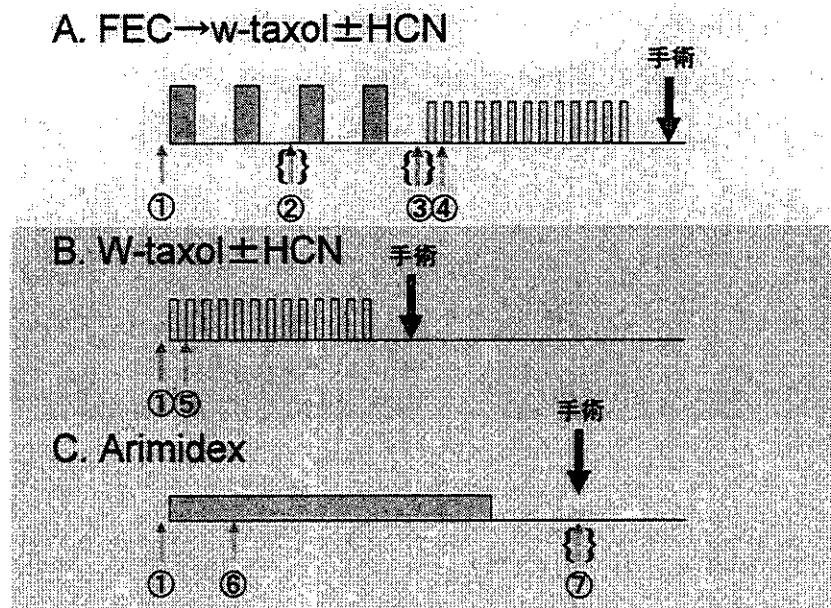


F111	TWEAK; APO3L	AF030099	O43508	SK015
F11j	cytochrome c	M22877	P00001	AH478
F11k	BLANK			
F11l	BLANK			
F11m	BLANK			
F11n	BLANK			
F12a	cell death-inducing DFFA-like effector A (CIDEA)	AF041378	O60543	ST158
F12b	BLANK			
F12c	BLANK			
F12d	BLANK			
F12e	BLANK			
F12f	BLANK			
F12g	BLANK			
F12h	BLANK			
F12i	BLANK			
F12j	BLANK			
F12k	BLANK			
F12l	BLANK			
F12m	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677		
F12n	BLANK			
F13a	BLANK			
F13b	BLANK			
F13c	BLANK			
F13d	BLANK			
F13e	BLANK			
F13f	BLANK			
F13g	BLANK			
F13h	BLANK			
F13i	BLANK			
F13j	BLANK			
F13k	BLANK			
F13l	BLANK			
F13m	BLANK			
F13n	BLANK			
F14a	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677		
F14b	BLANK			
F14c	BLANK			
F14d	BLANK			
F14e	BLANK			
F14f	BLANK			
F14g	BLANK			
F14h	BLANK			
F14i	BLANK			
F14j	BLANK			
F14k	BLANK			
F14l	BLANK			
F14m	BLANK			
F14n	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677		
G11	ubiquitin	M26880		
G13	brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1)	K00558		
G15	HLA class I histocompatibility antigen C-4 alpha subunit (HLAC)	M11886		
G27	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677		
G29	cytoplasmic beta-actin (ACTB)	X00351		
G31	phospholipase A2; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ); 14-	V00530		
G43	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)	M86400		
G45	23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A)	X56932		
G47	40S ribosomal protein S9 (RPS9)	U14971		
ENDOFGENES				

資料4) 付随研究の採血ポイント

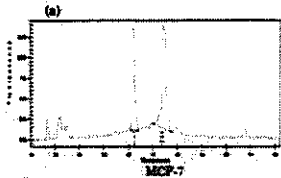


資料7) サンプルのQC と保存法改善についての基礎研究

臨床サンプルから抽出した RNA の質の評価と保存法の改善を実施した。

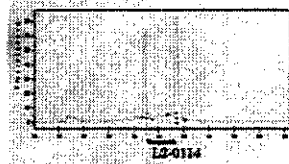
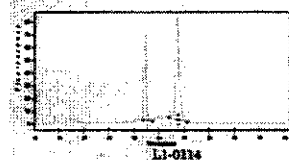
臨床サンプル例における Bioanalyzer2100 による RNA 解析結果

a) Cell line (MCF-7)



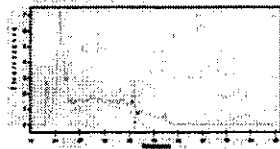
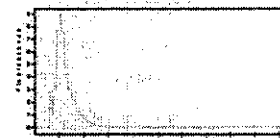
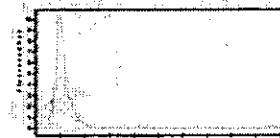
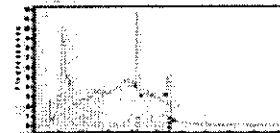
RNAlater浸透後抽出も
ISOGENで直接抽出もほ
ぼ同様の結果

b) 末梢血単核球



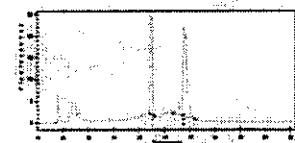
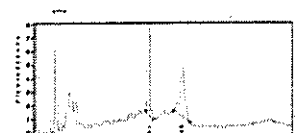
単核球抽出後RNAlater使
用もISOGEN直接抽出も
同様の結果

c) CNB検体
(RNAlater使用:
24時間laterに浸透後抽出)



いずれも著明なRNAの変性が
認められる

d) CNB検体
ISOGEN浸透、凍結後、
homogenizeして抽出



良好なRNAが得られている

本研究において、乳房組織においては、脂肪組織に富み、RNAlater による RNA 保存は、不適であると考えられたため、Isogen 処理を実施することと minor change した。以降、良質の RNA の回収が行われている。

資料8) ホルモン接触時、Tamoxifen 投与時の前臨床データの解析

試験の概要

- cDNA カスタムアレイ 20 枚を使用
 - 10 枚 : MCF7 細胞株
 - 10 枚 : SK-BR-3 細胞株
- 細胞株への処理
 - エストロゲン (E) 濃度 : 2 段階 (10e-11, 10e-9M)
 - Tamoxifen (T) 濃度 : 2 段階 (10e-7, 10e-6 M)

処理群と ID

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	MN11T0	ME11T0	ME11T7	ME11T6	MN11T6
	E9	MN09T0	ME09T0	ME09T7	ME09T6	MN09T6
SK-BR-3	E11	SN11T0	SE11T0	SE11T7	SE11T6	SN11T6
	E9	SN09T0	SE09T0	SE09T7	SE09T6	SN09T6

発現データの特徴

1. 平均値の比較 (アレイ毎、変換なし)

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	95.7	85.6	94.3	86.7	78.1
	E9	70.9	66.5	80.3	95.1	67.7
SK-BR-3	E11	80.3	76.4	78.4	64.4	57.9
	E9	30.7	30.0	30.2	36.9	27.3

2. 中央値の比較 (変換なし)

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	63.3	57.5	67.7	70.4	66.3
	E9	53.5	50.3	47.8	54.0	44.9
SK-BR-3	E11	59.0	48.8	58.7	41.1	39.6
	E9	15.2	15.0	15.8	16.2	17.0

解析

1. 平均値、中央値に対して分散分析を行う

```
proc glm data = ARMEANS;
class EXPR TRT;
model EXP = EXPR TRT;
lsmeans EXPR TRT;
run;
```

結果 I. (平均値)
R2 = 0.932110

変数	DF	Type I SS	Mean Square	F 値	Pr > F
EXPR	3	9206.858000	3068.952667	52.09	<.0001
TRT	4	500.437000	125.109250	2.12	0.1405

EXPR	
MCF7, E11	88.08
MCF7, E9	76.10
SK-BR-3, E11	71.48
SK-BR-3, E9	31.02
TRT	
Cont.	69.400
E	64.625
E+T7	70.800
E+T6	70.775
T6	57.750

結果 II. (中央値)

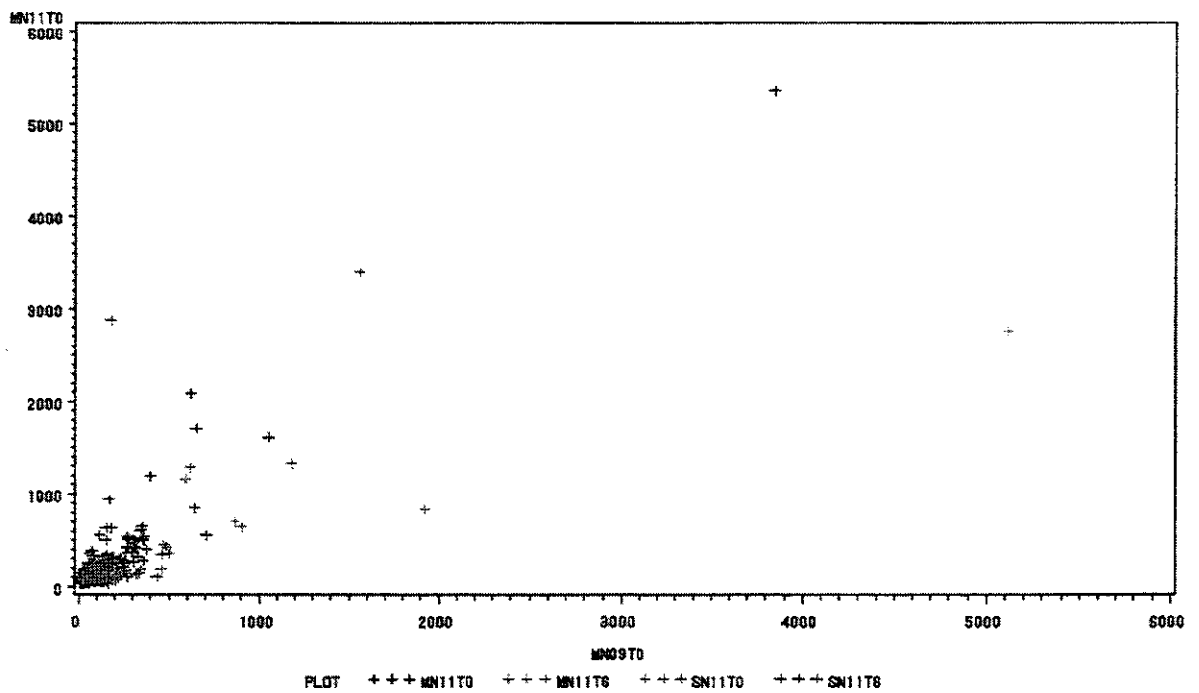
R2 = 0.943879

変数	DF	Type I SS	Mean Square	F 値	Pr > F
EXPR	3	6487.933500	2162.644500	66.15	<.0001
TRT	4	110.602000	27.650500	0.85	0.5227

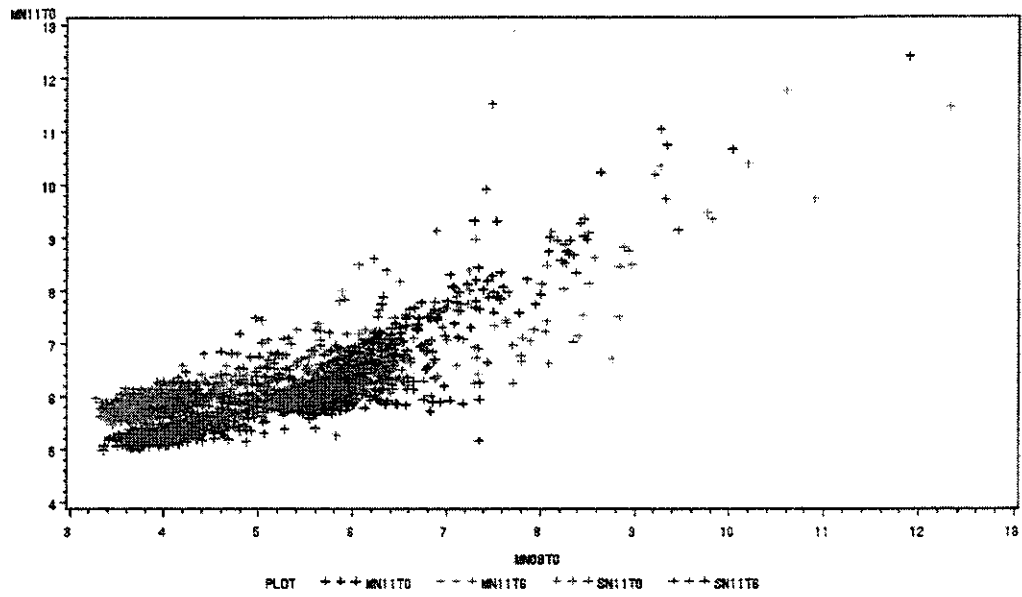
	EXPR
MCF7, E11	65.04
MCF7, E9	50.10
SK-BR-3, E11	49.44
SK-BR-3, E9	15.84
	TRT
Cont.	47.750
E	42.900
E+T7	47.500
E+T6	45.425
T6	41.950

2. 散布図

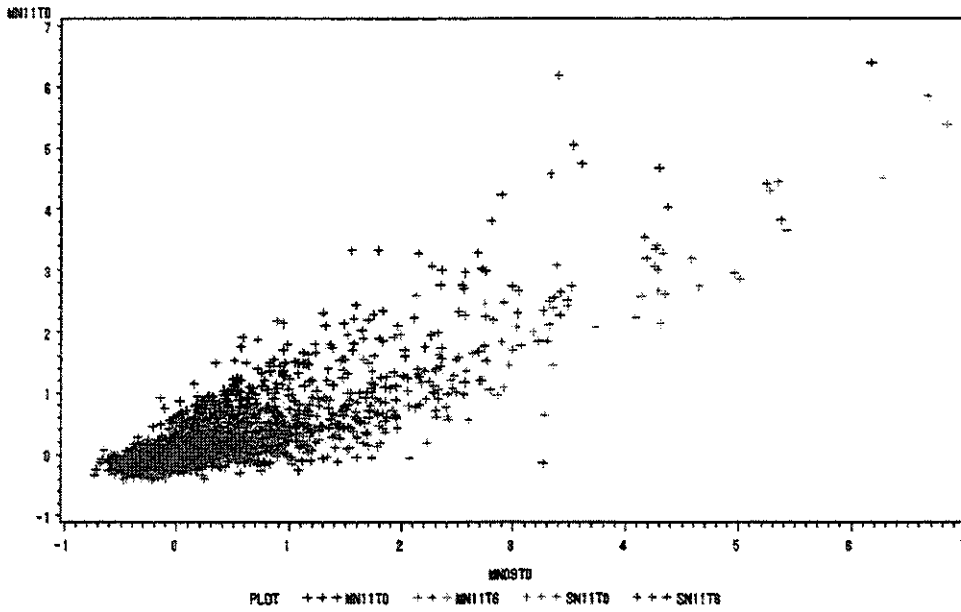
I. 同一処理の細胞間



II. 散布図 (log2 変換)

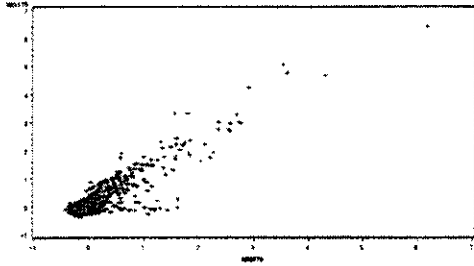


III. 散布図 (中央値による正規化)

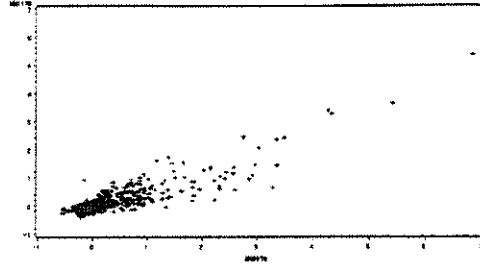


IV. 散布図 (同一処理の細胞毎)

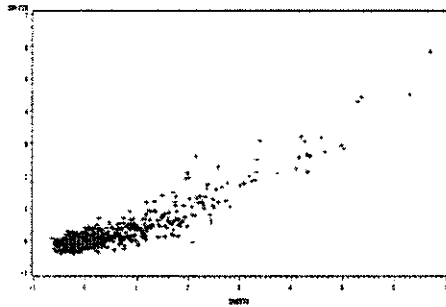
MN**T0



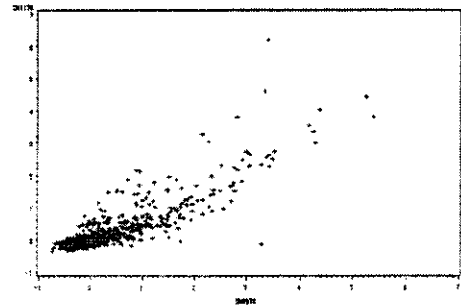
MN**T6



SN**T0



SN**T6

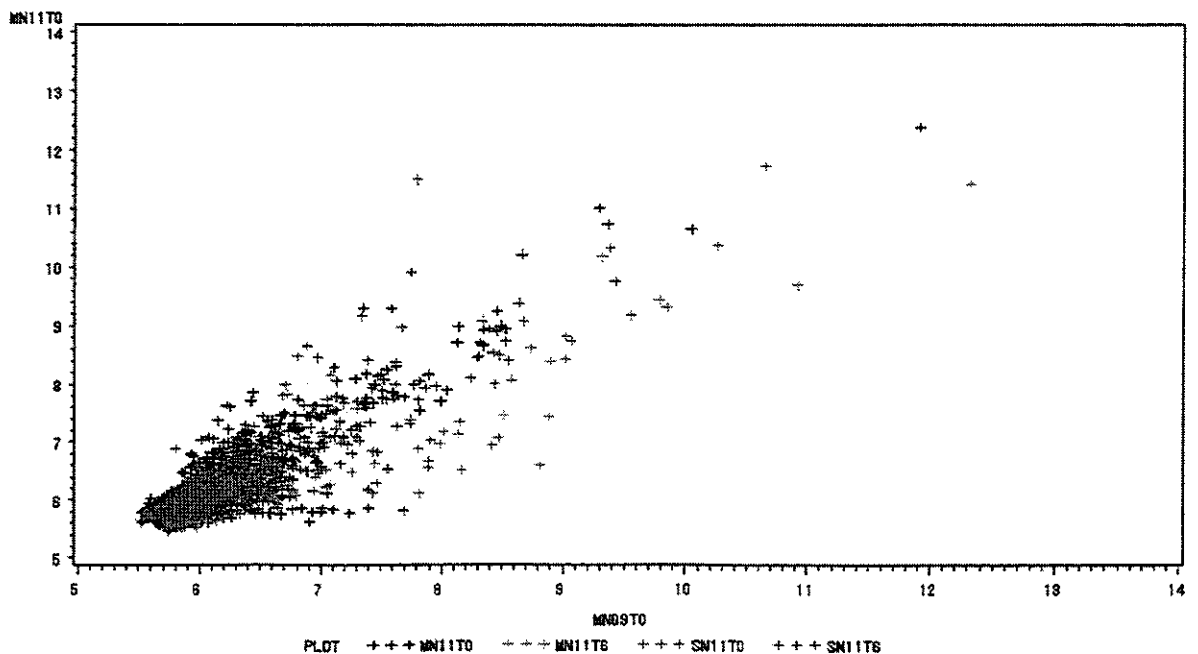


考察

- 正規化後に非線形の傾向がみられる
 - 本来は 45 度の直線に従って分布する
- 非線形の度合は散布図毎に異なる
 - 平均値や中央値の乖離が大きいものほど、非線形の度合が大きい傾向がある

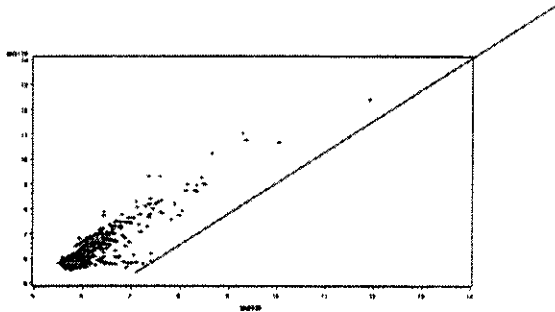
2. 正規化

I. 対数変換前に正規化した場合

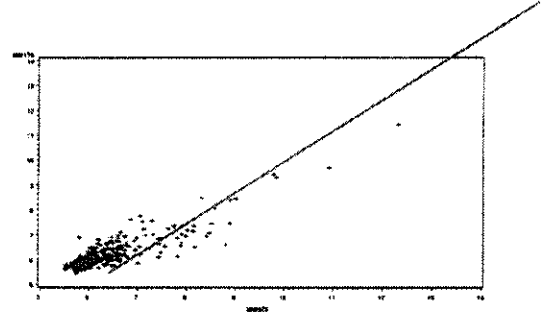


II. 散布図 (同一処理の細胞毎)

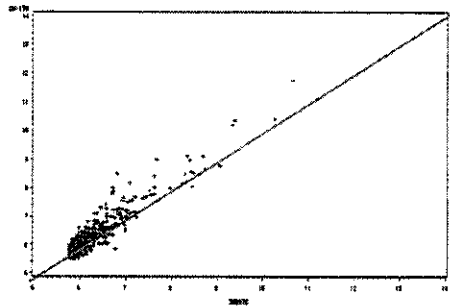
MN**T0



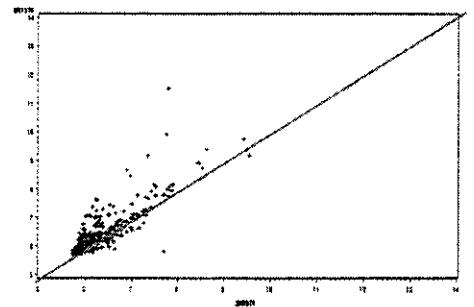
MN**T6



SN**T0



SN**T6

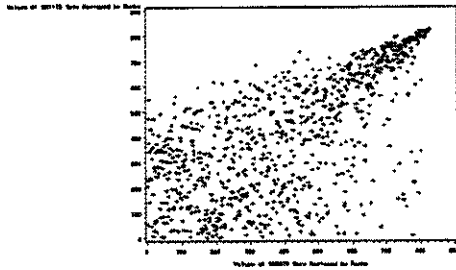


考察

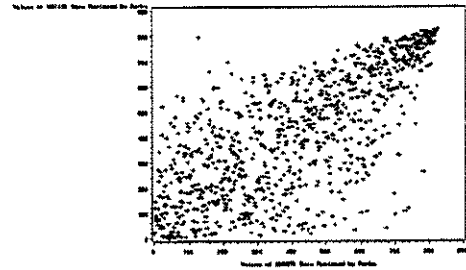
- 対数変換に由来するバイアスは 正規化→(比)→対数変換の順が良好な結果を得られる。
- 順位変換は対数変換や正規化の影響を受けない
 - 実験変動に対してロバスト

III. 散布図 (順位変換)

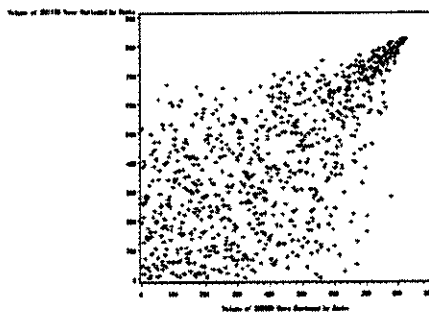
MN**T0



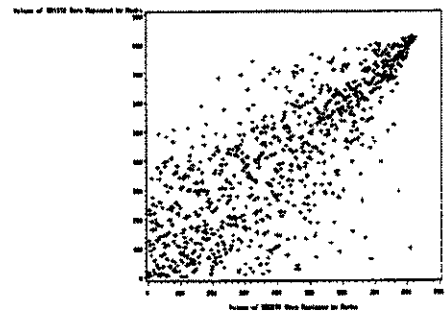
MN**T6



SN**T0

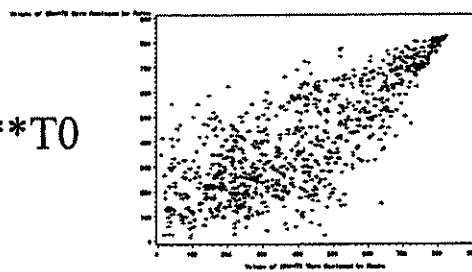


SN**T6

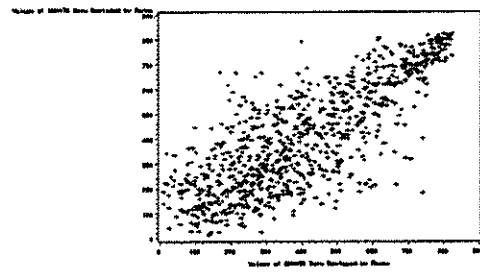


IV 順位の平均をとった散布図

MN**T6

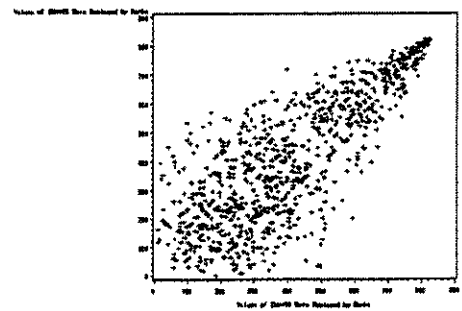
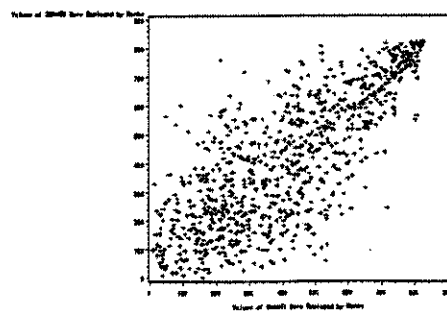


SN**T0



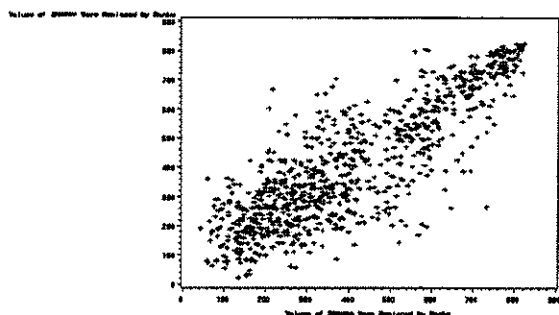
MN**T0

SN**T6

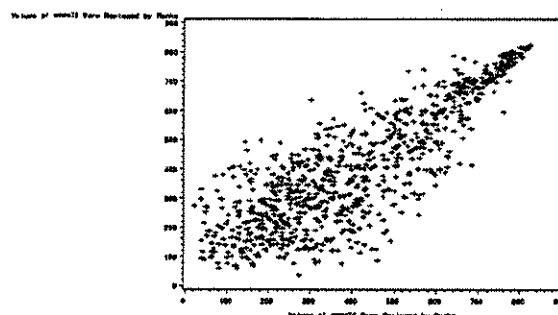


V. 順位の平均をとった散布図

MN vs SN

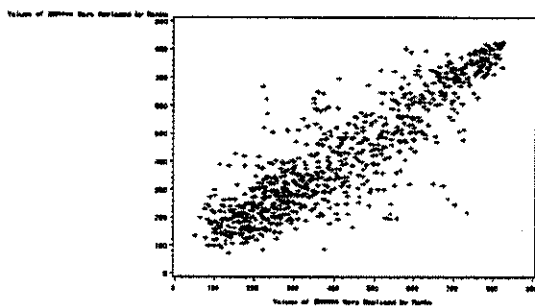


T0 vs T6

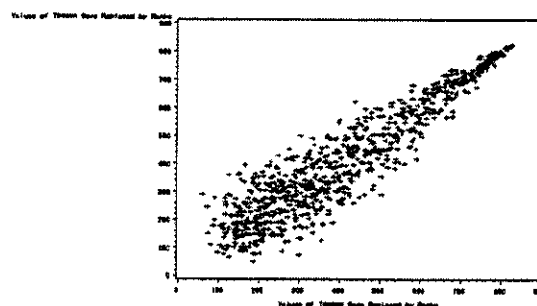


VI. 順位の平均をとった散布図

MN vs SN



T0 vs T



(全てのデータを使用)

考察

フィルターアレイの性質

- 発現の強い所では再現性が良い
 - それ以外では（見かけ上は）ノイズだが、シグナルの情報は保持
- 反復が必要
 - 本試験では細胞毎に 8 回、処理毎に 8 回の反復

3. クラスタ解析

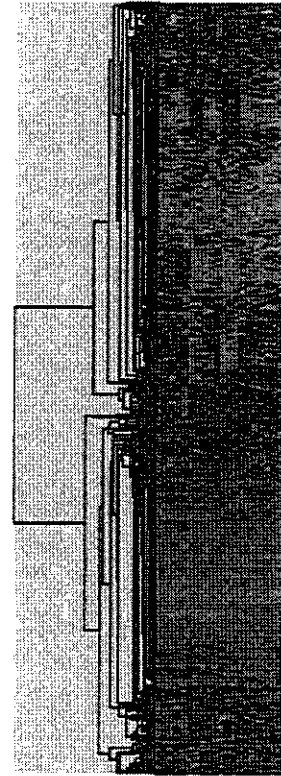
I. 全遺伝子の Centroid linkage

順位データを下記のように変換

$$y = 2\{2(x-1)/(n-1) - 1\}$$

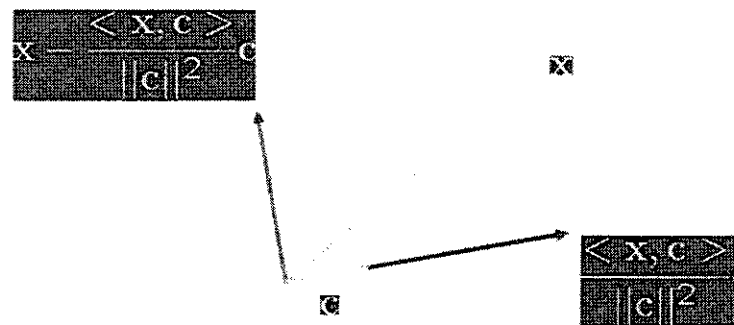
遺伝子に対して Centroid linkage を行う

結果 (右図)



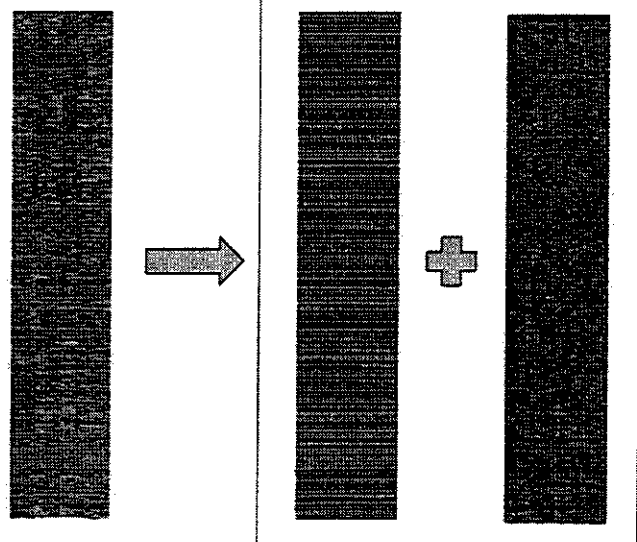
II. アレイデータの分解

- アレイデータを対比空間に正射影
- 直交するふたつのベクトルに分解

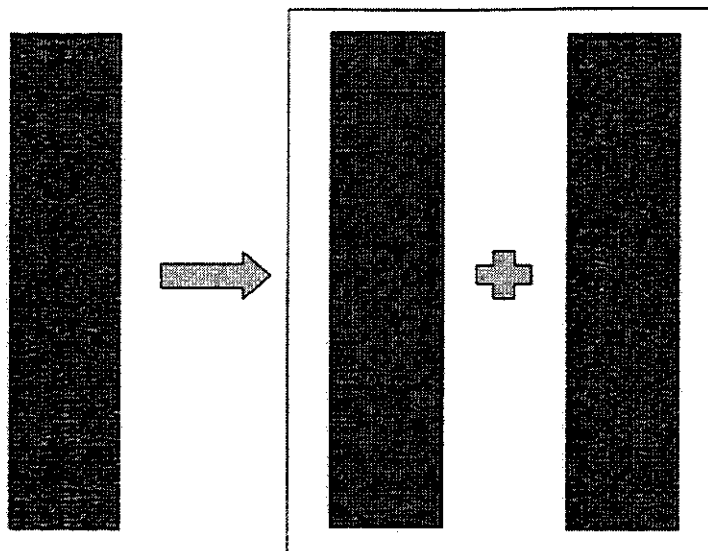


結果

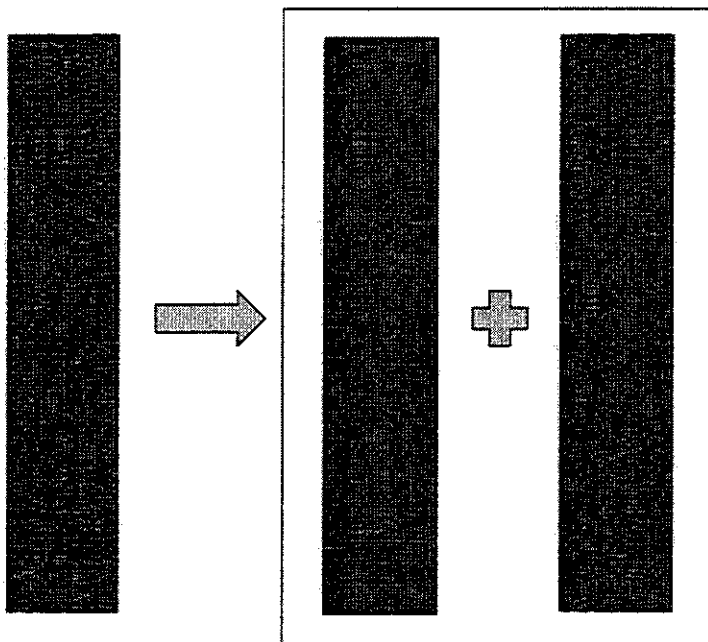
アレイデータの分解 (1)



アレイデータの分解 (2)



アレイデータの分解 (3)

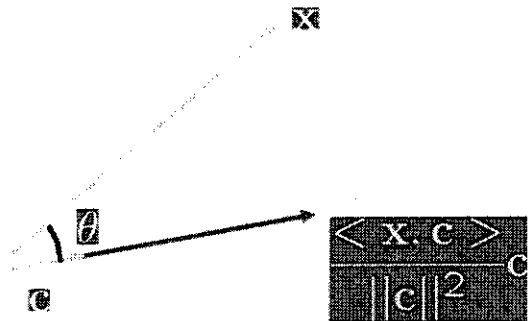


考察

- アレイデータの分解は、視覚的にデータの特徴を吟味する際に有用である。
- ただし、偶然生じたノイズをシグナルとして誤って拾う可能性も高い。
- シグナルの順位付けが必要。

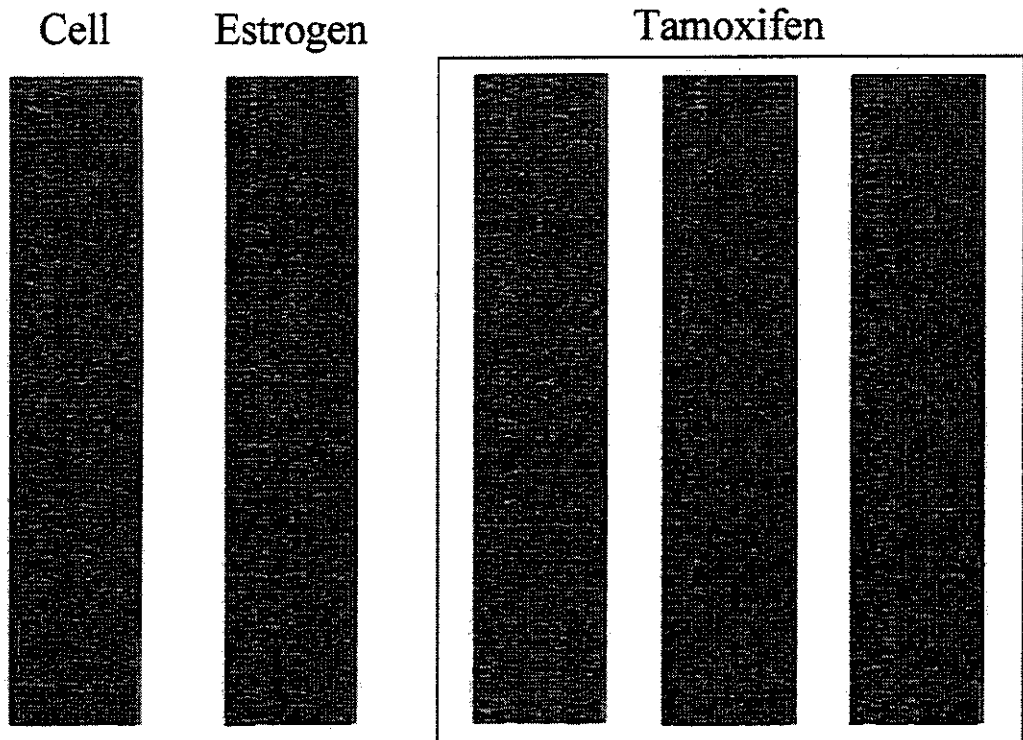
4. ベクトル間の角度による順位付け

$$\cos\theta = \frac{\langle x, c \rangle}{\|x\| \|c\|}$$



結果

I. 特異的な発現変動の抽出



II. 細胞株間による発現遺伝子の抽出

乳癌細胞株 I に強く発現している遺伝子群

Cytokine; interleukin 18 precursor (IL18); interferon gamma-inducing factor (IFN-gamma-inducing factor; IGIF); interleukin 1 gamma (IL1-gamma)
additional; insulin receptor substrate 1
signal/oncogene; retinoid X receptor alpha (RXRA)
translation/detoxification; glutathione-S-transferase homolog
cell cycle regulation; cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2B (CDKN2B); p14-INK4B;
multiple tumor suppressor 2 (MTS2)
transporter; type I cytoskeletal 18 keratin (KRT18); cytokeratin 18 (CK18)
Transcription/Repair; high mobility group protein HMG2
signal/oncogene; jagged homolog 2 (JAG2)
signal/oncogene; microtubule-associated protein 2 (MAP2)
Drug Metabolism; nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)
Cytokine; MHC class I molecule; MHC class I subunit-related protein A (MICA); PERB11.1
Transcription/Repair; ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6A
signal/oncogene; RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE (S6K)
Transcription/Repair; RAD51C truncated protein

乳癌細胞株 II に強く発現している遺伝子群

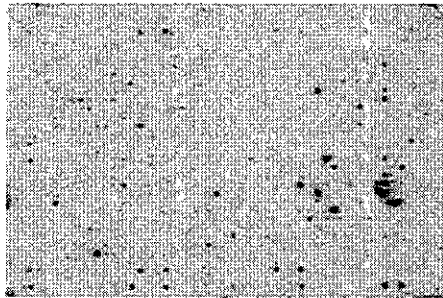
signal/oncogene; epidermal growth factor receptor (EGF receptor; EGFR); ERBB proto-oncogene
transporter; cytoskeletal keratin 7 (KRT7); cytokeratin 7 (CK7)
Cytokine; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A); tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1); tumor necrosis factor-binding protein 1 (TBP1); CD120A antigen
signal/oncogene; ras-related protein RAB5C
transporter; type II cytoskeletal 2 oral keratin; cytokeratin 2P (CK2P)
signal/oncogene; ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2
Transcription/Repair; thymidine phosphorylase precursor (TDRPase); platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEC GF); gliostatin
signal/oncogene; cell surface glycoprotein MUC18; melanoma-associated antigen A32; CD146 antigen; melanoma adhesion molecule
RhoFamily; rho GDP dissociation inhibitor 2 (RHO GDI2; RHO-GDI beta); LY-GDI; ARHGDI B; GDID4
Drug Metabolism; cytochrome P450 reductase
Growth Factor; insulin-like growth factor binding protein 5 precursor (IGF-binding protein 5; IGF BP5; IBP5)
apoptosis; caspase 4 precursor (CASP4); CASP5; ICH2 cysteine protease; ICH3; TX protease; TY protease; ICE(REL) III

III. 薬剤接触により発現調節を特異的に受ける遺伝子の抽出

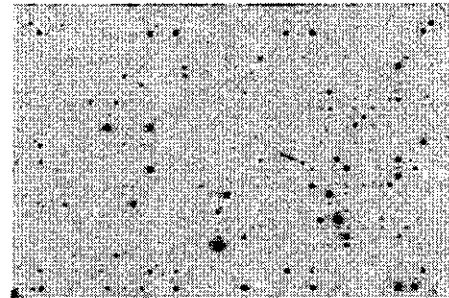
更なるノイズの低減を同法により達成し、薬剤関連遺伝子の特定を行った。結果の有意性は並べ替えにより並べ替えにより帰無分布 (過程) を算出し、発現プロファイルの有意性を評価した。(非公開)

資料9) 乳癌サンプルの遺伝子発現解析の実施経過

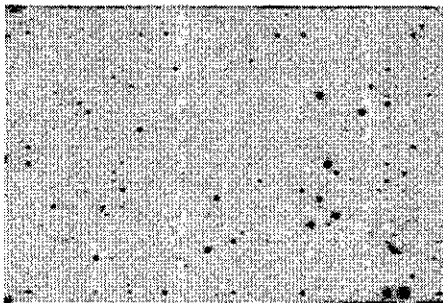
1. 現在遺伝子発現が終了した症例の提示 (症例 ID は非公開とする)



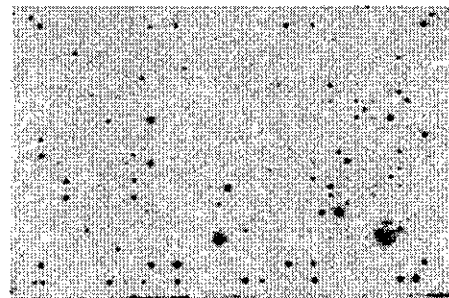
Breast cancer (Pt No.X)



PBM (Pt No.X)



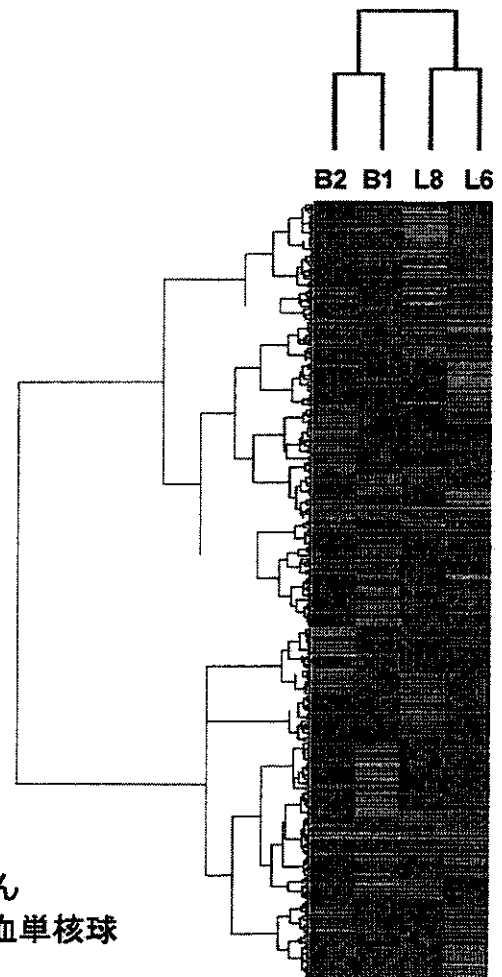
Breast cancer (Pt No.X)



PBM (Pt No.X)

2. クラスタ解析結果例

乳がんと末梢血単核球の遺伝子発現プロファイルはクラスタ解析により、明確に区別された。



B:乳がん
L:末梢血単核球

3. 臨床乳癌サンプルで発現の高い遺伝子の選択 (中間解析)

a) 乳癌で発現の高い遺伝子(PBMC との比較)

cadherin 3 (CDH3); placental cadherin precursor (P-cadherin; CDHP)
proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin
casein kinase I gamma 3 subunit (CSNK1G3)
insulin receptor precursor (INSR; IR)
heat shock protein 40 homolog (HSP40 homolog); DNAJW
wingless-related MMTV integration site 8b protein (WNT8B)
BCL2-interacting killer protein (BIK); NBK apoptotic inducer protein; BP4; BIP1
cadherin 6 precursor (CDH6); kidney cadherin (K-cadherin)
N-sam; fibroblast growth factor receptor1 precursor (FGFR1); basic fibroblast growth
factor receptor precursor (BFGFR); fms-like tyrosine kinase 2 (FLT2); heparin-binding
growth factor receptor (HBGFR-alpha A1); HBGFR-alpha A2; HBGFR-alpha A3
glutathione S-transferase M4 (GSTM4)
insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)
metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)
mitogen-activated protein kinase 6 (MAP kinase 6; MAPK6; PRKM6); p97-MAPK;
extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3)
6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT);
methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
RAD50
caspase 9 precursor (CASP9); MCH6; ICE-like apoptotic protease 6 (ICE-LAP6);
apoptotic protease activating factor 3 (APAF3)

b) 乳癌で発現の低い遺伝子(PBMC との比較)

growth-arrest-specific protein 1 (GAS1)
selectin E precursor (SELE; ESEL); endothelial leukocyte adhesion molecule 1
(ELAM1)
phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMTase); noradrenaline
N-methyltransferase
ATP-binding cassette subfamily G (white) member 2 (ABCG2); breast cancer resistance
protein (BCRP); mitoxantrone resistance protein 1 (MXR1)
caspase 3 (CASP3); apopain precursor; cysteine protease CPP32; YAMA protein; SREBP
cleavage activity 1 protein (SCA1)
inhibitor of apoptosis protein1 (IAP1; API1) + IAP homolog C; TNFR2-TRAF
signaling complex protein 1; MIHC
retinoblastoma-related protein p107
DNA polymerase alpha 70-kDa subunit (POLA2)
bleomycin hydrolase (BLM hydrolase)
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D (CDKN2D); p19-INK4D
glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4