

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17342

研究課題名（和文）スプライシング変異の転写後配列への影響：ゲノム・トランスクリプトーム統合解析

研究課題名（英文）Effects of splicing variants on post-transcriptional sequence: integrated genome and transcriptome analysis

研究代表者

山田 茉未子（YAMADA, Mamiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60835601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム変異のmRNAのスプライシングに及ぼす影響について網羅的な検討を行い、ゲノム変異がスプライシング異常を惹起すると共に、生成されるトランスクリプトを評価すると従来のエクソーム解析ではサイレント変異あるいはミスセンス変異として認識されていた変異が、ナンセンス変異あるいはフレームシフト変異を起こすことを小児科領域の遺伝性希少疾患の領域においても解明した。実際に、HNRNPK遺伝子、PUF60遺伝子、JMJD1C遺伝子、RNPC3遺伝子の変異をもつ患者においてトランスクリプトーム解析により確定診断に至った。またキメラ遺伝子形成も先天遺伝性疾患の機序としても重要であることを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児遺伝性疾患の原因解明のために遺伝学的検査、特にエクソーム解析が中心的役割を果たしている。しかしその診断率には限界があり、その原因の一つとしてスプライシング異常の影響を考慮した検出ができないことが挙げられる。そこでエクソーム解析とRNA解析を組み合わせた解析手法を、小児遺伝性疾患の患者に適用し、その有用性を既存のデータベースに対して検証し有益性を認識した。その上で、実際の患者さんの解析にも適用し、複数の患者さんで確定診断に至ることができた。本研究により適切な診断による根拠に基づく予後の予測、治療法の導入、適切な検査の実施に貢献できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The effects of genomic variants on mRNA splicing were comprehensively investigated, and it was shown that genomic variants cause splicing abnormalities. Surprisingly, they also showed that transcripts produced by variants recognized as silent or missense variants in conventional exome analysis cause nonsense or frameshift mutations. In actual clinical practice, integrated genomic and transcriptomic analysis confirmed the diagnosis in patients with mutations in the HNRNPK gene, PUF60 gene, JMJD1C gene, and RNPC3 gene. Chimeric gene formation was shown to be one of the important mechanisms of congenital genetic diseases. The utility of RNA analysis in genetic analysis was established.

研究分野：臨床遺伝学

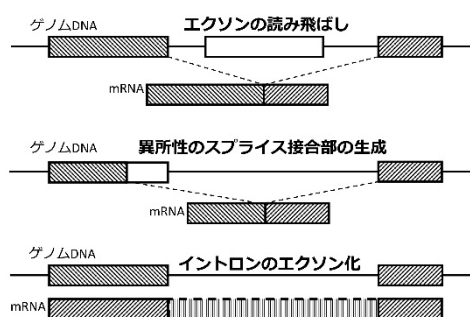
キーワード：スプライシング トランスクリプトーム 統合解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網羅的遺伝子解析技術の展開により、小児疾患においても遺伝子変異に基づく疾患が解明されるようになった。一方で解析技術の主流であるエクソーム解析の診断率は4割未満であり、臨床的に典型的だが変異が同定されない患者も3割程度存在している。従来の解析手法の弱点として、スプライシング異常は、遺伝性疾患の重要な発症機構であるものの、スプライシング異常の検出・評価には十分ではなかった。それを克服する課題として下記の3項目が挙げられる。

(1) ゲノム配列変異が惹起するタンパクアミノ酸配列への影響はコドンの機械的な変換のみによって予測されることが一般的で、生成された mRNA 配列(トランスクリプト)のレベルまでの検討が行われることは稀である。スプライス異常の影響を正確に評価するためには右図に示すように、当該エクソンの読み飛ばし(exon skipping) 異所性のスプライス接合部の生成(creation of alternative splice sites)あるいはイントロンのエクソン化(intron retention)のいずれを来たすのか、そして mRNA 配列のレベルでタンパクの読み枠にどのような影響を与えるか評価すべきである。



(2) イントロン開始部位(5' スプライス部位)および終了部位(3' スプライス部位)はそれぞれ gt、ag というコンセンサス配列として知られ、当該部位に変異があればスプライシング異常を惹起すると判断している。一方で、コンセンサス部位よりイントロン側の変異についてはスプライシング異常が実在するか mRNA 配列のレベルまでの検討が行われることは稀である。

(3) エクソン内のスプライシング調節タンパクの結合部位に関わるゲノム変異も、スプライシング異常を惹起する可能性がある。ゲノム配列上の読み枠の機械的な翻訳では「ミスセンス変異」や「サイレント変異」と予測される変異であっても、実際は 1) に掲げたスプライシング異常を来す可能性があるが、mRNA 配列のレベルまでの検討が行われることは稀である。スプライシング異常による転写後配列を適切に評価した変異解析を医療実装する必要がある。

### 2. 研究の目的

同一個人検体のレベルでゲノム配列粗データ(エクソーム)とトランスクリプトーム配列粗データ(リンパ芽球由来全 mRNA 配列・RNA-Seq)が公開されているコホートについて、新しく開発されたアルゴリズム SAVNet を用いてゲノム・トランスクリプトームを統合的に解析することにより 452 名の個人のレベルのスプライシング異常とスプライシング異常を惹起しているゲノム変異を関連づけて網羅的に検出し、得られた結果を *in vitro* 実験により検証して、更に実際の患者検体の解析を通じて、背景(1)~(3)に示した課題を克服したうえでスプライシング異常の臨床的な重要性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

1000genomes エクソーム粗配列(Fastq フォーマット, [www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org))および Geuvadis RNA シーケンシング粗配列(Fastq フォーマット, [www.geuvadis.org](http://www.geuvadis.org))に対して変異解析および SAVNet 解析を行い、レアバリエント(MAF < 0.03)がどのようなスプライシング異常を惹起しているのか網羅的に評価した。研究プロジェクトはバイオインフォマティクス解析(*in silico* 解析)と臨床検体を用いた臨床的有用性の評価に分かれた。

#### (1) バイオインフォマティクス解析

エクソーム粗配列をソフトウェア BWA により、ヒト正常参照配列にマッピングする。標準的プロトコル(GATK best practice pipeline)により、稀少ゲノム変異(minor allele frequency < 3% 未満)を検出する。

RNA-seq 粗配列をソフトウェア STAR(Dobin et al, 2013)でヒト参照配列にマッピングした。SAVNet 理論に基づいて、1)で検出されたゲノムバリエントを異常な転写産物に関連づけ、false discovery rate 0.01 の水準でスプライス関連バリエント(Splicing associated variant, 以下 SAV)を抽出した。

SAV の存在するエクソン・イントロン境界および隣接するエクソンの関連している正常および異常トランスクリプトの分布とリード数を、sashimi plot 分析により計数した。2018 年に発表された解析プログラム ggsashimi (Garrido-Martinet al, 2018)を使用した。

異常トランスクリプトの塩基配列を *in silico* で再構成し読み枠を分析した。ゲノム情報のみによって予測されるタンパク配列への影響と、トランスクリプト配列レベルまで観察して得られたタンパク配列の影響の異同を明らかにした。なお、表現型が正常なコホート由来の検体を検討していることに考慮し、常染色体劣性疾患の原因遺伝子群を標的とした分析を進めた。

## (2)臨床検体を用いた、臨床的有用性の評価

ゲノム解析の結果、スプライシング異常を引き起こすことが予想される変異を有する患者に対して、エクソーム解析だけでなく RNA 解析も追加して行った。

また、典型的な常染色体劣性遺伝病の症状を呈する患者で、これまでにゲノムのみ解析により疾患原因遺伝子に 1 ヶ所の病的アレルしか確認されていない症例に対して RNA-seq を実施し、ゲノム・トランスクリプトームを統合した再解析を行った。これらの患者は本来複合ヘテロ接合体であって 2 ヶ所の病的アレルを有すると想定されるが、統合解析によりこれまで同定不能であった方の病的アレル(cryptic allele)がスプライシング変異として検出されれば、SAVNet 解析の臨床的有用性が確立できることを目指した解析である。

## 4. 研究成果

既存データベースである 1000 Genome project 由来の英国人・フィンランド人エクソームデータとそのゲノムデータに対応した Geuvadis project からの RNA-seq データを統合的に解析した。ゲノム変異がスプライシング異常を惹起すると共に、生成されるトランスクリプトを評価すると従来のエクソーム解析ではサイレント変異あるいはミスセンス変異として認識されていた変異が、ナンセンス変異あるいはフレームシフト変異を起こすことが解明され、ゲノム解析技術の向上に貢献する結果を得た(Mol Genet Metab Rep. 2019 Oct 23;21:100531)。

本研究の臨床応用として、Oral-Facial-Digital 症候群の 19 番目の原因遺伝子として IFT172 の提唱(Am J Med Genet A. 2019 Dec;179(12):2510-2513)、シュワッハマン・ダイヤモンド症候群における親遺伝子と偽遺伝子の遺伝子転換(Am J Med Genet A. 2020 Jul;182(7):1631-1636)、スプライシング異常が原因であった Au-Kline 症候群の診断(Mol Genet Genomic Med. 2020 Sep;8(9):e1364)、RNA 解析により解明された Verheij syndrome の軽症例の機序(Am J Med Genet A. 2020 Nov;182(11):2709-2714)、学習障害およびてんかんを伴う JMJD1C 遺伝子の同義変異のスプライシング異常による発症の解明(Am J Med Genet A. 2020 Dec;182(12):3064-3067)、重度の低身長症の原因である RNPC3 遺伝子変異の解明(Am J Med Genet A. 2021 Jun;185(6):1836-1840)、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の新規原因遺伝子である LSR の発見(J Pediatr. 2020 Jun;221:251-254)を論文、学術発表(日本小児科学会・日本小児遺伝学会・日本先天異常学会・日本人類遺伝学会・欧州人類遺伝学会・米国人類遺伝学会・米国西海岸小児科学会)にて発表した。更に、ゲノム構造異常によるキメラ遺伝子形成が小児遺伝性疾患の原因遺伝子になっていることを解明(Congenit Anom.2021 May;61(3):76-81)し、学術発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Mamiko, Uehara Tomoko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Fukushima Hiroyuki, Morisada Naoya, Tominaga Kenta, Onoda Motohiro, Kosaki Kenjiro	4. 巻 179
2. 論文標題 IFT172 as the 19th gene causative of oral facial digital syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 2510-2513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.61373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Mamiko, Suzuki Hisato, Shiraishi Yuichi, Kosaki Kenjiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Effectiveness of integrated interpretation of exome and corresponding transcriptome data for detecting splicing variants of genes associated with autosomal recessive disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2019.100531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Mamiko, Uehara Tomoko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Inui Ayano, Ikemiyagi Masako, Kamimaki Isamu, Kosaki Kenjiro	4. 巻 182
2. 論文標題 Shortfall of exome analysis for diagnosis of Shwachman Diamond syndrome: Mismatching due to the pseudogene SBDSP1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1631-1636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.61598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Mamiko, Shiraishi Yuichi, Uehara Tomoko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Abe Hatano Chihiro, Kurosawa Kenji, Kosaki Kenjiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Diagnostic utility of integrated analysis of exome and transcriptome: Successful diagnosis of Au Kline syndrome in a patient with submucous cleft palate, scaphocephaly, and intellectual disabilities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.1364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mamiko, Uehara Tomoko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro	4. 巻 182
2. 論文標題 Protein elongation variant of PUF60 : Milder phenotypic end of the Verheij syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 2709-2714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mamiko, Sokoda Tatsuyuki, Uehara Tomoko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Yagihashi Tatsuhiko, Maruo Yoshihiro, Kosaki Kenjiro	4. 巻 182
2. 論文標題 Learning disability and myoclonic epilepsy associated with apparently synonymous but splice disrupting JMJD1C variant that led to 21bp deletion of the transcript	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 3064-3067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mamiko, Suzuki Hisato, Watanabe Akiko, Uehara Tomoko, Takenouchi Toshiki, Mizuno Seiji, Kosaki Kenjiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Role of chimeric transcript formation in the pathogenesis of birth defects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 76 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mamiko, Ono Masae, Ishii Tomohiro, Suzuki Hisato, Uehara Tomoko, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro	4. 巻 185
2. 論文標題 Establishing intellectual disability as the key feature of patients with biallelic RNPC3 variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1836-1840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 山田茉未子、鈴木 寿人、水野 誠司、渡邊 晶子、上原 朋子、武内 俊樹、小崎 健次郎
2. 発表標題 Chimeric transcript formation as a new pathogenetic mechanism of rare and undiagnosed diseases
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茉未子、鈴木 寿人、水野 誠司、渡邊 晶子、上原 朋子、武内 俊樹、小崎 健次郎
2. 発表標題 小児先天性遺伝性疾患における新たな発症機序の解明 ゲノム構造異常によるキメラ遺伝子形成の網羅的解析
3. 学会等名 第43回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mamiko Yamada
2. 発表標題 Effectiveness of transcriptome analysis in deciphering molecular pathology of patients with suspected genetic disorders
3. 学会等名 第43回日本分子生物会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茉未子、白石友一、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 Effectiveness of integrated interpretation of exome and corresponding transcriptome data in detecting splicing variants of recessive disorders.
3. 学会等名 欧州人類遺伝学会2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茉未子、白石友一、鈴木寿人、黒澤健司、小崎健次郎
2. 発表標題 Effectiveness of integrated interpretation of exome and corresponding transcriptome data in detecting splicing variants: Population and clinical studies.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会・The 13th World Congress of International Cleft Lip and Palate foundation CLEFT 合同開催(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茉未子、白石友一、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 Effectiveness of integrated interpretation of exome and corresponding transcriptome data in detecting splicing variants: Population and clinical studies.
3. 学会等名 Scientific, Practical Conference DYSMORPHOLOGY AUTUMN 2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茉未子、鈴木寿人、上原朋子、武内俊樹、小崎健次郎
2. 発表標題 IFT172 Mutation as the Nineteenth Cause of Oral-Facial-Digital Syndrome
3. 学会等名 米国人類遺伝学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茉未子、白石友一、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 Integration of exome data with transcriptome data increased detection of pathogenic variants by 20% among 179 samplesエクソームとRNA-seq解析を統合させると病的変異の検出はエクソームのみに比較して20%上昇する～179検体の解析から～
3. 学会等名 第64回日本人類遺伝学会・第19回東アジア人類遺伝学会連合大会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茉未子、小崎健次郎
2. 発表標題 Documentation of IFT172 as the nineteenth gene causative of oral-facial-digital syndrome underscores the importance of ciliary trafficking in its pathogenesis.
3. 学会等名 2020 Western Medical Research Conference. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茉未子、上原朋子、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 人工知能手法に基づくスプライシング異常予測による未診断患者15トリオ家系列の解決
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茉未子、上原朋子、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 Evaluation of SpliceAI in predicting abnormal splicing in a cohort of 964 patients with rare and undiagnosed diseases
3. 学会等名 欧州人類遺伝学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茉未子、鈴木 寿人、水野 誠司、渡邊 晶子、上原 朋子、武内 俊樹、小崎 健次郎
2. 発表標題 Chimeric transcript formation as a new pathogenetic mechanism of rare and undiagnosed diseases.
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 山田茉未子、上原朋子、鈴木寿人、小崎健次郎
2. 発表標題 トランスクリプトームおよび全ゲノム解析を用いたキメラ遺伝子形成による先天性遺伝性疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田茉未子、鈴木 寿人、水野 誠司、渡邊 晶子、上原 朋子、武内 俊樹、小崎 健次郎
2. 発表標題 Chimeric transcript formation as a new pathogenetic mechanism of rare and undiagnosed diseases: Analysis using whole genome sequencing and long-read transcriptome sequencing.
3. 学会等名 欧州人類遺伝学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田茉未子
2. 発表標題 RNA解析・全ゲノム解析の医療実装による未診断疾患の解決を目指して
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------