

学位論文

「心筋症として診断された突然死症例における

サルコメア構成タンパク遺伝子の変異解析」

指導教授名 栗原 克由

申請者氏名 村上 千香子

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【はじめに】

わが国において内因性突然死の約半数を占めている心臓性突然死の多くは虚血性心疾患であり、次いで多いのが心筋疾患である。心筋疾患の中でも代表的な疾患である心筋症(CM)は、「心機能障害を伴う心筋疾患」と定義されており、臨床病態に基づき拡張型心筋症(DCM)、肥大型心筋症(HCM)、拘束型心筋症(RCM)、不整脈原性右室心筋症(ARVC)、分類不能な心筋症および原因または全身疾患との関連が明らかな特定心筋症に分類される。各心筋症とも家族内発症など遺伝的背景が確認されている症例もあることから、遺伝子異常に対する研究が注目されている。1990年に心筋症の家系で心筋 β ミオシン重鎖遺伝子(MYH7)の変異が心筋症の原因遺伝子として同定され、現在までに11種類のサルコメア構成タンパク遺伝子において450以上の遺伝子変異が原因遺伝子として同定されている。

そこで、これら報告をもとに心筋症による突然死の実態を明らかにすることを目的に、当教室で検案・解剖されたCM症例についてサルコメア構成タンパク遺伝子であるMYH7、心筋トロポニンT遺伝子(TNNT2)、心筋トロポニンI遺伝子(TNNI3)、心筋トロポニンC遺伝子(TNNC1)、ミオシン結合蛋白C遺伝子(MYBPC3)、心室型ミオシン調節軽鎖遺伝子(MYL2)、心室型ミオシン必須軽鎖遺伝子(MYL3)の遺伝子解析を行った。さらにこれら心筋症原因遺伝子解析による遺伝子診断の可能性についても検討を行った。なお、本研究は北里大学医学部・病院倫理委員会およびヒトゲノム倫理審査小委員会の審査と承認を得ている(B01-24)。

【材料および方法】

ご遺族から同意を得たDCM19例、HCM15例、ARVC3例の血液を対象とした。対照には連結不可能匿名化して保存されている特記すべき疾患のない200例を用いた。これら試料からQuick Gene-800 (FUJIFILM)を用いてそのプロトコールに従いDNA抽出を行った。NCBIの報告に基づきMYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2、MYL3についてExonを含むようにプライマーを設計し、各DNA試料についてAmpliAq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems)を用いてPCR増幅を行った。PCR産物はBigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて泳動後、SeqScape Software Ver.2.5.0 (Applied Biosystems)を用いて解析および塩基配列決定を行った。決定した塩基配列についてはNCBIに報告されている配列をリファレンスとし、変異の有無の検討を行った。検出された変異については心筋症と対照との間で有意差検定を行った。

【結果および考察】

CM 症例 37 例および対照 200 例について MYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2 および MYL3 の変異解析を行った結果、ミスセンス変異 7 ヶ所、サイレント変異 8 ヶ所、フレームシフト変異 1 ヶ所、一塩基置換 10 ヶ所および 2 塩基挿入 1 ヶ所が検出された。

MYH7 では検出された遺伝子変異のうち 3 ヶ所 c.732C>T (p.Phe244=)、c.4239G>A (p.Ser1413=)、c.5793C>T (p.Gly1931=) はサイレント変異であり、全て CM 症例で検出された。サイレント変異はアミノ酸置換を伴わないため、一般的には疾患との関連はないとされていたが、サイレント変異によりスプライシングの過程でエクソスキッピングが起こり、mRNA の安定性やタンパクの折りたたみ構造や機能に変化が生じるとされており、今回検出されたサイレント変異がタンパクの機能に影響を及ぼしている可能性も考えられた。

TNNI3 では DCM において新たにミスセンス変異 c.46C>A (p.Pro16Thr) が検出された。この領域は PKA によりリン酸化されるセリン残基を含んでいる。TNNI3 のリン酸化は心筋収縮調節に重要な役割を担っており、トレオニンもまたリン酸化されるため今回検出されたミスセンス変異は拡張性心肥大の原因遺伝子となった可能性が示唆された。

MYBPC3 で検出された c.2671C>T (p.Arg891Trp) のミスセンス変異はアミノ酸の荷電性変化を伴っていた。MYH7 においてアミノ酸の荷電性変化を伴うミスセンス変異はタンパクの構造変化をきたすため予後不良であるといわれている一方で、MYBPC3 変異例は遅発性で比較的予後良好であるともいわれている。今回検出されたアミノ酸の荷電性変化を伴うミスセンス変異は DCM 症例で検出され、43 歳と若年齢で死亡していることから、MYBPC3 においても荷電性変化を伴うアミノ酸変異は予後不良である可能性が示唆された。

MYL3 で検出されたミスセンス変異 c.170C>G (p.Ala57Gly) は、26 歳の HCM 症例にみられた。Ala57 は動物種間において高い保存性を有しており、タンパクの重要な機能を担っているカルシウム結合部位である EF-hand ドメインに位置している。心室型ミオシン必須軽鎖はアクトミオシン架橋形成時にアクチンと結合し、心筋の収縮力発生に対して重要な役割を果たしている。c.170C>G (p.Ala57Gly) に基づく EF-hand ドメインの変異により心筋収縮障害をきたし、その代償作用として HCM を発症したと考えられた。

さらに今回 48 ヶ所の遺伝子多型が検出された。ARVC を除く CM 症例と対照例との間で有意差検定を行ったところ、44 ヶ所において有意差は認められなかったが、TNNT2 の c.68-5_3delinsTT および c.348C>T (p.Ile116=)、TNNI3 の c.25-8T>A、MYBPC3 の c.1927+89C>G の 4 多型に有意差が認められた。有意差が認められた 4 多型についてその組み合わせから 16 グループを作成し、対照例との間の有意差検定を行い、これら 4 多型を用いた遺伝子診断の可能性について検討を行った。その結果、

HCM においてはグループ A (c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)と B(c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T (p.Ile116=))に、DCM においてグループ K(c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)にそれぞれ対照例との間で有意差が認められた(A; P=0.008, B; P=0.0003, K; P=0.007)。

以上の結果から HCM では少なくとも 3 多型 (c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T)、DCM で 2 多型(c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)が遺伝子診断には重要であることが示され、これら 4 多型を用いることで検案における CM 遺伝子診断も可能となることが示唆された。

法医学で扱う突然死症例は、主として解剖所見から死因の診断がされているが、不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく、また十分な医療情報が得られないこともあり、診断に苦慮する事例がある。解剖しても明らかな病変が認められない場合には、遺伝子異常に基づく突然死も考慮しなければならない。遺伝子異常を解明することは、その疾患を治療する上で重要な第一歩であり、治療に直結せずとも、その患者の予後推定や家族へのフィードバックが可能となり、予防医学にも貢献するものと考えられる。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 対象および方法	
2-1. 対象試料および DNA 抽出	3
2-2. PCR 増幅および泳動、解析	3
3. 結果	
3-1. CM 症例のみ認められた変異	
3-1-1. MYH7	4
3-1-2. TNNT2、TNNI3 および TNNC1	4
3-1-3. MYBPC3	4
3-1-4. MYL2 および MYL3	5
3-2. 遺伝子多型	5
4. 考察	
4-1. CM 症例のみに認められた変異	
4-1-1. MYH7	5
4-1-2. TNNT2、TNNI3 および TNNC1	6
4-1-3. MYBPC3	7
4-1-4. MYL2 および MYL3	8
4-2. 遺伝子多型	9
5. 総括	9
6. 今後の課題	12
7. 謝辞	12
8. 引用文献	13
9. 図表	16

1. 序論

法医学とは「医学的解明、助言を必要とする法律上の案件、事項について、科学的で公正な医学的判断を下すことによって、個人の基本的人権の擁護、社会の安全、福祉の維持に寄与することを目的とする医学」と定義づけられており[1]、これまでに社会医学として重要な役割を担ってきた。現代社会において法医学の実際活動は多岐にわたるが、高齢化に伴い高齢者の突然死が増加している現状を踏まえ、その死因を究明し、社会にフィードバックしていくことも重要な責務の一つである。

突然死とは、瞬間死あるいは急性症状の発現後 24 時間以内の死亡で、交通事故等の外因死を除いた自然死のことであり、その中でも心臓性突然死の占める割合は約 50%と多く[2]、その研究は予防医学的にも大きな展望が望まれている。突然死の死因、病態を解明するには解剖を積極的に行う必要があるが、異状死体の取り扱われ方は全国各地で異なり、また扱いに関する法規が異なっているため十分な調査・研究ができないのが現状である。

従来、病気は病態を手がかりとして診断されていたが、遺伝子操作の技法の進歩によって、一部の病気については発病の主要な原因になった遺伝子の構造変化を明らかにすることによって診断できるようになり、その結果、遺伝子異常により生じる循環器疾患も複数見つかってきている。わが国において内因性突然死の約半数を占めている心臓性突然死の多くは虚血性心疾患である。虚血性心疾患とは生活習慣や加齢性変化等による冠状動脈の硬化や狭窄に基づく血量の低下により引き起こされる心機能不全である。次いで多いのが心筋疾患であり、代表的な疾患が心筋症(CM)である。CM とは「心機能障害を伴う心筋疾患」と定義されており、臨床病態に基づき拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)、肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy: HCM)、拘束型心筋症(Restrictive cardiomyopathy: RCM)、不整脈原性右室心筋症(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: ARVC)、分類不能な心筋症(Unclassified cardiomyopathy)および原因または全身疾患との関連が明らかな特定心筋症(Specific cardiomyopathy)に分類される[3]。

DCM は心筋収縮不全と左室内腔の拡張を特徴とする疾患群であり、進行性の慢性心不全症状を呈し、致死性不整脈による突然死や血栓症を生じ予後不良である。また、病理組織所見として心筋細胞の肥大・変性や繊維化が特徴的であ

る[4]。

HCM は主にサルコメア関連遺伝子の変異に起因する心筋疾患で、心室壁の肥厚を特徴とし、その病態は左室の拡張性・コンプライアンスの低下によって起きる拡張機能障害を呈する。病理所見として心筋肥大と錯綜配列などを特徴とするが、細動脈の壁肥厚や内腔の狭小化による微小血管循環障害がみられ、相対的心筋虚血を呈し、心筋線維化を呈することがある。特に進行性に心機能低下をきたした拡張相肥大型心筋症(end-stage of HCM, dilated phase of HCM: D-HCM)では心筋線維化を伴い、心室頻拍や重症心不全を呈し予後不良である[5]。

ARVC は原因不明の右室心筋の変性、脂肪浸潤・線維化などを病理的特徴とし、右室の拡大や収縮不全のほか左室にも病変がおよぶ症例もある。さらに右室起源の致死的心室不整脈を呈し、若年者やアスリートにおける突然死の主な原因となることが多いといわれている[6]。

各 CM とも家族内発症など遺伝的背景が確認されている症例もあることから、遺伝子異常に対する研究が注目されている。1990 年に CM の家系で心筋 β ミオシン重鎖遺伝子(MYH7)の変異が CM の原因遺伝子として同定され[7]、現在までに MYH7、心筋トロポニン T 遺伝子(TNNT2)、心筋トロポニン I 遺伝子(TNNI3)、心筋トロポニン C 遺伝子(TNNC1)、ミオシン結合蛋白 C 遺伝子(MYBPC3)、心室型ミオシン調節軽鎖遺伝子(MYL2)、心室型ミオシン必須軽鎖遺伝子(MYL3)、 α ミオシン重鎖遺伝子(MYH6)、 α 心筋アクチン(ACTC)、 α トロポミオシン(TPM1) およびタイチン(TTN)の 11 種類のサルコメア構成タンパク遺伝子において 450 以上の遺伝子変異が原因遺伝子として同定されている[8-11]。そこで、これら報告をもとに CM による突然死の実態を明らかにすることを目的に、当教室で検案・解剖された CM 症例について MYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2 および MYL3 の遺伝子解析を行った。さらにこれら CM 原因遺伝子解析による遺伝子診断の可能性についても検討を行った。

なお、本研究は北里大学医学部・病院倫理委員会およびヒトゲノム倫理審査小委員会の審査と承認を得ている (B01-24)。

2. 対象および方法

2-1. 対象試料および DNA 抽出

試料はご遺族から同意を得た DCM19 例、HCM15 例、ARVC3 例の血液を対象とした。その内訳を Table 1 に示した。男性が DCM13 例、HCM11 例、ARVC2 例、女性は DCM6 例、HCM4 例、ARVC1 例であり、CM の既往のある症例は DCM17 例、HCM6 例、ARVC1 例で、家族内発症が確認されているのは HCM の 1 例であった。

各 CM の診断は AHA Scientific Statement および ESC レポートに基づき、HCM は錯綜配列および間質の線維化を伴った心室壁厚の増加による左室肥大を、DCM は左心室拡張、左心室収縮機能障害および Table 1 に示した病歴を、ARVC は右室に限局し、進行につれ右室全体ないし中隔を除く左室にまで至る心筋の線維脂肪織への進行性の置換を診断基準とした。発症が確認されてからの平均生存年数は、DCM 約 8 年、HCM 約 9 年であった。また、死亡時の状況としては、運動時、睡眠時など様々であった。対照にはすでに連結不可能匿名化して保存されている特記すべき疾患のない 200 例を用いた。これら試料から Quick Gene-800 (FUJIFILM)を用いてそのプロトコールに従い DNA 抽出を行った。

2-2. PCR 増幅および泳動、解析

NCBI の報告に基づき MYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2 および MYL3 について Exon を含むようにプライマーを設計した(Table 2-10)。増幅は 10 μ g の DNA 0.5 μ l を鋳型として、10 μ M Forward Primer 1.0 μ l、10 μ M Reverse Primer 1.0 μ l、AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix 5.0 μ l を加え、Sterile Deionized Water で総量 10.0 μ l に調製したものを反応液とし、Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いて、Initial Step 95 $^{\circ}$ C 10 分後、Denaturation 95 $^{\circ}$ C 30 秒、Annealing 58–65 $^{\circ}$ C 30 秒、Extension 72 $^{\circ}$ C 1 分を 35 サイクル、Final Step 72 $^{\circ}$ C 7 分で行った。PCR 産物は ExoSAP-IT[®] (usb)により精製後、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンス反応を行った。BigDye[®] XTerminator (Applied Biosystems)による精製後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて泳動、SeqScape Software Ver.2.5.0 (Applied Biosystems)を用いて解析および塩基配列決定を行った。決定した塩基配列については NCBI に報告されている配列をリファレンスと

し(MYH7: NM_000257.2, TNNT2: NM_000364.2, TNNI3: NM_000363.4, TNNC1: NM_003280.2, MYBPC3: NM_000256.3, MYL2: NM_000432.3, MYL3: NM_000258.2)、変異の有無の検討を行った。検出された遺伝子多型についてはCMと対照例との間で有意差検定を行った。

3. 結果

CM症例37例および対照200例についてMYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2およびMYL3の変異解析を行った結果、29ヶ所の変異が検出された。このうちCM症例のみに認められた変異は22ヶ所であった。遺伝子多型は48ヶ所検出された。CM症例のみに検出された変異および遺伝子多型をTable 11およびTable 12に示した。

3-1. CM症例のみ認められた変異

3-1-1. MYH7

3ヶ所のサイレント変異(c.732C>T (p.Phe244=)、c.4239G>A (p.Ser1413=)、c.5793C>T (p.Gly1931=))、2ヶ所の一塩基置換(c.639+31C>T、c.3853+27T>A)および1ヶ所の一塩基挿入(c.3337-3_-2insC)が検出された(Table 11, Fig.1,2)。DCMで検出された3ヶ所の変異(c.639+31 C>T, c.4239G>A (p.Ser1413=), c.5793C>T (p.Gly1931=))は各1例のみにみられたが、c.3853+27T>AはDCM3例、HCM1例、c.732C>T (p.Phe244=)はDCM2例、HCM1例、c.3337-3_-2insCはDCM3例で検出され、さらにこれらの変異はDCM1例を除き2つないし3つが同一症例に存在していた。

3-1-2. TNNT2、TNNI3 および TNNC1

6ヶ所の変異 (TNNT2 : c.873C>T (p.Thr291=)、 c.600+14A>T および c.842+61A>G、TNNI3 : c.46C>T (p.Pro16Thr) および c.109-17C>A、TNNC1 : c.24+9C>T)が検出された (Table 11, Fig.3,4)。TNNT2 の c.600+14A>T、c.842+61A>G、TNNI3 の c.46C>T (p.Pro16Thr) および TNNC1 の c.24+9C>T は今回新たに検出された変異であった。

3-1-3. MYBPC3

4ヶ所のミスセンス変異 (c.706A>G (p.Ser236Gly)、c.2671C>T (p.Arg891Trp)、c.3137C>T (p.Thr1046Met)および c.3218G>C (p.Arg1073Pro))、1ヶ所のサイレント変異 (c.75C>T (p.Ser25=))、1ヶ所のフレームシフト変異 (c.1777delT (p.Ser593fs:1)) および2ヶ所の一塩基置換 (c.25+55T>C および c.292+55C>T) が検出された (Table11, Fig.5-7)。このうち c.3137C>T (p.Thr1046Met) は DCM、HCM 各1例、c.1777delT (p.Ser593fs:1) は DCM1例、HCM2例に検出された。

3-1-4. MYL2 および MYL3

MYL3 において1ヶ所のミスセンス変異 (c.170C>G (p.Ala57Gly))、MYL2 において1ヶ所のサイレント変異 (c.456C>T (p.Tyr152=)) が検出された (Table11, Fig.8,9)。

3-2. 遺伝子多型

検出された48ヶ所の遺伝子多型についてCMとの関連性について検討を行った。CM症例と対照例との間で有意差検定を行ったところ、HCMでTNNT2のc.68-5_-3delinsTT (P = 0.010) および c.348C>T (p.Ile116=) (P = 0.026)、DCMでTNNI3のc.25-8T>A (P = 0.006) およびMYBPC3のc.1927+89C>G (P = 0.02)に有意差が認められた (Fig.10-13)。その他44ヶ所では有意差は認められなかった。なお、ARVCは症例数が少ないため計算から除外した。

4. 考察

4-1. CM症例のみに認められた変異

4-1-1. MYH7

心筋βミオシン重鎖は1935のアミノ酸より構成されており、ATP結合部位やアクチン結合部位などの重要なドメインを含んでいる。心筋βミオシン重鎖をコードしているMYH7は第14番染色体長腕(14q11.2-q13)に位置し、40のExonより構成される約23kbの遺伝子である。

MYH7で検出された遺伝子変異のうち3ヶ所 c.732C>T (p.Phe244=)、c.4239G>A (p.Ser1413=)、c.5793C>T (p.Gly1931=)はサイレント変異であった。

サイレント変異はアミノ酸置換を伴わないため一般的には疾患との関連はないとされていたが、サイレント変異によりスプライシングの過程でエクソンスキッピングが起これ、mRNA の安定性やタンパクの折りたたみ構造や機能に変化が生じるとされており、今回検出されたサイレント変異がタンパクの機能に影響を及ぼしている可能性も考えられた。また、CM 症例 4 例 (D02、D10、D15、H14)では MYH7 に複数個の変異が存在していた。2 つの遺伝子変異が同時に現れた場合 CM 病態がより重篤となるとの報告があり[12,13]、さらに 2 例 (D02、D08)では他のサルコメア構成タンパク遺伝子 (TNNT2、MYBPC3)にも変異が存在していた。収縮タンパクである β ミオシン重鎖、ミオシン結合蛋白 C、トロポニン T の遺伝子異常と CM 表現型との間に関係があることが示唆されており[14]、これら遺伝子変異が同時に現れたことで極めて重篤な病態を呈したものと推察された。

4-2-2. TNNT2、TNNI3 および TNNC1

トロポニン複合体とトロポミオシンはアクチンを中心とする細いフィラメントに存在し、アクチンとミオシンの相互作用を Ca^{2+} 依存性に調節する役割を持っている。このトロポニン複合体はトロポニン T (TnT)、トロポニン I (TnI)、トロポニン C (TnC)の 3 つのサブユニットから構成され、これらをコードする遺伝子に HCM の原因となる多くの突然変異が見い出されている。これら遺伝子変異に基づく心筋の機能異常は、Ca の感受性の亢進あるいは Ca の感受性の抑制を引き起こす。Ca 感受性の亢進は、通常の Ca^{2+} 濃度で心筋収縮力が増加することを意味しており、これは HCM の特徴である心臓収縮機能の増強と拡張機能の低下につながる。TNNT2 の変異はトロポニン複合体を低い Ca^{2+} 濃度に反応する高感度なスイッチに変えることが明らかとなり[15]、TNNI3 での変異も Ca 感受性を亢進させることが報告されている[16,17]。これらの収縮調節蛋白では HCM 病態発現において Ca 感受性亢進の関与が強く示唆されている[18]。一方、DCM ではリン酸化による Ca 感受性の抑制により、通常の細胞質内 Ca^{2+} 濃度では正常より小さな収縮力しか発生することができないため、それに伴う心拍出量の低下に対して心拡大と心室内腔拡張である代償的心臓リモデリングを誘発すると考えられている[19]。

今回検出された c.600+14A>T (TNNT2)、c.109-17C>A (TNNI3)および c.24+9C>T (TNNC1)は DCM 症例のみに検出された。イントロンは遺伝子発現調節や転写効

率に機能的役割を持っていることから、これらの変異は心筋症発症に大きく関わっている可能性が考えられた。

また、TNNT2 で検出された c.873C>T (p.Thr291=)、c.842+61A>G 変異は同一 HCM 症例に存在していた。2つの変異を持つ患者は単一の遺伝子変異を持つ患者より HCM がより重症であり、ホモ接合の場合特に顕著にみられるという報告がある[12,13]。

TNNI3 では DCM において新たにミスセンス変異 c.46C>A (p.Pro16Thr) が検出された。この領域は PKA によりリン酸化されるセリン残基を含んでいる。TNNI3 のリン酸化は心筋収縮調節に重要な役割を担っており、トレオニンもまたリン酸化されるため今回検出されたミスセンス変異は拡張性心肥大の原因遺伝子となった可能性が示唆された。

4-2-3. MYBPC3

MYBPC3 は MYH7、TNNT2 に次いで変異が多いことが知られており、第 11 番染色体短腕に位置し、35 の Exon から構成されている約 24kb の遺伝子である。ミオシン結合蛋白 C はミオシンと結合していることにより太いフィラメントの正常な形態を形成し、リン酸化による心収縮性の調節という重要な役割を果たしている[20-24]。

今回検出された遺伝子変異のうち c.2671C>T (p.Arg891Trp)はフィブロネクチン III 型領域、c.1777delT (p.Ser593fs:1)、c.3137C>T (p.Thr1046Met)および c.3218G>C (p.Arg1073Pro)は免疫グロブリン領域で起こっている。さらに c.3137C>T (p.Thr1046Met)および c.3218G>C (p.Arg1073Pro)はタイチンやミオシンと結合する部位であることから、これらの変異によりサルコメアが構造変化をきたし、心筋症を発症した可能性が考えられた。さらにミスセンス変異 c.2671C>T (p.Arg891Trp)はアミノ酸の荷電性変化を伴っていた。MYBPC3 のミスセンス変異に基づく CM 病態は遅発性で比較的予後が良好であるといわれている[25,26]。一方、MYH7 においてアミノ酸の荷電性変化を伴うミスセンス変異はタンパクの構造変化をきたすため、臨床的に予後不良であるといわれている[27-31]。アミノ酸の荷電性変化を伴うミスセンス変異を所有する DCM 症例 (D01)は 43 歳と若年齢で死亡していることから、MYBPC3 においても荷電性変化を伴うアミノ酸変異に基づく CM 病態は予後不良であると考えられた。

HCM は常染色体優性遺伝であり、家族性 HCM の研究では患者の約半数にサ

ルコメア構成タンパク遺伝子に変異を有することが報告されている。MYH7、TNNT2 および MYBPC3 の3つの遺伝子に変異頻度の高い遺伝子として知られている。しかし DCM の原因遺伝子は十分に定義されていない。今回の結果をみると DCM では MYH7 で 37%、MYBPC3 で 21%、また HCM では MYBPC3 で 33% の症例に変異が検出されたことから、MYH7 および MYBPC3 の変異解析は心筋症の法医学的遺伝子診断にも有用であることが示唆された。

4-2-3. MYL2 および MYL3

心室型ミオシン軽鎖は心室型ミオシン調節軽鎖(RLC)と心室型ミオシン必須軽鎖(ELC)で構成されており、心筋βミオシン重鎖頭部のレバーアームドメインに結合し、心筋βミオシン重鎖の構造を維持している。RLCとELCをコードしているMYL2とMYL3はそれぞれ第12番染色体長腕(12q23-q24.3)および第3番染色体短腕(3p21.2-p21.3)に位置し、7つのExonで構成されている。MYL2は166のアミノ酸で構成される約10.0kb、MYL3は195のアミノ酸で構成される約6.5kbの遺伝子である[32]。MYL3ではExon6にストップコドンが存在するためExon7はタンパクをコードしていないとみなされている[33]。

MYL2およびMYL3はEF-handをもつ細胞内Ca²⁺結合蛋白スーパーファミリーのうち、カルモデュリンおよびTnCサブファミリーに属し、アクチン結合部位、プロリンリッチ領域、4つのEF-handの機能的ドメインで構成されている。

MYL3で検出されたミスセンス変異c.170C>G(p.Ala57Gly)は、26歳のHCM症例にみられた。本症例は25歳でHCMと診断され、兄も同様にHCMで死亡している。

Ala57は動物種間において高い保存性を有しており(Fig.14)[34,35]、タンパクの重要な機能を担っているカルシウム結合部位であるEF-handドメインに位置している。ELCはアクトミオシン架橋形成時にアクチンと結合し、心筋の収縮力発生に対して重要な役割を果たしている。c.170C>G(p.Ala57Gly)に基づくEF-handドメインの変異により心筋収縮障害をきたし、その代償作用としてHCMを発症したと考えられた。

今回22ヶ所の変異がCM症例のみに検出された。遺伝性CMの表現型は遺伝的要素と環境要因の両方が複雑に相互作用している。今後さらに他のサルコメア構成遺伝子の解析も含めた幅広い検討が必要であると考えられた。

4-2. 遺伝子多型

検出された 48 ヶ所の遺伝子多型のうち TNNT2 の c.68-5_-3delinsTT および c.348C>T (p.Ile116=)、TNNI3 の c.25-8T>A、MYBPC3 の c.1927+89C>G の 4 多型に HCM 症例と対照例および DCM 症例と対照例との間で有意差がそれぞれ認められた。HCM 症例と対照例との間で有意差が認められた TNNT2 の c.348C>T (p.Ile116=)はトロポミオシンとの結合部位である。

有意差が認められた 4 多型についてその組み合わせから 16 グループを作成し、CM 症例 37 例と対照 191 例との間の有意差検定を行い、これら 4 多型を用いた遺伝子診断の可能性について検討を行った。その結果、HCM においてはグループ A (c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)と B(c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T (p.Ile116=))に、DCM においてグループ K(c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)にそれぞれ対照例との間で有意差が認められた(A; P=0.008, B; P=0.0003, K; P=0.007) (Table 13)。

以上の結果から HCM では少なくとも 3 多型(c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T)、DCM で 2 多型(c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)が遺伝子診断には重要であることが示され、これら 4 多型を用いることで検案における CM 遺伝子診断も可能となることが示唆された。

法医学で扱う突然死症例は、主として解剖所見から死因の特定がなされているが、不整脈などの機能的な死亡では解剖において形態学的所見は乏しく、また十分な医療情報が得られないこともあり、診断に苦慮する事例がある。解剖しても明らかな病変が認められない場合には、遺伝子異常に基づく突然死も考慮しなければならない。遺伝子異常を解明することは、その疾患を治療する上で重要な第一歩であり、治療に直結せずとも、その患者の予後推定や家族へのフィードバックが可能となり、予防医学にも貢献するものと考えられる。そのためにも今後はさらなるサルコメア構成タンパク遺伝子や Z 帯構成要素などの解析を行い、CM 病態を解明するとともに、より高精度の CM 遺伝子診断法を開発していくことが必要であると考えられた。

5. 総括

今回、サルコメア構成タンパク遺伝子変異に基づく CM による突然死の実態を明らかにすることを目的に、当教室で検案・解剖された CM 症例について

MYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2 および MYL3 の遺伝子解析を行った。さらにこれら CM 原因遺伝子解析による遺伝子診断の可能性についても検討を行い以下のような結論を得た。

- 1) MYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2 および MYL3 の変異解析を行った結果、CM 症例のみに認められた変異は 22 ヶ所、遺伝子多型は 48 ヶ所検出された。このうち TNNT2 の c.600+14A>T および c.842+61A>G、TNNI3 の c.46C>T (p.Pro16Thr) および TNNC1 の c.24+9C>T は今回新たに検出された変異であった。
- 2) MYH7 では 3 ヶ所のサイレント変異 c.732C>T (p.Phe244=)、c.4239G>A (p.Ser1413=)、c.5793C>T (p.Gly1931=)が CM 症例のみに検出された。サイレント変異によりスプライシングの過程でエクソンスキッピングが起こり、その結果タンパクの機能に影響を及ぼした可能性が考えられた。
- 3) TNNI3 では DCM において検出されたミスセンス変異 c.46C>A (p.Pro16Thr) は TNNI3 のリン酸化領域であるため、拡張性心肥大の原因遺伝子となった可能性が示唆された。
- 4) MYBPC3 で検出された c.2671C>T (p.Arg891Trp)のミスセンス変異はアミノ酸の荷電性変化伴っており、この変異を所有する DCM 症例は 43 歳と若年齢で死亡していることから、MYBPC3 の荷電性変化を伴うアミノ酸変異に基づく CM 病態は予後不良である可能性が示唆された。
- 5) MYL3 で検出された c.170C>G (Ala57Gly)は、アミノ酸配列の高保存領域におけるミスセンス変異であり、カルシウム結合部位である EF-hand ドメインに位置していることからミスセンス変異により心筋収縮障害をきたし、その代償作用として HCM を発症したと考えられた。
- 6) DCM5 例、HCM3 例で同一症例内に複数の遺伝子変異が検出され、これら変異により、より重篤な CM 病態を呈したことが推察された。

- 7) 検出された 48 ヶ所の遺伝子多型について CM との関連性の検討を行ったところ、DCM で TNNI3 の C.25-8T>A および MYBPC3 の c.1927+89C>G、HCM で TNNT2 の c.68-5_-3delinsTT および c.348C>T の 4 ヶ所で対照例との間に有意差が認められ、CM との関連性が示唆された。

- 8) 有意差が認められた 4 遺伝子多型について遺伝子診断の可能性について検討したところ、HCM では少なくとも 3 多型(c.68-5_-3delinsTT、c.25-8T>A、c.348C>T)、DCM では 2 多型(c.348C>T (p.Ile116=)、c.1927+89C>G)が遺伝子診断には重要であることが示され、これら 4 多型を用いることで検案における CM 遺伝子診断も可能となることが示唆された。

- 9) 本研究はサルコメア構成遺伝子に基づく CM の病因を解明したものであり、病態を基礎とした遺伝子診断、重症度分類、治療さらには予防に貢献するものと考えられた。

6. 今後の課題

対象とした CM の試料は当教室にて検案・解剖を行ったご遺体より採取した試料であるため、検出されたミスセンス変異がタンパク高次構造や酵素活性にもたらす影響を検討することができなかった。今後、臨床との共同研究を行うことで、CM 患者の遺伝子解析および CM 発症のメカニズムをより詳細に検討していく予定である。さらに症例数を増やしタイチン、Z 帯構成要素などについても検討を行い、関連性を解明していくことが必要であると考えられた。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北里大学医学部法医学教室栗原克由教授に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、直接御指導、御助言を頂き、御校閲を賜りました中村茂基講師に深謝いたします。また、本研究および論文作成に終止多大なる御指導、御配慮を頂きました入江渉助教および前田一輔助教ならびに教室員各位に心から感謝致します。

8. 引用文献

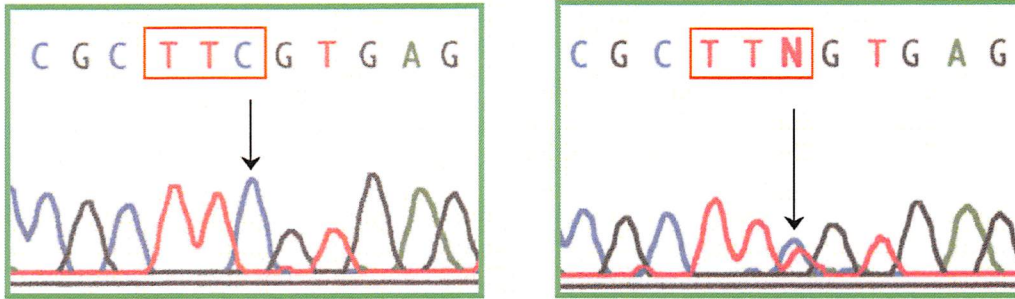
- [1] 田中宣幸, 柏村征一, 池田典昭, 中園一郎, 恒成茂行, 久保真一, 他: 学生のための法医学. 南山堂
- [2] 東京都監察医務院: 平成 24 年版、統計表および統計図表: 2012. <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/kansatsu/database/24toukeihyou-toukeizu.html>
- [3] Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-2.
- [4] 廣江道昭, 岡崎修: 拡張型心筋症. 循環器病学-基礎と臨床-. 西村書店, 東京, 2010. p221-35.
- [5] 廣江道昭, 渡邊絵里, 諸井雅男, 保科瑞穂: *Heart View* 2013; vol.17 No.3: 24-39.
- [6] Hamada T, Kubo T, Kitaoka H, et al. Clinical features of the dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy in comparison with those of dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 2010; 33: E24-8.
- [7] Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: From mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104: 557-67.
- [8] Ahmad F, Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6: 185-216.
- [9] Watkins H, McKenna W, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332:1058-64.
- [10] Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *JAMA* 2002; 287: 1058-64
- [11] Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, et al. Mutation in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 338: 1248-57.
- [12] Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107: 2227-32.
- [13] Richard P, Isnard R, Carrier L, et al. Double heterozygosity for mutations in the

- beta-myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding protein C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet* 1999; 36: 542-5.
- [14] Friedrich FW, Carrier L. Genetics of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 2467-76.
- [15] Harada K, Morimoto S. Inherited Cardiomyopathies as aTroponin Disease. *J Physiol* 2004; 54: 307-18.
- [16] Takahashi-Yanaga,F. Morimoto,S. et al. Functional Consequences of the Mutations in Human Cardiac Troponin I Gene Found in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 2095-107.
- [17] Kathryn E, Hugh W, Charles SR. Altered Regulatory Properties of Human Cardiac Troponin I Mutants That Cause Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2000; 275: 22069 -74.
- [18] 森本幸生. 特発性心筋症における筋収縮・調節蛋白質の機能異常：医学のあゆみ. 217: 825-829. 2006.
- [19] Morimoto S. et al.: Ca²⁺-desensitizing effect of a deletion mutation familial dilated cardiomyopathy.:*Proc Natl Acad Sci USA*.:99: 913-918.2002.
- [20] Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, et al. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res* 2004; 94: 1279-89.
- [21] Winegrad S. Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* 1999; 84: 1117-26.
- [22] Carrier L, Bonne G, Bahrend E, et al. 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* 1997; 80: 427-34.
- [23] Oakley CE, Chamoun J, Brown JL, et al. Myosin binding protein-C: enigmatic regulator of cardiac contraction. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2161-6.
- [24] Bahrudin U, Morisaki H, Morisaki T, et al. Ubiquitin-proteasome system impairment caused by a missense cardiac myosin-binding protein C mutation and associated with cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Biol* 2008; 384: 896-907.
- [25] Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, et al. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 322-30.
- [26] Charron P, Dubourg O, Desnos M, et al. Clinical features and prognostic

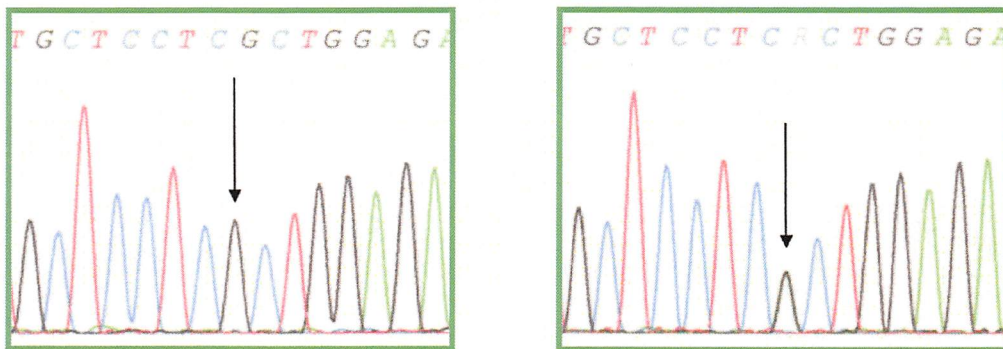
implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation* 1998; 97: 2230-6.

- [27] Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992; 326: 1108-14.
- [28] Anan R, Greve G, Thierfelder L, et al. Pronostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994; 93: 280-5.
- [29] Komamura K, Iwai N, Kokame K, et al. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 2004; 49: 129-33.
- [30] Konno T, Shimizu M, Ino H, et al. A novel missense mutation in the myosin binding protein-C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with left ventricular dysfunction and dilation in elderly patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 781-6.
- [31] Konno T, Shimizu M, Ino H, et al. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 125-31.
- [32] Fodor WL, Darras B, Seharaseyon J, et al. Human ventricular/slow twitch myosin alkali light chain gene: characterization, sequence, and chromosomal location. *J Biol Chem* 1989; 264: 2143-9.
- [33] Olga MH, Michelle J, Georgiana G, et al. Myosin essential light chain in health and disease. *Am J Heart Circ Physiol* 2007; 292: 1643-54.
- [34] Morano I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77: 544-55.
- [35] Lee W, Hwang TH, Kimura A, et al. Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2001; 141: 184-9.

MYH7 c.732C>T (p.Phe244=)



MYH7 c.4239G>A (p.Ser1413=)



MYH7 c.5793C>T (p.Gly1931=)

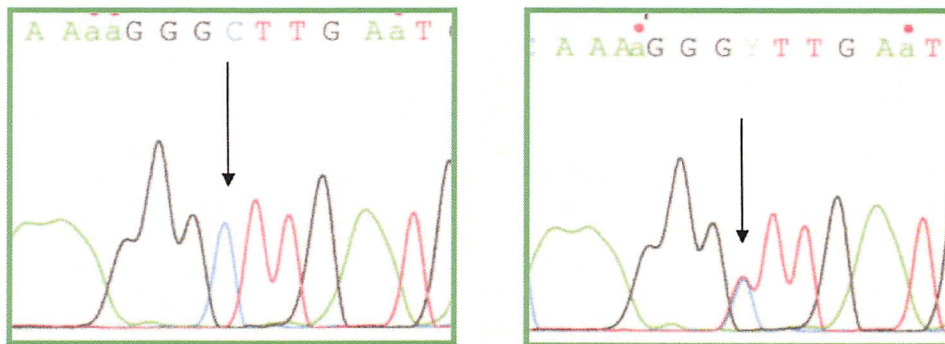
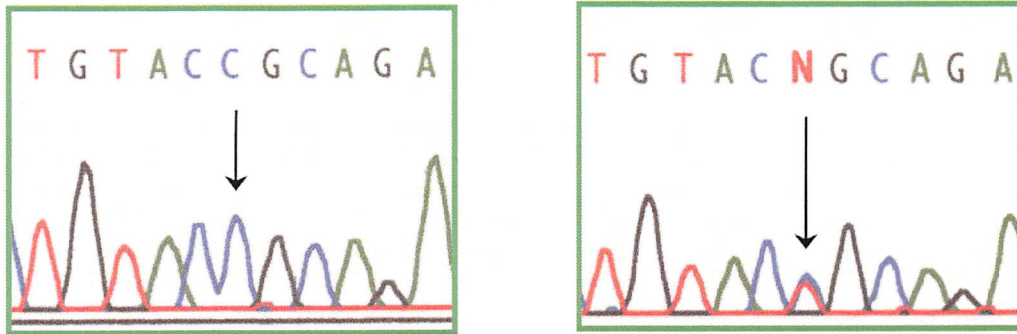
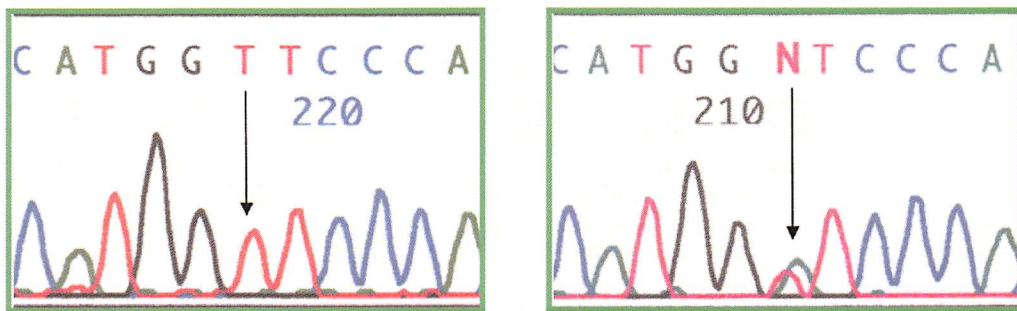


Fig 1. MYH7 に検出されたサイレント変異

MYH7 c.639+31C>T



MYH7 c.3853+27T>A



MYH7 c.3337-3 -2insC

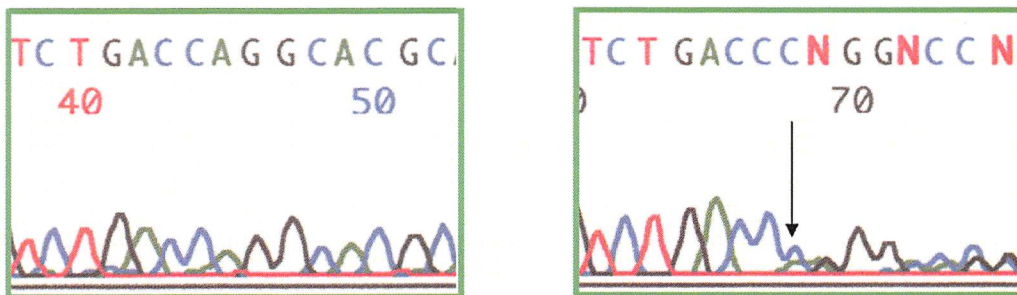
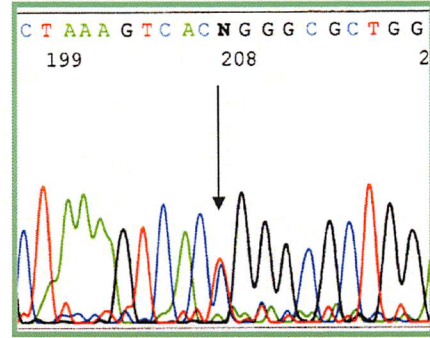
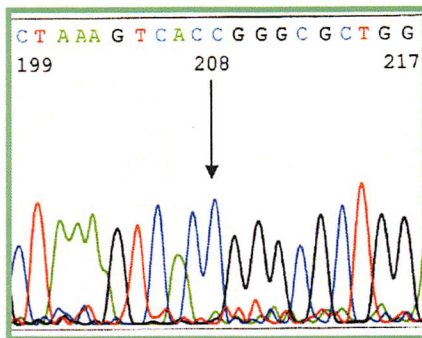
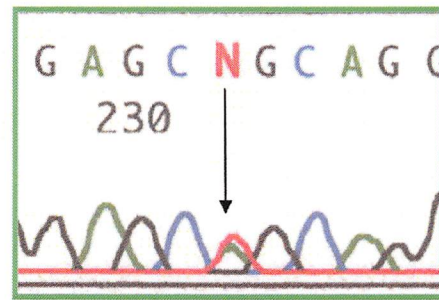
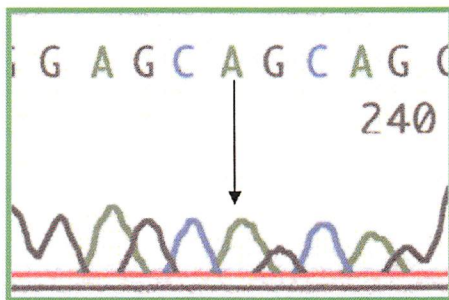


Fig 2. MYH7 に検出された一塩基置換および一塩基挿入

TNNT2 c.873C>T (p.Thr291=)



TNNT2 c.600+14A>T



TNNT2 c.5793C>T (p.Gly1931=)

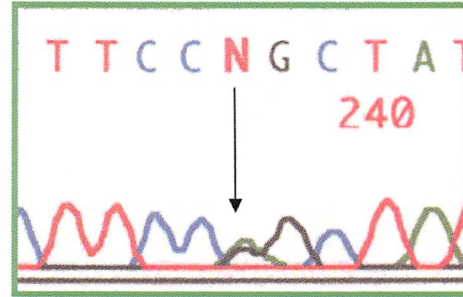
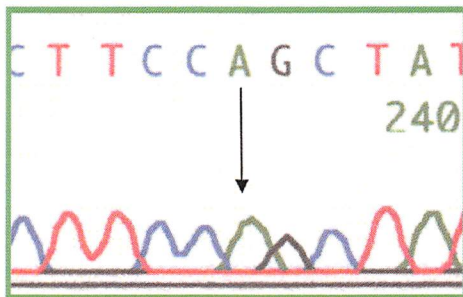
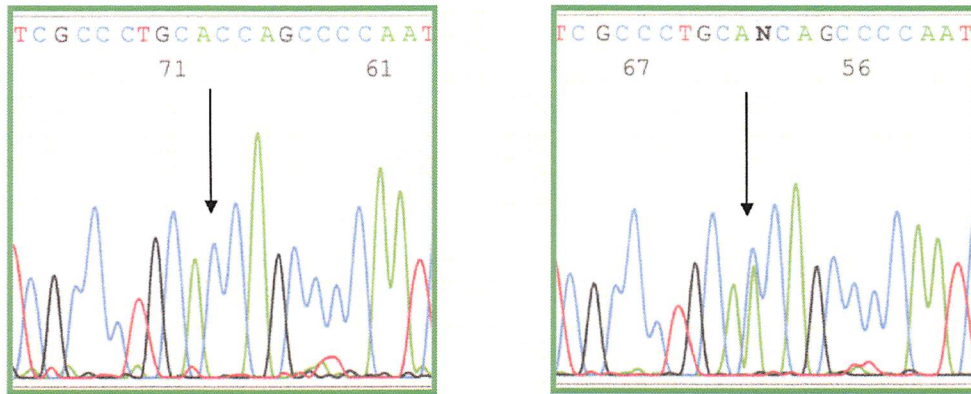
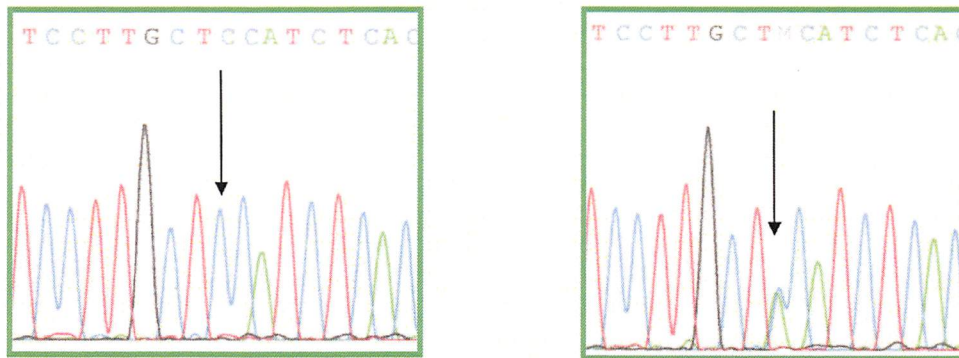


Fig 3. TNNT2 に検出されたサイレント変異および一塩基置換

TNNI3 c.46C>A (p.Pro16Thr)



TNNI3 c.109-17C>A



TNNC1 c.24+9C>T

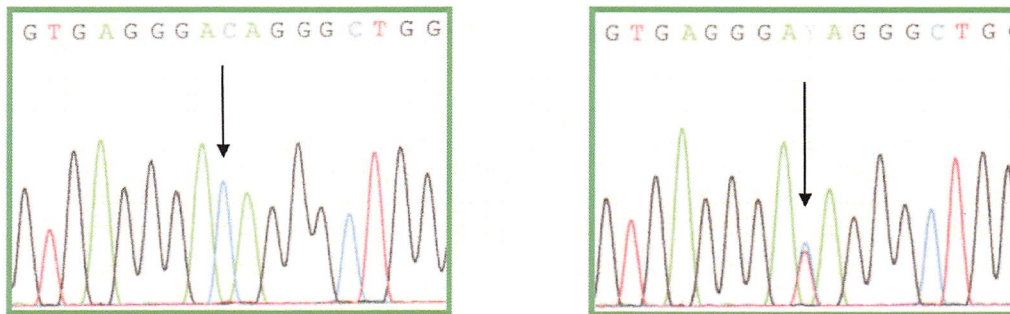
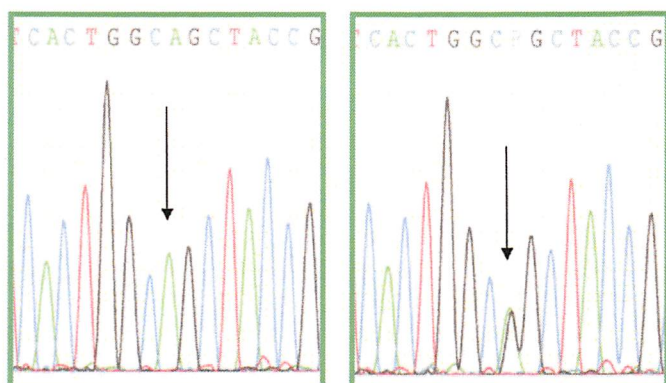
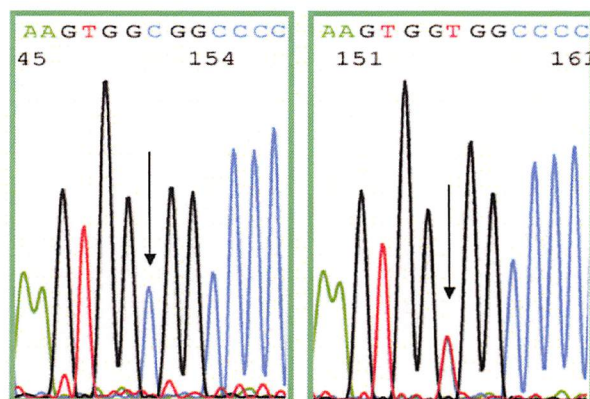


Fig 4. TNNI3 および TNNC1 に検出されたミスセンス変異および一塩基置換

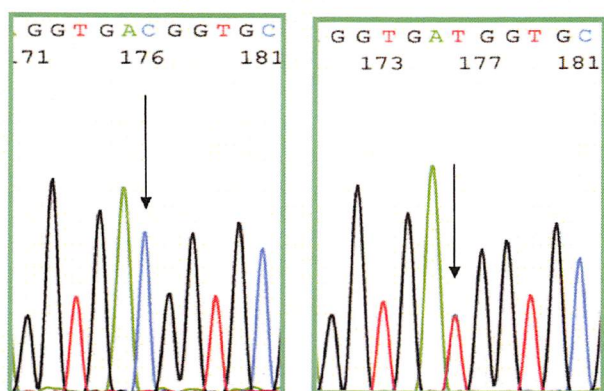
MYBPC3 c.706A>G (p.Ser236Gly)



MYBPC3 c.2671C>T (p.Arg891Trp)



MYBPC3 c.3137C>T (p.Thr1046Met)



MYBPC3 c.3218G>C (p.Arg1073Pro)

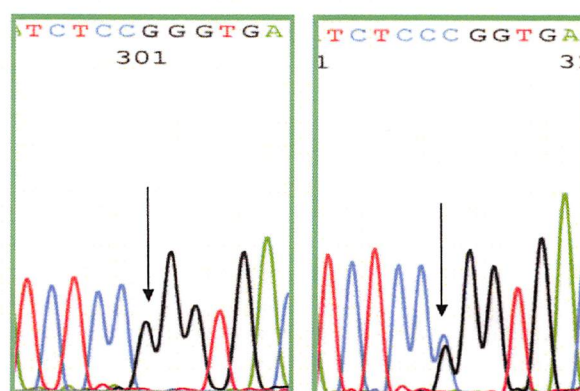
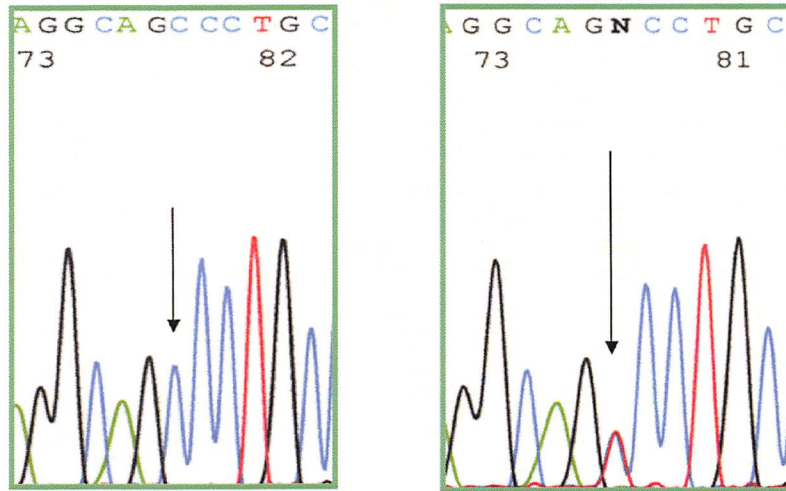


Fig 5. MYBPC3 に検出されたミスセンス変異

MYBPC3 c.75C>T (p.Ser25=)



MYBPC3 c.1777delT (p.Ser593fs:1)

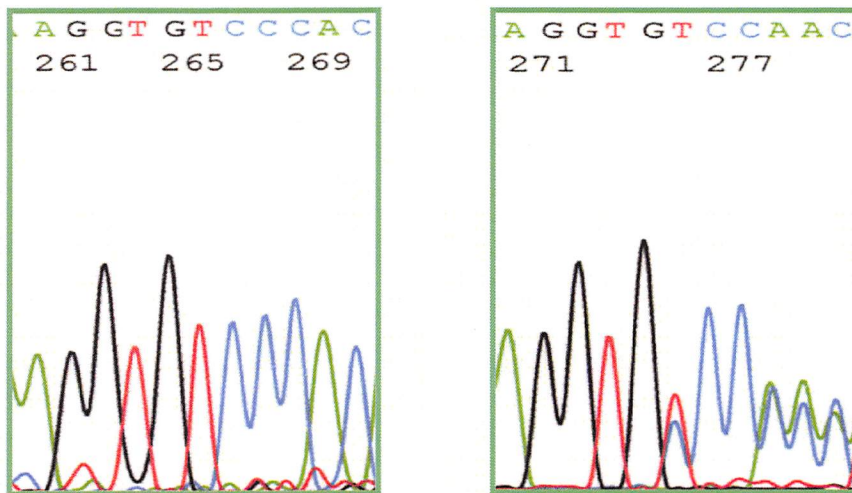
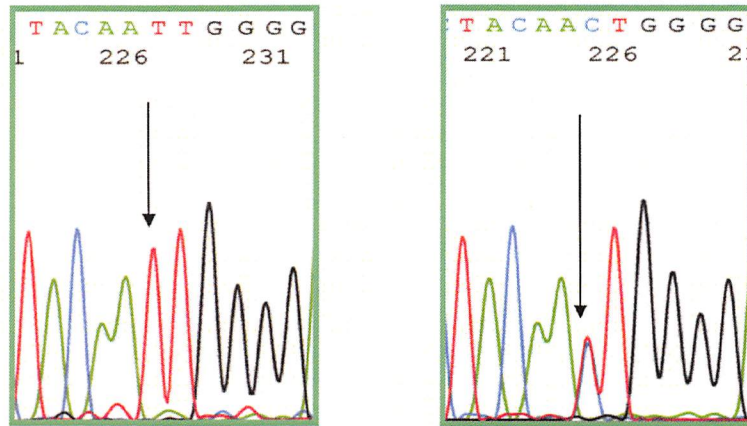


Fig 6. MYBPC3 に検出されたサイレント変異およびフレームシフト変異

MYBPC3 c.25+55T>C



MYBPC3 c.292+55C>T

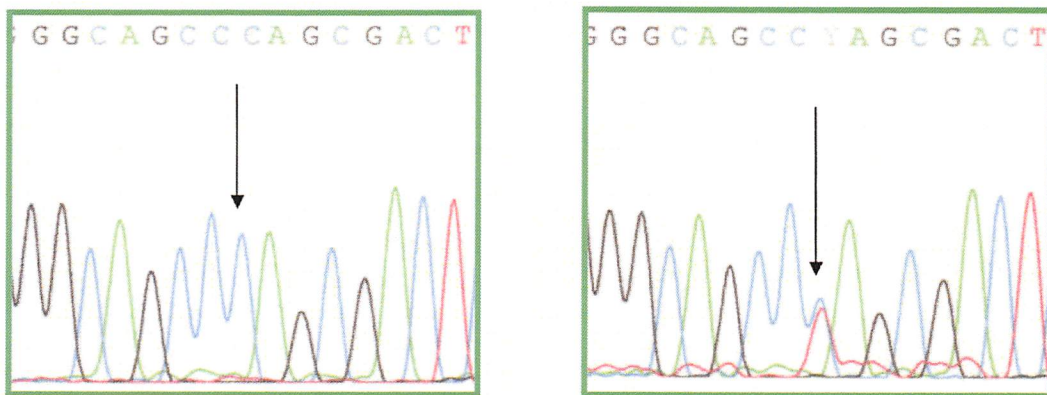


Fig 7. MYBPC3 に検出された一塩基置換

MYL3 c.170C>G (p.Ala57Gly)

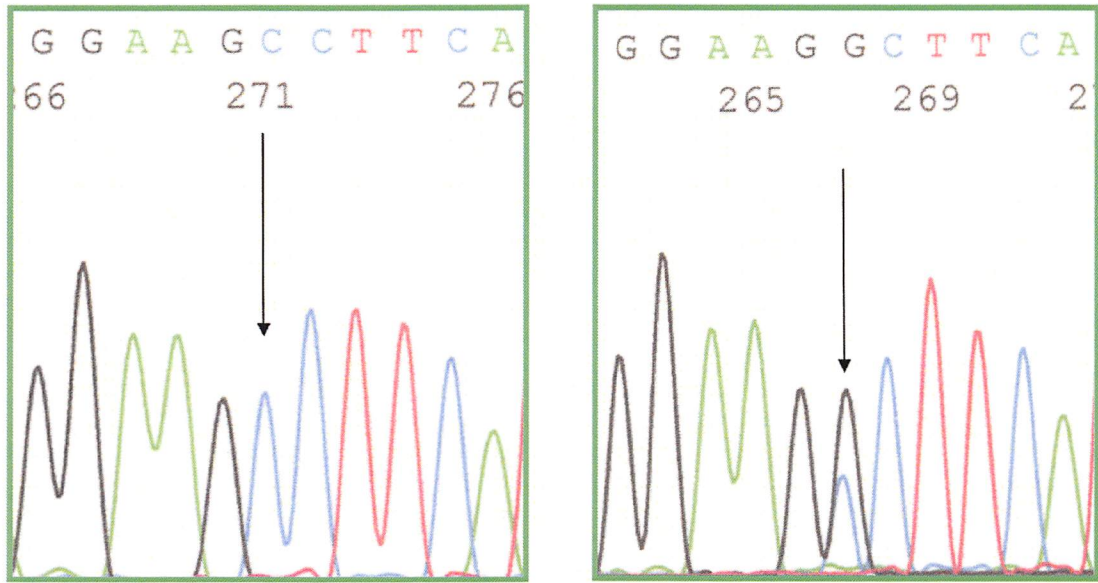


Fig 8. MYL3 に検出されたミスセンス変異

MYL2 c.456C>T (p.Tyr152=)

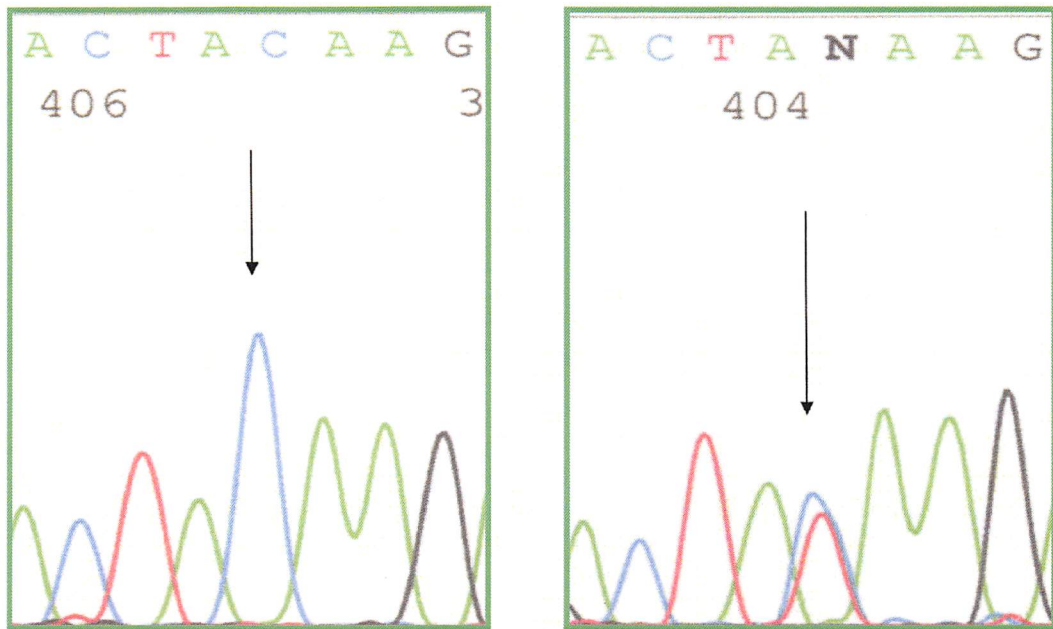


Fig 9. MYL2 に検出されたサイレント変異

TNNT2 c.68-5 -3delinsTT

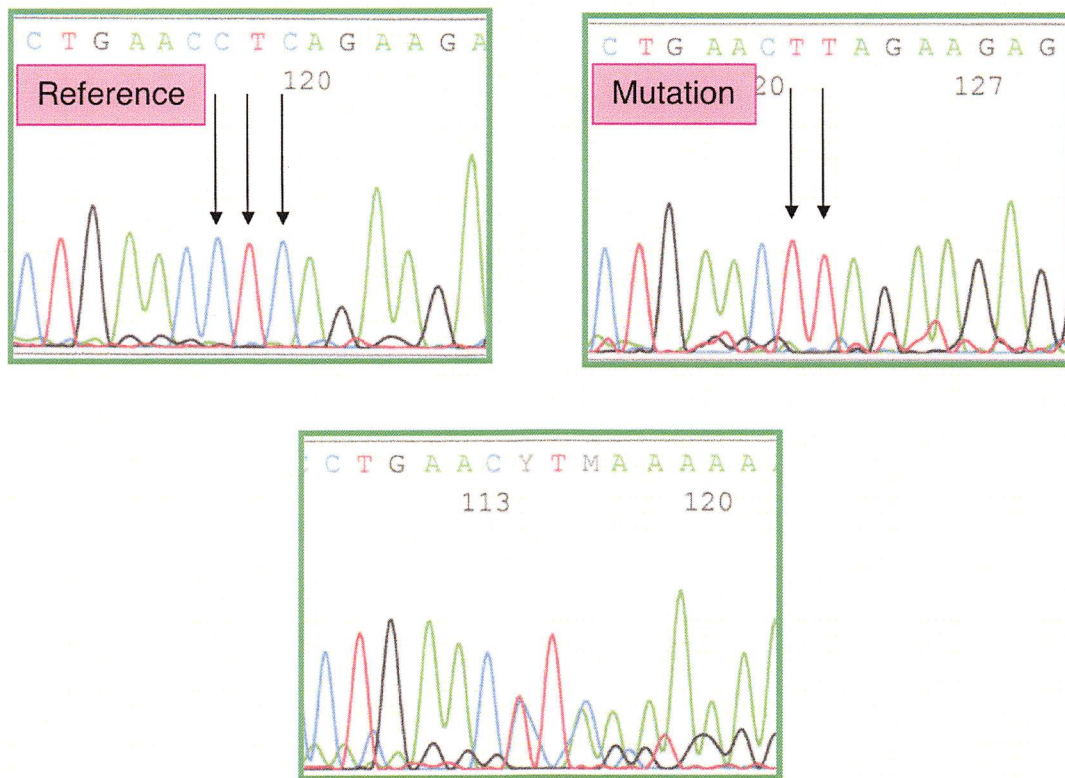


Fig 10. TNNT2 に検出された遺伝子多型

TNNT2 c.348C>T (p.Ile116=)

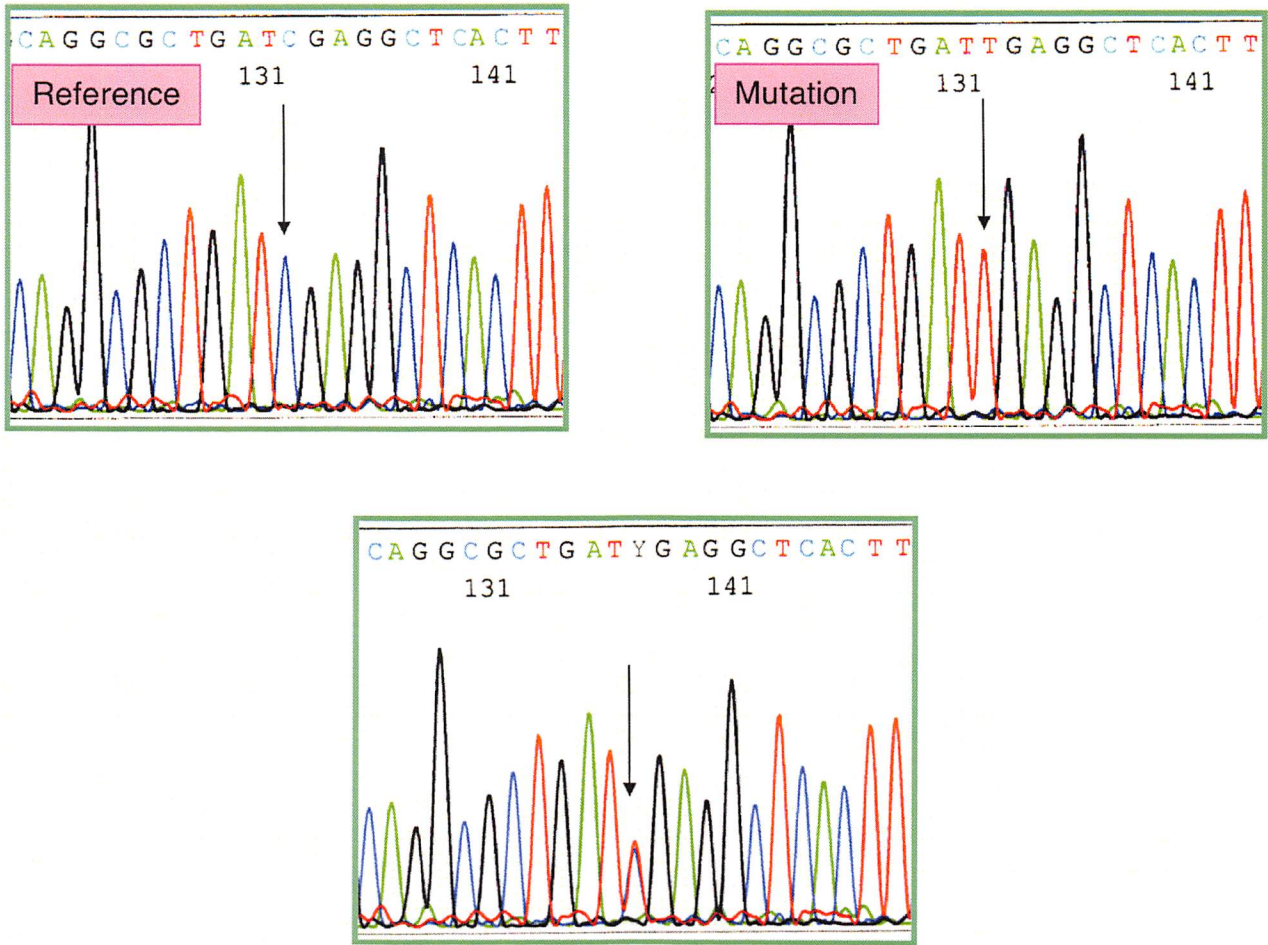


Fig 11. TNNT2 に検出された遺伝子多型

TNNI3 c.25-8T>A

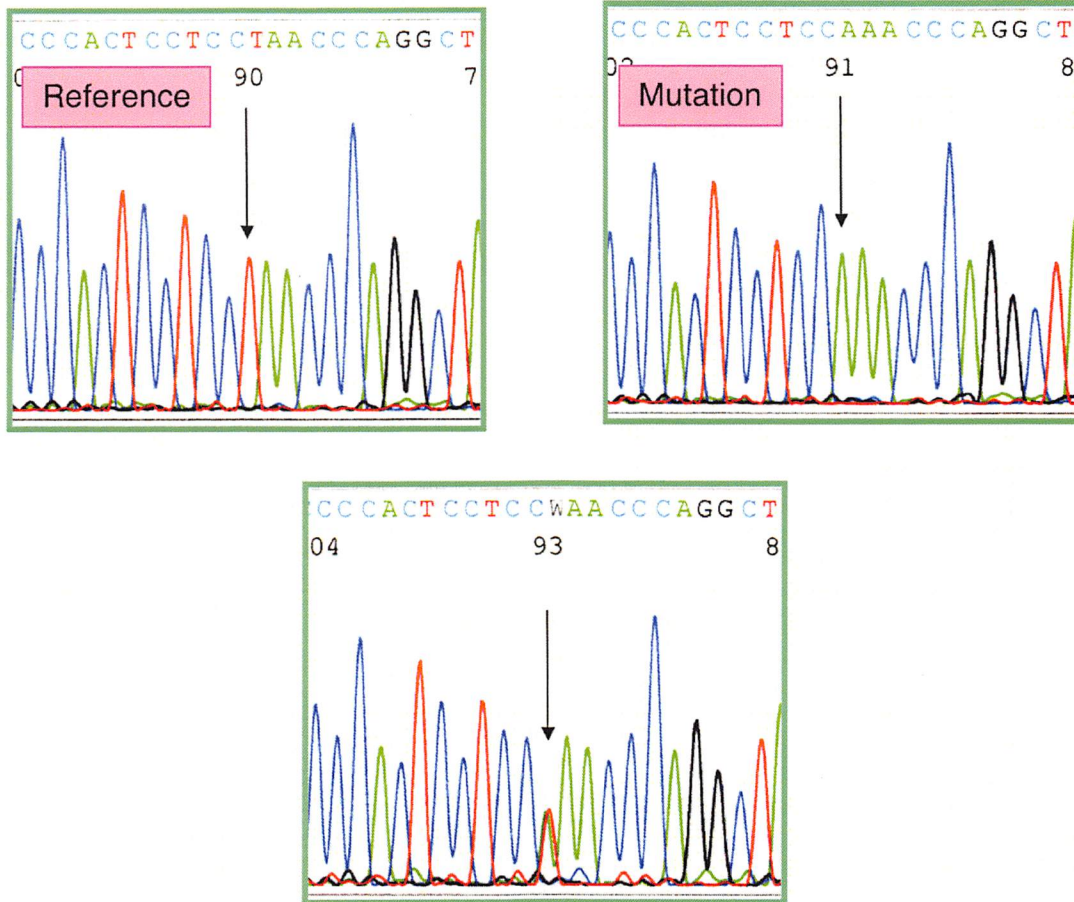


Fig 12. TNNI3 に検出された遺伝子多型

MYBPC3 c.1927+89C>G

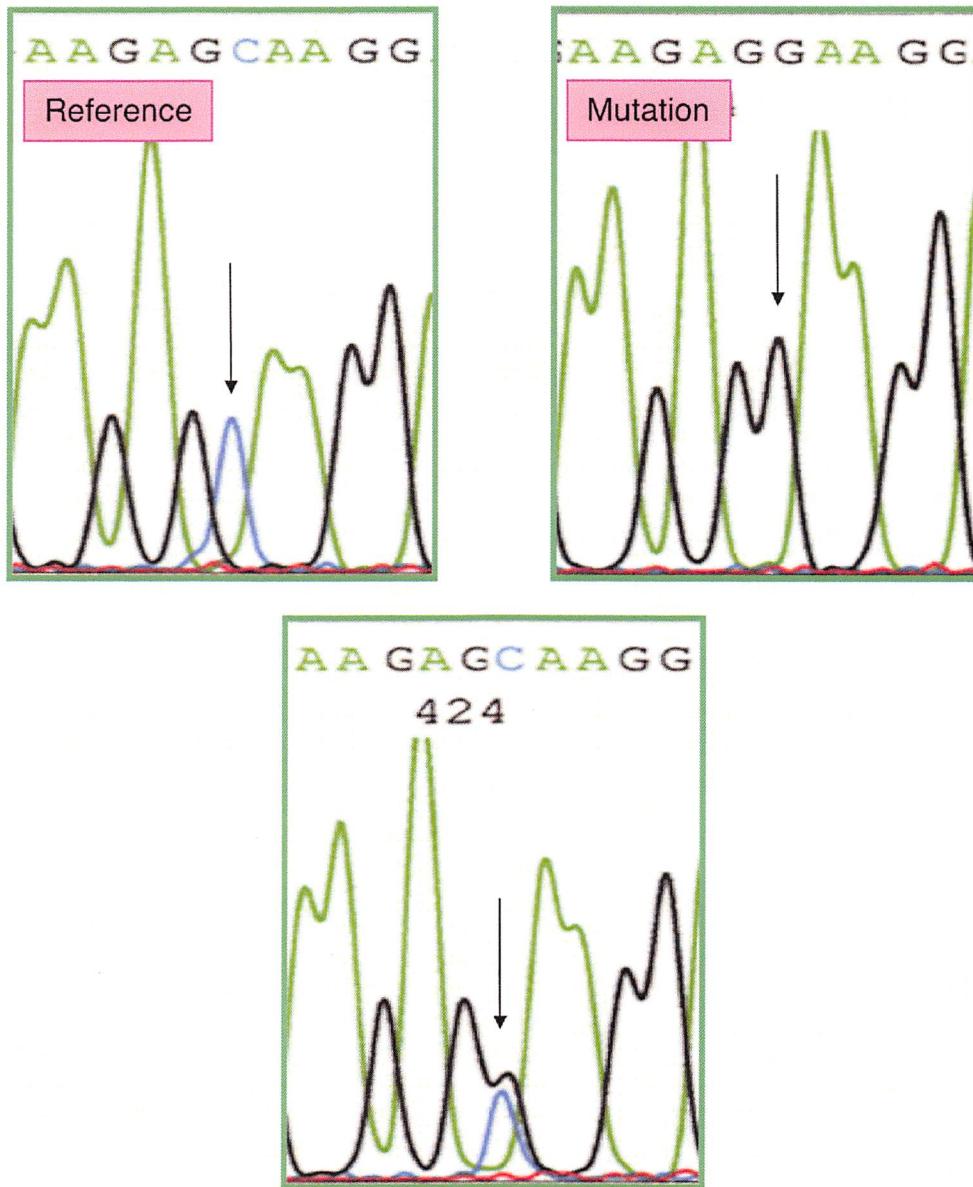
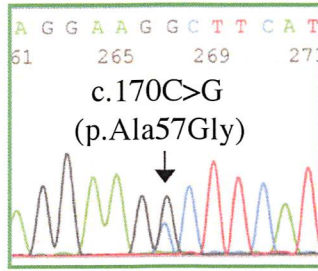


Fig 13. MYBPC3 に検出された遺伝子多型



Amino acid sequence

Homo sapiens	E	E	F	K	E	A	F	M	L	F	D
Rat	E	E	F	K	E	A	F	Q	L	F	D
Mouse	E	E	F	K	E	A	F	L	L	F	D
Pongo abelii	E	E	F	K	E	A	F	M	L	F	D
Bos taurus	E	E	F	K	E	A	F	T	L	F	D

Fig 14. MYL3 で検出されたミスセンス変異とアミノ酸配列

Table 1. 心筋症症例

No.	Sex	Age (yrs) at death	Confirmed family history	Age (yrs) at first presentation	Situation	Clinical history
D01	F	43	No	23	na	DCM, CD, renal failure
D02	M	61	No	56	Bathing	DCM
D03	F	43	No	40	na	DCM
D04	M	73	No	49	Sleeping	DCM
D05	F	31	No	25	Exercising	DCM
D06	M	76	No	55	na	DCM
D07	M	58	No	48	Shopping	DCM
D08	M	59	No	54	Sleeping	DCM
D09	M	32	No	na	Exercising	Arrhythmia
D10	M	54	No	50	Working	DCM
D11	M	57	No	47	Sleeping	DCM
D12	M	55	No	52	na	DCM, DM, renal failure
D13	F	88	No	na	na	DM
D14	M	53	No	51	na	DCM
D15	M	69	No	59	Sleeping	DCM
D16	F	68	No	59	Sleeping	DCM
D17	F	77	No	69	Sleeping	DCM
D18	M	68	No	66	na	DCM
D19	M	58	No	na	Sleeping	DCM
H01	M	53	No	na	Working	na
H02	F	36	No	na	na	na
H03	F	58	No	na	Exercising	HT, hyperlipemia
H04	M	49	No	na	Sleeping	HT
H05	M	44	No	na	Sleeping	HT
H06	M	64	No	49	na	na
H07	M	55	No	na	Drinking	na
H08	F	49	No	na	Working	Af
H09	F	45	No	na	na	HCM, brain infarction, DM
H10	M	26	Yes	25	na	HCM
H11	M	51	No	31	Sleeping	HCM
H12	M	63	No	56	na	HCM
H13	M	60	No	na	Exercising	HT
H14	M	73	No	63	Sleeping	HCM
H15	M	53	No	51	Sleeping	HCM
A01	M	33	No	30	Working	Arrhythmia
A02	M	44	No	na	na	DM, schizophrenia
A03	F	62	No	52	na	na

D, DCM; H, HCM; A, arrhythmogenic right ventricular CM; CD, collagen disease; DM, diabetes mellitus; Af, atrial fibrillation; HT, hypertension; na, not available

Table 2. MYH7 の Primer 塩基配列 (1)

Exon		Primer塩基配列(5'– 3')	Annealing Temperature(°C)
3	Forward	ACTCCTCTTGACTCTTGAGC	62
	Reverse	AAGGAGAATGGGACCATCCT	
4	Forward	TAACCCTCTTGAGGAAGGAG	62
	Reverse	TGGACATGGATGGAGCAAGA	
5&6	Forward	AACTCCAAAATCACCAGCC	62
	Reverse	TGGGATCAGGGAGATTCTGA	
7-9	Forward	ATTTGAGGCTTGCTGGTCTC	58
	Reverse	ACCAGATGGTCTAGAGCAAG	
10	Forward	GTCTGTCCAAGTCTCTC	62
	Reverse	ATCCAGCAGTGCCATGAAAC	
11	Forward	TGTCCTGTGCTGCTTCTCA	65
	Reverse	AACAACCAATGGCCAGAGTC	
12	Forward	ACAAGGGATCTCACTTACCC	56
	Reverse	AGATACTGCTGAGCAGACTG	
13	Forward	TTACAGGCATGAACCACCAC	62
	Reverse	CCCATATTGAGCAGGGTTGT	
14	Forward	TCACTCTTCCCAACAACCCTG	62
	Reverse	AGAAATAGCTGTTGAATGTGGG	
15	Forward	GCACAGCCCAATGGCCA	62
	Reverse	ATGTGTTCTTGTTGGTGTGCG	
16	Forward	GCAGAATCCATGTCACCTGTGTGA	62
	Reverse	AATTGACCTGGCTCAGAACCTTG	
17	Forward	GCTGTGATCTTACTCACACC	59
	Reverse	AATGGTCCCGAATGCACCAA	
18	Forward	TCCTGCATCTCTTTCTGGCA	62
	Reverse	AATGGTCCCGAATGCACCAA	
19&20	Forward	CAGAACCCAGAACTTCAGTC	62
	Reverse	GCATCAGAGGAGTCAATGGA	
21	Forward	GCTGTTACCCTTCCTAAGGT	62
	Reverse	CTGCAGGTCTCTGTGTTGA	
22	Forward	GGTTTCAGGACCTCAGGTAGGAA	62
	Reverse	CTTCTCTAGCGCCTCTTTGAGG	
23	Forward	CTCTACCTGCAAGAATGAGG	62
	Reverse	CAAGGTCAGTATGGTCTGAG	
24	Forward	TGGACCTTGATCATGGAGCT	62
	Reverse	CTCTGGGCACAGATAGACAT	
25	Forward	CCAAGTCCTGAGGTAAGTGA	62
	Reverse	TCTTGGGTCTGCTTGTACTG	

Table 3. MYH7 の Primer 塩基配列 (2)

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
26	Forward	ACTCCTCTTGACTCTTGAGC	62
	Reverse	AAGGAGAATGGGACCATCCT	
27	Forward	AGAAGCCGAGAGCCTTTTAG	62
	Reverse	CACTACATGGACAGAAAGGG	
28&29	Forward	TTGCACCTCTTACACCCCTT	62
	Reverse	GATGCAAGGCTAGTCAGTGT	
30	Forward	GCCAAGGGATGATGTTGAGA	62
	Reverse	ACTAGCTAAGCATCGCCTGT	
31	Forward	GTTTACCTCTTGTCCCCATC	60
	Reverse	ATGTCCAGGGTCTGTCTCAG	
32	Forward	CTGAGACAGACCCTGGACAT	60
	Reverse	TGGCACCATATGGGAACACT	
33	Forward	TCCAACCTCCACTGGACCTCA	64
	Reverse	GATGAGAACAGGGAGCCAAA	
34	Forward	TCCATGATTAGTGAGCAGGC	59
	Reverse	GGTGCCTGTATCAAGACACT	
35	Forward	ACAGGTGCCTTTAGTGAAGG	62
	Reverse	TCTCAAGCCTTGCTTGCTGA	
36	Forward	GGCTTGAGAGCTATGCATAG	62
	Reverse	AAGTCCTCACACACTTGCTG	
37	Forward	CAGCAAGTGTGTGAGGACTT	62
	Reverse	CTGGTTGTCACTGTGGCTAT	
38&39	Forward	ATGACTGTGCCATCTTCACC	62
	Reverse	TGTCTGGGTATGCCTGCTGT	
40	Forward	TCTCACCTTTGTTCCCATGC	62
	Reverse	CTAGGCCAGGCCTTTGAATT	

Table 4. TNNT2 の Primer 塩基配列

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
2	Forward	ACAGCTCATGAGGGGTGGA ACTA	65
	Reverse	GTGCTCTGCCTGGGATCTACAACC	
3&4	Forward	ATGAGAACGGCAGGCCAGGCTAGTG	65
	Reverse	GTTTGCCTCAAGACCCGAGCAACC	
5	Forward	GTAGTGGCTTGGGAATTGGAATG	65
	Reverse	GAACCAGGAAGAGGAGCCAGT	
6	Forward	GTGGCGGGAGGTAGCCGACAGT	65
	Reverse	TGGGCAATCAATGGTTGAATCTTA	
7	Forward	TTGACCCAGCGCTTCTCTTGTGTC	65
	Reverse	ACTGGGTGCCACCAATGCAACTTC	
8	Forward	CCAGTGCCGGGAGGGACTCAC	65
	Reverse	CAGCCCGTGTCCACTGCACCATAC	
9	Forward	GGATCAGGCCCTGCCTGTCCTGACA	65
	Reverse	TCCTCCTCCTCTTTCTTCCTGTTCT	
10	Forward	GCCAGGCCCTGCCAGAGGTCTT	70
	Reverse	CCCTGGGGGAGGCCTGAAACAG	
11	Forward	ACGTCCGTGGAGCTGGTTGAAAGT	62
	Reverse	CCCGGCCAATATTGTCTCTTGACT	
12	Forward	TGGGAGCTACCCTCTCAGAA	60
	Reverse	CACAGCAGCTGGGAATCTCT	
13	Forward	GTAAACCCGGCTGACTACAG	62
	Reverse	AGCCAGCCCAATCTCTTCAC	
14	Forward	CAGGGGGTTTGGGGAGGGTTAG	60
	Reverse	GTGGGGCACCTGCTCAGTTCTCT	
15	Forward	GGAGGGCCCTTTCTTACTGGAC	62
	Reverse	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG	
16	Forward	GCCCCTCCTGACCCTTA ACTATCC	60
	Reverse	CGGAGGAGCCAGAGAAGGAAACCT	
17	Forward	GGGGGTGAAATGTGGGGCGGAGAA	62
	Reverse	GTGTGGGGGCAGGCAGGAGTGGTG	

Table 5. TNNI3 の Primer 塩基配列

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
1	Forward	CGTTATCTGGCATAGTGGGC	58
	Reverse	TTGGGGCATCACTCACCCAT	
2	Forward	TCCCTTAGGAGACAGGACACAGC	58
	Reverse	TTACCGTACCGCACCCCTCTGCTA	
3	Forward	GGTCTTGGTGGTCATGGGGT	58
	Reverse	TGTA CTCTGCCCCAGGAAG	
4	Forward	TAGACTCAGGGCTCAAGTTG	58
	Reverse	AAAGCCCCACCCATTCTCAA	
5	Forward	CTGGTCTTTATCCTGAAGCC	58
	Reverse	ATTCCGGGACTAGAAACCTC	
6	Forward	CAACACACACCACGTTCCCTC	58
	Reverse	AGAGACCAAGTCCCAGCCAT	
7	Forward	GTAGGATGGAGGAGTTGGGTG	58
	Reverse	CCCCTCAGCATCCTCTTTCCT	
8	Forward	AGAAGAGACCCTAACCTCTG	58
	Reverse	GAAGCTTTATTCCTCAGGGC	

Table 6. TNNC1 の Primer 塩基配列

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
1	Forward	TGGTCCTTG TAGCCGTTTCGT	65
	Reverse	CTGGGTTGAAGGCACGTAGG	
2	Forward	TCACGTCAGGGCTTTGGG	67
	Reverse	CAACCTGCCACCTCCCT	
3	Forward	GGCTTGGTCCCTCTTGCTCT	63
	Reverse	AACCAAGGCTCGGATAGGCT	
4	Forward	AGCCTATCCGAGCCTTGGTT	63
	Reverse	GAGGCAGAGCAGGGACACT	
5	Forward	AGTGTCCCTGCTCTGCCTC	63
	Reverse	TGGGCATAGGCAGCTCTGG	
6	Forward	GGAGACAAGAACAACGACGG	63
	Reverse	GCAGAAGGCAGTGTGGAGC	

Table 7. MYBPC3 の Primer 塩基配列 (1)

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
2	Forward	GACCTCAGCTCTCTGGAATTCATC	67
	Reverse	GCTCAGAGGCCACGTCCCTCGTCAA	
3	Forward	GTGCACGCTCCAACCAG	63
	Reverse	CAGCAAAGGCAAGAAAGTGTG	
4	Forward	CTGGGACGGGGAGGAGAATGTG	65
	Reverse	GCTTTTGAGACCTGCCCTGGAC	
5&6	Forward	GGGCACCTGCGGTCCCAGCTAACT	70
	Reverse	TGCCTCCCAGATTCCCCACACC	
7	Forward	CTGGAGCTCCTGGTCTTATGTGAT	62
	Reverse	GGAGCCGTGACACCAAGATGATAA	
8&9	Forward	GCTTCTCAAACGGCCCCCTCTG	62
	Reverse	GGAGGGAGAAAGGGACACTA	
10	Forward	AATCTGGCTAGTGTCCCTTTCTCC	62
	Reverse	AGCCCTTTAACTCCTTCCCACTG	
11&12	Forward	TCGGCCCAACTGACTTA	58
	Reverse	CCCAGGCCAGGCAGGACT	
13	Forward	TCCCCAGAAAATCTTCA	60
	Reverse	GCCGGACTCCGCTCTTT	
14&15	Forward	GGCGGCACAGAGGGGATTG	65
	Reverse	CAGTGCGCCCCGTGATAATC	
16&17	Forward	AACACTTCAACGGCCCCTTCTG	65
	Reverse	GTCAGCTCCACCCCGTCCTTCA	
18	Forward	GGGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAAT	68
	Reverse	GTCAAAGGCCCAAGGTCACAGAGG	
19	Forward	ACAGGCACACGTGTTTTTAC	58
	Reverse	CAGTCTCCACCTGTCCCATC	
20&21	Forward	AGAATACCAACAAGCCAGGACAAG	65
	Reverse	GCCCCAGGACCCCACTTTTGAT	

Table 8. MYBPC3 の Primer 塩基配列 (2)

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
22	Forward	TCCTCCTGGCTCTCCCGTTTCTC	67
	Reverse	GCGCCCCTCTGCTGCTTCTTC	
23	Forward	GCTCCTCTGCTCCCTACTTCC	60
	Reverse	ATGGCCATCAGCACACTTCAC	
24	Forward	TCGGTGCCACAGAGATGATTTTGA	67
	Reverse	GGCTGCCCTCTGTGTTCTCCT	
25	Forward	CCTGTGGCGGTTAGTTGG	60
	Reverse	CACCGGTAGCTCTTCTTCTTCTTG	
26	Forward	CCGAGGGAAGGTGGTGTGG	65
	Reverse	TCTGTAAAATGCGGCTGAGTATCC	
27	Forward	GGAAGTGCCCCCTATGT	70
	Reverse	TCGCACTGCTCAAAGAAG	
28	Forward	TCAGAFFAFTGGGCAGTGGGAGTG	70
	Reverse	CTGGGGTGTCAATGGCGGGTCTT	
29	Forward	GCCTGGAGTTGCTGTGTTAG	58
	Reverse	GGCTGCCCTCTTTGGTC	
30	Forward	GCGGCCGGCCCTTGAGT	68
	Reverse	TGGA AAAATGTGAGCTGTGGGTTGG	
31	Forward	GCATTCAGGCACTTACCAGGTGACG	68
	Reverse	CACGGTGAGGACAGTGAAGGGTAGC	
32	Forward	GGCCGCAGCTACCCTTCAC	63
	Reverse	GGCCCCTCTCCCTGTTCC	
33	Forward	GGCCTCTCGGTACCAAGTCCTGTC	67
	Reverse	CAACGT CGGGCCTGTGAGC	
34	Forward	GCAGGGCCATGGTACTCACTCTTG	65
	Reverse	CCGCCGCTCTTCCCATCTC	
35	Forward	CACAGTGACATGGCCTCCTCTTCT	63
	Reverse	GCCCCTACAGCCTCCCATTACT	

Table 9. MYL2 の Primer 塩基配列

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
1	Forward	GTGCCCCGCCTCACCTATGACT	70
	Reverse	GGGGCATTGATTGGGGTTCCT	
2	Forward	CACCCAGAGTAGGGGCCTGACCTA	70
	Reverse	TTCAGGCCGAATTTGGGATTGTTT	
3	Forward	GGCCTGACGTTTTGAAGAACTGT	64
	Reverse	TCCCATCCCCTGAATTTGTCTTA	
4	Forward	GGAGCCAATGGCAGTGTCATAATG	70
	Reverse	CGCCCAGCCAAGTTGCTGTTT	
5&6	Forward	AGCCTTGCTGGCCCCTTCATC	70
	Reverse	TGTGGGGTTCAGGGGTGCTTTAGAC	
7(1)	Forward	AGATGGCCGTGCCTTTATAC	58
	Reverse	TAACAGACAAGGTAGGGACAGAGG	
7(2)	Forward	CCTGACGTGATGGCAACTT	59
	Reverse	GAAACAGTTCTGAGTGGCTG	

Table 10. MYL3 の Primer 塩基配列

Exon		Primer塩基配列(5' - 3')	Annealing Temperature(°C)
1	Forward	TTTATGGCCCTGTCCCTATTGTGC	62
	Reverse	CTCCTGCTGCAGCCCTTCTGATG	
2	Forward	TGCTGGAATGGGACAGGCTGAGAC	64
	Reverse	ACATCCCCACACTGCCCGTAGGT	
3	Forward	GGGCTGGGGTTCCCTGGTCTG	62
	Reverse	CCCTCATCGGGACAATGCGAGAT	
4	Forward	AAAGTGCCTCGCGATGGTAGTTTG	62
	Reverse	GTCTGCCATTGAGGCTCCCTAATT	
5	Forward	CCTGGCCTCAGAAATGGGGTGATG	64
	Reverse	ACCTGGGCACGAGGTTTAGCTGGAC	
6	Forward	GAGGCTGACAGAAGACGAAGTGA	64
	Reverse	AGACGGAGGCAGCAGGATGTCAAG	
7	Forward	CTTGACATCCTGCTGCCTCC	62
	Reverse	AAAGAGAGGGAGGAAGGGAAAT	

Table 11. 心筋症症例のみに検出された変異

Case	MYH7	TNNT2	TNNI3	TNNC1	MYBPC3	MYL2	MYL3
D01	c.639+31C>T				c.2671C>T (p.Arg891Trp)		
D02	c.732C>T (p.Phe244=) c.3337-3_-2insC				c.1777delT (p.Ser593fs:1)		
D03			c.109-17C>A				
D04			c.46C>A (p.Pro16Thr)				
D05	c.3853+27T>A						
D08	c.4239G>A (p.Ser1413=)	c.600+14A>T					
D10	c.732C>T (p.Phe244=) c.3337-3_-2insC c.3853+27T>A						
D11					c.3137C>T (p.Thr1046Met)		
D14	c.5793C>T (p.Gly1931=)						
D15	c.3337-3_-2insC c.3853+27T>A				c.706A>G (p.Ser236Gly)		
D16				c.24+9C>T			
H04						c.456C>T (p.Tyr152=)	
H06					c.75C>T (p.Ser25=) c.25+55T>C		
H07					c.3137C>T (p.Thr1046Met)		
H08		c.842+61A>G c.873C>T (p.Thr291=)					
H10							c.170C>G (p.Ala57Gly)
H11					c.1777delT (p.Ser593fs:1)		
H12					c.3218G>C (p.Arg1073Pro)		
H13					c.1777delT (p.Ser593fs:1)		
H14	c.732C>T (p.Phe244=) c.3853+27T>A						
A03					c.292+55C>T		

Table 12. 今回検出された遺伝子多型

Gene	Observed variants	Effect on protein	Gene	Observed variants	Effect on protein
<i>MYH7</i>			<i>MYBPC3</i>		
	1. c.-8-25G>T			1. c.292+41G>C	
	2. c.189C>T	p.Thr63=		2. c.506-12delC	
	3. c.895+17G>A			3. c.1091-24C>T	
	4. c.2163-56A>G			4. c.1927+89C>G	
	5. c.2967T>C	p.Ile989=		5. c.2737+12C>T	
	6. c.3973-30A>G			6. c.3628-90G>A	
	7. c.5655+21C>T			7. c.3288G>A	p.Glu1096=
	8. c.*113G>A		<hr/>		
<i>TNNT2</i>			<i>MYL2</i>		
	1. c.42-58G>A			1. c.132T>C	p.Ile44=
	2. c.53-11_53-7delCTTCT			2. c.274+20_274+21insGT	
	3. c.68-71C>T			3. c.274+53G>A	
	4. c.68-70G>A/T			4. c.275-58G>A	
	5. c.68-5_-3delinsTT			5. c.353+20delG	
	6. c.97+48A>G			6. c.353+46_353+47insC	
	7. c.163+120T>C			7. c.169+198delT	
	8. c.164-50G>A			8. c.169+671T>G	
	9. c.348C>T	p.Ile116=		9. c.170-384T>C	
	10. c.489+57G>C			10. c.274+391T>G	
	11. c.601-404A>C			11. c.275-311A>C	
	12. c.758A>G	p.Lys260Arg	<hr/>		
	13. c.801+41C>G		<i>MYL3</i>		
	14. c.802-122C>G			1. c.69C>T	p.Pro23=
	15. c.802-33C>T			2. c.129+44G>T	
<hr/>				3. c.307+37A>C	
<i>TNNI3</i>				4. c.482-100C>T	
	1. c.25-8T>A			5. c.*89G>A	
<hr/>			<hr/>		
<i>TNNC1</i>					
	1. c.-171G>A				
<hr/>			<hr/>		

Table 13. 各心筋症における4遺伝子多型のグループ別頻度

	Groups											
	A*	B*	D	E	G	I	J	K*	M	N	O	P
All CM	3 (21.4)	1 (50.0)	1 (25.0)	17 (14.7)	0 (0)	0 (0)	1 (3.7)	11 (19.6)	0 (0)	0 (0)	2 (13.3)	0 (0)
DCM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (6.9)	0 (0)	0 (0)	1 (3.7)	8 (14.3)	0 (0)	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)
HCM	3 (21.4)	1 (50.0)	1 (25.0)	7 (8.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (5.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ARVC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)
Control	8 (57.2)	0 (0)	2 (50.0)	82 (70.7)	3 (100)	8 (100)	25 (92.6)	34 (60.7)	4 (100)	8 (100)	11 (73.3)	6 (100)

Parenthesis indicates %.

①, c.68-5_-3delinsTT; ②, c.25-8 T>A; ③, c.348 C>T; ④, c.1927+89 C>G

A: ①, ②, ③, ④. B: ①, ②, ③. C: ①, ②, ④. D: ①, ③, ④. E: ②, ③, ④. F: ①, ②. G: ①, ③. H: ①, ④. I: ②, ③. J: ②, ④. K: ③, ④. L: ①

M: ②. N: ③. O: ④. P: no mutation. C, F, H, L; no observed groups were omitted.

*P = 0.008; OR = 0.17, 95% CI = 0.04-0.75. A(HCM) vs. other groups.

*P = 0.0003; B(HCM) vs. other groups.

*P = 0.007; OR = 0.30, 95% CI = 0.11-0.80. K(DCM) vs. other groups.