

氏 名 Nguyen Thanh Phuong

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2460 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Transcriptome Analysis of Citrullinemia Type II: From  
Molecular to Pathological Perspectives

論文審査委員 主 査 黒川 顕  
遺伝学コース 教授  
北野 潤  
遺伝学コース 教授  
木村 暁  
遺伝学コース 教授  
池尾 一穂  
遺伝学コース 准教授  
矢崎 正英  
信州大学 先鋭領域融合研究群  
バイオメディカル研究所 教授

# Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Nguyen Thanh Phuong

Title : Transcriptome Analysis of Citrullinemia Type II: From Molecular to Pathological Perspectives

Citrin deficiency (CD) is an autosomal recessive disorder caused by loss-of-function mutations in *SLC25A13*, encoding citrin protein, a glutamate/aspartate antiporter located on the inner mitochondrial membrane. The loss of citrin leads to disruptions in various metabolic pathways, especially the malate-aspartate shuttle and urea cycle. CD is prevalent in East Asian countries, with approximately 2-3% of the Japanese population carrying *SLC25A13* mutations. Although the causal gene is known, there is a heterogeneous spectrum of symptoms and clinical manifestations associated with CD affecting patient livers. CD patients exhibit symptoms ranged from peculiar dietary choice, fatty liver disease, hepatitis and fatigue, to the more severe onset of citrullinemia type II (CTLN2) during adulthood, which leads to severe hyperammonemia-induced neuropsychiatric symptoms, primarily because of hepatic urea cycle dysfunction due to ASS1 enzyme decrease. Given the diverged clinical manifestation, the molecular mechanisms underlying non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other metabolic disruptions observed liver of CD patients remain poorly characterized. Furthermore, the emergence of advanced-stage liver pathologies, especially liver cancer, requires further investigation. It is critical to assess the link between CD/CTLN2 and liver cancer development, which can help devise preventative measures. Lastly, the reasons why only a subset of CD patients experience CTLN2 onset and the mechanism responsible for the decreased expression of hepatic ASS1 enzyme despite normal mRNA levels remains elusive.

To address these questions and gain deeper understanding of CTLN2 manifestation and CD condition in general, a comprehensive and integrative assessment of the disease in patients is crucial. This study utilizes transcriptomic data obtained from liver tissues of CTLN2 patients with confirmed SLC25A13 mutation. Our data include both mRNA and miRNA expression, in combined with a wide range of publicly available control datasets and reference databases. From those questions mentioned above, my study focuses on three key aspects with following findings:

Firstly, I investigated alterations in protein-coding gene expression and the miRNA-mRNA regulatory landscape in the liver of CD/CTLN2 patients compared to normal liver samples. Furthermore, I aimed to elucidate the connection between these changes and the disrupted metabolic functions and pathways underlying the persistent symptoms of CD. The results from transcriptomic analyses reveal dysregulated gene expression patterns, such as the up- and down-regulation of established biomarker, i.e., SPINK1 and PPARA, respectively. Enrichment analysis revealed the upregulation of energy generation pathways as a compensatory response to the loss of mitochondrial function. Additionally, fatty liver phenotype and repression of multiple signaling pathways, including thyroid hormone signaling, are observed. Employing ensemble approach using Random Forest feature selection based on gene expression data, I proposed a list of potential gene signatures that can serve as biomarkers for future applications. Co-expression analysis identifies gene modules associated with disease severity, such as the  $\omega$ -oxidation pathway and immune activation. Looking at miRNA expression, I also detected the significant up-regulation of miR-27a/b and miR-192, which potentially affecting lipid metabolism, metabolic functions, and signaling pathways like TGF- $\beta$ . MiRNA activities in CTLN2 liver was demonstrated to strongly repressed various signaling pathways, as evidenced by gene expression. MiR-27a upregulation was also observed in a cell line model of CD, highlighting its critical role in response to citrin loss. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles identified potential

miRNA-mRNA interactions, with some of them implicated in liver cancer development. Secondly, my study explores the likelihood and putative mechanisms underlying the development of prevalent liver pathologies, particularly hepatocellular carcinoma (HCC), in CD/CTLN2 patients. Transcription factors specific to HCC are found to be enriched in upregulated genes from CTLN2 liver samples, suggesting a potential link to malignancy development. The over-representation of highly expressed worse prognosis genes further supports the promotion of malignancy in CD/CTLN2 patients. I also employ cell deconvolution methods to recognize immune cell composition in disease liver, and compare that with healthy liver. Interestingly, I observed an intensified inflammatory response in CD/CTLN2 liver, creating a favorable environment for the emergence of malignant cells.

Lastly, my study aims to explain the enigmatic suppression of the ASS1 protein in CTLN2 manifestation and the regulatory mechanisms responsible for this suppression. I proposed several possible mechanisms of ASS1 regulation at translational and post-translational level. Then, preliminary experiments employing citrin-KO HepG2 cell lines as a disease model are performed, but under various treatment conditions on citrin-KO cells, no CTLN2-characterized effect was observed. This suggests the need for further investigation to understand the regulatory mechanisms of ASS1, particularly in an accurate *in vivo*-like setting.

In conclusion, my study provides a comprehensive analysis of the transcriptomic landscape and underlying mechanisms of CTLN2 and CD. The findings expanded our current understanding of dysregulated pathways, potential biomarkers, and the association between CD/CTLN2 liver and liver cancer.

## 博士論文審査結果

<sup>Name in Full</sup>  
氏名 Nguyen Thanh Phuong

<sup>Title</sup>  
論文題目 Transcriptome Analysis of Citrullinemia Type II:  
From Molecular to Pathological Perspectives

シトリン欠損症 (CD) は、ミトコンドリア内膜に存在するグルタミン酸/アスパラギン酸アンチporterであるシトリンをコードする SLC25A13 遺伝子の機能欠損変異によって引き起こされる常染色体潜性遺伝疾患である。CD の臨床症状は多様であるが、主に患者の肝臓に影響を及ぼし、中でも最も重篤な臨床症状であるシトルリン血症 II 型 (CTLN2) は、高アンモニア血症と肝癌の顕著な発生率によって特徴づけられる。これまで CD の臨床症状や病態については多数報告されているが、CD/CTLN2 患者で進行する脂肪肝炎や特に肝癌との関連について、これらの分子メカニズムは未だ解明されていない。さらに、CD 患者の一部のみが CTLN2 を発症する原因や、mRNA レベルでは正常であるにもかかわらず、アルギニン合成酵素 ASS1 の発現が低下する機序についても未だ解明されていない。

Nguyen Thanh Phuong さんは CTLN2 の発症と CD 病態についてより深く理解するために、SLC25A13 遺伝子変異が確認された CTLN2 患者の肝生検の mRNA と miRNA を含むトランスクリプトームデータと、公開されている複数のコホート研究から得られた正常肝組織のトランスクリプトームデータとの比較解析をおこなった。レガシーな発現解析と機械学習 (ランダムフォレスト) を組み合わせて解析することで、バイオマーカーとなり得る関連遺伝子候補の抽出に成功した。エンリッチメント解析では、エネルギー生成経路の発現上昇、肝脂肪に関連する複数のシグナル伝達経路の抑制など、CTLN2 患者特異的な代謝パスウェイを抽出することができた。また、mRNA と miRNA の発現プロファイルの統合解析からは、上方制御された miR-27a/b と miR-192 が脂質代謝異常や代謝機能調節、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路などのシグナル伝達経路に関与している可能性を見出した。さらに、CD/CTLN2 肝サンプルにおいて発現量が上昇した遺伝子の転写因子が、肝細胞癌 (HCC) に特異的な転写因子群に含まれていることを明らかにし、これら転写因子が CD/CTLN2 患者における HCC 発症促進に関与していることを強く示唆した。CD/CTLN2 では ASS1 タンパク質の発現減少が確認されていることから、miR-3909 や miR-27a-3p 等 miRNA による ASS1 の翻訳抑制、ASS1 タンパク質分解など新たな仮説を提案した。

本研究は、CD/CTLN2 患者検体の包括的なトランスクリプトーム解析により、CD/CTLN2 における肝疾患病態形成に関する新たな仮説を提案し、CD/CTLN2 と肝細胞癌の関連性の理解を深めるものであり、優れた研究であると認められる。また、提出された博士論文は、本研究の成果のみならず複雑な病態理解に必須の基礎知識も整理されており、240 頁におよぶ気概溢れる博士論文となっている。以上のことから Phuong さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。