筋トロポニンT遺伝子変異はHCMの病因の15%を説明すると報告している。これまで報告された心筋トロポニンTの遺伝子変異13種類のうち約半分の6種類の変異がエクソン9に認められたことから、エクソン9が心筋トロポニンT遺伝子変異のホットスポットと考えられるが、今後他のエクソンについても詳細に検索を進める必要がある。

エクソン9の検索において、106番目のアミノ酸IleをコードするコドンATTが同じくIleをコードするコドンATCへと変化するサイレント変異Ile106Ileを140症例中41例(29.3%)と、比較的高頻度に認めた。しかしこれはHCM患者以外の正常者に

も50例中32例(64.0%)と高頻度に認める変異であり、ヘテロ接合体に加え3名にホモ接合体を認めたことより、疾患とは関連のない遺伝的多型と考えられた。

結 論

日本人HCM患者において、心筋トロポニンT遺伝子変異をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 2家系10名において、心筋トロポニンT遺伝子エクソン9の92番目のアミノ酸アルギニンをコードするコドンCGGがトリプトファンをコードするコドンTGGへと変化する変異Arg92Trpを検出した。この2家系内には突然死が3人、拡張型心筋症様病態を示す症例が3人存在し、臨床的に予後不良な変異と考えられた。

2. 1家系において、心筋トロポニンT遺伝子エクソン9の110番目のアミノ酸フェニルアラニンをコードするコドンTTTがイソロイシンをコードするコドンATTへと変化する変異Phe110Ileを検出した。この変異は、心筋トロポニンT遺伝子変異のうち、唯一予後良好と報告された変異であった。

3. 1家系において、心筋トロポニンT遺伝子エクソン8の85番目のアミノ酸バリリンをコードするコドンGTGがロイシンをコードするコドンTTGへと変化する変異Val85Ile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。

4. 臨床診断されたHCM140症例を対象として、心筋トロポニンT遺伝子エクソン8とエクソン9の検討を行い、4症例の家系に3種類の遺伝子変異を検出した。これにより、北陸地方のHCMの2.9%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の清水 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の森瀬敏夫講師、由雄裕之助手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)において発表した。

文 献

- 1) Maron BJ, Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy: a discussion of nomenclature. *Am J Cardiol* 43: 1242-1244, 1979
- 2) Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* 20: 1-8, 1958
- 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 of 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. Giant T-wave inversion as a manifestation of asymmetrical apical hypertrophy (AAH) of the left ventricle-

ehocardiographic and ultrasonocardiographic study. *Jpn Heart J* 17: 611-629, 1976

6) Forissier JF, Carrier L, Farza H, Bonne G, Bercovici J, Richard P, Hainque B, Townsend P, Yacoub MH, Taure S, Dubourg O, Millaire A, Hagege AA, Desnos M, Komajda M, Schwarts 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, Maunter B, J. O'Connell, Olsen E, Thiene G, Consultant J, 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 obstructive cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 60: 123-129, 1979

10) Shite J, Yokota Y, Takeuchi Y. 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. 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: myodardial 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, Faruqi A. 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) Jarco JA, McKenna W, Pare P. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 321:1372-1378, 1989
- 21) Geister-Lozrance 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 hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77: 701-712, 1994
- 23) Watkins H, Conner D, Thierfelder L. Mutation in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11: 434-437, 1995
- 24) Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 13: 63-69, 1996
- 25) 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. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 16: 379-382, 1997
- 26) Rosenzweig A, Watkins H, Hwang DS. Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med* 325: 1753-1760, 1991
- 27) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326: 1108-1114, 1992
- 28) Nishi H, Kimura A, Harada H. 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
- 29) Watkins H, Thierfelder L, Hwang DS. Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutation. *J Clin Invest* 90: 1666-1671, 1992
- 30) Epstein ND, Cohn GM, Cyran F. Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the β -myosin heavy chain gene. A908Leu \rightarrow Val mutation and a 403Arg \rightarrow Gln mutation. *Circulation* 86: 345-352, 1992
- 31) Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F. 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
- 32) Dausse E, Komajda M, Fetler L. 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
- 33) Harada H, Kimura A, Nishi 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
- 34) Dufour C, Dausse E, Fetler L, Dubourg O, Bouhour J-B, Vosberg H-P, 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
- 35) Anan R, Greve G, Thierfelder L. Prognostic implications of a novel β cardiac myosin heavy chain gene mutation that causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 93: 280-285, 1994
- 36) Consevage MW, Salada GC, Baylen BG. 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
- 37) Nishi H, Kimura A, Harada 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
- 38) Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Eguchi N. 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
- 39) Kato M, Takazawa K, Kimura A. Altered actin binding with myosin mutation in hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *Lancet* 345: 1247, 1995
- 40) Arai S, Matsuoka R, Hirayama K. Missense mutation of the β -cardiac myosin heavy-chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 58: 267-276, 1995
- 41) 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
- 42) Nishi H, Kimura A, Harada H. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91: 2911-2915, 1995
- 43) Kuang SQ, Yu JD, Lu L. 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
- 44) Cuda G, Perrotti N, Perticone F. 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
- 45) Kimura A, Symposium on gene abnormalities in medical diseases. 3. Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Japan. *Intern Med* 36: 152-154, 1997
- 46) Marian AJ, Yu QT, Mares A Jr. 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
- 47) 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
- 48) Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink P, Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 29: 549-555, 1997
- 49) 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
- 50) 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
- 51) Yamauchi-Takahara K, Nakajima-Taniguchi C, Matsui H. Clinical implications of hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations in the alpha-tropomyosin gene. *Heart* 76: 63-65, 1996
- 52) Niimura H, Bachinski L, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutation in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 338: 1248-1257, 1998
- 53) Fisch C. Electrocardiography. *In* E Braunwald (eds), *Heart Disease*, 5th ed, p108-152, Saunders WB, Philadelphia, 1997
- 54) Feigenbaum H. Echocardiography. *In* E Braunwald (eds), *Heart Disease*, 5th ed, p53-107, Saunders WB, Philadelphia, 1997
- 55) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984
- 56) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
- 57) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified α -globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 58) Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546, 1988
- 59) Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 336: 775-785, 1997
- 60) Fananapazir L, Epstein ND. Genotype-Phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy: Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical β -myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 89: 22-32, 1994
- 61) Anan R, Shono H, Kisanuki A, Arima S, Nakao S, Tanaka H. Patients with familial hypertrophic cardiomyopathy caused by a Phe110Ile missense mutation in the cardiac troponin T gene have variable cardiac morphologies and a favorable prognosis. *Circulation* 98: 391-397, 1998

Molecular Genetic Analysis of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy With Mutations in the Cardiac Troponin T Gene Noboru Fujino, The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 77 — 90 (1998)

Key words familial hypertrophic cardiomyopathy, cardiac troponin T gene, dilated cardiomyopathy-like feature, gene mutation

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is characterized by left and/or right ventricular hypertrophy and abnormal stiffness of the left ventricle with resultant impaired ventricular filling. Previously HCM was defined as a heart muscle disease of unknown cause, however the disease appears to be genetically transmitted in about half the patients as an autosomal dominant trait. Molecular studies have shown us that HCM can be caused by a mutation in one of seven genes encoding proteins of the cardiac sarcomere: the β -myosin heavy chain, cardiac troponin T (cTnT), α -tropomyosin, myosin-binding protein C, two types of myosin light chains and cardiac troponin I. This study was performed to examine the existence of the cTnT gene mutation in familial HCM patients in the Hokuriku district of Japan for the first time. Exon 8 and exon 9 of the cTnT gene were amplified by PCR and variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Subsequent direct sequencing of the PCR products confirmed their mutations. The mutations were confirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Thereby three missense mutations in the cTnT gene were identified from four probands with HCM; the first mutation was a C-to-T transition in exon 9, resulting in amino acid substitution of Arg to Trp at codon 92 (Arg92Trp). This mutation was identified in ten individuals of two families. In the ten individuals, three individuals progressed into dilated cardiomyopathy-like (D-HCM-like) features, five individuals showed asymmetrical septal hypertrophy (ASH), one individual presented electrocardiographic abnormality, and another individual had no clinical manifestations at all. These two families had three cases of sudden death, so the patients with this mutation were thought to have poor prognosis. The second mutation was a T-to-A transversion in exon 9, resulting in amino acid substitution of Phe to Ile at codon 110 (Phe110Ile). The third mutation was a G-to-T transversion in exon 8, resulting in amino acid substitution of Val to Leu at codon 85 (Val85Leu). This was a new mutation. Both Phe110Ile and Val85Leu patients showed ASH. A silent mutation Ile106Ile was frequently identified in 41 probands (3 homozygous and 38 heterozygous). Three mutations (Arg92Trp, Phe110Ile, Val85Leu) in the cTnT gene were identified in four of the 140 HCM probands (2.9%). The two families with Arg92Trp need extra careful management, as they have several cases of sudden death and D-HCM.