

次世代シーケンサーを用いた遺伝性不整脈の遺伝子解析および

ゼブラフィッシュを用いた不整脈重症度評価と個別化治療

林 研至

金沢大学附属病院 検査部

【研究の背景】

遺伝性不整脈には、先天性 QT 延長症候群 (LQTS)、ブルガダ症候群、カテコラミン誘発多形性心室頻拍、QT 短縮症候群、早期再分極症候群、家族性心房細動、家族性除脈、不整脈原性右室心筋症などが含まれる。遺伝性不整脈は比較的まれであるが、心臓突然死 (SCD) の原因として重要な疾患群である。2010 年の循環器学会ガイドラインによれば、植え込み型除細動器 (ICD) の適応となった重症不整脈の原因の 20% がブルガダ症候群および LQTS である。遺伝性不整脈における SCD は一般に若年から中高年層で発症することから、その病態を把握し、これを未然に防ぐことが特に重要である。

当科ではこれまで 500 例を超える遺伝性不整脈症例を集積し、既知遺伝子の解析を行ってきた¹⁾。臨床的に LQTS と診断された症例では 70% 以上の確率で変異を同定できたが、それ以外の遺伝性不整脈疾患では、家族歴を認める症例であってもその検出頻度は 10-30% 程度にすぎない。一方、近年の遺伝子解析技術の発展により、次世代シーケンサーを用いて拡大候補遺伝子解析あるいは全エクソーム解析が可能となった。次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析により、数多くの遺伝子多型が見出される。それらの多型が疾患発症にどの程度寄与しているかどうか明らかにすることは極めて重要であると考えられる。

【目 的】

我々がこれまでに集積した遺伝性不整脈症例に対し、拡大候補遺伝子解析 (不整脈および心筋症に関与する 140 遺伝子の網羅的解析) あるいは全エクソーム解析を行う。網羅的遺伝子解析により見出され、稀少性の高い遺伝子多型に対し、*in silico* の予測ツールを用いて病原性を評価し、家族解析による遺伝子型-表現型を評価する。疾患起因性が高いと考えられる遺伝子変異に対し、従来のパッチクランプ法に加え、ゼブラフィッシュを利用してその病的意義の解明を試み、遺伝子変異ごとに個別化治療法を決定する。

【方 法】

遺伝性不整脈症例に対し、拡大候補遺伝子解析あるいは全エクソーム解析を行った。

従来のパッチクランプ法に加え、ゼブラフィッシュを利用してその病的意義の解明を試みた。LQT および若年発症徐脈などの遺伝性不整脈症例より見出された病原性 PTV を Crispr/Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュに導入した。sgRNA/Cas9 をゼブラフィッシュ胚の 1 cell stage にマイクロインジェクションし、2 日後に体細胞の挿入欠失変異を確認した。マイクロインジェクション後 2~3 日の時点で遺伝子変異の機能評価を行った。機能評価法として、光学顕微鏡下での心房・心室の拍動観察、ビデオマイクロスコープを用いた心機能評価、光学マッピングを用いた刺激伝導速度の測定、体表面心電図測定、心筋活動電位測定を用いた。

受精後 2-3 ヶ月で野生型ゼブラフィッシュと異種交配させ、最終的に 6~8 ヶ月かけてホモ接合性の遺伝子変異を有する成魚を作成した。この遺伝子改変ゼブラフィッシュを用い、疾患発症メカニズムの解明、治療薬の評価および開発を行なっ

た。また、モルフォリノを用いて病原性遺伝子をノックダウンし、ゼブラフィッシュ胚の心臓の評価を行った。

【結 果】

遺伝性不整脈 88 症例に対して次世代シーケンサーによる解析を行なった。従来の候補遺伝子解析法で異常が認められなかった先天性 QT 延長症候群 (LQTS) 31 症例のうち、17 例に遺伝子変異を見出した。また、若年発症徐脈 20 症例のうち、6 例に遺伝子変異を見出した。

若年発症徐脈症例より *LMNA* 遺伝子の 2 種類の protein truncating variant (PTV) を見出した。Crispr/Cas9 システムを用いてヒト *LMNA* 遺伝子のホモログであるゼブラフィッシュ *lmna* 遺伝子に変異を導入した。受精後 48 時間の胚 (F0 モザイク) において、*lmna* 遺伝子変異をもつゼブラフィッシュでは心拍数の有意な低下を認め、72 時間後において光学マッピングを用いて測定した心室内伝導速度の有意な低下を認めた。また、ホモ接合性の *lmna* 遺伝子変異をもつゼブラフィッシュ胚 (F2) に対し心機能の評価を行ったところ、変異をもつ胚では心拍数の有意な低下および心室内伝導速度の有意な低下を認めた。このように *LMNA* 遺伝子改変ゼブラフィッシュは、症例の臨床的特徴を忠実に再現した。

LQTS 症例 (LQT2) で見出された *KCNH2* 遺伝子変異に対し、ゼブラフィッシュ初期胚を用い、ノックダウン/レスキュー実験を行った。ゼブラフィッシュ胚にゼブラフィッシュ *kcnh2* アンチセンスモルフォリノ (MO) を単独注入したところ、72 時間後に体表面心電図上著明な QTc 延長を認めた。一方、MO+野生型 *KCNH2* RNA の QTc はコントロールと同等であり、MO+変異 *KCNH2* RNA の QTc はコントロールと比較して有意に延長した²⁾。

【考 察】

Crispr/Cas9 システムを用いた遺伝子改変ゼブラフィッシュ作成の論文報告は極めて少なく、我々が作成した *lmna* 遺伝子変異を有するゼブラフィッシュも過去に報告されていない。また、本遺伝子改変フィッシュは症例の表現型を忠実に再現しており、徐脈性不整脈モデルとして有用と考えられる。今後、遺伝性不整脈疾患モデルを作成し、疾患発症メカニズムの解明および治療法の確立を目指すことは極めて独創的な試みと考えられる。ゼブラフィッシュ胚の体表面心電図の測定技術は未だ確立されていない。今後正確かつ確実な心電図測定技術を確立することで、ゼブラフィッシュを用いた不整脈研究が飛躍的に進むと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ゼブラフィッシュはトランスジェニックマウスや iPS 細胞由来心筋細胞と比較して短期間かつ低コストで多くの遺伝子変異の機能を評価しうる high throughput 解析が可能であるという特色がある³⁾。このように個々の遺伝子変異の病的意義、不整脈発生機序および個別の治療方針をより正確かつ短期間に決定し、臨床にフィードバックさせることが可能である。

【参考・引用文献】

- 1) Hayashi K, Konno T, Tada H, Tani S, Liu L, Fujino N, Nohara A, Hodatsu A, Tsuda T, Tanaka Y, Kawashiri MA, Ino H, Makita N, Yamagishi M. Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2015;8:1095-1104.
- 2) Tanaka Y, Hayashi K, Fujino N, Konno T, Tada H, Nakanishi C, Hodatsu A, Tsuda T, Nagata Y, Teramoto R, Yoshida S, Nomura A, Kawashiri MA, Yamagishi M. Functional analysis of *KCNH2* gene mutations of type 2 long QT syndrome in larval zebrafish using microscopy and electrocardiography. *Heart Vessels.* 2019;1:159-166.
- 3) Kithcart A, MacRae CA. Using Zebrafish for High-Throughput Screening of Novel Cardiovascular Drugs. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2:1-12.