

より、血液学的検査値の変動と相関して動く遺伝子群の存在が確認できた。

### (3) アジュバントデータベースのメタデータの整備

計画したメタデータ構造の改良及びメタデータ作成の半自動化の実装を完了した。

#### D. 考察

ラット及びマウスに共通して、Poly I:C、FK565、MALP2s 及び R848 曝露により、炎症性細胞や傷害によりネクロシスを起こした細胞より放出される内因性の DAMPs である S100a8、S100a9 及び heat shock protein 関連遺伝子が発現上昇した。マウスでは cdiGMP 及び 2'3'cGAMP においても、これらの遺伝子が発現上昇していた。一方、FK565 では、Poly I:C 及び MALP2s に比してインターフェロン下流遺伝子の発現変動が極めて軽度であった。FK565 はインターフェロン系の活性化能が極めて弱いことが知られており、当該差異の要因になっている可能性がある。本年度の研究により、幾つかのアジュバントで共通して発現変動する遺伝子群、特定のアジュバントで特異的に発現変動する遺伝子群など、様々な形でアジュバントを特徴付ける遺伝子群が抽出された。これらには DAMPs、インターフェロン系、TLR 系などに係る遺伝子群が含まれており、免疫メカニズムに基づく有効性及び安全性バイオマーカーの探索に応用できるものと期待

できる。今後、アジュバントや遺伝子に対する階層的クラスタリング等の各種分類を行う解析手法を適用することにより、類似するメカニズムを持つアジュバントのグループ化などについても検討を進める予定である。加えて、血液学的検査値の変動と相関して動く遺伝子群の存在が確認できたことから、引き続き、メカニズムの解釈を含めた検討を継続する。

計画したアジュバントデータベースのメタデータの整備作業を完了した。当該達成は、データベース構築における作業効率の向上に寄与するものと考えられる。今後、データベースに登録するアジュバントの特性(物性、受容体等)に係るメタデータの整備を進める予定である。

#### E. 結論

アジュバント投与ラット及び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研究では、年度で計画された動物実験が全て完了した。ラットでは 14 種のアジュバント、マウスでは 23 種のアジュバント投与による遺伝子発現データを比較解析したところ、幾つかのアジュバントで共通して発現変動する遺伝子群、特定のアジュバントで特異的に発現変動する遺伝子群など、様々な形でアジュバントを特徴付ける遺伝子群が抽出された。これらには DAMPs、インターフェロン系、TLR 系などに係る遺伝子群が含まれており、免疫メカニズムに基づく有効性及び安全性バイオマ

ーカーの探索に応用できるものと期待できる。加えて、血液学的検査値の変動と相関して動く遺伝子群の存在が確認できた。

計画したアジュバントデータベースのメタデータの整備作業を完了した。当該達成は、データベース構築における作業効率の向上に寄与するものと考えられる。引き続き、必要に応じて改良を検討する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Onishi, M., Ozasa, K., Kobiyama, K., Ohata, K., Kitano, M., Taniguchi, K., Homma, T., Kobayashi, M., Sato, A., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Wijaya, E., Igarashi, Y., Nakatsu, N., Ise, W., Inoue, T., Yamada, H., Vandenberg, A., Standley, DM., Kurosaki, T., Coban, C., Aoshi, T., Kuroda, E., and Ishii, KJ. (in press). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh 5 responses to the coadministered antigen. *J. Immunol.*

Igarashi, Y., Nakatsu, N., Yamashita, T., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T. and Yamada, H. (2015). Open T G-GATEs: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic acids research* 43(Database issue), D921-7.

Hanafusa, H., Morikawa, Y., Uehara, T., Kaneto, M., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Comparative gene and protein expression analyses of a panel of cyto

kines in acute and chronic drug-induced liver injury in rats. *Toxicology* 324, 43-54.

Minami, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Omura, K., Kanki, M., Horinouchi, A., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). miRNA expression atlas in male rat. *Scientific Data* 1, 10.1038/sdata.2014.5.

Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression of rat liver in a 2-stage hepatocarcinogenesis model. *J Toxicol Sci* 39(6), 837-48.

Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats. *J Toxicol Sci* 39(5), 785-794.

Saito, K., Maekawa, K., Ishikawa, M., Senoo, Y., Urata, M., Murayama, M., Nakatsu, N., Yamada, H. and Saito, Y. (2014). Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicological Sciences* 141(2), 377-386.

Uehara, T., Horinouchi, A., Morikawa, Y., Tonomura, Y., Minami, K., Ono, A., Yamate, J., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Identification of metabolomic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats. *Journal of applied*

toxicology : JAT 34(10), 1087-1095.

## 2. 学会発表

### 【招待講演】

山田弘, Overview:トキシコゲノミクスプロジェクト, 第41回日本毒性学会年会, トキシコゲノミクスの活用例と今後の展開(神戸), 2014.7.

山田弘, 堀井郁夫, 第41回日本毒性学会年会, 日本毒性学会&日本中毒学会合同シンポジウム 急性中毒の予後に影響するバイオマーカーの臨床および基礎毒性学的な考察(神戸), 2014.7.

Yamada H., Future approach for safety assessment / evaluation with new science & technology, International Workshop of Nonclinical Safety Studies for Human Clinical Trials (Seoul, Korea), 2014.11.

山田弘, 大規模トキシコゲノミクスデータベースを活用した安全性バイオマーカー探索, 第8回ラットリソースリサーチ研究会(京都), 2015.1.

### 【ポスター発表】

中津則之, 五十嵐芳暢, 青枝大貴, 石井健, 山田弘, 麻酔剤としてのインフルラン, ジエチルエーテル, ペントバルビタールがラット肝遺伝子発現に及ぼす影響についての検討, 第41回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

五十嵐芳暢, Johan T Nystrom-Persson, 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxigetes:トキシコゲノミクスデータ解析プラットフォームの実装, 第41回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

坂手龍一, 深川明子, 水口賢司, 山田弘, 増井徹, 塩谷恭子, 松田潤一郎, 宮本恵宏, 松山晃文, 創薬・疾患研究のための生物資源・疫学研究データベースの開発, トーゴの日シンポジウム2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, Johan T. Nystrom-Persson, 山田弘, 石井健, 水口賢司, アジュバントデータベースの開発とトキシコゲノミクスデータの統合に向けて, トーゴの日シンポジウム2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, 安全性評価モデルのアジュバント遺伝子発現情報への適用に向けて, 第8回次世代アジュバント研究会(大阪), 2015.1.

## 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デザイン及び遺伝子発現データ取得状況

	被験物質	投与部位	採材時間	採材臓器
1	Advax	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
2	Murabutide	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
3	cdiGMP	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
4	2'3'cGAMP	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
5	Pam3CSK4	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
6	AS04	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
7	Alum(GSK)	IP	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉
8	Advax	IM	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、リンパ節
9	Addavax	IM	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、リンパ節
10	ISA51VG	IM	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、リンパ節
11	AS04	IM	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、リンパ節
12	Alum(GSK)	IM	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、リンパ節

太字: 遺伝子発現測定終了

IP: 腹腔内投与、IM: 筋肉内投与

表2 マウスを用いたアジュバント投与実験デザイン及び遺伝子発現データ取得状況

	被験物質	投与部位	採材時間	採材臓器
1	FK565	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
2	Murabutide	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
3	sHz	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
4	cdiGMP	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
5	Pam3CSK4	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
6	Poly I:C	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
7	ISA51VG	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
8	AddaVax	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
9	2'3'cGAMP	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
10	R848	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
11	DMXAA	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
12	MALP2s	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
13	MPLA	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
14	iEDAP	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
15	MDP	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節
16	LPS	ID	6, 24h	肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節

太字: 遺伝子発現測定終了

IP: 腹腔内投与

表3 ラットにおいて14種のアジュバント投与により遺伝子発現変動を示した遺伝子数

	被験物質	投与経路	採材時間	肝臓		脾臓		リンパ節		腎臓	
				Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
1	Poly I:C	IP	06h	357	419	92	135	178	189	877	1002
			24h	8	67	2	2	4	4	191	174
2	K3	IP	06h	4	7	2	5	8	8	59	55
			24h	5	5	1	2	3	4	54	56
3	D35	IP	06h	3	3	11	2	6	3	6	2
			24h	7	4	3	4	8	4	4	2
4	FK565	IP	06h	1102	1267	856	626	474	360	1652	1584
			24h	314	176	72	16	44	47	332	180
5	bCD	IP	06h	4	5	2	5	2	4	6	4
			24h	3	3	4	5	5	6	1	4
6	ISA51V C	IP	06h	6	16	4	3	11	8	56	61
			24h	9	8	5	1	2	5	51	88
7	Addavax	IP	06h	20	22	4	6	7	2	2	12
			24h	12	32	4	7	4	4	5	3
8	sHz	IP	06h	18	10	5	4	12	18	109	98
			24h	10	5	4	3	4	7	46	87
9	DMXAA	IP	06h	5	7	1	2	8	3	70	59
			24h	6	5	6	3	4	4	71	63
10	MPLA	IP	06h	5	8	3	2	3	3	66	52
			24h	3	4	4	2	1	4	66	53
11	MALP2s	IP	06h	671	577	222	241	336	176	699	735
			24h	9	26	12	6	1	10	160	107
12	R848	IP	06h	850	603	1019	640	1463	636	643	286
			24h	215	159	288	86	321	314	243	57
13	Alum	IP	06h	17	15	5	7	2	7	4	23
			24h	13	13	4	4	8	3	8	3
			06h	7	16	14	3	4	4	-	-
			24h	6	8	4	9	15	2	-	-
14	FCA	IP	06h	161	146	30	11	14	5	16	8
			24h	26	35	10	7	4	8	2	5
			06h	18	43	12	9	10	9	-	-
			24h	16	23	8	8	10	46	-	-

表4 マウスにおいて23種のアジュバント投与により発現変動を示した遺伝子数

	被験物質	投与経路	採材時間	肝臓		脾臓		リンパ節	
				Up	Down	Up	Down	Up	Down
1	Advax	IP	06h	142	32	214	69	-	-
		IP	24h	70	22	7	4	-	-
		ID	06h	14	9	9	4	7	6
2	Alum	IP	06h	183	226	74	10	-	-
		ID	06h	-	-	-	-	34	27
		ID	06h	10	11	4	3	13	3
	Alum (GSK)	ID	06h	11	12	6	31	16	4
3	AS04	ID	06h	64	12	56	14	64	19
4	K3	IP	06h	13	24	7	33	-	
		ID	06h	12	24	7	7	26	10
		ID	06h	-	-	-	-	5	8
5	D35	ID	06h	9	10	7	9	45	11
6	K3S	IP	06h	13	30	6	9	-	-
7	K3-SPG	ID	06h	18	25	8	21	31	23
8	FCA	ID	06h	161	87	102	14	371	205
9	FK565	ID	06h	1733	1693	708	290	177	99
10	Murabutide	ID	06h	13	30	5	7	2	1
11	sHz	ID	06h	7	5	13	6	16	52
12	cdiGMP	ID	06h	430	145	678	91	1372	361
13	Pam3CSK4	ID	06h	187	24	113	21	24	3
14	Poly I:C	ID	06h	883	999	957	343	2013	972
15	ISA51VG	ID	06h	7	15	6	4	8	3
16	AddaVax	ID	06h	22	24	6	9	65	20
17	2'3'cGAMP	ID	06h	665	122	422	28	843	78
18	R848	ID	06h	777	979	2370	1215	2672	641
19	DMXAA	ID	06h	208	39	112	13	997	115
20	MALP2s	ID	06h	604	783	517	238	1150	413
21	MPLA	ID	06h	7	16	6	18	4	8
22	Endocine	IN	06h	38	17	4	13	-	-
23	bCD	IP	06h	8	19	2	1	-	-
		ID	06h	78	146	63	43	43	55

IP：腹腔内投与、ID：皮下投与、IN：経鼻投与

Coefficient = -0.5836 ( -0.8563 ) m= -0.8359 n.failed= 0

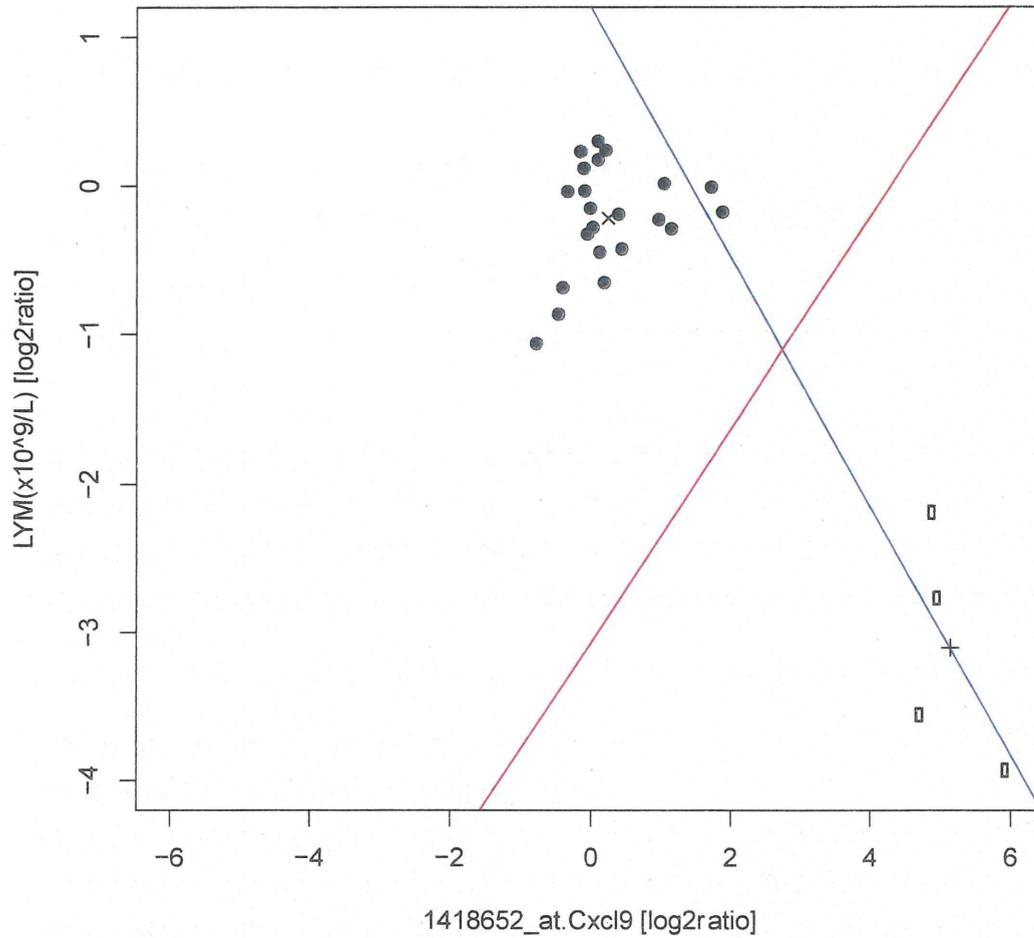


図1 Cxcl9 とリンパ球数の相関解析

有意差ありのサンプルデータのみを用いた際の相関係数は-0.8563。

白丸：有意差ありのサンプルデータのプロット

黒丸：有意差なしのサンプルデータのプロット

×：有意差ありのサンプルデータのプロットの重心

＋：有意差なしのサンプルデータのプロットの重心

青線：有意差ありのサンプルデータの回帰直線

赤線：有意差の有無を判別したときの判別直線

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

本分担研究では、遺伝子発現解析、パスイ解析、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、ワクチン臨床治験データの解析、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。本年度は、「網羅的トランスクリプトーム解析によるアジュバントの評価」、「臨床検体由来の血清マイクロ RNA 発現解析」、「アジュバントデータベースの開発」の三項目に注力した。

#### 1. 網羅的トランスクリプトーム解析によるアジュバントの評価

多種多様な物質がアジュバントとして作用することが知られる一方、それらが生体に及ぼす反応の多くが未知である。そのような背

景から、アジュバントの有効性・安全性の評価方法の確立が期待されている。本研究では、マウス及びラットに各種アジュバントを投与し、投与後 6 時間と 24 時間の 2 つの時点における複数臓器の遺伝子発現を網羅的に測定して得られた遺伝子発現プロファイルに基づいてアジュバントの分類、特徴づけを行い、トランスクリプトームレベルでのアジュバント評価手法を提案することを目指している。本年度は解析手法を確立するため、マウスに対する 21 種類のアジュバント投与後 6 時間の 3 臓器（肝臓、脾臓、リンパ節）における遺伝子発現解析を行った。

#### 2. 臨床検体由来の血清マイクロ RNA 発現解析

本プロジェクトでは、アジュバント含有ワクチン臨床試験から得られる血清サンプル中

のマイクロ RNA(miRNA)発現データの解析を通じて、アジュバントワクチンの有効性・安全性に対する有効な評価指標(バイオマーカー)の探索、及び分子レベルにおける作用メカニズムの理解を目標としている。また、ワクチン臨床試験以外の疾患関連臨床検体からも血清サンプルを収集しており、疾患に関連する血清 miRNA マーカーの探索も進めている。

#### 2-1. H5N1 型インフルエンザワクチン治験被験者の血清中 miRNA 発現解析

2007年に20歳未満の被験者346名に対し、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インフルエンザワクチン(H5N1株)投与した。その結果、8割以上の被験者において免疫原性上昇が観測された反面、5割以上の被験者で発熱が観測された。このような高頻度の発熱を事前に予測できるバイオマーカーの発見が期待されており、我々は血清 miRNA に着目した。昨年度(2013年度)までに、ワクチン投与前血清中の miRNA 発現データを複数の統計手法により解析し、発熱と関連性の高い miRNA を66種類同定した。計算機上で行った発熱識別テストの結果、それらの多くは高い精度で発熱を識別できることが示された。しかし、同定された miRNA を発熱マーカーとして実用化するためには、再現性を評価することが必要だと考えられる。

本年度は、同一製法で製造された H5N1 インフルエンザワクチンの追加治験(2013年実施)の被験者から得たワクチン投与前血清中の miRNA 発現を新たに測定し、過去の miRNA 発現データ(発熱関連 miRNA を同定したもの)との比較、検証を行うことを目的とした。

#### 2-2. 全身型若年性突発性関節炎患者血清中

#### の miRNA 発現解析

全身型若年性突発性関節炎 (Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: sJIA) は、小児に発症する疾患であり、病態として弛張熱、発疹、関節炎などの全身症状が現れる。本疾患の特徴として、IL-6 や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの過剰発現が観測されている。一方、マクロファージ活性化症候群 (Macrophage Activation Syndrome: MAS) は、高頻度で起こる sJIA の合併症で高い致死率を伴う重篤な疾患である。sJIA や MAS を特徴付けるような分子マーカーの発見は、sJIA の病態診断や MAS への病態転換の識別マーカーとしての応用が期待できる。

今年度、sJIA 患者14名分(2名の MAS 患者を含む)の2つの時点(治療前:急性期、及び治療後:寛解期)における計28血清サンプル中の miRNA 発現値をマイクロアレイにより計測した。得られた miRNA 発現プロファイルを健康者のものと比較し、sJIA や MAS で異なる発現量を示す miRNA を発見することを目標とした。

#### 3. アジュバントデータベースの開発

公開済みのトキシコゲノミクスデータを用いた、アジュバントデータベースのプロトタイプとも言える Toxygates システム (<http://toxygates.nibio.go.jp>)に、現在までに得られているアジュバント投与後のマウス・ラットの遺伝子発現データを加え、統合解析システムを構築することを目的とした。

## **B. 研究方法**

### 1. 網羅的トランスクリプトーム解析によるアジュバントの評価

最初に、各臓器(肝臓、脾臓、リンパ節)ごとに以下の手順で発現変動遺伝子を同定した。

(1) コントロールサンプル(アジュバント非投与個体)間で発現値のばらつきの大きい遺伝子を取り除くため、各遺伝子プローブに対して CV(コントロールサンプルの発現値の標準偏差/コントロールサンプルの発現値の平均)を計算し、 $CV \geq 1.0$  のプローブを以降の解析から削除した。

(2) 各アジュバント投与群ごとにコントロールサンプルとアジュバント投与サンプルの発現値を比較し、有意に変動した遺伝子を選択した。

(3) いずれかのアジュバント投与群で選択された遺伝子の集合を Global gene set として同定した。

次に、各臓器ごとに同定された Global gene set を指標に用いて階層的クラスタリングを行い、アジュバントの分類、及び遺伝子クラスタの抽出を行った。

## 2. 臨床検体由来の血清マイクロ RNA 発現解析

### 2-1. H5N1 型インフルエンザワクチン治験被験者の血清中 miRNA 発現解析

H5N1 インフルエンザワクチン追加治験(2013 年度実施)の被験者 28 名分のワクチン投与前血清の miRNA 発現を新たに測定し、これをデータ 2014 とした。次に、2012 年に測定された発現プロファイル(発熱関連 miRNA の同定に用いたもの)からワクチン投与前血清の発現データを抜き出し、これをデータ 2012 とした。データ 2012 とデータ 2014 に共通する 1893 種の miRNA に着目し、それらの発現値を比較した。

### 2-2. 全身型若年性突発性関節炎患者血清中

前述の H5N1 インフルエンザ追加治験から得られた健常者 28 検体(ワクチン投与前)の miRNA 発現プロファイルと sJIA 患者群(急性期)の発現プロファイルを比較し、以下 3 基準を全て満たすものを sJIA 関連 miRNA として選択した。

- (1)  $|\log_2(FC)| > 1.0$
- (2)  $p\text{-value}(t\text{-test}; FDR) < 0.01$
- (3) いずれかの群で発現平均値が 64 以上

次に、選択された sJIA 関連 miRNA の中で、MAS 陽性群(MAS+)と MAS 陰性群(MAS-)の二群間で発現値差の大きい ( $|\log_2(FC)| > 1.0$ ) ものを MAS 関連 miRNA として選択した。

## 3. アジュバントデータベースの開発

- アジュバントデータベースプロジェクトの実験デザインに応じて、新規の遺伝子発現データおよび各実験の付随情報(メタデータと呼ぶ)をウェブからアップロードして管理ができる、管理インターフェースを開発した。
- インハウス解析による、マウスとラット間での相同遺伝子のマッピングデータを用いて、マウスとラットの遺伝子発現データを統一的に扱えるシステムを構築した。
- データの内部構造およびユーザーインターフェースを改変することで、公開済みのトキシコゲノミクスデータおよび新規のアジュバントデータをそれぞれ別々に、あるいは統合的に解析できるオンラインシステムを実現した。

## C. 研究結果

### 1. 網羅的トランスクリプトーム解析によるアジュバントの評価

Global gene set を用いたアジュバント分類の結果、同一のアジュバントを投与した3匹の個体は互いに良く似ている遺伝子発現変動プロファイルを示すことが確認できた (図 1A)。更に、異なるアジュバントでも、共通する性質を持つものは遺伝子発現変動も似ている傾向にある。例えば、Cluster #1 に属する c-di-GMP、cGAMP、DMXAA は STING タンパク質を標的とし、R848 と poly:IC は Toll 様受容体を標的とする点で一致する。

次に、同様の手順で遺伝子を分類した結果、各アジュバントやアジュバントクラスタを特徴づけるような遺伝子群が観察できた (図 1B)。現在、それら遺伝子群の役割や関連シグナリングパスウェイの推定を行っている。

### 2. 臨床検体由来の血清マイクロ RNA 発現解析

#### 2-1. H5N1 型インフルエンザワクチン治験被験者の血清中 miRNA 発現解析

データ 2012 とデータ 2014 の各 miRNA の発現平均値を比較した結果、発現平均値全体の傾きを観測した (図 2A)。特に、高発現領域 (発現値  $> 8$ ) では、大多数の miRNA がデータ 2014 で高い発現値を示していた。次に、サンプル間の発現値分布を比較した結果、同じデータ群に属するサンプルは互いに相関が高く、異なるデータ群間では相関が低いことが分かった (図 2B)。以上の結果から、2012 年と 2014 年に測定したデータ群間で何かしらの系統的なバイアスが存在することが示唆される。

#### 2-2. 全身型若年性突発性関節炎患者血清中の miRNA 発現解析

健常者と比較して、急性期 sJIA 患者の血清で発現値が有意に異なる 30 種の sJIA 関連 miRNA を同定した (図 3)。その中で、20 種の miRNA が sJIA で有意に高い発現値、10 種が有意に低い発現値を示した。更に、治療後 (寛解期) 血清におけるそれら miRNA の発現値を調べたところ、30 種のうち 9 種の miRNA で発現値が有意に減少していた: p-value (paired t-test)  $< 0.05$ ;  $\log_2(\text{FC}) < 1.0$ 。例えば、hsa-miR-x1 の発現値は治療前と比較して、半分以下 ( $\log_2(\text{FC}) = -1.170$ ) に減少していた (図 4A)。

次に、30 種の sJIA 関連 miRNA の急性期における発現値を、sJIA 群内の MAS- と MAS+ で比較した結果、5 種の miRNA が MAS+ で低発現 (発現平均値  $< 1/2$ ) を示した。例えば、MAS+ における hsa-miR-x4 の発現平均値は、MAS- の  $1/5$  未満 ( $\log_2(\text{FC}) = -2.70$ ) あった (図 4B)。これらを 5 種の miRNA を MAS 関連 miRNA として同定した。

### 3. アジュバントデータベースの開発

研究方法の項目で述べた、拡張した Toxygates システムと管理インターフェースを用いて、マウスまたはラットに各種アジュバントを投与した後の遺伝子発現データを追加した。ここでは、マウスとラット間での相同遺伝子のマッピングデータを用い、さらにパスウェイ等外部のデータベースで必要な統合処理を行なうことで、マウスとラットの遺伝子発現データを統一的に扱える解析システムを実現した。さらに、open TG-GATES データベース (<http://toxico.nibiohn.go.jp>) とし

て公開されている、医薬品（低分子化合物）をラットに投与した後の遺伝子発現データを取り込んだデータセットと、今回のアジュバント反応遺伝子発現データセットの2つをそれぞれ別々に、あるいは統合して解析できるように、システムを拡張した。

この結果、特定のアジュバントをマウスに投与後にどのような遺伝子が発現変動したかを調べ、それと似たような反応をラットで示す既知の医薬品をランキングするなど、自在な解析が可能になった。さらに、アジュバントの種類および投与経路の異なる多数のサンプルの遺伝子発現データについての生物学的解釈を支援するため、本研究分担者らによって開発された TargetMine データウェアハウス (<http://targetmine.mizuguchilab.org>) との間で、リアルタイムにデータの受け渡しを可能にするシステムを構築した。これにより、パスウェイや遺伝子機能注釈に基づいた統合解析の効率化に成功した。

以上により、本年度で、アジュバントデータベースの最初のバージョンを完成した。（このバージョンは、オンライン上でパスワードによって保護されており、プロジェクト参加者間で共有されている。）

## D. 考察

### 1. 網羅的トランスクリプトーム解析によるアジュバントの評価

アジュバントを評価するうえで、今回得られた遺伝子発現プロファイルは有用な評価基準となり得る。個々のアジュバントやアジュバントクラスタに特異的な遺伝子群の検出手法、それらの遺伝子群からアジュバント作用

機序を推定する手法の開発に現在着手している。また、臓器間の遺伝子発現の比較にも今後着手する。

### 2. 臨床検体由来の血清マイクロ RNA 発現解析

#### 2-1. H5N1 型インフルエンザワクチン治験被験者の血清中 miRNA 発現解析

独立した二つの治験から得られた血清 miRNA 発現データを比較した。いずれのデータもワクチン投与前の 20 歳未満の被験者血清から測定されたデータにも関わらず、発現値に著しい系統的誤差が観測された。これには、主に 2 つの要因が考えられる。一つ目の要因は血清サンプルの状態である。データ 2012 は採取されてから数年間保存した血清から測定されたものであり、データ 2014 は採取されて一年以内に測定されたものである。原理的に、血清 miRNA の保存性は高いと言われているが、一部の miRNA が分解されてしまい、データ標準化の過程で発現分布全体に影響を及ぼした可能性がある。二つ目の要因は定量手法の問題である。データ 2012 とデータ 2014 は、それぞれ異なる型番のマイクロアレイチップによって測定されている。原因を特定するためには、それぞれの治験由来の血清サンプルを選び出し、同一のプラットフォームで測定、比較することが必要だと考えられる。また、一旦系統的バイアスが観測されたデータ群間の発現値を直接比較するためには、新たな標準化手法の導入・開発が必要だと考えられる。

#### 2-2. 全身型若年性突発性関節炎患者血清中の miRNA 発現解析

同定された 30 種の sJIA 関連 miRNA の中で、

少なくとも 8 種は他の自己免疫疾患(関節リウマチや全身性エリテマトーデス)との関連性が報告されている点が興味深い。また、MAS 関連 miRNA として同定された miRNA-x4 はマクロファージ活性化・炎症性サイトカイン産生を抑制することが複数の研究により報告されている。これらの miRNA が SJIA や MAS の診断マーカーとして応用できる可能性がある。

### 3. アジュバントデータベースの開発

アジュバントデータベースの最初のバージョンの完成により、マウスとラットの遺伝子発現の統合的解析が可能になった。次の段階として、より高度な解析を支援するための、クラスタリングや可視化機能を実現することを計画している。

また、既に実験的に取得済みの血液学的データについても、データベースに組み込んで、遺伝子発現との統合解析を可能にするシステムを構築する必要がある。さらに、次年度は、臨床検体由来の血清 miRNA 発現データのデータベース化に着手することを計画している。このデータは、マウス・ラットの遺伝子発現データと違って、miRNA であることに加えてデータセット毎に実験デザインが異なることから、既存のデータベースに単純にデータを取り込むことはできない。しかし、これまでに開発したアジュバントデータベースシステムは、汎用的な基盤構造を持っているため、これを活用することで、比較的容易に新たなデータベースの構築ができると考えている。

## E. 結論

トランスクリプトーム解析によるアジュバ

ントの評価研究に関しては、データ処理と解析手法の基盤を構築し、アジュバントの分類及び遺伝子群の抽出を行った。

臨床検体由来の血清 miRNA 発現解析については、30 種の sJIA 関連 miRNA と 5 種の MAS 関連 miRNA を同定した。また、発熱関連 miRNA の検証研究では、再現性における課題も浮き彫りとなった。

アジュバントデータベースの開発に関しては、マウス・ラットの遺伝子発現データを追加し、統合解析が可能なデータベースの最初のバージョンが完成した。

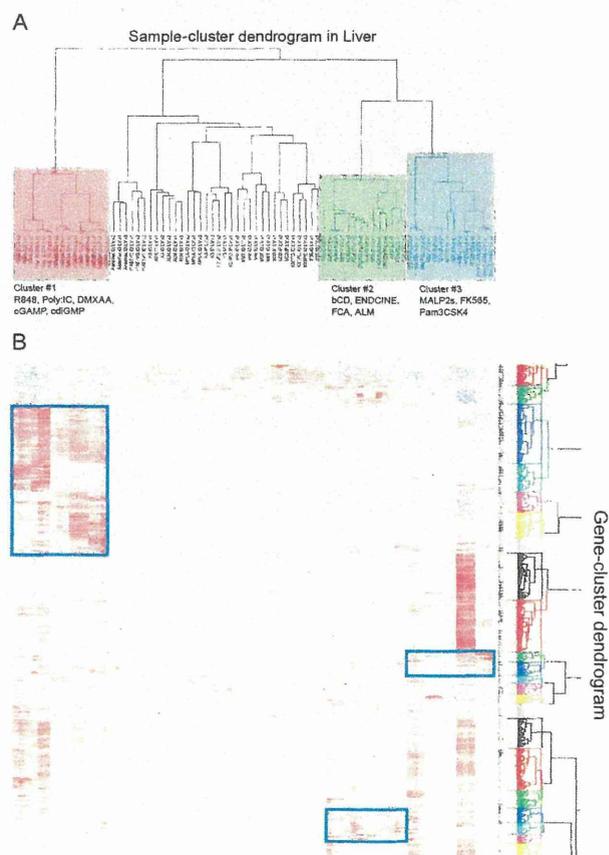


図 1A. 肝臓遺伝子発現プロファイルに基づくアジュバントの分類

図 1B. アジュバントクラスタ特異的な遺伝子

群の検出

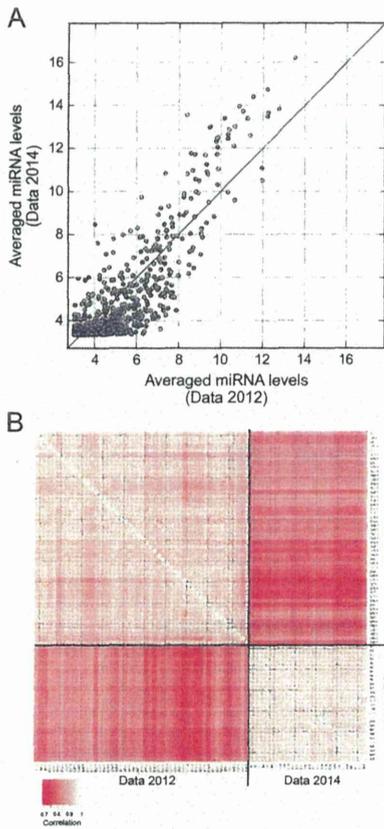


図 2A. miRNA 発現データ 2012 と 2014 の比較。(A) 各 miRNA の発現平均値の比較。(B) サンプル間の比較。赤は互いのサンプルの発現相関がより低いことを示す。

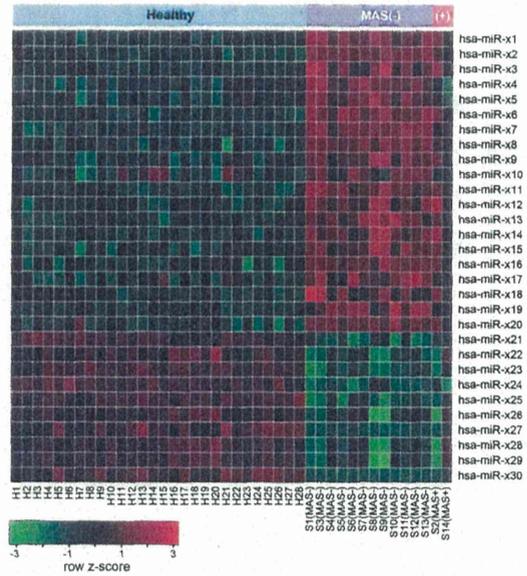


図 3. 同定された sJIA 関連の 30 種の miRNA。データ未発表のため miRNA の名称は伏せてある。

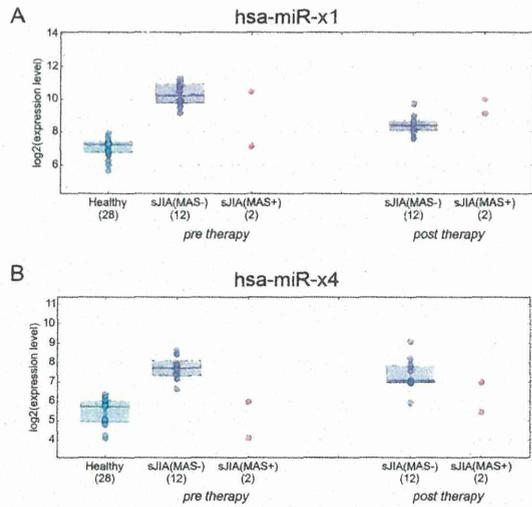


図 4. 治療前、及び治療後段階における miRNA の発現値。健常者の発現値を青、sJIA(MAS-)を紫、sJIA(MAS+)を赤で示している。(A) sJIA 関連 miRNA-x1、(B) MAS 関連 miRNA-x4。

## G. 研究発表

【査読付】

Fujita J., Maeda Y., Nagao C., Tsuchiya Y., Miyazaki Y., Hirose M., Mizohata E., Matsumoto Y., Inoue T., Mizuguchi K., Matsumura H., Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*., *FEBS letters*, 588(10):1879–85, 2014

Murakami Y., Mizuguchi K., Homology-based prediction of interactions between proteins using Averaged One-Dependence Estimators, *BMC bioinformatics*, 15(1):213, 2014

Chen Y. A., Murakami Y., Ahmad S., Yoshimaru T., Katagri T., Mizuguchi K., Brefeldin a-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its partner through an ARM-type alpha-helical structure., *BMC Res Notes*, 7(1):435, 2014

Shirai H., Ikeda K., Yamashita K., Tsuchiya Y., Sarmiento J., Liang S., Morokata T., Mizuguchi K., Higo J., Standley D. M., Nakamura H., High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations, *Proteins*, 82(8):1624–35, 2014

Yamada H., Nagao C., Haredy A. M., Mori Y., Mizuguchi K., Yamanishi K., Okamoto

S., Dextran sulfateresistant A/Puerto Rico/8/34 influenza virus is associated with the emergence of specific mutations in the neuraminidase glycoprotein., *Antiviral research*, 111:69–77, 2014

Kumagai A., Fujita A., Yokoyama T., Nonobe Y., Hasaba Y., Sasaki T., Itoh Y., Koura M., Suzuki O., Adachi S., Ryo H., Kohara A., Tripathi L. P., Sanosaka M., Fukushima T., Takahashi H., Kitagawa K., Nagaoka Y., Kawahara H., Mizuguchi K., Nomura T., Matsuda J., Tabata T., Takemori H., Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line, *Genes (Basel)*, 5(4):1095–114, 2014

Chen Y. A., Tripathi L. P., Dessailly B. H., Nyström-Persson J., Ahmad S., Mizuguchi K., Integrated Pathway Clusters with Coherent Biological Themes for Target Prioritisation Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, *PLoS One*, 9(6):e99030, 2014

Camargo L. M., Zhang X. D., Loerch P., Caceres R. M., Marine S. D., Uva P., Ferrer M., Rinaldis E., Stone D.J., Majercak J., Ray W. J., Chen Y. A., Shearman M. S., Mizuguchi K., Pathway-Based Analysis of Genome-Wide siRNA Screens Reveals the Regulatory Landscape of App Processing, *PLoS one*,

10(2):e0115369,  
2014

Nakae Y., Oka Y., Fujiki F., Morimoto S., Kamiya T., Takashima S., Nakata J., Nishida S., Nakajima H., Hosen N., Tsuboi A., Kyo T., Oji Y., Mizuguchi K., Kumanogoh A., Sugiyama H., Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1) -specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients, *Cancer Immunology, Immunotherapy* (in press)

【査読なし】

水口賢司, 計算生物学によるシステムの理解から創薬へ, 生命科学から創薬へのイノベーション (南山堂), 82-88, 2014

伊藤真和吏, 水口賢司, *Sagace* 創薬・疾患研究のためのデータベース横断検索サービス, 今日から使える! データベース・ウェブツール 達人になるための実践ガイド 100 (羊土社), (実験医学増刊) 32(No.20):60-61, 2014

【国内学会：招待講演】

水口賢司, 乳癌細胞増殖の分子機構解明から創薬へ: タンパク質構造と相互作用予測による主導, CBI 学会 2014 年大会, 東京, 2014.10.29

水口賢司, 計算生物学による創薬を目指して, IPAB シンポジウム, 東京,

2014.12.5

【国内学会：一般講演】

土屋裕子, 水口賢司, 抗体デザイン手法の開発に向けた抗原認識機構の解明, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 2014.6.26

Yamashita K., Ikeda K., Sarmiento J., Liang S., Tsuchiya Y., Mizuguchi K., Higo J., Nakamura H., Shirai H., Standley D. M., Kotai Antibody Builder: Automated, high-resolution structural modeling of antibodies, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 2014.6.26

五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxygates, トキシコゲノミクスデータ解析プラットフォームの実装, 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014.7.3

土屋裕子, 水口賢司, 抗体デザイン手法の開発に向けた抗原認識機構の解明, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌, 2014.9.27

Tsuchiya Y., Mizuguchi K., Elucidation of antigen recognition by antibodies toward the development of a method for antibody design, 生命医薬情報学連合大会 2014 年大会, 仙台, 2014.10.2

五十嵐芳暢, Nystrom J., 山田弘, 石井健, 水口賢司, アジュバントデータベ

スの開発とトキシコゲノミクスデータの統合に向けて、トーゴの日シンポジウム 2014, 東京, 2014.10.5

坂手龍一, 深川明子, 水口賢司, 山田弘, 増井徹, 塩谷恭子, 松田潤一郎, 宮本恵宏, 松山晃文, 創薬・疾患研究のための生物資源・疫学研究データベースの開発, トーゴの日シンポジウム 2014, 東京, 2014.10.5

陳怡安, Tripathi L., Dessailly B.H., Nystrom J., Ahmad S., 水口賢司, Integrated pathway clusters for gene set analysis and target prioritization, トーゴの日シンポジウム 2014, 東京, 2014.10.5

伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 深川明子, 坂手龍一, 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース横断検索システム Sagace, トーゴの日シンポジウム 2014, 東京, 2014.10.5

水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 長尾知生子, 陳怡安, 伊藤真和吏, 創薬・疾患研究のためのビッグデータ探索, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25

【国際学会：一般講演】

Nyström J., Keeble-Gagnere G., Igarashi Y., Morita M., Ito M., Nakatsu N., Yamada

H., Mizuguchi K., Appels R., Toxygates: Applying a Toxicology Software Platform to Wheat 'omics, Plant & Genome Asia 2014, Singapore, 2014.5.19

Hamano Y., Kida H., Nishikawa H., Tripathi L., Ihara S., Arai T., Hirose M., Tada Y., Suenaga T., Mori M., Yano Y., Arase H., Mizuguchi K., Sakaguchi S., Inoue Y., Kumanogoh A., Identification Of Anti-Myxovirus Resistance Protein-1 Autoantibody As A Specific Marker For Idiopathic Nonspecific Interstitial Pneumonia, EULAR 2014, パリ, 2014.6.12

Ito J., Ishii J. K., Mizuguchi K., The Potential of Serum miRNA Signatures to Understand the Immune Responses to Influenza Vaccines Diseases, Systems Biology of Infectious Diseases, Seattle, WA, USA, 2014.8.18

Aoshi T., Nakatsu N., Igarashi Y., Wijaya E., Ito J., Kishishita N., Standley D., Yamada H., Mizuguchi K., Ishii K., Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models, Keystone Symposium on The Modes of Action of Vaccine Adjuvants, Seattle, Washington, USA, 2014.10.8

【学会以外のセミナー、講演会等】

水口賢司, Computational and systems

approaches to early stage drug discovery, 中国科学院 上海生命科学研究院, 上海(中国), 2014.5.6 (招待講演)

水口賢司, バイオインフォマティクスによるシステムの理解から創薬へ, 徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター, 徳島, 2014.5.16(招待講演)

Prathipati P., Ito J., Tsuchiya Y., Mizuguchi K., Prioritization of YES kinase inhibitors using protein structure based pharmacophore models and enriched maximum common substructures, IPAB コンテスト:「コンピュータで薬のタネを創る」, 東京, 2014.7.17(口頭発表) グランプリ Nvidia 賞受賞

Prathipati P., Ito J., Tsuchiya Y., Mizuguchi K., Methods for the Integration of structure based and ligand based approaches to screen 'Yes kinase inhibitors', Level-5, Tokyo, 2014.7.18(招待講演)

Nyström J., Igarashi Y., Morita M., Ito M., Nakatsu N., Yamada H., Mizuguchi K., Toxygates - a hybrid linked data and microarray platform for userfriendly toxicogenomics, OPENTOX EURO 2014, Athens, Greece, 2014.9.23 (口頭発表)

水口賢司, 計算生物学によるシステムの理解から創薬へ, 第2回 関西ライフ

サイエンス・リーディングサイエンティストセミナー, 大阪, 2014.12.15(招待講演)

中江吉希, 岡芳弘, 藤木文博, 水口賢司, 熊ノ郷 淳, 杉山治夫, AML 患者の WT1-specific CTL の effector-memory (EM) 分画 (EM-WT1-CTLs) には gene-expression profile により区別できる2つの cell population がある:そして、WT1 ペプチドワクチン治療に伴いその EM-WT1-CTLs の gene-expression profile は responder、non-responder それぞれに特徴的な変化をする, WT1 ペプチドワクチンの研究会, 大阪, 2015.3.28 (口頭発表)

Tripathi L., Ito, J., Aoshi, T., Ishii, K., Mizuguchi K., Effective characterisation of adjuvant transcriptomes for biomarker and target discovery, The 8th Meeting of Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium, Osaka, 2015.1.20(ポスター)

Prathipati P., Aoshi T., Igarashi Y., Ishii K., Mizuguchi K., A Systems Biology Framework for the identification of the molecular basis of immune adjuvanticity, The 8th Meeting of Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium, Osaka, 2015.1.20(ポスター)

伊東純一, 石井健, 水口賢司, インフルエンザワクチン臨床試験における血清 miRNA マーカーの可能性, 第8回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2015.1.20 (ポスター)