

# 学位論文要旨

氏名 村上 千香子

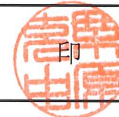


論文題目

「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」

指導教授承認印

栗原 克由



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

氏名 村上 千香子

【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T遺伝子(TNNC1)、心筋βミオシン結合蛋白C遺伝子(MYBPC3)、心室型ミオシン調節鎖遺伝子(MYL2)、心室型ミオシン必須鎖遺伝子(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】

すでに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。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AmpliTaq 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】

今回、CM症例37例および対照200例についてMYH7、TNNT2、TNNI3、TNNC1、MYBPC3、MYL2、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では検出されたアミノ酸変異はサイレント変異であり、c. 732C>T (p. Phe244=)、c. 4239G>A (p. Ser1413=)、c. 5793C>T

(p. Gly1931=) はすべて 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ン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) および c. 2992C>G (p. Gln998Glu) 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 HCM および DCM 症例で検出され、HCM 症例で 36 歳、DCM 症例で 43 歳といずれも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 (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 domain 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 (Ala57Gly) に基づく EF-hand domain 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 ヶ所の一塩基多型 (SNP) が検出された。ARVC を除く CM 症例と対照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. 68-5delC および c. 348C>T (p. Ile116=)、TNNI3 の c. 25-8T>A、MYBPC3 の c. 1927+89C>G の 4SNPs に有意差が認められた。有意差が認められた 4SNPs 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 4SNPs 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. 68-5delC、c. 25-8T>A、c. 348C>T (p. Ile116=)、c. 1927+89C>G) と B (c. 68-5delC、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 3SNPs (c. 68-5delC、c. 25-8T>A、c. 348C>T)、DCM で 2SNPs (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 4SNPs 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。