

ロングリードシーケンサーを用いた *DSG2* compound heterozygous 変異検出による、

不整脈原性右室心筋症の遺伝的背景の解明

園田桂子

国立循環器病研究センター メディカルゲノムセンター

【研究の背景】

不整脈原性右室心筋症 (ARVC) は、右室心筋の線維脂肪化によって生じる心室不整脈と右心不全を特徴とする致死性の遺伝性心疾患である¹⁾。有病率は約 5000 人に 1 人、発症年齢は 30~40 代で若年者突然死の原因として重要である。主な原因は細胞間接着因子の一つであるデスモゾームをコードする遺伝子 (*PKP2*, *JUP*, *DSG2*, *DSC2*, *DSP*) の病的変異であり、欧米では同定される変異の半分以上は *PKP2* である。

我々は先行研究で日本人 ARVC 患者 99 人について遺伝学的検査を実施し *DSG2* 変異が最も多いことを報告した²⁾。その後、患者を 159 人に増やして遺伝学的検査を施行し、*DSG2* 変異患者 (64 人) は両心機能低下による心不全と心室不整脈を 40-50 歳代に発症することを発見した。さらに家族解析を行い、発端者や ARVC と診断された家族の大部分が *DSG2* の homozygous もしくは compound heterozygous 変異であるのに対し、単一の *DSG2* heterozygous 変異を持つ家族の大部分は ARVC ではないことが分かった。

今までの研究成果から、①日本人 ARVC 患者では欧米人と異なり *DSG2* 変異が最多である、②*DSG2* 変異患者は *PKP2* 変異患者と臨床像が異なる、③*DSG2* 変異は潜性遺伝形式であるということが分かった。潜性遺伝疾患では変異が同一アレル上にあるか否かの確認は重要だが、家族検体が入手できない場合は判断が難しい。また単一の *DSG2* heterozygous 変異だけを有しているように見える患者も、実はもう一方のアレルに欠失や重複などの DNA 構造多型 (Structural variants, SVs) が隠れている可能性もある。これらの問題を解決し *DSG2* 変異同定率を上昇させるため、我々は、Long-read sequencer (LRS) による *DSG2* ターゲットシーケンスを計画した。

【目 的】

LRS であるナノポアシーケンサーを用い、日本人の主要な ARVC 原因遺伝子である *DSG2* の compound heterozygous 変異の確認及び SVs 検出を行い、*DSG2* 変異検出率を上昇させ、早期診断および治療介入へつなげることを目標とする。

【方 法】

本研究では LRS であるナノポアシーケンサー (GridION) を用いて *DSG2* における compound heterozygous 変異確認および SVs 検出を行った。

① *DSG2* compound heterozygous 変異確認

研究対象は先行研究で複数の *DSG2* 変異が同定され compound heterozygous 変異であることを確認できなかった 15 名であった。複数の変異をカバーするように Long-range PCR をを行い、PCR 産物にシーケンス用アダプターを結合させ、GridION を用いてシーケンスを行った。Fastq データをヒト DNA 標準配列へマッピングしハプロタイプ解析を行った。

② *DSG2* における SVs 検出

研究対象は先行研究で単一の *DSG2* heterozygous 変異のみ同定された 5 名であった。既に設計済みの *DSG2* 用 Cas9 プローブを用いてゲノム DNA からターゲット部位を切り出し、シーケンス用アダプターを結合させ、GridION に

よるシーケンスを行った。Fastq データをヒト DNA 標準配列へマッピングし SVs を検出した。

【結 果】

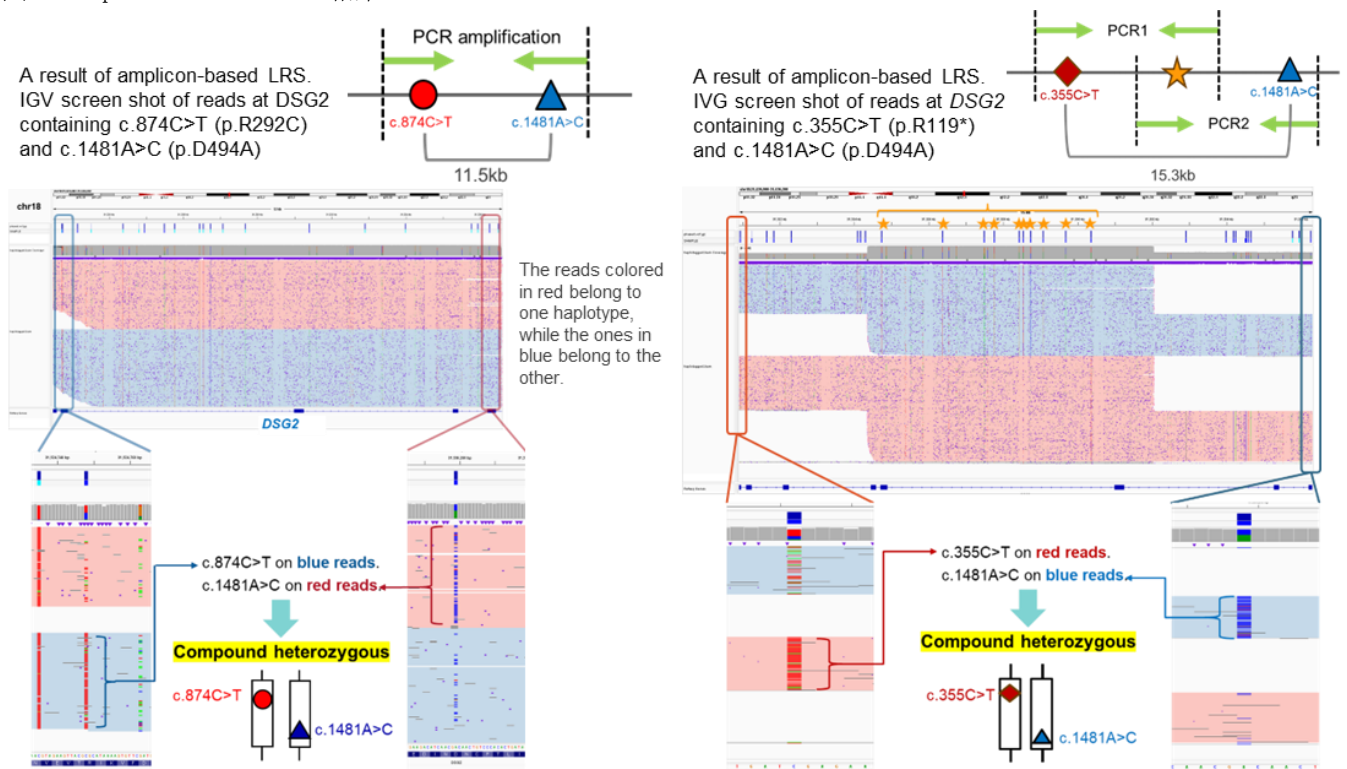
① *DSG2* compound heterozygous 変異確認

15 名全員にナノポアシーケンサーによる amplicon-based LRS を施行し、ハプロタイプ解析を行った。代表的な LRS の結果を図 1 に示す。15 名全例が *DSG2* の compound heterozygous 変異を有していた。この結果から日本人 ARVC 発端者 159 人のうち、38 人が *DSG2* の compound heterozygous 変異を有し、26 人が *DSG2* の homozygous 変異を有していたので、計 64 人(40%)が両アレルに *DSG2* 変異を有していたことが分かった。

② *DSG2* における SVs 検出

1 例で Cas9 によるターゲットシーケンスを行ったが、明らかな SVs は指摘できなかった。しかし使用できる DNA が 1g しかなく、*DSG2* にマッピングされたリード数が不十分であったため、信頼性が低い結果となった。*DSG2* 遺伝子全体をカバーするためにタイリング法というライブラリ作成法を用いていたが、少ない DNA から十分なリードを得るためには別のライブラリ作成法を用いる必要があると分かったので、手法を変えて今後も研究を継続する予定である。

図 1. Amplicon-based LRS の結果



【考 察】

本研究では、複数の *DSG2* 変異を持つ家族ゲノム情報を欠いた 15 人の ARVC 発端者に対し、amplicon-based LRS を用いて変異のハプロタイプ解析を行い、15 名全員が *DSG2* の compound heterozygous 変異を有していることを証明した。これにより、日本人 ARVC の主たる原因は常染色体潜性遺伝形式をとる *DSG2* の両アレル変異であることが明らかになった。

一般的に毛髪や皮膚の異常を伴わない ARVC は常染色体顕性遺伝形式をとるとされており、ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org/>) や OMIM (<https://omim.org/>) でも *DSG2* の主たる遺伝形式は顕性遺伝と記載されている。^{3, 4}近年 *DSG2* の homozygous 変異の報告を散見するようになったため^{5, 6}、日本人 ARVC コホートで家系解析を行ったところ、潜性遺伝形式をとる compound heterozygous 変異や homozygous 変異が多いことが分かった。潜性遺伝疾患では、複数の変異が同じアレルにあるのか別々のアレルにあるのかを判別することは重要である。しかし我々のコホート中 15 人は両親のゲノム情報がなく、その判別ができなかった。そこで、我々は amplicon-based LRS を用いて複数変異を直接 phasing す

ることにより、15人の *DSG2* 変異は全て compound heterozygous であることを確認した。*DSG2* 変異による ARVC は 40-50 歳前後で発症することが多く、両親の遺伝子検査が難しいケースが少なくない。Amplicon-based LRS によるハプロタイプ解析の有用性は既に報告されており⁷⁾、本研究でも大変役立った。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ARVC は原因遺伝子により表現型が異なるため、原因遺伝子を特定することで疾患進行を予測し適切な早期介入が可能となる。*DSG2* による ARVC の場合、40-50 歳頃に心室不整脈発症を発生し、同時期から両心室機能低下も呈する。心室不整脈に対しては植込み式除細動器による突然死を予防できるが、心収縮能低下に対する有効な薬物治療は現在のところ存在せず、重症心不全症例は心移植を必要とする。Amplicon-based LRS により原因遺伝子が *DSG2* であると明らかにすることで、早期から心不全の進行や心移植の可能性を念頭に診療することができ、患者の予後改善が期待できる。

DSG2 の compound heterozygous 変異を確認することは、発端者だけではなく家族のフォローアップにも重要である。また潜在性遺伝であるため無症状の heterozygous 変異キャリアが日本には多く存在しており、彼ら同士の子供は ARVC 発症リスクが高く、早期介入が必要になることを伝えることが可能となる。

【参考・引用文献】

1. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000;355:2119-2124. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02379-5
2. 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. doi: 10.1002/mgg3.311
3. Awad MM, Dalal D, Cho E, Amat-Alarcon N, James C, Tichnell C, Tucker A, Russell SD, Bluemke DA, Dietz HC, et al. *DSG2* mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2006;79:136-142. doi: 10.1086/504393
4. Bhuiyan ZA, Jongbloed JD, van der Smagt J, Lombardi PM, Wiesfeld AC, Nelen M, Schouten M, Jongbloed R, Cox MG, van Wolferen M, et al. Desmoglein-2 and desmocollin-2 mutations in dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patients: results from a multicenter study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2:418-427. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.839829
5. Chen L, Rao M, Chen X, Chen K, Ren J, Zhang N, Zhao Q, Yu W, Yuan B, Song J. A founder homozygous *DSG2* variant in East Asia results in ARVC with full penetrance and heart failure phenotype. *Int J Cardiol*. 2019;274:263-270. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.06.105
6. Hermida A, Fressart V, Hidden-Lucet F, Donal E, Probst V, Deharo JC, Chevalier P, Klug D, Mansencal N, Delacretaz E, et al. High risk of heart failure associated with desmoglein-2 mutations compared to plakophilin-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Eur J Heart Fail*. 2019;21:792-800. doi: 10.1002/ejhf.1423
7. McClinton B, Watson CM, Crinnion LA, McKibbin M, Ali M, Inglehearn CF, Toomes C. Haplotyping Using Long-Range PCR and Nanopore Sequencing to Phase Variants: Lessons Learned From the ABCA4 Locus. *Lab Invest*. 2023;103:100160. doi: 10.1016/j.labinv.2023.100160