

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03237

研究課題名(和文) 脂肪肝進行の時系列トランスオミクス解析による理解

研究課題名(英文) Understanding of fatty liver progression using time-series Trans-omics analysis

研究代表者

久保田 浩行 (Kubota, Hiroyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：40376603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：食餌性肥満と通常食マウスの肝臓から得た5階層7種のオームデータに対して、数理的な手法、統計的手法、データベースを駆使し多階層ネットワークを構築した。これらの結果から、全ての階層において、多くの分子が2つの異なるタイミングで変動していることを見出した。同時に、数理解析の結果から階層間の制御も2つのタイミングに行われていることが分かった。これらの結果は、脂肪肝の進行が2段階で変化していることを示している。さらに、得られたネットワークを基に代謝経路の特徴を抽出し、経路間のメタレベルでの制御も明らかにすることが出来た。本研究により、肥満に伴う脂肪肝進行の全体像の端緒が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象は全て多階層に跨るネットワークに制御されているため、生命現象の全体像を明らかにするには、この多階層ネットワークを明らかにする必要がある。本研究で開発したトランスオミクス解析の手法は階層を繋げるのみならず、階層間の制御に関与する他の制御の寄与とタイミングも明らかにすることができた。本手法により、今後のオミクス研究に新たな方法と視点を与えられると期待される。また、肥満に伴う脂肪肝の進行が、2段階によって変容するという知見は、肥満の状態に応じた対応(治療)が必要であることを意味しており、治療への応用も期待できる。本研究の手法と結果は、他の疾患の理解にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Trans-omics network was constructed using seven omics data on five layers derived from the livers of diet-induced obesity and control mice through mathematical methods, statistical methods, and databases. We found that many of the molecules in all layers changed at two different timings. Also, from the results of the mathematical analysis, we found that other regulations between the layers contributed at the two same timing. These results indicated that fatty liver progression was divided into two stages. Furthermore, based on the trans-omics network, we extracted the characteristics of the metabolic pathways and found that each pathway showed different characteristics. Moreover, we also revealed the coordinated regulation among the layers: a meta-level regulation. These results will provide new insights into fatty liver progression.

研究分野：システム生物学

キーワード：システム生物学 脂肪肝 トランスオミクス解析 マルチオミクス解析 肥満

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病やガン・心血管疾患の大きな危険因子である。健康志向が高まっているが、肥満者数は世界的にも急増している。肥満がもたらす重篤な疾患の一つが脂肪肝である。脂肪肝はインスリン抵抗性や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)・肝ガン等の危険因子であり、その理解や制御(予防)は喫緊の課題である。近年、肥満にはスイッチ様の応答が報告されており、一旦肥満になると例えその後痩せたとしても再び肥満になりやすい体質は残ることが報告されている。つまり、肥満の進行はダイナミクスの観点からも興味深い対象であるが、そのメカニズムは不明のままである。しかし、脂肪肝に関わる分子の動的特性に注目した研究はない。

肥満の肝臓に対する応答は複数の階層(エピゲノムやトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなど)に影響を及ぼすことから、異なる階層の多くのオミクス研究が行われ、数多くの発見があった。しかし、これら殆どの研究が単一階層データかつ対象サンプルとの2点間比較である。時系列を計測した研究も僅かに行われているが、せいぜい3点程度である。さらに階層間の関係を検討する場合、実験条件が異なるため階層間の比較はできない。つまり、肥満進行における階層間の詳細な変容の全体像は未だ不明のままである。

### 2. 研究の目的

我々は世界に先駆けて多階層に跨るネットワーク同定手法を開発し、時系列データを用いた分子の関係性の推定に成功している。本申請ではこれらの手法を基に、肥満における脂肪肝の進行に伴う分子間の変動の関係性を記述する。これにより、脂肪肝進行の詳細な分子の関係性と、肝臓が脂肪肝になり肝ガンなどの危険因子に変容していく過程、そしてそれに関与する分子を理解する。これまでのオミクス解析では、測定した階層の「変動した」という定性的な比較しかできていない。そこで、本研究では、数理モデル(微分方程式モデル)を作成することで変動した異なる階層の分子間の「関係性」も推定する。特に、階層的に上流の分子以外の寄与を考慮することで、これまで見過ごされてきた階層間の制御を定量的に推定し、上流分子以外の寄与とその寄与が始まるタイミングも明らかにする。これにより、肥満に伴う脂肪肝進行の多階層の全体像(トランスオミクスネットワーク)を描き、メタレベルでの制御構造を明らかにすることで脂肪肝進行の理解を目指す。

### 3. 研究の方法

5~20週齢の食餌性肥満(DIO)と通常食(CD)マウスの肝臓を取得する。これらのサンプルから、既に関

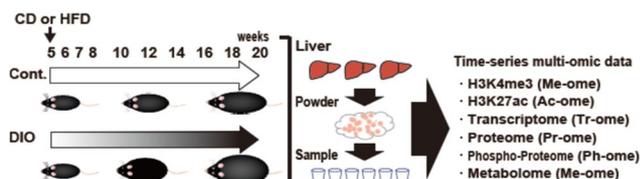


図1 実験デザイン

法を用いて、エピゲノム(H3K4me3, H3K27ac)、トランスクリプトーム、発現プロテオーム、リン酸化プロテオーム、メタボローム(親水性・疎水性)の5階層7種のオームデータを取得する(図1)。

#### (1) トランスオミクスネットワークの構築(図2)

・微分方程式モデル(ODEモデル)を用いたエピゲノム、トランスクリプトーム、プ

## ロテオーム階層の統合 (図2)

エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム階層の分子をシンボルで紐づけし、微分方程式モデルでフィッティングを行う。その際に、他の分子の寄与を考慮し複数のモデルを作成する。複数のモデルからモデルの当てはまりを比較できる BIC を用いて最良のモデルを選択する。これにより、下流階層の分子が上流分子の挙動だけで説明できるか、出来ない場合、「どのような制御」が「いつ」寄与するのかが推定できる。

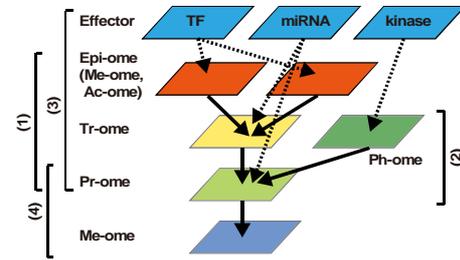


図2 階層間の統合

### ・プロテオームとリン酸化プロテオーム階層の統合 (図2)

トランスクリプトーム、プロテオーム、リン酸化プロテオーム階層の分子をシンボルで紐づけし、相関などを用いてリン酸化プロテオーム階層の分子を分類する。分類した分子群を、その分類から推定されるリン酸化のタンパク質に対する機能と紐づけることで統合する。

### ・effector 階層 (転写因子、miRNA、キナーゼ) の推定 (図2)

データベースや統計的手法を用いて変動したエピゲノム領域に結合する転写因子、変動したトランスクリプトーム・プロテオームを制御する可能性のある miRNA、変動したリン酸化部位をリン酸化するキナーゼを推定する。

### ・メタボローム階層との統合 (図2)

上記で統合したプロテオーム階層の分子を、KEGG データベースを用いて統合する。

## (2) ネットワークの特徴抽出

代謝経路に注目し、各代謝経路の特徴 (各階層の分子の増減・変動開始時期) を抽出する。この抽出結果を基に、経路間の関係性を描きだすことでメタレベルでの制御関係を明らかにする。これらの結果から肥満に伴う脂肪肝進行のメカニズムを理解する。

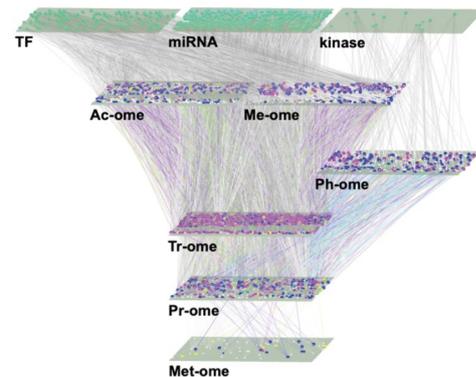


図3 構築したトランスオミクスネットワーク

## 4. 研究成果

トランスオミクス解析により、肥満に伴う脂肪肝進行のトランスオミクスネットワークを構築した (図3)。これらの結果、全ての階層において、多くの分子が 5,6 週齢と、10,12 週齢に変動していることが明らかとなった。また、ODE モデルを用いた他の制御の推定結果から、やはり、5,6 週齢と、10,12 週齢に他の制御が関与していることが明らかになった (図4)。これらの結果は、脂肪肝の進行において分子の変動が 2 段階で変化していることを意味しており、脂肪肝進行に新たな視点を与える結果となった。

次に、代謝経路に注目し、その特徴

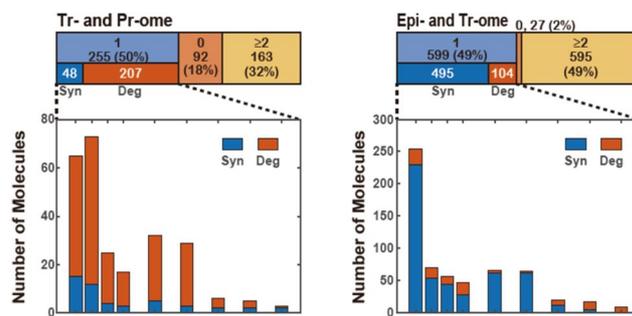


図4 ODEモデルで推定した他制御の寄与とタイミングの推定結果

を抽出した。興味深いことに、代謝経路毎に特徴が存在していた。例えば、コレステロール合成経路は、肥満誘導初期から全ての階層で増加していた。アスコルビン酸経路は10週以降にタンパク質量が減少していた。ODEモデルの結果による代謝経路間の制御に注目すると、OXPHOS経路のタンパク質分解が肥満の初期から誘導されており、ミトファジーによる分解が初期から誘導されていることが示唆された。また、酸化経路では、逆に、RNA量が減少している一方でタンパク質合成が増加していることが示された。これらの結果は、同じ経路内でも階層ごとの制御が異なるという複雑な制御の存在を意味している。また、これらの経路の制御関係を考察することで、経路間の制御関係、つまりメタレベルでの制御メカニズムが明らかとなった(図5)。また、トランスオミクス解析を他の研究に適用し、肥満における肝臓・筋肉の変容も明らかにした。

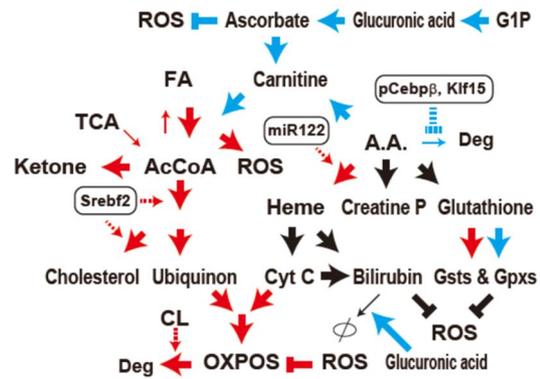


図5 経路間のメタレベルでの制御関係  
色は肥満初期(赤)または後期(青)からの変動を示す

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuzaki Fumiko, Uda Shinsuke, Yamauchi Yukiyo, Matsumoto Masaki, Soga Tomoyoshi, Maehara Kazumitsu, Ohkawa Yasuyuki, Nakayama Keiichi I., Kuroda Shinya, Kubota Hiroyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109569 ~ 109569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109569	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 Kokaji Toshiya, Eto Miki, Hatano Atsushi, Yugi Katsuyuki, Morita Keigo, Ohno Satoshi, Fujii Masashi, Hironaka Ken-ichi, Ito Yuki, Egami Riku, Uematsu Saori, Terakawa Akira, Pan Yifei, Maehara Hideki, Li Dongzi, Tsuchiya Takaho, Ozaki Haruka, Inoue Hiroshi, Kubota Hiroyuki, Suzuki Yutaka, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 12
2. 論文標題 In vivo transomic analyses of glucose-responsive metabolism in skeletal muscle reveal core differences between the healthy and obese states	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-022-17964-9	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 -
1. 著者名 Uematsu Saori, Ohno Satoshi, Tanaka Kaori Y., Hatano Atsushi, Kokaji Toshiya, Ito Yuki, Kubota Hiroyuki, Hironaka Ken-ichi, Suzuki Yutaka, Matsumoto Masaki, Nakayama Keiichi I., Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 25
2. 論文標題 Multi-omics-based label-free metabolic flux inference reveals obesity-associated dysregulatory mechanisms in liver glucose metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103787 ~ 103787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.103787	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 Ito Yuki, Uda Shinsuke, Kokaji Toshiya, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Suzuki Yutaka, Kuroda Shinya, Kubota Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of hepatic responses to glucose perturbation between healthy and obese mice based on the edge type of network structures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-31547-2	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8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kubota Hiroyuki
2. 発表標題 Trans-omic analysis of obesity revealed time-dependent regulation across multiple omic layer.
3. 学会等名 The 31st Hot Spring Harbor International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuzaki F., Uda S., Yamauchi Y., Matumoto M., Soga T., Maehara K., Ohkawa Y., Nakayama K. I., Kuroda S., Kubota H.
2. 発表標題 Trans-omic analysis of inulin response in the liver.
3. 学会等名 The 31st Hot Spring Harbor International Symposium, Online (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田浩行
2. 発表標題 トランスオミクス解析による生命現象の理解
3. 学会等名 最先端バイオインフォマティクス研究ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kubota Hiroyuki
2. 発表標題 Selective regulation of the Insulin-AKT pathway by simultaneous processing of blood insulin pattern in the liver.
3. 学会等名 Fusion of Mathematics and Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Ito, Shinsuke Uda, Toshiya Kokaji, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, Yutaka Suzuki, Shinya Kuroda and Hiroyuki Kubota.
2. 発表標題 Comparison of hepatic responses to glucose perturbation between normal and obese mice using edge ontology.
3. 学会等名 Fusion of Mathematics and Biology (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田 浩行
2. 発表標題 トランスオミクス解析を用いた疾患の理解
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森下 宗, 宇田 新介, 久保田 浩行
2. 発表標題 肥満マウス肝臓におけるインスリン抵抗性の数理モデル解析
3. 学会等名 第45回分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯通堂 紀子、松崎 芙美子、宇田 新介、和泉 自泰、高橋 政友、中尾 素直、油屋 駿介、馬場 健史、 菊竹 智恵、須山 幹太、大川 恭行、原田 哲仁、松本 雅記、中山 敬一、久保田 浩行
2. 発表標題 食餌性肥満によるマウス肝臓変容の時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 第45回分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3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
研究協力者	宇田 新介  (Uda Shinsuke)		
研究協力者	松崎 芙美子  (Matsuzaki Fumiko)		

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
---------	---------