

# Brugada 症候群における SCN5A のコピー数多型についての検討

園田桂子<sup>1</sup> 大野聖子<sup>1, 2\*</sup> 堀江 稔<sup>2</sup>

SCN5Aは心臓ナトリウムチャンネルをコードする遺伝子である。Brugada症候群(BrS)の遺伝子変異同定率は20%程度でしかないが、SCN5A変異はその大部分を占める。一方、様々な疾患とコピー数多型(CNV)との関連性が報告されているが、BrSでは2例の報告しかなく、アジア人では検討されていない。そこで、われわれは有症候性もしくは家族歴のある日本人BrS患者151人を対象とし、SCN5Aのサンガー法によるシークエンス解析とMLPA法によるCNVの検出を施行した。サンガー法により、20人の発端者にSCN5A変異を同定した。MLPA法は140人で結果を得ることができ、そのうち4人に各々異なるCNVを同定した(欠失3人、重複1人)。4人中3人は致死性不整脈イベントを有しており、平均診断年齢は23±14歳と若年であった。安静時12誘導心電図では4人ともPQ時間は延長し、QRS幅は正常上限であった。これら4人の臨床像は、蛋白生成が減少するtruncating変異や、ナトリウム電流が著明に減少するミスセンス変異を有する患者群と類似していた。SCN5AのCNVは、有症候性もしくは家族歴のあるBrS発端者の2.9%に同定され、臨床像も重症であり、スクリーニングされるべき変異と考えられる。

(心電図, 2020; 40: 5~15)

## I. はじめに

Brugada症候群(Brugada syndrome: BrS)は若年者に心室細動(ventricular fibrillation: VF)や突然死を引き起こす遺伝性不整脈疾患であり、安静時12誘導の右側胸部誘導(V<sub>1</sub>~V<sub>3</sub>)でcoved型ST上昇を示す<sup>1)</sup>。BrSの原因遺伝子は、1998年に心臓ナトリウムチャンネルのαサブユニットをコードする遺伝子であるSCN5Aの変異が報告された後<sup>2)</sup>、現在までに約20遺伝子において300を超える変異が報告

**Keywords**

- Brugada 症候群
- SCN5A
- コピー数多型

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター分子生物学部  
(〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町6-1)

<sup>2</sup> 滋賀医科大学アジア疫学研究センター

\*は責任者を示す

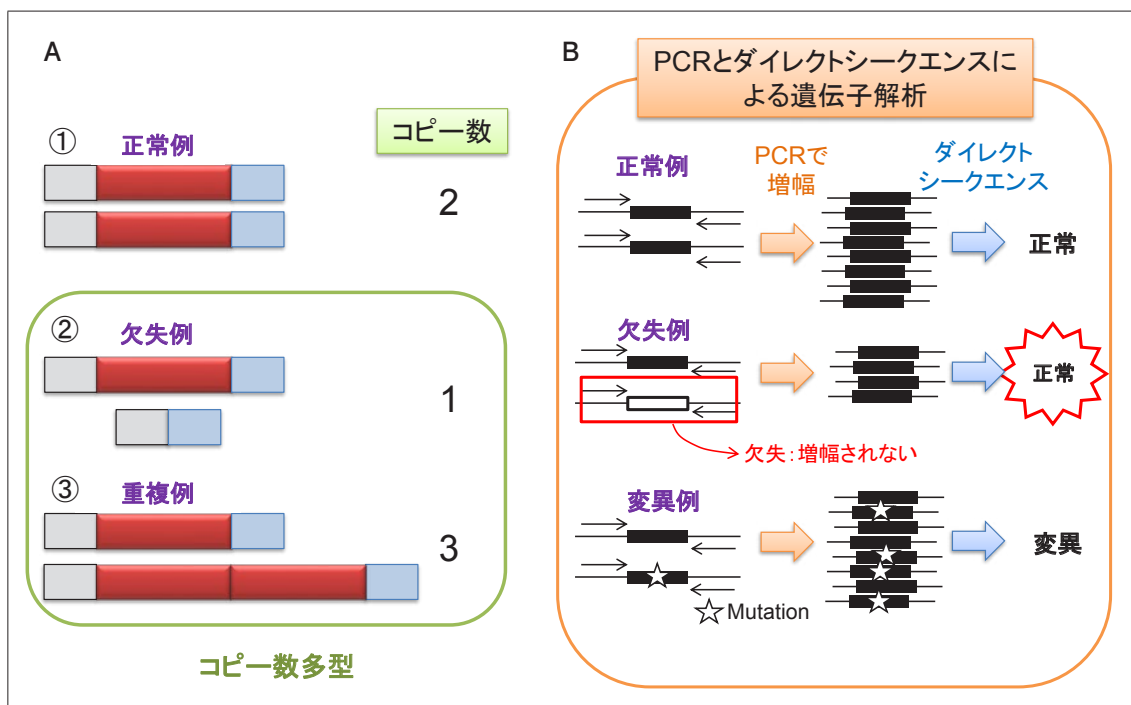


図1 コピー数多型の概念(A)と欠失を伴う場合の遺伝子解析例(B)

- A: 赤い部分がある遺伝子とする。正常例では、遺伝子が両方のアレルの一つずつあるので、コピー数は2である。欠失例では片方の遺伝子がないので、コピー数は1となる。重複例では、片方のアレルの遺伝子が2に増えるので、コピー数は3となる。
- B: 解析対象のエクソン(太線)の前後のイントロン(細線)部分にプライマー(矢印)を設定し、PCRで増幅した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定する。変異例では変異部分が増幅されるので、シーケンスにより変異を同定できるが、欠失例では欠失している部分は増幅されないため、正常例と同じ結果になる。

されている。大部分は心臓ナトリウムチャネル機能低下をきたす *SCN5A* の変異、もしくはそれに関与する遺伝子の変異である。BrSは遺伝性疾患であるにもかかわらず、遺伝子変異同定率は20%程度でしかない<sup>3)~5)</sup>。遺伝子変異が同定されない一因として、“検査法に起因する変異の見落とし”を考える必要がある。すなわち、従来のサンガー法や現在主流の short-read の次世代シーケンサー(next generation sequencing: NGS)では同定しがたい変異が存在する。

## II. コピー数多型とその検査法

ヒトの遺伝子は通常2量体として存在する。遺伝子のコピー数が異なる場合をコピー数多型(copy number variation: CNV)という。図1Aに概念を

示す。赤い部分がある遺伝子とすると、①正常例では両方のアレルの一つずつの遺伝子があり、コピー数は2である。②では一方の遺伝子が欠損しており、コピー数は1、逆に③では一方の遺伝子が1つ挿入されているのでコピー数は3になる。

従来、遺伝子解析はPCRとダイレクトシーケンスを中心とした検査法を用いてきた。解析対象遺伝子の各エクソンをPCRで増幅し、ダイレクトシーケンスで変異を検出するのだが、CNVは1kb以上の欠失あるいは重複となるため、PCRで増幅する範囲を超えてしまい、シーケンスで異常が検出できない(図1B)。そこで、特定の遺伝子に対してCNVを検出するために、TaqMan<sup>®</sup> copy number assay法(URL: <https://www.thermofisher.com/>)や multiplex ligation-dependent probe amplification

(MLPA)法(URL : <https://www.mlpa.com/>)が開発された。詳細は各社HPを参照していただきたい。

### Ⅲ. 不整脈疾患におけるコピー数多型

検査法の発達により、様々な不整脈疾患でCNVが同定されるようになった。Bhuiyanらはカテコラミン感受性多形性心室頻拍の2家系に心筋リアノジン受容体遺伝子(*RYR2*)のCNVを同定した<sup>6)</sup>。BarcらはQT延長症候群において*KCNQ1*のCNVを1家系、*KCNH2*のCNVを2家系に同定した<sup>7)</sup>。われわれも不整脈原性右室心筋症の症例にデスモソーム関連遺伝子の一つであるプラコフィリンをコードする遺伝子(*PKP2*)にCNVを同定し、報告した<sup>8)</sup>。これらの報告では、いずれもMLPA法を用いてCNVをスクリーニングしている。

### Ⅳ. BrSにおける*SCN5A*のコピー数多型

BrSでは、*SCN5A*のCNVを有する欧米人2症例が報告されているだけで<sup>9), 10)</sup>、アジア人についてはBrSの有病率が高いにもかかわらず、検討されていなかった。そこで、われわれは日本人のBrS発端者における*SCN5A*のCNVについて検討し、報告した。以下に、2018年“Heart Rhythm”に掲載されたわれわれの論文について述べる<sup>11)</sup>。

#### 1. 研究方法・結果

本研究では、有症候性もしくは家族歴のあるBrS発端者151人を対象に、*SCN5A*のサンガー法による変異検出とMLPA法によるCNV検出を行った。サンガー法により20人の発端者に*SCN5A*の一塩基置換が同定した。MLPA法の結果は140人で得ることができ、そのうち4人に*SCN5A*のCNVを同定した。

MLPA結果を図2に示す。発端者1は*SCN5A*の全エクソンの欠失、発端者2と3は各々エクソン4とエクソン24の欠失、発端者4はエクソン17-24の重複を有していた。発端者1の欠失の範囲をCGH法で確認したところ、*SCN5A*とその周囲20個の遺伝子を含む1.91Mbであった(図3)。発端者2と3

はlong-range PCR法で欠失の範囲を確認した(図4A, B)。発端者4はquantitative PCR (qPCR)法で重複を確認し、PCR法で重複配列の位置を確認した(図4C)。

CNVが同定された4人の発端者の臨床的特徴を表1に、心電図と家系図を図5に示す。平均診断年齢は23 ± 14歳と一般的なBrS患者に比べ若年であり、3人は致死性不整脈イベントを発症していた。心電図は4人ともPQ時間が延長し、QRS幅も正常上限であった。

変異による表現型の違いを検討するため、サンガー法で同定した*SCN5A*変異のうち、ナトリウム電流量が90%以上減少する変異( $M_{inactive}$ )をもつ4人とタンパク合成が減少するtruncating変異(T)をもつ6人を併せた10人と、CNVを同定した4人の臨床所見を比較したが、2群間で有意差は認めなかった(表2)。次に、これら14人をまとめてA群とし、*SCN5A*変異が同定されなかった116人をB群として、AとBの2群間で臨床所見を比較した(表3)。A群ではVF・CPAの発症率、洞不全や房室ブロックの合併率、不整脈の家族歴の割合が有意に高かった。心電図所見については、A群でPQ時間とQRS幅が有意に延長しており、Brugada心電図タイプ1はA群で高率に認められた。

#### 2. 考察

本研究ではBrS患者140人中4人に*SCN5A*のCNVを同定した(2.9%)。過去に3つのコホート研究がBrS患者の*SCN5A*のCNVを調べているが、合計334人中1人しか同定されていなかった(0.3%)<sup>10), 12), 13)</sup>。われわれの研究結果が過去の研究と違った要因として、研究対象患者の人種と、対象患者の選択法の影響が考えられる。過去の研究はいずれも欧米人を対象としていたが、われわれの研究は日本人のみを対象とした。また、われわれは研究対象を有症候性もしくは家族歴のある患者とし、心臓電気生理学的検査でVFが誘発された無症候性患者は除外した。

同定した4つのCNVによるナトリウム電流の変

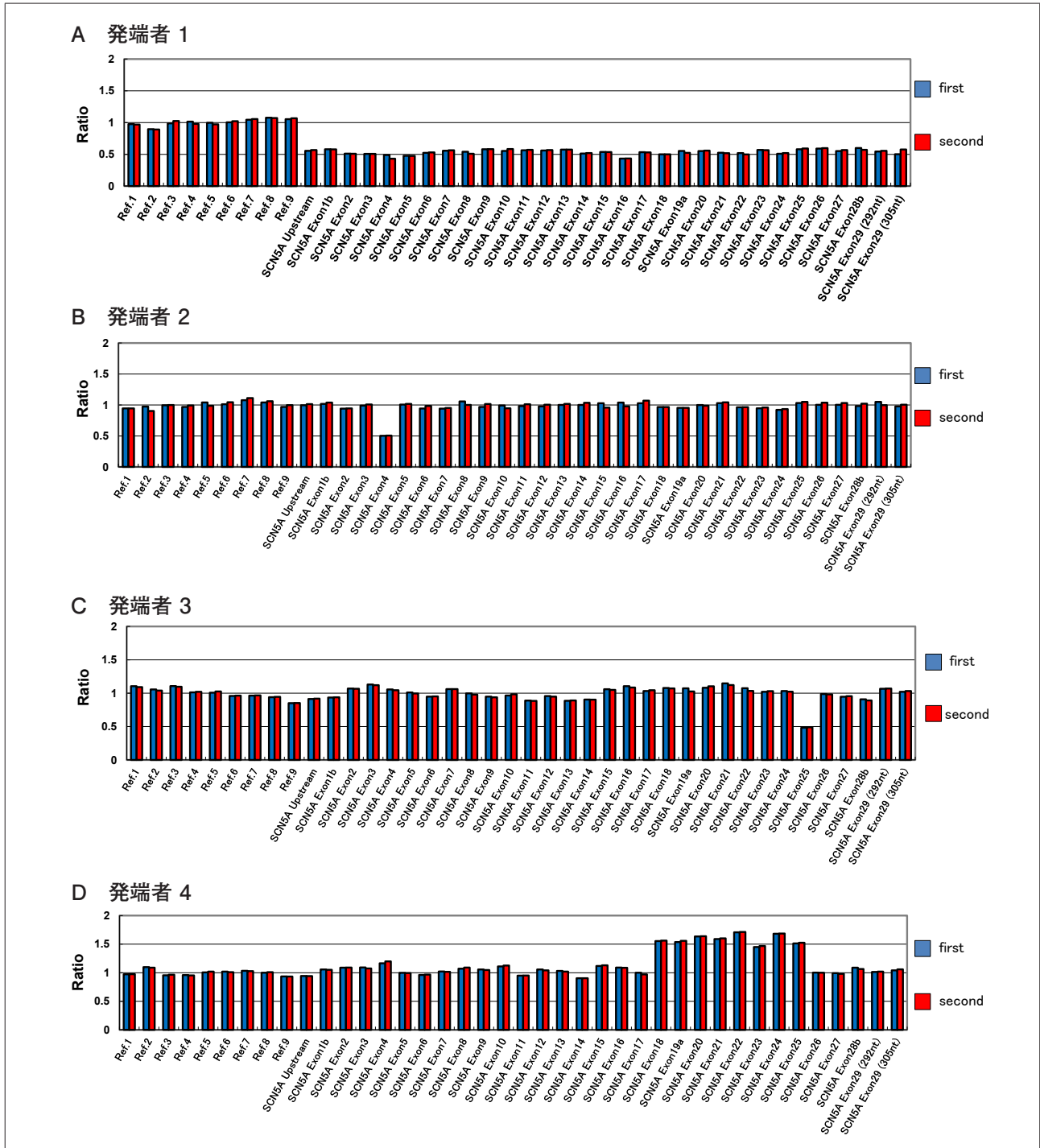


図2 MLPA法による SCN5A の CNV 解析結果

エクソン 6 は転写物のうちアイソフォーム 3 にしか存在しないので、エクソン 7-29 はアイソフォーム 1 (NM\_198056.2) のエクソン 6-28 に相当する。

A : 発端者 1 の結果。SCN5A の全エクソンでコピー数が半減している。

B : 発端者 2 の結果。エクソン 4 のコピー数が半減している。

C : 発端者 3 の結果。エクソン 24 のコピー数が半減している。

D : 発端者 4 の結果。エクソン 17-24 のコピー数が 1.5 倍に増加している。

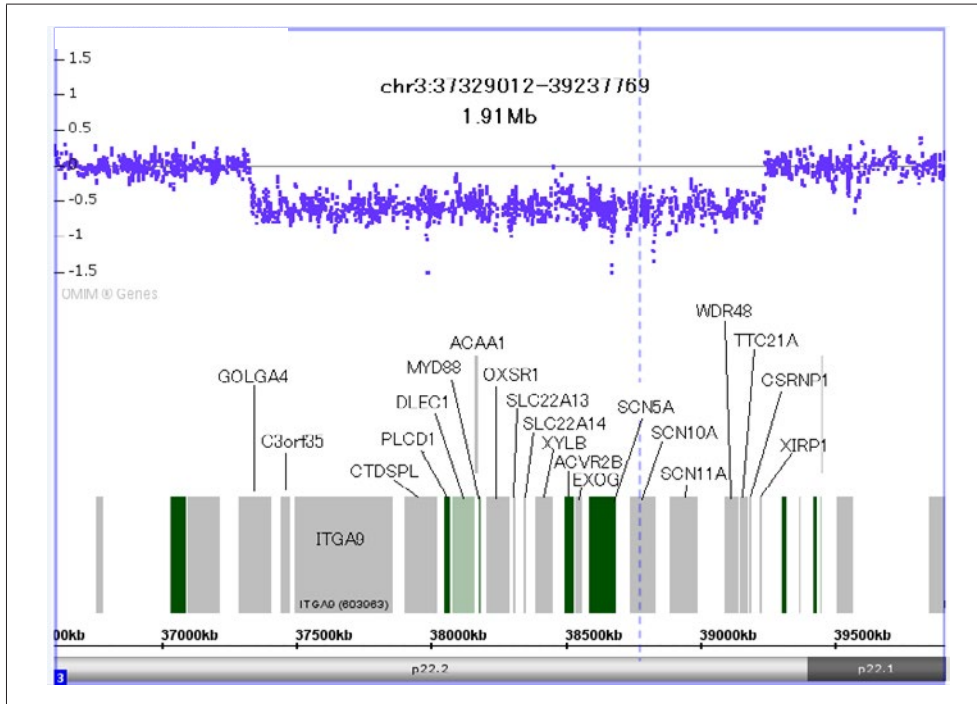


図3 発端者1のCGH法の結果

欠失の範囲は1.91Mbで、SCN5Aと周囲20個の遺伝子が含まれている。

化について考察した。全エクソンが欠失している発端者1では、鋳型DNAが正常の半分であるため、生成されるタンパクも半減すると予想される。一つのエクソンが欠失している発端者2と発端者3については、過去の報告と今回のわれわれの報告が生成されるチャンネルが無機能であることを証明した<sup>14)</sup>。エクソン17-24の重複がある発端者4では、巨大な重複配列がSCN5A内に挿入されているため、ナトリウムチャンネルの機能は高度に障害されると予想される。以上から、4つのCNVはいずれもハプロ不全をきたしている可能性が高い。90%以上のナトリウム電流低下をきたすミスセンス変異や、nonsense-mediated mRNA decayによりタンパク生成が減少するナンセンス変異やフレームシフト変異も、ハプロ不全をきたす。これらの変異とCNVが表2のように類似した臨床像を呈する理由は、どちらもハプロ不全をきたすためと考えられる。これらのハプロ不全をきたすSCN5A変異を有する発端者(グループA)は、SCN5Aの変異が同定されなかつ

た発端者(グループB)に比べ、重症な表現型を有していた(表3)。ハプロ不全をきたすSCN5A変異の同定は、BrS患者の管理に有用であると考えられる。

### 3. 結語

われわれは、有症候性もしくは家族歴のあるBrS発端者の2.9%にSCN5AのCNVを同定した。BrS患者に対し、SCN5AのCNVをスクリーニングすべきであると考ええる。

### V. 今後の課題

Brugada症候群をはじめ、遺伝性不整脈疾患においてCNVを検査することは、過去の研究やわれわれの報告からも重要であることがわかった。しかしMLPA法の場合、ターゲットとした遺伝子のCNVを調べることはできるが、網羅的な検索はできない。全ゲノムのCNV検出には、DNA arrayやNGSが活用される。以前は、コスト面からスクリーニングとしてNGSを使用することは難しかったが、現在では低価格化が進み、DNA arrayよりも安価と

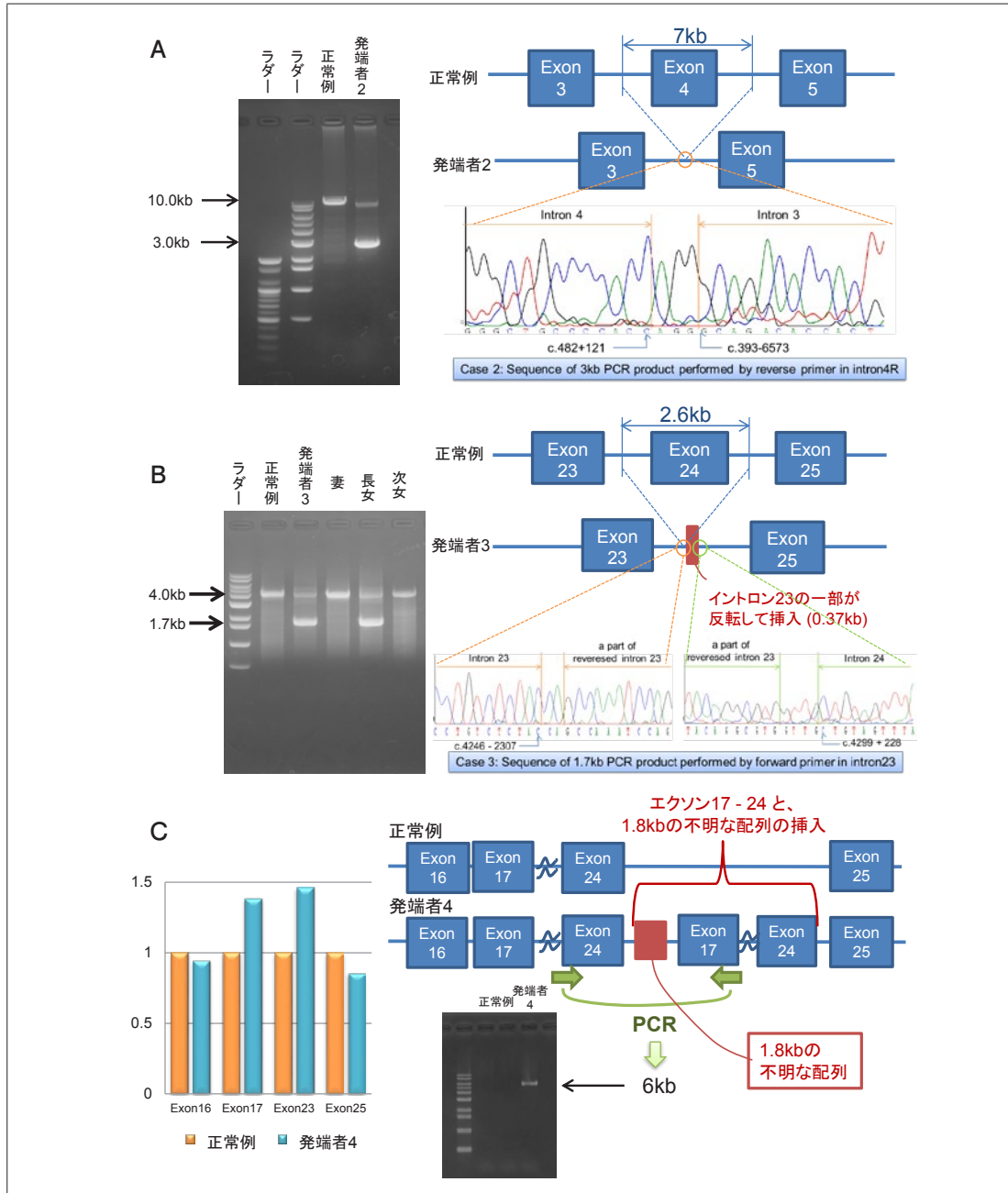


図4 Long-range PCRの電気泳動と quantitative PCRの結果

- A: エクソン3のフォワードプライマーとエクソン5のリバースプライマーによるPCR産物の電気泳動の結果。コントロールでは10kbのPCR産物のみ生成されているが、発端者2では10kbと3kbのPCR産物が生成されている。
- B: エクソン23のフォワードプライマーとエクソン25のリバースプライマーによるPCR産物の電気泳動の結果。コントロールおよび発端者3の妻と次女では4kbのPCR産物のみ生成されているが、発端者3と長女では1.7kbと4kbのPCR産物が生成されている。
- C: コントロール(オレンジ)と発端者4(青)の quantitative PCR法の結果を表した棒グラフ(左)。エクソン17とエクソン23の結果は発端者においてコントロールの1.5倍である。イントロン23のフォワードプライマーとイントロン17のリバースプライマーによるPCR産物の電気泳動の結果(右)。コントロールではPCR産物は生成されないが、発端者4では6kbのPCR産物が生成されている。

表 1 SCN5Aのコピー数多型を有する4人の発端者の臨床像

No.	性	診断年齢(歳)	症状	発症年齢(歳)	家族歴	HR (bpm)	PQ (ms)	QRS (ms)	QTc (ms)	J波	安静時心電図	併存症	SCN5Aのコピー数多型
1	男	15	失神 心肺停止 心室細動	15	房室ブロック	60	320	120	400	-	Type1	洞不全症候群 房室ブロック	全エクソン欠失
2	男	32	失神 心室頻拍	25	なし	60	260	120	400	-	Type1	房室ブロック	エクソン4欠失
3	男	42	心肺停止 心室細動	16	突然死	60	210	110	410	-	Type1	房室ブロック	エクソン24欠失
4	女	9	無症状	-	Brugada症候群 突然死	72	200	120	416	-	Type1	房室ブロック	エクソン17-24重複

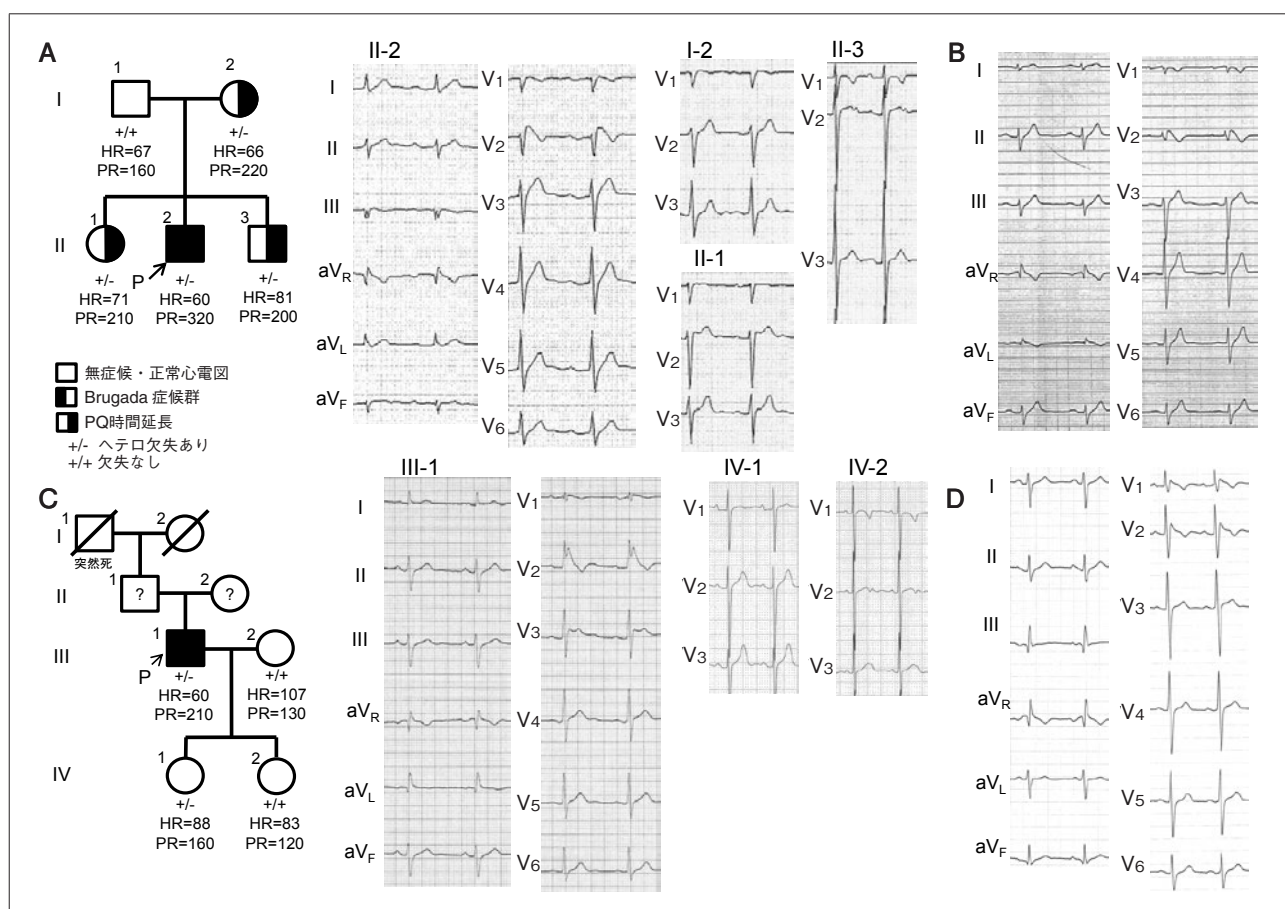


図 5 家系図と心電図

A: 発端者1, B: 発端者2, C: 発端者3, D: 発端者4.

表2 SCN5Aのコピー数多型を有する発端者とTまたはM<sub>active</sub>変異を有する発端者の臨床像の比較

	コピー数多型 (n = 4)	T or M <sub>inactive</sub> (n = 10)	p値
男性, n (%)	3(75)	9(90)	
診断年齢 - 歳	23 ± 14	45 ± 6	0.05
症状, n (%)	3(75)	8(80)	1
発症年齢 - 歳	19 ± 6	39 ± 19	0.066
失神, n (%)	3(75)	6(60)	1
心室細動・心肺停止, n (%)	3(75)	5(50)	1
家族歴, n (%)	3(75)	8(80)	1
Brugada症候群, n (%)	1(25)	1(10)	0.505
突然死・致死性不整脈, n (%)	2(50)	4(40)	1
失神, n (%)	0(0)	1(10)	1
不整脈, n (%)	1(25)	5(50)	0.58
洞不全症候群, n (%)	0(0)	4(40)	0.251
房室ブロック, n (%)	1(25)	0(0)	0.286
ペースメーカー植込み, n (%)	0(0)	5(50)	0.221
心房細動, n (%)	0(0)	0(0)	-
安静時心電図			
HR - ms	63 ± 6	66 ± 5	0.568
PQ - ms	248 ± 55	217 ± 27	0.277
QRS - ms	118 ± 5	118 ± 9	0.754
QT - ms	398 ± 13	395 ± 21	0.801
QTc - ms	407 ± 8	412 ± 18	0.601
JT - ms	280 ± 16	277 ± 21	0.776
JTc - ms	286 ± 9	290 ± 18	0.772
J波, n (%)	0(0)	2(20)	1
BrS type1, n (%)	4(100)	8(80)	1
併存症			
心房細動, n (%)	0(0)	3(30)	0.497
洞不全症候群, n (%)	1(25)	5(50)	0.559
房室ブロック, n (%)	4(100)	9(90)	1
I群薬負荷試験			
陽性, n (%)	3	2	
陽性, n (%)	2(67)	2(100)	1
EPSによる心室細動誘発試験			
陽性, n (%)	2	5	
陽性, n (%)	0(0)	3(60)	0.429
加算平均心電図			
陽性, n (%)	2	3	
陽性, n (%)	2(100)	2(67)	1



表3 A群とB群の臨床像の比較

	A群 (n=14)	Group 群 (n=116)	p値
男性, n (%)	12(86)	106(91)	0.618
診断年齢 - 歳	39 ± 19	45 ± 15	0.185
症状, n (%)	11(79)	90(78)	0.735
発症年齢 - 歳	34 ± 19	40 ± 18	0.251
失神, n (%)	9(64)	59(51)	0.231
心室細動・心肺停止, n (%)	8(57)	25(22)	0.004
家族歴, n (%)	11(79)	65(56)	0.148
Brugada症候群, n (%)	2(14)	4(3)	0.135
突然死・致死性不整脈, n (%)	6(43)	47(41)	0.971
失神, n (%)	1(7)	8(7)	1
不整脈, n (%)	6(43)	14(12)	0.01
洞不全症候群, n (%)	4(29)	1(1)	< 0.001
房室ブロック, n (%)	1(7)	3(3)	0.382
ペースメーカー植込み, n (%)	5(36)	6(5)	0.003
心房細動, n (%)	0(0)	0(0)	
安静時心電図			
HR - ms	65 ± 5	65 ± 13	0.427
PQ - ms	226 ± 38	179 ± 24	< 0.001
QRS - ms	118 ± 8	107 ± 20	0.003
QT - ms	395 ± 18	387 ± 33	0.149
QTc - ms	410 ± 15	399 ± 30	0.037
JT - ms	278 ± 19	280 ± 32	0.821
JTc - ms	288 ± 16	289 ± 30	0.889
J波, n (%)	2(14)	32(28)	0.354
BrS type1, n (%)	12(86)	45(39)	0.001
併存症			
心房細動, n (%)	3(21)	16(14)	0.422
洞不全症候群, n (%)	6(43)	6(5)	< 0.001
房室ブロック, n (%)	13(93)	31(27)	< 0.001
I群薬負荷試験	5	84	
陽性, n (%)	4(80)	81(96)	0.21
EPSによる心室細動誘発試験	7	71	
陽性, n (%)	3(43)	47(66)	0.243
加算平均心電図	5	68	
陽性, n (%)	4(80)	45(66)	1

なった。ただし、short-read法のNGSデータを用いて、CNVを含むDNAの構造多型を検出する際は、リファレンスゲノムにマッピングしたリードのdepthやpositionにより間接的に推定することが多いため、検出感度は十分とはいえない<sup>15)</sup>。最近では、short-read法とlong-read法を併用した構造多型の検出も試みられている<sup>16)</sup>。われわれの研究室では、long-read法の一つであるナノポアシーケンサーを用いて構造多型の解析を進めている。構造多型がヒトゲノムに与える影響は一塩基多型の3倍、20kb以上の構造多型は一塩基多型の50倍と報告されており<sup>17)</sup>、構造多型の同定により、遺伝性不整脈疾患の新たな遺伝的背景が解明できると期待できる。

#### 付記

本稿は、第23回日本不整脈心電学会学術奨励賞優秀賞を受賞した論文をもとに、総説としてまとめたものである。なお、図表については、受賞論文より一部改変し、転載させていただいた。

#### 受賞論文

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*, 2018 ; 5 : 1179-1188

#### 〔文 献〕

- 1) Brugada P, Brugada J : Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death : a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*, 1992 ; 20 : 1391-1396
- 2) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. : Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 1998 ; 392 : 293-296
- 3) Crotti L, Marcou CA, Tester DJ, et al. : Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing : implications for genetic testing. *J Am Coll Cardiol*, 2012 ; 60 : 1410-1418
- 4) Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, et al. : An international compendium of mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*, 2010 ; 7 : 33-46
- 5) Le Scouarnec S, Karakachoff M, Gourraud JB, et al. : Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome. *Hum Mol Genet*, 2015 ; 24 : 2757-2763
- 6) Bhuiyan ZA, van den Berg MP, van Tintelen JP, et al. : Expanding spectrum of human RYR2-related disease : new electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation*, 2007 ; 116 : 1569-1576
- 7) Barc J, Briec F, Schmitt S, et al. : Screening for copy number variation in genes associated with the long QT syndrome : clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*, 2011 ; 57 : 40-47
- 8) Sonoda K, Ohno S, Otuki S, et al. : 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
- 9) Eastaugh LJ, James PA, Phelan DG, et al. : Brugada syndrome caused by a large deletion in *SCN5A* only detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011 ; 22 : 1073-1076
- 10) Mademont-Soler I, Pinsach-Abuin ML, Riuro H, et al. : Large Genomic Imbalances in Brugada Syndrome. *PLoS One*, 2016 ; 11 : e0163514
- 11) Sonoda K, Ohno S, Ozawa J, et al. : Copy number variations of *SCN5A* in Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 2018 ; 15 : 1179-1188
- 12) Garcia-Molina E, Lacunza J, Ruiz-Espejo F, et al. : A study of the *SCN5A* gene in a cohort of 76 patients with Brugada syndrome. *Clin Genet*, 2013 ; 83 : 530-538
- 13) Koopmann TT, Beekman L, Alders M, et al. : Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in *SCN5A* in a Dutch Brugada syndrome cohort. *Heart Rhythm*, 2007 ; 4 : 752-755
- 14) Schroeter A, Walzik S, Blechschmidt S, et al. : Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na (v)1.5. *J Mol Cell Cardiol*, 2010 ; 49 : 16-24

- 15) Tattini L, D'Aurizio R, Magi A : Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015 ; 3 : 92
- 16) Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, et al. : Multiplatform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nat Commun* , 2019 ; 10 : 1784
- 17) Chiang C, Scott AJ, Davis JR, et al. : The impact of structural variation on human gene expression. *Nat Genet*, 2017 ; 49 : 692-699

## Copy Number Variations of *SCN5A* in Brugada Syndrome

Keiko Sonoda<sup>1</sup>, Seiko Ohno<sup>1,2</sup>, Minoru Horie<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience and Genetics, National Cerebral and Cardiovascular Center

<sup>2</sup>Center for Epidemiologic Research in Asia, Shiga University of Medical Science

**BACKGROUND** : Loss-of-function mutations in *SCN5A* are present in ~20% of Brugada syndrome (BrS) patients. Copy number variations (CNVs) have been shown to be associated with several inherited arrhythmia syndromes. **OBJECTIVE** : The purpose of this study was to investigate *SCN5A* CNVs among BrS probands. **METHODS** : The study cohort consisted of 151 BrS probands who were symptomatic or had a family history of BrS, sudden death, syncope, or arrhythmic diseases. We performed sequence analysis of *SCN5A* by the Sanger method. To detect CNVs in *SCN5A*, we performed multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of the 151 BrS probands. **RESULTS** : We identified pathogenic *SCN5A* mutations in 20 probands by the Sanger method. In 140 probands in whom multiplex ligation-dependent probe amplification was successfully performed, 4 probands were found to present different CNVs (deletion in 3 and duplication in 1) . Three of them had fatal arrhythmia events ; the remaining 1 was asymptomatic but had a family history. Mean age at diagnosis was  $23 \pm 14$  years. All of the baseline 12-lead electrocardiograms showed PQ-interval prolongation. The characteristics of these 4 probands with CNVs were similar to those of the probands with mutations leading to premature truncation of the protein or missense mutations causing peak  $I_{Na}$  reduction  $> 90\%$ . **CONCLUSION** : We identified *SCN5A* CNVs in 2.9% of BrS probands who were symptomatic or had a family history.

**Keywords** : Brugada syndrome, *SCN5A*, Copy number variation