

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08102

研究課題名(和文) 遺伝性不整脈とエピジェネティクスの関連性についての検討

研究課題名(英文) Investigation of relationship between inherited arrhythmias and epigenetics

研究代表者

服部 哲久(Hattori, Tetsuhisa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：80638932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性不整脈は先天性QT延長症候群(LQTS)やBrugada症候群(BrS)等、家族性に発症する不整脈である。LQTSでは約70%の患者に遺伝子変異が同定される。一方、BrSでの遺伝子変異同定率は低く、その理由としてタンパクコード領域の変異以外の理由が考えられた。そこで我々はエピジェネティクスに着目し、研究を進めた。当初の計画では原因遺伝子変異が同定されていない家系において、Chip-Seqを実施し、ヒストンメチル化の異常を同定する予定だった。ただ2019年にロングリードシーケンサーを導入したため、まずはゲノムDNAの構造異常を同定し、タンパク発現に関与する領域のスクリーニングを実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーの時代になり、多くの遺伝性疾患について、その原因となる多くの遺伝子および遺伝子変異が同定されるようになってきた。しかし、同定されない遺伝性疾患も残されている。その理由として、いわゆるタンパク翻訳領域以外の異常が隠れていることが考えられている。そこで私たちはロングリードシーケンサーを用いて、タンパク翻訳領域以外の異常について解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Inherited arrhythmia is a disease including congenital long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BrS) and so on. In LQTS, pathogenic mutations are detected about 70% of the patients. In contrast, the detection rate of pathogenic mutations in BrS is very low. The one of the reasons is that the disease is not caused by mutations in protein coding regions. Therefore, we started the research focused on the epigenetics. We first planned to perform Chip-seq, however, we introduced a long sequencer, Oxford Nanopore system in 2019 and started to detect genomic structural variant which affect the protein expression. To detect the structural variant, we used the data from targeted gene sequencing obtained by short read sequencer. Comparing the total reads and depth between samples from controls and patients, we could suspect large deletions and duplications in several patients. Then we performed long read sequencing using Nanopore system to detect correct breakpoint.

研究分野：循環器病学

キーワード：エピジェネティクス ロングリードシーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性不整脈は、遺伝子変異を中心に研究されてきたが、原因となる遺伝子変異を特定できない症例も多く存在する。その理由として、これらの症例では遺伝子の翻訳タンパク領域の変異は存在しないものの、遺伝子発現（エピジェネティクス）の異常が疾患と関連している可能性がある。近年、エピジェネティクスの分野における研究が急激に進行しているが、不整脈分野においては報告が極めて少なく、明らかにされていないことが多い。

遺伝性不整脈の主な原因遺伝子であるイオンチャネルタンパクをコードする遺伝子の多くは、転写開始点上流に CpG アイランドが存在しており、CpG アイランドのメチル化により発現がコントロールされている。これらの領域のメチル化に異常を生じている場合、疾患を発症している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク翻訳領域（exon）以外の領域における遺伝子上の異常がエピジェネティクスに疾患発症に影響を及ぼしていると考え、遺伝性不整脈疾患とエピジェネティクスの関連を探索し、新たな遺伝性不整脈の新たな発症機序解明を試みることを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究開始当初、Chip-Seq によってメチル化の異常を検出し、遺伝性不整脈発症との関連を解明する予定だった。ただ、エクソン領域以外の変異についてのスクリーニングが完了している症例はなく、まずは全ゲノム領域のシークエンスから開始する必要があると判断した。全ゲノムシークエンス対象症例を抽出しているタイミングで、所属する研究室にロングリードシークエンサー（LRS）である Oxford Nanopore システムが導入されることになった。LRS では、一塩基レベルでの変異検出は不正確だが、エピジェネティクスと関連する構造多型も同時に同定することが可能であり、まず LRS でのスクリーニングを実施することにした。LRS の候補として、これまでに実施したショートリードシークエンサー（SRS）のターゲットシークエンスで構造多型が疑われる症例を抽出した。

### 4. 研究成果

LRS で解析を始めるにあたり、心房中隔欠損（ASD）と心房頻拍を合併している 5 か月男児を最初の解析対象者とした。この症例はターゲットシークエンスのペア解析で、MYH6 から MYH7 領域にかけての欠損が疑われた（図 1）。

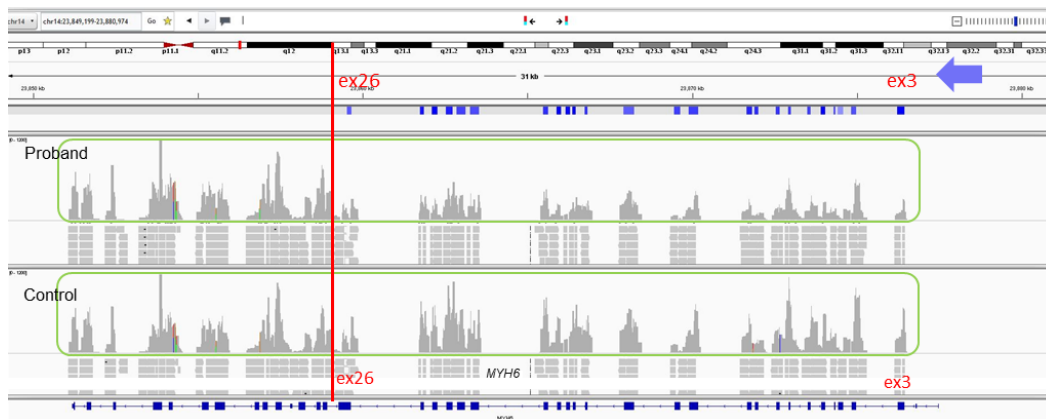


図 1 Agilent 社 SureCall で同定された MYH6 の exon3 から exon26 にかけての欠損

そこで発端者と ASD のある母親について Long PCR を実施したところ、control には同定されない 1500bp 程度の異常なバンドが検出された（図 2）

Control    Proband    Mother    Ladder

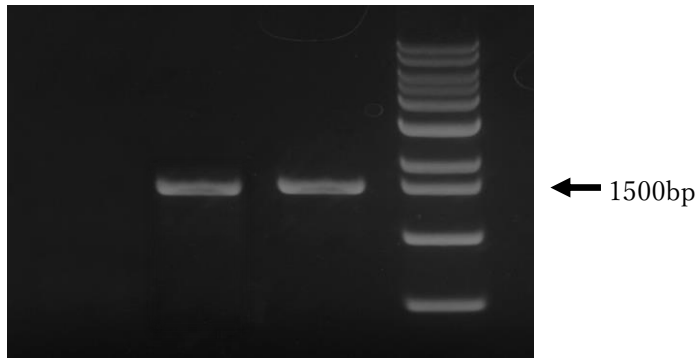


図2 欠損領域を挟むプライマーで検出された PCR 産物、発端者と母親にのみ約 1500bp のバンドが確認できる

ここで得られた PCR 産物についてダイレクトシーケンスを実施し、Break point を決定しようと試みた。しかし *MYH6* と近接する *MYH7* の配列は近似しており、Sanger 法での欠損領域の Break point 同定は非常に困難であった。そこで LRS での解析を実施した。その結果、図3に示すように、*MYH6* の exon26 から *MYH7* の exon27 にわたる欠損を明瞭に確認することが可能であった。

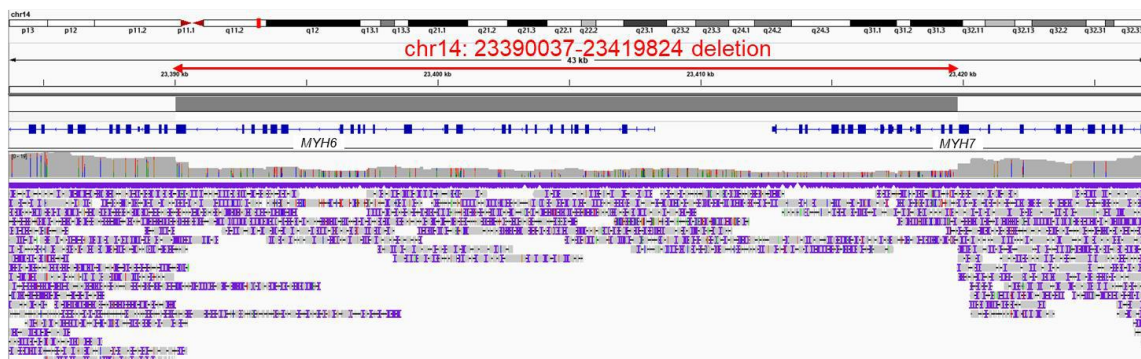


図3 LRS で同定された欠損範囲、Break Point が明瞭に描出されている

*MYH6* の exon26 と *MYH7* の exon27 は相同性が高く、正確な欠損範囲同定は困難であったが、現在の遺伝子変異記載法 (3' rule) に基づくと、図4に示すような *MYH6* intron 25 から *MYH7* intron 26 にわたる約 30,000 塩基の欠損であった。なお *MYH6* および *MYH7* はいずれも Lagging 鎖上の遺伝子である。

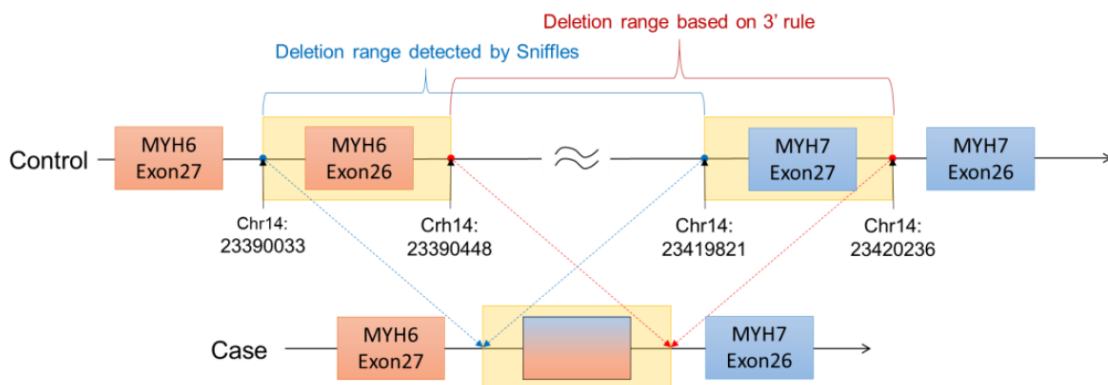


図4 LRS で同定された欠損の模式図

ここで同定された欠損では、*MYH7* の Promoter 領域は保持されているが、*MYH6* の Promoter 領域は欠損していることが考えられる。また欠損領域は相同性の高い exon であるため、*MYH7* exon26 から *MYH6* exon 26 につながる Fusion protein が *MYH7* の Promoter によって発現している可能性がある。本研究結果は、現在論文として投稿中である。今後、他の ASD 症例などのスク

リーニングを実施し、*MYH6-MYH7* 領域の欠損と ASD 発症のメカニズムを解明していく予定である。

さらに他の LRS 候補症例を抽出し、解析を進めている。

失神歴のある先天性 QT 延長症候群 (LQTS) 症例に Na-Ca 交換体をコードする *SLC8A1* の exon1 から exon9 までの重複が SRS のターゲットシーケンスで同定された。ただ exon1 よりも上流の情報は得られておらず、全ゲノム解析を LRS で実施し、重複範囲を決定し、Promoter 領域の関与を解明する。

またこれまで遺伝子変異が同定されていなかった精神発達遅滞を伴う LQTS 症例に、LQT2 の原因遺伝子である *KCNH2*、および肥大型心筋症を合併した WPW 症候群の原因遺伝子である *PRKAG2* の欠損が SRS で疑われた。この領域の欠損は 7q36 deletion として、これまでも報告がある。ただし MLPA 法や Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法による同定が報告されているのみであり、LRS での Validation をおこなった報告はない。そこで今後、LRS による欠損範囲の同定と、欠損領域に含まれるエピジェネティックな作用を持つ領域の解析等を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sonoda Keiko, Ohno Seiko, Ozawa Junichi, Hayano Mamoru, Hattori Tetsuhisa, Kobori Atsushi, Yahata Mitsuhiko, Aburadani Isao, Watanabe Seiichi, Matsumoto Yuichi, Makiyama Takeru, Horie Minoru	4. 巻 15
2. 論文標題 Copy number variations of SCN5A in Brugada syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 1179 ~ 1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2018.03.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hattori T, Sonoda K, Horie M, Ohno S
2. 発表標題 Lower Frequency of Classical Triad in Andersen-Tawil Syndrome Probands with De Novo KCNJ2 Mutations than Those with Familial Mutations
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Sonoda, Tetsuhisa Hattori, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 De novo RYR2 mutations are associated with severe phenotype of CPVT more strongly than inherited ones
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuhisa Hattori, Keiko Sonoda, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 Lower Frequency of Classical Triad in Andersen-Tawil Syndrome Probands with De Novo KCNJ2 Mutations than Those with Familial Mutations
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuhisa Hattori, Keiko Sonoda, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 High Frequency of De Novo KCNJ2 Mutations in Andersen-Tawil Syndrome Patients
3. 学会等名 APHRS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Sonoda, Seiko Ohno, Tetsuhisa Hattori, Minoru Horie
2. 発表標題 Functional Change of an SCN5A Mutation Identified in the Patient with Short-Coupled Variant of Torsades de Pointes
3. 学会等名 APHRS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大野 聖子 (Ohno Seiko)  (20610025)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長  (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------