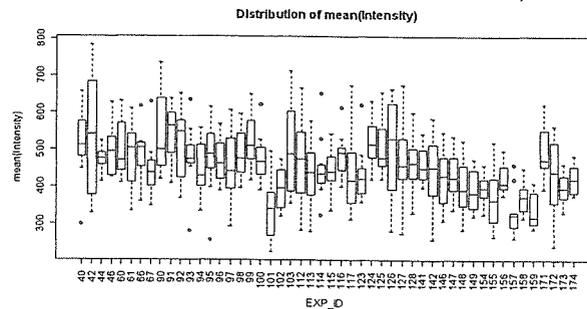


試行したglobal normalization方法

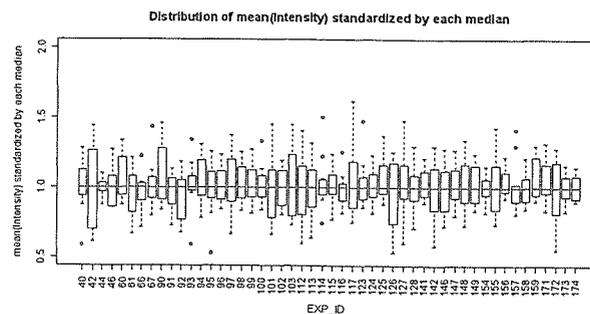
方法	候補遺伝子	代表値	絞り込み方法			遺伝子数
			① (小分散)	② (右下20%)	③ (200以上)	
1	全遺伝子	median	—	—	—	15918
2	全遺伝子	mean	—	—	—	15918
3	全遺伝子	trimmed mean	—	—	—	15758
4	全遺伝子	mean	—	○	—	3355
5	全遺伝子	mean	—	○	○	394
6	Affy100遺伝子	mean	—	—	—	100
7	Affy100遺伝子	mean	○	—	—	38
8	Affy100遺伝子	mean	○	—	○	27
9	Affy100遺伝子	mean	—	○	—	35
10	Affy100遺伝子	mean	○	○	—	9
11	Affy100遺伝子	mean	○	○	○	12

これらを生体(vivo)のtreatedのデータを用いて、平均データに対するrank invariant 遺伝子の平均Fold Changeで評価する

平均強度の分布 (vivo, control, raw データ)



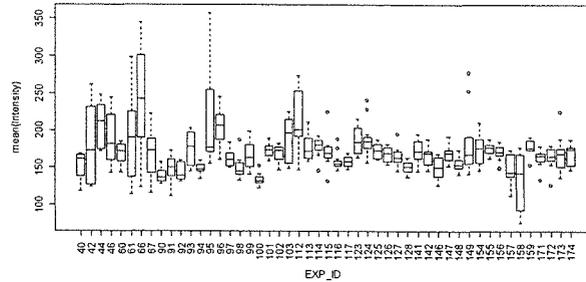
実験間



実験内

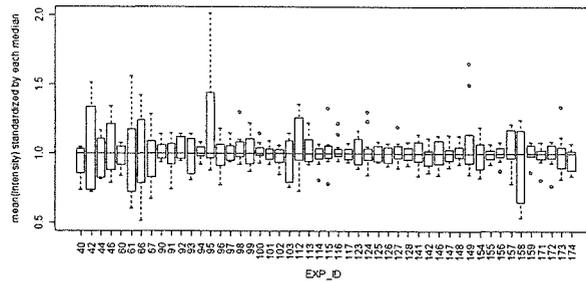
平均強度の分布(vivo, control, spike normalization)

Distribution of mean(Intensity)



実験間

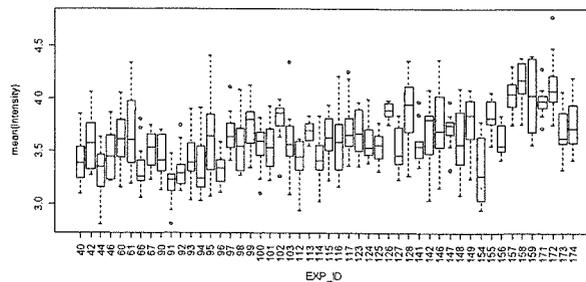
Distribution of mean(Intensity) standardized by each median



実験内

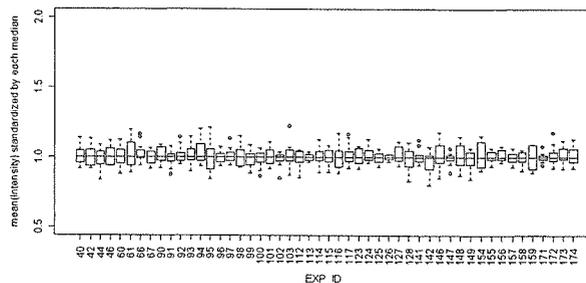
平均強度の分布(vivo, control, global normalization)

Distribution of mean(Intensity)



実験間

Distribution of mean(Intensity) standardized by each median



実験内

まとめ

- spike補正は、発現量の高い領域において、動かないと思われる遺伝子群の、平均的Fold Changeを安定化している。
- spike補正は、はずれ値が多めに発生する傾向がある。
- spike補正は同一EXP_ID内における、総強度ばらつきを低減させるが、異なるEXP_ID間においては、ばらつきが残っている (添加スパイク量 \propto DNA量に対する依存性と思われる)。
- global normalizationは、全領域において平均的Fold Changeを安定化する。
- global normalizationは全遺伝子の平均値によるものが最も優れていた。

[検証]

溶媒対照群を用いたサーカディアン遺伝子の抽出

- 薬剤効果の検出力を評価するモデルケースとして採用
- 単回投与のコントロール(初期23化合物)を、屠殺時間(3、6、9、24時間)で4群に分け、Tukey法(すべての群間の比較)による多重比較を行う
- 化合物毎に検定を行い、多くの化合物で同様の結果が得られるほど、信頼性が高いと考える

結論

コントロールのサーカディアン遺伝子はGlobal補正のほうが拾いやすい傾向にある

Global, Spike補正は多くの場合一致する

両補正法が一致しない場合、Spikeによるゆがみ(DNA測定誤差?)が原因である例が複数認められた

→In vivoでmRNA量に著変がない場合、Global補正で変化は十分に検出できる。

ただし、臓器が異なる場合など、Global補正では対応できない事例も存在するため(J. Tox. Sci. 31:491-508, 2006) Spike補正も利用可能とした。

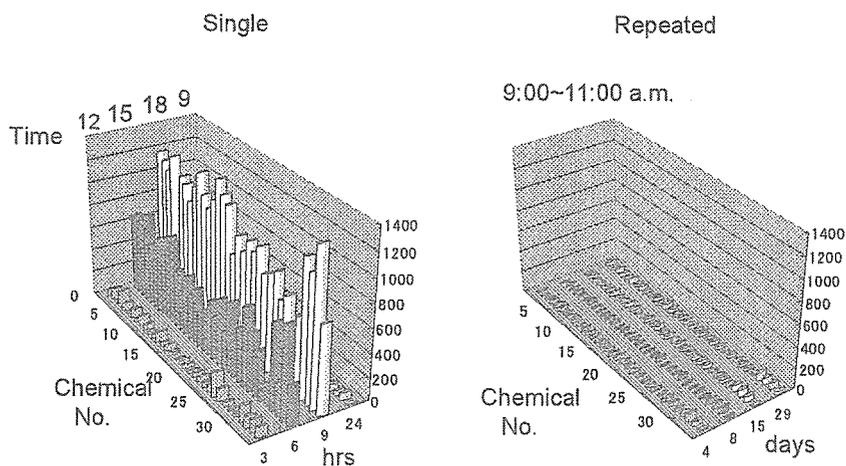
プロジェクトの特徴

- 1) 定量性に優れたAffymetrix 社GeneChipを採用。DNA量に基づいたSpike RNAを添加して細胞1個あたりのmRNA量を評価する手法も採用
- 2) 全被検化合物 150は標準的医薬品が中心であり、臨床で副作用が明らかとなり開発・市販中止となった薬物や、企業提供の独自化合物を多く含む
- 3) 十分な用量・時間設定のもとに得られた各種毒性学的データのフルセットを、遺伝子発現データとリンクさせ、かつ関連情報と有機的に結びつけ、統合データベースとして構築する
- 4) 種差のブリッジングを考慮している

プロジェクトの特徴

- 1) 定量性に優れたAffymetrix 社GeneChipを採用。DNA量に基づいたSpike RNAを添加して細胞1個あたりのmRNA量を評価する手法も採用
- 2) 全被検化合物 150は標準的医薬品が中心であり、臨床で副作用が明らかとなり開発・市販中止となった薬物や、企業提供の独自化合物を多く含む
- 3) 十分な用量・時間設定のもとに得られた各種毒性学的データのフルセットを、遺伝子発現データとリンクさせ、かつ関連情報と有機的に結びつけ、統合データベースとして構築する
- 4) 種差のブリッジングを考慮している

D site albumin promoter binding protein



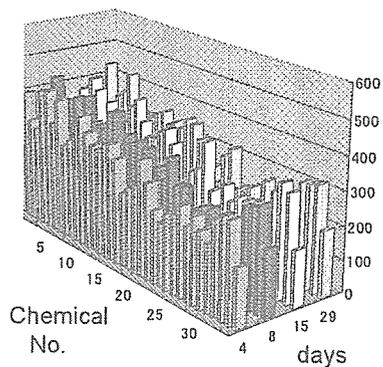
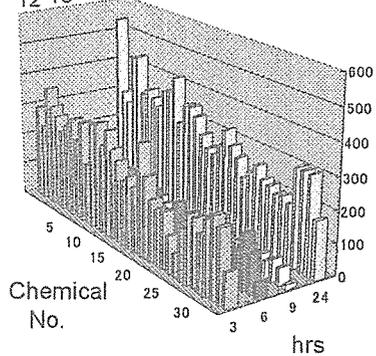
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like

Single

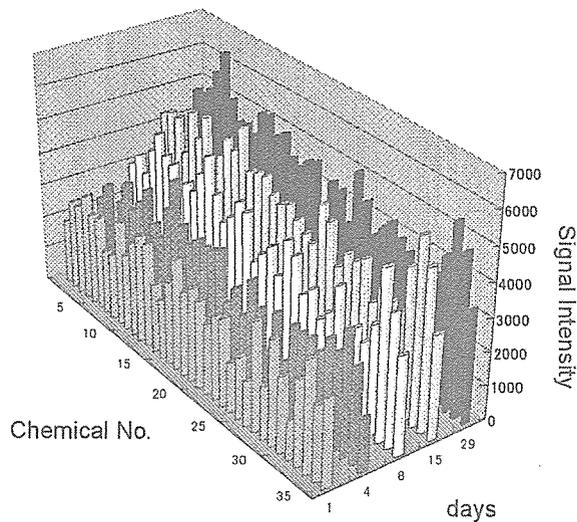
Repeated

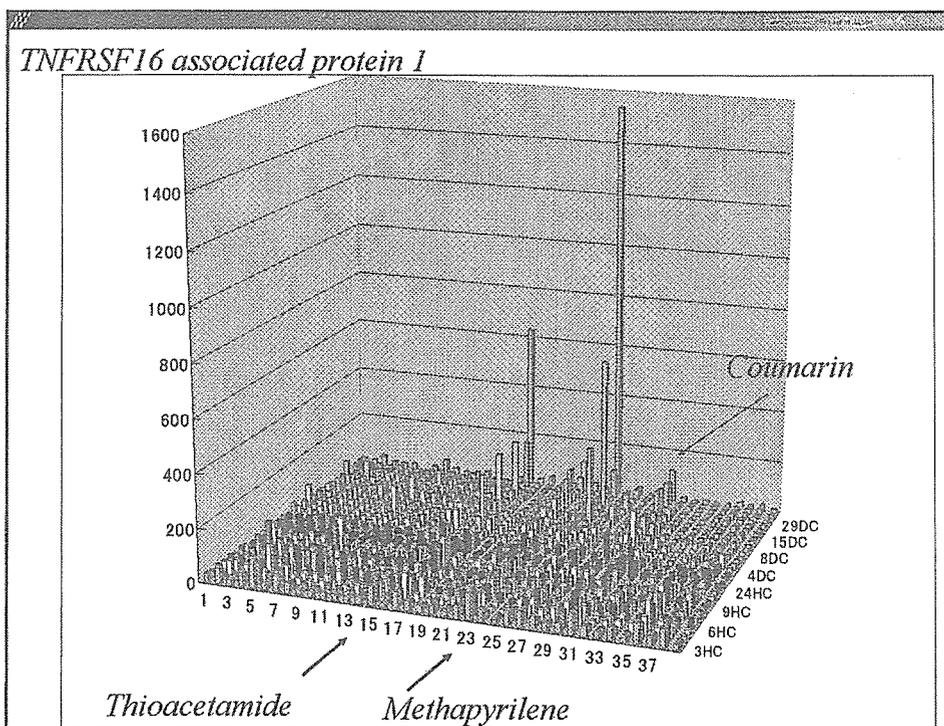
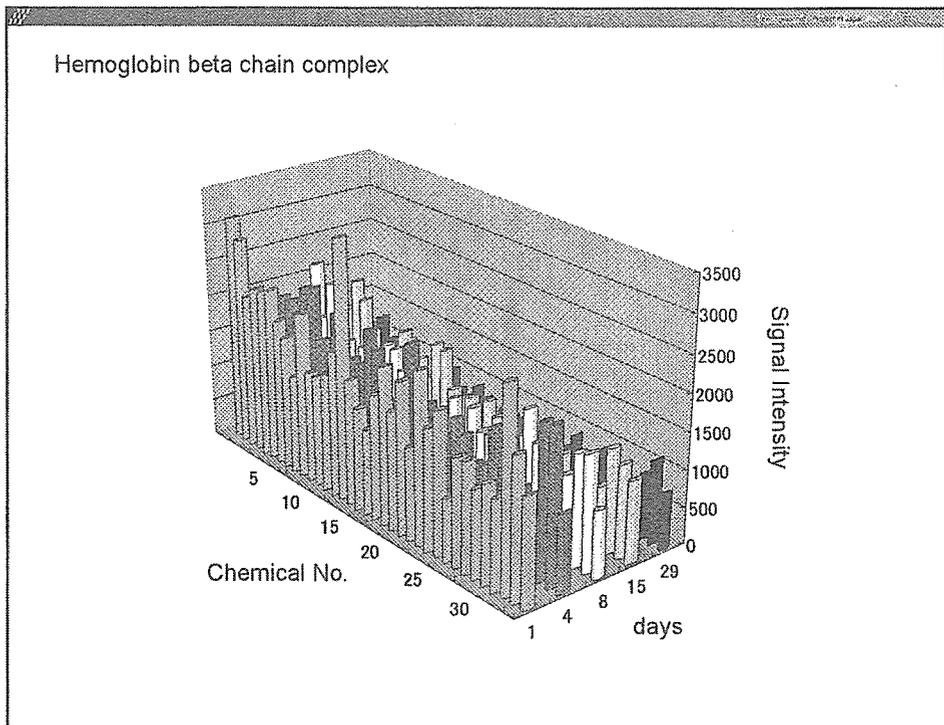
Time 12 15 18 9

9:00~11:00 a.m.



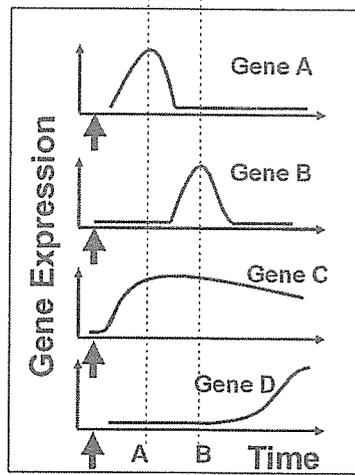
Steroid delta-isomerase 3



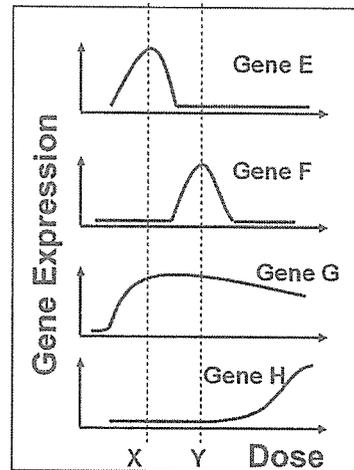


時点・用量水準の少ないプロトコルでは、変化を見逃す確率が高い

発現変動の時間依存性

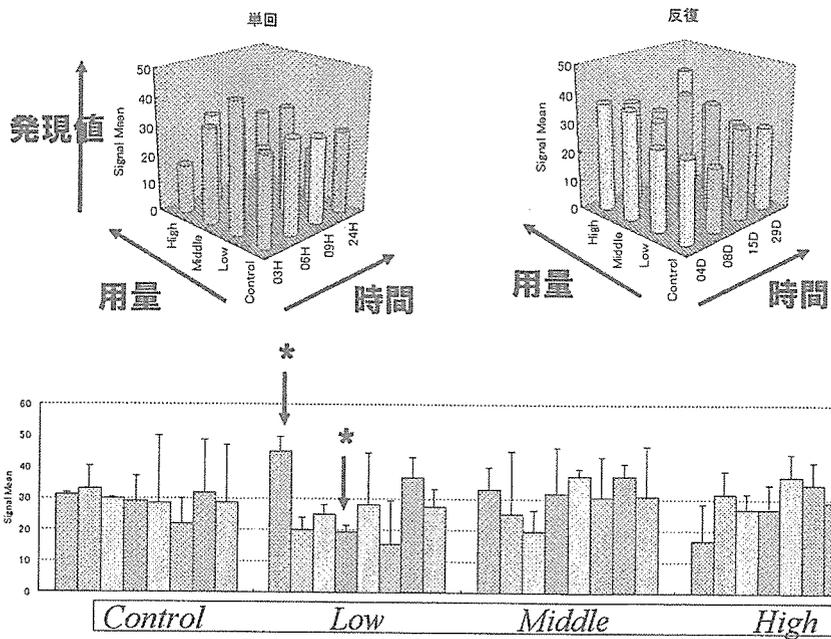


発現変動の用量依存性



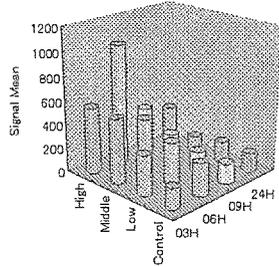
Drug

1393856x

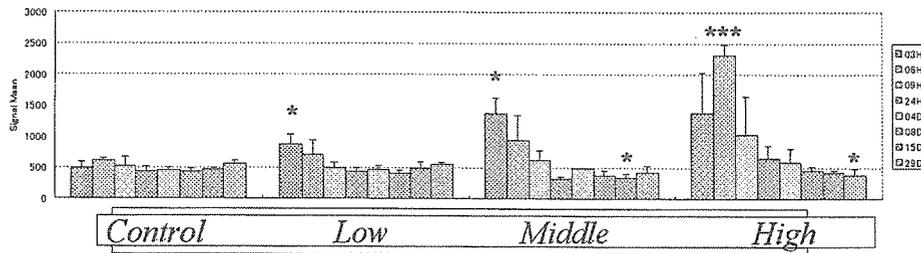
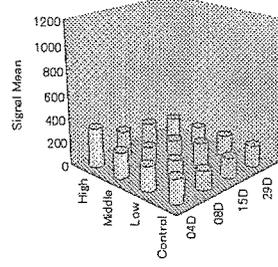


ヘムオキシゲナーゼ1

単回

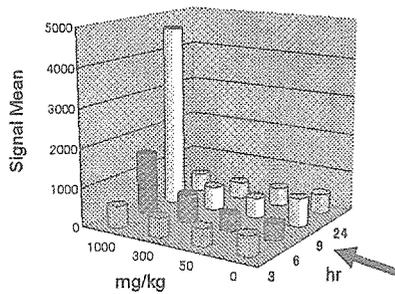


反復

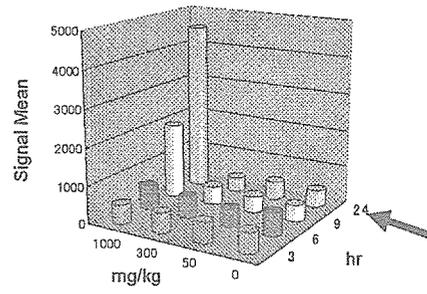


アセトアミノフェンのHeme oxygenase-1誘導における週令差

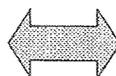
6 week



12 week



Hmox-1は細胞ストレスの
バイオマーカーとなるか？



ピークとなる時間が異なる
閾値が存在する

J. Tox. Sci. 31:491-508, 2006

網羅的遺伝子解析の問題点

例数に比べデータ数が膨大である

→統計手法の適用が困難

有効な“フィルタリング”の必要性

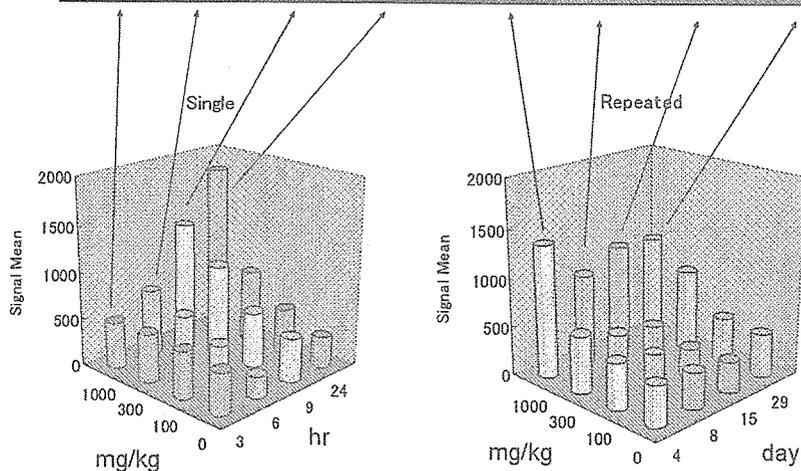
予め対象を絞り込めるか？ ⇔ 何が起こるかわからない
毒性を予測

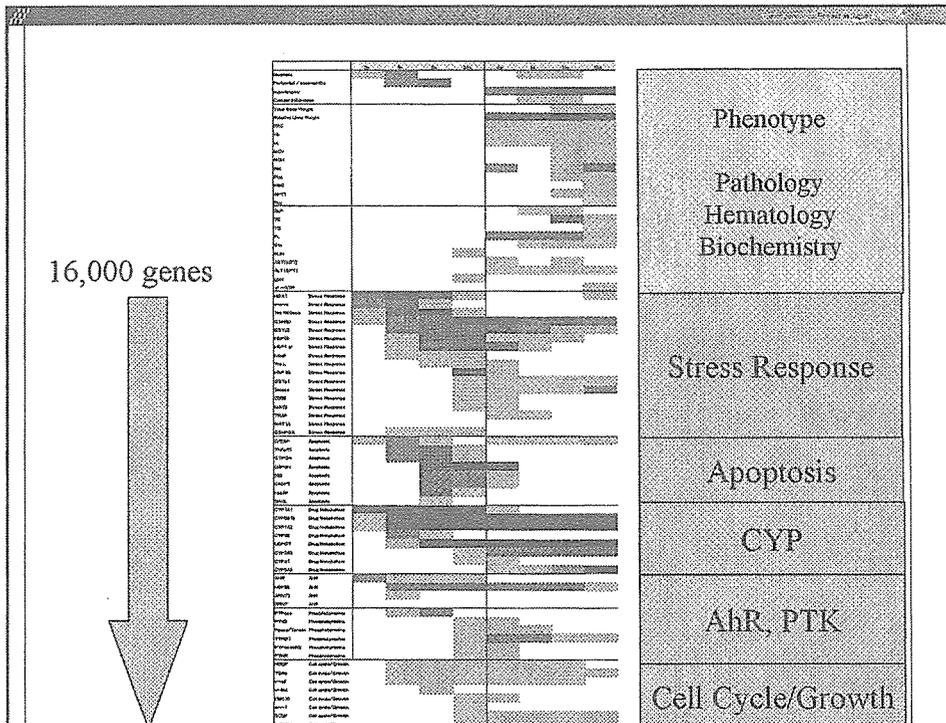
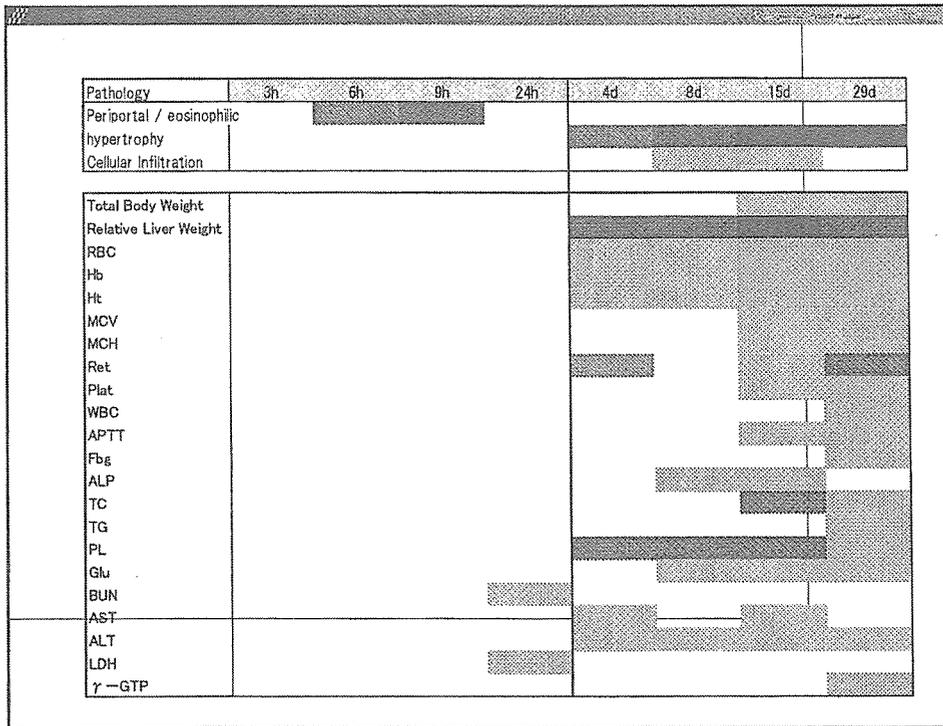
毒性メカニズムが殆ど不明な現状では絞り込むべきでない
cf. battery

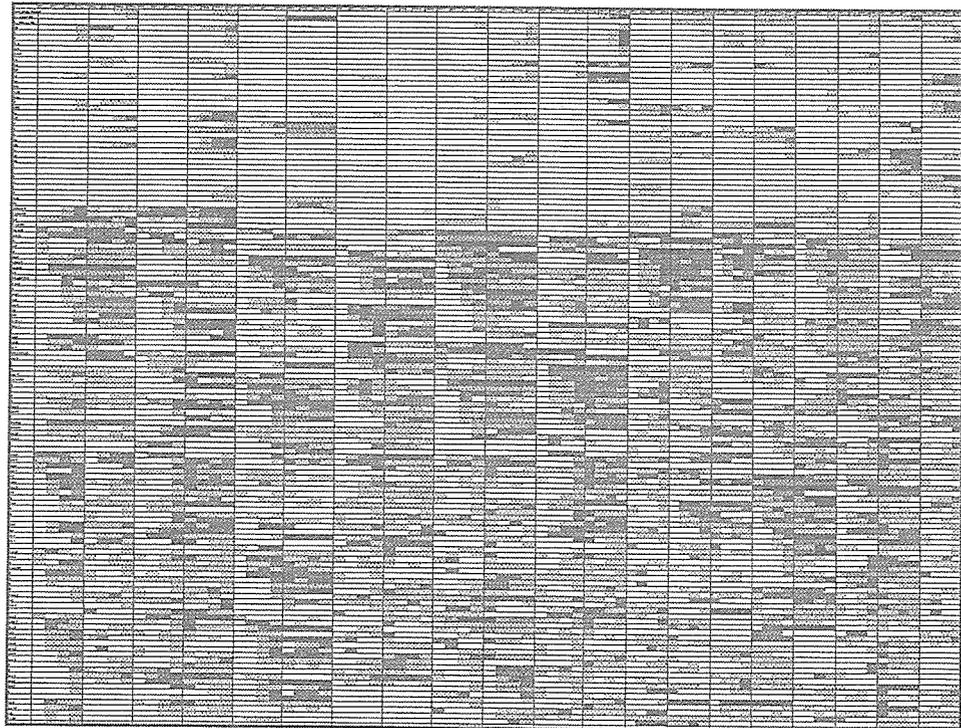
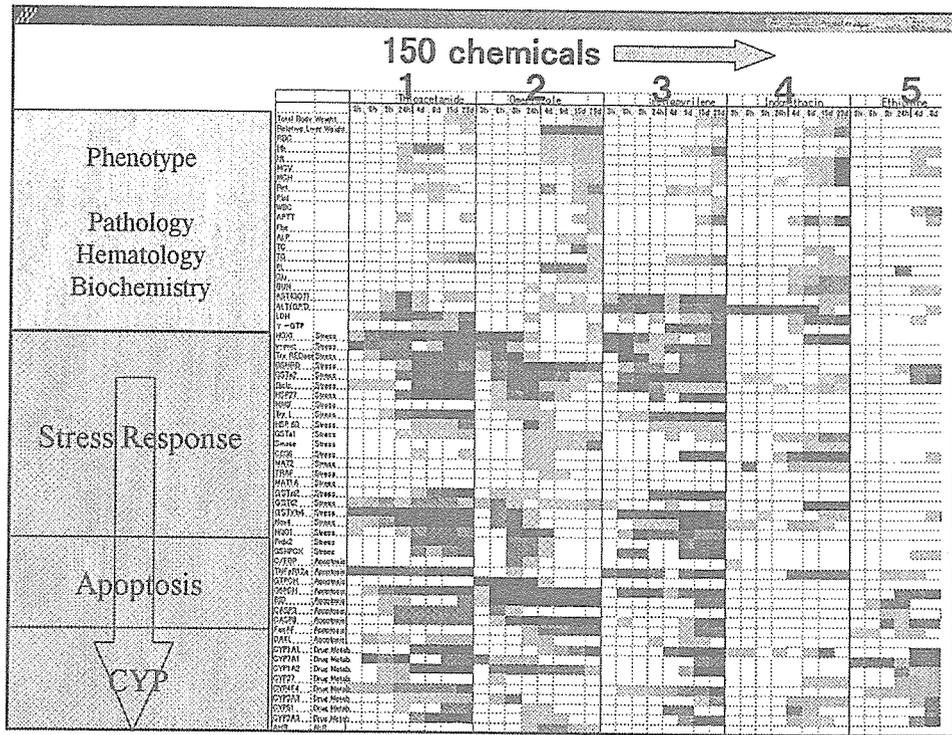
→それぞれについて研究者が試行錯誤する必要がある

glutathione reductase

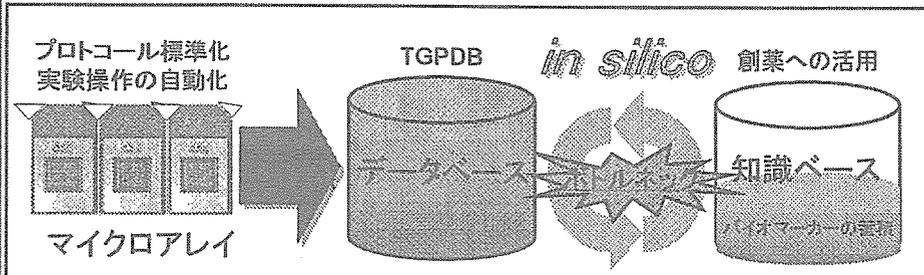
3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d
----	----	----	-----	----	----	-----	-----







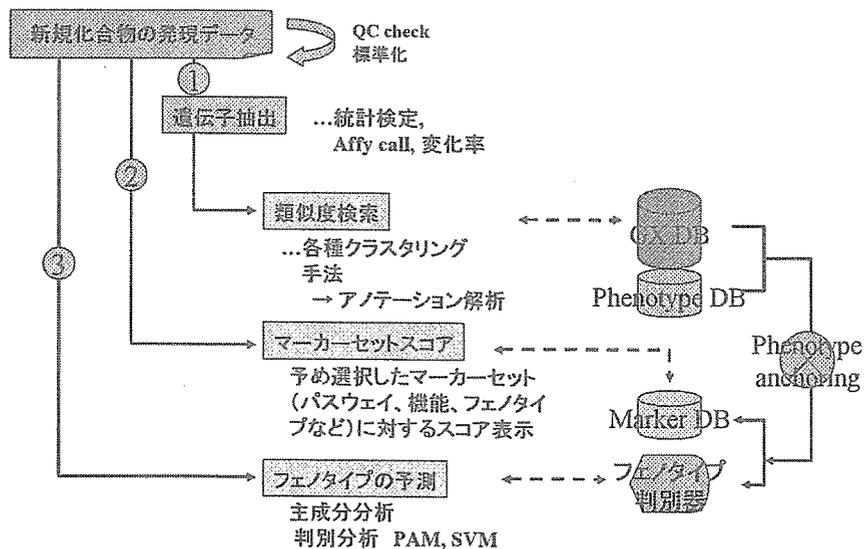
トキシコゲノミクス研究のボトルネック

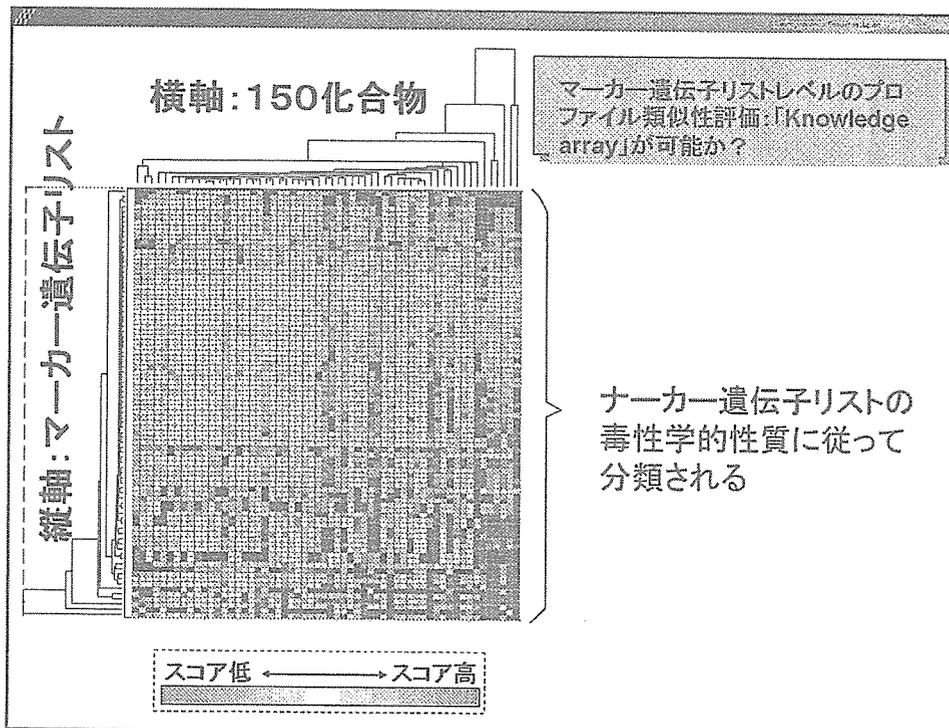
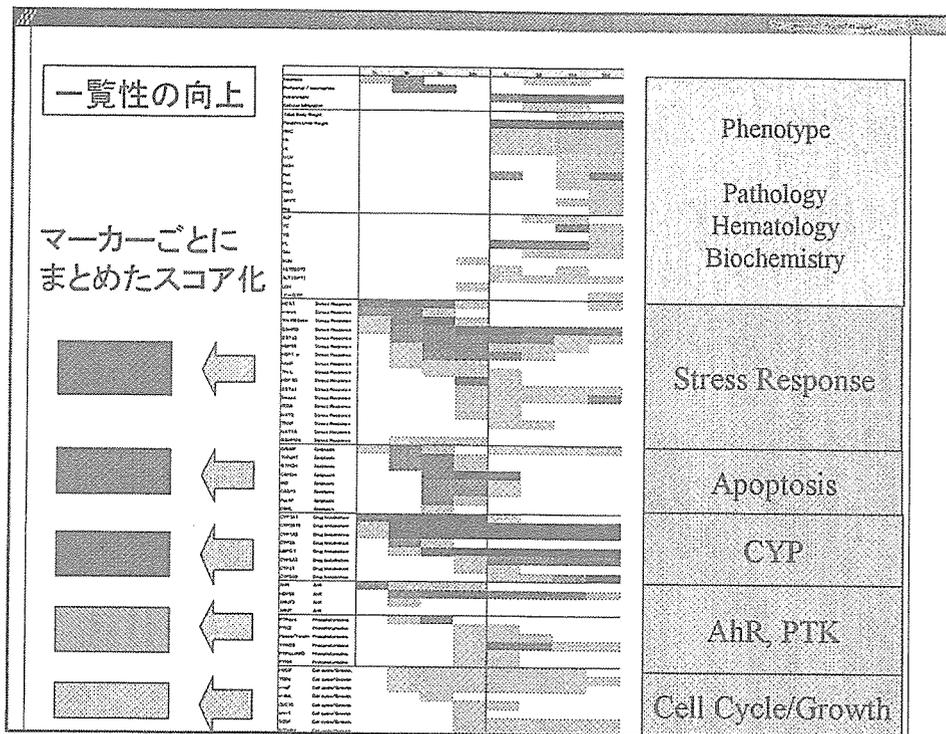


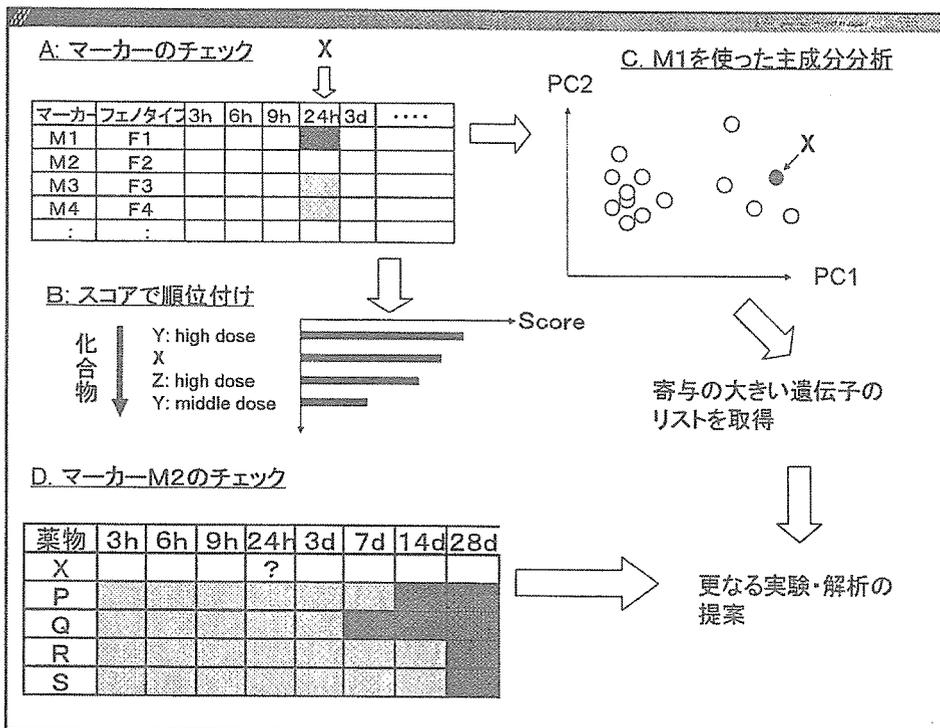
マイクロアレイ技術の発達により、網羅的遺伝子発現データ取得のスループットは劇的に向上した一方で、データベースからの知識探索・活用は自動化できないためにスループットは低い

TGP大規模DBの資源を有効活用するため、知識(バイオマーカー遺伝子セット)を効率的に探索・活用するためのツール作成→TG-GATEs

TG-GATEsを用いた新規開発化合物の解析・安全性予測



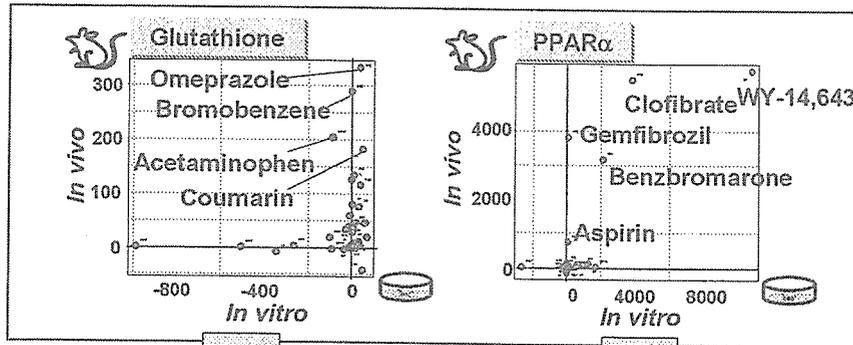




プロジェクトの特徴

- 1) 定量性に優れたAffymetrix 社GeneChipを採用。DNA量に基づいたSpike RNAを添加して細胞1個あたりのmRNA量を評価する手法も採用
- 2) 全被検化合物 150は標準的医薬品が中心であり、臨床で副作用が明らかとなり開発・市販中止となった薬物や、企業提供の独自化合物を多く含む
- 3) 十分な用量・時間設定のもとに得られた各種毒性学的データのフルセットを、遺伝子発現データとリンクさせ、かつ関連情報と有機的に結びつけ、統合データベースとして構築する
- 4) 種差のブリッジングを考慮している

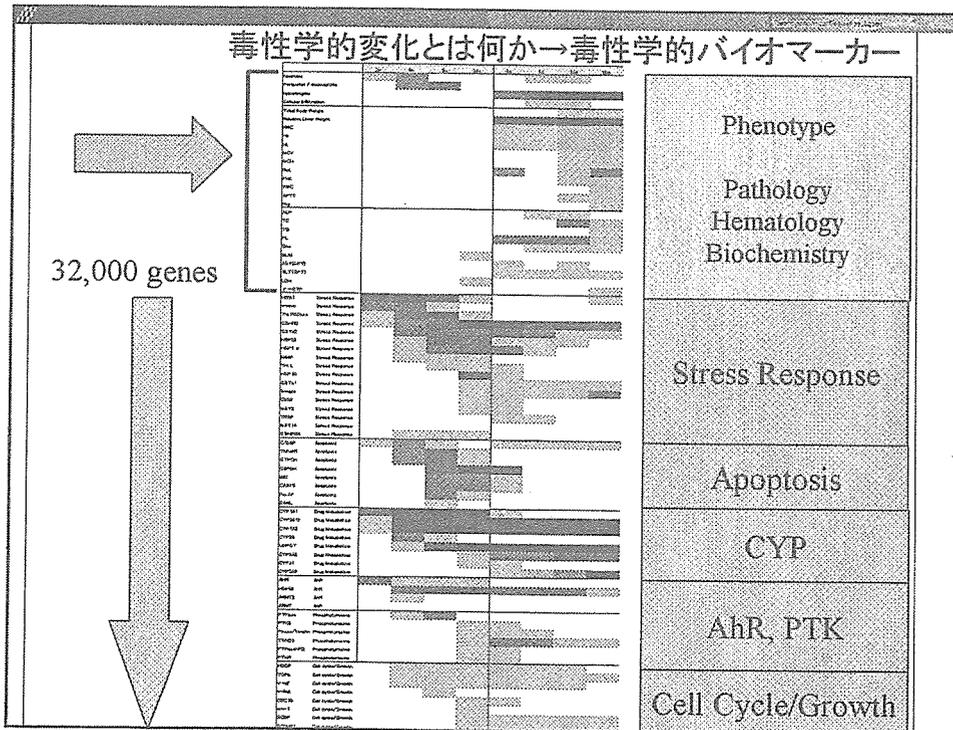
バイオマーカー遺伝子リストを活用した化合物評価 —種差の解析—



グルタチオン欠乏評価マーカー
*in vivo*と*in vitro*の相関低

PPARα 制御下遺伝子セット
*in vivo*と*in vitro*の相関高

毒性学的変化とは何か→毒性学的バイオマーカー



* NOEL とNOAEL: 医薬品のNOELは無意味

課題

トランスクリプトームに対応した新しい毒性病理学

マーカー遺伝子リストから真のバイオマーカーへ

種差の壁の克服

➡ 毒性メカニズムの解析が必須・急務

トランスクリプトームで毒性の予測
は可能か？

- ラットにおいて、単回投与のデータから長期連投のフェノタイプを予測すること
→TG-GATEsにより格段の進歩
- ラットのデータからヒトの毒性を予測すること
→新規戦略が必要？



TGPの概要

トキシコゲノミクスプロジェクト
宮城島 利一

平成19年 2月13日(火)



なぜ

トキシコゲノミクス？

トキシコロジー

毒性学

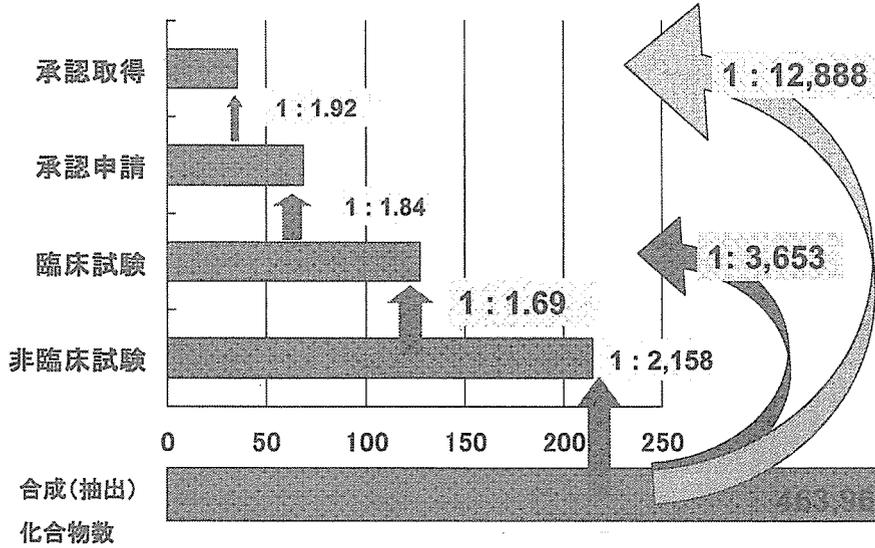
ゲノム

遺伝的情報

オミクス

包括的手段

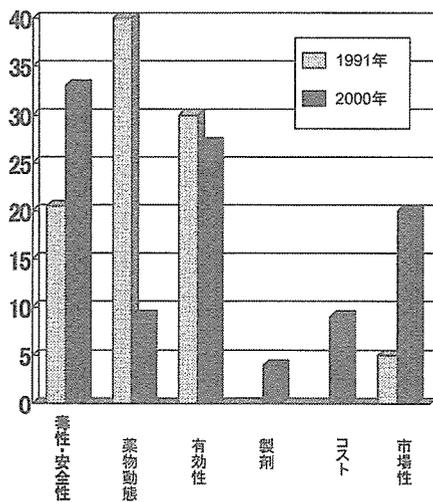
開発段階別化合物数と承認取得数



日本製薬工業協会：2000～2004

開発候補化合物の開発中止理由

Nature Rev.Drug Discov.2,566-580(2003)を修正



肝毒性のため市場から撤退した医薬品

年	医薬品名	薬効
2000	Troglitazone	糖尿病
1999	Trovaflaxacin	キノロン系抗菌剤
1998	Bromfenac	解熱鎮痛剤
1996	Chlormezanone	抗不安剤
1993	Moxisylyte	αブロッカー
1985	Perhexilene	狭心症
1983	Zimeldine	抗うつ剤
1982	Benoxaprofen	解熱鎮痛剤
1979	Ticrynafen	利尿剤
1974	Nialamide	抗うつ剤