

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20852

研究課題名（和文）新しい解析手法を用いたマルチオミクス解析による知的障害/発達遅滞発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of intellectual disability/developmental delay by multi-omics analysis using a novel analytical method

研究代表者

平出 拓也（Hiraide, Takuya）

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70783447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：知的障害/発達遅滞発症の症例に対し、患者末梢血DNAを用いたゲノム解析と尿由来細胞を用いたRNA解析によるマルチオミクス解析を行った。ゲノム解析ではAIによるスプライシング予測プログラムを利用した。マルチオミクス解析の結果、知的障害と脳形成異常を伴う症例において、イントロンにレトロトランスポゾンが挿入され、スプライシング異常が起きている可能性が考慮される症例を同定した。ショートリードシーケンサーでは挿入の全域を明らかにすることができず、ロングリードシーケンサーを用いたゲノム解析を行った。その結果、イントロンにおけるレトロトランスポゾン挿入が疾患原因になることを解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

知的障害/発達遅滞発症の患者において、エクソーム解析により多くの原因遺伝子が同定されている。しかし、半数以上の症例は原因不明であり、新たな解析手法の確立が必要である。我々の研究はAIを利用したゲノム解析とRNA解析によるマルチオミクス解析により、新しい疾患発症原因を同定することができた。今後の遺伝学的解析の発展に十分に貢献することができた。

研究成果の概要（英文）：A multi-omics analysis was performed on a case of intellectual disability/developmental delay using genomic analysis of the patient's peripheral blood DNA and RNA analysis using urine-derived cells. The genomic analysis utilized an AI-based splicing prediction program. The multi-omics analysis identified cases with retrotransposon insertions in introns in patients with intellectual disability and brain dysplasia, which could be considered as possible cases of splicing abnormalities. Short-read sequencing was unable to reveal the entire insertion area, and genomic analysis was performed using long-read sequencing. As a result, we were able to elucidate that retrotransposon insertions in introns are the cause of the disease.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：ゲノム解析 RNA解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

知的障害/発達遅滞は中枢神経系の機能に影響を与える様々な病態で生じ、人口の1~3%に認められる。遺伝学的要因を明らかにすることは、患者管理や家族計画において、患者とその家族に有益である。知的障害/発達遅滞の遺伝型と表現型の関連性は複雑であり、網羅的遺伝子解析が非常に有用な解析手法であるが、エクソーム解析による知的障害/発達遅滞の原因同定率は27%~39%にとどまる (Anazi ら *Mol Psychiatry*, 2017; Bowling ら *Genome Med.* 2017)。近年、半数以上の未解決症例の遺伝学的要因を明らかにするため、エクソン領域のバリエーションだけでなく、イントロンや発現調節領域のバリエーション、およびゲノム構造異常の探索が試みられているが、膨大なデータの解釈にしばしば難渋し、その解析スキームは確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソーム解析にて原因を同定できなかった知的障害/発達遅滞患者における新しい疾患発症機序を明らかにすることで、患者管理や遺伝カウンセリングに貢献することである。網羅的遺伝学的解析において、様々なインフォマティクス解析や機械学習を導入したマルチオミクス解析を行い、膨大なバリエーションのフィルタリングや解釈を行う。ゲノム解析では、極めて多数のゲノム構造変化および非コード領域のバリエーションが検出されるため、候補バリエーションの絞り込みに多大な労力を要する。この問題を解決するため、遺伝子発現量やスプライシング異常の観点からイントロンや転写調節領域の変異の意味づけを可能にするRNA-seqや、スプライス異常を予測する複数のAIプログラムを利用し、その有用性を検討する。多彩なインフォマティクス解析を利用したゲノム解析とRNA-seqとのマルチオミクス解析を行うことで、小児神経疾患の遺伝学的解析スキームの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 医科大学にてエクソーム解析を行った知的障害/発達遅滞の症例において、未解決の症例は72例であった。知的障害/発達遅滞に自閉スペクトラム症や外耳形態異常を合併している場合、原因を同定できる可能性が高まることを見出した (Hiraide ら *Clin Genet.* 2021)。他に、頭部MRI異常や発語・独歩の遅れ、父親の年齢が原因同定と関わる臨床所見であるという報告がある (Deciphering Developmental Disorders Study *Nature*, 2017)。これらを参考に19例を今回の解析対象とした。

(2) 患者DNAを用いゲノム解析を行った。抽出されたバリエーションに対し、公共データベース (GEMJ-WGA, 54KJPN, gnomAD) に登録のある頻度0.5%以上のバリエーションを除外することで、まれなバリエーションを抽出した。

(3) PhenoMatcher を利用し、表現型記載の国際標準である Human Phenotype Ontology (HPO) term を入力し、OMIM に登録されている疾患原因遺伝子をスコアリング、症状と関連が高い順に疾患原因候補遺伝子をランキングするフェノーム解析を行った。

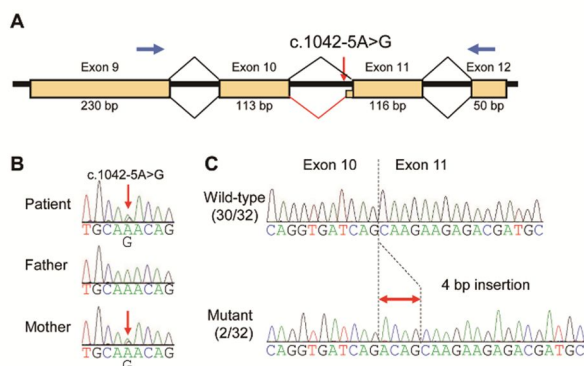
(4) 機械学習を利用した4つのスプライシング予測ツール [SpliceAI, MMSplice, SpliceRover, Pangolin] を使用してスプライシング予測を行い、スプライシング異常を検出した。スプライス異常が予測されたバリエーションに関しては、RNA-seq データで検証し、病的意義を判断した。

(5) コピー数異常検出プログラムである Canvas によりコピー数異常を検出した。レトロトランスポゾンの挿入は TEMP2 を利用した。さらに、Manta を用いて挿入、欠失、逆位、転座を検出した。

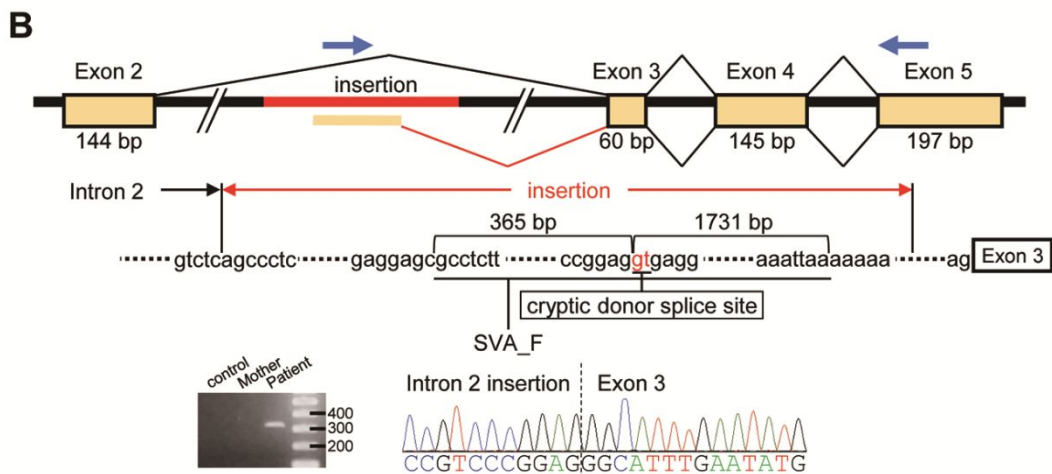
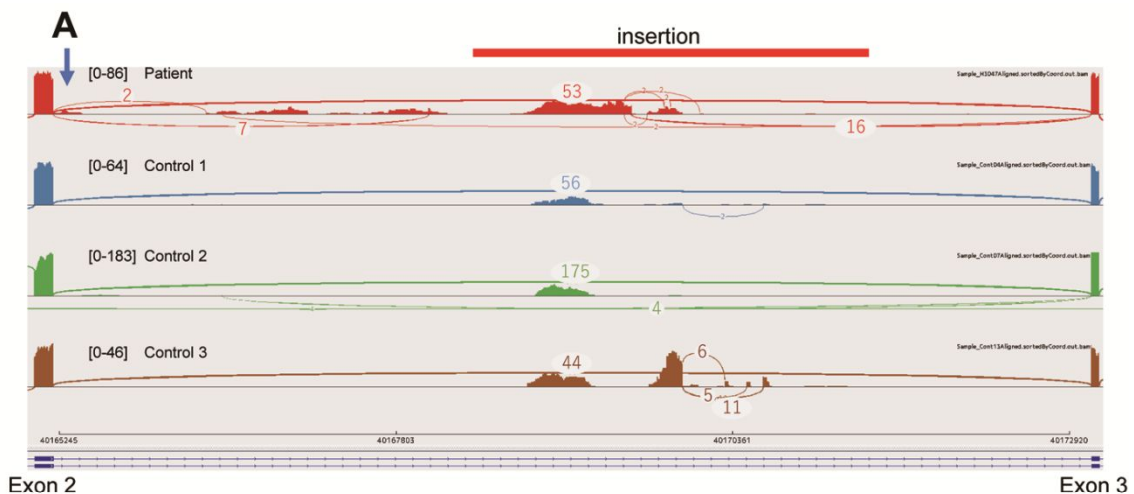
(6) 患者および両親より入手した尿から Urinary cell を樹立し、RNA-Seq を行った。遺伝子発現異常は OUTRIDER プログラム、スプライス異常の同定は FRASER プログラム、片アレル性発現の同定は ASEReadCounter プログラムを利用した。

4. 研究成果

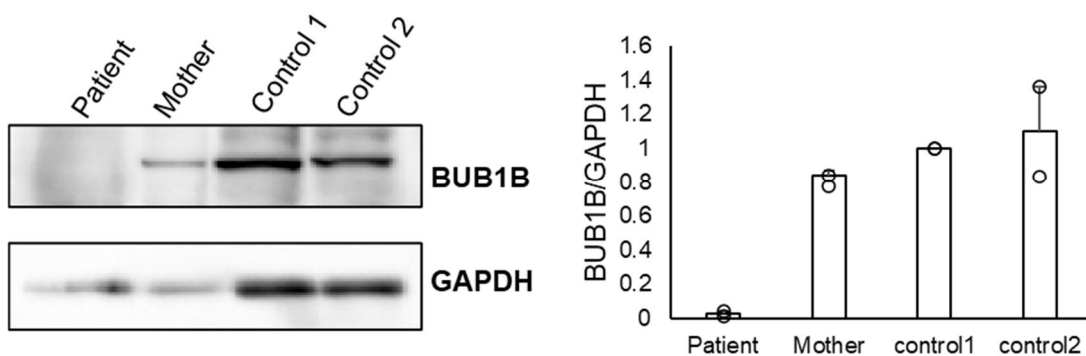
(1) 症例は premature chromatid separation (PCS) / mosaic variegated aneuploidy (MVA) syndrome の女兒。PCS/MVA syndrome は常染色体潜性遺伝形式をとる遺伝性疾患である。エクソーム解析により、*BUB1B* 遺伝子 (NM_001211.6) のイントロン10に、母由来の既知の病的バリエーション (c.1402-5A>G) が同定された。RT-PCR により4bpの挿入が引き起こされるバリエーションであった。



(3) RNA-seq リードを挿入部分を含む新しい参照配列に再アラインメントした。挿入配列内に 5' スプライス部位を持ちエクソン 3 に 3' スプライス部位を持つリードが 16 リードあることがわかった。レトロトランスポゾン挿入と異常スプライシングの因果関係が示された。



(4) 尿由来細胞を用いたイムノブロット法を行った。患者において BUB1B タンパクの発現レベルが著しく低下していた。



以上のデータは、RNA-seq によるトランスクリプトーム異常の検出が、病的バリエントを同定する手がかりとなることを示した。挿入配列の決定はロングリードシーケンスの有用性を示した。

引用文献

1. Anazi S, Maddirevula S, Faqeih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry*. 2017;22(4):615-624.
2. Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, Finnila CR, Hiatt SM, Engel KL, et al. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome*

Med. 2017;9(1):43.

3. Hiraide T, Yamoto K, Masunaga Y, Asahina M, Endoh Y, Ohkubo Y, et al. Genetic and phenotypic analysis of 101 patients with developmental delay or intellectual disability using whole-exome sequencing. *Clin Genet.* 2021 Jul;100(1):40-50.

4. Deciphering Developmental Disorders Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature.* 2017;542(7642):433-438.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawakami Ryota, Hiraide Takuya, Watanabe Kazuki, Miyamoto Sachiko, Hira Kota, Komatsu Kazuyuki, Ishigaki Hidetoshi, Sakaguchi Kimiyoshi, Maekawa Masato, Yamashita Keita, Fukuda Tokiko, Miyairi Isao, Ogata Tsutomu, Saitsu Hiroto	4. 巻 69
2. 論文標題 RNA sequencing and target long-read sequencing reveal an intronic transposon insertion causing aberrant splicing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-023-01211-8	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 Hiraide Takuya, Hayashi Taiju, Ito Yusuke, Urushibata Rei, Uchida Hiroshi, Kitagata Ryoichi, Ishigaki Hidetoshi, Ogata Tsutomu, Saitsu Hiroto, Fukuda Tokiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Case Report: Novel compound heterozygous TPRKB variants cause Galloway-Mowat syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	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) 10.3389/fped.2024.1360867	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平出 拓也, 吉岡 和香子, 伊藤 祐介, 漆畑 伶, 林 泰壽, 石垣 英俊, 西野 一三, 福田 冬季子
2. 発表標題 RYR1にミスセンスバリエントを認めた軽微な運動後筋痛のみを示す高CK血症の家族例
3. 学会等名 第65回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平出拓也, 林泰壽, 伊藤祐介, 漆畑伶, 内田博之, 北形綾一, 石垣英俊, 緒方勤, 才津浩智, 福田冬季子
2. 発表標題 TPRKB遺伝子に新規病的バリエントを同定したGalloway-Mowat syndromeの1例
3. 学会等名 第66回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------