

デング熱ウイルス感染経過データに対する 動的ネットワークバイオマーカー解析の適用

村田 健哉^{1,a)} 春木 孝之² 吉田 泰彦³ 奥 牧人⁴ 小泉 桂一⁴ 門脇 真⁴

概要: 動的ネットワークバイオマーカー (DNB) はバイオマーカーの揺らぎ, それらの間の相関から健康状態と疾患状態の間の未病状態を検出することができる. この未病状態を検出するため, 様々な生命系オープンデータに対する DNB 解析の適用が試みられている. 本研究では, Cytometry by Time Of Flight (CyTOF) 装置により得られたデング熱ウイルス感染経過データに対して DNB 解析を行い, DNB タンパク質が抽出されるかどうか, また遷移状態を検出できるかどうかを調べた. 解析の結果, デング熱ウイルス 2 型の感染処理後 8 時間において, ウイルスの Envelope, 免疫に関係するタンパク質 IL-1 β , TNF α が DNB タンパク質として得られた. 少数のタンパク質の揺らぎが検出されたため, この時点はデング熱ウイルス感染初期の遷移状態であると考えられる.

キーワード: 動的ネットワークバイオマーカー, CyTOF, デング熱ウイルス, 未病

Application of Dynamical Network Biomarker analysis to dengue fever virus infection data

MURATA KENYA^{1,a)} HARUKI TAKAYUKI² YOSHIDA YASUHIKO³ OKU MAKITO⁴ KOIZUMI KEIICHI⁴
KADOWAKI MAKOTO⁴

Abstract: Dynamical Network Biomarker (DNB) can detect pre-disease (“Mibyō”) state between health and disease states from the fluctuation of biomarkers and the correlation between them. Recently, the application of DNB analysis into various biological open data has been attempted to detect the pre-disease state. In this study, we performed the DNB analysis on the dengue fever virus infection data obtained by Cytometry by Time Of Flight (CyTOF) instrument, and then examined whether DNB proteins can be extracted and whether the pre-disease state can be detected. These numerical results showed that the virus Envelope, and the immune proteins IL-1 β and TNF α were obtained as DNB proteins at 8 hours after infection with the dengue fever virus serotype 2. Therefore, we suggest that this time point (8h) indicates the pre-disease state of the initial infection after the dengue fever virus.

Keywords: Dynamical Network Biomarker, CyTOF, dengue fever virus, pre-disease

¹ 富山大学大学院 理工学教育部
Graduate School of Science and Engineering, University of
Toyama, Toyama 930-8555, Japan
² 富山大学 学術研究部 都市デザイン学系
Faculty of Sustainable Design, Academic Assembly, Univer-
sity of Toyama, Toyama 930-8555, Japan
³ 富山大学 工学部
School of Engineering, University of Toyama, Toyama 930-
8555, Japan
⁴ 富山大学 学術研究部 薬学・和漢系
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Academic Assembly,

1. はじめに

健康・医療戦略の閣議決定資料によると, 国民の健康寿命の延伸が戦略市場創造プランのテーマの1つとして掲げられている [1]. 健康寿命は World Health Organization

University of Toyama,
Toyama 930-0194, Japan
a) m1871127@ems.u-toyama.ac.jp

(WHO) により 2000 年に定義された用語で、健康的に自立した生活を送ることができる期間である。健康寿命の延伸を目指し、未病の考え方が重要視されている。この未病という用語は中国最古の医学書「黄帝内経」で初めて使われ、健康状態から疾患状態になる間の遷移状態を指すと現在では解釈されることが多い [2]。疾患状態前の未病のときに治療することで、より容易に健康状態に戻ことができると一般に考えられている。

通常のバイオマーカーは生体の情報を基に健康状態と疾患状態を識別する指標である [3]。例えば、血圧はその数値により高血圧または低血圧を識別することができる。一方、健康状態と未病状態を識別するのに適したバイオマーカーの開発はこれまであまりなされていなかったが、2012 年に Chen, L. *et al.* により動的ネットワークバイオマーカー (Dynamical Network Biomarker, DNB) 解析が提案された [4], [5]。

最近、遺伝子発現量データに対する DNB 解析が行われ、DNB 遺伝子が抽出された [4], [6]。Koizumi *et al.* (2019) は DNA マイクロアレイ (一度に数万の遺伝子から遺伝子発現量を得る手法) によりマウスが肥満になる過程の遺伝子発現量データを取得して、DNB 解析を行った結果、肥満に関係する DNB 遺伝子の抽出に成功した [6]。今後は、他の生体データに対する適用も期待されている。

本研究では、Cytometry by Time Of Flight (CyTOF) データに対する DNB 解析の適用を提案する。CyTOF は誘導結合プラズマ質量分析法 (金属同位体による質量分析) の技術を用いる細胞の定量化手法であり、単一細胞から複数 (40 以上) の細胞内外のタンパク質の計測を可能とする [7]。例として、デング熱ウイルス感染経過データに着目する。

本稿の構成について述べる。第 2 章では解析対象となるデング熱ウイルス感染経過データの詳細を説明し、第 3 章では DNB 解析の手法について説明する。第 4 章では解析結果を詳細に説明し、第 5 章ではまとめを行う。

2. 解析対象データ

DNB 解析は変数選択が目的の 1 つであるため、遺伝子発現量のように多くの要素をもつデータが対象である。加えて、どの時点が未病であるかどうか不明なため、可能な限り多くの時点のデータがあることが望ましい。この条件に該当するデータを FlowRepository データベースから検索したところ、デング熱ウイルス感染経過データ (FR-FCM-ZY87) が見つかった [8]。なお、FlowRepository はフローサイトメトリー (細胞に光を当て細胞内外のタンパク質発現量を計測する手法) と CyTOF の実験データの両方が蓄積されているデータベースであり、現在、約 1,000 データが登録されている。

デング熱はフラビウイルス科のウイルスによる感染症

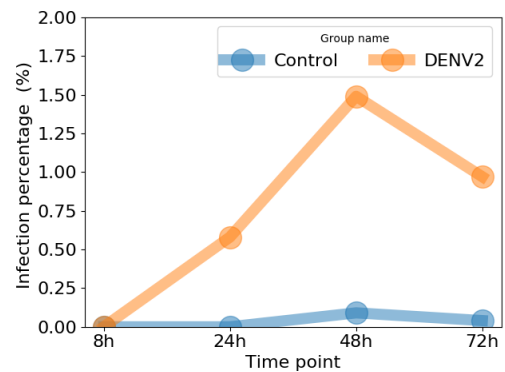


図 1 DENV2 の感染率の時間経過。縦軸はウイルス感染率である [10]。

Fig. 1 Time series of DENV2 infection rate: The vertical axis is the virus infection rate

で、主にネッタイシマカを媒介して感染する。感染後 3 日から 1 週間で発症する。主に南北アメリカで流行しており、2016 年に 238 万人以上の症例が報告されている [9]。この取得したデング熱ウイルス感染経過データは、人間の単球由来の樹状細胞にデング熱 2 型ウイルス (DENV2) とデング熱 4 型ウイルス (DENV4) を感染させ、その経過を観察したデータである。

Hamlin, R. *et al.* は DENV2 と DENV4 の間における感染メカニズムの違いを明らかにするために、感染処理した樹状細胞群を用いて CyTOF による機能解析を行った [10]。サンプルは 7 人の健康者から得た単球由来樹状細胞である。DENV2 および DENV4 により感染処理された細胞と併せて、処理されていない対照群が準備された。感染処理後から、8 時間 (8h)、24 時間 (24h)、48 時間 (48h)、72 時間 (72h) の 4 時点のデータであるため、解析対象データは合計 84 データである。本研究では特に、DENV2 の感染経過データに着目する。

図 1 は DENV2 の感染率の時間経過を示す。このグラフは Hamlin, R. *et al.* による論文の図 1A を参考に作成された。図 1 より、時間が経つにつれ、ウイルスの感染率は一旦増加した後に 48h でピークを迎えその後減少していることがわかる。対照群の感染割合はほとんど変化していない (多少変化しているが実験誤差と考えられる)。

CyTOF データの形式は Flow Cytometry Standard (FCS) である。解析の利便性を考慮して汎用的な csv 形式に変換するために、Python のパッケージ fcsparser が使用された。変換後の CyTOF データのカラムは、「金属同位体: タンパク質」である。しかし、CyTOF の仕様上、カラムには計測時間、金属同位体のみが記載され特定のタンパク質を標識していないカラムも含まれることもある。よって、タンパク質に対して DNB 解析を行うためにこれらを除き、残った 18 種類のタンパク質を DNB 解析の対象とした。先行研究を参考に、細胞にゲーティング (CyTOF

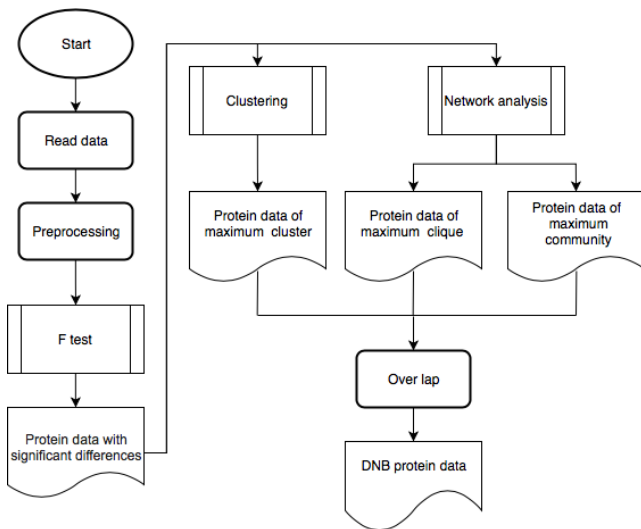


図 2 DNB 解析のフローチャート
Fig. 2 Flowchart of DNB analysis

データ内の計測値から、レコードの分類をする手法)されたレコードを抽出した [10] .

3. DNB 解析

本研究では 8h および 72h の DENV2 群データを 対照群データと比較して DNB 解析を行う。この DNB 解析とは未病状態 (健康状態と疾患状態の間の遷移状態) を検出する指標を抽出する手法であり、次の条件を満たす群を抽出する。

- グループ内の要素の偏差が対照群と比べて大きい。
- グループ内の要素間の相関の強さが対照群と比べて大きい。

図 2 は DNB 解析のフローチャートを示す。まずデータの読み込み、前処理となる対象となるタンパク質の抽出、ゲーティング、対数変換を行う。データに 0 が含まれているため、対数を取る際にデータ全体に 1 を足しておく。

次に、F 検定 (2 群間の母分散に差があるかどうかを判断する検定) を用いて対照群に対して DENV2 群の母分散が有意に大きなタンパク質群を抽出する。本研究では有意水準 0.05 を用いる。ここで、タンパク質間の検定が複数回行われるため多重検定となる。そのため、Benjamini-Hochberg 法により、多重検定の問題を解決する。

続いて、F 検定で抽出されたタンパク質群に対し階層的クラスタリングを行う。クラスタリングのためのデータ間の非類似度に 1 からピアソンの積率相関係数の絶対値を引いた値、結合法に最長距離法、しきい値に 0.9 を用いる。クラスタリング後、要素数が最大のクラスタを DNB タンパク質候補群とする。

併行して、F 検定で抽出されたタンパク質群に対しネットワーク解析を行う。タンパク質を要素 (ノード) とし、要素間の相関関係 (無相関検定により相関の有無を決定) が

表 1 Python のライブラリとそのバージョン

Table 1 Python library and its version

Python version	3.5.3
Python package	version
numpy	1.10.4
scipy	0.18.1
pandas	0.21.0
networkx	2.0
python-louvain	0.10

らネットワークを作成する。このネットワークをクリークとコミュニティに分ける。クリークは互いの要素が完全に繋がっている部分グラフであり、コミュニティはクリークのように完全に繋がってはいないが、密である部分グラフである。得られたクリークとコミュニティの中で、それぞれノード数が最大の群を DNB タンパク質候補群とする。

最後に、クラスタリングとネットワーク解析で得られた候補群から重複するタンパク質を抽出することで、DNB タンパク質が抽出される。

この DNB 解析は Python 言語により実装されている [11]。表 1 は Python のライブラリとそのバージョンを示す。特に、ネットワーク解析で乱数が使用されるため、乱数生成に使用される PYTHONHASHSEED を「65535」に固定する。

4. 解析結果

デング熱ウイルス感染経過データから DNB タンパク質が得られるかどうかを確認するため、DENV2 群の全ての時間における DNB 解析を行った。本研究では 8h と 72h のデータに着目した。

表 2 は全 7 サンプル中で DNB タンパク質が抽出されたサンプル数を示す。例えば、8h におけるタンパク質 Envelope は、全 7 サンプル中 4 サンプルで DNB タンパク質として抽出されたことを示す。全 7 サンプル間に個人差があると予想されることから、DNB タンパク質として 3 サンプル以上で抽出されたタンパク質が有用であると考えることとする。

4.1 デング熱ウイルス 2 型感染初期の遷移状態

表 2 の 8h のデータからわかるように、ウイルスの Envelope が 4 個、免疫制御や炎症に大きく関わるタンパク質 IL-1 β が 3 個、腫瘍壊死因子と呼ばれアポトーシスを誘導する役割や急性期反応に関係する役割をもつタンパク質 TNF α が 3 個抽出されている。図 1 からわかるように 8h でウイルス感染割合が 0.0% にも関わらず、ウイルスの Envelope および炎症に関連のある DNB タンパク質が抽出されたことを意味している。

図 3 は感染処理後 8h における各サンプルの DNB タンパク質 Envelope, IL-1 β , TNF α (これらのタンパク質は

表 2 全 7 サンプル中で DNB タンパク質が抽出されたサンプル数：
3 以上の数を太字で示す。

Table 2 The number of the samples which DNB protein was extracted in 7 samples: 3 or more is shown by bold font.

Protein	Time point	
	8h	72h
Envelope	4	2
CCR7	0	0
CD1c	0	0
CD11c	1	0
CD14	0	1
CD16	0	1
CD40	1	1
CD45	0	1
CD80	0	1
CD209	0	2
CXCL10	2	1
Caspase3	1	1
DENV NS3	1	1
HLA-DR	0	0
IL-1b	3	4
IL-6	0	5
IL-8	2	4
TNF α	3	3

表 2 で選択されている)の平均標準偏差の時間経過を示す。

一般的に、この平均標準偏差は抽出された DNB タンパク質の揺らぎの強さを確認するために S^* を DNB タンパク質群、 i をタンパク質、 s_i をある 1 つのタンパク質の標準偏差として

$$\frac{1}{|S^*|} \sum_{i \in S^*} s_i$$

により計算される [6]。なお、サンプル 758 が急激な変化を示すため、縦軸の上限を 0.7 にすることで全体の傾向がわかるように工夫した。サンプル 771, 772, 773 の 3 つについて、平均標準偏差が 8h ピークのような結果を示し、24h にかけて減少していることがわかる。

図 4 は DENV2 群の各サンプルの DNB タンパク質 Envelope, IL-1 β , TNF α の平均相関強度の時間経過を示す。平均相関強度の計算方法は S^* を DNB タンパク質群、 i, j をタンパク質、 r_{ij} をある 2 つのタンパク質間のピアソンの積率相関係数として

$$\frac{2}{|S^*|(|S^*|-1)} \sum_{i, j \in S^*, i < j} |r_{ij}|$$

である [6]。図 4 より、サンプル 758 を除く 6 サンプルが 8h でピークを示し、24h にかけて平均相関強度が減少していることがわかる。また、24h 以降は、おおむね増加傾向である。平均標準偏差と平均相関強度の両方が似たような傾向を示している。

図 1 から、感染処理後 8h でウイルス感染割合が 0.0% であることは、観測限界であると考えられる。以上のことから、わずかな感染に対してウイルスの Envelope と炎症

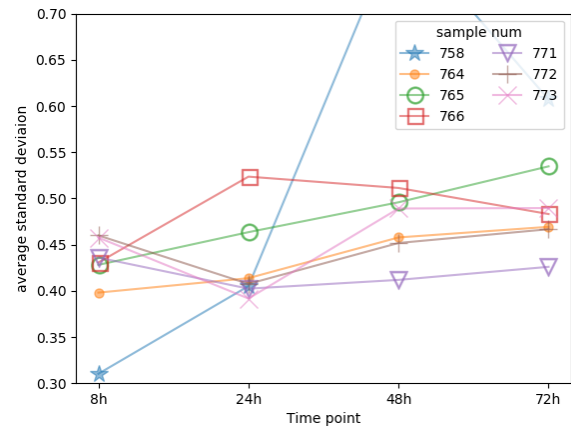


図 3 感染処理後 8h における各サンプルの DNB タンパク質 Envelope, IL-1 β , TNF α の平均標準偏差の時間経過：色の実線は各サンプルを示す。

Fig. 3 Time series of average standard deviation of DNB proteins Envelope, IL-1 β and TNF α in each sample at 8h after then infection: The colored lines represent each sample.

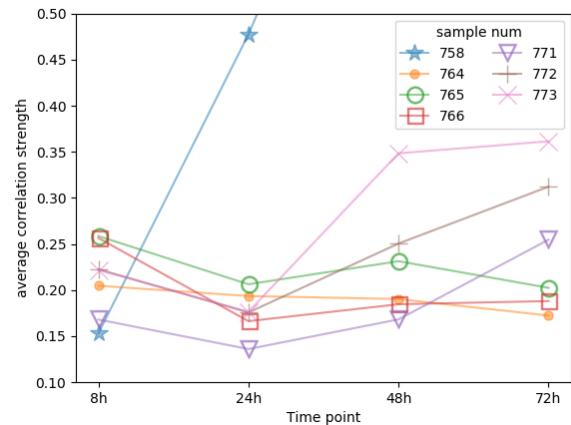


図 4 感染処理後 8h における各サンプルの DNB タンパク質 Envelope, IL-1 β , TNF α の平均相関強度の時間経過：色の実線は各サンプルを示す。

Fig. 4 Time series of average correlation strength of DNB proteins Envelope, IL-1 β and TNF α in each sample at 8h after then infection: The colored lines represent each sample.

に関連する DNB タンパク質が抽出されたことを踏まえると、この時点 (8h) はデング熱ウイルス 2 型感染初期の遷移状態であることを意味している。

4.2 デング熱ウイルス 2 型発症前の遷移状態

表 2 の感染処理後 72h のデータからわかるように、免疫制御や炎症に大きく関わるタンパク質 IL-1 β が 4 個、B 細胞の抗体産生を誘導する IL-6 が 5 個、好中球やリンパ球に遊走活性をもつ IL-8 が 4 個、腫瘍壊死因子と呼ばれ

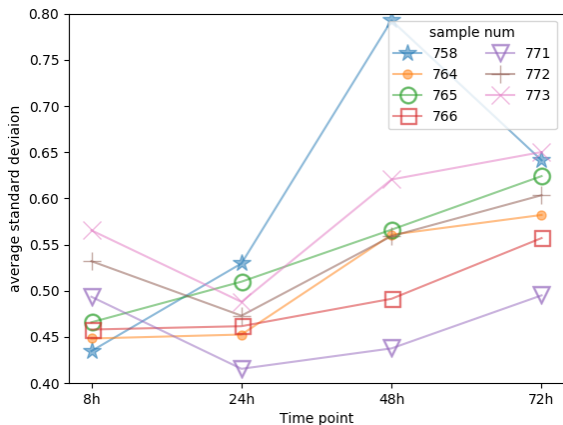


図 5 感染処理後 72h における各サンプルの DNB タンパク質 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α の平均標準偏差の時間経過: 色の実線は各サンプルを示す。

Fig. 5 Time series of the average standard deviation of DNB proteins IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α in each sample at 72h after then infection: The colored lines represent each sample.

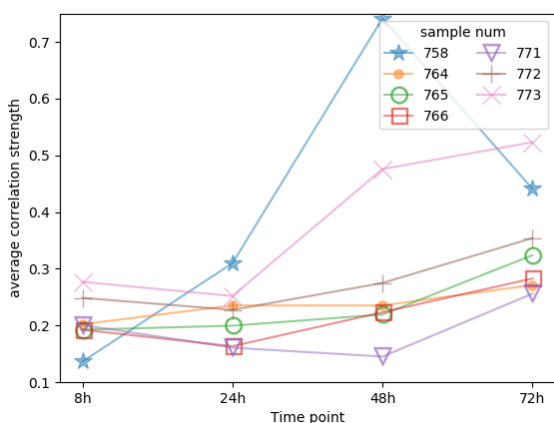


図 6 感染処理後 72h における各サンプルの DNB タンパク質 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α の平均相関強度の時間経過: 色の実線は各サンプルを示す。

Fig. 6 Time series of the average correlation strength of DNB proteins IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α in each sample at 72h after then infection: The colored lines represent each sample.

アポトーシスを誘導する役割や急性期反応に関係する役割をもつタンパク質 TNF α が 3 個抽出されている。

図 5 は DENV2 群の 72h における各サンプルの DNB タンパク質 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α (これらのタンパク質は表 2 で選択されている) の平均標準偏差の時間経過を示す (計算方法は図 3 と同様)。サンプル 758 を除く 6 サンプルについて、平均標準偏差が 72h でピークになっていることがわかる。

図 6 は DENV2 群の 72h における各サンプルの DNB

タンパク質 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α の平均相関強度の時間経過を示す (計算方法は図 4 と同様)。同様に、サンプル 758 を除く 6 サンプルについて、平均相関強度が 72h でピークになっていることがわかる。以上のことから、抽出されたタンパク質が炎症に関係するタンパク質であることを考慮すると、DENV2 群において 72h はデング熱ウイルス 2 型発症前の遷移状態であることを意味している。

5. まとめ

本研究では、CyTOF データに対して DNB 解析が適用できるかどうかを検討するために、デング熱ウイルス感染経過データに着目した。解析の結果、得られた結論は次の通りである。

- (1) デング熱 2 型ウイルスの感染処理後 8h (感染率 0.0%) で、ウイルスの Envelope, 炎症に関連のあるタンパク質 IL-1 β と TNF α が抽出されたことにより、デング熱ウイルス 2 型感染初期の遷移状態が検出されたと考えられる。
- (2) デング熱 2 型ウイルスの感染処理後 72h で、炎症に関連のあるタンパク質 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α が抽出されたことから、デング熱ウイルス 2 型発症前の遷移状態が検出されたと考えられる。
- (3) DNB タンパク質として複数のサンプルで抽出されたタンパク質を選択する方法は有効である。

これらの結果から、CyTOF データに対して DNB 解析が適用可能であると結論付ける。

現在、DNB 解析がさらに改良され、「同期性揺らぎ遺伝子」(Synchronously Fluctuated Genes, SFGs) の抽出法が提案されている [12]。SFGs では遺伝子を対象としているが、今後、タンパク質や他のバイオマーカーへの適用も期待される。

参考文献

- [1] 健康・医療戦略推進本部:健康・医療戦略 (平成 26 年 7 月 22 日閣議決定) 入手先 <<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryoku/suisin/ketteisiryou/kakugi/170217senryaku.pdf>> (参照 2020-01-23)。
- [2] 一般社団法人日本未病システム学会編: 未病医学標準テキスト, 喜多 敏明:未病の歴史, pp 3-4, 株式会社エヌ・ティー・エス (2018)。
- [3] Henry, N., Hayes, D.: Cancer biomarkers, Molecular Oncology, Vol. 6, Issue 2, pp 140-146 (online), DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.010 (2012)。
- [4] Chen, L., Liu, R., Liu, Z., Li, M., Aihara, K.: Detecting early-warning signals for sudden deterioration of complex diseases by dynamical network biomarkers, Sci. Rep., Vol. 2, Article number 342 (online), DOI: 10.1038/srep00342 (2012)。
- [5] 国立研究開発法人科学技術振興機構, 陳 洛南, 合原 一幸, 劉 銳, 劉 治平, 李 美儀: 動的ネットワークバイオマーカーの検出装置, 検出方法及び検出プログラム, 特許番号 P5963198, 発行日付 2016-08-03。

- [6] Koizumi, K., Oku, M., Hayashi, S., *et al.*: Identifying pre-disease signals before metabolic syndrome in mice by dynamical network biomarkers, *Sci. Rep.*, Vol. 9, Article number 8767 (online), DOI: 10.1038/s41598-019-45119-w (2019).
- [7] Spitzer, M., and Nolan, G.: Mass Cytometry: Single Cells, Many Features, *Cell*, Vol. 165, Issue 4, pp. 780–791 (online), DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.019 (2016).
- [8] FlowRepository: FlowRepository - CyTOF analysis of dengue virus-infected human moDCs, available, from <<https://FlowRepository.org/id/FR-FCM-ZY87>> (accessed 2020-01-23)
- [9] WHO: Dengue and severe dengue, available, from <<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>> (accessed 2020-01-23)
- [10] Hamlin, R., Rahman, A., Pak, T., *et al.*: High-dimensional CyTOF analysis of dengue virus-infected human DCs reveals distinct viral signatures, *JCI Insight*, Vol. 2, Issue 13, e92424 (online), DOI: 10.1172/jci.insight.92424 (2017).
- [11] 井川 智哉: FCM データに対する DNB 解析の適用に関する基礎的研究, 富山大学大学院 理工学教育部 修士学位論文 (2018) .
- [12] Oku, M.: Two Novel Methods for Extracting Synchronously Fluctuated Genes, *IPSI TBIO*, Vol. 12, pp. 9-16 (online). DOI: 10.2197/ipsjtbio.12.9 (2019).