

Title	末梢血トランスクリプトームの外れ値解析：エクソーム解析の限界を超えるアプローチ
Sub Title	Outlier analysis of the peripheral blood transcriptome : an approach beyond the limits of exome analysis.
Author	山田, 茉未子(Yamada, Mamiko)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	深部イントロン変異など従来の技術では検出が難しいスプライシング異常を同定①ATAD3A・ ATAD3B遺伝子の欠失症例、②PTEN遺伝子のdeep intronバリエーションによるCowden症候群、③WDR45遺伝子の深部イントロン変異によるBPANの患者の診断が確定した。また、スプライシングによる影響を予測するスコアとしてSpliceAIが知られているが、SpliceAIスコア0.7をカットオフ値とすることで診断に有益な候補まで、適切に絞り込めることが示された。さらに、WDR45異常症の患者から、異常トランスクリプトを是正するASO作成を行い、将来的な個別化創薬に発展できる成果を得た。 The diagnosis of patients with (1) ATAD3A and ATAD3B gene deletions, (2) Cowden syndrome due to a deep intron variant in the PTEN gene, and (3) BPAN due to a deep intron variant in the WDR45 gene was confirmed by identifying splicing abnormalities that are difficult to detect using conventional techniques, including deep intron variants. In addition, SpliceAI is known as a score to predict the effect of splicing, and it was shown that a SpliceAI score cutoff of 0.7 can be used to appropriately narrow the list of candidates to those that are useful for diagnosis. Furthermore, the study demonstrated that the development of ASOs from patients with abnormal WDR45 transcripts is feasible for future personalized drug discovery.Outlier analysis of the peripheral blood transcriptome: an approach beyond the limitations of exome analysis.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2021～2024 課題番号：21K15873 研究分野：遺伝医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K15873seika

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.

令和 7 年 5 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2024

課題番号：21K15873

研究課題名（和文）末梢血トランスクリプトームの外れ値解析：エクソーム解析の限界を超えるアプローチ

研究課題名（英文）Outlier Analysis of the Peripheral Blood Transcriptome: An Approach Beyond the Limits of Exome 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）・講師

研究者番号：60835601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：深部イントロン変異など従来の技術では検出が難しいスプライシング異常を同定①ATAD3A・ATAD3B遺伝子の欠失症例、②PTEN遺伝子のdeep intronバリエーションによるCowden症候群、③WDR45遺伝子の深部イントロン変異によるBPANの患者の診断が確定した。また、スプライシングによる影響を予測するスコアとしてSpliceAIが知られているが、SpliceAIスコア0.7をカットオフ値とすることで診断に有益な候補まで、適切に絞り込めることが示された。さらに、WDR45異常症の患者から、異常トランスクリプトを是正するASO作成を行い、将来的な個別化創薬に発展できる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深部イントロン変異など通常の技術では検出が難しいスプライシング異常を同定し、患者の疾患の原因を明らかにすることに成功した。また、そのスプライシング異常を惹起する変異を是正するアンチオリゴ核酸の同定にも成功した。この成果は、将来的な個別化創薬の開発につながるだけでなく、進行性の疾患における早期導入により発症遅延などの効果も期待できる発展性のある見込まれる成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The diagnosis of patients with (1) ATAD3A and ATAD3B gene deletions, (2) Cowden syndrome due to a deep intron variant in the PTEN gene, and (3) BPAN due to a deep intron variant in the WDR45 gene was confirmed by identifying splicing abnormalities that are difficult to detect using conventional techniques, including deep intron variants. In addition, SpliceAI is known as a score to predict the effect of splicing, and it was shown that a SpliceAI score cutoff of 0.7 can be used to appropriately narrow the list of candidates to those that are useful for diagnosis. Furthermore, the study demonstrated that the development of ASOs from patients with abnormal WDR45 transcripts is feasible for future personalized drug discovery. Outlier analysis of the peripheral blood transcriptome: an approach beyond the limitations of exome analysis.

研究分野：遺伝医学

キーワード：トランスクリプトーム解析 スプライシング 偽エクソン形成

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児遺伝性疾患の解析の主流はエクソーム解析法で、翻訳領域の点変異の検出に優れるが、臨床的には典型例であるにも関わらず変異が同定されない症例が3割程度残ってしまう。未解決例の主因はゲノム構造異常やスプライシング異常と想定され、エクソーム解析の原理的な意味での盲点といえる。たとえば数十塩基を越える大きさのゲノム構造異常の検出や深部イントロン変異などエクソン・イントロン境界以外の非翻訳領域変異に基づくスプライシング異常の検出は不可能で、いずれも解決が待たれる。

2. 研究の目的

既存のエクソーム解析では数十塩基を越える大きさのゲノム構造異常の検出や深部イントロン変異などエクソン・イントロン境界以外の非翻訳領域変異に基づくスプライシング異常の評価は困難である。本研究は、ゲノム構造異常やスプライシング異常が転写産物に直接的な影響を与えることに着目し、患者由来トランスクリプトームデータの「外れ値解析法」という機械学習に基づく手法を用いて、ゲノム構造異常を転写産物の発現量の異常として、スプライシング異常を転写産物の異常なスプライシングパターンとして系統的に検出する。

特にゲノム構造異常については、キメラ遺伝子形成を、スプライシング異常については深部イントロン変異の評価に着目する。異常が検出された場合、長鎖シーケンサー（ナノポア）により異常転写産物の全長および当該遺伝子領域全体のゲノム配列の全長を決定し、当該患者におけるスプライシング異常とそれを惹起したゲノム異常を解明する。

3. 研究の方法

既存の患者由来トランスクリプトーム解析データに対して人工知能・機械学習の手法（ニューラル・ネットワーク）を用いて外れ値解析を行う。ソフトウェア OUTRIDER によりスプライシング異常の量的評価を、ソフトウェア Fraser により質的評価を行う。ゲノム構造異常に起因する変異と、深部イントロン領域変異に起因する異常スプライシングパターンが想定される。

(1) ゲノム構造異常へのアプローチ：実データでエクソンとなっている部分の位置と発現量ゲノム領域別発現量（read depth）について、外れ値解析を行う。

(2) スプライシング異常へのアプローチ

質的異常の検出：転写ユニットの破壊・重複・キメラ遺伝子形成による遺伝子発現の異常やエクソンから離れた場所に存在する深部イントロン変異による異常スプライシングなどによる転写産物の質的異常を外れ値解析により評価する。

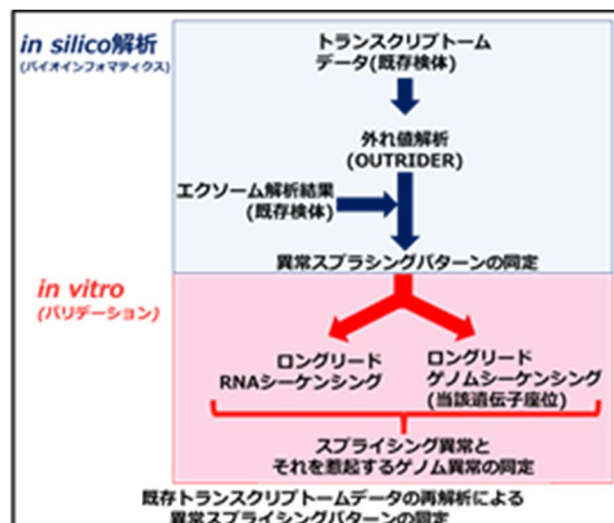
量的異常の検出：発現量の相対的な変化を次世代シーケンサーの read-depth から算出し、各エクソンや異常に生成された偽エクソンなどの領域ごとに外れ値解析を行う。遺伝子発現量の50%程度の減少を検出することや、多くのスプライシング・アイソフォームの中から患者に特異的な異常なトランスクリプト配列を特定することを目指す。

4. 研究成果

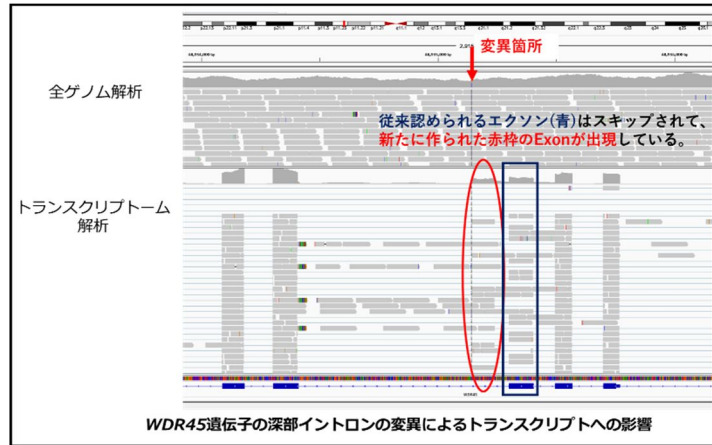
(1)原因不明の呼吸障害を伴う乳児において、ATAD3A および ATAD3B 遺伝子の欠失があり、RNA 解析では両遺伝子の融合した転写産物(キメラ遺伝子)を検出した。患者は、小脳低形成、筋緊張低下、呼吸不全症候群 (OMIM #618810) と診断された。この研究は診断のつかない新生児・乳児に対して適切な診断を付けることで適切な管理に結びつけるためのものであり、本結果も患者の医療管理に有益な情報となった。

(2)スプライシングによる影響を予測するスコアとして SpliceAI が知られているが、WDR45 の患者のデータを用いて、その有用性や診断に有用なカットオフ値の設定を目指した。その結果 SpliceAI スコア 0.7 をカットオフ値とすることで診断に有益な候補まで、適切に絞り込めることが示された。

(3)RNA 解析で PTEN 遺伝子の deep intron バリエントを検出した。患者はタンパク漏出性胃腸症・難治性腹水を伴う患者であり Cowden 症候群と診断した。この研究は診断のつかない新生児・乳児に対して適切な診断を付けることで適切な管理に結びつけるためのものであり、本結果も患者の医療管理に有益な情報となった。



(4)WDR45 遺伝子の深部イントロン変異によって生じている脳の鉄沈着を伴う神経変性疾患 (Neurodegeneration with brain iron accumulation: NBIA) について、RNA 解析を行った結果異常なトランスクリプトが生成されていた。偽エクソン形成を正常なスプライシングへ誘導する手法として、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) が知られており、本症例に対する検討を行った。本患者の変異に対して作成した、特異的な ASO を、変異の入った神経細胞に導入した結果、治療効果の期待される ASO を同定することができた。



研究期間全体を通じ、深部イントロンバリエントを検出、それに伴う異常トランスクリプトを是正する可能性のある ASO 作成に成功し、今後の遺伝学的治療に貢献しうる成果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mamiko Yamada, Kazuhiro Maeta, Hisato Suzuki, Ryo Kurosawa, Toshiki Takenouchi, Tomonari Awaya, Masahiko Ajiro, Atsuko Takeuchi, Hisahide Nishio, Masatoshi Hagiwara, Fuyuki Miya, Masafumi Matsuo, Kenjiro Kosaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful skipping of abnormal pseudoexon by antisense oligonucleotides in vitro for a patient with beta-propeller protein-associated neurodegeneration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sci Rep.	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） 10.1038/s41598-024-56704-z	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 Hisato Suzuki, Masatoshi Nozaki, Hiroshi Yoshihashi, Kazuo Imagawa, Daigo Kajikawa, Mamiko Yamada, Yu Yamaguchi, Naoya Morisada, Mayuko Eguchi, Shoko Ohashi, Shinsuke Ninomiya, Toshiyuki Seto, Tomoharu Tokutomi, Mariko Hida, Katsuaki Toyoshima, Kenjiro Kosaki, Toshiki Takenouchi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome Analysis in Sick Neonates and Infants: High-yield Phenotypes and Contribution of Small Copy Number Variations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of 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） 10.1016/j.jpeds.2022.01.033	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 Kurosawa Ryo, Iida Kei, Ajiro Masahiko, Awaya Tomonari, Yamada Mamiko, Kosaki Kenjiro, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 PDIVAS: Pathogenicity predictor for Deep-Intronic Variants causing Aberrant Splicing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Genomics	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） 10.1186/s12864-023-09645-2	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田茉未子、前田 和宏、鈴木寿人、武内俊樹、栗屋智就、萩原正敏、網代 将彦、竹内 敦子、西尾 久英、宮冬樹、松尾雅文、小崎健次郎	
2. 発表標題 アンチセンス核酸薬による異常スプライシング是正：WDR45の偽エクソン形成に対するアプローチ	
3. 学会等名 第127回日本小児科学会	
4. 発表年 2024年	

1. 発表者名 山田茉未子
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 日本先天異常学会
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1件

1. 著者名 山田茉未子	4. 発行年 2025年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 68
3. 書名 Medical Science Digest 2025年5月号	

〔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
---------	---------