

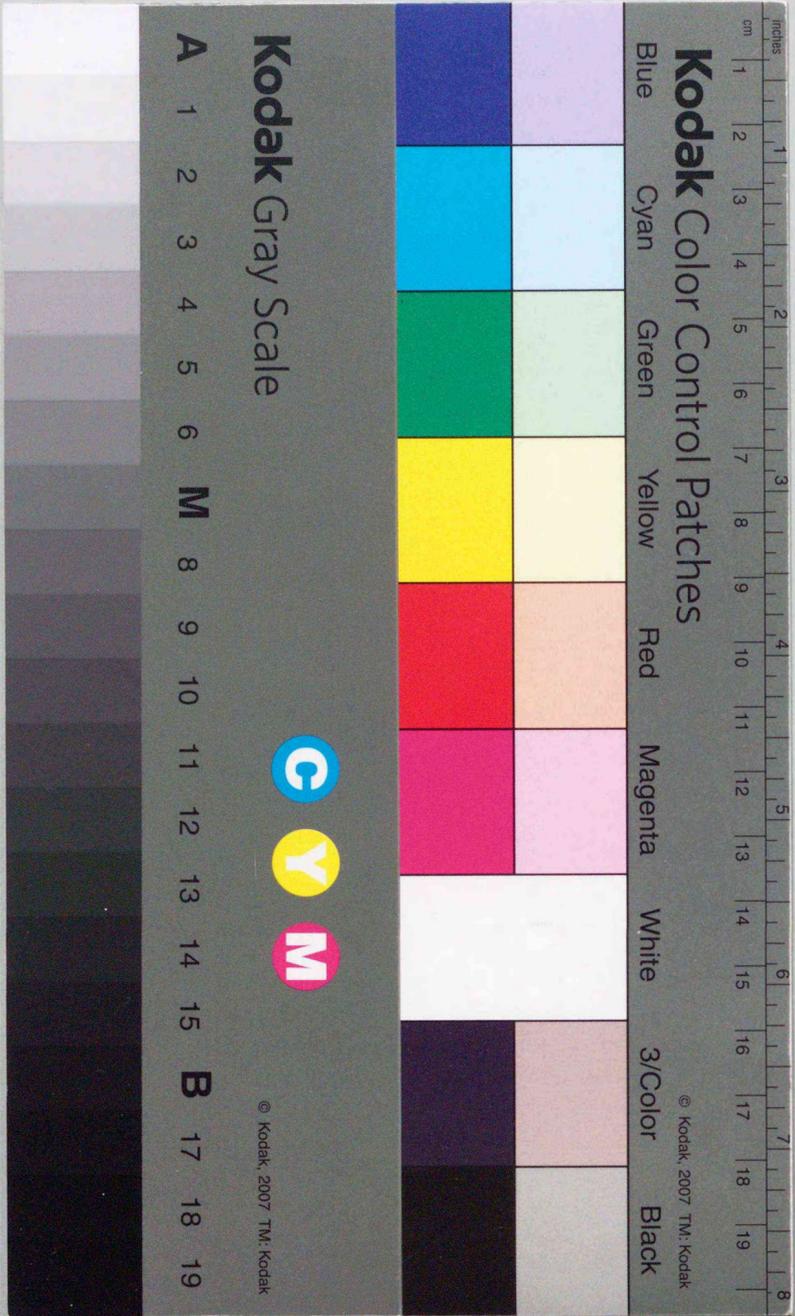


Title	日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性
Author(s)	町田, 正晴
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第3348号
Issue Date	1994-03-25
DOI	10.11501/3095147
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51190
Type	theses (doctoral)
File Information	000000272652.pdf



[Instructions for use](#)

日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性
北海道大学医学部循環器内科学講座
町田正晴



(新稿)

①

日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性

町田 正晴

北海道大学医学部循環器内科学講座

Genetic heterogeneity of hypertrophic
cardiomyopathy in Japanese

Masaharu Machida

Department of Cardiovascular Medicine,
Hokkaido University School of Medicine.

Sapporo 060, Japan

key words

hypertrophic cardiomyopathy
missense mutation
 β -myosin heavy chain gene
PCR-SSCP analysis
linkage analysis
genetical heterogeneity

短縮題名

日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性

Familial hypertrophic cardiomyopathy (FHCM) is thought to be caused by missense mutations in cardiac β -myosin heavy chain (β -MHC) gene in 30~40% of affected Caucasian individuals. On the other hand, it has been reported that Japanese FHCM is closely linked to DNA marker PALB on chromosome 18q by linkage analysis. Therefore, in order to elucidate the etiological significance of missense mutations in β -MHC gene in Japanese HCM patients, we have investigated the sequence variation in exon 3 to 25 of β -MHC gene from 16 multiplex FHCM kindreds and 28 sporadic patients by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method. In this study we demonstrated one missense mutation (codon741: ^{Gly}GGG \rightarrow ^{Arg}AGG) in only one kindred among 16 multiplex Japanese kindreds with FHCM. Two synonymous mutations (codon715: ^{Trp}TAC \rightarrow ^{Trp}TAT, codon989: ^{Ile}ATT \rightarrow ^{Ile}ATC) are demonstrated in another kindred. The same mutation in codon989 is also detected in one sporadic patient. Furthermore, we performed linkage study with two DNA markers (F13B on chromosome 1q, D11S916:AMF185ya1 on chromosome 11p-q) which are recently reported to be linked with FHCM. Three and four families showed statistically negative linkage with F13B and D11S916(AMF185ya1), respectively. These results suggest that several responsible genes for HCM may exist in Japanese and principal responsible gene for Japanese HCM is different from it for Caucasian HCM.

Caucasian 家族性肥大型心筋症 (FHCM)患者において,30~40%の患者が心筋ミオシン β 重鎖(β -MHC)遺伝子のmissense mutation を原因としていると考えられている.一方本邦においては,連鎖解析により日本人FHCM患者が,18番染色体上のDNAマーカー“PALB”と密に連鎖することが示されている.よって日本人肥大型心筋症(HCM)患者において,心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationがどれほど関与しているかを検討するために,日本人FHCM16家系,および孤発例28名を対象に,心筋 β -MHC遺伝子のexon3から25にかけて,塩基配列の多型をpolymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)法を用い検討した.その結果,日本人FHCM16家系中1家系にのみ missense mutation (コドン741: GlyGGG \rightarrow ArgAGG)を認めた.また2種類の synonymous mutation (コドン715: TryTAC \rightarrow TryTAT,コドン989: IleATT \rightarrow IleATC)を別の一家系に認めた.またコドン989に認められたmutationと同じ mutationを1孤発例に認めた.更に最近Caucasian FHCM において疾患との連鎖が報告された1番染色体上のDNAマーカーF13B,11番染色体上のDNAマーカーD11S916(AMF185ya1)を使用し,連鎖解析を行った.その結果F13Bでは3家系において,D11S916(AMF185ya1)では4家系において連鎖が否定された.これらの結果より日本人HCMには何種類かの原因遺伝子が関与しており,主たる原因遺伝子がCaucasianHCMとは異なることが示唆された.

緒言

肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy: 以下HCM)は原因不明の心筋の肥大を特徴とし,心血行動態的,電気生理学的な異常をきたす疾患である.10年生存率は成人例で約80%,小児例で約50%とされており,成人例では突然死が全死亡の半数近くを占める¹⁾²⁾.若年発症例や家族歴のある症例(家族内発症例)の予後が悪いことが知られているが,心電図学的,形態学的,また症状の有無などにより予後を推測することは現在困難とされている^{3)~5)}.無症状例は突然死の剖検にて初めてHCMと診断されることもあり,これらの患者をいかに発見し,適切に指導するかが重要であるが,必ずしも容易なことではない.一方,HCMはその半数の症例で家族内発症が認められ,多くの例で常染色体優性遺伝の形式を取ることが知られている⁶⁾.この群は家族性HCM(以下FHCM)と定義されている.これらに対しFHCMの原因遺伝子を同定し早期発見,早期治療に用いようとする試みがなされ

てきた。Seidmanらのグループは、フランス系カナダ人の大規模なFHCM家系について、14番染色体上のD14S26に位置するDNAプローブCIR-L436を用いて検出したRFLP(restriction fragment length polymorphism)と疾患との連鎖検定を行い、疾患がD14S26と密に連鎖していることを報告した⁷⁾。同時期に心筋ミオシン β 重鎖(β -myosin heavy chain:以下 β -MHC)遺伝子がD14S26近傍に存在することが報告され⁸⁾、Seidmanらは心筋 β -MHC遺伝子に対し解析を行い、その結果心筋 β -MHC遺伝子内にmissense mutationを有するFHCM家系を報告した⁹⁾。

以来心筋 β -MHC遺伝子の解析が欧米を中心に多くの施設でなされるようになり、その結果FHCM家系の約30~40%に心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationが認められたと報告されている^{10)~12)}。また置換されたアミノ酸の性質と疾患の浸透率や予後が密接な関係を持つとの報告もなされており^{10)~13)}、遺伝学的に

新たな予後規定因子を決定できる可能性が示唆されている。一方他のDNAマーカーとの連鎖が報告されている家系も存在し^{14)~16)}、本症の遺伝的多様性が示唆されている。本邦でも連鎖解析により同疾患の原因遺伝子が18番染色体上に存在する可能性が示唆されているが、HCMが遺伝学的に多様性を持つ疾患であり、また各家系が小規模なものであることより、連鎖解析という確立論的手法のみで原因遺伝子を同定することは難しい。また各家系のlod値が有意なものでないことは、必ずしも疾患との連鎖を否定しない。しかし本邦HCM患者における心筋 β -MHC遺伝子内の異常の有無を、連鎖解析以外の手法で直接検索した大規模な報告はほとんどない。よって本研究では、日本人HCM患者を対象に(孤発例を含む)、報告されているほとんどのmissense mutationが存在している、心筋 β -MHC蛋白のheadからhead-rod junction coding sequenceをPCR-SSCP法で直接検索した。また最近疾患との連鎖が報告された^{13)~14)}1番、

11番染色体上のDNAマーカーとの連鎖を解析した。その結果日本人FHCM16家系中1家系のみ心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationが認められ、孤発例にはmissense mutationは認められず、CaucasianにおけるHCMと本邦におけるHCMとでは主たる遺伝学的原因が異なることが示唆された。また1番,11番染色体上のDNAマーカーと疾患との有意な連鎖は認められなかった。

対象と方法

対象

北海道大学循環器内科でフォローされ、家族歴濃厚なFHCM16家系の内、患者37名、境界型10名、正常者45名(図1)、および孤発例と思われる28名を対象とした。あらかじめ用意した問診表に従い自覚症、既往歴を調査した。高血圧性の心肥大を否定するために高血圧症(140/90mmHg以上)の既往のあるものは除外した。またアミロイドーシスなどの二次性心筋

症も除外した。HCMの診断は12誘導心電図、心エコー図法によって行った。左室壁厚の測定は、心エコー図法により左室短軸断面を用い、腱索および乳頭筋レベルで計測した。診断基準は；1)心室中隔前部の壁厚が13mm以上で、中隔の後壁に対する壁厚の比が1.3以上であるもの。2)自由壁厚が15mm以上で、壁厚最大部の壁厚最小部に対する比が1.5以上のもの。3)左心室壁厚が全周性に13mm以上であるもの。これに加えて、4)肥大が心尖部に限局し、12誘導心電図でQRS complexの高電位と巨大陰性T波を認めたものとした。境界型は中隔心室前部の壁厚が12mm以上13mm未満のもの、または心室中隔後部から自由壁の壁厚が13mm以上15mm未満のものとした。尚、各対象よりインフォームドコンセントを得た後、末梢血を採血した。

図1

ゲノムDNAの抽出, およびPCR法による増幅

対象者120例中119例においては末梢血有核細胞より高分子DNAを抽出し回収した. また残りの1例については既死亡例であったため, パラフィン包埋組織よりDNAを抽出, 回収した. primerは心筋 β -MHC遺伝子のexon3から25(計23exon), 各exonを挟むように設計した. primerは ^{32}P - γ ATP($\sim 6000\text{ci}/\text{mmol}$)で5'末端ラベルされ, 回収したゲノムDNAをtemplateDNAとしPCRを行った. PCR mixtureは高分子ゲノムDNA, ^{32}P 末端標識primer, 各 $8\mu\text{M}$ のdNTP, Pfu DNA polymerase (Stratagene), 1X Pfu reactin bufferより構成され, $15\mu\text{l}$ に調整した. 反応はdenaturation(95°C , 1min), annealing ($50^\circ\text{C}\sim 65^\circ\text{C}$, 1min \sim 3min), extension(76°C , 1min)の条件で30サイクル, programable heat blockで行った(DNA thermal cycler, Perkin Elmer Cetus).

Single Strand Conformation Polymorphism

(SSCP)法によるDNA多型の検出¹⁷⁾

反応終了後の溶液 $15\mu\text{l}$ に $60\mu\text{l}$ denaturing solution (95% formamide, 20mMEDTA, 0.05% BPB, 0.05% XC)を加え, 95°C , 5分加熱後氷冷し, $4\mu\text{l}$ を5%非変性ポリアクリルアミドゲル(5%のグリセロールを含む)で, 0.5XのTBE bufferを使用し4~5時間, 40Wで電気泳動した. 結果はゲルを乾燥した後オートラジオグラムにて観察した.

直接塩基配列決定法

SSCP法で検出されたDNA塩基配列の多型は, 直接塩基配列決定法で塩基配列を決定した. まず多型の認められた検体のexonを各primer 30pmole (Ex19-5', 5'-TCCTCCTACTTCCTTCTTGC-3'; Ex19-3', 5'-GAGCTTCTGGTGCACCCTC-3'; Ex20-5', 5'-GGATCTGCAGGTGACCCTGAAT-3'; Ex20-3', 5'-ACAACAGGAAA GCATCAGAGG-3'; Ex24-5', 5'-AGCATGGACCTTGACATGGAG-3'; Ex24-3', 5'-GGGCACA

GATAGACATGGCAT-3')を含む50 μ lの系で上記の条件でPCRを行い増幅した。PCR法にて増幅した目的のexonを、2%アガロースゲル電気泳動で分離後、ゲルより切出し、electroelution法によりDNAを回収し、これを直接sequencing-templateとした。sequencing primerにはPCR法にて使用したprimerを³²P- γ ATPで5'末端ラベルし用いた。primer 1.2pmol, sequencing-template 0.01pmolを使用し、Circum Vent Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit(New England Biolabs)を用い反応を行った。反応終了後の溶液にstop solutionを加え加熱変性後、7M尿素/6%変性ポリアクリルアミドゲルで1X TBE bufferを用い電気泳動を行った。ゲルを乾燥後オートラジオグラムで塩基配列を決定した。

Dot blot hybridization

心筋 β -MHC遺伝子codon741の変異に対して、正常塩基配列に特異的なoligonucleotide

probe(Ex20741G, 5'-AGCAGGAAGGGGGCAGAGA-3'), 変異塩基配列に特異的なoligonucleotide probe(Ex20741A, 5'-AGCAGGAAGAGGGGCAGAGA-3')を合成した。変異の認められた患者家系において、家系内の患者、非患者のゲノムDNAから各20pmoleのprimerを用いPCR法にてexon20を増幅した。各増幅された検体にNaOH0.4M, EDTA 10mMとなるように加え、100 $^{\circ}$ C, 10分加熱後、dot blotterを用いcharged nylon membrane(Hybond N plus, Amersham)にalkali blotした。blotしたmembraneを6XSSC, 10XDenhardt's solution, 1%SDS, 500 μ g/ml変性鮭精子DNA溶液に入れ、30 $^{\circ}$ C, 8時間prehybridizationを行い、この溶液に5'末端を³²P- γ ATPで標識したoligonucleotide probe 2.5pmolを加え30 $^{\circ}$ C, 8時間hybridizationを行った。hybridizationはEx20741G, Ex20741A両probeに対して独立して行った。洗浄は6XSSC, 0.1%SDS溶液を用い室温, 15分を2回、その後60 $^{\circ}$ C, 15分を2回行った。結果をオートラジオグラムにて観察した。

連鎖解析

FHCM患者との連鎖が示されている1番, 11番染色体上の tetranucleotide repeat, dinucleotide repeatのDNAマーカーF13B¹⁸⁾, D11S916(AMF185ya1; Genbank: Z16809)を既報の条件で増幅し, 5%変性ポリアクリルアミドゲル(含7M尿素), 1XTBEにて70W, 4~5時間電気泳動した. ゲルを乾燥後オートラジオグラムにてPCRフラグメントの多型を検出した. 検出された多型をコンピュータープログラムLIPEDにより disease penetrance 90%, disease prevalence 0.0002でlod値を算出した¹⁹⁾. 各多型の頻度は, 非患者である配偶者24名より算出した. また本症は年齢依存性の発症様式を示すので16才以上の症例を対象とし, 病歴不明な第一世代については常染色体優性遺伝形式を示すこと, 第二世代に2人以上の症例を有することにより, いずれか一方を発症者として計算した.

結果

1) PCR-SSCP法によるDNA多型の検出

PCR-SSCP法は一本鎖DNAフラグメントのとりコンフォーメーションの差を, 非変性ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動度の差として検出するものである¹⁷⁾. FHCM16家系, 孤発例27名を対象にPCR-SSCP法で心筋 β -MHC遺伝子exon3~25の塩基配列の多型を検索した結果, exon19, 20, 24にのみ疾患に一致して塩基配列の多型が認められた(図2). 家系VIIにおけるexon19, 家系XIにおけるexon20のPCR-SSCP法による解析では非患者に2本のバンドが, 患者には非患者に認められた2本のバンドに加え, さらに2本のバンドが認められた(図2-a, b). 家系VIIと孤発例患者1例におけるexon24のPCR-SSCP法による解析では, 非患者に1本のバンドが, 家系VIIの患者にこのバンドに加え更に1本のextraバンドが検出され, 孤発例ではextraバンドのみが検出された(図

2-c). これは家系VIIの患者が exon24 の多型に対し heterozygote であり, 孤発例1例は homozygote であることを示唆する.

図2

2) 直接塩基配列決定法によるDNA多型の解析

PCR-SSCP法により検出された上記の多型を明らかにするために, 多型の認められた非患者と患者のPCRフラグメントの塩基配列を直接塩基配列決定法で決定した. 家系XIにおける exon20 の解析では患者DNAの codon741 (exon20) の第一塩基部に A, G 両レーンに同時にバンドを認め, G から A への mutation が heterozygous に生じていることが判明した (図3-a). この置換はアミノ酸を741グリシンから741アルギニン (GGG → AGG) に変化させており missense mutation であった. また家系VIIにおける exon19, 家系VIIと孤発例1例における exon24

の多型の解析では, codon715 (exon19) と 989 (exon24) の3番目の塩基に1塩基置換の mutation が認められた (図3-b, c). しかしこれらの mutation はアミノ酸置換を伴わないものであった (codon715: ^{Tyr}TAC → ^{Tyr}TAT, codon989: ^{11c}ATT → ^{11c}ATC). 家系VIIの患者は両 mutation に対して heterozygote であったが, 孤発例患者1名は codon989 の第3塩基部に C のバンドのみ認め変異に対して homozygote であった.

図3

3) Dot blot hybridization

家系XIにおいて exon20 に認められた missense mutation が患者に特異的なものであることを確認するために, 家系XIの構成員8名に対して dot blot hybridization を行った (図4). 正常塩基配列に特異的な probe (Ex20741G) を hybridize させた場合, 患者で正常者より弱いシグナルが認められ, 変異塩基配列に特異的な probe (Ex20741A) を

hybridizeさせた場合,患者にのみシグナルが認められた.この結果は患者が変異塩基配列に対してheterozygoteであり,変異が疾患特異的であることを示している.

図 4

4) 連鎖解析

PCR法によって増幅されたDNAマーカーF13B,D11S916(AMF185ya1)の変性ポリアクリルアミドゲルによる解析の結果,F13Bでは3種類の多型が,D11S916(AMF185ya1)では11種類の多型が認められた(図5).各個人のマーカーの遺伝型は図1に示した.FHCMとこれらのDNAマーカーとの連鎖解析の結果,3家系でF13Bと,4家系でD11S916(AMF185ya1)との $\theta = 0.001$ におけるlod値が -2.0 以下となり連鎖が否定された(表1).また各家系のlod値の最高値は3以下であり,有意な連鎖を示す家系は認められなかった.

図 5, 表 1

考案

日本人FHCM16家系,孤発例患者28名を対象とした心筋 β -MHC遺伝子のexon3~25内の異常を検索した結果,心筋 β -MHC遺伝子内のmissense mutationを認めたのはFHCM16家系中1家系にのみであり,また孤発例には認められなかった.心筋 β -MHC遺伝子は計40exonよりなる遺伝子であるが,現在まで報告されたmissense mutationのほとんどは心筋 β -MHC蛋白のhead部からhead-rod junction部をコードしているexon3~25内に認められている.head部はATPase活性部位,actinとの結合部位,myosin light chain(MLC)との結合部位など多くの重要な機能を持ち,またhead-rod junction部位は収縮の際に大きく運動する部位である(図6)²⁰⁾.

図 6

この部位のアミノ酸配列はtail部に比べ、種を超えてかなり確実に保存されており、この部位での missense mutation が心筋 β -MHC 蛋白の機能に大きな影響を与えていると考えられる。一方 tail 部の異常に関しては intron 39 から exon 40 にわたる 2.4 kb の deletion が報告されているが²¹⁾、この異常を有した4名の内、1名しか HCM を発症しておらず、この部位の異常が心筋 β -MHC 蛋白の機能にどれほど影響しているかは極めて疑問である。よって本研究では exon 3~25 を解析したことにより、HCM の原因となる心筋 β -MHC 遺伝子の異常をほぼ確実に検出できたと考える。今回認められた missense mutation は Caucasian FHCM 家系において報告されたものと同じのものであり²²⁾、心筋 β -MHC 蛋白のアクチン binding site をコードしている exon 20 内に生じていた。またアミノ酸の電荷が neutral から basic (グ

リシン→アルギニン)に変化しており、蛋白分子の構造上、機能上大きな変化をもたらしたと考えられる。実際 Epstein らは in vitro motility assay で、正常と missense mutation を有する心筋 β -MHC 蛋白の actin 蛋白に対する移動速度を調べ、missense mutation を有する心筋 β -MHC 蛋白の速度が正常に比べ低下していることを報告している²³⁾。またアミノ酸の電荷の変化に関しては、心筋 β -MHC 遺伝子の missense mutation の中でも、アミノ酸の電荷が変化する家系では、変化しない家系と比較し症状が重く、早期に発症し、浸透率が高く、予後が悪いことが報告され¹⁰⁾¹³⁾、蛋白の機能面での変化の強弱が予後に影響することが示唆されている。我々の症例でも小規模な家系ではあるが、発症者は2名とも治療を要する不整脈を有しており、抗不整脈薬の内服を受けている。既に死亡しているため調査の出来なかった2名の患者では、流出路狭窄のため cardiomyectomy を施行されており、予後が悪いというこれまでの

報告と一致した。また本家系における連鎖解析ではPALB, F13B, D11S916それぞれのマーカーに対し, lod値は, 殆ど0か0以下であり, 心筋 β -MHC遺伝子内のmissense mutationが家系XIにおけるHCMの原因と考えられた。その他exon19と24にアミノ酸の変化を伴わないmutationを, 完全に疾患に一致して認めた1家系(家系VII)が存在したが, この変異はDNA sequence上, 新たな転写開始部位や, スプライシング部位を生じておらず, HCM発症の原因となるとは現時点では考えにくい。ただこのmutationは他に1孤発例にのみ同時に認められており, 一般的な多型や家系内の単なる多型の遺伝とも考えにくく, 今後messenger RNAや蛋白レベルでの検討が必要であろう。

以上, 本研究において結果としてmissense mutationが16家系中1家系のみにはしか認められなかったという事実は, FHCM家系の約30~40%が心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationを有しているとするCaucasianを

対象とした報告と比較すると^{10)~12)}, 本邦におけるFHCMの原因として, 心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationが明らかに少ないことを示している。連鎖解析上HCMと心筋 β -MHC遺伝子との連鎖が認められなかったとする報告もあるが^{24)~26)}, 本疾患は遺伝学的多様性を持ち, また小規模な家系を対象とする場合, 単純にlod値の合計のみでは原因遺伝子の有無を断定することは困難である。本研究では未知のmutationも含めて心筋 β -MHC遺伝子内のmutationの有無をPCR-SSCP法による多型の検出と, それに引き続き直接塩基配列決定法により調査したものであり, 日本人HCM患者(孤発例を含む)には β -MHC遺伝子内のmissense mutationの関与が少なく, 本邦におけるFHCMの多くは, 主たる遺伝学的原因がCaucasianにおけるものとは異なることがほぼ確実に示された。しかし主たる遺伝学的原因が異なると考えられる日本人FHCMとCaucasian FHCMとの間で, 全体として疫学的

に明らかな予後の差がないことは興味深いことである。心筋の病理組織学的検討では、正常者、心筋 β -MHC遺伝子の missense mutation を原因とする HCM 患者、遺伝学的原因が不明の HCM 患者で心筋内の β -MHC 蛋白や actin 蛋白の量に差がないこと、偏光顕微鏡による検討でも心筋細胞の構造に差がないことより、心肥大が β -MHC 蛋白の機能異常に伴う二次的なものではないかという報告がある²⁷⁾。この報告は他の蛋白の機能異常においても同様に、二次的に心肥大が生じ HCM の病態となる可能性を示唆している。また遺伝学的要因のみではなく環境や物理学的要因が心肥大を促進している可能性も考えられる。心筋 β -MHC 遺伝子の異常を原因とする家系 XI では、2名の閉塞型患者と2名の非閉塞型患者を含んでいたが、我々の家系ではこの他にも家系内で明らかに形態学的に異なる肥大様式を示す家系が存在し(家系 I, XIV: 心尖部肥厚と非対称性中隔肥厚, 家系 IV, V, X, XII: 側壁肥厚と非対称性中隔肥厚)

、1つの遺伝学的な原因のみで肥大様式や程度が決るものではないと考える。経時的な観察より心尖部肥厚型の非対称性中隔肥厚型への変化を認めた報告や²⁸⁾、高齢発症例では軽症高血圧の合併頻度が高かったという報告は²⁹⁾、遺伝学的素因は HCM 発症の最も重要な要因ではあるが、他の因子により修飾を受けている可能性を示唆している。以上より考えると疫学的な予後は、原因遺伝子の種類ではなく、二次的に心肥大を引き起こし得る蛋白分子自身の機能異常の程度(遺伝学的素因)とその他の修飾因子に密接に相関している可能性があると考えられる。だが現在心筋 β -MHC 遺伝子以外の原因遺伝子は同定されておらず推測の域を出ない。

他の原因遺伝子に関しては、日本人 FHCM 家系に対しては、RFLP による連鎖解析で、疾患と18番染色体長腕上の DNA マーカー PALB との連鎖が当科、および九州大学を中心とするグループより報告されており¹⁶⁾³⁰⁾、両施設より報告された組換え率0での lod 値の合計が7を超え

ることから、この近傍に日本人FHCMの原因遺伝子がある可能性が示唆されている。またマイクロサテライトを利用した大規模家系における連鎖解析により、新たな原因遺伝子が1番染色体長腕、11番染色体短腕から長腕にかけて存在する可能性をそれぞれ別のグループが報告している¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究でも報告されたマーカーを使用し連鎖解析を行い、完全に連鎖の否定できる家系をF13Bで3家系、D11S916(A M F 185ya1)で4家系認めた。またその他lod値が低値な家系の存在も考えあわせると、一部lod値が高値な家系も存在したが、本邦においてこれらの部位近傍に原因遺伝子を持つFHCMの割合は低いと考える。しかし多数の連鎖を示す遺伝子座が報告されている現在、本邦FHCMの多くが18番染色体上に原因遺伝子を持つ可能性は高いが、PALBとの連鎖の低い家系では他の原因遺伝子の関与が強く疑われ(例：本研究における家系XI)、そのような家系において、家系の規模の拡大や、lod値が高値であったものを

多数集め、近傍のマーカーに対し連鎖を検定していくことが必要であろう。

結語

1)日本人FHCM患者において、心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationが原因となっている家系が存在することを示した。

2)日本人HCM患者では、CaucasianFHCM患者と比較し、心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationを原因とするものが少なく、主たる遺伝学的原因が異なる異なる可能性が示された。

3)最近CaucasianFHCM家系で連鎖が報告された1番、11番染色体上のDNAマーカーを使用した連鎖解析では、完全に連鎖の否定できる家系、lod値の低い家系が多数存在し、同部位に原因遺伝子を持つFHCMは本邦では少ないものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜わりました北海道大学医学部循環器内科学講座、北畠顕教授に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言を頂きました北海道大学医学部第一病理学講座、脇坂明美助教授、直接御指導を頂きました野口宗親博士、御協力を頂きました北海道大学医学部循環器内科学講座、第一病理学講座の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

1) Mckenna W, Deanfield J, Faruqui A, England D, Oakley C, Goodwin J (1981) : Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy : Role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. Am J Cardiol 47 : 532-538.

2) 関口守衛, 森本紳一郎, 西川俊郎, 荷見源成, 松井弥寿子, 広江道昭, 木村裕子, 滝本治俊, 金子まこと, 大森みどり, 星野和夫, 酒井吉郎, 寺田一行, 内田達郎, 稲葉茂樹, 大坪恵子, 松村研二, 笠貫宏, 中村憲司, 広沢弘七郎, 松田三和, 小松行雄 (1983) : 肥大型心筋症181例の長期予後. 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班昭和57年度研究報告集 : 355-364.

3) Maron BJ, Lipson LC, Roberts WC, Savage DD, Epstein SE (1978) : "Malignant" hypertrophic cardiomyopathy : Identification of a subgroup of families with unusually frequent premature death. Am J Cardiol 41 : 1133-1140.

4) Mckenna WJ, Borggrefe M, England D, Deanfield J, Oakley CM, Goodwin JF (1982) : The natural history of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy : An electrocardiographic study. Circulation 66 : 1233-1240.

5) Maron BJ, Roberts WC, Epstein SE (1982) : Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy : A profile of 78 patients. Circulation 65 : 1388-1394.

6) Maron BJ, Nichols III PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ (1984) : Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy : Assessment by M-mode and two dimensional echocardiography. Am J Cardiol 53 : 1087-1094.

7) Jarcho JA, McKenna W, Pare JAP, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, Levi T, Keller HD, Seidman JG, Seidman CE (1989) : Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. N Engl J Med 16 : 1372-1378.

8) Matuoka R, Yoshida MC, Kanda N, Kimura M, Ozasa H, Takao A (1989) : Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2→q13. Am J Med Genet 32 : 279-284.

9) Lowrance AATG, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1990) : A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy : A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. Cell 62 ; 999-1006.

10) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1992) : Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 326 : 1108-1114.

11) Solomon SD (1990) : Familial hypertrophic cardiomyopathy is a genetically heterogeneous disease. J Clin Invest 86 : 993-999.

12) Epstein ND, Fananapazir L, Lin HJ, Mulvihill J, White R, Lalouel JM, Lifton RP, Nienhuis AW, Leppert M (1992) : Evidence of genetic heterogeneity in five kindreds with familial hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 85 : 635-647.

13) Epstein ND, Cohn GM, Cyran F, Fananapazir L (1992) : Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the β -myosin heavy chain gene. Circulation 86 : 345-352.

14) Watkins H, MacRae C, Thierfelder L, Chou YH, Frenneaux M, McKenna W, Seidman JG, Seidman CE (1993) : A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3. Nature Genet 3 : 333-337.

15) Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J, Dausse E, Bertrand IB, Wisnewsky C, Pulvenis D, Fetler L, Vignal A, Weissenbach J, Hillaire D, Feingold J, Bouhour JB, Hagege A, Desons M, Isnard R, Dubourg O, Komajda M, Schwarz K (1993) : Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. Nature Genet 4 : 311-313.

16) 木村 彰方, 笹月 健彦, 西 宏文, 原田 晴仁, 古賀 義則, 戸嶋 裕徳 (1991) : 肥大型心筋症の遺伝子解析. 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班平成3年度報告集 : 125-128.

17) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879.

18) Nishimura DY, Murray JC (1992) : A tetranucleotide repeat for the F13B locus. *Nucl Acids Res* 20 : 1167.

19) Ott J (1974) : Estimation of the recombination fraction in human pedigrees : efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet* 26 : 588-597.

20) Jaenicke T, Diederich KW, Haas w, Schleich J, Lichter P, Vosberg HP (1990) : The complete sequence of human β -myosin heavy chain gene and an analysis of its product. *Genomics* 8 : 194-206.

21) Marian AJ, Yu QT, Mares A, Hill R, Roberts R, Perryman B (1992) : Detection of a new mutation in the β -myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 90 : 2156-2165.

22) Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F, Cohn G, Epstein ND (1993) : Missense mutation in the β -myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3993-3997.

23) Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Sellers JR, Epstein ND (1993) : Skeletal muscle expression and abnormal function of β -myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 91 : 2861-2865.

24) Hejtmancik JF, Brink PA, Towbin J, Hill R, Brink L, Tapscott T, Trakhtenbroit A, Roberts R (1991) : Localization of gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1 in a diverse US population. *Circulation* 83 : 1592-1597.

25) Schwartz K, Beckmann J, Dufour C, Faure L, Fougerousse F, Carrier L, Hengstenberg C, Cohen D, Vosberg HP, Sacrez A, Ferriere M, Desnos M, Cambien F, Dubourg O, Komajda M (1992) : Exclusion of cardiac myosin heavy chain and actin gene involvement in hypertrophic cardiomyopathy of several french families. *Circulation Res* 71 : 3-8.

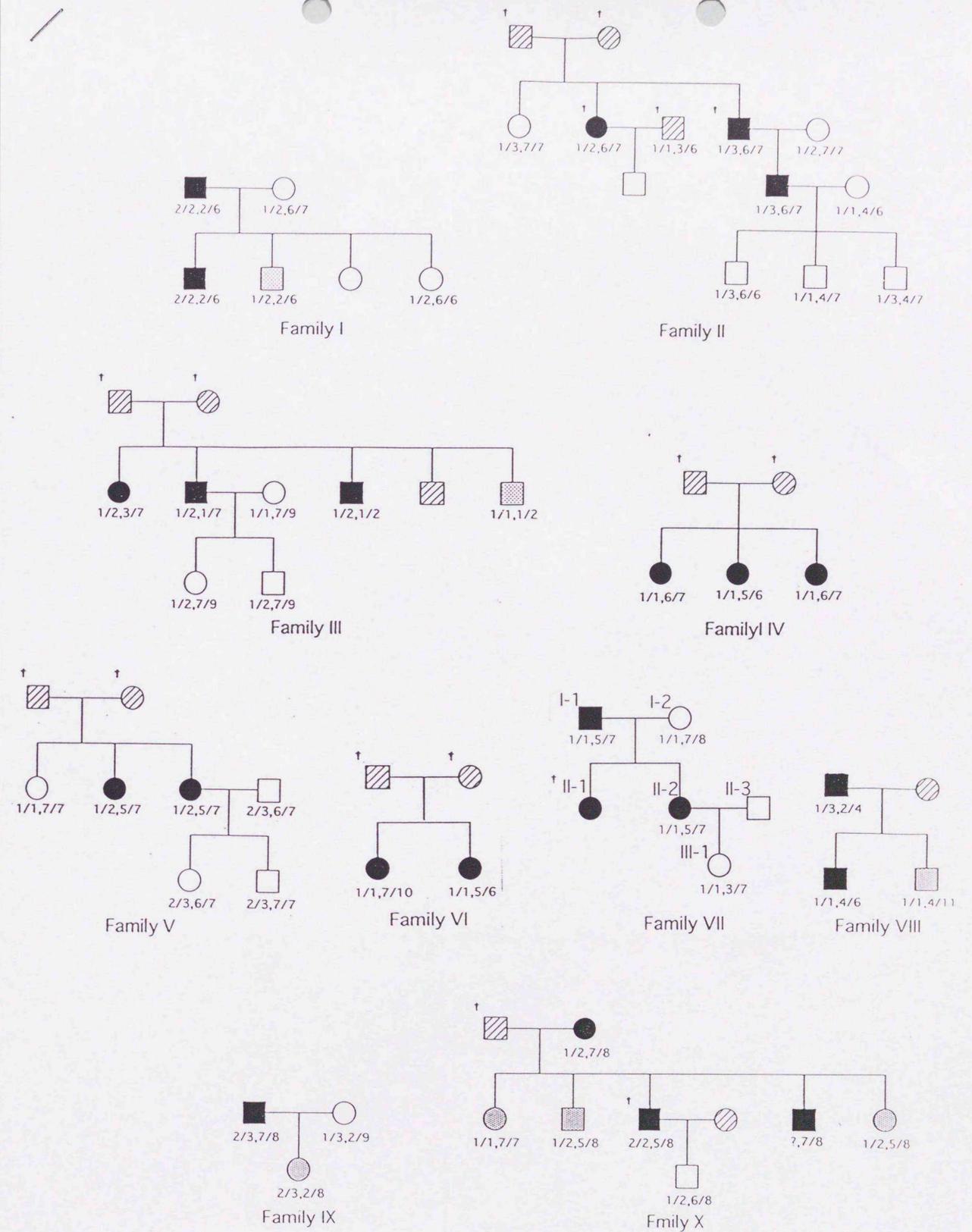
26) Ko YL, Lein WP, Chen JJ, Wu CW, Tang TK, Liew CC (1992) : No evidence for linkage of familial hypertrophic cardiomyopathy and chromosome 14q1 locus D14S26 in a Chinese family : evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet* 89 : 597-601.

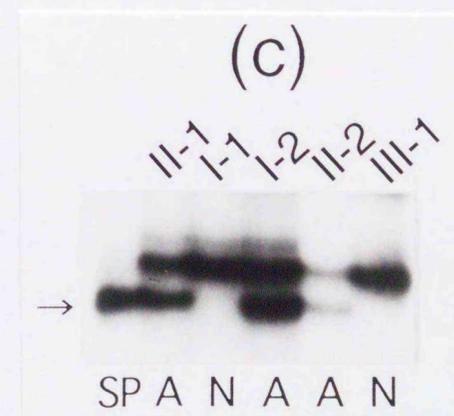
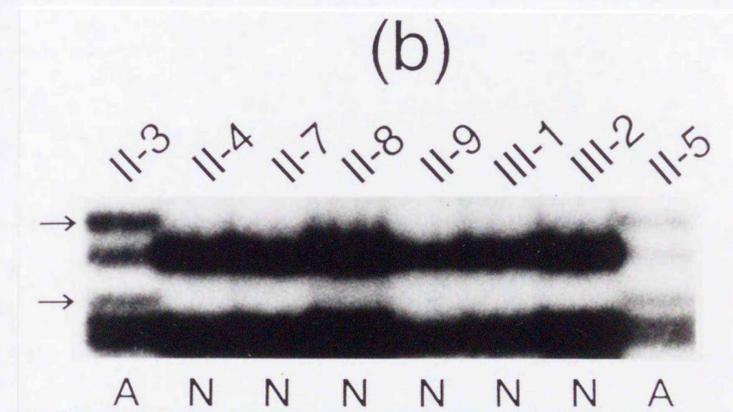
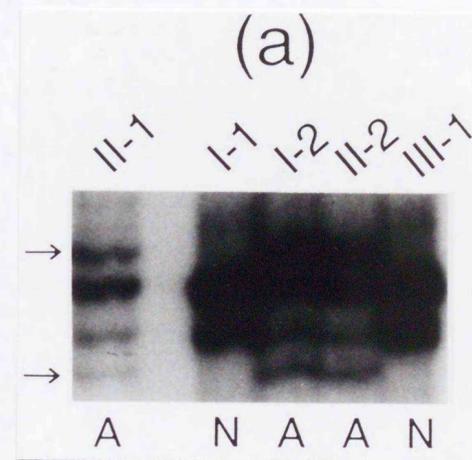
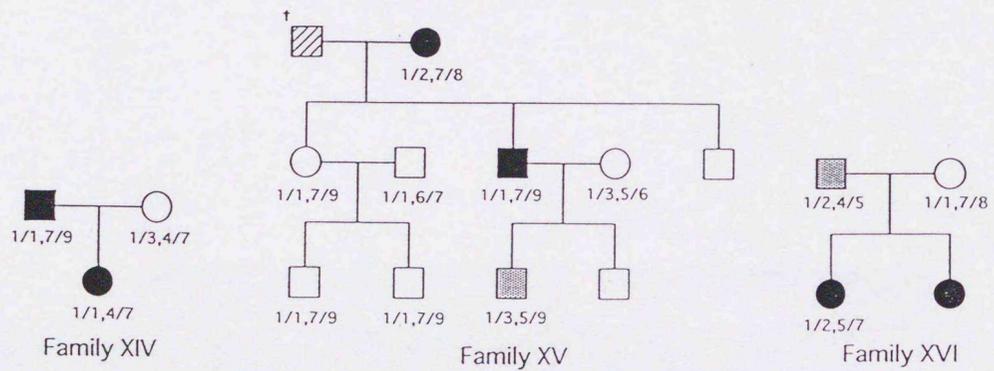
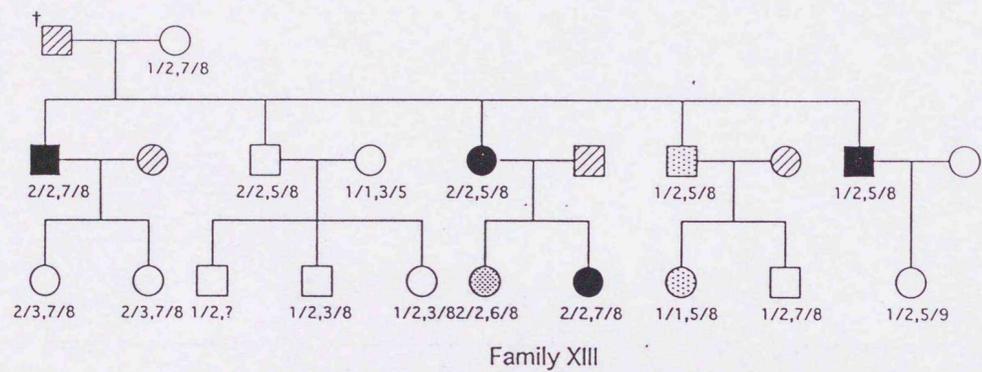
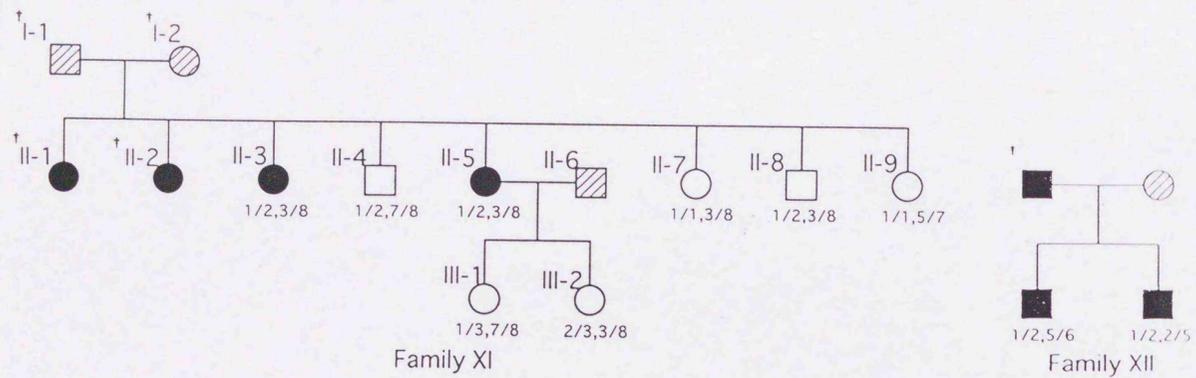
27) Vybril T, Dietiker PR, Roberts R, Epstein HF (1992) : Accumulation and assembly of myosin in hypertrophic cardiomyopathy with the 403 Arg to Gln β -myosin heavy chain mutation. *Circulation Res* 71 : 1404-1409.

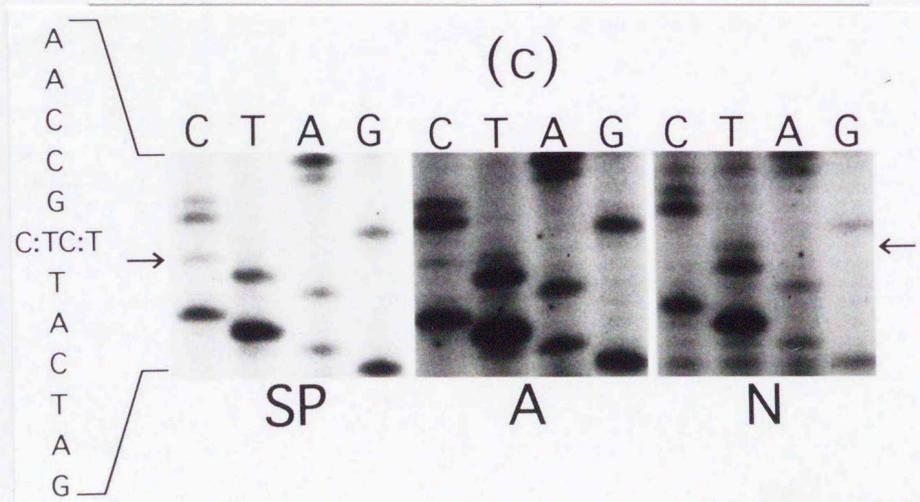
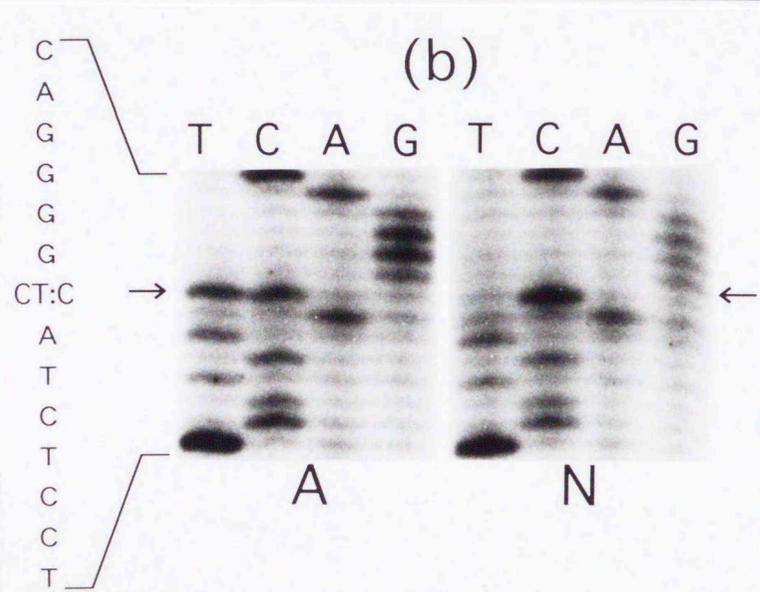
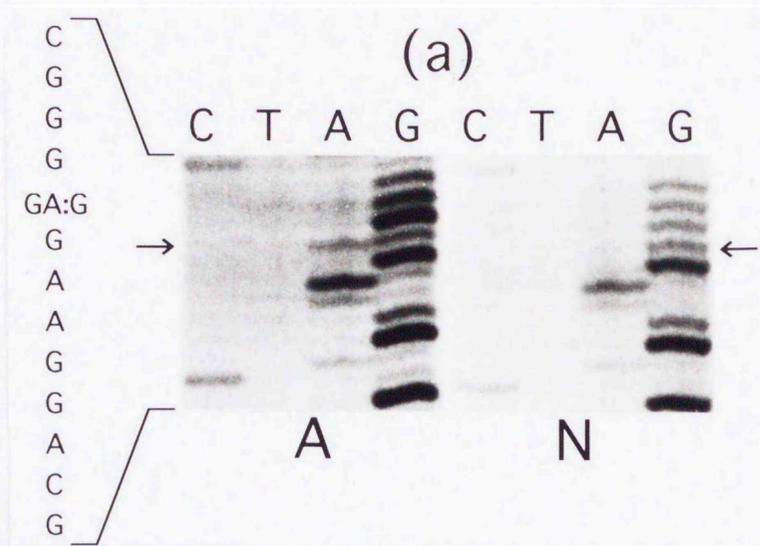
28) 戸嶋 裕徳, 松山 公明, 志田 正典, 古賀義則 (1989): 心尖部肥大型心筋症の心電図, 心エコー図の経年変化. 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班昭和63年度報告集: 133-135.

29) 清水 雅俊, 横田 慶之, 川合 宏哉, 本多 由佳, 寺島 充康, 桜本 博也, 横山 光宏 (1993): 家族性肥大型心筋症の臨床像の多様性に関する検討. 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班平成4年度報告集: 38-41.

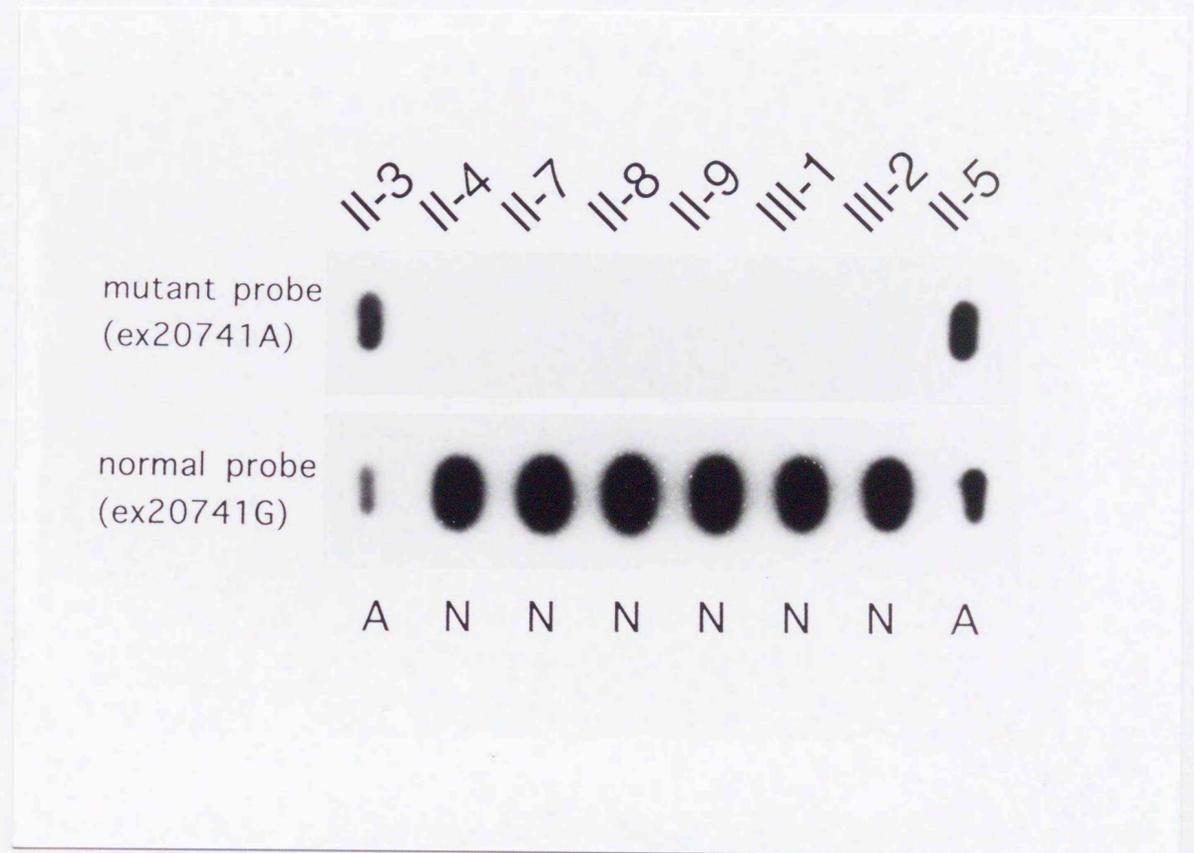
30) 佐藤 広樹 (1992): 肥大型心筋症の原因遺伝子の連鎖解析に関する研究. 北海道医学雑誌 67: 830-838.



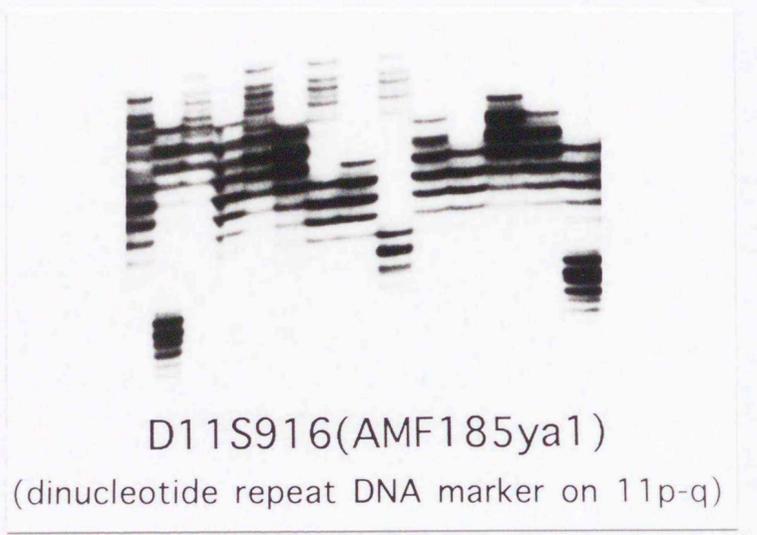
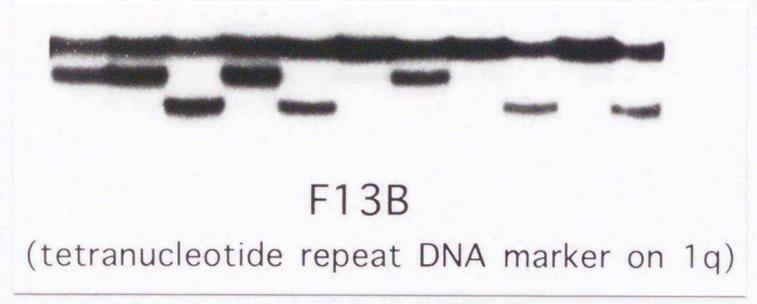




3

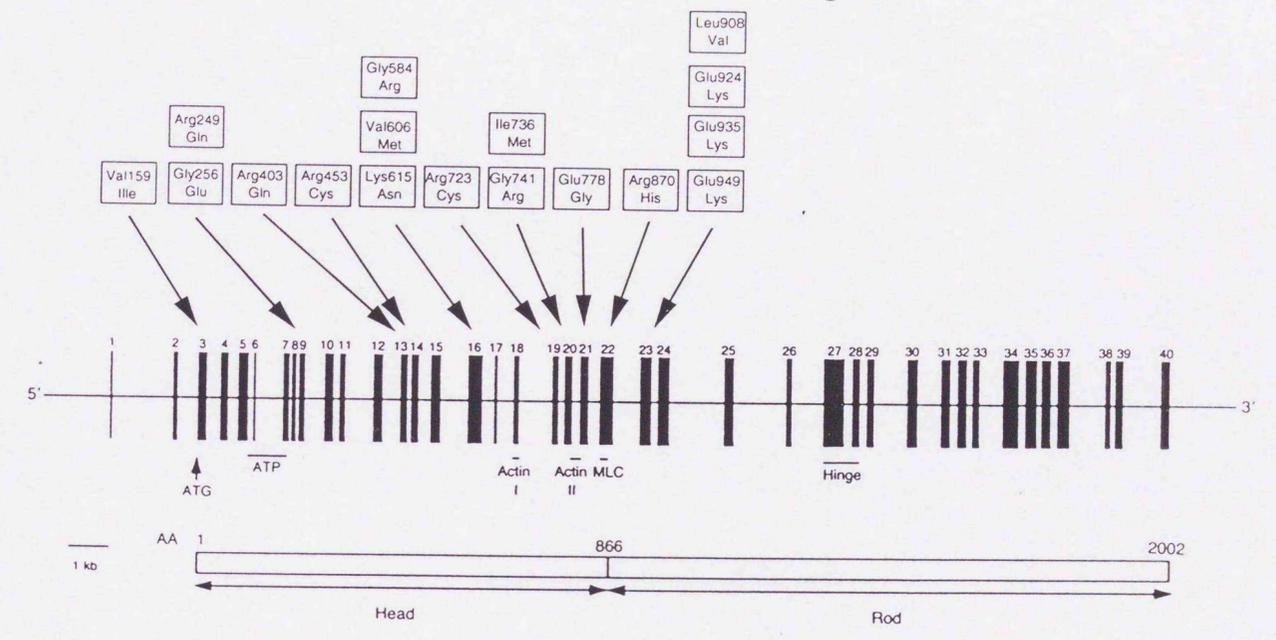


4



125

Cardiac β -myosin heavy chain gene



田6
ATG正位

Table 1. Linkage analysis of 16 FHCM multiplex families

Family	locus marker	Chromosome	F13B		D11S916 (AMF185ya1)	
			1q	1p~q	1q	1p~q
$\theta =$			0.001	0.05	0.001	0.05
FH 1			0.000	0.000	0.259	0.221
FH 2			-2.308	-0.656	0.516	0.440
FH 3			0.329	0.272	-1.801	-0.283
FH 4			0.119	0.099	0.032	0.026
FH 5			0.185	0.170	0.763	0.063
FH 6			0.075	0.062	-2.319	-0.720
FH 7			0.000	0.000	0.000	0.000
FH 8			0.300	0.257	0.300	0.257
FH 9			0.000	0.000	0.000	0.000
FH 10			-2.078	-0.712	-2.388	-0.762
FH 11			-0.659	-0.478	-0.768	-0.538
FH 12			0.146	0.122	-0.057	-0.046
FH 13			-3.241	-1.230	-3.252	-1.622
FH 14			0.000	0.000	0.000	0.000
FH 15			-0.967	-0.561	-3.358	-1.462
FH 16			0.000	0.000	0.000	0.000

Lod scores between FHCM and a DNA marker at a recombination fraction (θ) are calculated at the disease-penetrance of 90% and disease-prevalence of 0.0002.

Table 1
10710 1102

Figure 1. Family pedigrees of 16 Japanese multiplex families with FHCM.

Squares and circles represent male and female respectively. Closed, open, speckled and stippled symbols represent affected, unaffected, borderline and disease-status unknown individuals, respectively. † symbols represent death. Genotypes of F13B (bottom left) and AMF185ya1 (bottom right) indicated for each subjects.

Figure 2. PCR-SSCP analysis of exon 19, 20, 24 of cardiac β -MHC gene.

a) SSCP analysis of PCR products of exon 19 from members of family VII. b) SSCP analysis of PCR products of exon 20 from members of family XI. c) SSCP analysis of PCR products of exon 24 from members of family VII and one sporadic patient. Affected and unaffected, and sporadic individuals are indicated by A, N, and SP respectively. Individuals are identified by pedigree number represented on Fig 1. Arrowheads indicate extra bands. In addition to normal bands detected at lane N, other extra bands are detected at lane A. At lane SP only extra band is visible.

Figure 3. Direct sequencing analysis of exon 19, 20, 24 of cardiac β -MHC gene.

a) Sequencing ladders of PCR products of exon 20 from one affected member and one unaffected member of family XI. b) Sequencing ladders of PCR products of exon 19 from one affected member and one unaffected member of family VII. c) Sequencing ladders of PCR products of exon 24 from one affected and one unaffected member of family VII and those from one sporadic patient. Affected, unaffected and sporadic individuals are indicated A, N, and SP, respectively. Nucleotide substitutions indicated by arrowheads; G to A substitution (a), C to T

substitution(b), **T** to **C** substitution(c). Extra bands are detected in the affected but not in the unaffected. Both normal and extra bands are detected in the affected of family XI and VII and these results suggest that these mutations are heterozygote. In one sporadic patient only extra band is visible and this suggest that this mutation is homozygote.

Figure 4. Dot blot hybridization with allele-specific oligonucleotide probe.

PCR products of exon 20 from members of family XI were hybridized with both normal (ex20741G) and mutant (ex20741A) probes. Affected and unaffected individuals are indicated A and N, respectively. Individuals are identified by pedigree number represented on Fig 1. Only PCR products from the affected are hybridized with mutant probe, whereas those from the unaffected are hybridized stronger with normal probe than those from the affected.

Figure 5. Representative electrophoresis patterns of F13B (tetranucleotide DNA marker on 1q) and AMF185ya1 (dinucleotide marker on 11p-q).

3 polymorphisms and 11 polymorphisms are detected. Genotypes were determined as following examples. F13B: from rightward; 1/3, 1/1, 1/3, 1/1, 1/2, 1/1, 1/3, 1/2, 1/3, 1/2, 1/2. D11S916 (AMF185ya1): from rightward; 7/10, 5/6, 4/5, 7/8, 5/7, 2/9, 7/8, 2/8, 5/6, 2/5, 4/6, 2/4, 4/11.

Figure 6. A schematic diagram of the normal cardiac β -myosin heavy chain and location of missense mutations.

Sequence that encode the initiation of transcription(ATG), ATPase

activity(ATP), actin binding(Actin I and II), myosin light-chain binding(MLC), and hinge function(Hinge) are indicated. The head and rod regions of the encoded polypeptide are shown at the bottom of the figure. Each published missense mutations are shown above the diagram. (modified from paper 14)

