

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16407

研究課題名（和文）末梢血単核球の応答プロファイルデータ解析による疾患層別化方法論の構築

研究課題名（英文）establishment of a novel disease stratification method with response profile data analysis of peripheral blood mononuclear cells

研究代表者

水野 忠快（Tadahaya, Mizuno）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：90736050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では低侵襲性に入手可能な末梢血単核球を疾患層別化に活用すべく、末梢血単核球の応答プロファイルの有用性評価を目的とした。末梢血単核球に対し炎症刺激を施した際のオミクスデータをデータベースより入手し、年齢の違いを対象に解析した。独自教師なし解析手法により、年齢と相関し、かつ既存生物学的知見と対応する遺伝子群の抽出に成功した。対象データには臨床情報が付帯されておらず、そのような共変量を用いずとも教師なしに分離できた点は特筆に値する。一方発現プロファイルの場合は、年齢と相関する遺伝子自体は見つけられたものの、その数は少なく遺伝子群としては既存知見と対応しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢血単核球は低侵襲性に入手可能であり、患者の状態を記述する重要な情報を包含していると考えられる。一方、臨床検体は一般に認知されない交絡を多く含み、疾患に由来する生物学的情報がそれ以外の情報に埋もれてしまうことが多い。刺激に対する応答プロファイルは、発現プロファイルよりも生物学的差分が強調され、交絡の多い臨床検体でも頑健な層別化が可能になると期待される。本研究では上記概念の実証の一環として、公知データを用いて年齢を層別する遺伝子群の検出力を応答プロファイルと発現プロファイルとで比較し、仮説を支持する結果を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated usefulness of response profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for disease stratification. By using an omics data set that analyzed PBMC treated with LPS, the differences derived from age were analyzed. Analysis of response profiles with our previously established method detected a gene group that correlates age and is correspondent with the existing biological knowledge. On the other hand, a gene group derived from just expression data does not correspond to the existing knowledge and the number of its components is less than that of the gene group derived from response profiles.

研究分野：プロファイルデータ解析

キーワード：疾患層別化 プロファイルデータ解析 末梢血単核球

1. 研究開始当初の背景

ある疾患の創薬標的を探索するためには、対象とする疾患由来試料と対応するコントロール試料の比較が必須である。またヘテロな患者群を対象にした治験は、着目した疾患への効果が適切に評価できず、有用性が見出せない危険性が高い。このように疾患の層別化は創薬において非常に重要である。疾患層別化を目的に、近年オミクスデータより抽出した多変量マーカーの研究が盛んである。中でも低侵襲にサンプリング可能な PBMC は生体試料として注目を集めている。しかし PBMC を対象とした層別化マーカーの探索は成果に乏しい。原因の一つとして、個人差等のバックグラウンドノイズが高く、実験間誤差が大きいことが挙げられる。疾患の層別化を行うにはデータ間の比較が必須なため、データの安定性が必要不可欠であり、どのようにすれば PBMC のオミクスデータを安定させることができるか、という点が課題となっている。申請者は上述の問いに答えるため、PBMC に炎症刺激を行ってオミクスデータを取得し、応答性の変化をプロファイル（試料が持つ生物学的情報）とすることを着想した。応答次元ではバックグラウンドが相対的に下がるため、各試料の生物学的な特徴量が鮮明になり、プロファイルとしての安定性が増すと期待される。

一方、得られるプロファイルデータは次元数が膨大であり、そのままの状態では研究者が解釈することは困難である。申請者はこれまでに、プロファイルデータ解析手法、orthogonal linear separation analysis (OLSA)を開発している。OLSA は、因子分析を元にした手法であり、オミクスデータを縮約し、生物学的に意義のあるシグネチャー（遺伝子発現変動パターン、等）を教師無しに分離・抽出する方法論である（Mizuno T., *Sci Rep*, 2019; 特許出願済）。既存の知見に依存しないため、正確な亜集団の実態が不明な疾患にも適用可能であり、研究者が認識できない表現型をもデータ駆動型に分類できる可能性を有している。実際、HSP90 阻害剤を解析すると、一般的なクラスタリングの手法では区別できない阻害剤間の作用の違いを検出することに成功している。

2. 研究の目的

以上の背景を元に、本研究では、PBMC 応答プロファイルを OLSA により解析するアプローチが疾患層別化マーカーの探索に有用であることを検証し、新たな疾患層別化方法論として提案することを目的と定めた。

3. 研究の方法

(1) ヒト血液検体より頑健な PBMC 応答プロファイルを取得する方法論の検討

PBMC 応答プロファイルは以下の流れで取得される：

1. ヒト血液検体からの PBMC を調整する
2. PBMC に対して炎症刺激を施しインキュベーションする
3. RNA を抽出しトランスクリプトーム解析に供する

PBMC の状態は、疾患状態に加えてデータ取得までの扱いによっても変動しうる。そこで炎症刺激に対する応答性を指標として、凍結保存の有無等交絡になりうる実験操作が与える PBMC の状態への影響を評価した。

(2) ヒトの状態記述における応答プロファイルと発現プロファイルの比較

COVID19 の影響により患者の来院頻度が激減し、初期取得検体の保存期限の観点から新たな検体の取得が見込めなくなった。また検出力に基づいて試験デザインを再考したものの、取得済みの検体数ではオミクス解析による評価は困難であると判断されたため、データの独自取得を断念した。代替として、既存データベースより取得した、末梢血単核球に対して LPS 処理を施した際のオミクスデータを対象に解析を実施した。本データは健康人を対象としており、疾患層別化の判断指標にはならないものの、年齢を目的変数として取り組んだ。発現プロファイル、LPS 刺激に対する応答プロファイルを入力として、独自プロファイルデータ解析手法 OLSA により遺伝子群を抽出し、年齢と相関するものを探索した。見出した遺伝子群を GO 解析に供し、生物学的知見との対応を評価した。

4. 研究成果

(1) PBMC 調整過程の炎症応答に対する検討

本研究ではヒトの疾患状態を PBMC の状態により記述することを試みている。ヒトの状態以外の要因による PBMC の状態変化を可能な限り抑えるべく、PBMC の調整プロトコールに着目した。PBMC の調整過程において、遠心・バッファー置換(ウォッシュ操作)は調整試薬の除去という点では多い方がよいものの、一方で PBMC に対する負荷は高い。そこで本工程が与える PBMC への影響を検討した。PBMC の状態は、最終的にプロファイルとして用いる予定である炎症応答により評価することとし、LPS による炎症刺激時の TNF- α 等のサイトカインの遺伝子発現量を評価対象とした。検討の結果、ウォッシュ操作により、炎症性サイトカインが有意に減少し、一方で抗炎症性サイトカインは増加することが明らかとなった (図 1)。本結果より、ウォッシュ

操作の繰り返しは避け、一度に留めることとした。

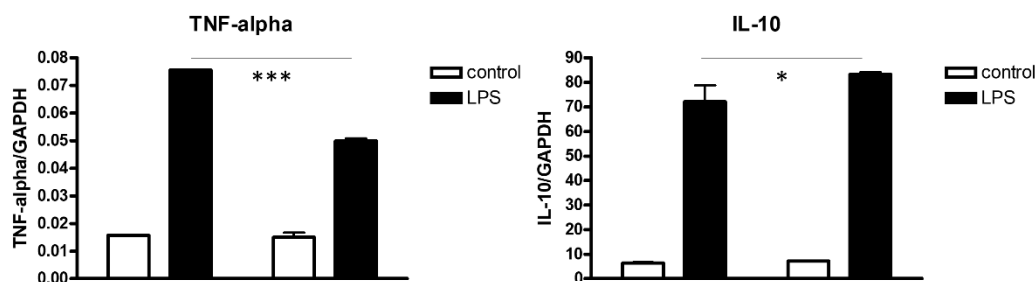


図 1. ウォッシュ操作が与える PBMC の炎症応答への影響

(2) PBMC 凍結保存が与える炎症応答に対する検討

一般に PBMC は凍結保存可能とされ、製品として購入することが可能である。凍結保存が可能な場合、プロファイルを取得するためのフィージビリティが格段に向上するものの、本操作が PBMC の炎症応答に与える影響については不明である。そこで取得した PBMC を凍結保存した場合とそうでない場合とを比較し、炎症応答を評価した。結果、炎症性サイトカインが有意に減少し、一方で抗炎症性サイトカインは増加することが明らかとなった (図 2)。またフローサイトメトリーによる解析の結果、死細胞が増加することも明らかとなったため、PBMC 調整後、凍結保存はせず炎症刺激を施すこととした。

以上 (1), (2) の検討を経て、ヒト血液から炎症応答への交絡要因をできる限り排しつつ、PBMC を取得するプロトコールが確立された。

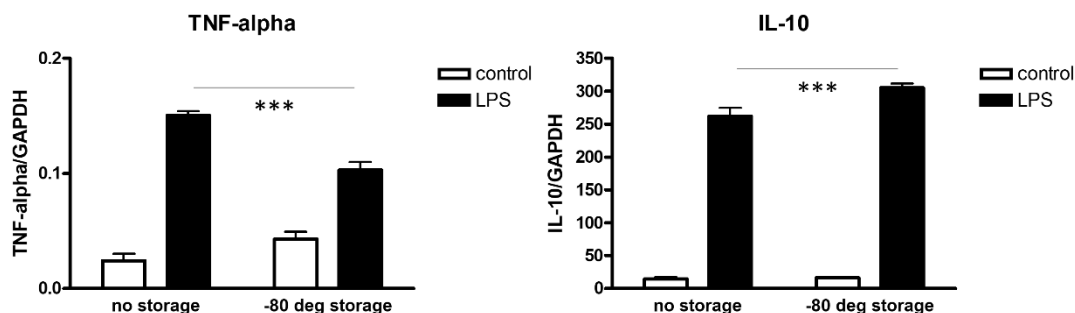


図 2. 凍結保存が与える PBMC の炎症応答への影響

(3) 年齢を対象とした応答プロファイルと発現プロファイルの比較

現状、特定の疾患を有する患者より取得した PBMC に対し、炎症刺激をした際の PBMC のトランスクリプトームデータは存在しない。一方、健康人であれば GSE62627 など少数ながら存在する。これらの中には臨床情報として年齢が与えられているものが存在したため、ヒトの状態として年齢を対象とし、年齢を分別可能か？を課題として本研究のコンセプトの検証に取り組んだ。GEO dataset より GSE62627 のデータを取得し、解析可能な状態へと整形した。本データは、様々な炎症刺激 (LPS, RIG-I, 等) を施した際の PBMC のトランスクリプトームデータを収載している。まず本データを以下のように加工し、発現プロファイル、応答プロファイルを定義した。

- 発現プロファイル: 対数変換や Quantile 正規化等の一般的な変換のみを施したもの
- 応答プロファイル: 上記に加え、vehicle 処理に対する変動を表す値へと変換したもの

用意したプロファイルを独自解析手法である OLSA に供した。本手法は因子分析を改変したものであり、多変量データを構成する潜在的な少数の因子を抽出する方法論である。結果、発現プロファイルは因子が一つしか見出されなかった一方、応答プロファイルでは 13 個の因子が見出された (図 3a, 図 4a)。本結果は、応答プロファイルの方が様々な要素の情報を含むことを示唆している。

次に OLSA の解析結果を可視化し、年齢と関連する情報が抽出できているか否かを検証した。結果、1 因子のみである発現プロファイルは年齢と関連しなかったものの、応答プロファイルでは第 2 因子と年齢の関連とが推定された。そこでこれらのスコアの差分を Welch 検定により評価したところ、因子間の多重検定補正後の p 値が 0.01 を下回ったことから、統計学的に有意な差を検出できているものと判断された (図 3b, c; 図 4b, c)。

OLSA により得られた各因子は、重み付きの遺伝子群 (ベクトル量) として取得される。そこで第 2 因子を代表する遺伝子群を抽出し、当該遺伝子群に生物学的な意義があるか否かを評価し

た。具体的にはベクトル内で数値の大きい遺伝子をスミルノフグラブス検定により選別し、gene ontology 解析に供した。結果、mitochondrial translation (G0:0032543), 及び regulation of DNA damage checkpoint (G0:2000001)が統計的に有意と判定された(図 5)。

以上の結果より、応答プロファイルは発現プロファイルに比べて年齢に関連する情報を表現できており、独自解析手法 OLSA は当該情報を抽出可能であるということが示された。臨床情報としては年齢以外与えられておらず、そのように臨床情報が乏しい状況にあってもプロファイルデータから年齢に関する情報を抽出できたという点は特筆に値する。

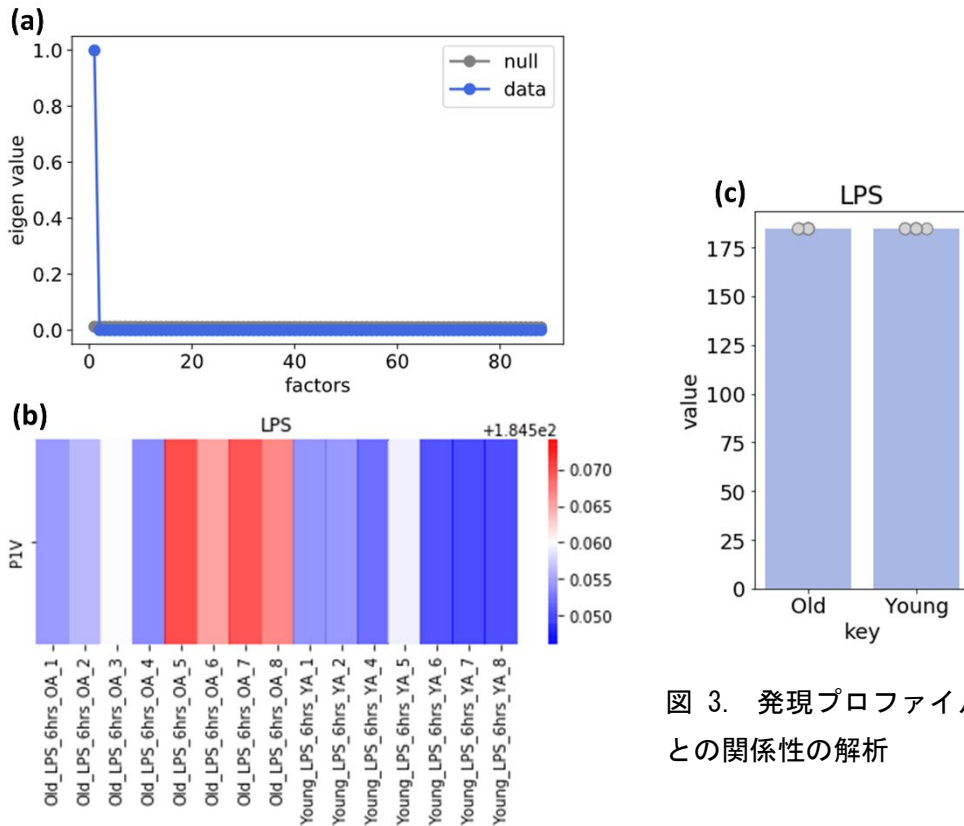


図 3. 発現プロファイルと年齢との関係性の解析

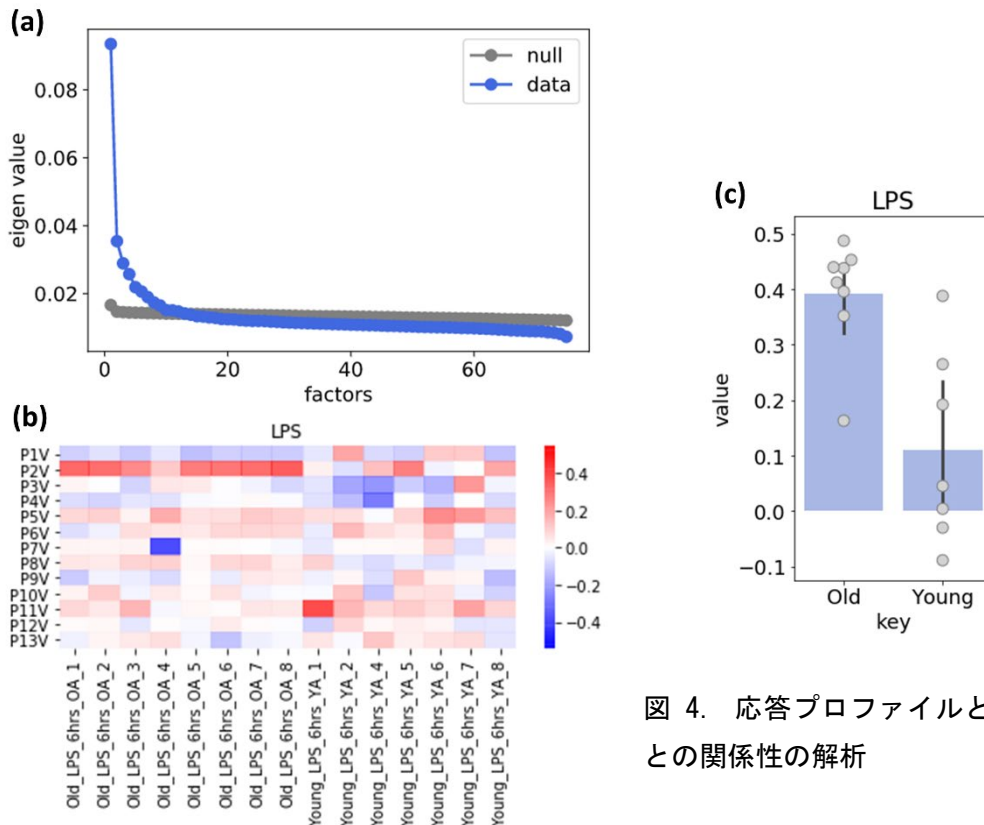


図 4. 応答プロファイルと年齢との関係性の解析

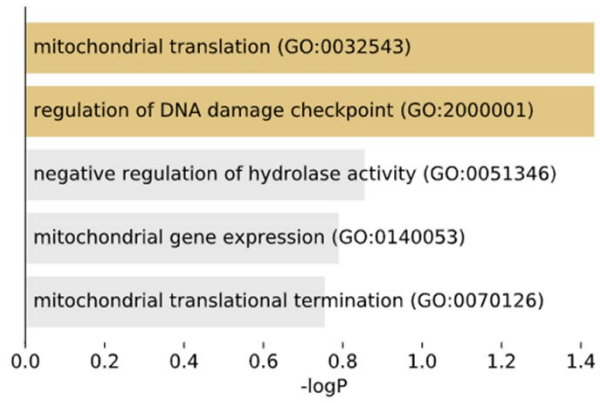


図 5. 応答プロファイルより見出された因子の生物学的意義の検証

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuno T, Morita K, Kusahara H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Interesting Properties of Profile Data Analysis in the Understanding and Utilization of the Effects of Drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull .	6. 最初と最後の頁 1435-1442.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00301.	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 Morita K, Mizuno T, Kusahara H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Decomposition profile data analysis of multiple drug effects identifies endoplasmic reticulum stress-inducing ability as an unrecognized factor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70140-9.	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------