

研 究 報 告 書

「トランスオミクス解析による多剤併用療法の合理的設計と多因子代謝疾患の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 柚木 克之

1. 研究のねらい

細胞は、DNA、RNA、タンパク質、代謝物質など複数のオミクス階層にまたがる分子間相互作用ネットワークによって多彩な機能を発揮するシステムである。代謝と他のオミクス階層をつなぐネットワークの破綻はがんなどの多因子代謝疾患を引き起こすことが知られており、これらに対する薬剤の作用は、標的分子への刺激をきっかけとしてネットワークの破綻を正常化する応答として捉えることができる。しかしながら、日本国内で承認されている化合物ベースの薬剤約 1500 種類のうち、分子間相互作用ネットワークのグローバルな応答として薬理作用が理解されているものはほとんど存在しない。したがって、多因子代謝疾患のメカニズムを解明し、疾患制御につなげるためには、まず第 1 のステップとして「地図」となる多階層代謝制御ネットワークを再構築する必要がある。次いで第 2 のステップとして、得られたネットワーク情報に基づいて多因子標的を同定し、当該多因子標的を制御する最適な薬剤組合せを探索する方法論が必要である。本研究はこれら 2 つのステップについて手法開発と概念実証を行う。

第 1 のステップとして、先に開発した「トランスオミクス解析」の方法論を薬剤作用に適用し、各種薬剤を投与した際に細胞内で応答する多階層代謝制御ネットワーク(以下「薬剤応答ネットワーク」)を再構築することにより、いまだ不明な点が多い薬剤応答のグローバルな作用機序をネットワークとして解明する。これと並行して、トランスオミクス解析の方法論をより多くのオミクス階層を対象に拡張する。また、トランスオミクス解析によるネットワーク再構築の自動化を目的として、汎用生命科学オープンプラットフォーム Garuda Platform に準拠したトランスオミクス解析ソフトウェアを開発し、創薬研究者からの要望が根強いトランスオミクス解析の自動化を実現する。

第 2 のステップとして、得られた薬剤応答ネットワークを「地図」として多因子標的を同定し、当該多因子標的を制御する最適な薬剤組合せを探索する方法論の開発と概念実証を行う。新規に見出した薬剤組合せを用いて、ネットワーク内で密接に関連する多因子標的を正常状態へと誘導するネットワーク中心の代謝疾患制御を目指す。これにより、多因子代謝疾患一般に将来展開可能な創薬基盤技術を確立する。

2. 研究成果

(1) 概要

■ 研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

◇ 薬剤を投与した培養肝細胞もしくはマウスの肝臓のサンプル調製、オミクスデータ計測

培養肝細胞(ヒト肝がん由来 HuH-7)およびマウス肝臓を用いて 2 型糖尿病薬メトホルミンの作用を反映したオミクスデータを取得するための実験系構築を試みた。最終的には、メトホルミンの生理的応答である血糖値上昇抑制および生化学的応答である肝臓における AMPK リン酸化亢進の両者をマウスにおいて測定できる実験系を確立した。調製したマウス肝臓サンプルについては順次品質評価を行い、平成 30 年 12 月現在、オミクス計測に供する準備段階にある。

◇トランスオミクス解析の拡張・改良

これまでのメタボロームデータの代わりに炭素 13 で標識した同位体メタボロームデータを用いる改良型トランスオミクス解析手法を開発した (Krycer, Yugi et al. 2017, Cell Rep.)。また、従来のトランスオミクス解析では取り扱えなかったトランスクリプトーム階層による代謝制御を含む拡張手法を開発した (Sano et al. 2016, Sci. Signal.; Kawata, Hatano, Yugi et al. 2018, iScience)。このほか、リン酸化プロテオーム階層をキナーゼ層 (タンパク質をリン酸化する側) と基質層 (リン酸化される側のタンパク質) の 2 つに分けて両者の間のネットワークを推定する手法を開発した (Kawata, Yugi et al. 2018, Genes Cells)。

■研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

トランスオミクスに基づく創薬基盤技術の社会実装を目指し、製薬企業等の創薬研究者によるトランスオミクス解析を容易に実施可能にすることを目的としたソフトウェアを開発した。まず、メタボローム階層、リン酸化プロテオーム階層、トランスクリプトーム階層のそれぞれのネットワーク再構築手法を個別にソフトウェア化した。次いで、当該 3 階層間をつなぐ階層間ネットワーク再構築ソフトウェアを開発し、システム・バイオロジー研究機構が提供する Garuda Platform に準拠して、前記 3 階層を個別に解析するソフトウェア群とシームレスなデータ交換を行えることを確認した。

■研究テーマ C・D: 薬剤応答ネットワークに基づく多剤併用療法の設計

上記研究テーマ A によりメトホルミン作用の薬剤応答ネットワーク再構築が完了した時点で行う解析を想定した概念実証研究を行い、ネットワークを用いた併用薬候補探索が現実的に可能であることを示した。

(2) 詳細

■研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

◇薬剤を投与した培養肝細胞もしくはマウスの肝臓のサンプル調製、オミクスデータ計測

培養肝細胞 (ヒト肝がん由来 HuH-7) を用いて、2 型糖尿病薬メトホルミンの作用を反映したオミクスデータを取得するための実験系構築を試みた。当初の実験デザインは、グルカゴン HuH-7 細胞に投与し、一定時間経過後にメトホルミンを投与して応答を測定するというものであった。しかし、想定していたグルカゴンに対する当該培養細胞の応答が見られなかったため、バックアップとして考えていたマウス肝臓サンプルを用いた実験系構築に移行した。マウス肝臓を用いた系では、先行研究 Miller et al. (2013) Nature にてメトホルミン投与時に計測された血糖値応答をほぼ再現することに成功した。さらに、メトホルミン用量を 7 段階変えて試したところ、用量依存的に血糖値低下を示すことを見出した。しかし、メトホルミン投与時の肝細胞における分子レベルのポジティブコントロールとして広く知られている AMPK リン酸化の亢進を確認できなかった。この問題に関しては領域会議における杉浦悠毅研究者からの指摘をヒントに実験条件を変更したところ、AMPK リン酸化の亢進を測定できる実験系の確立に成功した。研究目的達成に向けて、取得した肝臓サンプルの品質評価を行い、血糖値降下と AMPK リン酸化亢進の両方を呈したサンプルを特に選抜してオミクス計測に供する。得られたオミクスデータを研究テーマ B で開発したソフトウェアに入力し、メトホルミンに応答する多階層ネットワークを再構築する。

◇トランスオミクス解析の拡張・改良

シドニー大学の David James 教授と共同で、これまでのメタボロームデータの代わりに炭素 13 で標識した同位体メタボロームデータを用いる改良型トランスオミクス解析の手法開発を行った(Krycer, Yugi et al. 2017, *Cell Rep.*)。代謝物質およびリン酸化の時定数(=代謝物質濃度またはリン酸化強度が最大値の 1/2 に達する時間)を求めたところ、インスリンで刺激したマウス 3T3L1 脂肪細胞では代謝フラックス増加に先んじて代謝酵素リン酸化がパスウェイの各所で起こる現象を見出し、'metabolic priming' と命名した(図 1)。また、RNA など比較的変動が遅い遺伝子発現のオミクス階層による階層縦断的代謝制御を対象とする拡張版トランスオミクス技術を開発した(Kawata, Hatano, Yugi et al. 2018, *iScience*)。なおこれに先立ち、当該技術の一部を応用した論文を発表した(Sano et al. 2016, *Sci. Signal.*)。このほか、トランスオミクス解析の方法論を俯瞰する総説を発表し、同一条件下で調製したサンプルを用いたオミクス計測データに基づくメカ

ニスティックかつ階層縦断的なネットワーク再構築としてトランスオミクスを定義した(Yugi et al. 2016, *Trends Biotechnol.*; Yugi and Kuroda 2017, *Cell Syst.*)。

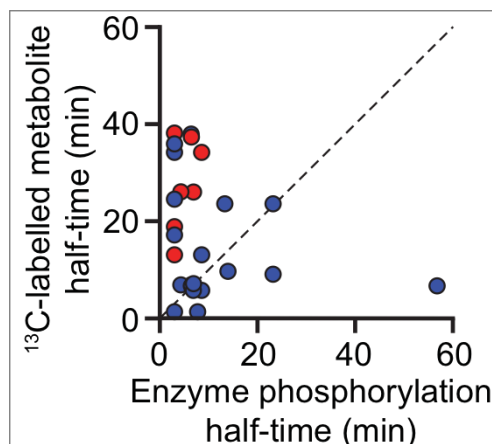


図 1. リン酸化強度および代謝物質濃度の時定数 (Krycer, Yugi et al. 2017, *Cell Rep.*)

横軸は代謝酵素のリン酸化強度の時定数、縦軸は当該代謝酵素の基質または産物となる代謝物質濃度の時定数である(青: 基質, 赤: 産物)。プロットされた点が 45 度線の上側に有意に偏っており、このことはリン酸化強度が代謝物質濃度よりも有意に時定数が小さい(=速い)ことを示す。

■研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

◇メタボロームおよびリン酸化プロテオームデータの解析ソフトウェア開発

トランスオミクス解析を製薬企業等の創薬研究者が実施するうえで技術的障壁となるのが、複数のデータベースの操作や各オミクス階層特有の ID 体系、データ形式などに精通していなければならないことである。この技術的障壁を解消するため、グラフィカル・ユーザー・インターフェースによりトランスオミクス解析を実行するソフトウェアの開発を開始した(図 2)。

当該ソフトウェアの開発は、システム・バイオロジー研究機構が提供する Garuda Platform に準拠した。これは、同 platform が複数のソフトウェアのシームレスな連動を可能にするデータ交換規格を備えていたことによる。まず、リン酸化プロテオーム階層、メタボローム階層それぞれのデータ解析ソフトウェアを macOS 環境で開発し、動作を確認した。さらに、潜在的な顧客となるであろう企業研究者の要望をヒアリングし、企業研究所に多いネットワークから隔離された Windows 環境に対応した版を開発した。

◇トランスクリプトーム解析ソフトウェアおよび 3 階層統合ソフトウェアの開発

「研究テーマ A」で開発したトランスクリプトーム階層のネットワーク再構築手法を、前記 2 階層同様に Garuda 上で動作する解析ソフトウェア化した。また、これら 3 階層間をつなぐ階層間ネットワーク再構築ソフトウェアを開発し、前記 3 階層を個別に解析するソフトウェア群とシームレスなデータ交換を行えることを確認した。



図 2. トランスオミクス解析ソフトウェア試作品の実行例

1) オミクスデータを読み込み、2) 解析開始から数分程度待つと、3) 多階層ネットワークの構造を記述するファイルが出力される。ネットワーク構造の視覚化は既存のソフトウェアを用いる。

3. 今後の展開

■研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

メトホルミンの薬剤応答ネットワークは平成 31 年 3 月頃の再構築完了を目指している。再構築が完了した暁には、諸説あるメトホルミンの作用点それぞれの薬剤作用への寄与を、ネットワークの文脈に位置づけて数理モデル等で評価する。

■研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

プロトタイプとなるソフトウェアは概ね動作確認できたので、プロジェクトの目標であるパッケージ化と対外発表が視野に入ってきた。目標達成のため、複数種のデータへの対応や潜在的ユーザーによる試用・改良を実施する。

■研究テーマ C・D「薬剤応答ネットワークに基づく多剤併用療法の設計」

薬剤応答ネットワークを用いた併用薬候補探索が現実的に可能であることが示されたので、上記研究テーマ A のメトホルミンの薬剤応答ネットワーク再構築を待って併用薬候補を探索する。

4. 自己評価

薬剤応答ネットワークの再構築に係る技術として、従来カバーしていたメタボローム階層、リン酸化プロテオーム階層のみならずトランスクリプトーム階層やゲノム階層へとトランスオミクス解析技術を拡張したことが代表的成果の一つである。さらに、薬剤応答ネットワークを用いた併用薬候補の最適化手法についても概念実証が済んでいる。これらの技術を容易に利用可能とするソフトウェアは試作品の動作確認を完了している。一方、実験系の確立に難航したため、メトホルミンを題材とした薬剤応答ネットワークの再構築は最終年度までずれ込んだ。いわゆるドライ分野出身である研究者にとって初めての本格的な実験系構築とそのトラブルシューティングに直面したことは今後キャリアを重ねていくうえで貴重な経験となったが、ウェット分野の「引き出し」の不足のために時間を費やしてしまったことは反省材料である。研究実施にあたっては、サンプルの調製から品質評価に至るまでに実施する動物実験、生化学・分子生物学実験の機器・試薬類を整備し、研究補助員を雇用して実験系を立ち上げることができた。データ解析に関しては、計算サーバを購入して手法開発ならびにソフトウェア開発に用いた。なお、本研究で開発した技術は、将来的に前記のソフトウェアを介して創薬研究者に普及を図ることにより、トランスオ

ミクス解析に基づく新規創薬基盤技術として社会実装する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. †Kawata, K., †Yugi, K., Hatano, A., Kokaji, T., Tomizawa, Y., Fujii, M., Uda, S., Kubota, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, S., “Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data”, Genes Cells, in press († These authors contributed equally).
2. †Kawata, K., †Hatano, A., †Yugi, K., Kubota, H., Sano, T., Fujii, M., Tomizawa, Y., Kokaji, T., Tanaka, K.Y., Uda, S., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Saitoh, K., Kato, K., Ueno, A., Ohishi, M., Hirayama, A., Soga, T., Kuroda, S., “Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks”, iScience, 2018, 7:212–229. (Cover Article; † These authors contributed equally).
3. †Krycer, J.R., †Yugi, K., Hirayama, A., Fazakerley, D.J., Quek, L.E., Scalzo, R., Ohno, S., Hodson, M.P., Ikeda, S., Soji, F., Suzuki, K., Domanova, W., Parker, B.K., Nelson, M.E., Humphrey, S.J., Turner, N., Hoehn, K.L., Cooney, G.J., Soga, T., Kuroda, S., James, D.E., “Dynamic metabolomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, Cell Rep., 2017, 21(12):3536–3547. († These authors contributed equally)
4. Yugi, K. and Kuroda, S. “Metabolism-Centric Trans-Omics”, Cell Syst., 2017, 4(1):19–20.
5. Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., and Kuroda, S., “Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple ‘Omic’ Layers”, Trends Biotechnol., 2016, 34(4):276–290. (Cover Article).

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Yugi, K., Krycer, J.R., Kuroda, S., and James, D.E., “Dynamic metabolomics and phosphoproteomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, 19th International Conference on Systems Biology, Lyon, France, 29 Oct. 2018.
2. 柚木克之, James R. Krycer, 平山明由, Daniel J. Fazakerley, Lake-Ee Quek, Richard Scalzo, 大野聡, Mark P. Hodson, 池田五月, 庄司二葉, 鈴木久美, Westa Domanova, Benjamin L. Parker, Marin E. Nelson, Sean J. Humphrey, Nigel Turner, Kyle L. Hoehn, Gregory J. Cooney, 曾我朋義, 黒田真也, David E. James, 「トランスオミクス解析による代謝プライミング現象の発見」, 第 12 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 2018 年 10 月 19 日.
3. Yugi, K., “Dynamic metabolomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, From Single- to Multiomics: Applications and Challenges in Data Integration, Heidelberg, Germany, 12–14 Nov. 2017.
4. Yugi K. “Trans-omic analysis reveals fed and fasting insulin signal across phosphoproteome, transcriptome, and metabolome” The 1st International Symposium for Trans-Omics (Tokyo, Japan) November. 2017.
5. Yugi, K., “Trans-omic reconstruction of insulin signal flow in global phosphorylation and

metabolic network”, 6th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells, Munich, Apr. 2016.

著作物

1. 柚木克之, 角田達彦, 黒田真也, 「GWAS をトランスオミクスで読み解く」, 遺伝子医学 MOOK 33:127-136, 2018.
2. 柚木克之, 「トランスオミクス解析による薬剤作用機序の網羅的理解」, ファルマシア 53(12):1187-1191, 2017.