

## 「川崎市内科医会」が聖マリアンナ医科大学・市内ベンチャー企業との共同研究に成功 ーコロナワクチン複数回接種に影響を受ける遺伝子群を発見ー



### 1. 発表者：



渡邊嘉行（総合川崎臨港病院 理事長、川崎市内科医会 副会長）

山本博幸（聖マリアンナ医科大学 大学院医学研究科 バイオインフォマティクス学分野 大学院教授）

出川寿一（川崎市内科医会 会長）

羽鳥 裕（川崎市内科医会 名誉顧問）

團野宏樹・福田雅和（株式会社ナレッジパレット 代表取締役 共同創業者）

### 2. 発表のポイント：

◆新型コロナウイルス感染症に対する、医療従事者へのコロナワクチン優先的接種を活用し、自らのワクチン接種前後の経時的な採血検体を研究貢献に活かそうと、「川崎市内科医会」出川寿一会長、渡邊嘉行副会長が中心となり、川崎市内のクリニック・民間病院内科医が結集。さらに、聖マリアンナ医科大学 大学院医学研究科 バイオインフォマティクス学分野（山本博幸教授）、株式会社ナレッジパレットとの共同研究により、**mRNA コロナワクチン接種を「複数回」接種する毎に、発現上昇する遺伝子群の同定に成功し**、海外医学雑誌「*Journal of Medical Virology* 誌（Impact factor (2021):20.693）（Clarivate, 2022）」に報告した。

◆川崎市内科医会は、市内ベンチャー企業「株式会社ナレッジパレット（團野宏樹・福田雅和 共同創業者）」との共同応募により、「川崎市産学共同研究開発プロジェクト補助金」を獲得。市内クリニック・民間病院に勤務する、医師を始めとした医療従事者自らが被検者となり、合計 993 の経時的な血液検体を回収。抽出された、血清および末梢血単核細胞（PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells）を用い、993 検体の中和抗体解析ならびに、705 検体の次世代シーケンサー（NGS: Next Generation Sequencing）による遺伝子発現解析を行うことに成功した。

◆この NGS 解析には、川崎市内科医会・市内ベンチャー企業「株式会社ナレッジパレット」による高精度・大規模トランスクリプトーム解析技術を応用した。膨大な検体数の NGS トランスクリプトーム解析を川崎市内科医会、聖マリアンナ医科大学との共同で実現することに成功した。

◆本解析から得られた膨大なデータは、聖マリアンナ医科大学 大学院医学研究科 バイオイン

フォーマティクス学分野（山本博幸教授）、総合川崎臨港病院理事長 渡邊嘉行、株式会社ナレッジパレットとの共同バイオインフォーマティクス解析作業により、コロナワクチンを「複数回」接種する毎に体内で発現上昇してゆく‘遺伝子群’を発見した。

本研究内容は、中和抗体の解析結果（第1報）を昨年、海外医学雑誌「*Journal of Clinical Laboratory Analysis*」誌（Impact factor (2021):3.124）」掲載後、今回の「大規模トランスクリプトーム解析」を第2報として海外医学雑誌「*Journal of Medical Virology*」誌（Impact factor (2021):20.693）（Clarivate, 2022）」に報告した。本研究手法と研究結果がもつインパクトは非常に高く、今後の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）発症の病態解明に、さらには mRNA ワクチンの更なる開発進歩に大きく貢献するものと期待される。

◆さらに、本研究で経時的に回収された 705 血液検体の一部は、1細胞 RNA 解析（Single cell RNA seq）にも対応できる検体保管がなされており、今後は、これらの残検体を、世界の COVID-19 研究、mRNA ワクチン研究に活用することを検討している。「川崎市内科医会」は、国内外研究機関との共同研究等の機会探索を検討しており、マッチング先の紹介等、今後、川崎市等の公的機関に相談する予定である。

### 3. 発表内容：

#### 研究の背景

新型コロナワクチン（mRNA ワクチン）は、異例の速さで開発がなされ承認後に世界の臨床現場に登場した。しかしながら、過去に前例のない mRNA ワクチンがヒトにもたらす影響、詳細なメカニズム、日本人における個体差等は、既に新型コロナウイルス感染拡大から3年以上経過した、現在でも十分に解明されていない。本プロジェクトは、先行ワクチン接種対象者である「川崎市医療従事者自らにより提供された血液 705 検体」を、川崎市ベンチャー企業である、株式会社ナレッジパレットの大規模トランスクリプトーム技術で解析した。本研究は「川崎市産学共同研究開発プロジェクト補助金」と「川崎市内科医会資金」を活用して実現。得られたビッグデータを用いることにより「ワクチン接種関連（副反応、免疫異常、アナフィラキシー、後遺症、異時発症疾患等）を予測可能なバイオマーカー」の開発に繋げる研究を計画した。国民へのワクチン接種安全性への貢献が期待できるだけでなく、様々な定期ワクチン接種の安全性予測診断実現にも応用可能であり、バイオマーカーの発見、診断薬・診断システムの開発、臨床応用に繋げることができると考え研究開始となった。

#### 研究の方法と結果

##### （方法）

【1】 医療従事者自らの経時的血液検体採取

神奈川県内科医学会「生命倫理委員会」審査・承認後、臨床試験登録のもと、川崎市内の医療従事者について、ワクチン接種前（0日）、接種後22日、90日、180日、360日、に、血液採取。採取した血液から、血清と末梢血単核細胞（PBMC）を分離・保管。

## 【2】 抗体量及び次世代シーケンスデータ取得

採取した血液検体のうち、血清を用いて、抗体検査（SARS-CoV-2 S-RBD-IgG / IgM、中和阻害活性「SARS-CoV-2 sVNT アッセイ」測定を実施。全遺伝子発現プロファイリングには、PBMCを用い、バルクレベルのトランスクリプトーム解析を実施。

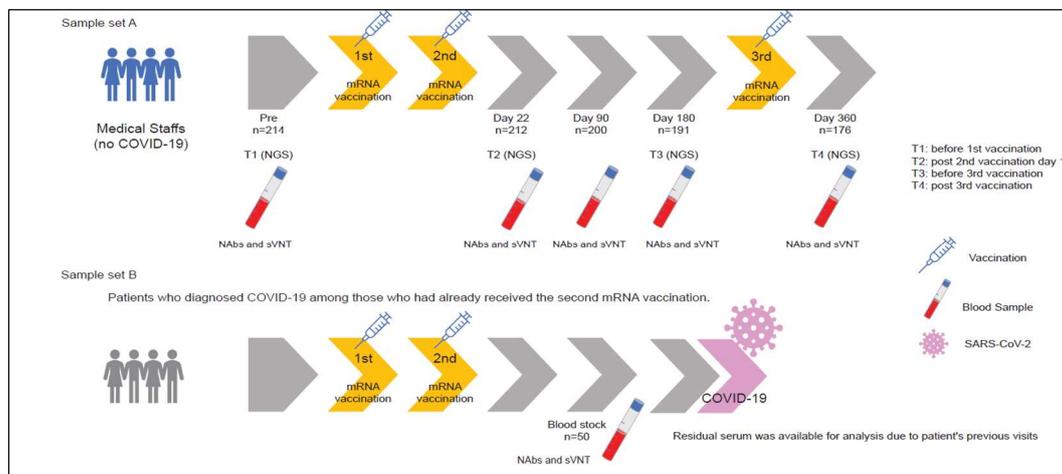
## 【3】 抗体及び次世代シーケンスデータを基にバイオインフォマティクス解析

抗体量データについては、ベース抗体量、抗体量の時系列変化をベースに、ダイナミクスのクラスタリングにより、検体の分類を実施。トランスクリプトーム解析については、次世代シーケンスで得られる生データから、遺伝子発現定量を実施。遺伝子発現定量には、株式会社ナレッジパレットの大規模科学計算及び解析パイプラインを活用。定量された遺伝子発現行列については、次元圧縮、クラスタリングを行い、検体間の性質の分類を実施。このクラスター情報と、抗体量データとの統合解析を行うことで、ワクチン接種に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定。

## （結果）

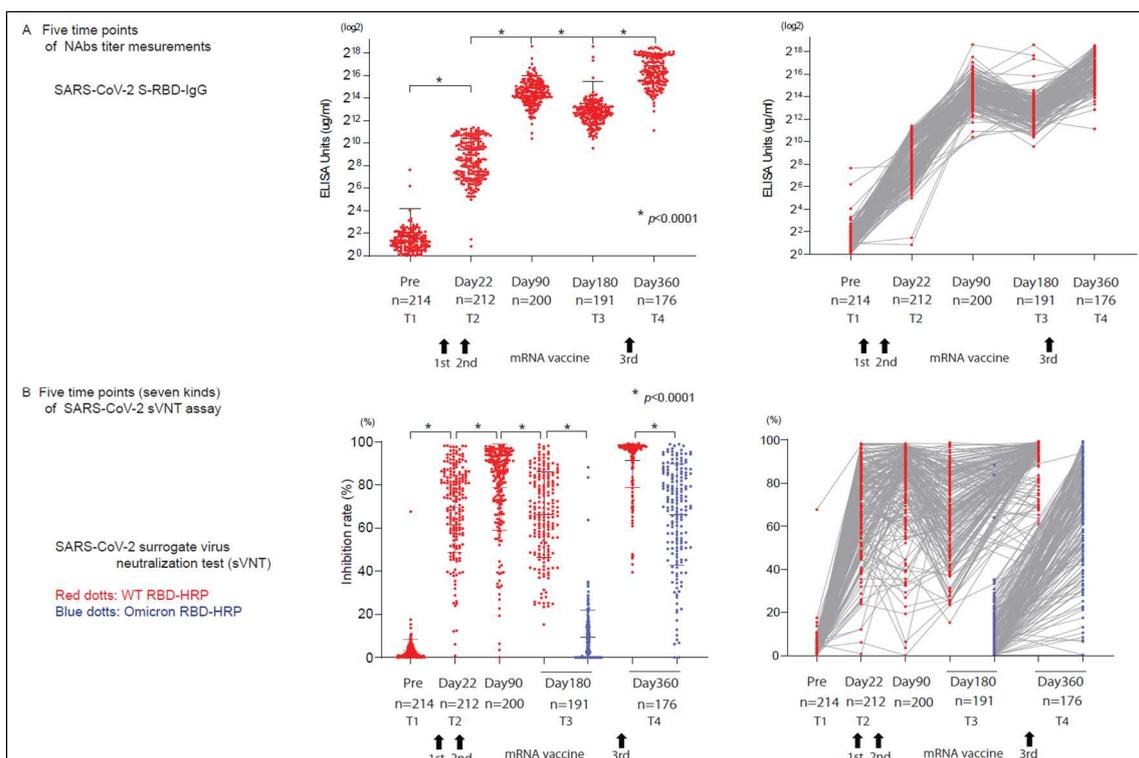
【1】 遺伝子トランスクリプトーム解析まで行っている「コロナワクチン研究」は既に、国内外でも存在するが、200 検体以上の検討は極僅かである。川崎市内科医会会員の医療施設（クリニック・民間病院）に従事する医療従事者から回収した合計 993 検体（ワクチン接種前（0日）：214 検体、接種後22日：212 検体、90日：200 検体、180日：191 検体、360日：176 検体）を抗体検査に、うち 705 検体をトランスクリプトーム解析に利用することができた（図1）。

図1 上段は医療従事者のワクチン接種のタイミングで経時的に採血実施した流れ。下段は医療機関に通院されていた患者さんが COVID-19 となった際の過去保存血清の検討。



【2】 SARS-CoV-2 S-RBD IgG/IgM 抗体検査を見ると、1・2 回目接種後の S-RBD に対する抗体は非常に高い量を 90 日まで維持し、180 日で低下傾向にあるものの、ブースター接種により更に高い値を維持できているように見える、一方で、SARS-CoV-2 サロゲート・ウイルス中和試験 (sVNT) で確認すると、1 回接種後 22 日目の時点でかなりばらつきがあり、2 回接種により中和率 (阻害率) は上昇するも、180 日目には再度かなりのばらつきをもって低下していることが分かった (図 2)。これらの検討は新型コロナウイルス感染拡大当初の SARS-CoV-2 新型コロナウイルスに対する中和試験 (WT RBD-HRP) であるが、オミクロン変異株に対する中和試験 (Omicron RBD-HRP) では、顕著な低下を示しており、抗体量との解離が示された。さらに、ブースター接種を行うことで中和試験 (WT RBD-HRP) に回復は見られたものの中和試験 (Omicron RBD-HRP) では十分な上昇なくばらつきを認めた結果であった。

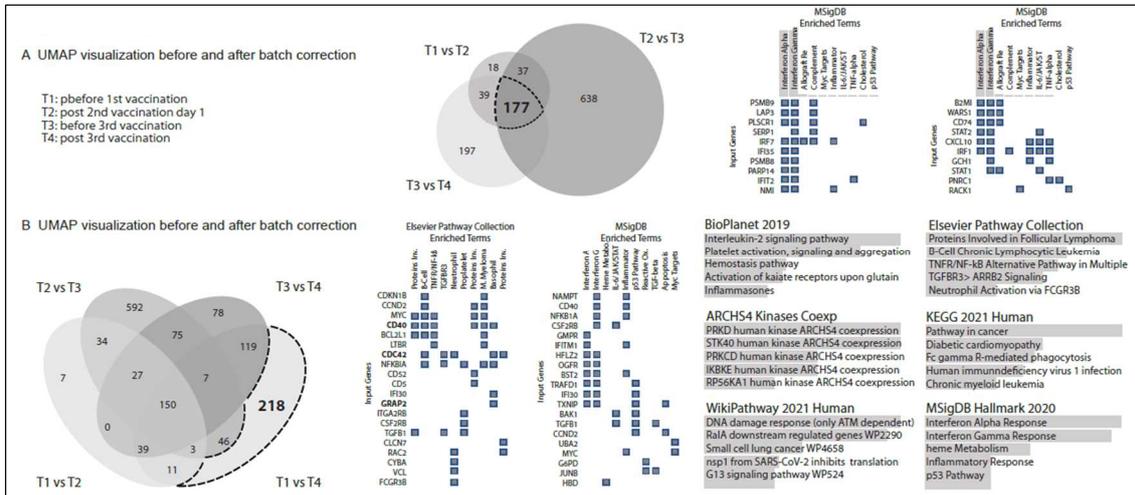
図 2 経時的な SARS-CoV-2 S-RBD IgG/IgM 抗体検査と、SARS-CoV-2 サロゲート・ウイルス中和試験 (sVNT)。下段、赤点は武漢株に対する中和試験 (WT RBD-HRP)、青点はオミクロン変異株に対する中和試験 (Omicron RBD-HRP)。



【3】 NGS トランスクリプトーム解析では、mRNA ワクチン接種前 (T1)、1・2 回目接種後 (T2)、ブースター接種 (3 回目) 前 (T3)、ブースター接種 (3 回目) 後 (T4) のタイミングで、多くがワクチン接種後に発現上昇 (118 遺伝子)・発現低下 (98 遺伝子) していた。一方で、ブースター接種 (3 回目) 後に特徴的な発現変化を示す遺伝子群 (図 3B) が存在し、interleukin-

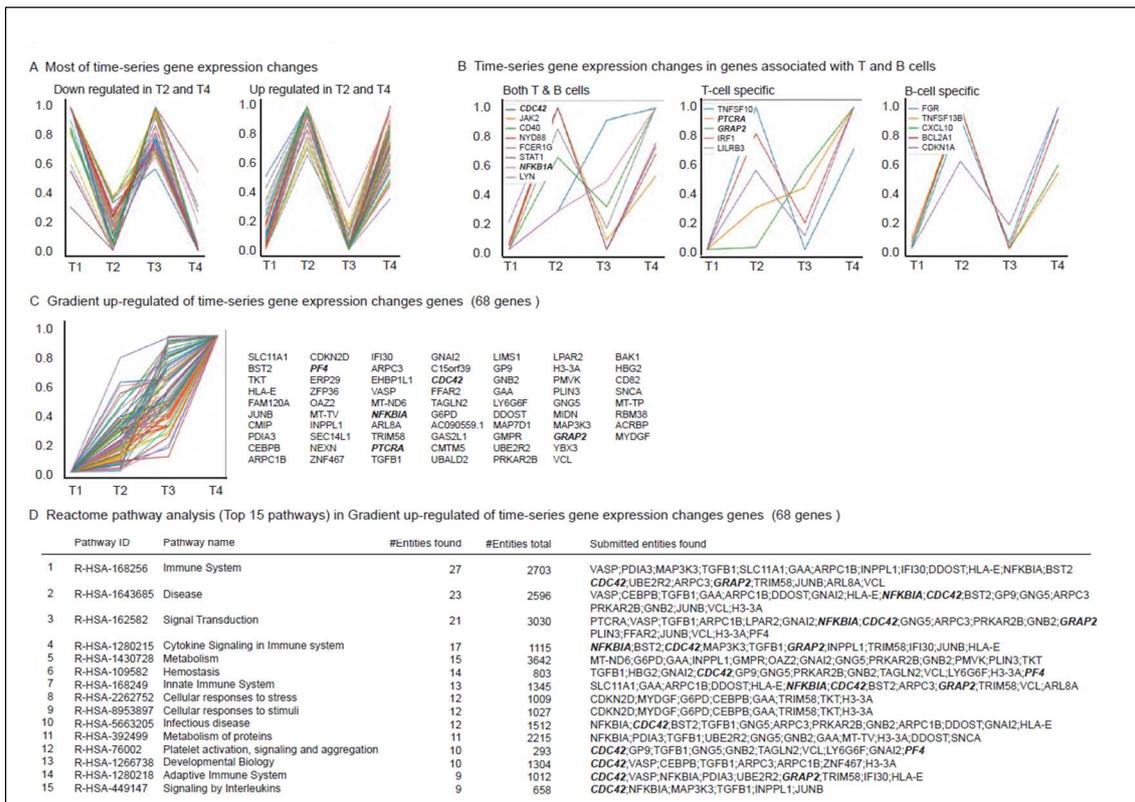
2 signaling、DNA damage response、lymphoma、leukemia、cancer 関連であった。

図3 NGS トランスクリプトーム解析結果 (DEG 解析)



また、T1-T4 間で発現変化の差が大きい遺伝子には、CD40、platelet differentiation-related factors, NFE2、STAT4、TGFB1、GZMA、KLRG1 などが含まれており、CXCL4/platelet factor 4 (PF4) は T4 で発現上昇、immune response-related factor GATA2/GATA3 は T2-T3 間で発現の有意な上昇を認めた。我々は最終的に、T4 の時点（ブースター接種後）にむけて、mRNA ワクチン接種する毎に発現上昇する 68 遺伝子(図 4C)の同定に成功し、なかでも CDC42、GRAP2、NFKB1A、PTCRA、PF4 は高頻度にバスウェイ解析でも登場する遺伝子となり、これらは immune system、metabolism、hemostasis、platelet activation genes に分類されていた。この結果は既報告とも一致する結果であり、我々の、大規模トランスクリプトーム解析が得た結果の詳細を、さらに深く解析することで、ワクチン接種の安全性予測診断、バイオマーカー発見、診断薬・診断システムの開発、臨床応用に繋げることができると考えられた。

図4 NGS トランスクリプトーム解析結果 (DEG 解析)



## 用語解説

### # 1 発現変動遺伝子 (DEG : differentially expressed genes) 解析

トランスクリプトーム解析で得られた遺伝子発現量の算出結果から群間の発現変動遺伝子 (DEG)を検出する手法。

### # 2 uniform manifold approximation and projection (UMAP)

高次元データを低次元空間に非線形な射影を行う手法の一つ。近年 1 細胞ゲノミクス (single-cell RNA sequencing) 分野で広く利用されている。

## 4. 発表雑誌 :

- ・ 雑誌名 : **Journal of Medical Virology** (オンライン版 : 2023 年 6 月 22 日)
- ・ 論文タイトル : Time-series transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells obtained from individuals who received the SARS-CoV-2 mRNA vaccine
- ・ 著者 : Watanabe Y, Yamamoto H, Matsuba I, Watanabe K, Kunishima T, Takechi Y, Takuma T, Araki Y, Hirotsu N, Sakai H, Oikawa R, Danno H, Fukuda M, Sugino R, Futagami S, Wada K, Itoh F, Tateishi K, Oda I, Hatori Y, Degawa H
- ・ DOI 番号 : [10.1002/jmv.28884](https://doi.org/10.1002/jmv.28884)

- ・ 雑誌名 : **Journal of Clinical Laboratory Analysis** (オンライン版 : 2022 年 6 月 9 日)
- ・ 論文タイトル : Heterogeneity assessment of vaccine-induced effects using point-of-care surrogate neutralization test for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.
- ・ 著者 : Watanabe Y, Matsuba I, Watanabe K, Kunishima T, Takechi Y, Takuma T, Araki Y, Hirotsu N, Sakai H, Oikawa R, Danno H, Fukuda M, Futagami S, Wada K, Yamamoto H, Itoh F, Oda I, Hatori Y, Degawa H
- ・ DOI 番号 : [10.1002/jcla.24545](https://doi.org/10.1002/jcla.24545)

## 5. 問い合わせ先 :

<研究に関すること>

聖マリアンナ医科大学 大学院医学研究科 バイオインフォマティクス学分野 教授 山本博幸

TEL : 044-977-8111

Email : [h-yama@marianna-u.ac.jp](mailto:h-yama@marianna-u.ac.jp)

総合川崎臨港病院 理事長、川崎市内科医会 副会長、聖マリアンナ医科大学 消化器内科 臨床教授 渡邊嘉行

TEL : 044-233-9336

Email : [ponponta@rinko.or.jp](mailto:ponponta@rinko.or.jp)

<報道に関すること>

聖マリアンナ医科大学 知財事業推進課

TEL : 044-977-8111

Email : [chizai@marianna-u.ac.jp](mailto:chizai@marianna-u.ac.jp)