

平成 31 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 29

受付番号 814

氏 名

嶋田 健一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ボストン (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

『薬物による肝障害における細胞間コミュニケーションの解明』3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Harvard Medical School, Department of Systems Biology, Timothy Mitchison5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入****も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

私は、2015年11月にハーバード医科大学（HMS）に赴任して以来、薬物による臓器障害進行メカニズムの解明、また化合物毒性の客観的な評価手法の確立を目的とした研究を進めてきた。海外特別研究員として働いた2年間は、主に大規模トキシコゲノミクスデータベースの機械学習を用いた情報解析によりこの目的を達成したが、現在、一細胞 RNA-Seq を用いた肝臓の薬物に対する応答を調べる系も確立しており、こちらは現在継続中である。

1. Open TG-GATEs データを用いた体系的な薬物性疾患の分類・疾患特有の遺伝子応答の解明

人間は、薬・食品添加物・工業用化学物質・農薬など、絶えず様々な外因性化学物質（xenobiotics）にさらされている。xenobiotics から体を守る機構は進化的に備わっており、その中でも特に肝臓での分解と腎臓における排出がこの役割を担っている。しかし同時に、肝臓や腎臓自体は xenobiotics に高濃度でさらされるため、損傷を受けることが多い。

臨床では、病気（臓器の損傷など）の診断は、（代謝物・酵素などの）血中マーカーの値を調べるところから始まる。血液サンプルからは様々な疾患に関する情報を読み取れるが、血液から疑わしい疾患が見つかった場合、病状をより詳細に調べるために、バイオプシーによる組織病理を組み合わせることで、より正確に診断を確定できる。しかし、これらの病気は、その存在が認知・定義されている場合に診断が可能であるが、現在、そもそも認知すらされていない病気や症状を調べる術はない。そこで、多くの研究は、必然的に、すでに明確に定義されている『病気』をより深く学ぶ、という方法を採用することになる。本研究では、この前提となっている「病気」自体の定義を再考するところから見つめ直した。具体的には

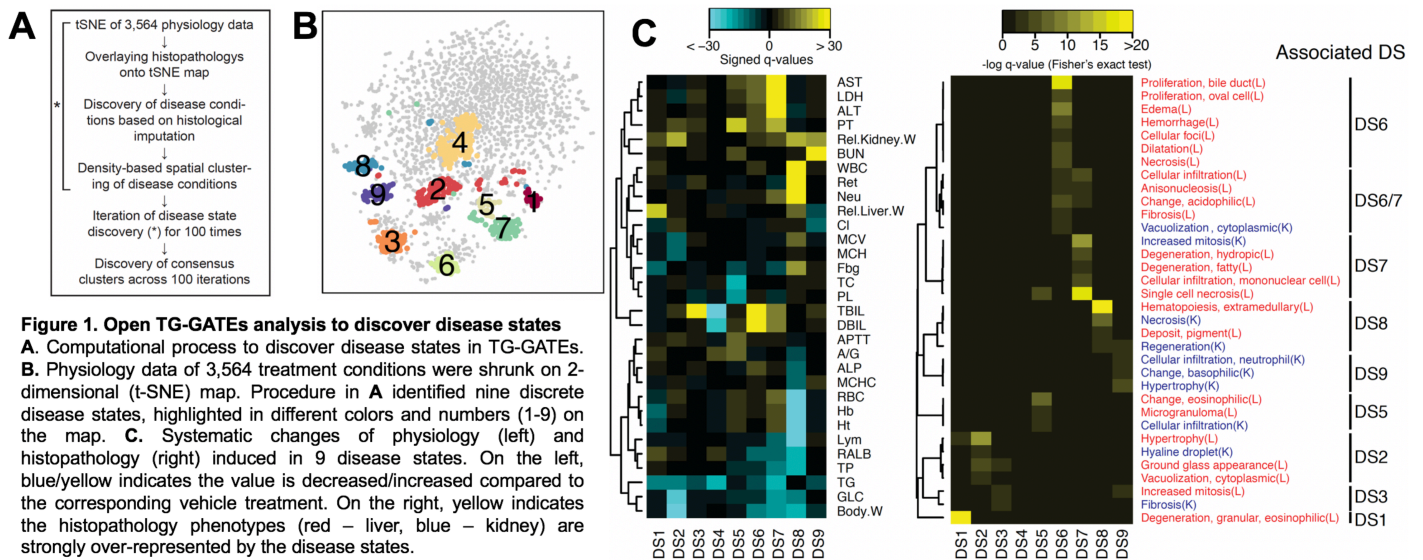
「薬物によって引き起こされる臓器障害を大規模な実験データから発見・定義しなおし、それらの特徴を比較する」というアプローチで取り組んだ。この目的のために、独立行政法人医薬基盤研究所と日本の製薬会社13社が過去に共同で行った大規模毒性試験プロジェクトの提供する Open TG-GATEs

(<http://toxico.nibiohn.go.jp/open-tggates>)のデータを解析した。Open TG-GATEs では計3万匹以上のラットに対し160種類の薬物の異なる濃度・期間投与した後に、生理学データ（40種類の血液マーカーや体重、臓器湿重量）・組織病理学データ（60余種類にわたる肝・腎病理所見の有無）・肝臓と腎臓のトランスクリプトームデータを収集し、公開している。これらのデータ、特に臨床で広く利用可能な「生理データと肝・腎の組織病理情報」から機械学習（教師なし学習）を用いて病気状態（disease status; DS）のサンプルを発見・定義し、個々のDSに関連する生理学的・組織病理学的所見や特異的なトランスクリプトーム変化を同定した。この研究結果は2019年2月、Molecular Systems Biology にて発表した（筆頭著者兼責任著者として）。また、この論文は受け入れ先機関の広報に取り上げられた

(<https://hms.harvard.edu/news/toxin-response>)。以下に、研究概要を記す。

Supervised classification, which dominates toxicogenomics, seeks to best separate multiple experimental outcomes into pre-determined phenotypes using available data (e.g., fibrosis or carcinogenicity in the liver). It does not test if the data best support those pre-determined phenotypes vs others, or how multiple phenotypes relate to each other and interconvert. We therefore sought to first identify mutually exclusive disease states in a data-driven manner, and only then to decipher state-specific molecular mechanisms or biomarkers.

Most toxicogenomic investigations start by classification of transcriptomes, to exploit their high dimensionality and potential for molecular pathway identification. However, transcriptomes are not part of standard clinical diagnosis, and their relationship to disease states is unclear. As a machine-mimic of clinical diagnosis, we started by clustering conditions that exhibit abnormal physiology (*i.e.*, blood chemistry and body and tissue weights) and histopathology from the Open TG-GATEs dataset. These data correspond to, in rats, a standard set of clinical measurements applied by physicians to patients with almost any unidentified diseases. We identified nine discrete 'disease states' that were independently supported by physiology and histopathology data (**Fig. 1A-B**). Some of the nine disease states correspond to known liver and kidney injuries or gastrointestinal bleeding, while others are unknown (**Fig. 1C, Table 1**).



DS	Clinical description	Physiology	Histopathology	Induced transcriptome	Toxin class	Kinetics
1	Metabolically active	Rel.Liver.Weight up	Granular eosinophilic degeneration (L)	Anti-inflammatory; anabolism of ATP, lipids, amino acids (L)	Lipid-lowering drugs	Late-onset; robust
2	Tolerance	Body.Weight, GLC down	Hypertrophy (L)	Xenobiotic metabolism, ferroptosis resistance (L)	Synthetic hormones	Late-onset; robust
3	Hemolytic anemia	TBIL up	N/A	N/A	N/A	Early-onset; transient
4	N/A	TBIL, DBIL down	N/A	N/A	N/A	Early-onset; transient
5	Acute liver injury	PT up; TC, PL down	Eosinophilic change (L)	IL-1/TNFA signal, RNA-pol II transcription (L)	N/A	Early-onset; transient
6	Cholestasis	DBIL up	Proliferation of bile ducts (L)	IL-1/TNFA signal, cancer signature, response to alkaloid (L)	N/A	Early-onset; transient
7	Hepatocellular injury	AST, ALT, LDH up	Single cell necrosis (L)	IL-1/TNFA signal, cancer signature, cell cycle, collagen biosynthesis (L)	N/A	Early-onset; transient
8	Bleeding	WBC, Ret, Neu up; Hb, Ht, Lym, RBC down	Extramedullary hematopoiesis (L)	IL-1/TNFA signal, IL-6/Jak/STAT signal, complement/coagulation cascade (L)	NSAIDs	Late-onset; robust
9	Kidney injury	BUN, Rel.Kidney.Weight, up	Hypertrophy (K)	IL-1/TNFA signal (K)	N/A	Late-onset; robust

Table 1. Characteristics of the nine disease states

We then performed a supervised analysis of gene expression data through the lens of these machine-identified disease states, in which we found some pathways changed exclusively in one disease states, while others changed commonly in multiple disease status (**Fig 2**). For example, a gene set representing ‘complement and coagulation cascade’ was exclusively upregulated in gastrointestinal bleeding, while a gene set “cellular response to IL-1 and TNF α ” was upregulated in any disease states associated with injury, in the corresponding tissues.

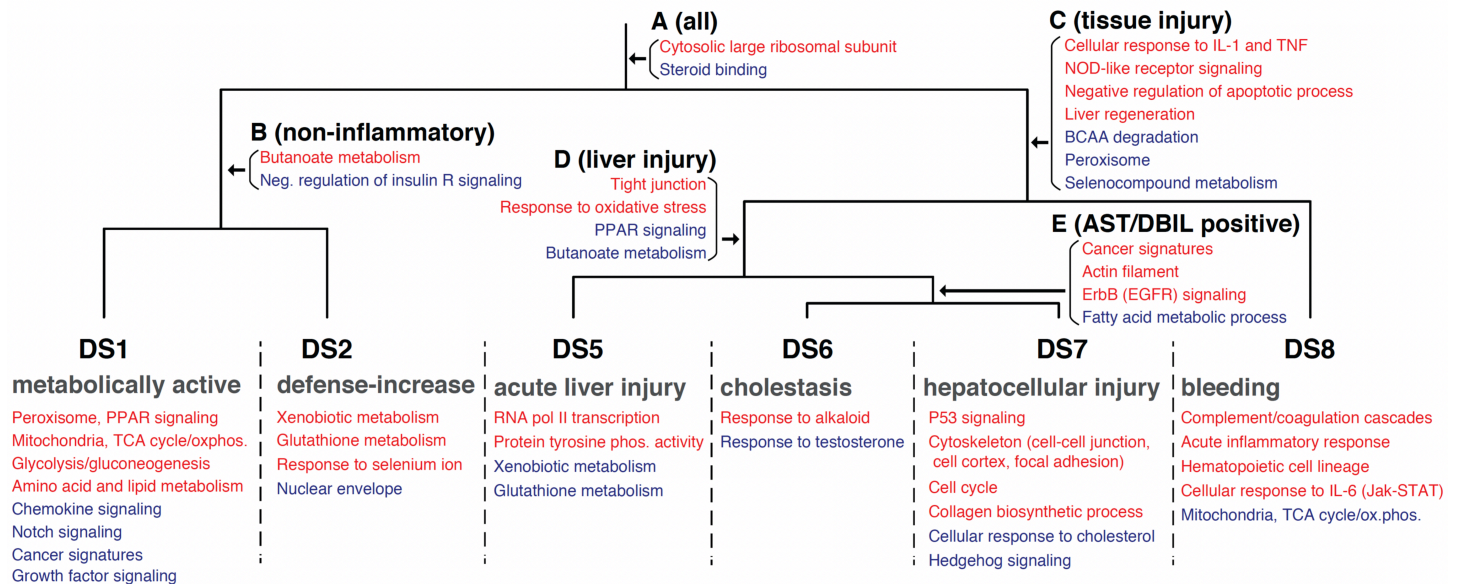


Figure 2. Comparison of liver transcriptome changes across six disease states
Manually curated map of transcriptional activities of pathways (GO, KEGG) in the liver among six DS whose livers were affected. Up- and down-regulated pathways are colored in red and blue, respectively.

Our combined data revealed that the machine-identified disease states correspond in part to known disease states and mechanisms of toxin action. Analysis of temporal transitions between disease states provided evidence for induction of tolerance (Fig. 3), and we found distinct gene expression signatures that correlated with tolerance. These included xenobiotic metabolism genes as expected, but also novel biomarkers for protection from ferroptosis, a specific form of cell death mediated by runaway lipid oxidation.

Finally, we tried to understand the mechanism of body-weight loss induced in animals that experience various tissue injuries as well as tolerance to chemical toxicity (Fig. 4A). Loss of body weight is a well-known indicator of chronic toxicity in rats, though its etiology is poorly understood. We could provide the first systematic evidence for liver-to-body communication though specific circulating metabolites and hepatokines with important roles in toxicity and tolerance, namely toxin-induced tissue-injury experiencing rats decreased body weight by shutting down liver-synthesized Igf1 paracrine signals (Fig. 4B). Moreover, we further identified a series of events correlated with loss of body weight, that are likely causally connected to one another: chemical treatment inducing increase in kidney-expression of a known anorexic hormone Gdf15, decrease in cumulative food intake, decrease in blood glucose level, and decrease in liver-expression of Igf1 and its associated genes. They are likely causally connected to one another (Fig. 4C).

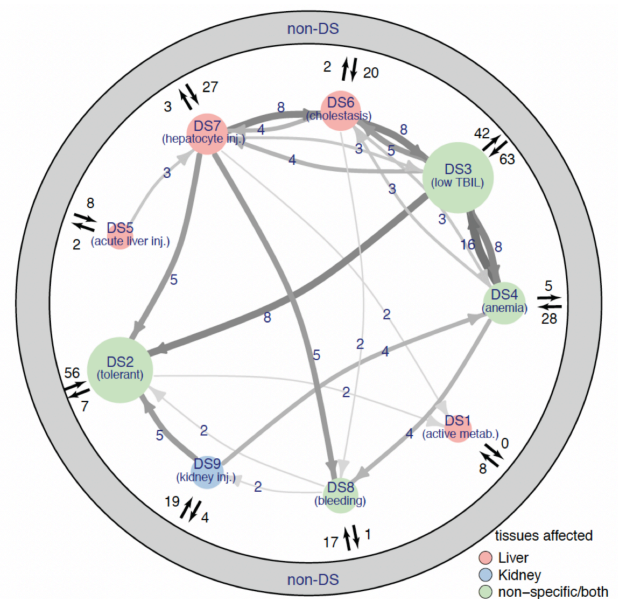


Figure 3. Transition between disease states
A. Non-DS: non-disease state. Size and darkness of arrows reflect the number of conditions shifting from one DS to another.

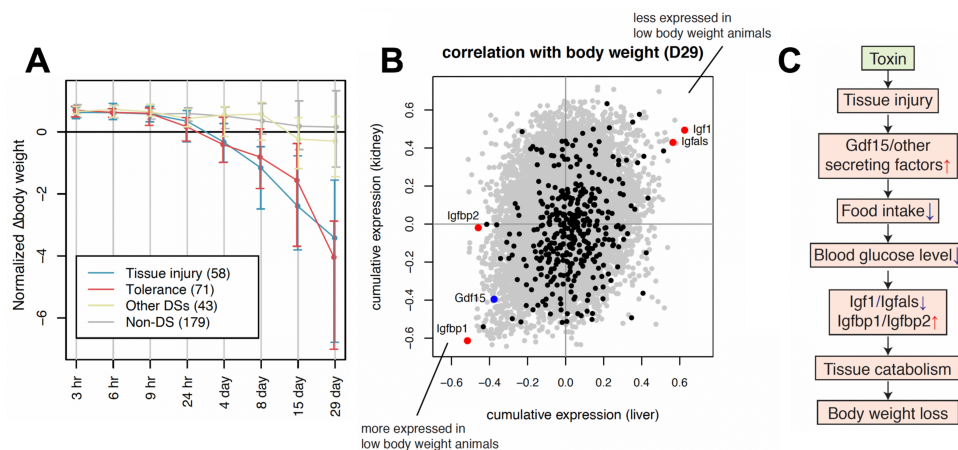


Figure 4. Mechanism of body weight loss upon toxin treatment in rats

A. Toxin-induced tissue injury and tolerance is associated with decrease in body weight over time. **B.** Cumulative expression of Igf1 and associated genes are most strongly positively correlated with decrease in body weight on Day 29. Gdf15, an anorexic factor is substantially correlated with body weight on Day 29. **C.** Proposed causal sequence of how toxin induces body weight loss over time in rats.

本研究の展望として、どのような薬物が肝臓に耐性を惹起するのか、というメカニズムを明らかにしていくことで、薬物性臓器障害を未然に防ぐ役に立つと考えられる。一方で、多くの毒性学の研究では、いまだに個々の化学物質が動物に与える影響を分子生物学を用いて調べていくのが主流である。このような本研究のようなデータ内の大局的な変化よりも「ある薬物投与後に、1つの血液マーカーや1つの遺伝子発現がどう変化するか」という詳細を追うことが重要である。このような枠組みの研究においても本研究で利用した Open TG-GATEs は未だ利用価値は高いと考えられる。それは、特に着目している薬物によるマーカー・遺伝子の変化は、その投与条件にユニークなものか、あるいは他の薬物にも共通するのか、という『比較毒性学』的な検証を簡単に行えるからである。現在、このような問題を実験生物学者が簡単に調べられるウェブサービスを実装している (**Fig. 5**)。このウェブサービス ShinyTG は、まだ改良中であるが、近日中に論文にて投稿し、一般公開する予定である。

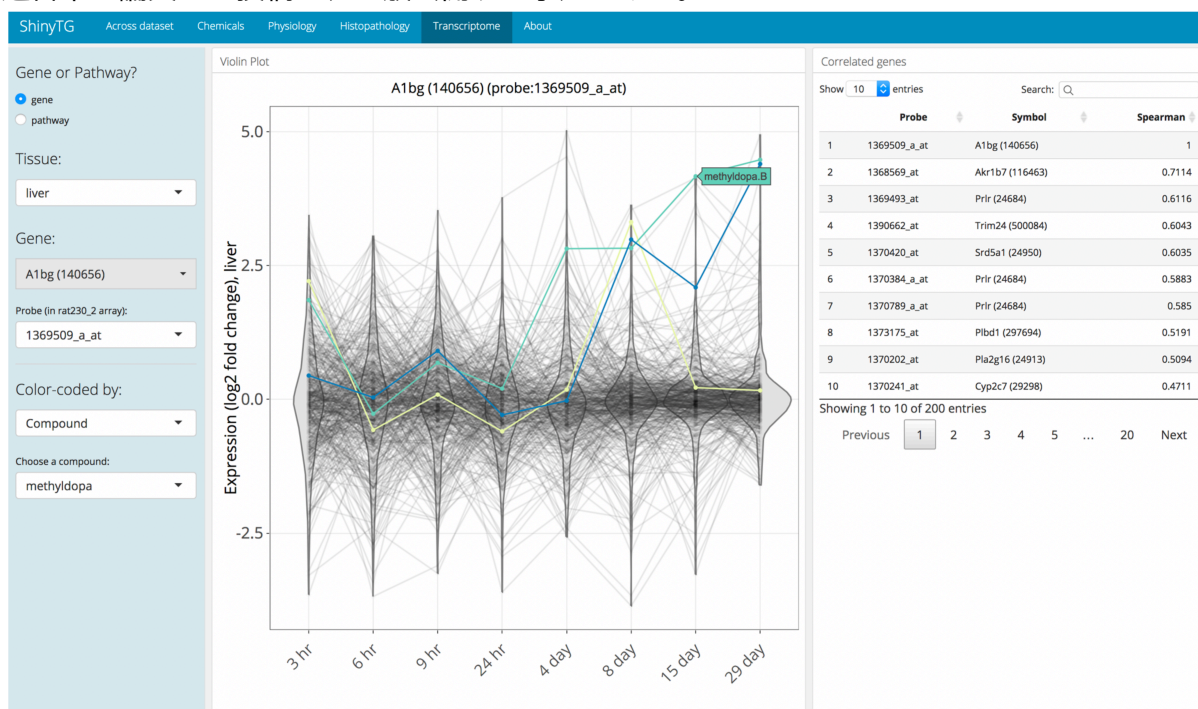


Figure 5. Open TG-GATEsデータ探索のためのウェブツール ShinyTG

分子生物学者が自分でOpen TG-GATEsデータを仮説を調べるためのツール。R言語とShinyパッケージなどで実装した。上はその機能の一部、トランスクリプトームデータ探索画面のスナップショット。Open TG-GATEsに含まれる全薬剤投与条件下、3時間後から29日後までの肝・腎臓での遺伝子の経時的変化が追える。左図は、血圧降下剤methylidopa（用量の3レベルは黄・緑・青の線で表記、その他の薬剤投与条件は灰色で表記）投与後の血清中の糖タンパクA1bg遺伝子の転写発現を示している。Methylidopa投与後A1bgの転写量は8日目以降継続して高く、この発現上昇の度合いは、Open TG-GATEsのその他ほとんど全ての薬剤と比較しても際立っている。右表は、A1bgと発現量の相関が高い遺伝子を表している。

2. 一細胞 RNA-seq を用いたマウス肝臓の解析

当初の予定では、上記 OpenTG-GATEs データの解析をある程度進めたところで、同時並行で当時広まりだしていた一細胞 RNA-seq 技術を使って、アセトアミノフェン肝毒性マウスモデルにおける肝臓内の各細胞種の挙動を調べることを目的としていたが、このプロジェクトを始めてすぐに取り巻く状況が変

わったので、方針の変更を余儀なくされた。具体的には、2015年に inDrop (Allon Klein, HMS)、Drop-seq (Aviv Regev, Broad Institute) という high-throughput (>1,000) で細胞をバーコーディングする技術が発表され、またこのどちらをも品質で上回る Chromium system (10x Genomics) が発表されて以降、特に免疫学・発生学分野で、我々の予想よりもはるかに早くこの一細胞 RNA-seq 技術が世界中に広まった。肝臓においても、Ido Amit, Shalev Itzkovitz ら (Weissman Institute) がマウスの肝臓を使って、また、武部貴則ら (Cincinnati Children's Hospital) がヒト由来肝微小組織を用いて行った一細胞 RNA-seq をそれぞれ 2017 年に Nature に発表されたため、テクノロジーとしての新規性はほとんどなくなったが、本研究においては、TG-GATEs の解析から得られてた知見である薬剤による「肝細胞の“drug-tolerance”」をアセトアミノフェン投与により誘導し、その耐性獲得の挙動を一細胞レベルで調べようとしている。これまでにマウスの肝臓を細胞になるべくストレスがかからないような酵素液（コラーゲナーゼ）を灌流した後、肝実質細胞を分離する手法を確立した。この方法は、MIT の Sangeeta Bhatia の研究室から学んだラット肝細胞の単離法ものに、自ら改変をくわえたものである。具体的には、Bhatia 研究室は、ラットを使用していたため、門脈からカテーテルを通してコラーゲナーゼ溶液を灌流しているが、マウスの門脈は細く脆いので、文献などを参考に、大動脈からの逆行性灌流を確立した。

3. 真核生物間遺伝子保存パターン(phylogenetic profiling)を用いたタンパク質複合体・パスウェイの同定

Open TG-GATEs のデータ解析で得られた「体重減少のメカニズム」として、毒性のある薬物が、肝臓からの Igf1 分泌抑制をすることが示唆されたように、肝臓から分泌されるホルモン(hepatokine)が重要なメッセージとして、臓器間コミュニケーションが行われている可能性がある。そこで、**機能的に強く関連する遺伝子対は進化の過程でオーソログの保存パターンが似ているはずである**という仮説のもと、**真核細胞間遺伝子保存パターン**を比較する進化的アプローチを用いて、臓器・細胞間コミュニケーションにおけるリガンド・レセプター対を探っている。この研究はライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS、柏) の千葉啓和特任助教との共同研究で行っており、2018 年 3 月、2019 年 1 月と DBCLS にて集中的な解析を行った。この解析から、遺伝子の機能によって、その保存度は、大きく異なることがわかった (Fig.6)。この中で、細胞間コミュニケーションを司るタンパク質は、進化的にはかなり新しく、ヒトで確認される分泌性タンパク質の多くは真核細胞の多くでは保存していないことがわかったため、残念ながらデータの情報量が足りないためにリガンド・レセプター対をこのアプローチで網羅的に探る、という当初の目的は果たせなかったが、この解析から新規の遺伝子間インタラクション (タンパク質複合体・パスウェイ) を同定してきた。これら Open TG-GATEs は未だ利用価値はまだまだ高いと考えられるは、現在進行中の大規模オミクス解析、一細胞において新規タンパク質機能を理解する上で、非常に有用となっている。

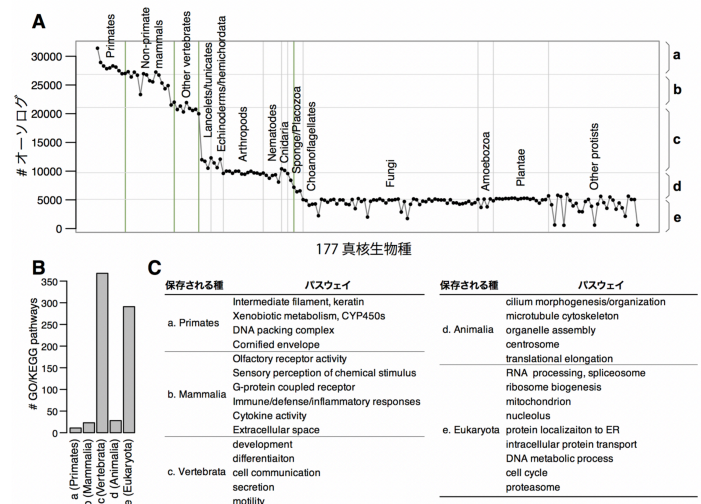


Fig. 6 真核生物間でのオーソログ保存パターン
A. ヒト (左端) で確認されるオーソログの177の真核生物種間での保存パターン。定義によって、同一種のゲノム内でも、1つまたは複数の対応する遺伝子を1つのオーソログとみなせるため、19973の遺伝子に対して、31406のオーソログが定義されている。保存されるオーソログの数は、緑の縦線で区切られる5つの種の分類(a-e)によって、大きく異なる。B. Aの5つの分類で保存される遺伝子に強く関係するパスウェイ。Fisher's exact testにより導出。C. Bのなかで、各分類に代表されるパスウェイの例。