

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

トキシコゲノミクスによる毒性バイオマーカーの開発

研究分担者 山田 弘

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクトリーダー

**研究要旨**

医薬品開発の一環として次世代アジュバントの開発が精力的に行われている中、その安全性を評価するための新たな手法の構築に係る課題の克服が必要となっている。

本分担研究では、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースと本研究事業で構築されるアジュバントデータベースの情報を融合させ、インフォマティクス手法を用いて解析することにより、アジュバントの安全性評価に用いるバイオマーカー、加えて有効性の評価に用いるバイオマーカーの特定を目指している。

本年度は、(1) トキシコゲノミクスデータベースに格納されている情報を基にした免疫系への影響を予測するバイオマーカーの抽出、(2) アラムアジュバント及び Freund' s complete adjuvant 投与ラットのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索、(3) Advax 投与マウスのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索、(4) アラムアジュバントを含有する全粒子 H5N1 プレパンデミックワクチンの小児臨床試験サンプル(血清)より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索、(5) 次世代シーケンサーを用いたヒト血清中マイクロ RNA 測定方法の確立の一環として少量(癌研究の分野などでは一般的に 5-10mL 程度の血清を使用)のヒト血清からの total RNA の抽出及び精製条件の検討を行った。

その結果、トキシコゲノミクスデータベースを活用したバイオマーカー探索では、免疫系への影響を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。アジュバント投与ラット及びマウスのサンプルを用いたバイオマーカー探索研究では、両動物種のいずれにおいても、アジュバント投与の影響を反映する遺伝子発現の変動を捉え、試験デザインを考察する上で重要となる基礎データの蓄積も達成できた。アジュバントワクチンの臨床試験検体より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索では、発熱及び抗体価上昇を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。ヒト血清からの total RNA の抽出及び精製条件の検討では、通常使われる血清量の 1/5-1/10 量での測定に目処がたった。

今後、アジュバントデータベースの情報量を充実させることにより、単に予想性だけでなくロバストネスが保証された安全性及び有効性に係るバイオマーカーの抽出、ラットとマウスにおける反応性の種差の検討などが可能になると考えられる。

## A. 研究の目的

現在、パンデミックワクチンをはじめとする様々なワクチンの開発が世界中で進められているが、関連して次世代アジュバントの開発も精力的に行われている。アジュバントは、ワクチンの効力を増強させるための有効なツールとなりうるが、その安全性を評価するための新たな手法の構築が課題となっている。本研究事業は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究(有効性)および審査行政(安全性)に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的としているが、その中で本分担研究は、トキシコゲノミクス手法を用いてアジュバントの安全性評価に資する新規バイオマーカーの開発を第一目標にしている。

バイオマーカー探索研究には、2種のデータベースを活用する。1つは、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースである。当データベースには、医薬品を中心とした約 180 化合物に係る毒性情報及び遺伝子発現情報が蓄積されている。当データベース構築においては、in vivo 系では製薬企業における毒性情報が最も豊富な動物種であるラット(肝臓および腎臓が評価対象臓器)、in vitro 系ではラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞を用い、選定した化学物質を曝露した際の遺伝子発現情報を Affymetrix 社の GeneChip® マイクロアレイにより取得している。また、ラットを用いた実験では、単回投与および28日間反復投与を実施し、遺伝子発現の用量相関的变化および経時的变化を確実に捉えるため、単回・反復それぞれ4用量・4時点という十分な用量段階およびサンプリング時間を設定し、全ての用量・時点で、臓器重量、血液学、血液生

化学、病理変化等の毒性学データを取得し、データベースに格納している。

2つ目は、当研究事業で構築されるアジュバントデータベースである。当データベースには、臨床研究等で採取されたヒトの血液サンプル、ラットやマウス等の実験動物から採取した血液サンプル及び臓器サンプルから得た、マイクロRNA データ、トランスクリプトームデータ等が蓄積されることになっている。

これらのデータベース情報を融合させ、インフォマティクス手法を用いて解析することにより、アジュバントの安全性評価に用いるバイオマーカー、加えて有効性の評価に用いるバイオマーカーの特定を目指す。

## B. 研究の方法

### (1)トキシコゲノミクスデータベースを活用したバイオマーカー探索

トキシコゲノミクスデータベースに格納されている情報を基に、免疫系への影響を予測するバイオマーカーの抽出を行った。解析では、実験条件下において血球系への影響が殆ど認められない化合物を陰性対照群、免疫抑制効果が知られている化合物群を陽性対照群とし、T検定とブートストラップ法を用いて特徴遺伝子を抽出した後、サポートベクターマシン(SVM)により判別モデルを構築した。

### (2)アジュバント投与ラットのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

本研究は、国立感染症研究所血液・安全性研究部(研究分担者)との連携の下で遂行している。平成 24 年度は、広く一般的に

用いられているアラムアジュバント(Alum)及び障害性の強い Freund's complete adjuvant (FCA)をデータ収集アジュバントに選択して動物実験を実施した。実験方法の概略は以下の通りである。

① 動物実験

ラットへのアジュバント投与及び臓器の採取は国立感染症研究所血液・安全性研究部において行われた。試験デザインを表1に示す。採取した肝臓、腎臓、脾臓、肺及び筋肉は、RNA later (Ambion)に 4℃で一晩浸漬後、-80℃にて凍結保存した。

② total RNA の抽出・精製

RNA later 中で凍結保存されていたサンプルから RNA later を除去後、RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。破砕液に TRIZOL LS、クロロホルムを添加して水層を分取し、RNeasyキット(Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。一部をアガロースゲル電気泳動することにより RNA の純度及び分解の有無を確認した。

③ GeneChip<sup>®</sup>解析

解析はアフィメトリクス社のプロトコールに従って行った。total RNA 5 µg を取り、T7-oligo dT プライマーを用いて逆転写し一本鎖 cDNA を合成した。さらに T4 DNA polymerase により、二本鎖 DNA を合成・精製した。次に IVT 反応により標識化された cRNA を合成・精製後、300-500bp となるように断片化し、ターゲット液とした。断片化の前後で吸光度測定及び電気泳動を行い、純度及び分解の有無を確認した。ターゲット液を Rat Genome 230 2.0 array に 45℃にて

18 時間ハイブリダイゼーションし、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンで染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。

遺伝子発現データの群内再現性及び変動は、スクアッタープロットにより確認した。

④ 判別モデルの構築

投与 6 時間後の遺伝子発現プロファイルを陽性対照群とし、(1)で設定した血球系に影響が少ない化合物群を陰性対照群とすることで、(1)と同様に SVM 判別モデルを構築した。

(3)アジュバント投与マウスのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

本研究は、医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト(研究代表者)との連携の下で遂行している。平成 24 年度は、Advax を単回腹腔内投与したマウスより、投与 6 及び 24 時間後に肝臓、腎臓、脾臓及び肺を採材し、各臓器の遺伝子発現データを取得した。動物実験はアジュバント開発プロジェクトにおいて行われ、遺伝子発現データの取得は(2)ラットと同様にして行った。

得られた遺伝子発現データについては、まず溶媒対照群と Advax 投与群の間で T 検定を行い、有意に発現変動している遺伝子を確認した。次にマウスとラットの間で簡便なオーソログ遺伝子置換を行った後、Advax 投与 6 時間後のマウス肝臓での遺伝子発現プロファイルにおいて 2 倍以上発現変動している遺伝子群及び(2)ラットで特定した特徴遺伝子と重複して

いる遺伝子群を抽出し、SVM 判別モデルを再構築した。さらに、同モデルを用いて、トキシコゲノミクスデータベースに格納された化合物情報をテストセットとし、アジュバント性能をもつ化合物の予測を行った。

#### (4)アジュバントワクチンの臨床試験検体より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索

本研究は、医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト(研究代表者)との連携の下で遂行している。平成 24 年度は、アラムアジュバントを含有する全粒子 H5N1 プレパンデミックワクチンの小児臨床試験サンプル(血清)より取得したマイクロ RNA データを用いてバイオマーカーの同定を試みた。臨床試験及び東レの 3D-Gene<sup>®</sup> チップによるマイクロ RNA データの取得は、アジュバント開発プロジェクトにおいて遂行された。バイオマーカー探索における有効性及び安全性の指標は、それぞれアジュバントワクチン接種後の抗体価上昇及び発熱とした。解析には、アジュバントワクチン接種前の血清 85 検体のマイクロ RNA 発現データを用い、抗体価上昇群(70 例)と非上昇群(15 例)、及び発熱群(34 例)と非発熱群(51 例)に分類し、それぞれについて T 検定とブートストラップ法により特徴的に変動するマイクロ RNA の抽出を行った。

#### (5)次世代シーケンサーを用いたヒト血清中マイクロ RNA 測定方法の確立

平成 24 年度は、少量(癌研究の分野などでは一般的に 5-10mL 程度の血清を使用)のヒト血清からの total RNA の抽出及び精製条件の検討を行った。実験方法の概略は以

下の通りである。

- ① Human True A serum (BIOPREDIC International)より、miRNAeasy Serum / Plasma kit (Qiagen)もしくは NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel)を用いて total RNA を抽出及び精製した。
- ② 得られた total RNA 全量について、TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina)もしくは NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs)を用いて、ライブラリーの調整を行った。
- ③ 得られたライブラリーを自動 DNA 断片ゲル抽出システム Pippin Prep (Sage Science)により、21-25 塩基の micro RNA と adapter 配列からなる 140 - 150 塩基付近で分画した。
- ④ サイズ分画したライブラリーを次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)によりシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料を用いる場合は試料提供者に一切不利益・危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的等を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行われた。

動物実験については、施設(国立感染症研究所、医薬基盤研究所)の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施され、倫理審査の承諾を得て行われた。

## C. 研究結果

### (1)トキシコゲノミクスデータベースを活用したバイオマーカー探索

構築した SVM 判別モデルは、学習セットの陽性対照群と陰性対照群に対して、比較的高い判別性能を示した(図1)。抽出したマーカー遺伝子の生物学的意義を確認したところ、その多くは免疫の作用機序に関わるものであった。当該モデルをトキシコゲノミクスデータベースに格納されている学習セット以外の化合物に対して適用したところ、LPS が陽性判定されるなど、免疫機構に影響を与える化合物を良好に判別した。

### (2)アジュバント投与ラットのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

先ず、各群内における再現性をスキッタープロットで評価した。データのばらつき傾向が、無処置群<溶媒対照群<Alum 投与群<FCA 投与群の順で認められたが、再現性は確保されていると判断した(図 2)。無処置群と溶媒対照群の比較から、生理食塩水投与の影響が確認されたが、その変動は小さく、アジュバント投与によって変動する遺伝子の解析に影響を与えるものではないと考えられた。

肝臓、腎臓、脾臓及び肺の中で、肝臓が最も変動遺伝子が多い傾向にあった。また腹腔内投与と筋肉内投与を比較した場合、腹腔内投与の方で多くの顕著に変動する遺伝子が認められた(論文投稿準備中のためデータ非公開)。Alum 及び FCA を腹腔内投与したラット肝臓における遺伝子発現データを陽性対照群、(1)で設定した血球系に影響が少ない化合物群を陰性対照群として SVM 判別モデルの構築を完了した。当該モ

デルをトキシコゲノミクスデータベースに格納されている化合物に対して適用したところ、LPS は陽性判定、免疫抑制作用を持つ化合物は陰性に判別した。

### (3)アジュバント投与マウスのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

(2)と同様、先ず各群内における再現性をスキッタープロットで評価した。投与 6 時間後の肝臓の結果を例として図 3 に示したが、本実験における再現性が確認された。

肝臓において有意に発現変動した遺伝子には、サイトカインを含む免疫系に関わる遺伝子が多くみられた。引き続き、マウスとラットのオーソログ遺伝子を用いた種差を超えた SVM 判別モデルの構築を進めており、関連してオーソログ遺伝子置換の方法及び特徴遺伝子選択等についての検討を行っている。

### (4)アジュバントワクチンの臨床試験検体より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索

アラムアジュバントを含有する全粒子 H5N1 プレパンデミックワクチン投与前の血清を用い、アジュバントワクチンの有効性及び安全性を予測するバイオマーカーの探索を行った。バイオマーカー探索における有効性及び安全性の指標は、それぞれアジュバントワクチン接種後の抗体価上昇及び発熱とした。解析の結果、抗体価上昇群と不変群で有意に発現差のあるマイクロ RNA が 33 種類、発熱と非発熱群で有意に発現差のあるマイクロ RNA が 34 種類抽出された。この中の 8 種類のマイクロ RNA については、他のイ

ンフルエンザワクチンの接種においても変動することが報告されており、アジュバントワクチンの種類を超えたバイオマーカーとなる可能性が示唆された(図 4)。

#### (5)次世代シーケンサーを用いたヒト血清中マイクロ RNA 測定方法の確立

NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina により調製されたライブラリーの品質をサイズ分画による精製の前後で Bioanalyzer 2100 High Sensitivity DNA Assay により確認した(図 5)。必要なマイクロ RNA の配列を含む DNA の塩基長は約 140-150 塩基であり、マイクロ RNA の配列を含まないアダプターダイマーは 120 塩基である。精製操作により、血清から調製したライブラリーに非常に多く含まれていたアダプターダイマー及びごく短い DNA を含むアダプターがかなり除去されていることが確認できた。

当ライブラリーを MiSeq でシーケンスし、MiSeq reporter によりアライメントを行った。その結果、反応の陽性対象として用いた脳 total RNA については、mature 及び precursor あわせて 20%以上がマイクロ RNA 由来の配列を示した。アライメントされなかった配列の多くは 10-15mer 程度の配列であった。血清 1mL を用いた測定では、1%未満と非常に少なかったものの、一般的に報告されている血清のマイクロ RNA の配列がシーケンスされていた。一方、血清 0.3mL を用いた測定では、リード数が極めて少なく、マイクロ RNA の種類も一般的に報告されているものとは異なっていた。

#### D. 考察

トキシコゲノミクスデータベースを活用したバイオマーカー探索では、免疫系への影響を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。今後、当マーカーの施設間での再現性を実証するため、プロジェクトで蓄積したデータを用いての評価だけではなく、外部データを用いた検証も進める必要があると考えている。

アジュバント投与ラット及びマウスのサンプルを用いたバイオマーカー探索研究では、両動物種のいずれにおいても、アジュバント投与の影響を反映する遺伝子発現の変動を捉えることができた。また、臓器による反応性の差異、投与経路、溶媒、サンプリング時間及び採材臓器の手法などの要因が遺伝子発現データに及ぼす影響などに係る基礎データの蓄積も達成することができた。当基礎データは、今後計画する動物実験のデザインを立案する上で貴重な情報になると考えられる。平成 24 年度では、ラットで 2 種(Alum、FCA)、マウスで 1 種(Advax)のアジュバントのデータの取得を実施し、当該データを用いてラットではアジュバントの影響を評価する判別モデルの構築を完了し、マウスではモデルの構築を進めている。引き続き、様々な種類のアジュバントのデータを取得してデータベース化することにより、単に予想性だけではなくロバストネスが保証された安全性及び有効性に係るバイオマーカーの抽出、ラットとマウスにおける反応性の種差の検討などが可能になると考えられる。

アジュバントワクチンの臨床試験検体より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索研究でも、発熱及び抗体価の上昇を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。本研究についても、引き続き臨

床サンプルのデータを取得してデータベース化することにより、予想性及びロバストネスを兼ね備えた安全性及び有効性に係るバイオマーカーの抽出が可能になると考えられる。

次世代シーケンサーを用いたヒト血清中マイクロ RNA 測定方法の検討では、使用サンプルの少量化を実現するための測定条件の最適化を試みた。検討は、0.3 mL と 1 mL の血清量について行った。その結果、1 mL の血清を用いた測定では、リード数に改善の余地があるものの論文で報告されているマイクロ RNA の検出を再現することができた。一方、0.3 mL のサンプル量では、改変した測定条件下でも僅かな数のマイクロ RNA しか検出することができなかった。今後、さらに感度を向上させるため、抽出効率の改善、ライゲーション反応の効率化及びサイズ分画法の改善などを進める予定である。

## E. 結論

トキシコゲノミクスデータベースを活用したバイオマーカー探索では、免疫系への影響を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。アジュバントワクチンの臨床試験検体より取得したマイクロ RNA データを用いたバイオマーカー探索研究でも、発熱及び抗体価の上昇を予測するバイオマーカー候補の抽出を完了した。アジュバント投与ラット及びマウスのサンプルを用いたバイオマーカー探索研究では、両動物種のいずれにおいても、アジュバント投与の影響を反映する遺伝子発現の変動を捉え、試験デザインを考察する上で重要となる基礎データの蓄積も達成できた。これらの蓄積したデータをデータベース化し、さらに充実させることにより、ア

ジュバントの有効性及び安全性の予測・診断を可能にするバイオマーカーの開発が達成できることが期待できる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Minowa Y., Kondo C., Uehara T., Morikawa Y., Okuno Y., Nakatsu N., Ono A., Maruyama T., Kato I., Yamate J., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., Toxicogenomic multigene biomarker for predicting the future onset of proximal tubular injury in rats, *Toxicology*, 297, 47-56, 2012

Yamada F., Sumida K., Uehara T., Morikawa Y., Yamada H., Urushidani T., Ohno Y., Toxicogenomics discrimination of potential hepatocarcinogenicity of non-genotoxic compounds in rat liver, *J. Appl. Toxicol.*, Online publication, 2012

Nakatsu N., Igarashi Y., Ono A., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T., Evaluation of DNA microarray results in the Toxicogenomics Project (TGP) consortium in Japan, *J. Toxicol. Sci.*, 37, 791-801, 2012

Uehara T., Kondo C., Morikawa Y., Hanafusa H., Ueda S., Minowa Y., Nakatsu N., Ono A., Maruyama T., Kato I., Yamate J., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., Toxicogenomic Biomarkers for Renal Papillary Injury in Rats, *Toxicology*, 303, 1-8, 2013

山田弘, トキシコゲノミクスとバイオマーカー, *日本薬理学雑誌*, 140, 221-225, 2012

笛木修, 戸倉新樹, 小野寺博志, 今井弘一, 細井一弘, 山田弘, 光毒性試験代替法の第三者評価報告 評価対象: 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の組み合わせ, AATEX-JaCVAM, 11, 45-87, 2012

## 2. 学会発表

山田弘, 医薬品安全性評価に用いる Mechanistic Tool Box の充実, 第 39 回日本毒性学会学術年会, シンポジウム: 臨床副作用と非臨床毒性の相関—種差を乗り越えて—(仙台), 2012.7.18

中津 則之, 五十嵐 芳暢, 山田弘, 漆谷徹郎, 大野泰雄, トキシコゲノミクスプロジェクトにおける対照群データの解析, 第 39 回日本トキシコロジー学会学術年会(仙台), 2012.7.19

森川裕二, 上原健城, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, トキシコゲノミクスによる肝臓の小胞体ストレス評価マーカーの探索, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

山下智也, 森敦, 川原拓馬, 山田弘, 漆谷徹郎, 大野泰雄, 大規模データベース, 解析, 毒性予測システム TG-GATEs の機能, 応用例の紹介, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

水川裕美子, 森川裕二, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ヒト肝細胞トランスクリプトームデータベースを用いたペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)  $\alpha$  アゴニストの検出とその検証, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

南圭一, 新田浩之, 上原健城, 上西千晶, 五十嵐芳暢, 神吉将之, 木野潤一, 阿部香織, 堀之内 彰, 小野敦, 山田弘, 漆谷徹郎, 大野泰雄, シスプラチン投与ラット尿サンプルにおける miRNA 発現解析, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台),

2012.7.19

南圭一, 上原健城, 林仁美, 三森国敏, 大村功, 神吉将之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ラット肝 2 段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究—4. レクチンアレイを用いた肝臓の糖鎖プロファイル解析, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

上原健城, 森川裕二, 林仁美, 三森国敏, 神吉将之, 大村功, 南圭一, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ラット肝 2 段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究—1. トキシコゲノミクス及び病理組織学的アプローチによる肝発がん物質のイニシエーション活性の検索, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

神吉将之, 上原健城, 林仁美, 三森国敏, 大村功, 南圭一, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ラット肝 2 段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究—2. 肝臓および血漿における網羅的マイクロ RNA 発現解析とバイオマーカー探索, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

大村功, 上原健城, 林仁美, 三森国敏, 神吉将之, 南圭一, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ラット肝 2 段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究—3. 次世代シーケンサーを用いた肝臓における網羅的 DNA メチレーション解析, 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.7.19

山田弘, 医薬品開発における安全性バイオマーカーの探索と応用, 薬物動態談話会(東京), 2012.7.25

上原健城, 堀之内彰, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, 薬剤誘発性腎障害の早期診断を可能とするメタボノミクスバイオマーカーの探索, 第7回メタボロームシン



ポジウム(山形), 2012. 10.10

山田弘, わが国におけるトキシコゲノミクス研究の歩み, 成果および今後の課題, 日本臨床薬理学会学術総会(沖縄), 2012.12.1

Nakagawa S., Nishihara K., Sato T., Miyata H., Matsubara T., Iehara N., Igarashi Y., Yamada H., Fukatsu A., Yanagita M., Matsubara K., Masuda S., Novel sets of genes correlated with progressive tubular damage and tubulointerstitial fibrosis in patients with chronic kidney disease, American Society of Nephrology Annual Meeting (San Diego, US), 2012.10.30-11.4

中津 則之, トキシコゲノミクス手法のアジュバント開発への応用, 第6回次世代アジュバント研究会(大阪), 2013.1.16

五十嵐芳暢, インフルエンザワクチンの有効性と安全性のための血清中 miRNA 発現解析, 第6回次世代アジュバント研究会(大阪), 2013.1.16

山田弘, 医薬品・機能食品の安全性, 第21回琉球実験動物研究会(沖縄), 2013.1.26

Okubo S., Miyamoto M., Takami K., Kanki M., Ono A., Nakatsu N., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., Identification and quantitative evaluation of novel circulating liver-specific mRNAs in rats treated with various hepatotoxic compounds: validation for biomarkers of drug-induced liver injury, 52nd Society of Toxicology Annual Meeting (San Antonion, US), 2013.3.12

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予

#### 定も含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 ラットを用いたアジュバント投与実験のデザイン

	被験物質	投与部位	投与用量	採材時間	採材臓器
1	Alum	IP	0, 2.5mg/匹	6, 24h	肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓
2	FCA	IP	0, 0.25mg/匹	6, 24h	肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓
3	Alum	IM	0, 0.25mg/匹	6, 24h	肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 筋肉
4	FCA	IM	0, 0.05mg/匹	6, 24h	肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 筋肉

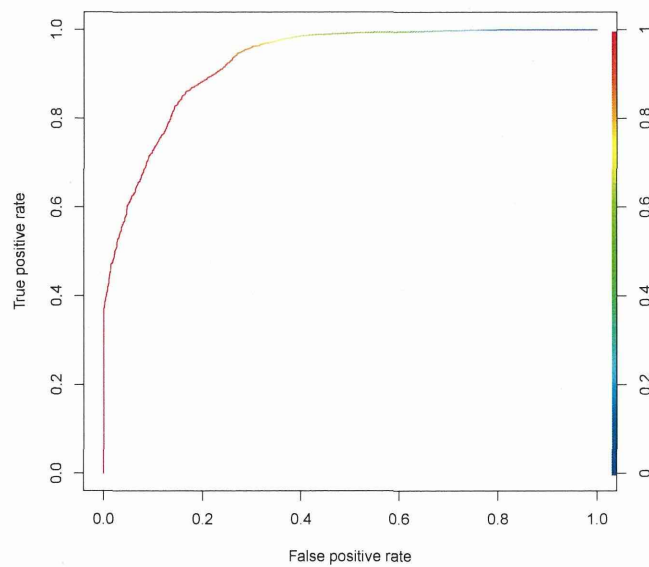


図1 免疫系への影響を判別する SVM モデルのトレーニングセットにおける判別性能 (右 Y 軸の色は閾値の値を示す)

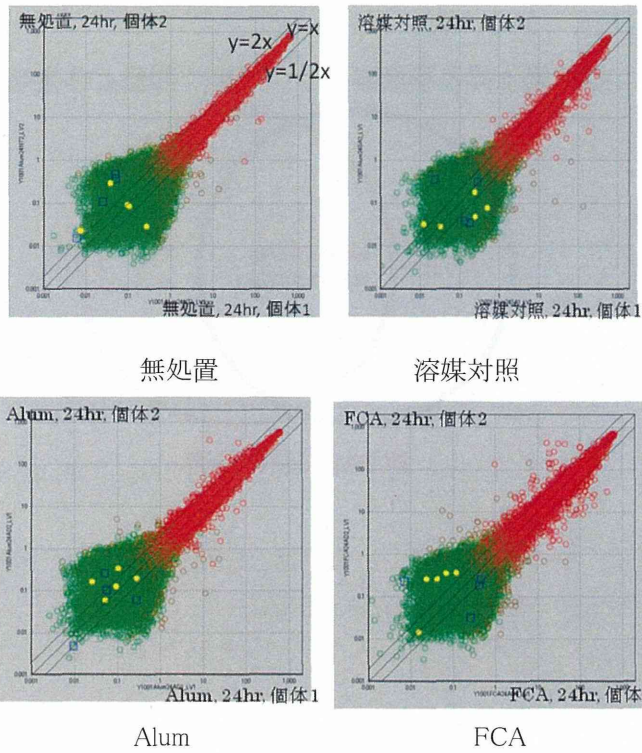


図2 無処置群、溶媒対照群、Alum 投与群、FCA 投与群の肝臓における遺伝子発現の  
 スキャッタープロット

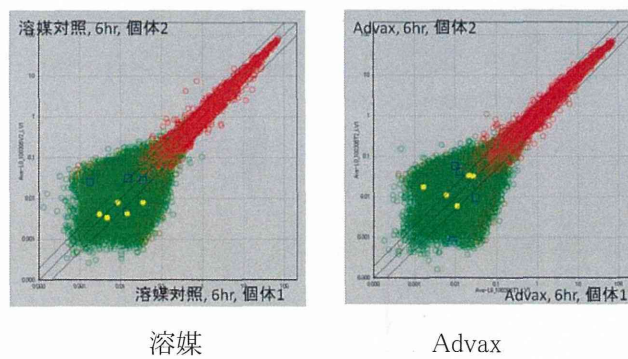


図3 溶媒対照群、Advax 投与群の肝臓における遺伝子発現のスクアッタープロット

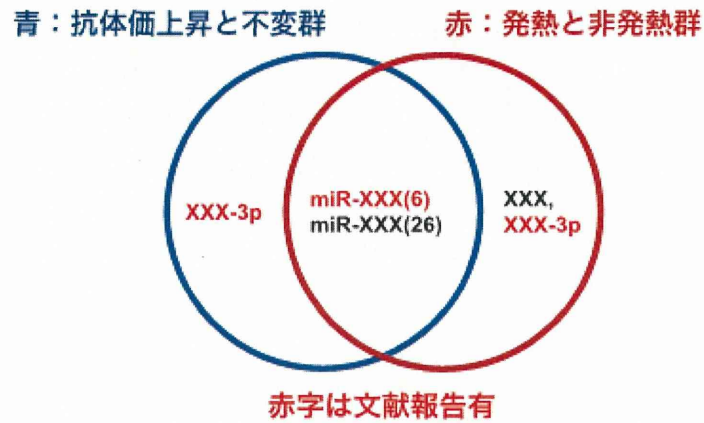


図4 H5N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性を投与前に予測するためのバイオマーカー候補(ヒト血清中 miRNA)

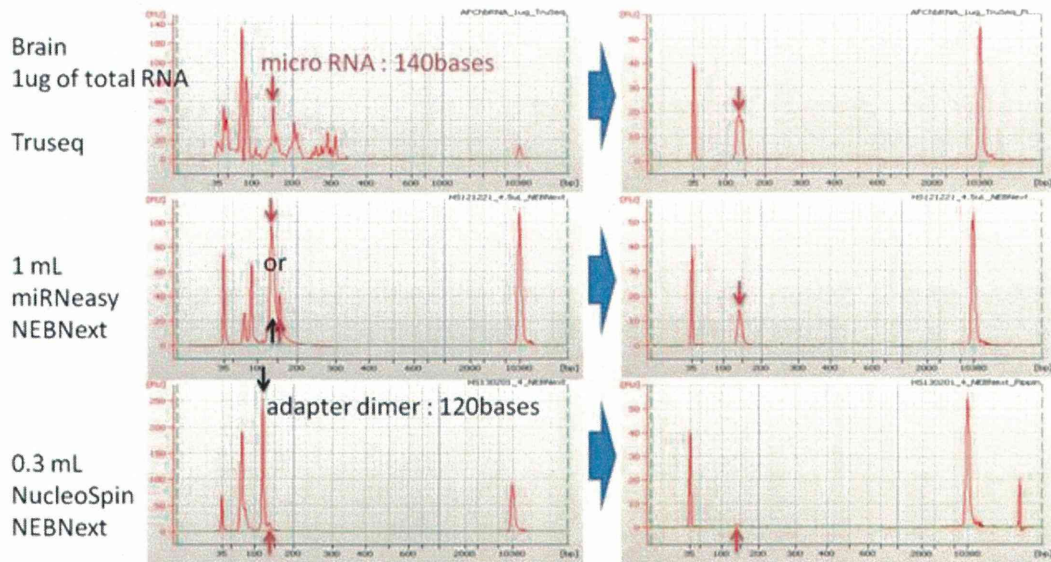


図5 サイズ分画前後におけるライブラリの品質確認  
(横軸は塩基長を、縦軸はその塩基長における DNA 量を示す)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

バイオインフォマティクスによるアジュバントデータベースプロジェクト支援

研究分担者 水口 賢司

独立行政法人 医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト  
プロジェクトリーダー

### 研究要旨

アジュバントデータベースプロジェクトでは、各種アジュバントによる生体レベルでの生物学的反応を総合的に解析したデータベースを構築する。本プロジェクトを通じて得られる多種多様な実験データを、幅広いバイオインフォマティクス技術により解析し、アジュバントの安全性や有効性の指標となるバイオマーカー発見を可能にするデータベースを構築することが本分担研究の目的である。

### A. 研究目的

アジュバントデータベースプロジェクトを通じて得られる膨大なデータの解析、そこから知識抽出、予測システムの構築を行う上で、バイオインフォマティクス技術は必須と言える。本分担研究では、遺伝子発現解析、パスイエイ解析、タンパク質立体構造解析などのバイオインフォマティクス解析手法を応用し、アジュバントデータベースの構築、及び新規アジュバントの開発を支援することを目的としている。具体的には、本年度は以下に挙げる二項目に注力した研究を行った。

#### 1. H5N1 インフルエンザワクチン治験被験者血清中のマイクロ RNA 発現解析

マイクロ RNA(miRNA)は 20~25 塩基の長さを持つノンコーディング RNA であり、メ

ッセンジャーRNA に結合し、遺伝子発現調節を介して細胞機能をコントロールすることが知られている。miRNA は血清中に安定して存在することが示されており [Clin Chem 56(11):1733-1741, 2010]、B 型肝炎 [J Viral Hepat 19(2):e58-65, 2012]や結核 [J Clin Microbiol 49(12):4246-51, 2011]など様々な感染症との関連が報告され始めている。そのような背景から、血清中 miRNA 発現量はアジュバントワクチンの「有効性」、及び「安全性」に対する有効な評価指標(バイオマーカー)となることが期待される。20 歳未満の被験者 346 名を対象に行われた、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを添加した沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 治験の結果、8 割以上の被験者において「免疫原性上昇」が観測されたのに対し、5 割以上の被験者で「発熱」が観測された。この治験で用い

られたアジュバントワクチンが誘発する「免疫原性上昇」や「発熱」などのフェノタイプと、被験者血清中 miRNA の関連性を調査し、miRNA のバイオマーカーとしての可能性を推し量ることが本研究の目的である。

## 2. DMXAA と STING のインシリコ・ドッキング実験

5,6-ジメチルキサンテン-4-酢酸 (DMXAA) は腫瘍血管破壊性の抗癌剤として開発された低分子化合物であり、TBK1-IRF3 パスウェイの活性化を介して I 型インターフェロン産生を誘導することが知られている [J Exp Med 204:1559-1569, 2007]。アジュバント開発グループ (石井健プロジェクトリーダー) によって行われた一連の実験により、DMXAA はマウスに対して高いアジュバント活性を示すことが判明し [PLoS One 8(3):e60038, 2013]、新規アジュバントとしての応用が期待されている。しかし、DMXAA の TBK1-IRF3 パスウェイ活性化メカニズムに関しては、標的タンパク質も含め、不明な点が多く残されている。一方、小胞体膜タンパク質である STING は、細菌由来のシグナル分子 bis-(3'-5')-サイクリックグアノシンリン酸 (c-di-GMP) を認識・結合することで、下流の TBK1-IRF3 パスウェイを活性化することが知られている [Nature 478(7370):515-8, 2011]。興味深いことに、STING ノックアウトマウス実験では、c-di-GMP と同様 DMXAA による I 型インターフェロン産生誘導の著しい低下が観測された。つまり、DMXAA は c-di-GMP と同じ認識機構で STING に結合し、TBK1-IRF3 パスウェイを活性化している可能性がある。

この仮説を、インシリコ・ドッキング (計算機によるリガンドとタンパク質の結合予測) を用いて検証することが本研究の目的である。

## **B. 研究方法**

### 1. H5N1 インフルエンザワクチン治験被験者血清中のマイクロ RNA 発現解析

H5N1 インフルエンザワクチン治験を通じて得られた被験者 115 名のワクチン投与前血清 (pre-serum)、及び投与後血清 (post-serum) 中の miRNA 発現値を、(株) 東レの miRNA マイクロアレイ (3D-gene) を用いて網羅的に測定した。次に、pre-serum と post-serum の miRNA 発現値の log2 変動比を計算することにより、miRNA 変動プロファイルを作成した (図 1 参照)。次に、被験者データをそのフェノタイプに基づいて陽性、または陰性の二つのグループへ分類し、陽性グループにおいて変動比が一定方向へ有意に変化している miRNA を選別するスコア関数を設計した。更に、miRNA 変動プロファイルによってどの程度フェノタイプが正しく識別できるかをテストするために、Leave One Out Cross Validation (LOOCV) を行った。LOOCV の手順は以下 3 ステップから構成される。

(1) 115 名のデータから 1 名のデータをテストデータとして取り出し、残り 114 名のデータを訓練データとする。

(2) 訓練データに対し、設計したスコア関数を用いて、各 miRNA のスコアを計算し、スコア上位 20 種の miRNA を選択する

(3) テストデータと訓練データのスコア上位 20 種の miRNA プロファイルを比較す

ることにより、テストデータのフェノタイプを予測する。予測フェノタイプと実際のフェノタイプを照合することにより正解または不正解を判定する。

以上(1)~(3)の操作を、全ての被験者が1回ずつテストデータになるよう、計115回繰り返すことにより、フェノタイプ識別精度(115回の内の正解回数)を計算した。そして、LOOCVを通じて常に上位にランクされたmiRNAをフェノタイプ関連miRNAとして検出した。

## 2. DMXAA と STING のインシリコ・ドッキング実験

タンパク質立体構造データベース Protein Data Bank からヒト由来の STING と c-di-GMP の複合体結晶構造を選び、これをドッキングのソースデータとして用いた。ドッキングプログラムには、タンパク質-低分子化合物ドッキングにおいて最も良く用いられる AutoDock Vina を採用した。AutoDock では、受容体であるタンパク質は剛体(3次元配座は常に固定)として扱われる一方、リガンドである低分子化合物の柔軟性(3次元配座は可変)を考慮したドッキングを行うことができる。最初に、結晶構造中で STING に結合している c-di-GMP を引き離し、空になった STING をドッキング受容体とした。次に、AutoDock を用いて、下記の2つのドッキングテストを行った。

(1) AutoDock の性能評価、及び c-di-GMP の STING に対する結合親和性を見積もるため、引き離された c-di-GMP を STING へドッキングさせた。

(2) DMXAA が STING へ結合する可能性、及びその結合部位を予測するため、DMXAA

を STING へドッキングさせ、c-di-GMP のドッキング結果と比較した。

## C. 研究結果

### 1. H5N1 インフルエンザワクチン治験被験者血清中のマイクロ RNA 発現解析

提案手法を用いて、二種類のフェノタイプ識別テストを行った。

(1) 発熱識別テスト(陽性群:発熱被験者 vs 陰性群:非発熱被験者)

(2) 免疫原性上昇識別テスト(陽性群:免疫原性上昇被験者 vs 陰性群:免疫原性非上昇被験者)

その結果、発熱識別テストにおいては80%、免疫原性上昇識別テストにおいては73%の正解率でフェノタイプを識別することができた。検出されたフェノタイプ関連 miRNA の中には、既知の感染疾患関連 miRNA のみならず、これまでに疾患との関連が報告されていないものも含まれていた。

### 2. DMXAA と STING のインシリコ・ドッキング実験

STING 構造から引き離された c-di-GMP を STING へ再度ドッキングさせた結果、c-di-GMP は元の位置(結晶構造上の c-di-GMP の位置)へ正確に結合することを確認した。また、その際の計算による結合親和性をコントロール値として設定した。次に、DMXAA を STING へドッキングさせた結果、最も結合親和性の高い20個の予測構造の内、17個は c-di-GMP 結合領域へ結合していた(図2A参照)。更に、その中の4つの予測構造では、DMXAA は c-di-GMP のグアニン環と空間的に良く重なる位置へ結

合していた (図 2 B 参照)。c-di-GMP のグアニン環と STING が形成する相互作用は、c-di-GMP と STING の結合にとって必要だと考えられており、この点において、DMXAA は c-di-GMP と同様の結合様式を示している点で興味深い。しかし、DMXAA の STING に対する結合親和性 (予測値) は、最大でも c-di-GMP の STING に対する結合親和性と比較して、はるかに低い値を示した。

## D. 考察

### 1. H5N1 インフルエンザワクチン治験被験者血清中のマイクロ RNA 発現解析

miRNA 発現変動プロファイルを用いることにより、アジュバントワクチンが誘発する「発熱」を 80%、「免疫原性上昇」を 73%の正解率で識別できることを示した。フェノタイプ識別精度を更に改善するためには、「年齢」や「性別」などのより詳細な被験者情報を識別モデルに取り込む必要があると考えている。今後は、特定されたフェノタイプ関連 miRNA の標的遺伝子とそれらの関連パスウェイに着目し、今回のアジュバントワクチンが誘発するフェノタイプを分子レベルで理解することを目指している。

### 2. DMXAA と STING のインシリコ・ドッキング実験

インシリコ・ドッキングの結果からは、DMXAA は STING の c-di-GMP 結合領域へ直接結合する可能性があることが示唆された。しかし、その結合親和性は c-di-GMP のものと比較して低いため、安定した結合を維持することは難しいと推察される。最近の報

告によれば、DMXAA による I 型インターフェロン産生誘導はヒトにおいては起こらないと言われている。今後は、ヒトとマウスの STING 構造比較、ドッキング結果比較を行い、STING のリガンド認識において鍵となるアミノ酸を特定することが優先課題と考える。そのようなアミノ酸の特定は、DMXAA のヒトとマウスに対する効果の差異を明らかにするのみならず、DMXAA よりも有効に働く新規アジュバントの開発に結びつくと考えられる。また、今回は DMXAA の標的タンパク質として STING にのみ着目したが、I 型インターフェロン産生パスウェイに携わる他のタンパク質も標的タンパク質の候補として評価する予定である。

## E. 結論

血清中 miRNA 発現解析においては、アジュバントワクチンが誘発するフェノタイプと関連性の高い miRNA を複数同定した。同時に、それら miRNA の発現変動プロファイルを比較することにより、一定の精度でフェノタイプを識別できることも示した。これらの miRNA は、ワクチンの「有効性」・「安全性」を特徴付けるバイオマーカーとして機能することが期待できる。DMXAA の標的タンパク質予測においては、弱い結合親和性ながらも、DMXAA が STING へ直接結合することが可能であることを示した。



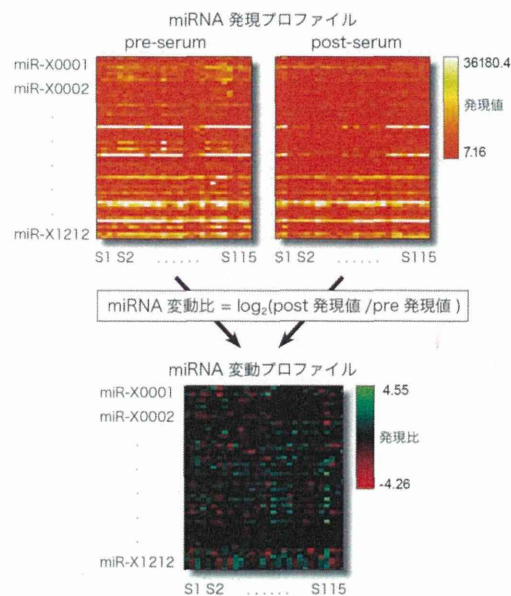


図1 miRNA 変動プロフィールの作成

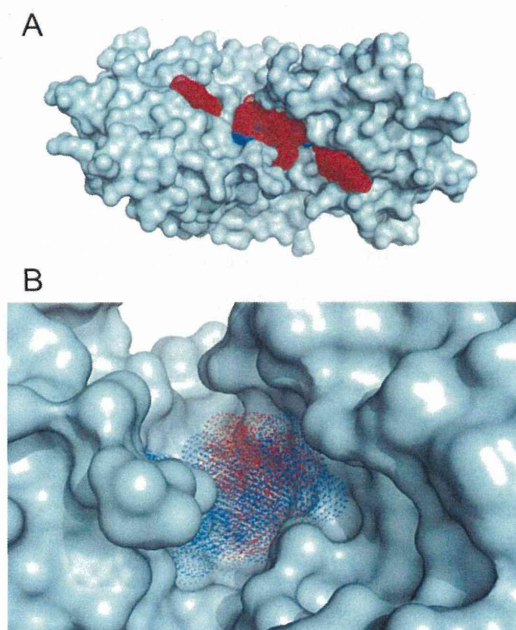


図2 AutoDockによるDMXAAとSTINGのドッキングテスト

ヒト STING の立体構造はシアン色、結晶構造中でSTINGに結合している c-di-GMP は青色でそれぞれ示している。(A) STING 構造

全体図。AutoDock によって予測された結合親和性が最も高い 20 個の結合領域を赤色で示している。(B) c-di-GMP 結合領域拡大図。c-di-GMP のグアニン環と最も良く空間的に重なる DMXAA の予測結合領域を赤色で示している。(未発表のため相互作用の詳細は省略)。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ihara S., Kida H., Arase H., Tripathi L., Chen Y. A., Kimura T., Yoshida M., Kashiwa Y., Hirata H., Fukamizu R., Inoue R., Hasegawa K., Goya S., Takahashi R., Minami T., Tsujino K., Suzuki M., Kohmo S., Inoue K., Nagatomo I., Takeda Y., Kijima T., Mizuguchi K., Tachibana I., Kumanogoh A., Inhibitory roles of signal transducer and activator of transcription 3 in antitumor immunity during carcinogen-induced lung tumorigenesis, *Cancer Research*, 72(12); 2990-9, 2012
- (2) Blower T. R., Short F. L., Rao F., Mori T., Mizuguchi K., Pei X. Y., Fineran P. C., Luisi B. F., Salmond G. P., Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin

- systems encoded in chromosomal and plasmid genomes, *Nucleic Acids Research*, 40(13):6158-73, 2012
- (3) Tripathi L., Kambara H., Moriishi K., Morita E., Abe T., Mori Y., Chen Y. A., Matsuura Y., Mizuguchi K., Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study, *Journal of Proteome Research*, 11(7):3664-79, 2012
- (4) Nagao C., Izako N., Soga S., Khan S. H., Kawabata S., Shirai H., Mizuguchi K., Computational design, construction, and characterization of a set of specificity determining residues in protein-protein interactions, *Proteins*, 80(10):2426-36, 2012
- (5) Keeble G., Nystrom J., Bellgard M., Mizuguchi K., An Open Framework for Extensible Multi-Stage Bioinformatics Software, (proceedings of the 7th International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics (PRIB 2012) Lecture Notes in Bioinformatics (LNBI) 7632: 106-117, 2012
- (6) Morita M., Igarashi Y., Ito M., Chen Y. A., Nagao C., Sakaguchi Y., Sakate R., Masui T., Mizuguchi K., Sagace: A web-based search engine for biomedical databases in Japan, *BMC Research Notes*, 31;5(1):604, 2012
- (7) Tripathi L., Mizuguchi K., A combined proteomics and computational approach provides a better understanding of Hepatitis C virus-induced liver disease, *Expert Reviews of Proteomics*, 9(5):493-496, 2012
- (8) Tiwari P., Tripathi L., Nishikawa-Matsumura T., Ahmad S., Isobe T., Soken-Nakazawa J. S., Mizuguchi K., Yoshizaki K., Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor STAT3 in Serum amyloid A gene promoter, *BBA - General Subjects*, 1830(6):3650-55, 2013
- (9) Tang C. K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Dessailly B. H., Kuroda E., Akira S., Mizuguchi K., Coban C., Ishii K., The chemotherapeutic agent DMXAA is a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant, *PLOS One*, 8(3):e60038, 2013
- (10) Dessailly B. H., Dawson N. L., Mizuguchi K., Orengo C. A., Functional Site Plasticity in

Domain Superfamilies, BBA - Proteins and Proteomics, 1834(5):874-89, 2013

- (11) Hutchins A. P., Diez D., Takahashi Y., Ahmad S., Jauch R., Tremblay M. L., Miranda-Saavedra D., Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions, Nucleic Acids Research, 1;41(4):2155-70, 2013

## 2. 学会発表

### 【国際学会】

- (1) Keeble G., Nystrom J., Bellgard M., Mizuguchi K., An Open Framework for Extensible Multi-Stage Bioinformatics Software, The 7th International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics (PRIB) 2012, Tokyo, Japan, 2012.11.9
- (2) Yoshizaki K, Tiwari P, Tripathi L., Ahmad S., Mizuguchi K., Nishikawa-Matsumura T, Isobe T, Soken-Nakazawa J. S., Basic and Clinical Significance of Interleukin 6 (IL-6) in AA Amyloidosis with RA, the 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, D.C, USA, 2012.11.11

(3) Ahmad S., A meta-analysis of public microarray datasets to detect differential expression of heat shock proteins in children, Biomarker Discovery Conference 2012, Shoal Bay NSW, Australia, 2012.12.6

(4) Ahmad S., Mizuguchi K., A sliding-probe model for predicting partner aware protein-protein interaction sites, The 23<sup>rd</sup> International Conference on Genome Informatics (GIW 2012), Tainan, Taiwan, 2012.12.13

### 【国内学会】

- (5) 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司, 活性部位とリガンド結合部位の情報を用いた酵素の機能予測法の開発, 第12回日本蛋白質科学会, 名古屋, 2012.6.21【ポスター発表】
- (6) 長尾知生子, 水口賢司, 酵素の多機能性に関する解析, 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2012.9.22【ポスター発表】
- (7) 水口賢司, 増井徹, 坂手龍一, 坂口由希, 五十嵐芳暢, 長尾知生子, 陳怡安, 伊藤真和吏, 医薬基盤研究所のデータベースと横断探索システム 'Sagace', 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11-14【ポスター発表】

【シンポジウム、ワークショップ等】

- (8) 長尾知生子, NGSに期待すること, NGS現場の会 第2回研究会, 大阪, 2012. 5. 24 【一般講演】
- (9) 水口賢司, 創薬支援とバイオインフォマティクス, 第14回大阪大学医工情報連携シンポジウム, 大阪, 2012. 7. 25 【招待講演】
- (10) 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース開発と統合: 医薬基盤研究所における取り組み, トーゴの日シンポジウム2012, 東京, 2012. 10. 5 【招待講演】
- (11) 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 山田弘, 水口賢司, Open TG-GATEsのRDF化によるデータ統合, トーゴの日シンポジウム2012, 東京, 2012. 10. 5 【ポスター発表】
- (12) 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, TargetMine, a data warehouse system for target discovery, トーゴの日シンポジウム2012, 東京, 2012. 10. 5 【ポスター発表】
- (13) 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂口由希, 坂手龍一, 増井徹, 水口賢司, 創薬・疾患研究のための生命科学分野のデータベース一括横断検索 Sagace, トーゴの日シンポジウム2012, 東京, 2012. 10. 5 【ポスター発表】
- (14) Tomii K., Ito J., Tabei Y., Shimizu K., Tsuda K., PoSSuM: A Database for Predicting Protein-Ligand Interactions, 生命医薬情報学連合大会 2012, 東京, 2012. 10. 15 【ベストポスター賞】
- (15) 水口賢司, 生体膜周辺のネットワークと創薬支援バイオインフォマティクス, 第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 京都, 2012. 11. 15 【招待講演】
- (16) Nystrom J, トキシコゲノミクスのRDFアプリケーション, バイオハッカソン (BH12. 12), 東京, 2012. 12. 20 【一般講演】
- (17) 水口賢司, 医薬基盤研究所のデータベースと創薬研究: Open TG-GATEs と TargetMineを中心として, 平成24年度第3回データベース講習会@大阪「創薬研究における統合データベースの活用」, 大阪, 2012. 12. 26 【招待講演】
- (18) 水口賢司, 創薬につながるバイオインフォマティクス, 統合データベース講習会: A J A C S 駿河, 静岡, 2013. 1. 13 【招待講演】
- (19) Ahmad S., Mizuguchi K., Expression profiles of stress-response genes and related miRNAs: implications for Adverse Effects Following Immunization (AEFI), 第6回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013. 1. 16 【ポスター発表】
- (20) 伊東純一, 水口賢司, インフルエンザワクチン治験から得られた血清中miRNAの発現解析, 第6回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013. 1. 16 【ポスター発表】