

# KeyMolnet による分子ネットワーク解析:卒業研究への活用

Molecular network analysis by KeyMolnet

utilized as a useful tool of graduation thesis research

バイオインフォマティクス

佐藤準一

## 1. はじめに

生命情報統合プラットフォーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所 Institute of Medicinal Molecular Design; IMMD)は、膨大な量の文献から生体分子・医薬・疾患・生命現象に関する情報(コンテンツ contents と呼ぶ)を網羅的に収集し、分子ネットワークを中心に体系化したデータベースである<sup>1)</sup>。コンテンツは、研究経験豊富な IMMD 専属バイオリジストが、一流レビュー誌から精選した信頼性の高い Core コンテンツ および National Center for Biotechnology Information(NCBI)の公共データベースである PubMed のアブストラクトから抽出した網羅性の高い Secondary コンテンツ から構成されている。Human Protein Reference Database(HPRD)の情報も Secondary コンテンツとして収録されている。コンテンツは 3 ヶ月ごとにアップデートされ、厳密なチェック(キュレーション curation と呼ぶ)を受けた後に収録されている。またユーザー独自のデータを User コンテンツ として組み込むことも出来る。KeyMolnet は DNA マイクロアレイ解析やプロテーム解析のデータを取り込むことが可能で、独自の検索シス

テムを用いて、KeyMolnet ライブラリーのカノニカルパスウェイと比較することにより、データに密接に関連する分子ネットワークを抽出し、疾患や薬物の標的分子を同定することが出来る。KeyMolnet では、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索(neighboring search)、発現制御に關与する転写因子群を調べる共通上流検索(common upstream search)、始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索(N-points to N-points search)、複数の端点を始点として、最多数の始点を含む最小の分子ネットワークを調べる相互関係検索(interrelation search)の 4 種類が、検索法として選択出来る。また描画した分子ネットワーク上で関連する遺伝子・タンパク質・代謝物などの情報を一括して把握出来るので、包括的な電子分子辞書(online molecular dictionary)としても活用出来る。明治薬科大学では平成 16 年度より、文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業オープンリサーチセンタープロジェクト(研究代表者本島清人)の一環として、KeyMolnet を常時使用可能なネットワーク環境を整備している。平成 21 年度以降は文部科学省私立大学戦

略的研究基盤形成支援事業ハイテクリサーチセンタープロジェクト(研究代表者佐藤 準一)により継続される予定である。

われわれの研究室ではバイオインフォマティクス卒前教育のために、平成 16 年度より KeyMolnet を薬学科卒業研究および生命創薬科学科薬科学総合実習演習に積極的に取り入れ<sup>2,3)</sup>、学生の自己学習能力の向上に役立てることを試みたので、その一端を紹介する。

## 2. 事例 1: 薬学科 4 年生(SN)の卒業研究

テーマ: 関節リウマチにおけるインフリキシマブレスポンダーのリンパ球の分子ネットワーク解析

われわれの研究室では、学生独自の卒業研究テーマを考案するように指導している。SN は関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)における疾患修飾性抗リウマチ薬(disease-modifying antirheumatic drugs; DMARDs)の効果発現機序に興味を示した。特に最近分子標的薬として注目されている抗 TNF $\alpha$ ヒト・マウスキメラ型抗体であるインフリキシマブに対する薬物応答個人差の分子機序を調べるため、NCBI のマイクロアレイ解析に関する公共データベース Gene Expression Omnibus(GEO)を rheumatoid arthritis, infliximab のキーワードで検索し、GEO に登録されているデータセット GSE3592 を抽出した。GSE3592 は、33 名のメトトレキサート(RA 標準薬)治療抵抗性の RA 患者(疾患活動性スコア 5.1 以上)に、イ

ンフリキシマブ 3mg/kg を 0, 2, 6, 8 週に静脈内投与し、投与開始 3 ヶ月後に末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)の遺伝子発現プロフィールを、INSERUM Homo sapiens 14K array(10,000 遺伝子)を用いて解析し、数値を正規化したデータセットである。患者に関しては、治療に反応して活動性スコアが 1.2 以上改善した場合をレスポンダー(n = 16)、それ以外の場合をノンレスポンダー(n = 17)として定義している。また健常者 3 名の PBMC の発現データをユニバーサルレファレンス(基準値)として用いている。

SN は KeyMolnet を利用して、レスポンダーで発現上昇している上位 20 遺伝子の共通上下流分子ネットワーク(検索 1)とノンレスポンダーで発現上昇している上位 20 遺伝子の共通上下流分子ネットワーク(検索 2)を調べ、さらに検索 1 に存在するが検索 2 には存在しない、すなわちレスポンダー特異的な分子ネットワーク(検索 3)を解析した。その結果、レスポンダー特異的な分子ネットワークとして CD85 シグナル伝達系(score = 65.602, score p value = 1.786E-020)およびその中心分子である SHP1 を見出した(図 1)。CD85 は単球、B 細胞、樹状細胞などに発現しており、HLA class I 分子と結合して SHP1 を介して細胞活性化の抑制シグナルを伝達する。CD85 遺伝子の single nucleotide polymorphism (SNP)は RA 発症との関連が報告されている。また SHP1 は種々の炎症性サイトカイン受容体に会合

している JAK チロシンキナーゼを直接脱リン酸化するホスファターゼであり、SHP1 の機能が低下すると自己免疫疾患や免疫不全症を来す。すなわちインフィリキシマブレスポンダーの必要条件として、SHP1 を主役とする CD85 シグナル伝達系による炎症細胞活性化抑制機構の維持が重要であることがわかった。この結論に到達するまで SN においては、研究課題に適したデータセットの選択、KeyMolnet の検索法の選択、解析した分子ネットワークの生物学的な意味付けや発症機構との関連性の検討など、様々な試行錯誤が必要であったが、教官に依存することなく、自ら学習して問題点を解決した。

### 3. 事例 2: 生命創薬学科 3 年生(YO)の薬科学総合実習演習の研究

テーマ：早期のアルツハイマー病の海馬脳組織の分子ネットワーク解析

YO はアルツハイマー病 (Alzheimer disease; AD) の脳の分子病態に興味を示した。特に AD の早期診断マーカーの発見を目指して、GEO を Alzheimer disease, brain, early のキーワードで検索し、GSE1297 を抽出した。GSE1297 は、病理学的に診断した 22 名の AD 患者と年齢を一致させた 9 名の健常者の剖検海馬 CA1 脳組織の遺伝子発現を、Affymetrix GeneChip HG-U133A array(22,000 遺伝子)を用いて解析したデータセットである。22 名の AD 患者に関しては、知能検査 Mini-Mental State Examination(MMSE; 30

点満点)の得点に基づき、軽症(26-20; n = 7)、中等症(19-14; n = 8)、重症(13-0; n = 7)に分類し、軽症 AD を早期 AD と定義している。

YO は早期 AD 患者の平均値と健常者の平均値の比を算出し、KeyMolnet を用いて AD で発現上昇している上位 100 遺伝子の共通上流分子ネットワークを解析した。その結果、早期 AD 海馬脳組織におけるエストロゲン受容体を介する遺伝子発現調節系(score = 34.214, score p value = 5.017E-011)の関与を見出した(図 2)。AD 発症頻度は、女性は男性に比べて 3 倍高いと報告され、閉経後のエストロゲンレベルの低下の関与が示唆されている。エストロゲンは AD 脳に沈着するアミロイドベータタンパクの産生を抑制することが報告されている。YO の発見は AD 発症早期の脳分子病態を考える上で非常に重要な知見と思われる。YO は殆ど教官に依存することなく、この結論を導き出すことが出来た。

### 4. まとめ

KeyMolnet を薬学科卒業研究や生命創薬科学科薬科学総合実習演習に取り入れて、学生の自己学習能力の向上に役立てることが出来た。2003 年にヒトゲノム解読が完了し、創薬研究はポストゲノム時代に突入した。KeyMolnet は遺伝子・タンパク質・複合体・低分子・細胞内局在・臓器別発現・分子間リレーション・医薬分子・疾患・病態など様々なカテゴリーの情報を網羅的に集約した生命情報統合プラットフォームで

あり、膨大なゲノム情報を最大限有効に活用して論理的な医薬分子設計を行うポストゲノム時代のゲノム創薬研究に不可欠なツールである。われわれは、神経難病である多発性硬化症の発症制御因子の分子ネットワーク<sup>4-7)</sup>、プリオンタンパク結合タンパク質の分子ネットワーク<sup>8)</sup>、ヒトグリア細胞分化の分子ネットワーク<sup>9)</sup>を解明し、報告している。今回の試みにより、KeyMolnetは学部学生レベルでも容易にマスターすることが可能で、自己学習能力や問題解決能力の向上に役立ち、将来のゲノム創薬を担う若手研究者の育成に利用出来ることがわかった。

## 5. 参考文献

- 1) Sato H, Ishida S, Toda K, Matsuda R, Hayashi Y, Shigetaka M, Fukuda M, Wakamatsu Y, Itai A. New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technol* 2005; 2: 89-98.
- 2) 工藤晃太、三澤多真子、陸玲玲、天竺桂弘子、佐藤準一：KeyMolnet による統合失調症とうつ病の分子機序の比較解析。第5回ファーマ・バイオフィォーラム。東京、2006. 12.9.
- 3) 椎名有葵、塩谷真央、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一：デュシエンヌ型筋ジストロフィー患者における oxandrolone の分子機序：KeyMolnet による解析。日本薬学会

第128年会。横浜、2008.3.28.

- 4) Satoh J, Illes Z, Peterfalvi A, Tabunoki H, Rozsa C, Yamamura T. Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 422: 30-33, 2007.
- 5) Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Dis Markers* 25: 27-35, 2008.
- 6) Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. Neuromyelitis optica/Devic's disease: Gene expression profiling of brain lesions. *Neuropathology* 28: 561-576, 2008.
- 7) Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult Scler* 2009, in press.
- 8) Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H. Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 16-35, 2009.
- 9) Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J. Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cell Mol Neurobiol* 2009, in press.

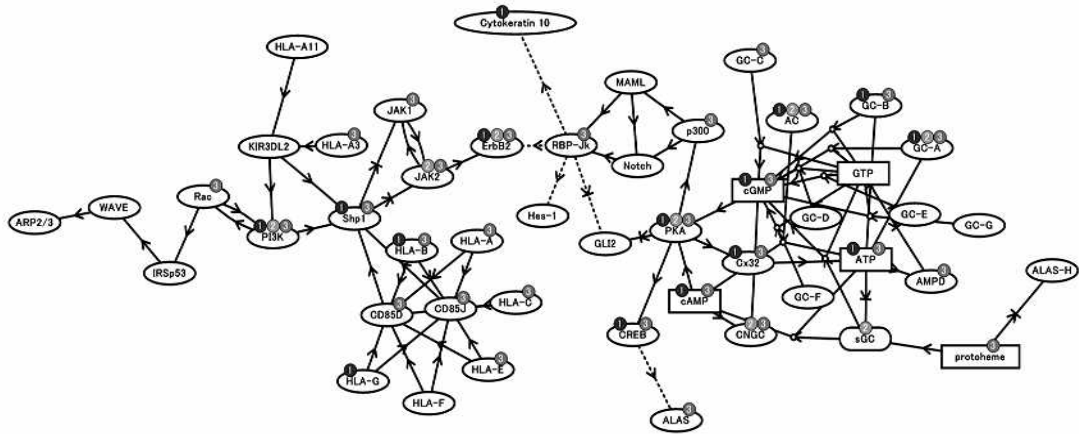


図 1. 慢性関節リウマチにおけるインフリキシマブレスポナー特異的分子ネットワーク。CD85 シグナル伝達系とその中心分子である SHP1(Shp1)の関与が示唆された。

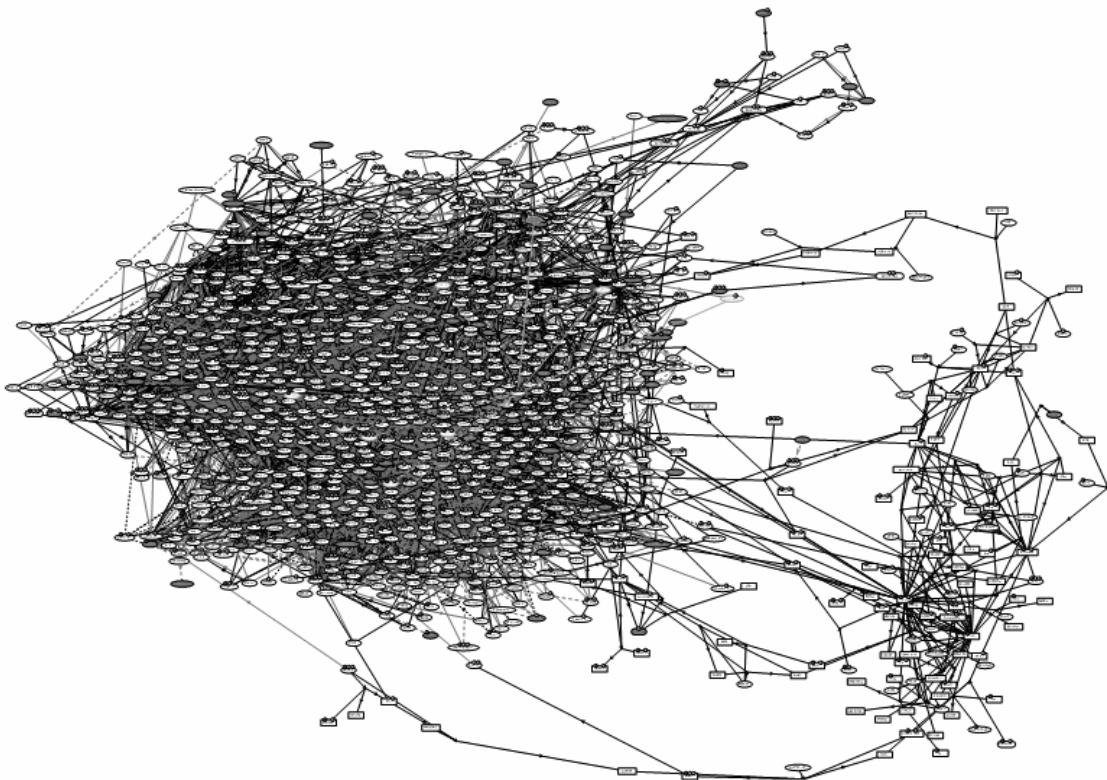


図 2. 早期アルツハイマー病海馬で発現上昇している遺伝子の分子ネットワーク。エストロゲン受容体(ER)を介する遺伝子発現調節系の関与が示唆された。