

G790del mutation in DSC2 alone is
insufficient to develop the pathogenesis of
ARVC in a mouse model

(マウスモデルにおいて、DSC2 G790del 変異
のみでは ARVC を発症するには不十分である)

氏名 濱田 頼臣

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻

令和元年 12月

目 次

1.	要約	・ ・ ・ ・ 1
2.	序章	・ ・ ・ ・ 1
3.	方法	・ ・ ・ ・ 2
4.	結果	・ ・ ・ ・ 5
5.	考察	・ ・ ・ 1 3
6.	まとめ	・ ・ ・ 1 5
7.	謝辞	・ ・ ・ 1 5
8.	参考文献	・ ・ ・ 1 5

1. 要約

【背景】不整脈誘発性右室心筋症(ARVC)は、心不全または心臓突然死を引き起こす遺伝性心疾患である。いくつかのデスモゾーム遺伝子(DSC2, PKG, PKP2, DSP, RYR2)は、ARVCに関与する原因遺伝子と考えられている。それらのうち、DSC2 変異は ARVC 遺伝子異常の 2%を占めている。

【目的】マウスモデルの不整脈誘発メカニズムと心機能に対する DSC2 の G790del 変異の影響を明らかにすることである。

【方法】CPISPR/Cas9 ゲノム編集技術を使用して、G790delDSC2KI マウスを生成した。WT マウスとヘテロ接合(+/G790del)マウス、ホモ接合(G790del/G790del)マウスを使用し、心臓の形態および、不整脈の有無を観察し比較した。また、デスモゾーム蛋白の発現量と局在性をウエスタンブロットおよび免疫染色で比較した。また、細胞内 Ca²⁺動態も比較した。

【結果】ヘテロ接合(+/G790del)マウス、ホモ接合(G790del/G790del)マウス共に、右心室(RV)の構造異常や致死性不整脈の機能的異常を認めなかった。ホモ接合マウスは6ヶ月齢でわずかに左心室機能障害を示した。ウエスタンブロットおよび免疫染色を行なったが、デスモゾーム蛋白の量と局在性に明らかな違いはなかった。ホモ接合マウスから単離された心筋細胞の細胞内 Ca²⁺トランジェントの延長に伴い、細胞短縮は減少し、イソプロテレノールに反応して自発的な Ca²⁺トランジェントが頻繁に観察された。

【結語】DSC2 の G790del 変異は ARVC の病因とは関係がなかったが、LV でわずかな収縮機能障害と Ca²⁺調節不全を示した。

2. 序章

不整脈誘発性右室心筋症 (ARVC) は、心筋細胞の損失と線維脂肪組織の置換を特徴とする遺伝性心疾患である。¹ 現在までに、DSC2、DSG2、PKG、PKP2、DSP および RyR2

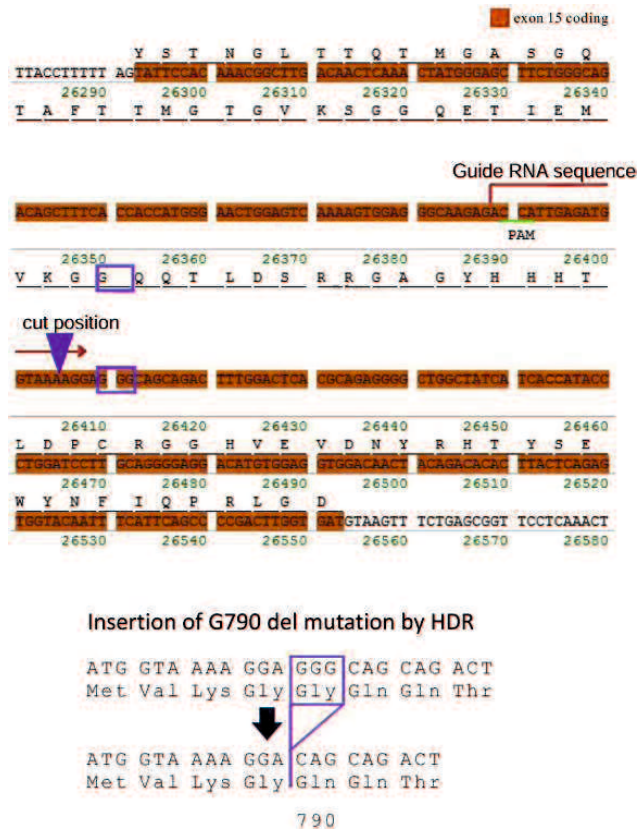
を含むいくつかの遺伝子が ARVC を引き起こすことがすでに知られている。² これらのタンパク質のうち、Desmocollin-2 (DSC2) の欠損が家族性不整脈誘発性右室心筋症 11 (ARVC11) の原因であることが報告されている。³ DSC2 および DSG2 は、PKG および PKP2 への結合において機能が重複していることが知られているデスモソームカドヘリンの心臓アイソフォームである。両方のタンパク質のいくつかのヘテロ接合変異は、ARVC を引き起こすことが報告されている。G790del は、ARVC 患者における DSC2 の既知の突然変異の 1 つである。^{4,5} 一部の研究者は、ARVC11 の発生における G790del の役割を強調したが、これはさらに解明されていないままである。DSC2 ノックインマウスモデル (KI) の心臓の構造と機能に対する G790del 変異の病原性効果を調査した。

3. 方法

3.1 動物モデル

Transgenic Inc (福岡、日本) によって生成された CRISPR / Cas9 ゲノム編集技術を使用して、C57BL6 ベースの G790del DSC2 KI マウスを取得した。補足図 1 は、マウス生成の詳細な方法を示している。

この研究は、NIH が発行した実験動物の管理と使用に関するガイド (NIH Publications No. 8023、改訂 1978) に準拠している。動物の世話および使用されたプロトコルは、山口大学医学部の動物倫理委員会によって確立されたガイドラインに従った。



補足図.1 Desmocollin-2 の Gly790del 変異マウスの設計

C57BL6 マウスの Desmocollin-2 の exon 15 に存在する G790 欠損は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を使用して作成した。27 匹の F0 マウスを直接シーケンスで分析し、14 匹のマウスが G790 欠損マウスであることがわかった。それらの 3 つは F1 マウスを取得するために使用された。

3. 2 組織学的分析

44~48 週齢の WT、ヘテロ接合+/G790del マウス、およびホモ接合 G790del/G790del マウスの心臓を収集し、10%ホルマリンを使用して固定した。形態分析のために、左心室乳頭筋のレベルの完全な全周断面を選択した。心室の各セクションは、ヘマトキシリン-エオシンとアザンで染色した。

3. 3 超音波検査

7.5 MHz プローブ (UST-5413) を装備した F37 超音波装置 (Hitachi Medical、オランダ) を使用して、心機能を分析した。WT および KI マウスは、最初に 4~5% イソフルラン (酸素と混合) で麻酔し、心エコー検査中に 1~2% イソフルランで維持した。

3. 4 体表面心電図 (ECG)

ECG は、ECG テレメトリーを使用して、覚醒状態の 24 週齢の WT および KI マウスでモニターされた。II 誘導を検出する皮下電極付きの送信機 (Data Sciences International, St.Paul, MN) を背部に埋め込んだ。ECG を最初に 24 時間モニターし、続いてマウス用のトレッドミル (Panlab, Barcelona, Spain) を使用して運動テストを実施した。最後に、アドレナリン作動薬とカフェインを使用した薬物負荷試験を実施した。エピネフリン (2 mg / kg 腹腔内投与) およびカフェイン (120 mg / kg 腹腔内投与) の注射後に ECG を記録し、30 分間モニターした。上記の記録は、WT (n = 10)、KI ヘテロ接合マウス (n = 9)、および KI ホモ接合マウス (n = 8) のサブセットで実行した。

3. 5 抗体

この研究では以下の抗体を使用した。

DSC2(anti DSC2 494-507 custom-made), DSG2(Progen), PKG(SCB), PKP2(Progen), DSP(Santa Cruz), Cx43(Sigma-Aldrich), Caspase-3 p17(SCB), TGF- β (SCB), collagen 6(Southern Biotech), GAPDH(sigma-Aldrich)

3. 6 ウェスタンブロット

WT および KI マウスの心臓の膜分画を、Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit(Thermo Fisher)を使用して抽出した。組織膜分画サンプルは、SDS-PAGE 用サンプルバッファーで変性した。SDS-PAGE、ブロッティング、および抗体検出は、以前の研究で報告した方法で実行した。⁶

3. 7 デスモゾーム蛋白の免疫組織化学分析

心臓を 4%パラホルムアルデヒドにて室温で一晩固定した。その後、心臓をパラフィンに包埋し、5 μ m 厚の切片にスライスした。HE 染色およびアザン染色を行った。HE および Azan 染色標本の分析には、BZ-9000 顕微鏡(Keyence, Tokyo, Japan)を使用した。キシレンとエタノールを使用してスライスを脱パラフィンし、1%ウシ血清アルブミンおよび 0.5%Triton X-100 の一次抗体で一晩染色した。PBS で洗浄した後、スライドを室温で 4 時間、二次抗体で染色した。LSM5 Exciter (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) を共焦点分析に使用し、すべての画像を Zen software (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) で処理した。

3. 8 統計学的分析

3 群以上の統計的比較のために、一元配置分散分析と事後ダネット検定を実施した。すべてのデータは平均 \pm SEM として表した。P<0.05 を統計的に有意であるとした。3 つ以上のグループの発生率を比較するために、カイ 2 乗検定とライアンの方法を採用した。

4. 結果

4. 1 DSC2 G790del KI マウスの形態学的特徴

KI マウスで ARVC の特徴である右室自由壁の繊維化と脂肪浸潤は認めず、WT マウスと KI マウスの間で右室の有意な構造の違いは観察されなかった。(図 1A) 対照的に、6 ヶ月齢のホモ接合マウスでは左室径が大きくなり、収縮力も低下した。(図 1A-C)

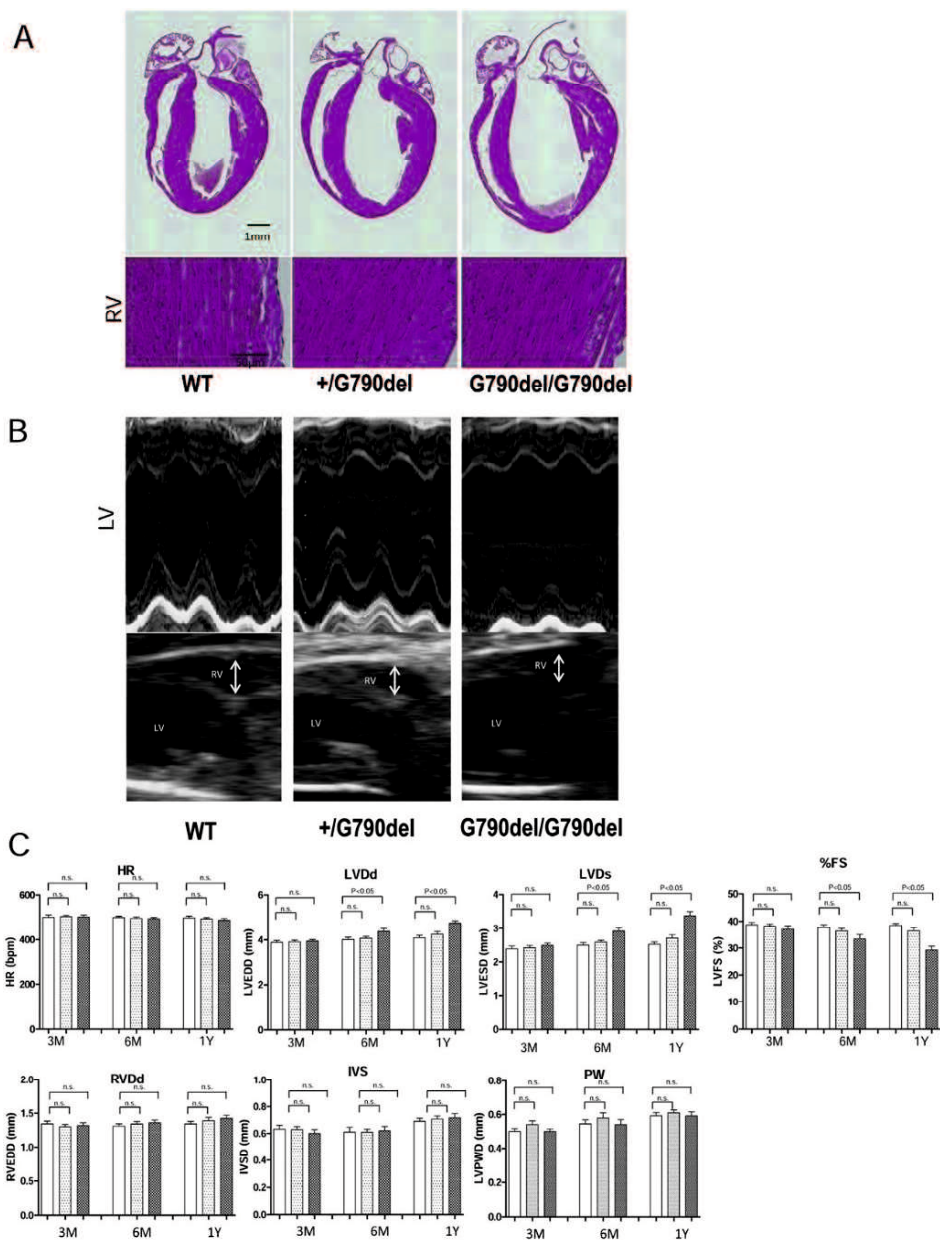


図.1 WT および Gly790del DSC2 ノックイン (KI) マウスの心臓の構造特性。

A. 1 歳の WT マウスおよび KI マウスの心臓の HE 染色された長軸切片の代表的な画像、および Azan 染色した右室壁。ホモ接合 KI マウスでも右心室の拡張、線維化、脂肪浸潤は観察されなかった。

B, C.

WT および KI マウスの心エコー図の代表的な画像と要約された心エコーパラメータ。ホモ接合 KI マウスでのみ、6 か月齢後に LV 拡張および%短縮率 (FS) の減少が観察された。データは、9–12 匹のマウスの平均値±SEM を表している。

4. 2 G790del マウスの心電図

図 2A および B は、生後 6 ヶ月のマウスの ECG を示している。静止状態では、ホモ接合型 G790del / G790del マウスでは QT 間隔のみがわずかに延長された。QT 間隔を除くすべてのパラメーターは、WT マウスと KI マウスの中に有意差は認めなかった。図 2C は、24 時間モニタリング中の代表的な ECG 記録と薬物負荷試験の記録を示している。要約されたデータを図 2D に示す。ヘテロ接合+/ G790del マウスは、24 時間の記録、運動試験、または薬物負荷試験で不整脈を示さなかった。ホモ接合型 G790del / G790del マウスは不整脈を示す傾向があったが、WT マウスと KI マウスの中で不整脈の発生に大きな差はなかった。

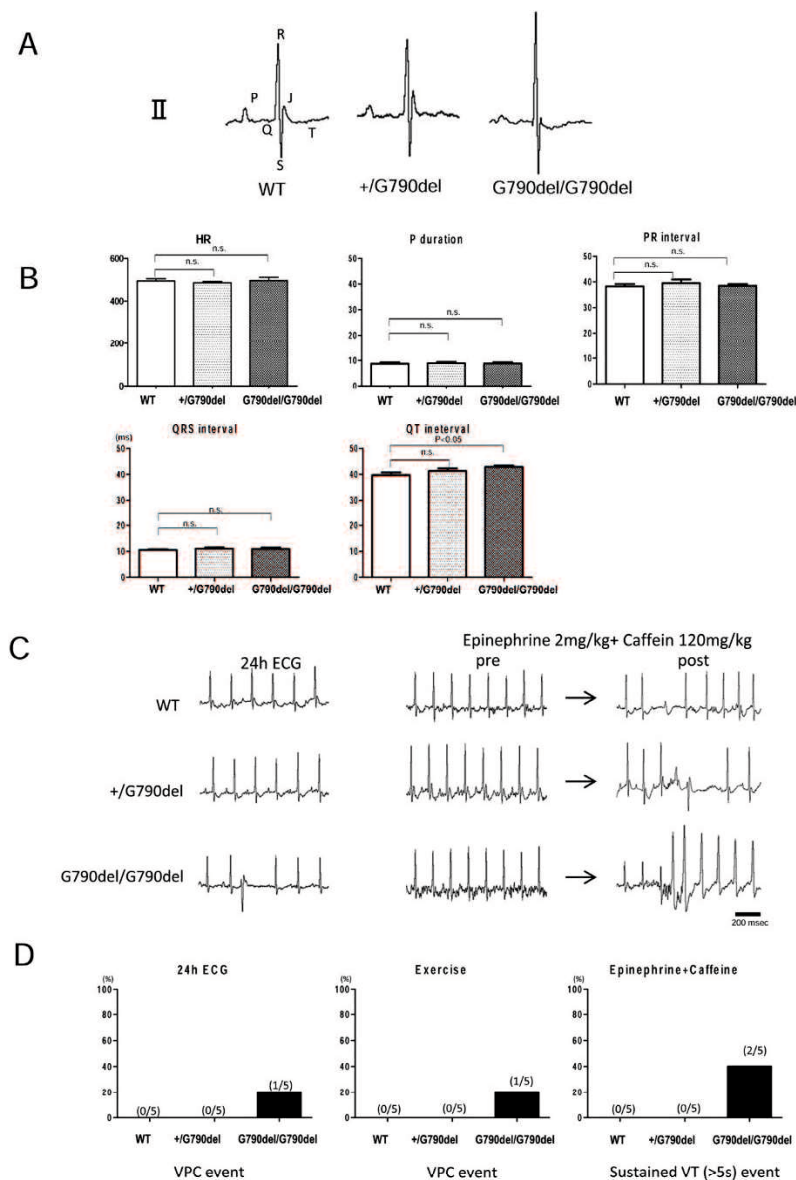


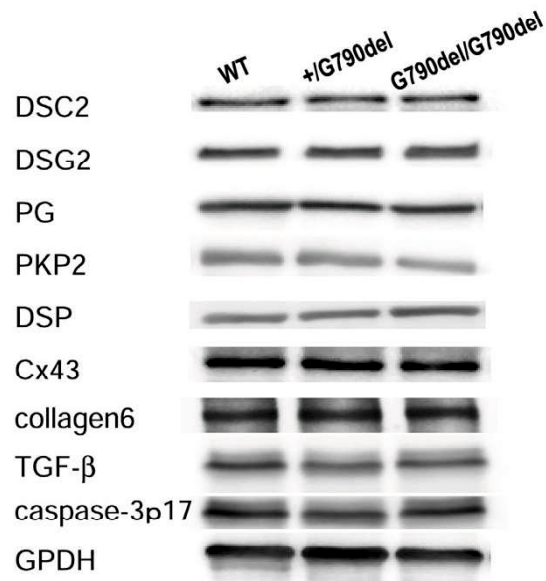
図.2 WTおよび Gly790del DSC2 KI マウスの心電図

A、B。ベースラインでの WT および KI マウスの心電図 (ECG) の代表的な記録。 ECG は、デジタル収集および分析システム (Power Lab / 4SP) を使用して記録および分析を行った。 データは、8~10 匹のマウスの平均値±SEM を表す。 C。(左) 24 時間の心電図記録。 心室性不整脈は、WT マウスと KI マウスの両方でめったに見られなかった。(右) エピネフリン (2 mg / kg 体重) およびカフェイン (120 mg / kg 体重) (Epi / Caff) の腹腔内注射後の心室性頻脈 (VT) の発生率。 D.不整脈イベントの要約データ。 ホモ接合 G790del / G790del マウスのみが不整脈を示したが、頻繁ではなかった。

4. 3 G790del KI マウスにおけるデスモゾーム蛋白の発現

心臓の膜画分におけるデスモソームタンパク質のウエスタンブロット分析を、生後 6 ヶ月の WT、+/G790del、および G790del/G790del マウスで実施した。結果は、グループ間で DSC2、DSG2、PKG、PKP2、DSP、および CX43 に大きな違いがないことが明らかになった (図 3A)。免疫蛍光染色では、グループ間でデスモソームタンパク質の量と構造に顕著な差がないことも実証された (図 3B)。

A



B

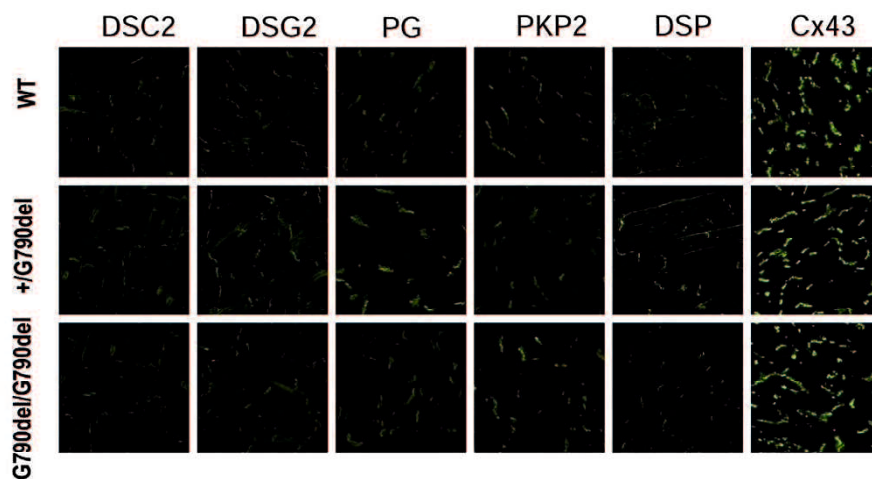


図.3 デスモソームタンパク質の免疫蛍光分析と発現レベル

A. 生後6ヶ月のWTおよびKIマウスの心臓膜分画における desmocollin-2 (DSC2)、desmoglein-2 (DSG2)、plakoglobin (PG)、plakophilin-2 (PKP2)、desmoplakin (DSP)、connexin-43 (CX43)、collagen 6、TGF- β 、caspase 3 p17 のウエスタンブロット解析。蛋白量に大きな違いはなかった。

B. WTおよびKIマウスの心臓における DSC2、DSG2、PKG、PKP2、DSP、および CX43 の免疫蛍光分析。タンパク質の局在に違いはなかった。

4. 4 マウス心筋細胞におけるサルコメア短縮と Ca²⁺トランジェント

WT、ヘテロ接合+/G790del、およびホモ接合 G790del/G790del マウスで心筋細胞短縮率を測定した。ホモ接合型 G790del/G790del マウスでは、わずかな細胞の短縮率減少と弛緩時間の延長を認めた (図 4A)。細胞内 Ca²⁺トランジェントのピークもわずかに減少し、ホモ接合性 G790del/G790del マウスでは Ca²⁺トランジェントがゆっくりと低下した (図 4A)。イソプロテレノール存在下で、カフェイン投与により測定された筋小胞体の Ca²⁺含有量は、ホモ接合マウスでわずかに減少していた (図 4B)。ホモ接合 G790del/G790del マウスでは、自然発生的な Ca²⁺トランジェントの頻度が増加した (図 4C)。

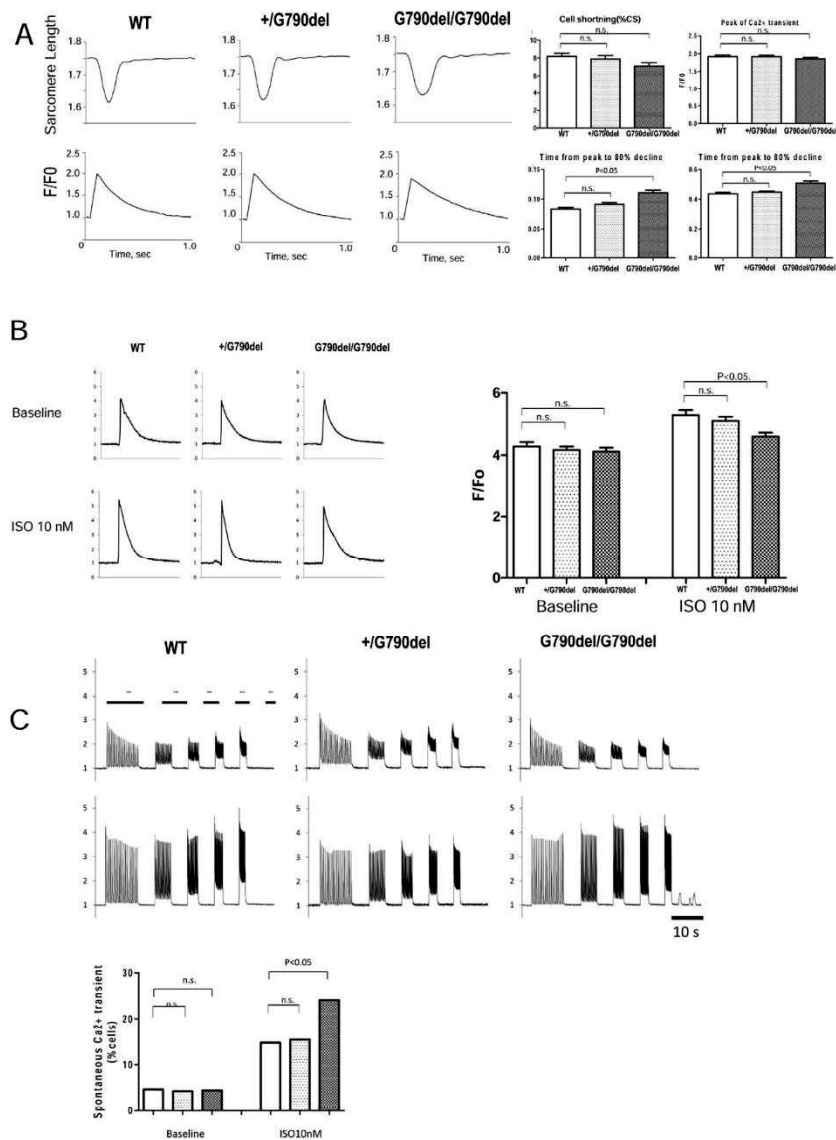


図.4 細胞短縮と Ca²⁺動態

A. 6 か月齢のマウスから分離された WT および KI 細胞での電気刺激中のサルコメア短縮とカルシウムトランジェントの代表的な記録。データは、それぞれ 3 匹のマウスからの 24–33 細胞の平均値±SD を表す。

B. 10 nM イソプロテレノール存在下、非存在下における、カフェイン投与によって測定された SR 内のカルシウム含量。データは、それぞれ 3 匹のマウスからの 12~20 個の細胞の平均値±SEM を表す。

C. 単離した心筋細胞の持続ペーシング下の自発的な Ca²⁺ トランジェントの代表的な記録。ホモ接合 KI マウスでは、自然発生的な Ca²⁺ トランジェントが観察された。誘発された Ca²⁺ トランジェントの発生を、棒グラフに示す。データは、それぞれ 3~4 匹のマウスからの 188~246 個の細胞の平均値±SD を表す。

5. 考察

この研究の主な発見は、DSC2 内の AA790 の単一アミノ酸の欠失は ARVC の発生に関与していないということ。そして、ホモ接合 G790del/G790del マウスでは異常な Ca²⁺放出を伴うわずかな LV 機能障害が観察されたということである。

ここでは、2 つの重要な質問に焦点を当てたい。

(1) DSC2 の G790del 変異は ARVC の原因なのか？

(2) DSC2 の G790del 変異の心臓への影響は何であるか？

DSC2 は、ARVC の発生における原因タンパク質であることが知られている。ARVC 患者の 1~2% で、DSC2 変異が ARVD/C の病原性の原因として観察されていることが報告されている。² Heuser らは、ARVD/C 患者の DSC2 遺伝子のイントロン 5 (c.631-2A→G) のヘテロ接合性スプライス受容部位変異の発生を報告した。³ 彼らは、この突然変異がゼブラフィッシュモデルでそれを再現することにより、この突然変異が ARVC を引き起こすというさらなる証拠を提供した。Liu らは、中国の ARVC ファミリーにおける DSC2 のヘテロ接合 V364 M 変異の検出を報告した。⁷ 対照的に、最近 Kapplinger らは ARVC コホートにおける DSC2 突然変異の有病率は対照コホートの有病率と類似していることを指摘した。⁸ 興味深いことに、Bhuiyan らは DSG2 または DSC2 の突然変異は、Dutch task force criteria (TFC) + ARVD/C 患者の PKP2 突然変異 (40%) よりも少ない (10%) ことを発見した。⁹ 総称して、DSC2 の突然変異のいくつかは ARVD/C の原因因子であるかもしれないが、単一の DSC2 突然変異は本格的な ARVD/C 表現型をもたらす可能性が低いことが示唆されている。

では、DSC2 の G790del はなにを意味するのか。

興味深いことに、ホモ接合体 G790del/G790del マウスは、異常な細胞内 Ca²⁺放出を伴うわずかな LV 機能障害を示した。Fressart らは 135 人の ARVD / C 患者を分析し、41 の疾患を引き起こす変異を特定した。¹⁰ このレポートでは、3 つの DSC2 ヘテロ接合変異、

Glu114Gly fsX7、R132C、および G790del が、疾患を引き起こす変異として示された。

G790del の臨床的意義を理解するために、G790 が動物間でどれだけ保存されているか調査した。G790 は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、サルで保存されていたが、ウサギとウマには Gly790 がなかった (補足図 2)。

Human	781	qetiemvkgghqtsescrga
Monkey	781	qetiemvkgghqtlescrga
Horse	781	rqenielvkg_hqtleldrgd
Pig	781	etlemvkgghqtlescqgag
Rabbit	781	gqetiemvkg_qqtldsyrga
Rat	781	qetiemvkggqrtldsrrat
Mouse	781	qetiemvkggqqtldsrrga

補足図.2 様々な動物の Desmocollin-2 アミノ酸配列の解析

マウス、ラット、ブタ、サル、およびヒトには Gly790 があるが、ウサギとウマには Gly790 がない

<http://exac.broadinstitute.org/variant/18-28648997-GTCC-G> によると、東アジアの人口の 1.8%がこの突然変異を抱えている。このレポートのパーセンテージが正確であれば、G790del は良性の SNIP である可能性がある。この研究では、ヘテロ接合+/G790del マウスは実際に LV および RV 機能に有意な効果を示さなかったが、ホモ接合 G790del/G790del マウスは異常な Ca²⁺ 放出を伴う軽度の LV 機能障害を示したことが観察された。さらに、ホモ接合性の突然変異のみが ARVC 表現型を示した DSC2 突然変異について 2 つの研究が報告している。Lorenzon らは、評価された 94 の不整脈性心筋症 (ACM) 患者の 5.3%で D179G 変異の検出を報告した。¹¹ 彼らの報告によると、ホモ接合性の D197G 変異のみが表現型を示した。Gerull らもまた、DSC2 のホモ接合型 Q554X 変異は ACM の原因因子であると報告した。¹² ただし、ARVD/C 患者で報告されている G790del 変異はヘテロ接

合体である。私たちの研究によると、DSC2 の G790del だけでは、マウスで ARVC を発生するには不十分である。ただし、G790del の変異は、人間においては異なる影響を与える可能性が残っている。また、ARVD/C の発症には未知の 2 番目の遺伝子異常が必要である可能性もある。

6. まとめ

G790del の DSC2 KI マウスの確立に成功した。ヘテロ接合+/G790del およびホモ接合 G790del / G790del マウスはいずれも ARVC の兆候を示さなかったが、ホモ接合 G790del / G790del マウスは異常な Ca²⁺ 放出を伴う軽度の LV 機能障害を示した。したがって、我々の研究は、DSC2 の G790del 変異だけでは、ノックインマウスモデルで ARVC の原因としては不十分であることを示した。

7. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご助言いただいた器官病態内科学 矢野雅文教授に感謝申し上げます。また、山本 健教授には、指導教官として、終始ご指導いただき、深謝の意を表します。本研究では、器官病態内科学の多くの先生方にデータ収集から解析まで、ご協力いただきました。ここに改めて感謝の意を表します。

8. 参考文献

1. D. Corrado, T. Wichter, M.S. Link, R.N.W. Hauer, F.E. Marchlinski, A. Anastakis,

- B. Bauce, C. Basso, C. Brunckhorst, A. Tsatsopoulou, H. Tandri, M. Paul, C. Schmied, A. Pelliccia, F. Duru, N. Protonotarios, N.M. Estes, W.J. McKenna, G. Thiene, F.I. Marcus, H. Calkins, Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an international task force consensus statement, *Circulation* (2015), <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017944>.
2. E. McNally, H. MacLeod, L. Dellefave-Castillo, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, in: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, Genetic Counseling (Eds.), in: N. Ledbetter (Ed.), GeneReviews® [Internet], University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993-2019 initial Posting: April 18, 2005; Last Update: May 25, 2017.
 3. A. Heuser, E.R. Plovie, P.T. Ellinor, K.S. Grossmann, J.T. Shin, T. Wichter, C.T. Basson, B.B. Lerman, S. Sasse-Klaassen, L. Thierfelder, C.A. MacRae, B. Gerull, Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 1081–1088, <https://doi.org/10.1086/509044>.
 4. D. Ng, J.J. Johnston, J.K. Teer, L.N. Singh, L.C. Peller, J.S. Wynter, K.L. Lewis, D.N. Cooper, P.D. Stenson, J.C. Mullikin, L.G. Biesecker, Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort, *Circ. Cardiovasc. Genet.* (2013), <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000039>.
 5. J. Fedida, V. Fressart, P. Charron, E. Surget, T. Hery, P. Richard, E. Donal, B. Keren, G. Duthoit, F. Hidden-Lucet, E. Villard, E. Gandjbakhch, Contribution of exome sequencing for genetic diagnostic in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia, *PLoS One* (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181840>.

6. Y. Nakamura, T. Yamamoto, S. Kobayashi, M. Tamitani, Y. Hamada, G. Fukui, X. Xu, S. Nishimura, T. Kato, H. Uchinoumi, T. Oda, S. Okuda, M. Yano, Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *JCI Insight* (2019), <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126112>.
7. J.S. Liu, L.L. Fan, J.J. Li, R. Xiang, Whole-Exome sequencing identifies a novel mutation of desmocollin 2 in a Chinese family with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Am. J. Cardiol.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.01.011>.
8. J.D. Kapplinger, A.P. Landstrom, B.A. Salisbury, T.E. Callis, G.D. Pollevick, D.J. Tester, M.G.P.J. Cox, Z. Bhuiyan, H. Bikker, A.C.P. Wiesfeld, R.N.W. Hauer, J.P. Van Tintelen, J.D.H. Jongbloed, H. Calkins, D.P. Judge, A.A.M. Wilde, M.J. Ackerman, Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/ dysplasia-associated mutations from background genetic noise, *J. Am. Coll. Cardiol.* (2011), <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.12.036>.
9. Z.A. Bhuiyan, J.D.H. Jongbloed, J. Van Der Smagt, P.M. Lombardi, A.C.P. Wiesfeld, M. Nelen, M. Schouten, R. Jongbloed, M.G.P.J. Cox, M. Van Wolferen, L.M. Rodriguez, I.C. Van Gelder, H. Bikker, A.J.H. Suurmeijer, M.P. Van Den Berg, M.M.A.M. Mannens, R.N.W. Hauer, A.A.M. Wilde, J.P. Van Tintelen, Desmoglein-2 and Desmocollin-2 mutations in Dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy patients : results from a multicenter study, *Circ. Cardiovasc. Genet.* (2009), <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.839829>.

10. V. Fressart, G. Duthoit, E. Donal, V. Probst, J.C. Deharo, P. Chevalier, D. Klug, O. Dubourg, E. Delacretaz, P. Cosnay, P. Scanu, F. Extramiana, D. Keller, F. Hidden-Lucet, F. Simon, V. Bessirard, N. Roux-Buisson, J.L. Hebert, A. Azarine, D. Casset-Senon, F. Rouzet, Y. Lecarpentier, G. Fontaine, C. Coirault, R. Frank, B. Hainque, P. Charron, Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice, *Europace* (2010), <https://doi.org/10.1093/europace/euq104>.
11. A. Lorenzon, K. Pilichou, I. Rigato, G. Vazza, M. De Bortoli, M. Calore, G. Occhi, E. Carturan, E. Lazzarini, M. Cason, E. Mazzotti, G. Poloni, M.L. Mostacciolo, L. Daliento, G. Thiene, D. Corrado, C. Basso, B. Bauce, A. Rampazzo, Homozygous desmocollin-2 mutations and arrhythmogenic cardiomyopathy, *Am. J. Cardiol.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.07.037>.
12. Baughman RP, B. Gerull, F. Kirchner, J.X. Chong, J. Tagoe, K. Chandrasekharan, O. Strohm, D. Waggoner, C. Ober, H.J. Duff, Homozygous founder mutation in desmocollin-2 (DSC2) causes arrhythmogenic cardiomyopathy in the hutterite population, *Circ. Cardiovasc. Genet.* (2013), <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000097>.
13. Hamada Y, Yamamoto T, Nakamura Y, Sufu-Simizu Y, Nanno T, Fukuda M, Ono M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi T, Yano M, G790del mutation in DSC2 alone is insufficient to develop the pathogenesis of ARVC in a mouse model, *Biochemistry and Biophysics Reports.* (2020)