

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06663

研究課題名(和文) 低分子量化合物を活用した多様かつ比較可能な肝機能障害モデルの樹立

研究課題名(英文) Establishment of various and comparable liver injury models with low molecular weight compounds

研究代表者

水野 忠快 (Mizuno, Tadahaya)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低分子量化合物を用いて比較可能な肝機能障害モデル群を樹立することを目的とした。構築したモデルを用いて免疫細胞比率推定手法(Deconvolution法)のベンチマークデータセットを2種類構築し、Deconvolution法において組織特異性、及び種差の考慮が重要であることを実証した。それぞれ国際誌NARGAB、及びToxicol Sciに採択された。特にラットDeconvolution法のデータセットは世界初であり、Open TG-GATEsやDrugMatrixといったラットで取得されている大規模毒性データベースの利活用促進につながるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低分子量化合物を用いて比較可能な肝機能障害モデル群を樹立することを目的とした。構築したモデルにより免疫細胞トラフィッキングの研究を推進すべく、免疫細胞比率推定手法の二つの課題解決に取り組んだ。既存手法はヒト血液での検証が多く、実質細胞など多様な細胞が混在する組織での性能評価の必要性は指摘されていたものの、未解決であった。本研究は同課題に対して組織特異性考慮の重要性を明確に示している。昨今多く公共データベースには多くのトランスクリプトームデータが蓄積されている。本研究は適切なデータ取得とモデリングにより、これらより新たな知見を得ることが可能であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a set of comparable liver dysfunction models using low molecular weight compounds. Using the established models, we constructed two benchmark datasets for the immune cell ratio estimation method (deconvolution method) and demonstrated the importance of considering tissue specificity and species differences in the deconvolution method. The results were published in the international journals NARGAB and Toxicol Sci, respectively. In particular, the rat deconvolution dataset is the first of its kind in the world, and is expected to promote the utilization of large-scale toxicity databases obtained from rats, such as Open TG-GATEs and DrugMatrix.

研究分野：医療薬学

キーワード：肝機能障害 トランスクリプトーム Deconvolution 免疫細胞トラフィッキング

1. 研究開始当初の背景

肝機能障害の病態進展において、免疫細胞の応答は重要である。そこで病態進展機序を危険因子への曝露、免疫応答の亢進、そして病態進行の連結として捉えると、3層からなるネットワーク構造として考えることができる。肝機能障害は非常によく研究されているため、各層自体は理解されている(1)。しかしある危険因子(入力)に対してどの病態(出力)が生じるかといった階層の対応関係(進行機序)は整理されておらず、その共通点・相違点や寄与率は不明である。現状を説明する要因として、比較可能な知見の欠如が挙げられる。階層間の対応関係を体系的に理解するためには、入力に対する中間層(免疫応答)、及び出力の対応を多面的に比較する必要がある。しかし頻用される代表的な肝機能障害モデル(胆管結紮等)同士は、構築に要する時間や方法等、条件が大きく異なるため比較できない。薬物誘導性肝障害(DILI)モデルは因果関係が比較的明瞭であるが、DILIの研究も概ね散発的であり、投与経路や処理時間等を考慮した比較可能な条件にて危険因子と免疫応答・病態との関係性を評価した知見は存在しない。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、データ駆動型解析による薬物の未知側面の理解に務めてきた。因子分析を応用して薬物の複合的な作用を分解するプロファイルデータ解析手法を独自に開発し、FDA承認薬の潜在的なERストレス誘導能の検出等の成果を上げている(2-4)。上記は、低分子薬物が多様な作用を有すること、及び独自解析手法がそれらを縮約して検出可能であることを示している。多様かつ比較可能な知見を集めることで入力から出力までの経路の共通点や相違点が明らかになると期待される。以上より、本研究では、低分子化合物を用いて肝臓に多様なパータベーションを与え、得られるデータを解析することで、肝機能障害における免疫細胞の応答の関係性を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

2021年度は、まず多様な肝機能障害のスペクトルをカバーする低分子化合物群を見出すためのスクリーニングに取り組んだ。多様な低分子化合物を投与した際の個体のプロファイルを有するデータベースとしては、ラットを対象としたOpen TGGATEs等の大規模毒性データベースが挙げられる(5)。同データベースを対象に*in silico*による一次スクリーニングを行い、その後*in vivo*による二次スクリーニングを行うことで、多様な肝機能障害を誘導する低分子化合物群の選定に取り組んだ。しかしながら上記方策ではマウスとラットの種差が示唆されたため、マウス、及びラットそれぞれに分けて低分子化合物を用いた多様な肝機能障害時のプロファイルデータを取得することとした。

2022年度は取得した二種類のデータの解析に取り組んだ。マウスのデータは、比較的少数ながらトランスクリプトームデータ、免疫細胞比率、及び生化学検査値からなるマルチビューデータであるため、これらの関係性をデータ駆動型に評価した。ラットのデータは組織トランスクリプトームデータから当該組織内の免疫細胞比率を推定するアルゴリズムであるDeconvolution法を可能とする補助的なデータである(6)。同データを用いたDeconvolution法をOpen TGGATEsへ適用することで、肝機能障害時の多様な免疫細胞の応答を解析した。

最終年度である2023年度には、2022年度に用いたDeconvolution法について見出した課題の解決に取り組んだ。第一は既存のDeconvolution法が血液やがんを主に対象としており、組織への適用の知見が乏しいことである。組織の場合、特に血液とは異なり組織の実質細胞やその他の細胞も多く混入するため、組織に対しても適用が可能かどうか不明となっている。同じ課題意識を持つ文言はいくらかの論文報告で認められたものの、具体的に検証はされていない(7)。第二に、現状ではDeconvolution法に資するラット免疫細胞のトランスクリプトームデータが存在しないことである。先の組織への適用可否についての知見が乏しいこともあり、現状ではOpen TG-GATEsのような多様な状態の組織トランスクリプトームデータをDeconvolution法で解析できない。本研究で取得したデータはこれらを解決するものであり、上記二つの課題解決に向けた研究を実施した。

4. 研究成果

2021年度は候補化合物群の*in silico*による一次スクリーニングと*in vivo*による二次スクリーニングとに取り組んだ。具体的には、TGGATEs等のラット毒性データベースを対象に因子分析を行い、様々なスペクトルを持ち、肝機能障害を惹起する候補化合物群を5群見出した。見出した群に所属する代表的な化合物をマウスの*in vivo*試験(生化学検査値)により評価したところ、興味深いことに半数の化合物はそもそも肝機能障害を誘導しなかった。肝機能障害を誘導しなかった化合物については、LD50を超える濃度であっても誘導されないことを確認している。

上記要因として、マウスとラットの種差が考えられる。そこで戦略を変更し、マウスとラットを分けて、多様な肝機能障害モデルの作出に取り組むこととした。研究拡充のため、新学術

領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受け、多様な化合物処理を施した際のマウス肝臓、及びラット各種免疫細胞のトランスクリプトームデータを取得した。前者は文献調査に基づき、マウスにて肝機能障害を有することが広く受け入れられている化合物を選出した。これらの化合物を用いることで、化合物による肝機能障害様式の相違点をデータ駆動型に判別することができる(図1)。後者は、組織トランスクリプトームデータから当該組織内の免疫細胞比率を推定するアルゴリズムである Deconvolution 法を実施する際、補助的に必要なデータである。既存のラット毒性データベースに対し、Deconvolution 法を適用することで、多様なパータベーションを与えた際の肝臓での免疫細胞の応答に関する情報が取得可能となる。

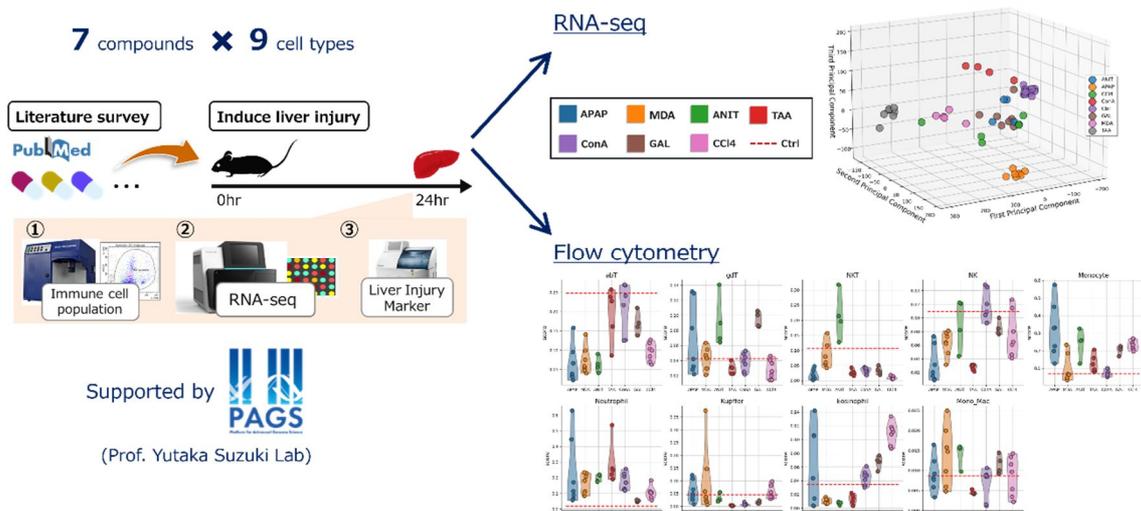


図1. データセットの構築

2022年度は、2021年度に取得した上記2つのデータセットを解析した。一つ目はマウスのデータセットであり、文献調査に基づいて選出された化合物群を処理した際のトランスクリプトームデータと、対応する肝臓中の免疫細胞データ、及び生化学検査値から構成されるマルチビューデータである。本データの解析により、比較的少数ではあるものの、化合物により様々なスペクトルの肝機能障害を惹起した際の免疫細胞の応答を、データ駆動型に評価可能となる。解析の結果、まず全体的な傾向としてALT上昇時に好中球が増大することを確認した。興味深いことにこのとき単球が続くものとそうでないものに分離されることを見出した(図1)。

二つ目はラット免疫細胞のトランスクリプトームデータである。興味深いことに、Deconvolution 法はヒトやマウスを中心に用いられており、これまでラットへの適用を可能とするデータセットが存在しなかった。本研究で取得したデータセットはまさしくラットへの適用を可能とするものであり、世界初のデータセットとなる。取得したデータセットにより確立したラットのDeconvolution法を用いてラットの大規模毒性データベースであるOpen TG-GATEs 収載のトランスクリプトームデータを解析し、得られた免疫細胞のデータを用いてクラスタリングを実施した。結果、同データベースの化合物が誘導する免疫細胞の挙動は、4つのクラスターに分かれることを見出した(図2)。

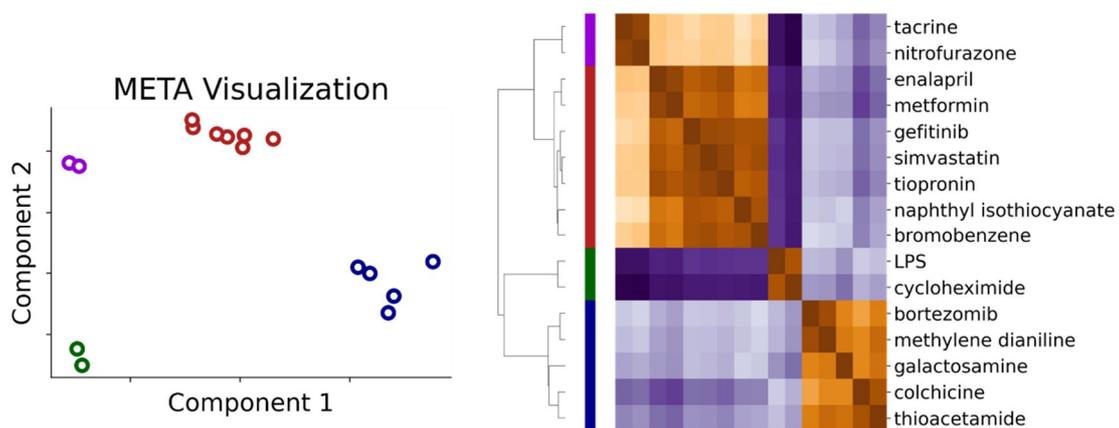


図2. ラットのデータセットを用いた解析

Deconvolution 法は組織のトランスクリプトームデータをメインに、解析対象の免疫細胞のトランスクリプトームデータを補助的に使用し、免疫細胞比率を推定する手法である。しかし、一般に血液を対象に性能評価がなされており、実質細胞など多様な細胞も存在する組織での精度は不明であった。そこで取得したマウスのデータセットを用い、組織特異的なDeconvolution

モデルを構築したところ、公共データベースより入手したデータより、アセトアミノフェン単回投与の72時間後に好酸球の浸潤が上昇することが推定された。実際に同一の条件を当研究室で再現したところ、確かに好酸球浸潤が確認された(図3)。一方、組織特異性を考慮しないモデルでは好酸球の挙動は推定できなかったことから、組織特異性の重要性が明らかとなった(8)。組織に適用が可能な場合、Open TG-GATEs などの大規模毒性データベースは有用なデータソースになると考えられるが、Deconvolution 法適用時の種間差については知見が存在しなかった。そこでヒト、マウス、ラットのデータをそれぞれ使い、種差の影響を評価したところ、Open TG-GATEs などラットのデータを入力とするときの性能は、我々が取得したラットのデータを補助的に用いた場合が最も高いことが示された(9)。以上より Deconvolution 法で用いる補助的データの種差を考慮することが推定精度に重要であることが示された。これらの成果は *NARGAB*, *Toxicol Sci* などの国際誌に採択された。

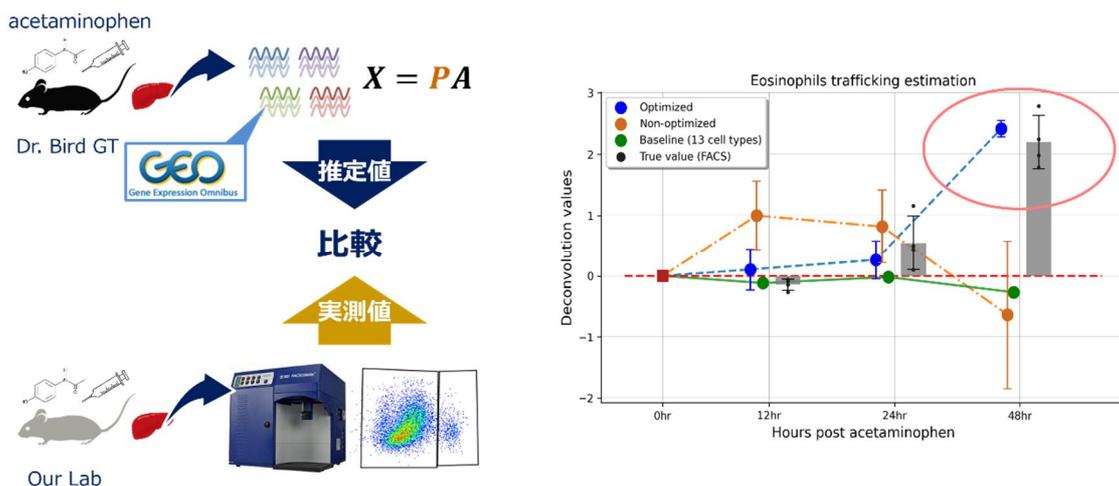


図3. ベンチマークデータセットを用いて最適化したモデルの性能

本研究では、低分子化合物を用いて多様な肝機能障害時の免疫細胞の挙動のプロファイルを構築し、免疫細胞同士の関係性理解に資するデータを取得した。またトランスクリプトームデータ、flow cytometry, 及び生化学検査値からなるマルチビューデータセットをマウスとラットの2種類で構築し、組織での Deconvolution 法のベンチマークデータセットを提案するとともに、Deconvolution 法において組織特異性、及び種差の考慮が重要であることを実証した。それぞれ国際誌 *NARGAB*, 及び *Toxicol Sci* に採択された。特にラット Deconvolution 法のデータセットは世界初であり、Open TG-GATEs や DrugMatrix といったラットで取得されている大規模毒性データベースの利活用促進につながるものと期待される。昨今多く公共データベースには多くのトランスクリプトームデータが蓄積されている。本研究は適切なデータ取得とモデリングにより、これらより新たな知見を得ることが可能であることを示唆している。

参考文献 (*, equal contribution; †, corresponding author; **本研究成果**)

1. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*. 2014 May;60(5):1090-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412603.
2. **Mizuno T†**, Kinoshita S, Ito T, Maedera S, Kusuhara H. Development of Orthogonal Linear Separation Analysis (OLSA) to Decompose Drug Effects into Basic Components. *Sci Rep*. 2019 Feb 12;9(1):1824. doi: 10.1038/s41598-019-38528-4. PMID: 30755704; PMCID: PMC6372619.
3. Morita K, **Mizuno T*†**, Kusuhara H. Decomposition profile data analysis of multiple drug effects identifies endoplasmic reticulum stress-inducing ability as an unrecognized factor. *Sci Rep*. 2020 Aug 4;10(1):13139. doi: 10.1038/s41598-020-70140-9. PMID: 32753643; PMCID: PMC7403579.
4. Nemoto S, Morita K, **Mizuno T†**, Kusuhara H. Decomposition Profile Data Analysis for Deep Understanding of Multiple Effects of Natural Products. *J Nat Prod*. 2021 Apr 23;84(4):1283-1293. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c01381. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33836128.
5. Igarashi Y, Nakatsu N, Yamashita T, Ono A, Ohno Y, Urushidani T, Yamada H. Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D921-7. doi: 10.1093/nar/gku955. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25313160; PMCID: PMC4384023.
6. Newman AM, Steen CB, Liu CL, Gentles AJ, Chaudhuri AA, Scherer F, Khodadoust MS,

- Esfahani MS, Luca BA, Steiner D, Diehn M, Alizadeh AA. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol*. 2019 Jul;37(7):773-782. doi: 10.1038/s41587-019-0114-2. Epub 2019 May 6. PMID: 31061481; PMCID: PMC6610714.
7. Chen Z, Wu A. Progress and challenge for computational quantification of tissue immune cells. *Brief Bioinform*. 2021 Sep 2;22(5):bbaa358. doi: 10.1093/bib/bbaa358. PMID: 33401306.
 8. Azuma I, Mizuno T* †, Morita K, Suzuki Y, Kusuhara H. Investigation of the usefulness of liver-specific deconvolution method by establishing a liver benchmark dataset. *NAR Genom Bioinform*. 2024 Jan 5;6(1):lqad111. doi: 10.1093/nargab/lqad111. PMID: 38187088; PMCID: PMC10768887.
 9. Morita K, Mizuno T* †, Azuma I, Suzuki Y, Kusuhara H. Rat Deconvolution as Knowledge Miner for Immune Cell Trafficking from Toxicogenomics Databases. *Toxicol Sci*. 2023 Nov 6;197(2):121–31. doi: 10.1093/toxsci/kfad117. Epub ahead of print. PMID: 37941435; PMCID: PMC10823770.

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 Azuma Iori, Mizuno Tadahaya, Morita Katsuhisa, Suzuki Yutaka, Kusuvara Hiroyuki | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Investigation of the usefulness of liver-specific deconvolution method by establishing a liver benchmark dataset | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics | 6. 最初と最後の頁 ecollections |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nargab/lqad111 | 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 Katsuhisa, Mizuno Tadahaya, Azuma Iori, Suzuki Yutaka, Kusuvara Hiroyuki | 4. 巻 197 |
| 2. 論文標題 Rat deconvolution as knowledge miner for immune cell trafficking from toxicogenomics databases | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Toxicological Sciences | 6. 最初と最後の頁 121 ~ 131 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/toxsci/kfad117 | 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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 東一織, 森田勝久, 水野忠快, 楠原洋之 |
| 2. 発表標題 大規模毒性データベース活用に向けたdeconvolution法の検討 |
| 3. 学会等名 第50回日本毒性学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 水野忠快 |
| 2. 発表標題 オミクスデータの潜在表現に基づく生体応答の記述と理解 |
| 3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野忠快 , 森田勝久 , 東一織 , 楠原洋之 |
| 2. 発表標題 Investigation of the impact of tissue specificity and species differences on deconvolution in transcriptomics data |
| 3. 学会等名 2023年日本バイオインフォマティクス学会年会・第12回生命医薬情報学連合大会3 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Katsuhisa Morita , Tadahaya Mizuno , Iori Azuma , Hiroyuki Kusuhara |
| 2. 発表標題 Investigation of factors contributing to the estimation accuracy of deconvolution toward application to large-scale toxicogenomics databases |
| 3. 学会等名 第38回日本薬物動態学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔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 |
|---------|---------|
| | |