

遺伝性不整脈の遺伝子診断の歴史*

蒔田 直昌¹

はじめに

1980年後半から始まった遺伝子学の急速な発展は、病態を分子レベルで理解する「分子の時代」の扉を開き、循環器疾患領域においても、心筋症や遺伝性不整脈などの疾患遺伝子が解明された。1990年から始まったヒトゲノム計画は、13年間で約30億塩基対のゲノム配列解読を完了した。そして今、遺伝学研究は、この膨大なゲノムデータに解釈を加えて医学やバイオテクノロジーに応用するステップへとさらに大きく進んでいる。では不整脈領域の遺伝子研究はどのように発展してきたのだろうか。本稿では遺伝性不整脈に焦点を当て、遺伝子診断法の歴史について概説する。

疾患遺伝子のマッピングと同定：
連鎖解析・ポジショナルクローニング

遺伝性不整脈として最初に注目されたのは、1960年代にRomanoとWardらによって見出された、先天性QT延長症候群(congenital long QT syndrome; LQTS)である^{1,2)}。LQTSの病態メカニズムとして、自律神経のバランス異常や心筋イオン電流の異常を含め多くの仮説が提唱されたが、分子病態の解明は困難で、その他の多くの遺伝性疾患と同様、1980年になるまで原因遺伝子

は解明されなかった。そのような状況下で最初に行われたのは、疾患の責任遺伝子が染色体上のどこに存在するかを明らかにする遺伝的マッピングで、その遂行に威力を発揮した手法が連鎖解析(linkage analysis)である。ヒト染色体は減数分裂の際、通常少なくとも1回交差(組換え)が生じる。同一染色体上の座位A・Bを想定したとき、両者の遺伝的距離が十分に遠ければ減数分裂の際にその間に交差が入る確率は極めて高くなり、相同染色体の交差を介してA・Bが分離する確率は50%になる。逆に、座位A・Bが十分に近ければ、その間に交差が入る確率が少なくなるので、ともに子孫に伝わり、独立した分離が認められない。このような状態を「連鎖(linkage)」という。疾患の原因となる遺伝子そのものは同定できなくても、特定の形質が分離している(明確なメンデル遺伝を示す)家系と全染色体上に存在する遺伝的マーカー(genetic marker)を利用して、疾患と連鎖するマーカーを明らかにすることができる。このような手法で疾患遺伝子を染色体上にマッピングすることが連鎖解析である。遺伝的マーカーとして最初は、血液型やHLAなどが用いられたが、現在はマイクロサテライトや一塩基多型(SNP)など情報量の多いマーカーに取って代わられている(表1)。これらの遺伝子マーカーの発達

* Recent Progress in Genetic Diagnosis of Inherited Arrhythmias

¹ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子生理学分野(〒852-8523 長崎市坂本1-12-4) Naomasa Makita: Department of Molecular Physiology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

表 1 ヒトの遺伝的マーカー

マーカーの種類	用いられた時代	座位の数	特徴
血液型	1910～1960	およそ 20	表現型から遺伝型の推測が困難。物理的マッピングは困難。
HLA 型	1970～	1	ハプロタイプマーカーの一つ。6p21.3 と連鎖する部位のみに使用できる。
RFLP	1975～	>10 ⁵	2 アレルマーカーで最大ヘテロ接合率 0.5。物理的マッピング容易。
ミニサテライト	1985～1990	およそ 10 ⁴	アレル多数で情報量多い。サザンプロットで判定。染色体末端に集中する傾向。
マイクロサテライト	1990～	およそ 10 ⁵	アレル多数で情報量多い。自動化された多重 PCR で検出。ゲノム全体にわたって存在。
SNP	2000～	およそ 10 ⁷	2 アレルマーカーで、ゲノム全体に密に存在。同時に大量の遺伝型判定可能。

RFLP：制限断片長多型，SNP：一塩基多型

に加えて、PCR やコンピュータの技術革新によって連鎖解析は飛躍的に進歩した。

不整脈領域において最初に行われた連鎖解析は、LQTS が第 11 染色体短腕 (11p15.5) の Harvey ras-1 (*HRAS*) と連鎖することを示した 1991 年の Keating らの研究である³⁾。日本でも 1994 年、理研の田中らが 13 家系の LQTS で同様の結果を得た⁴⁾。これらの研究は遺伝性不整脈におけるパイオニア的研究であり、その後の目覚ましい研究によってこれが 1 型 LQTS (LQT1) の遺伝子 *KCNQ1* であることが判明するのである⁵⁾。しかし、ヒトゲノムの全塩基情報が解明された現在からさかのぼってみると、*HRAS* と *KCNQ1* は遺伝的に連鎖していたとは言えるものの、1.9 Mb (190 万塩基) も離れており、*HRAS* との連鎖が判明した段階では疾患遺伝子 *KCNQ1* の同定には程遠かったことがわかる。

このように、染色体上の大まかな位置以外に情報が無い場合に疾患遺伝子を特定する方法として開発されたのが、ポジショナルクローニングである。まず、染色体領域周辺のマイクロサテライトなどのマーカーを使って、疾患と一緒に分離する一群のマーカー (ハプロタイプ) を見出し、候補遺伝子領域をできるだけ絞り込む。次にゲノムライブラリのスクリーニングによって、候補領域をカバーする重複した連続クローン (コンティグ) を作成し (染色体歩行)、転写産物のマッピングによってコンティグ内の発現配列を決定する。これらの候補遺伝子群のなかから優先的に変異スク

リーニングの対象となる遺伝子を決定する。このような多くの時間と労力を要するポジショナルクローニングによって最初に明らかにされたヒトの疾患は、X 連鎖慢性肉芽腫症 (1983 年) とデュシェンヌ型筋ジストロフィー (1985 年) である。不整脈の領域では 1995～1996 年にかけて、同様のアプローチで LQTS の 3 つの心筋イオンチャネル遺伝子 *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* が解明された⁵⁻⁷⁾。これらの研究が発端となって、機能解析やその他の不整脈の疾患遺伝子解析が爆発的に進み、その一部は突然死の予知や治療法の選択など臨床応用されるに至っている。そういう意味で LQTS に関する上記の 3 つの研究は、不整脈におけるパラダイムシフトともいえるべき画期的な研究だったと言える。

候補遺伝子解析

LQTS に心筋イオンチャネルの遺伝子変異が同定されたという事実は、「心筋イオンチャネル病」という新たな疾患概念を生み出した。さらに、LQTS に他のイオンチャネル遺伝子が関与している可能性や、他の不整脈疾患においても心筋イオンチャネル遺伝子が関与している可能性などが浮上した。このような仮説に則って遺伝子解析をする場合、明確なメンデル遺伝を示す大きな家系であれば連鎖解析が適応となるが、小さな家系や表現型が明白でない場合には連鎖解析は役に立たない。このような場合にはむしろ、候補となるターゲット遺伝子を選択し、次々と変異スクリーニン

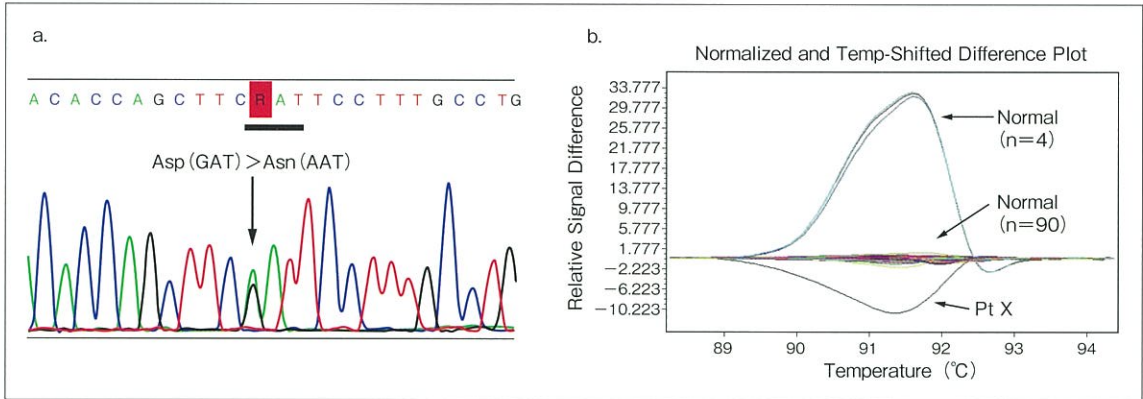


図1 遺伝子解析の実例

a. サンガー法 DNA シークエンス

Brugada 症候群患者のゲノム DNA を用いて、SCN5A 遺伝子の Exon 9 を PCR で増幅し、BigDye Terminator 3.1[®] でサンガー法シークエンスを行い、キャピラリーシークエンサー (Genetic Analyzer 3130[®]) で解析した結果である。矢印に示すように、Asparatic acid356(GAT)が Asparagine(AAT)に変化するミスセンス変異(D356N)のヘテロキャリアであることがわかる。

b. 融解曲線解析 (HRM)

患者 X に同定された遺伝子バリエーションが、健常人に存在するバリエーション(すなわち遺伝子多型)かどうかを判断するために、日本人 94 人の DNA と negative control を含め 96well の Light Cycler[®] で HRM 解析を行った。反応は 1 時間以内に終了し、結果はその場でわかる。患者 X と健常人 4 人を除く 90 人はほぼ同じ融解曲線パターンを示していた。異常パターンを示した健常人 4 人の DNA はサンガー法で確認し、同一のヘテロ遺伝子多型であることが判明した。患者 X と同じパターンを示す DNA は、その後の検査を含め 400 人に認められず、最終的に変異であることが確定した。このように同一遺伝子領域に関して大量のサンプルを解析する場合、この方法は極めて迅速かつ正確でコストも低い。

グをする候補遺伝子解析 (candidate gene approach) のほうが有効なことがある。キャピラリーシークエンサーなど (図 1a) のシークエンス解析技術が画期的な進歩をとげ、連鎖解析に比べて圧倒的に手軽な候補遺伝子解析は隆盛を極め、Brugada 症候群 (BrS)、QT 短縮症候群 (SQTS)、カテコラミン誘発性心室頻拍 (CPVT)、心臓伝導障害 (CCD)、先天性洞不全症候群 (SSS) などの遺伝性不整脈に多くの遺伝子変異が報告されてきた (表 2)。

変異検出のための遺伝子解析

変異を検出する手段の王道は塩基配列決定 (DNA シークエンス) である。ゲノム DNA において各エクソンを PCR で増幅するための DNA プライマーペアを合成し、得られた PCR 産物を直接ジデオキシシークエンス法 (サンガー法) でシークエンスする (図 1a)。キャピラリーシークエンサーのない時代には手製のポリアクリルアミドゲルを

用いてシークエンスしており、このときはせいぜい 200 bp 程度しか読めなかった。標準的なキャピラリーシークエンサーでは 1 回で 500~800 bp の塩基配列を同時に多数並列で決定することができる。次世代シークエンサーを用いた超高速塩基配列決定法は、サンガー法を圧倒的に凌駕する配列決定能力を持つが、コストの面などでルーチン遺伝子解析目的としての使用は困難で、次世代シークエンサーで同定した変異やバリエーションなどは、サンガー法で検証する必要がある。

塩基配列決定のコストが高価だったころ、迅速かつ安価にエクソンを検索して塩基配列決定のターゲットを絞り込む様々な手法が考案された (表 3)。その多くはヘテロ二本鎖の特性を利用している。ヘテロ二本鎖はヘテロ接合体の PCR 産物を加熱変性して一本鎖にしたとゆっくり冷却することで簡単に生成され、非変性ポリアクリルアミドゲルに流すと通常とは異なる移動度を示す (single-strand conformational polymorphism;

表2 遺伝性不整脈の原因遺伝子

サブタイプ	遺伝子	タンパク	遺伝子座	障害される電流	電流の効果	
LQTS	LQT1	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	11p15.5	遅延整流 K (I_{ks})	↓
	LQT2	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	7q35-36	遅延整流 K (I_{kr})	↓
	LQT3	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	Na (I_{Na})	↑
	LQT4	<i>ANK2</i>	Ankyrin-B	4q25-27	複数	
	LQT5	<i>KCNE1</i>	MinK	21q22.12	I_{ks}	↓
	LQT6	<i>KCNE2</i>	MiRP1	21q22.12	I_{kr}	↓
	LQT7	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	17q23.1-24.2	内向き整流 K (I_{K1})	↓
	LQT8	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 $\alpha 1C$	12p13.3	L型 Ca (I_{Ca-L})	↑
	LQT9	<i>CAV3</i>	Caveolin-3	3p25	I_{Na}	↑
	LQT10	<i>SCN4B</i>	Nav $\beta 4$	11q23	I_{Na}	↑
	LQT11	<i>AKAP9</i>	AKAP9	7q21-q22	I_{ks}	↓
	LQT12	<i>SNTA1</i>	syntrophin, $\alpha 1$	20q11.2	I_{Na}	↑
	LQT13	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	11q24.3	内向き整流 K (I_{KAch})	↓
SQTS	SQT1	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	7q35-36	I_{kr}	↑
	SQT2	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	11p15.5	I_{ks}	↑
	SQT3	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	17q23.1-24.2	I_{K1}	↑
	SQT4	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 $\alpha 1C$	12p13.3	I_{Ca-L}	↓
	SQT5	<i>CACNB2b</i>	Cav $\beta 2b$	10p12	I_{Ca}	↓
	SQT6	<i>CACNA2D1</i>	Cav $\alpha 2\delta 1$	7q21.11	I_{Ca}	↓
BrS	BrS1	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	I_{Na}	↓
	BrS2	<i>GPD1L</i>	GPD1L	3p22.3	I_{Na}	↓
	BrS3	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 $\alpha 1C$	12p13.3	I_{Ca}	↓
	BrS4	<i>CACNB2b</i>	Cav $\beta 2b$	10p12	I_{Ca}	↓
	BrS5	<i>SCN1B</i>	Nav $\beta 1$	19q13.12	I_{Na}	↓
	BrS6	<i>KCNE3</i>	MiRP2	11q13.4	I_{to}	↑
	BrS7	<i>SCN3B</i>	Nav $\beta 3$	11q24.1	I_{Na}	↓
	BrS8	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	12p11.23	IK_{ATP}	↑
	BrS9	<i>CACNA2D1</i>	Cav $\alpha 2\delta C$	7q21.11	I_{Ca}	↓
	BrS10	<i>KCND3</i>	Kv4.3	1p13.2	I_{to}	↑
	BrS11	<i>MOG1</i>	MOG1	17p13.1	I_{Na}	↓
	BrS12	<i>ABCC9</i>	SUR2A	12p12.1	IK_{ATP}	↑
	BrS13	<i>SLMAP</i>	SLMAP	3p14.3	I_{Na}	↓
ERS	ERS1	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	12p11.23	IK_{ATP}	↑
	ERS2	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 $\alpha 1C$	12p13.3	I_{Ca}	↓
	ERS3	<i>CACNB2b</i>	Cav $\beta 2b$	10p12	I_{Ca}	↓
	ERS4	<i>CACNA2D1</i>	Cav $\alpha 2\delta 1$	7q21.11	I_{Ca}	↓
	ERS5	<i>ABCC9</i>	SUR2A	12p12.1	IK_{ATP}	↑
	ERS6	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	I_{Na}	↓
CPVT	CPVT1	<i>RYR2</i>	リアノジン受容体	1q43	SR Ca 遊離チャネル	↑
	CPVT2	<i>CASQ2</i>	Calsequestrin 2	1p13.1	SR Ca 遊離チャネル	↑
CCD	CCD1	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	I_{Na}	↓
	CCD2	<i>TRPM4</i>	TRPM4	19q13.33	cation	↑
	CCD3	<i>SCN1B</i>	Nav $\beta 1$	19q13.12	I_{Na}	↓
	CCD4	<i>GJA5</i>	Connexin40	1q21.1	GJ conductance	↓
SSS	SSS1	<i>HCN4</i>	Pacemaker チャネル	15q24.1	$I_f(I_h)$	↓
	SSS2	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	I_{Na}	↓

LQTS: QT 延長症候群, SQTS: QT 短縮症候群, BrS: Brugada 症候群, ERS: 早期再分極症候群

CPVT: カテコラミン誘発性心室頻拍, CCD: 心臓伝導障害, SSS: 洞不全症候群, $I_f(I_h)$: ペースメーカー電流

表3 塩基配列決定の前に遺伝子変異を検出する方法

方法	長所	短所
一本鎖コンフォメーション解析(SSCP)	簡便, 安価	200 bp 程度までの短い配列に適応, 多型の多い部位には使えない
変性高速液体クロマトグラフィ(dHPLC)	迅速・高処理能力・定量的	装置が高価, 多型の多い部位には使えない
変性濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)	高感度	プライマーの選択が重要, GC クランププライマーが高価
融点曲線解析(HRM)	高感度	Light Cycler [®] 専用

SSCP). 同様に変性高速液体クロマトグラフィ(dHPLC)や変性濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)という方法もある。dHPLCは高速処理が可能のため、多数の試料においてSNPのタイピングをする目的などに適している。標識したプローブとハイブリダイズした試料DNAの蛍光の変化を解析する融解曲線解析(high resolution melting; HRM)というロッシュ社のLight Cycler[®]専用のシステムもある(図1b)。いずれの方法も大量の試料に対して一定のDNA断片を日常的に解析するスクリーニングには適しているが、変化した部分の特定はできず、遺伝子多型の多い領域のスクリーニングにも向かない。

候補遺伝子解析の問題点

LQTSのように遺伝子変異検出率が6割を超えるものもある一方で、BrSのように原因遺伝子が13個以上も報告されているのに、遺伝子変異検出率は2~3割程度にすぎないものもある。BrSの遺伝子判明率が低い原因は解明されていないが、1) SCN5A以外に未知の主たる原因遺伝子が存在する可能性、2) 非翻訳領域、プロモータ領域、イントロンなどの通常は遺伝子解析を行わない領域に変異がある可能性、3) 単一遺伝子疾患ではなく多因子疾患である可能性、4) 炎症を含めた環境要因が強く関与している可能性など、様々な可能性が考えられる。また、疾患によっては、変異キャリアが必ずしも表現型を示さない現象(不完全浸透: incomplete penetrance)や、変異キャリアが様々な異なる表現型を示す(variable expressivity)ことがあり、遺伝子修飾因子の関与を考慮する必要があり、問題はさらに複雑化している。

候補遺伝子解析は手軽ではあるが、あくまで既

知の遺伝子をスクリーニングするための研究手法で、未知の原因遺伝子の発掘を目的とする研究に対してはおのずと限界がある。また心房細動のような多因子疾患に対しては、連鎖解析や候補遺伝子解析はほとんど無力である。このような状況を打開するためには、何らかの研究手法のブレイクスルーが必要だと考えられてきた。近年開発された次世代シーケンサーによるエクソーム解析やゲノムワイド関連解析(genome-wide association study; GWAS)はこのような行き詰まりを打破することができる革新的な生命科学技術である。これらの技術によって、遺伝性不整脈の病態研究と臨床へのフィードバックが再び強力に推進されることが期待される(本誌別項参照)。

文献

- 1) Romano C, Gemme G, Pongiglione R: Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II. syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation. Clin Pediatr (Bologna) 45: 656-683, 1963
- 2) Ward OC: A new familial cardiac syndrome in children. J Ir Med Assoc 54: 103-106, 1964
- 3) Keating M, Atkinson D, Dunn C, et al: Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. Science 252: 704-706, 1991
- 4) Tanaka T, Nakahara K, Kato N, et al: Genetic linkage analyses of Romano-Ward syndrome (RWS) in 13 Japanese families. Hum Genet 94: 380-384, 1994
- 5) Wang Q, Curran ME, Splawski I, et al: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet 12: 17-23, 1996
- 6) Curran ME, Splawski I, Timothy KW, et al: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. Cell 80: 795-803, 1995
- 7) Wang Q, Shen J, Splawski I, et al: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell 80: 805-811, 1995