

Title	人工知能を用いた原因不明肝臓疾患のスプライシング異常の検出
Sub Title	Detecting abnormal splicing events of hepatic diseases using integrated analysis of exome analysis and RNA sequencing.
Author	山田, 茉未子(Yamada, Mamiko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>多くの肝不全症例は未だに原因不明とされ、診断率の向上には革新的な技術開発が求められる。本研究では原因不明の肝疾患患者の肝組織を解析し、新規の肝疾患概念の確立を目指した。進行性家族性肝内胆汁鬱滞(PFIC)は胆汁酸の運搬や排泄の異常を起こす乳児期早期発症の遺伝性疾患で、典型的な症状は胆汁鬱滞、掻痒感、成長の遅れである。胆汁鬱滞は肝硬変に進展しうる。PFICに關与する遺伝子変異としてATP8B1、ABCB11、ABCB4、TJP2、NR1H4が知られている。本研究では治療抵抗性の高胆汁酸血症・肝硬変を呈しPFICと診断され発達遅滞を合併した5歳女児を対象とした。両親から慶應義塾大学医学部倫理委員会の承諾の下、研究参画の同意を得た。エクソーム・RNA解析を行い、LSR遺伝子におけるc.602C>T, p.Ala201Valおよびc.1396dup, p.Arg466ProfsTer51の複合ヘテロ接合を認めた。ミスセンス変異については病原性ありとの評価であった。LSR(lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)は、肝臓や他臓器に発現し、細胞間接着において3細胞が接する面の接着に關与するトリセルラータイトジャンクションの構成タンパクである。肝細胞においてLSRの免疫染色を行ったところ、正常ではトリセルラータイトジャンクションにおいて発現するLSR遺伝子は当該患者では発現していなかった。マウスにおいてLSRの完全欠損を来している場合、肝低形成および胎仔期死亡を来することが知られているが、ヒトにおける疾患との関連性については知られていなかったが、本研究によりLSRがPFICの新規原因遺伝子であることを確立した。</p> <p>本研究によりエクソーム解析とRNA解析を統合する手法で、新規肝疾患を同定可能であることを示した。さらに多くの新規肝疾患の原因遺伝子の同定を進める計画である。近年、スプライシング異常を軽減する低分子化合物が開発されており、本研究で開発した方法は、治療可能な肝疾患患者の同定にも寄与すると期待される。</p> <p>The pathogenesis of substantial cases with hepatic failure remains unknown. Innovative approach is awaited. In this project, we evaluated mRNA obtained from liver biopsy with RNA-sequencing and exome analysis.</p> <p>Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) refers to a group of genetic disorders that are characterized by defects in the transport or excretion of bile salts. The phenotype of patients with PFIC include cholestasis, often with onset during early infancy, pruritus, and growth retardation. Mutations in the ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, and NR1H4 genes have been implicated in the etiology of PFIC, in which the cholestasis often progresses to liver cirrhosis.</p> <p>In this research, a 5-year-old female patient who has treat-resistant hyper bile acidemia, liver cirrhosis and developmental delay was the proband. On approval of the local institutional review board and informed consent from the parents of the child, molecular studies were performed. The nonsynonymous variant of the LSR gene, chr19(GRCh37): g.35749851C>T(c.602C>T, p.Ala201Val) was detected in exon3. Furthermore the heterozygous frameshift variant, chr19(GRCh37): g.35758119dup (c.1396dup, p.Arg466ProfsTer51) was detected in exon8 and was derived from the mother. Both variants were confirmed by Sanger sequencing. The nonsynonymous variant p.Ala201Val located within the Ig domain was predicted to be deleterious. The lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is expressed in the liver and other organs and represents a component protein of tricellular tight junctions, where three epithelial cells meet. The immunohistochemical staining using anti-LSR antibodies showed absent expression of LSR which is normally expressed at the tricellular tight junctions in this patient. Complete loss of function of the LSR protein has been shown to result in liver hypoplasia and fetal death in mice. The role of LSR in human health and disease have not yet been established. We hereby established biallelic pathogenic mutations in the LSR gene as a novel cause of pediatric cholestasis.</p> <p>In this study we have demonstrated that RNA-seq with exome analysis facilitate identification of new human disorder. We plan to apply this method to discover more disease-causing genes of which splicing is disrupted. Recent development of low molecular compounds which alleviate abnormal splicing would open a door to pharmacologic intervention of the new liver diseases.</p>
Notes	
Genre	Research Paper

URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190307
-----	---

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部クラスター部門	職名	助教(有期・医学部)	補助額	500 (特B)千円
	氏名	山田 茉未子	氏名 (英語)	Mamiko Yamada		
研究課題 (日本語)						
人工知能を用いた原因不明肝臓疾患のスプライシング異常の検出						
研究課題 (英訳)						
Detecting abnormal splicing events of hepatic diseases using integrated analysis of exome analysis and RNA sequencing.						
1. 研究成果実績の概要						
<p>多くの肝不全症例は未だに原因不明とされ、診断率の向上には革新的な技術開発が求められる。本研究では原因不明の肝疾患患者の肝組織を解析し、新規の肝疾患概念の確立を目指した。進行性家族性肝内胆汁鬱滞(PFIC)は胆汁酸の運搬や排泄の異常を起こす乳児期早期発症の遺伝性疾患で、典型的な症状は胆汁鬱滞、掻痒感、成長の遅れである。胆汁鬱滞は肝硬変に進展する。PFIC に関与する遺伝子変異として ATP8B1、ABCB11、ABCB4、TJP2、NR1H4 が知られている。本研究では治療抵抗性の高胆汁酸血症・肝硬変を呈し PFIC と診断され発達遅滞を合併した 5 歳女児を対象とした。両親から慶應義塾大学医学部倫理委員会の承諾の下、研究参画の同意を得た。エクソーム・RNA 解析を行い、LSR 遺伝子における c.602C>T, p.Ala201Val および c.1396dup, p.Arg466ProfsTer51 の複合ヘテロ接合を認めた。ミスセンス変異については病原性ありとの評価であった。LSR(lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)は、肝臓や他臓器に発現し、細胞間接着において 3 細胞が接する面の接着に関与するトリセルラータイトジャンクションの構成タンパクである。肝細胞において LSR の免疫染色を行ったところ、正常ではトリセルラータイトジャンクションにおいて発現する LSR 遺伝子は当該患者では発現していなかった。マウスにおいて LSR の完全欠損を来している場合、肝低形成および胎仔期死亡を来することが知られているが、ヒトにおける疾患との関連性については知られていなかったが、本研究により LSR が PFIC の新規原因遺伝子であることを確立した。</p> <p>本研究によりエクソーム解析と RNA 解析を統合する手法で、新規肝疾患を同定可能であることを示した。さらに多くの新規肝疾患の原因遺伝子の同定を進める計画である。近年、スプライシング異常を軽減する低分子化合物が開発されており、本研究で開発した方法は、治療可能な肝疾患患者の同定にも寄与すると期待される。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>The pathogenesis of substantial cases with hepatic failure remains unknown. Innovative approach is awaited. In this project, we evaluated mRNA obtained from liver biopsy with RNA-sequencing and exome analysis.</p> <p>Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) refers to a group of genetic disorders that are characterized by defects in the transport or excretion of bile salts. The phenotype of patients with PFIC include cholestasis, often with onset during early infancy, pruritus, and growth retardation. Mutations in the ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, and NR1H4 genes have been implicated in the etiology of PFIC, in which the cholestasis often progresses to liver cirrhosis.</p> <p>In this research, a 5-year-old female patient who has treat-resistant hyper bile acidemia, liver cirrhosis and developmental delay was the proband. On approval of the local institutional review board and informed consent from the parents of the child, molecular studies were performed. The nonsynonymous variant of the LSR gene, chr19(GRCh37): g.35749851C>T(c.602C>T, p.Ala201Val) was detected in exon3. Furthermore the heterozygous frameshift variant, chr19(GRCh37): g.35758119dup (c.1396dup, p.Arg466ProfsTer51) was detected in exon8 and was derived from the mother. Both variants were confirmed by Sanger sequencing. The nonsynonymous variant p.Ala201Val located within the Ig domain was predicted to be deleterious.</p> <p>The lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is expressed in the liver and other organs and represents a component protein of tricellular tight junctions, where three epithelial cells meet. The immunohistochemical staining using anti-LSR antibodies showed absent expression of LSR which is normally expressed at the tricellular tight junctions in this patient. Complete loss of function of the LSR protein has been shown to result in liver hypoplasia and fetal death in mice. The role of LSR in human health and disease have not yet been established. We hereby established biallelic pathogenic mutations in the LSR gene as a novel cause of pediatric cholestasis.</p> <p>In this study we have demonstrated that RNA-seq with exome analysis facilitate identification of new human disorder. We plan to apply this method to discover more disease-causing genes of which splicing is disrupted. Recent development of low molecular compounds which alleviate abnormal splicing would open a door to pharmacologic intervention of the new liver diseases.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Tomoko Uehara, Mamiko Yamada, Shuichiro Umetsu, Hiroshi Nittono, Hisato Suzuki, Tomoo Fujisawa, Toshiki Takenouchi, Ayano Inui, Kenjiro Kosaki	Biallelic mutations in the LSR gene cause a novel type of infantile intrahepatic cholestasis	The journal of pediatrics	2020 年 in press			
上原 朋子、山田 茉未子、梅津 守一郎、入戸 野博、鈴木 寿人、藤澤 知雄、武内 俊樹、乾 あやの、小崎 健次郎	LSR は遺伝性胆汁鬱滞の新規原因遺伝子である	第 123 回日本小児科学会学術集会	2020 年 8 月開催			

上原 朋子、山田 茉未子、梅津 守一郎、入戸 野博、鈴木 寿人、藤澤 知雄、武内 俊樹、乾 あやの、小崎 健次郎	LSR は遺伝性胆汁鬱滞の新規原因遺伝子である	第 42 回日本小児遺伝学会学術集会	2020 年 2 月開催予定でしたがコロナウイルスのため中止
--	-------------------------	--------------------	--------------------------------