

次世代マルチオミクス解析による 先天性大脳白質形成不全症の新規疾患発症機序の同定



浜松医科大学医学部附属病院・診療助教 平出 拓也

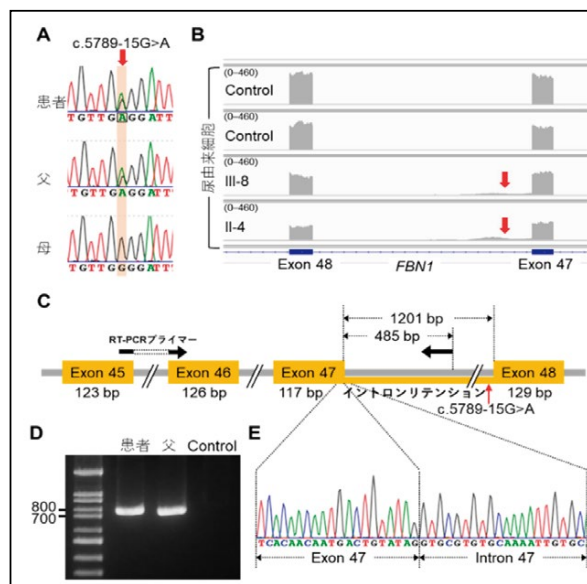
背景

遺伝子解析における次世代シーケンサーの進歩は、解析時間の短縮、コストの削減、診断率の向上を実現しています。ゲノム解析は、エクソーム解析では検出できない非翻訳領域に位置するバリエーションや構造異常を同定することができますが、非翻訳領域の候補バリエーションの病原性を評価することはしばしば困難です。一方、RNAシーケンス（RNA-seq）は、遺伝子発現とmRNAスプライシングの解析を通じて、ゲノム解析結果を解釈するために有用である可能性があります。しかし、RNA-seq研究において、一部の遺伝子はその発現が組織特異的であるため、遺伝子発現のある組織を用いて解析する必要があります。脳や心臓のような組織の生検は通常行われず、RNA-seqは全血、リンパ芽球系細胞株、皮膚線維芽細胞などの採取しやすい組織を用いて行われます。臨床的に利用しやすい検体の代表として、侵襲的な手技を必要としない尿があります。尿由来細胞を利用したRNA-seqの報告はありません。今回我々は、ゲノム解析と尿由来細胞のRNA-seqによるマルチオミクス解析を行い、イントロンバリエーションによるスプライシング異常を明らかにしたので報告します。

方法と結果

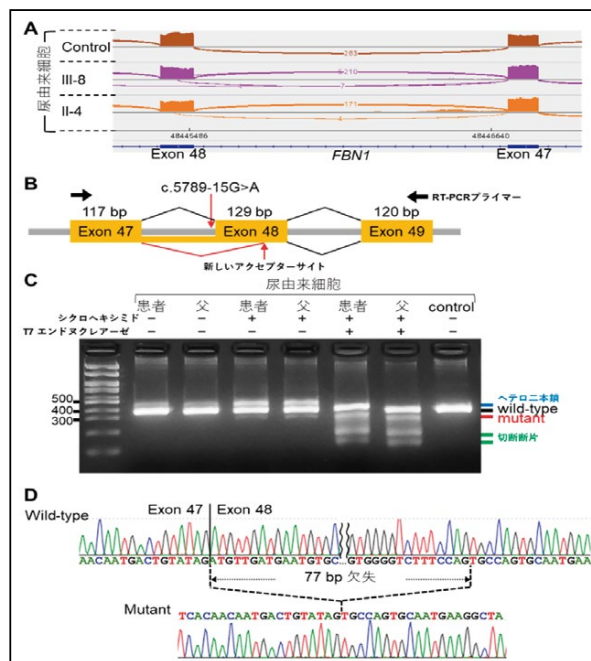
エクソーム解析で原因を同定できなかった神経発達障害関連疾患の患者について、血液白血球から抽出したゲノムDNAを用いて、ゲノムシーケンスを実施しました。抽出されたバリエーションに対し、公共データベースに登録のある頻度0.5%以上のバリエーションを除外することで、まれなバリエーションを抽出しました。ゲノム構造変化および非コード領域のバリエーションを検出し、スプライシングの変化を予測するためにAIプログラムであるSpliceAIを使用しました。その結果、Marfan症候群の患者において、*FBNI*遺伝子のイントロン47に罹患父由来のミスセンスバリエーション（NM_000138.4 : c.5789-15G>A）を同定しました（図1 A）。このバリエーションはSpliceAIにて、スプライシング異常が予測されました。病的意義を確認するため、患者と父から尿を約100ml採取し、遠心分離して細胞を回収、尿由来細胞を培養液中で培養しました。十分な尿由来細胞の増殖を確認し、尿由来細胞を用いてRNA-seqを行いました。遺伝子発現異常、スプライス異常、片アレル性発現を検索しました。そ

図1. イントロリテンション



の結果、*FBNI*に片アレル性発現が検出され、ナンセンス変異依存性のmRNA分解が関与している可能性が示唆されました。患者RNA-seqのデータより、*FBNI*のイントロン47にコントロールにみられないリードが存在しており（図1B）、スプライスされるはずのイントロン配列がスプライスされずに保持される、イントロンリテンションが示唆されました(図1C)。RT-PCRにより患者と罹患父にコントロールにはみられないバンドが検出され、イントロンリテンションの存在を確認しました（図1D, E）。このイントロンの保持により、1949番目の残基（p.Asp1930Gly*20）に早期終止コドンが生成されることが示唆されました。さらにSashimi plotより、エクソン48に新しいアクセプターサイトを形成するまれな転写産物の存在が示されました（図2A, B）。転写産物量が少ないため通常のRT-PCRではバンドが不明瞭でしたが、ナンセンス変異依存性mRNA分解の阻害薬であるシクロヘキシミドを添加することで、スプライシング異常による異常な転写産物の存在を確認することができました（図2C）。T7 エンドヌクレアーゼによりヘテロ二本鎖を切断することでバンドが明瞭に示されました（図2C）。このスプライシング異常によりmRNAに77bpの欠失が生じ、1934番目の残基（Asp1930Val*5）に早期終止コドンが生成されることが示唆されました（図2D）。RNA-seqはスプライシング異常の検出に有用であり、転写産物量が少なくても、スプライシング異常を検出することが示されました。

図2. まれなスプライシング異常の検出



考察

ゲノム解析により*FBNI*のイントロンバリエントが同定され、AIプログラムによりスプライシング異常を予測、さらに尿由来細胞を用いたRNA-seqによりその病原性が確認されました。ゲノム解析と尿由来細胞のRNA-seqを利用したマルチオミクス解析はエクソーム解析で未解決の症例に対する遺伝学的解析手法として有用でした。今後、さらなる解析手法の発展により、未解決症例の診断率がさらに向上することが期待されます。

論文

Takuya Hiraide, Kenji Shimizu, Sachiko Miyamoto, Kazushi Aoto1, Mitsuko Nakashima, Tomomi Yamaguchi, Tomoki Kosho, Tsutomu Ogata, Hiroto Saito

Genome sequencing and RNA sequencing of urinary cells reveal an intronic *FBNI* variant causing aberrant splicing

Journal of Human Genetics; <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01016-1>