

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300111

研究課題名(和文)オミックス解析とシステム数理科学による漢方薬効の統合理解

研究課題名(英文)Omics Analysis and Systems Mathematical Science towards Understanding Kampo Efficacy

研究代表者

井元 清哉 (Imoto, Seiya)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10345027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：漢方薬は、その効果についてあまり科学的な裏付けを持たないまま「経験的な効果」を頼りに広く治療に用いられている。本研究課題においては、漢方薬に科学的エビデンスを与えるため、薬効の分子レベルの作用機序を明らかにするための時系列トランスクリプトームデータを補中益気湯、人參養榮湯に関して取得し、それぞれインフルエンザ、および脱髄に対する作用について解析を行った。また、薬剤の作用をシミュレーションするため、シミュレーションモデルを時系列データとパスウェイにおける既存知識から自動的に構築するためのデータ同化技術を開発し、漢方薬効の大規模シミュレーションを可能とした。

研究成果の概要(英文)：Kampo medicine has been widely used, but frequently its scientific evidence is not very clear. In this study, to find scientific evidence of two Kampo medicine, Hochuekki-to and Ninjinyoei-to, we newly create whole transcriptome data measured by microarray chip technology. The transcriptome data were measured in time-series and we prepare multiple conditions for case-control study and for Hochuekki-to transcriptome data were measured in multiple tissues. We used them to elucidate molecular mechanism of Kampo efficacy. To create simulation model for representing drug mode-of-action, we developed new data assimilation technique that can handle drug as an external variable. The relationship among molecules can be automatically determined based on the previously reported models. If the template models contain errors, the method automatically revised the models that yield more accurate prediction. This technique enables us to perform larger simulation of Kampo mode-of-action.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：システム数理解析 漢方薬効 オミクスデータ解析 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は、8割の医師が処方し、町中のほとんどの薬局で一般に販売されており、特別な薬では全くない。しかしながら、ある症状についてある漢方薬がなぜ効果があるのか科学的に明らかになっていることは稀である。通常、新薬については、既存薬や偽薬と効果を比較する、いわゆる無作為化比較試験 (RCT) を行い、その効果を保証する。しかしながら、漢方薬は、そもそも個別化医療であり、RCTによりその効果を計るのは困難であることから RCT がほとんど行われてこなかった (実際、東洋医学会によると、漢方薬における RCT が実施されている論文は1986~2005年に出版された10症例以上を取り扱った全903報中13報であったとの調査報告がなされている)。

平成21年度厚生労働科学特別研究事業「漢方・鍼灸を活用した日本型医療創生のための調査研究」において、大規模な患者の診断・問診データの蓄積とそのデータ解析により漢方薬の効果が高い特徴的症狀を抽出するなどの研究がなされ、漢方医療に科学的なエビデンスを蓄積するための研究が進められていた (<http://kampo.tr-networks.org/sr2009/>)。しかしながら、上記研究は、漢方薬効を遺伝子やタンパク質が形成する生体内分子ネットワークレベルのシステムとして理解するという基礎科学的視点を有していない。一方、漢方薬を科学的に解釈するための研究は、中国、韓国も精力的に進めており、やはり日本と同様に、漢方医学における治療と西洋医学の治療との関連を科学的に明らかにすることに力点は置かれているが、徐々に漢方オミックスデータのシステムの解析の重要性も議論されつつあった (Qui, *Nature*, 488, 126-128, 2007; Lam et al., *Science Translational Medicine*, 2, 45-59, 2010)。

そのような背景の中、研究代表者・分担者らは、共同研究として2007年に発表した論文 (Yamaguchi et al., *Genome Inform.*, 18, 119-129, 2007) において、漢方薬 (人参養栄湯) を経口投与されたマウスのマイクロアレイ遺伝子発現データから、脱髄細胞を再髄鞘化する作用に関連する遺伝子パスウェイの候補を見出すことに成功した。この解析を通して、この薬効は、単一遺伝子に薬が作用することで実現されているのではなく、多くの遺伝子に作用し、その結果、再髄鞘化が起きるように漢方薬がシステムの状態を変化させていることが示唆され、システム数理科学的なアプローチが複雑な漢方薬効を理解する上で必要不可欠であることを世界で初めて示した。

2. 研究の目的

漢方薬効システムを予測抽出することの

できるオミックスデータをデザイン・取得し、統合理解するための情報科学技術を開発する。いくつかの漢方薬 (補中益気湯や人参養栄湯など) について、ラットに経口投与した時系列トランスクリプトームデータを取得する。また、比較対象 (コントロール) として、漢方薬を投与していないラットの時系列トランスクリプトームデータも同時点において計測する。この2つのトランスクリプトームデータに基づき、各漢方薬が影響を与えている遺伝子パスウェイを同定し、それらがどのような機能によりシステムの状態を変化させ薬効に関与しているかを明らかにする情報科学技術を開発する。また、トランスクリプトームに加え、ヒトの多様性と薬効の関係に対応するため、ゲノムデータ、特に次世代シーケンサーにより取得されたゲノムシーケンス (全ゲノムやエキソームシーケンス) を解析するための方法も合わせて開発を行う。

また、漢方薬に加え、他の薬剤の影響を計測したトランスクリプトーム (頻繁に用いられる3、特徴的な薬効が知られている2漢方薬を選定。研究計画の表を参照) について、投与した際のマイクロアレイ遺伝子発現データ、ヒストン修飾のエピゲノムデータ (共にケース・コントロールデータ) を取得する。これは、米国国立がん研究所 (NCI) が公開している60種類のヒト培養がん細胞株についての薬剤感受性などの基礎データ (NCI60) の漢方版に相当し、前述の時系列発現データ解析で見いだした機能的な漢方薬効システムを基にして、他の漢方薬の薬効システムとの関連を網羅的に調べることを可能とし、加えて、このケース・コントロールデータから注目すべき遺伝子群を事前に同定し、それらの動的振る舞いを個別漢方薬の時系列データを用いて解析することで前述の漢方薬の薬効システムに関する理解が飛躍的に進むことが期待できる。

以上を統合解析し、複雑な薬効システムを理解するためのシステム数理科学駆動型オミックス解析の一般的枠組みを構築し、漢方薬効トランスオミックスデータの解析を通してその有効性を示す。

3. 研究の方法

7週齢のC57BL/6に対して水 (control) または補中益気湯 (1g/kg/day) を2週間に渡って投与した後、Influenza virus に感染させ、6時間後、および24時間後に肺、脾臓を抽出しマイクロアレイ解析を共用促進事業のサポートを受け行った。例えば、水投与のみの状況でInfluenza virus に感染させた場合の各遺伝子発現の値と補中益気湯を投与した上でInfluenza virus に感染させた場合の各遺伝子発現の値を比較する場合、各条件において1枚ずつのマイクロアレイデータしかなければ、マイクロアレイの観測誤差

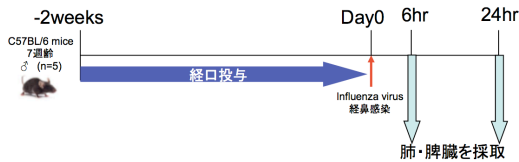


図1：補中益気湯によるインフルエンザ抑制機構の解明研究の実験デザイン

い大きさの誤差が含まれるため、本研究においては各時点においてマイクロアレイでは $n=4$ で解析を行った。このデザインにより、各遺伝子の発現量を条件間で統計的に比較することが可能となり、より精緻な解析が可能となった。

本研究においては、以下の網羅的な比較を肺、脾臓において行っている（図1参照）。

1. -2week vs 水投与(6hrs)vs 水投与(24hrs) (肺、脾臓それぞれで)
2. -2week vs 補中益気湯投与(6hrs) vs 補中益気湯投与(24hrs) (肺、脾臓それぞれで)
3. -2week vs 水投与+Influenza virus 感染(6hrs) vs 水投与+Influenza virus 感染(24hrs) (肺、脾臓それぞれで)
4. -2week vs 補中益気湯投与+Influenza virus 感染(6hrs) vs 補中益気湯投与+Influenza virus 感染(24hrs) (肺、脾臓それぞれで)
5. 水投与 vs 補中益気湯投与(6hrs, 24hrs, 肺、脾臓それぞれで)
6. 水投与+Influenza virus 感染 vs 補中益気湯投与+Influenza virus 感染(6hrs, 24hrs, 肺、脾臓それぞれで)

人参養栄湯の稀突起膠細胞（オリゴ）とその前駆細胞（OPC）に対する作用機序解明のため、人参養栄湯に含まれる陳皮を構成する成分（Hesperidin, Nobiletin, Narirutin）に着目し、補中益気湯投与の実験デザインを踏襲し以下のデータを取得した。

1. Control (0hr, 6hrs, 24hrs)
2. Hesperidin のみ (6hrs, 24hrs)
3. Nobiletin のみ (6hrs, 24hrs)
4. Hesperidin+Narirutin (6hrs, 24hrs)

次に、薬剤の効果をシミュレーションするための数理モデルの開発を行う。この研究のために、副腎皮質ホルモングルコルチコイドを暴露したラット肝臓細胞の時系列遺伝子発現プロファイルデータ（Jin et al., 2003）を用いた。このグルコルチコイドに対する反応モデルとして、5つのシミュレーションモデルが先行研究により構築され、197遺伝子の発現プロファイルがこれらのモデルで説明できると結論付けられている。しかしながら、これらのシミュレーションモデルは、数個の遺伝子によって構成

されており、薬剤の影響の全体像にはほど遠いと言わざるを得ない。そこで、データ同化技術を薬剤による攪乱を入れ、不完全なテンプレートモデルから完全なモデルへと改変することが出来るよう改良を行う。

4. 研究成果

補中益気湯によるインフルエンザ抑制に関する研究において取得したマイクロアレイデータは、Percentile Normalizationにより正規化した。各遺伝子について、 $n=4$ の遺伝子発現データを t -test により発現差解析し、有意に差のある遺伝子を抽出した。また、抽出した遺伝子の生物学的な解釈の為、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)、Meta Gene Profiler、DAVID を用いて遺伝子セット単位での解析を行った。肺 24hrsにおける上記6の比較を例示する。55,681 probes を75 percentileシフト、および \log_2 変換した後、最も平均値の大きい probe を用いて 24,288個の unique な gene へマッピングした。Case を補中益気湯投与+Inf1, Control を水投与+Inf1 とし、有意水準 5%で Case>Cont (かつ Case<0)の遺伝子が 162個、Case<Cont が 504個であった。DAVID による遺伝子セット解析を行った結果、Case<Cont で有意な遺伝子はリボソーム関連の遺伝子が有意に多く見られ水投与+Inf1 では Inf1 virus の増殖に使われており、補中益気湯投与下ではその働きが抑えられている可能性が示唆された。

人参養栄湯の稀突起膠細胞（オリゴ）とその前駆細胞（OPC）に対する作用機序解明、および脱髄に対する作用に関する研究について、計画で記載したデータの取得を終了し、クオリティチェックを行い、正常に取得されていることを確認した。また、遺伝子毎の発現差解析を終了し、既報の結果との整合性、差異について検討を行った。現在、さらなる解析を進めているところである。

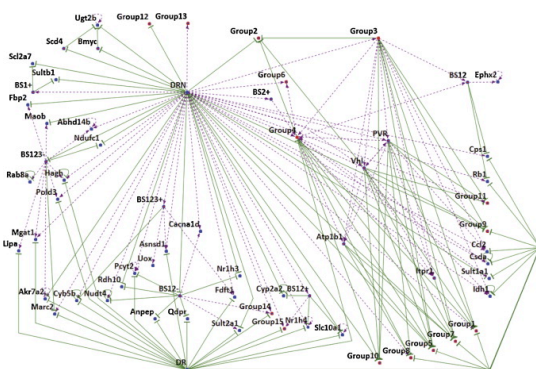


図2：グルコルチコイドの影響を受ける遺伝子のシミュレーションモデル(構造のみ図示)

薬剤の影響をシミュレーションするデータ同化技術の開発については、文献に基づき

構成した5つの小規模シミュレーションモデルから、モデルを拡張しより高い予測能力を有するモデルを新たに構築する技術を開発し、Hasegawa T, Nagasaki M, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S. An efficient method of exploring simulation models by assimilating literature and biological observational data. *BioSystems*. 121, 54-66 (2014).にて発表した。その結果、図2に示すような、薬剤応答の全容を示すシミュレーションモデルを構築できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Kayano M, Imoto S, Yamaguchi R, Miyano S. Multi-omics approach for estimating metabolic networks using low-order partial correlations. *Journal of Computational Biology*. 20(8), 571-582 (2013).
- ② Affara M, Sanders D, Araki H, Tamada Y, Dunmore BJ, Humphreys S, Imoto S, Savoie C, Miyano S, Kuhara S, Jeffries D, Print C, Charnock-Jones DS. Vasohibin-1 is identified as a master-regulator of endothelial cell apoptosis using gene network analysis. *BMC Genomics*. 14(1), 23 (2013).
- ③ Park H, Shimamura T, Miyano S, Imoto S. Robust prediction of anti-cancer drug sensitivity and sensitivity-specific biomarker. *PLoS One*. 9(10), e108990 (2014).
- ④ Hasegawa T, Yamaguchi R, Nagasaki M, Miyano S, Imoto S. Inference of gene regulatory networks incorporating multi-source biological knowledge via a state space model with L1 regularization. *PLoS One*. 9(8), e105942 (2014).
- ⑤ Hasegawa T, Nagasaki M, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S. An efficient method of exploring simulation models by assimilating literature and biological observational data. *BioSystems*. 121, 54-66 (2014).
- ⑥ Usuyama N, Shiraishi Y, Sato Y, Kume H, Homma Y, Ogawa S, Miyano S, Imoto S. HapMuC: somatic mutation calling using heterozygous germline variants near candidate mutations. *Bioinformatics*. 30(23), 3302-3309 (2014).
- ⑦ Hasegawa T, Mori T, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Akutsu T. An efficient data assimilation schema for restoration and extension of gene

regulatory networks using time-course observation data. *Journal of Computational Biology*. 21(11), 785-798 (2014).

- ⑧ Park H, Niida A, Miyano S, Imoto S. Sparse overlapping group lasso for integrative multi-omics analysis. *J Computational Biology*. 22(2), 73-84 (2015).
- ⑨ Hasegawa T, Mori T, Yamaguchi R, Shimamura T, Miyano S, Imoto S, Akutsu T. Genomic data assimilation using a higher moment filtering technique for restoration of gene regulatory networks. *BMC Systems Biology*, 9:14 (2015).

[学会発表] (計2件)

- ① 井元清哉、個別化医療時代の漢方、NPO健康医療開発機構 第7回シンポジウム、2014年03月02日、学士会館、国内、口頭発表(招待)
- ② Katayama-Shibata K, Munakata K, Dan K, Yamaguchi R, Imoto S, Watanabe K, Miyano S. Analysis of RNA Expression Change of Kampo-treated Mice, Pacific Symposium on Biocomputing, 2015年1月6日、米国ハワイ州、国外、ポスター発表

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井元 清哉 (IMOTO, Seiya)

東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：10345027

(2)研究分担者

渡辺 賢治 (WATANABE, Kenji)
慶應義塾大学・環境情報学部・教授
研究者番号：70191757