

次世代シーケンサーを活用した特発性遺伝性不整脈症候群患者における コピー数多型の同定

研究分担者 大野聖子

所 属 国立循環器病研究センター 分子生物学部
(前 滋賀医科大学アジア疫学研究センター)

研究要旨

【目的】 遺伝性特発性不整脈症候群（Inherited Primary Arrhythmia Syndrome, IPAS）の原因として、多くの原因遺伝子・変異が同定されている。本研究では、従来法では検出困難なコピー数多型を次世代シーケンサー（Next generation sequencer, NGS）を用いて IPAS 患者に同定する。

【対象と方法】 487 人の IPAS 患者において、NGS データと CNV 検出用ソフトを用いて解析する。NGS の解析で CNV が疑われた場合には、long PCR、定量 PCR 等の方法で CNV を確定した。

【結果】 487 人中、232 人に従来法で遺伝子変異が同定された。遺伝子変異が同定されなかった 255 人のうち、63 人に対して NGS での CNV 解析を実施した。その結果、4 人に CNV を同定した。

【結論】 IPAS の原因として、CNV は重要であり、NGS データでも検出が可能である。

A. 研究目的

遺伝性特発性不整脈症候群（Inherited Primary Arrhythmia Syndrome, IPAS）は、若年者突然死の原因として重要な疾患である。その代表疾患である先天性 QT 延長症候群（LQTS）での遺伝子変異同定率は 70% 近くになるが、他の疾患での遺伝子変異同定率は低い。その原因の一つが、コピー数多型（Copy Number variation, CNV）である。CNV は従来の polymerase chain reaction (PCR) 法では検出が困難であり、特殊な解析法を必要としていた。ところが近年、次世代シーケンサー（Next Generation Sequencer, NGS）解析ソフトの進歩により、NGS で得られたデータで CNV を検出することが可能になった。本研究では NGS データを用いて、CNV を検出することを目的とする。

B. 研究方法

対象は IPAS と診断された 487 人。このうち、従来法で遺伝子変異が検出されず、家族歴や病

態から遺伝子変異が強く疑われる患者 63 人について CNV について検討した。CNV の同定には Agilent 社の SureCall software の pair analysis を用いた。Pair analysis で CNV が疑われる場合には、定量 PCR (qPCR) 法、long PCR 法、Comparative Genomic hybridization 法 (CGH) を用いて、CNV の範囲を確定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、滋賀医科大学の倫理委員会承認の上、患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

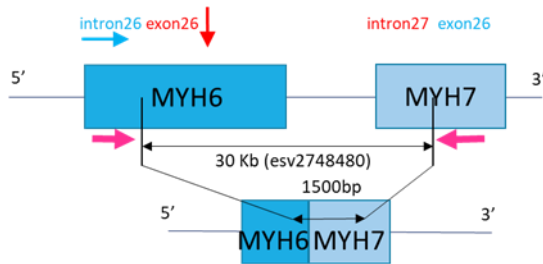
CNV の解析を行った 63 人中 4 人に 3 種類の CNV を同定した。

二人に同定した CNV はカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, CPVT）の主要な原因遺伝子である RYR2 の exon3 が欠失する CNV であり、筆者らは以前、別の方法で同定し、報告している（参考文献 1）。臨床像も CPVT に一致

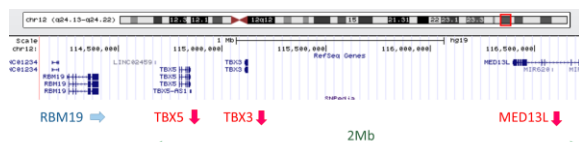
していた。

2番目の CNV はミオシン重鎖をコードする MYH6 の exon26 と MYH7 の intron26 にまたがる約 30Kb の欠失であった。qPCR で欠失範囲を予測したあと、long PCR で欠失を確認した。

(下図)



この欠失が同定された患者は、心房中隔欠損症と上室性期外収縮頻発を合併していた 0 歳男児であり、この欠失による疾患と考えられた。3 番目の CNV は、転写因子である TBX5 遺伝子の全欠損であった。qPCR で欠損範囲を確認したところ、その欠失範囲は 3' 側の TBX3 を超える広い範囲の欠失であった。(下図)



そのため、CGH 法を用いて、現在欠損範囲を確認している。この CNV が同定された患者は LQTS と診断されているが、横隔膜ヘルニアと肺低形成を合併しており、臓器分化に関わる重要な遺伝子の欠損が原因と考えられた。

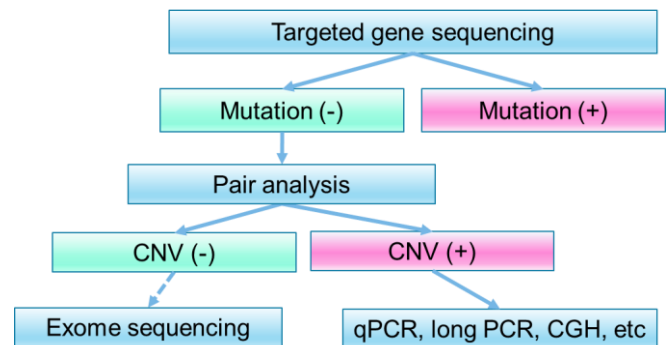
D. 考察

CNV は exon を超えた遺伝子の欠失や重複を指す。広範囲の CNV を同定するには FISH 法等も用いられたが、狭い領域での CNV 同定には適していない。Exon から遺伝子レベルでの CNV 同定には Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法が有効であるが、Target となる遺伝子・領域が決まっていることが多く、それ以外の遺伝子については検出が困難である。Comparative Genomic Hybridization (CGH)

法はゲノムレベルの SNP を調べることによって CNV を同定することができる。ただ CGH の検査費用は高価であり、日本では保険診療での検査が認められていないことから、その適応は限定的である。

一方、今回我々が採用した NGS データを用いた解析では、一般的な NGS を用いた遺伝子解析後のデータを活用することができる。そのため、安価に CNV を同定することができる。ただ、現時点での陽性的中率は非常に低く、解析ソフトの改善が望まれる。CNV を同定する最適な方法は、PCR を行わずに長鎖 DNA を読む 1 分子シーケンサーであるが、現在はまだ非常に高価であり、現実的ではない。

このような結果より、遺伝性疾患が疑われる場合に次世代シーケンサーを用いて解析を行う場合には、次図のような方針が考えられる。一般的な解析の後、変異が同定されなかった場合には、CNV 同定の解析を行い、CNV が疑われる場合には、qPCR 等で CNV の範囲を決定することができる。一方、CNV が疑われないような場合には、exome sequencing など、さらに広範囲の解析が必要になるかもしれない。



E. 結論

今回我々は、NGS で得られたデータを用いて、CNV を同定した。CNV による遺伝性疾患は決して少なくはなく、その可能性を念頭において解析を行う必要がある。

(参考文献)

1. Ohno S, et al.: Europace, 16:1646-1654,2014

F. 研究発表

1. 論文発表

[英文]

1. Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Ito S, Egashira T, Seki T, Hattori T, Ohno S, Kodaira M, Suzuki T, Hashimoto H, Okata S, Tanaka A, Aizawa Y, Murata M, Aiba T, Makita N, Furukawa T, Shimizu W, Kodama I, Ogawa S, Kokubun N, Horigome H, Horie M, Kamiya K, Fukuda K. Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes. **Biochem Biophys Rep.** 2017;9:245–256.
2. Ishikawa T, Ohno S, Murakami T, Yoshida K, Mishima H, Fukuoka T, Kimoto H, Sakamoto R, Ohkusa T, Aiba T, Nogami A, Sumitomo N, Shimizu W, Yoshiura KI, Horigome H, Horie M, Makita N. Sick sinus syndrome with HCN4 mutations shows early onset and frequent association with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. **Heart Rhythm.** 2017;14:717-724.
3. Fujii Y, Matsumoto Y, Hayashi K, Ding WG, Tomita Y, Fukumoto D, Wada Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa J, Makiyama T, Ohno S, Yamagishi M, Matsuura H, Horie M, Itoh H. Contribution of a KCNH2 variant in genotyped long QT syndrome: Romano-Ward syndrome under double mutations and acquired long QT syndrome under heterozygote. **J Cardiol.** 2017;70:74-79.
4. Yamamoto Y, Makiyama T, Harita T, Sasaki K, Wuriyanghai Y, Hayano M, Nishiuchi S, Kohjitan H, Hirose S, Chen J, Yokoi F, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T. Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT Syndrome with a CALM2 Mutation. **Hum Mol Genet.** 2017;26:1670-1677.
5. Ishibashi K, Aiba T, Kamiya C, Miyazaki A, Sakaguchi H, Wada M, Nakajima I, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Yamauchi T, Itoh H, Ohno S, Motomura H, Ogawa Y, Goto H, Minami T, Yagihara N, Watanabe H, Hasegawa K, Terasawa A, Mikami H, Ogino K, Nakano Y, Imashiro S, Fukushima Y, Tsuzuki Y, Asakura K, Yoshimatsu J, Shiraiishi I, Kamakura S, Miyamoto Y, Yasuda S, Akasaka T, Horie M, Shimizu W, Kusano K. Arrhythmia risk and β -blocker therapy in pregnant women with long QT syndrome. **Heart.** 2017;103:1374-1379.
6. Yamagata K, Horie M, Aiba T, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Yamagishi M, Makita N, Sakurada H, Tanaka T, Shimizu A, Hagiwara N, Kishi R, Nakano Y, Takagi M, Makiyama T, Ohno S, Fukuda K, Watanabe H, Morita H, Hayashi K, Kusano K, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Miyamoto Y, Kapplinger JD, Ackerman MJ, Shimizu W. Genotype-phenotype correlation of SCN5A mutation for the clinical and electrocardiographic characteristics of probands with Brugada syndrome: A Japanese multicenter registry. **Circulation.** 2017;135:2255-2270.
7. Aoki H, Nakamura T, Horie M, Ohno S, Makiyama T, Takemura T. Cardiac conduction defects and brugada syndrome: A Family with overlap syndrome carrying a nonsense SCN5A mutation. **J Arrhythm.** 2017;33:35-39.
8. Kimura Y, Noda T, Matsuyama T, Otsuka Y, Kamakura T, Wada M, Ishibashi K, Inoue Y, Miyamoto K, Okamura H, Nagase S, Aiba T, Kamakura S, Noguchi T, Anzai T, Satomi K, Wada Y, Ohno S, Horie M, Shimizu W, Yasuda S, Shimokawa H, Kusano K. Heart failure in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: what are the risk factors? **Int J Cardiol.** 2017;241:288-294.
9. Hayano M, Makiyama T, Kamakura T, Watanabe H, Sasaki K, Funakoshi S, Wuriyanghai Y, Nishiuchi S, Harita T, Yamamoto Y, Kohjitan H, Hirose S, Yokoi F, Chen J, Baba O, Horie T, Chonabayashi K, Ohno S, Toyoda F, Yoshida Y, Ono K, Horie M, Kimura T. The development of a patient-derived induced pluripotent stem cell model for the investigation of SCN5A-D1275N-Related cardiac sodium channelopathy. **Circ J.** 2017;81:1783-1791.
10. Shirai Y, Goya M, Ohno S, Horie M, Doi S, Isobe M, Hirao K. Elimination of ventricular arrhythmia in

- catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by targeting “catecholamine-sensitive area”: a dominant-subordinate relationship between origin sites of bidirectional ventricular premature contractions. **Pacing Clin Electrophysiol.** 2017;40:600-604.
11. Sonoda K, Ohno S, Otsuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T, Horie M. Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. **Europace.** 2017;19:644-650.
 12. Nishiuchi S, Makiyama T, Aiba T, Nakajima K, Hirose S, Kohjitani H, Yamamoto Y, Harita T, Hayano M, Wuriyanghai Y, Chen J, Sasaki K, Yagihara N, Ishikawa T, Onoue K, Murakoshi N, Watanabe I, Ohkubo K, Watanabe H, Ohno S, Doi T, Shizuta S, Minamino T, Saito Y, Oginosawa Y, Nogami A, Aonuma K, Kusano K, Makita N, Shimizu W, Horie M, Kimura T. Gene-based risk stratification for cardiac disorders in LMNA mutation carriers. **Circ Cardiovasc Genet.** 2017;10:e001603.
 13. Wada Y, Ohno S, Aiba T, Horie M. Unique genetic background and outcome of non-Caucasian Japanese probands with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. **Mol Genet Genomic Med.** 2017;5:639-651.
 14. Kojima A, Shikata F, Okamura T, Higaki T, Ohno S, Horie M, Uchita S, Kawanishi Y, Namiguchi K, Yasugi T, Izutani H. Refractory ventricular fibrillations after surgical repair of atrial septal defects in a patient with CACNA1C gene mutation. **J Cardiothorac Surg.** 2017;12:118.
 15. Fujii Y, Itoh H, Ohno S, Murayama T, Kurebayashi N, Aoki H, Blancard M, Nakagawa Y, Yamamoto S, Matsui Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa T, Ohkubo K, Watanabe I, Guicheney P, Horie M. A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced Ca²⁺ release and short-coupled torsade de pointe ventricular arrhythmia. **Heart Rhythm.** 2017;14:98-107.
 16. Nakagawa Y, Nishikimi T, Sakai H, Ohno S, Kinoshita H, Inazumi H, Moriuchi K, Kuwahara K, Horie M, Kimura T. Macro-pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and hidden macro-N-terminal proBNP: Case report. **Clin Biochem.** 2018;52:148-152.
 17. Saito A, Ohno S, Nuruki N, Nomura Y, Horie M, Yoshinaga M. Three cases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with prolonged QT intervals including two cases of compound mutations. **J Arrhythmia.** (in press)
 18. Ozawa J, Ohno S, Saito H, Saitoh A, Matsuura H, Horie M. A novel CACNA1C mutation identified in a patient with Timothy syndrome without syndactyly exerts both marked loss-and-gain of function effects. **Heart Rhythm Case Reports.** (in press)
 19. Wu J, Mizusawa Y, Ohno S, Ding W-G, Higaki T, Wang Q, Makiyama T, Itoh H, Toyoda F, James AF, Hancox JC, Matsuura H, Horie M. Who is the pathogenic culprit? A LQTS family with three compound genetic mutations. **Scientific Reports.** (in press)
 20. Ueshima S, Hira D, Kimura Y, Fujii R, Tomitsuka C, Yamane T, Tabuchi Y, Ozawa T, Itoh H, Ohno S, Horie M, Terada T, Katsura T. Population pharmacokinetics and pharmacogenomics of apixaban in Japanese adult patients with atrial fibrillation. **Br J Clin Pharmacol.** (in press)
 21. Fukumoto D, Ding W-G, Wada Y, Fujii Y, Ichikawa M, Takayama K, Fukuyama M, Kato K, Itoh H, Makiyama T, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Horie M, Ohno S. Novel intracellular transport-refractory mutations in KCNH2 identified in patients with symptomatic long QT syndrome. **J Cardiol.** 2018;71:401-408.
 22. Yagi N, Itoh H, Hisamatsu T, Tomita Y, Kimura H, Fujii Y, Makiyama T, Horie M, Ohno S. A Challenge for Mutation Specific Risk Stratification in Long QT Syndrome Type 1. **J Cardiol.** (in press)
 23. Sonoda K, Ohno S, Ozawa J, Hayano M, Hattori T, Kobori A, Yahata M, Aburadani I, Watanabe S, Matsumoto Y, Makiyama T, Horie M. Copy Number Variations of SCN5A in Brugada Syndrome. **Heart Rhythm.** (in press)
 24. Miyata K, Ohno S, Itoh H, Horie M. Bradycardia is a

Specific Phenotype of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Induced by RYR2 Mutations. **Intern Med.** (in press)

[和文]

1. 大野聖子. 不整脈症候群の遺伝子解析による診断と治療への活用、**Medical Practice** Vol.34, No.6, 989-993, 2017
2. 大野聖子. QT延長症候群 — QT時間だけでは決められない、**循環器ジャーナル 心電図診断スキルアップ** Vol65, No.2, 327-335, 2017

2. 学会発表

[国際学会]

1. Wada Y, Ohno S, Wuriyanghai Y, Makiyama T, Horie M. Exercise Inducible Polymorphic Ventricular Tachycardia Depending on the Different RYR2 Mutation Spectrum. APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
2. Fukumoto D, Ohno S, Wada Y, Fujii Y, Ichikawa M, Takayama K, Fukuyama M, Itoh H, Ding WG, Matsuura H, Horie M. Novel N-Terminal KCNH2 Mutations Identified in Symptomatic Long QT Syndrome Patients. APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
3. Aiba T, Ohno S, Ono M, Shigemizu D, Toyoda F, Miake J, Hagiwara A, Shinohara T, Okumura S, Toda T, Satake W, Tsunoda T, Shimamoto K, Sekine A, Takahashi A, Miyamoto Y, Tanaka T, Kusano K, Horie M, Shimizu W. KCNJ3 N496H A Rare Variant in Japanese as a Cause of Susceptible Gene for Ventricular Fibrillation in Overlap Syndromes between LQT and CPVT. APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
4. Takayama K, Ohno S, Horie M. Severe Phenotype of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Caused by Double RYR2 Mutations. APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
5. Fukuyama M, Ohno S, Takayama K, Ichikawa M, Fukumoto D, Horie M. Novel RYR2 Mutations Causative for Long QT Syndromes. APHRS2017.

(2017.9.14-17. Yokohama)

6. Ichikawa M, Ohno S, Fukumoto D, Takayama K, Wada Y, Fukuyama M, Makiyama T, Itoh H, Horie M. Next-Generation Sequencing Is One of the Promising Ways for Identifying Copy Number Variations in Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
7. Ohno S. RYR2 Mutations in LQTS APHRS2017. (2017.9.14-17. Yokohama)
8. Ohno S. Genetics in ARVC/D (2017.9.14-17. Yokohama)
9. Ohno S. Pharmacological Therapy in Patients with ARVC (2017.9.14-17. Yokohama)
10. Ohno S, Ozawa J, Fukuyama M, Horie M. High frequency of CACNA1C mutation carriers in genotyped LQTS patients (2017. 8. 26-30. Spain)
11. Aoki H, Ohno S, Fukuyama M, Yoshinaga M, Horie M. SCN10A Mutations Related with Bradycardia and Conduction Block in Young Patients. ESC Congress 2017. (2017. 8. 26-30. Spain)
12. Fukuyama M, Ohno S, Takayama K, Ichikawa M, Horie M. Novel RYR2 mutations causative for long QT syndromes. ESC Congress 2017. (2017. 8. 26-30. Spain)
13. Ichikawa M, Ohno S, Fukumoto D, Takayama K, Wada Y, Fukuyama M, Makiyama T, Itoh H, Horie M. Identification of copy number variations by next generation sequencer in patients with inherited primary arrhythmia syndromes. ESC Congress 2017. (2017. 8. 26-30. Spain)
14. Takayama K, Ohno S, Ding W-G, Kise H, Hoshi ai M, Matsuura H, Horie M. Early Repolarization Syndrome Caused by a de novo KCND3 Gain-of-Function Mutation. AHA2017. (2017.11.11-13. Anaheim.)

[国内学会]

1. 大野聖子. Can We Detect and Know All the Pathogenic Mutations by Next Generation Sequencer in Patients with Inherited Cardiovascular Diseases? 次世代シーケンサーで全部わかるの? JCS2017 (2017.3.17-19, 金沢)

2. 大野聖子, カテコラミン誘発多形性心室頻拍最近の話題 小児循環器病学会 遺伝性不整脈のブレイクスルー (2017.7.7 浜松)
3. 大野聖子, 総論ーゲノム医学の基礎 第32回犬山不整脈カンファランス (2017.8.19)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし