

## 遺伝子発現解析の目的と方法

### プロファイリング

ある化合物の作用を解析



ひとつの実験セット内での抽出  
変動遺伝子の抽出  
アノテーションアナリシス

### メカニズム解析

ある作用を有する化合物群  
で共通に変動する遺伝子  
(共通変動遺伝子)



化合物ごとに解析  
?) 1群3例での統計検定  
化合物横断的な解析  
?) 実験セット間のばらつき

### 作用予測

ある作用を有する化合物群  
に特異的に変動する遺伝子  
(特異的変動遺伝子)



共通性と特異性

バイオマーカー

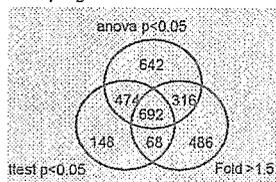
## 統計検定とアノテーションアナリシス

### TGP Exp.0040

Chem.: acetaminophen  
Rat: Crj: CD(SD)  
CRO: FDSC  
Dose: 0, 300, 600, 1000 mg/kg  
Time: 24h after dosing  
Array: Affymetrix RAE230A

Global mean normalize  
All absent を除外  
/ 10525 probeset

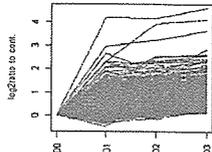
- up regulated



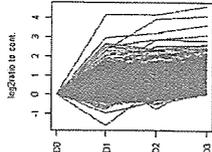
アノテーション解析

DAVID Bioinformatic Resources 2006  
<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>

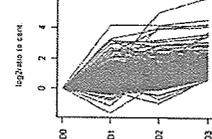
### ttest p<0.05 - 1382 probeset



### Anova p<0.05 - 2124 probeset



### Fold change > 1.5 - 1562 probeset



ttest p<0.05

KEGG PATHWAY	Count	%	PValue
RIBOSOME	27	1.68%	0.0000
BASAL TRANSCRIPTION FACTORS	4	0.26%	0.0039
AMINOACYL-TRNA SYNTHETASES	5	0.32%	0.0204
PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSION	6	0.45%	0.0035
PORPHYRIN AND CHLOROPHYLL METABOLISM	7	0.51%	0.0034
GLUTATHIONE METABOLISM	8	0.65%	0.0131
GLUTAMATE METABOLISM	7	0.51%	0.0187
METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME	10	0.72%	0.0022
STARCH AND SUCROSE METABOLISM	7	0.51%	0.0283

anova p<0.05

KEGG PATHWAY	Count	%	PValue
RIBOSOME	34	0.016	4.6E-13
LONG-TERM POTENTIATION	24	0.013	0.0002
TIGHT JUNCTION	25	0.018	0.0000
PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSION	7	0.0032	0.0039
BASAL TRANSCRIPTION FACTORS	5	0.0024	0.0188
AMINOACYL-TRNA SYNTHETASES	5	0.0024	0.0259
PORPHYRIN AND CHLOROPHYLL METABOLISM	9	0.0043	0.0032
FC EPSILON RI SIGNALING PATHWAY	19	0.009	0.0159
GLUTATHIONE METABOLISM	11	0.0052	0.0002
METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME	12	0.0056	0.0012
GLYCOSPHINGOLIPID METABOLISM	8	0.0038	0.0014
GLUTAMATE METABOLISM	8	0.0038	0.0014
LONG-TERM DEPRESSION	20	0.0094	0.0012
PROTEASOME	9	0.0042	0.0042
STARCH AND SUCROSE METABOLISM	9	0.0042	0.0042

fold change > 1.5

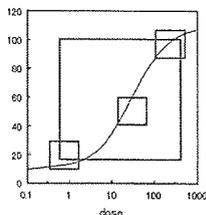
KEGG PATHWAY	Count	%	PValue
CELL CYCLE	19	0.0122	0.0014
GLUTATHIONE METABOLISM	10	0.0064	0.0007
GLUTAMATE METABOLISM	8	0.0051	0.0008
BASAL TRANSCRIPTION FACTORS	5	0.0032	0.0039
PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSION	5	0.0032	0.0014
METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME	11	0.007	0.0019
LONG-TERM POTENTIATION	14	0.009	0.0452
PORPHYRIN AND CHLOROPHYLL METABOLISM	9	0.0058	0.0040
BIOSYNTHESIS OF STEROIDS	5	0.0032	0.0055
LONG-TERM DEPRESSION	15	0.0096	0.0002

## 投与量依存性の検討

用量-反応性の評価

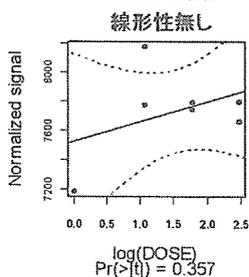
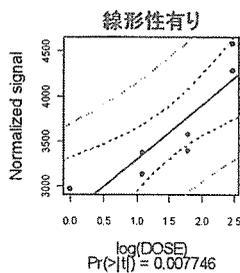


投与量に依存して  
一方方向性の変化を  
示すかどうか



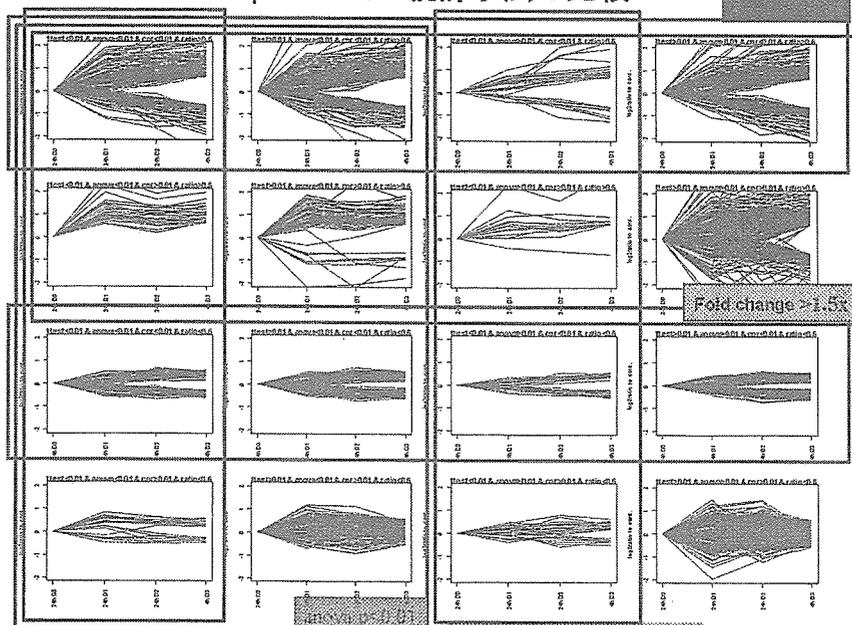
多くの生物反応は、シグモイド  
曲線に回帰する  
↓  
遺伝子発現も従うと仮定

GLM(General Linear Model) による線形性の評価

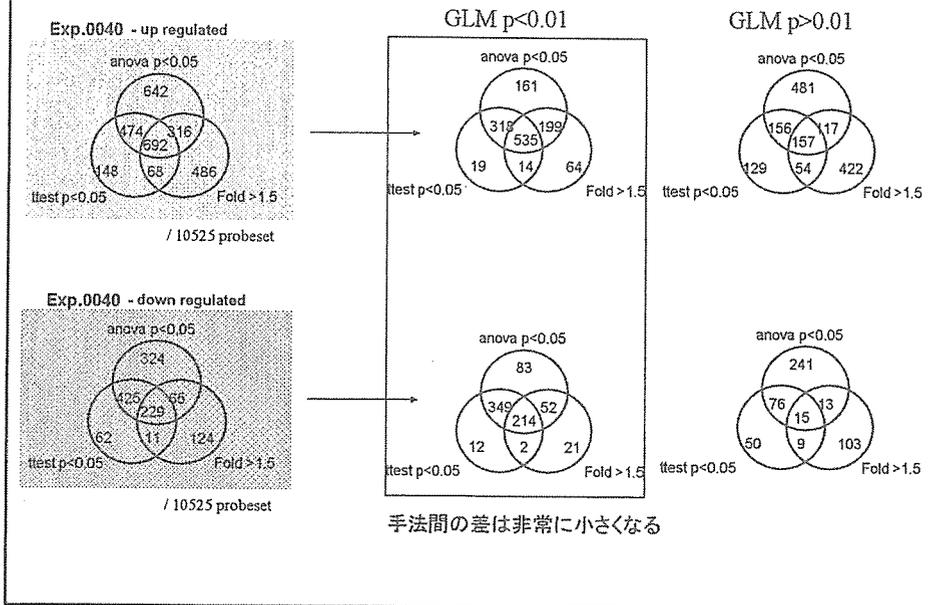


— Regression line ( $y = \text{delta} \cdot x$ )  
- - - 95% confidence interval for delta  
- - - 95% confidence interval for y  
● Observed signal

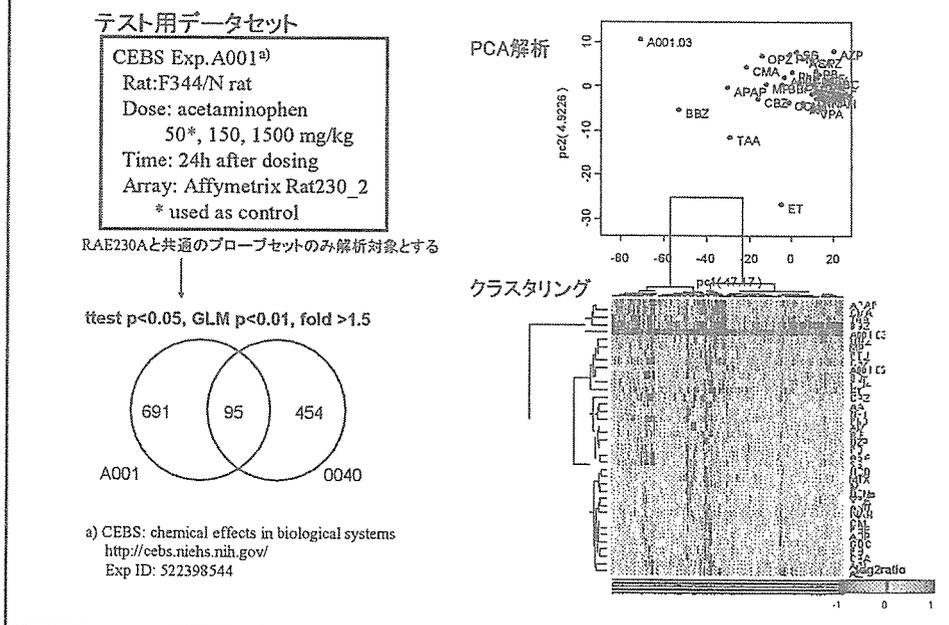
## Exp.0040での統計手法の比較



## 投与量依存性による絞込み



## 化合物類似性の評価は出来るのか？



## 遺伝子抽出を必要としないアノテーション解析

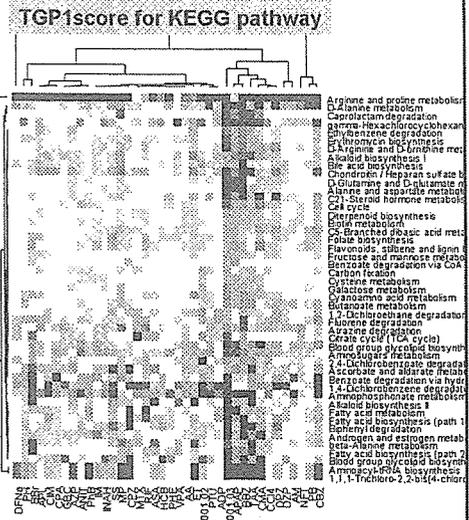
TGP1scoreによる遺伝子セット全体の  
変動をスコア化

- 統計検定などの遺伝子抽出を  
必要としない
- スコアは定量的

$$\text{TGP1score} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Index 1}_i \times \text{Index 2}_i}{\text{Number of genes}}$$

TGP score 1 \* (Index 1) X (Index 2)

Kiyosawa N, et al.  
*J Toxicol Sci.* 2006 Dec;31(5):433-48

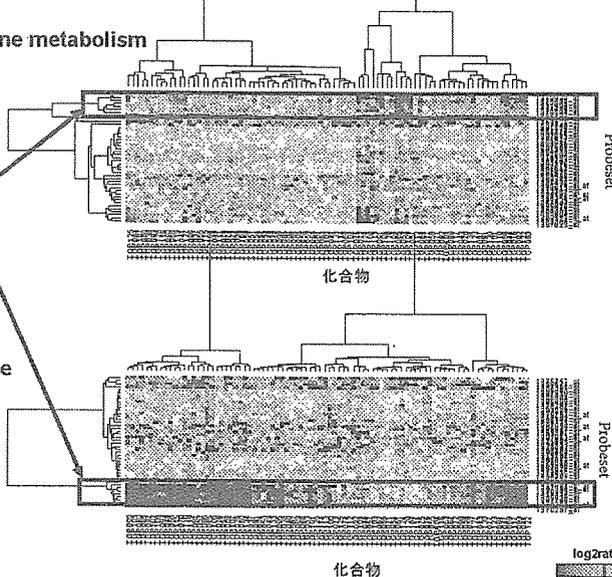


## 既存のpathway情報はバイオマーカーとして使えるか？

KEGG: Glutathione metabolism

バイオマーカーとして使えそうだが、  
生体における変化との  
関連は？

KEGG: Cell cycle



## 遺伝子についての情報

Probeset on RAT230\_2.0 genechip

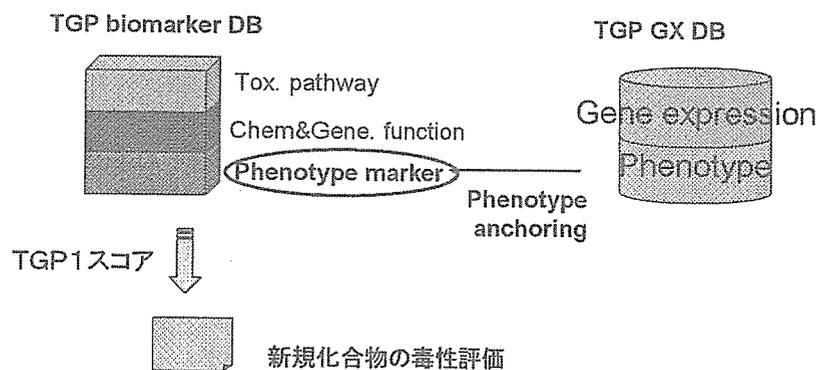
	+	-
Total No.of probeset on RAT230_2	31054	-
Gene name	21944	9110
unique UNIGENE ID	19015	3268
LocusLink ID	13687	9359
RGD ID	13314	9877
Annotations		
GO annotation	15672	
KEGG annotation	764	
GENE MAPP	1616	
probeset with no knowledge		15368

The GO, Kegg etc. is constructed to be a universal categorization of genes and gene products across species and states. Unique cellular functions and processes associated with the toxic response is not included.



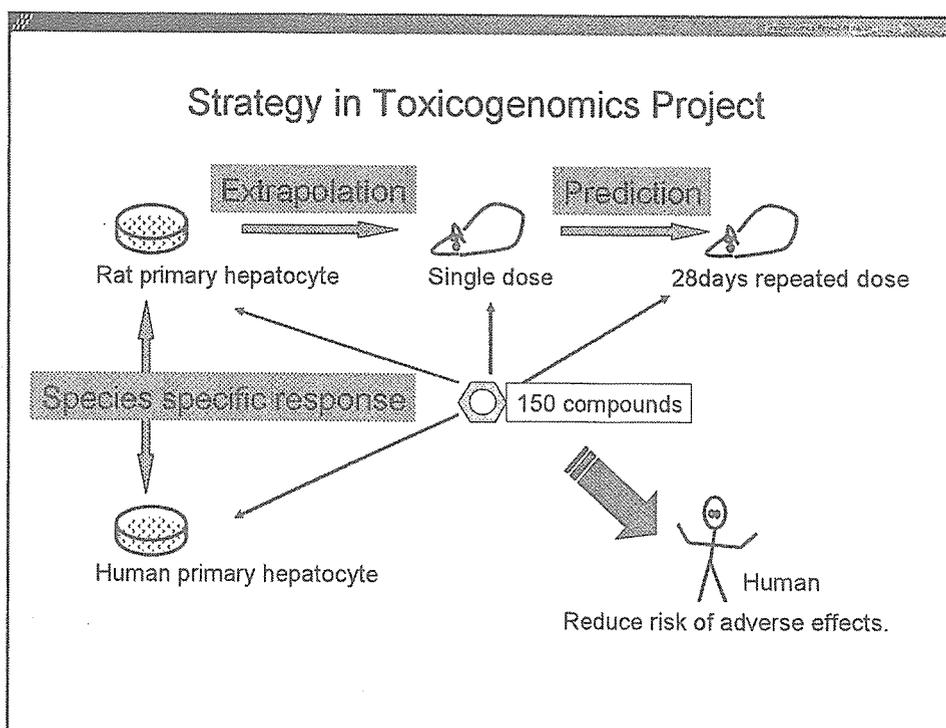
毒性変化との関連については、ほとんど不明

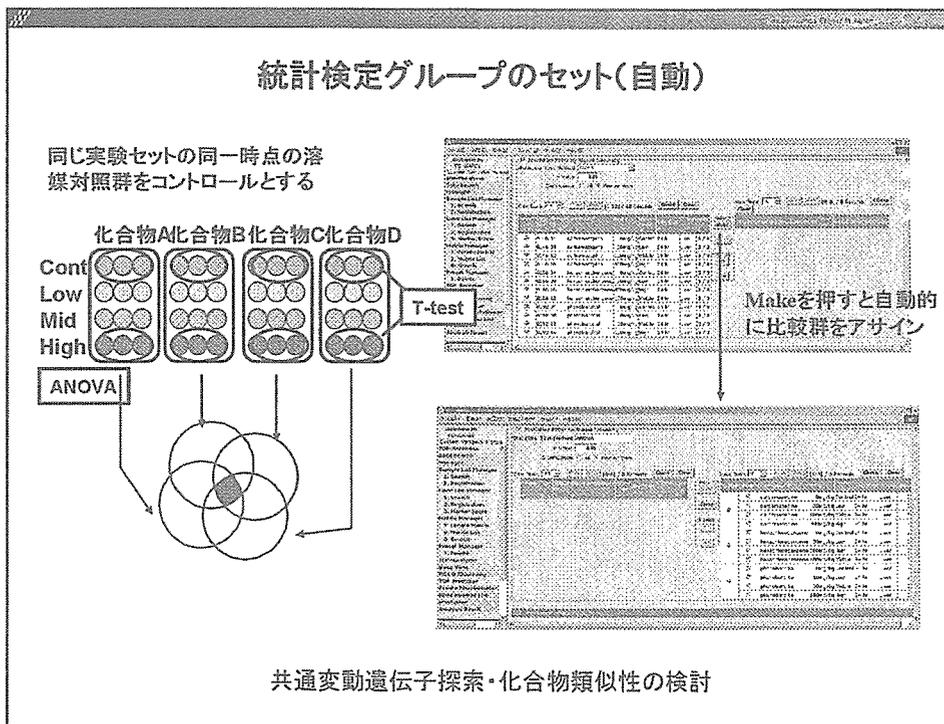
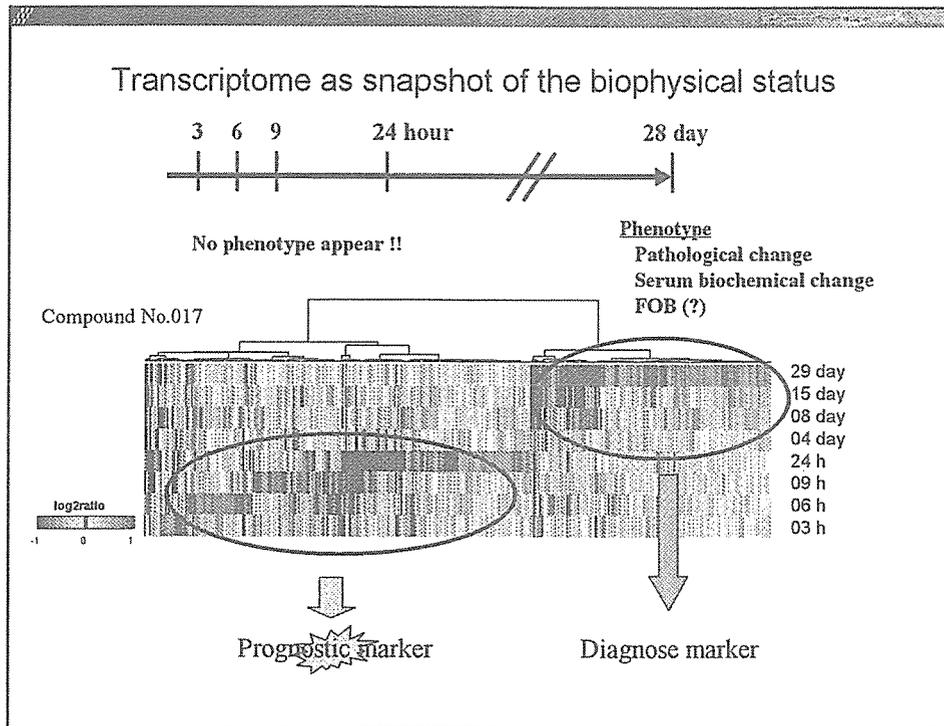
## 毒性バイオマーカーの必要性



TGxによる毒性予測・評価の精度・感度が向上には、フェノタイプを判別できる種々の毒性バイオマーカーの蓄積が必要

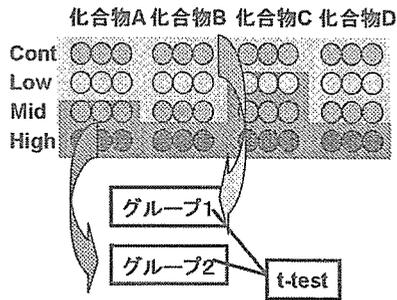
## TG-GATEによるバイオマーカーの抽出 共通変動遺伝子の抽出



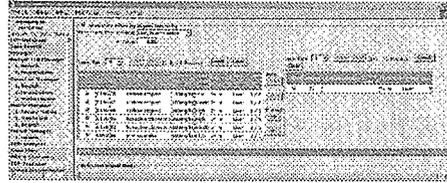


## 統計検定グループのセット(手動)

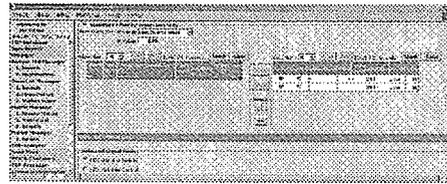
特定のフェノタイプの有無により化合物横断的にアサイン



### グループ1のアサイン



### グループ2のアサイン



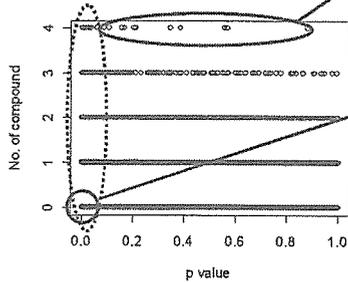
フェノタイプに関連するバイオマーカー探索

## 重要な変化の見落とし

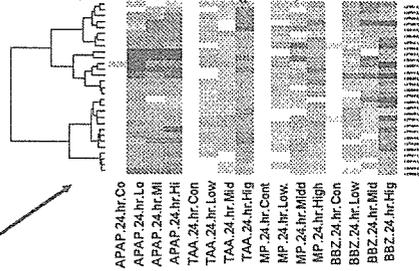
例  
酸化ストレス性肝障害物質  
acetaminophen  
thioacetamide  
methapyrilene  
bromobenzene

単回投与後24時間

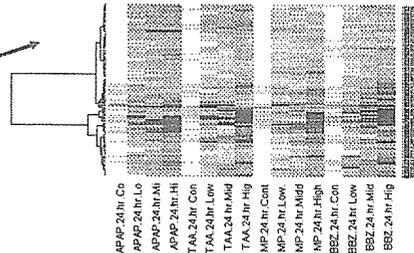
化合物別にANOVA  $p < 0.05$ の化合物数と全体でt検定を行った場合のp値の比較



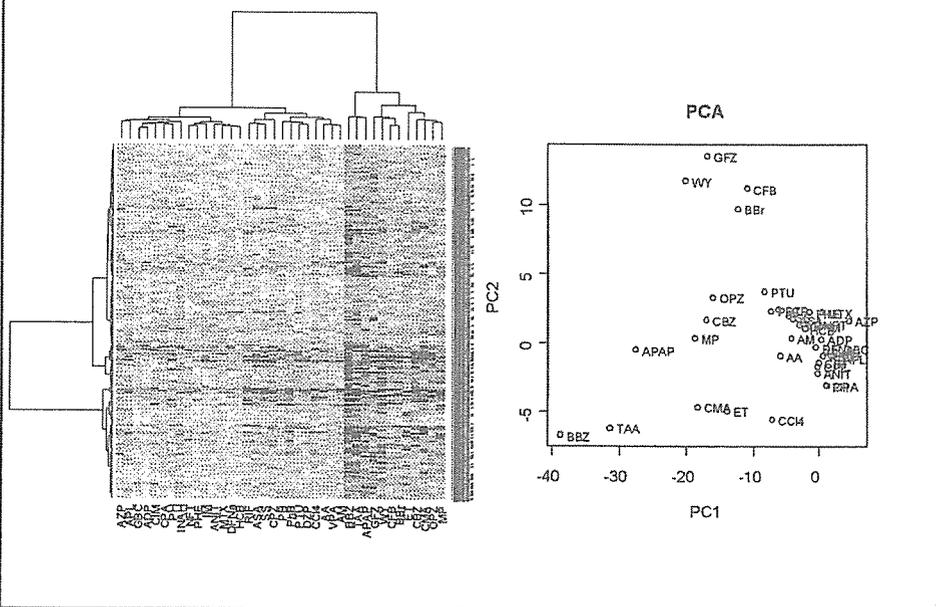
個別解析では4化合物で有意になるが、全体では有意ではない( $p < 0.01$ )



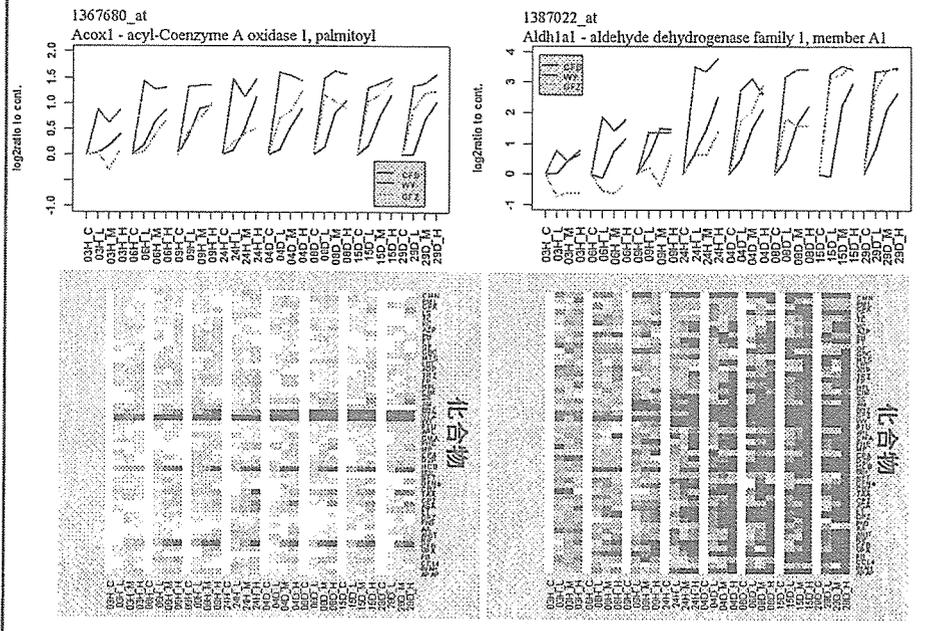
個別解析で1化合物も有意にならないが、全体では有意( $p < 0.01$ )



### 共通変動遺伝子を用いた化合物評価

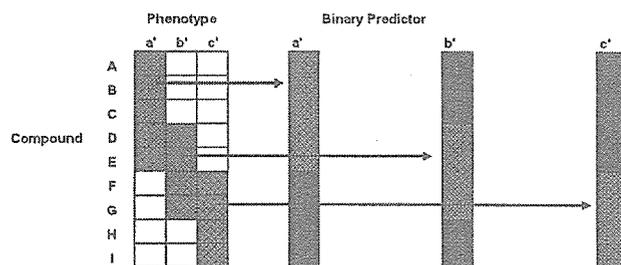
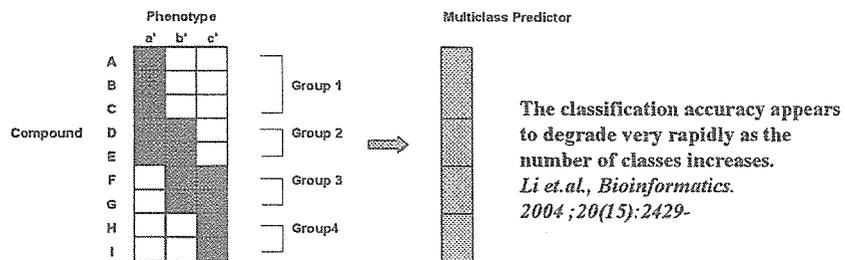


### 共通変動遺伝子と特異的変動遺伝子



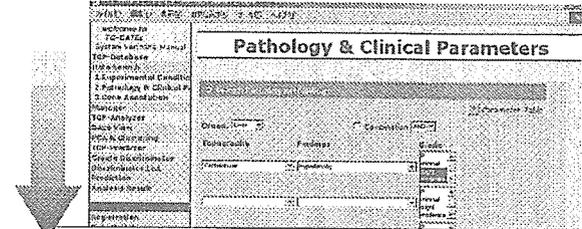
## 特異的変動遺伝子の選択と予測モデルの構築

### 判別分析の進め方



## 特異的遺伝子の抽出と判別モデルの構築

フェノタイプによるサンプル抽出



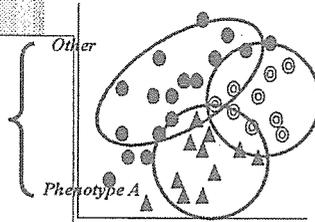
Phenotype A群とOtherで発現の異なる遺伝子を抽出

Correlation based gene selection  
t-stat base (unmodified or FDR correction)

判別に有用な遺伝子の絞込み

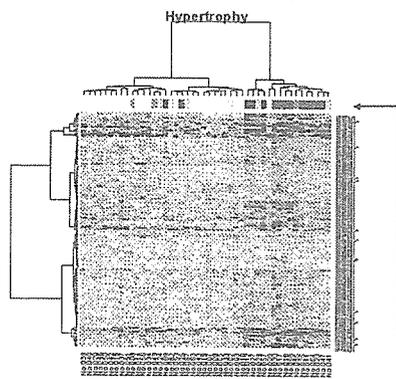
Nearest Shrunken Centroids (NSC)

判別機を作成



## 反復投与により Hypertrophy を惹起するサンプルの 単回24時間時点での特異的遺伝子抽出

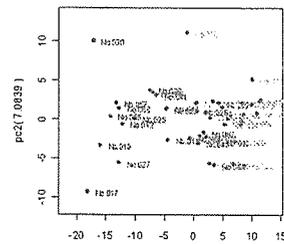
Gene expression at 24h high dose



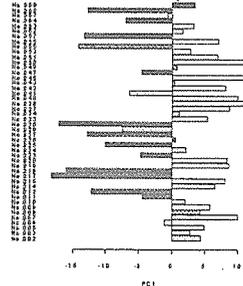
Compounds

Hypertrophy の強さ

PCA

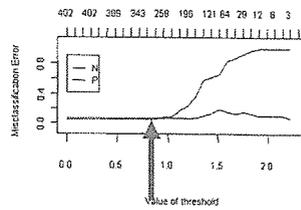


PC1 score of compounds



## Nearest Shrunken Centroids (NSC) による遺伝子の絞込み

遺伝子絞込みによるPAM判別エラーの推移



最大の判別率になる遺伝子数に絞込み

判別機の作成

SVM : Support vector machine

PAM : Prediction analysis of microarrays

LDA: linear discriminant analysis

MLDA : Maximum likelihood discriminant analysis

    DQDA : diagonal quadratic discriminant analysis

    DLDA : diagonal linear discriminant analysis

KNN : K-nearest neighbor

クロスバリデーションによる検証

## 判別機のトレーニングとテスト

トレーニング(55化合物)

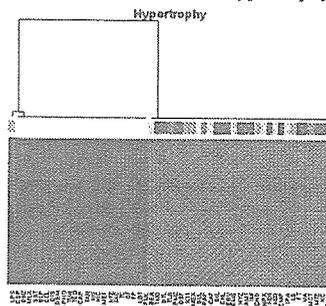
Rat230\_2.0

24h high dose データによるhypertrophy判別モデル

テスト(21化合物)

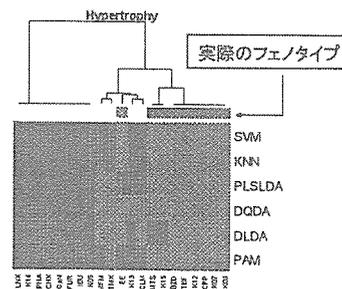
Rat230\_2.0

24h high dose データによるテスト



55化合物

別のサンプル  
によるテスト



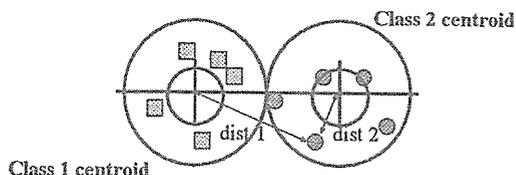
21化合物

	Cross Validation	Training	Test	Total
SVM	0.020	0.000	0.000	0.000
KNN	0.143	0.000	0.000	0.000
PLSLDA	-	0.000	0.143	0.066
DQDA	-	0.018	0.190	0.079
DLDA	-	0.018	0.238	0.092
PAM	0.055	0.018	0.095	0.053

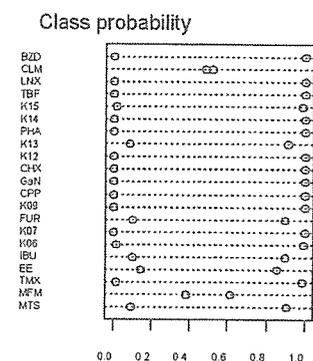
■ Positive  
■ Negative

## 2クラス分類におけるPAMIによる定量的判定

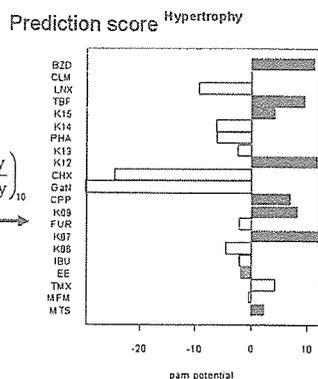
Nearest Centroid model



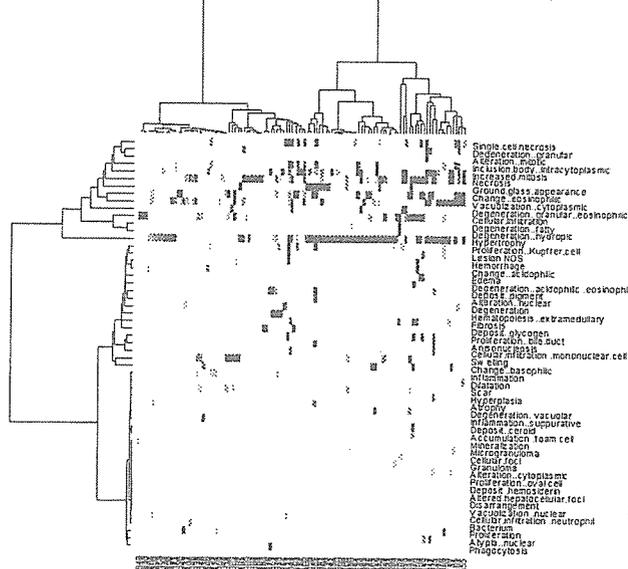
各クラスの中心からの距離を各クラスへの所属確率(class probability)として得る



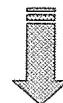
$$\text{Prediction score} = \log \left( \frac{\text{positive probability}}{\text{negative probability}} \right)_{10}$$



## 病理変化の発現状況 (75化合物)



メジャーなフェノタイプは限られている



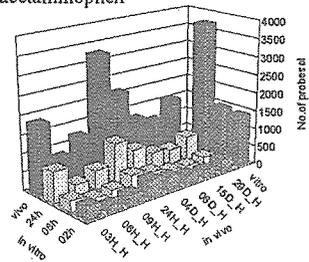
病理変化との関連だけでは、抽出できるバイオマーカーも限られる

いかに化合物を分類するかが重要

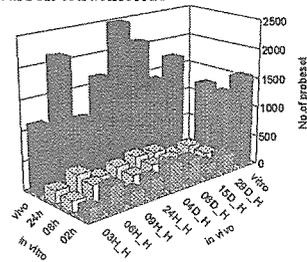
## *in vitro* データの利用

### Probeset > 1.5 fold up regulated *in vivo* & *in vitro*

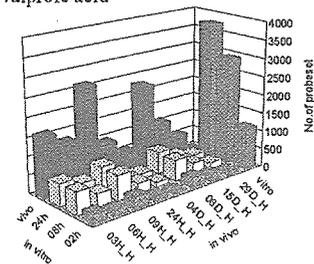
acetaminophen



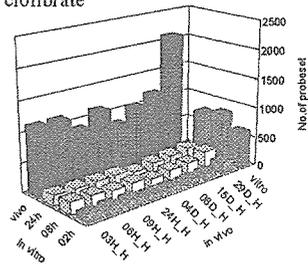
carbon tetrachloride



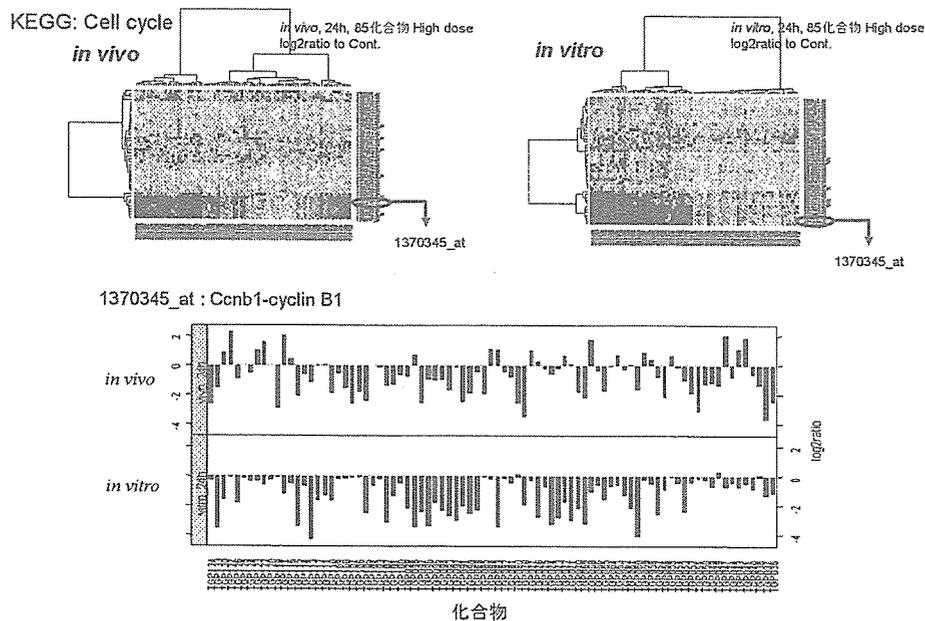
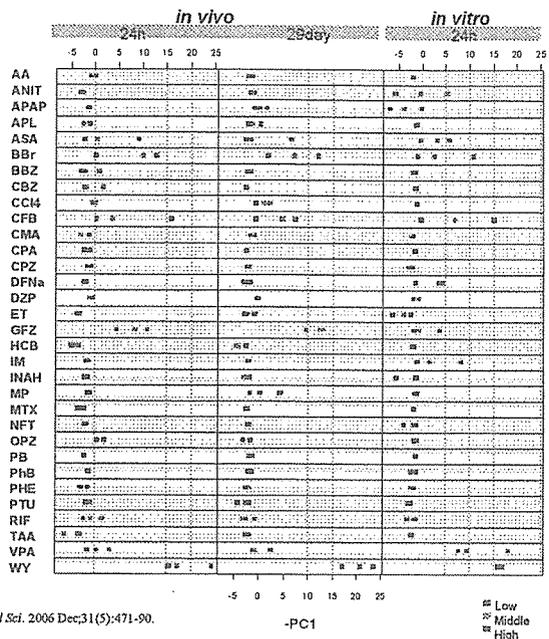
valproic acid

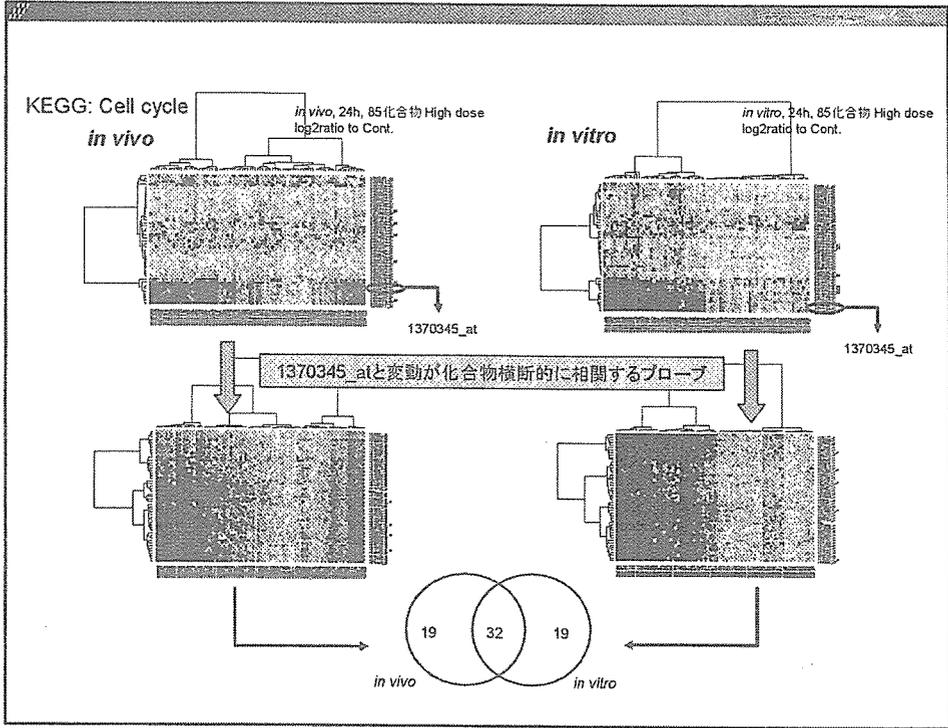


clofibrate



# Prediction of PPARalpha action from *in vitro* to *in vivo*

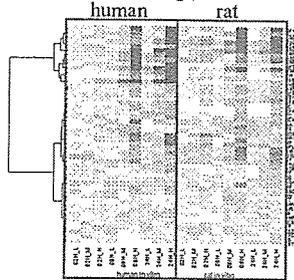




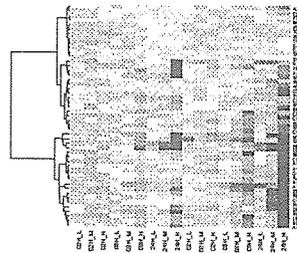
*in vitro* ヒト-ラット間の比較

ortholog genes shown similar change in Human&Rat

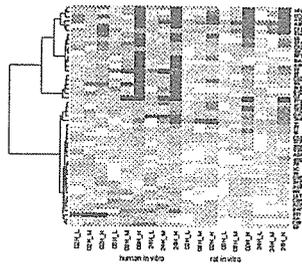
SLC20A1:solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1  
(human:201920\_at , rat:1370314\_at)



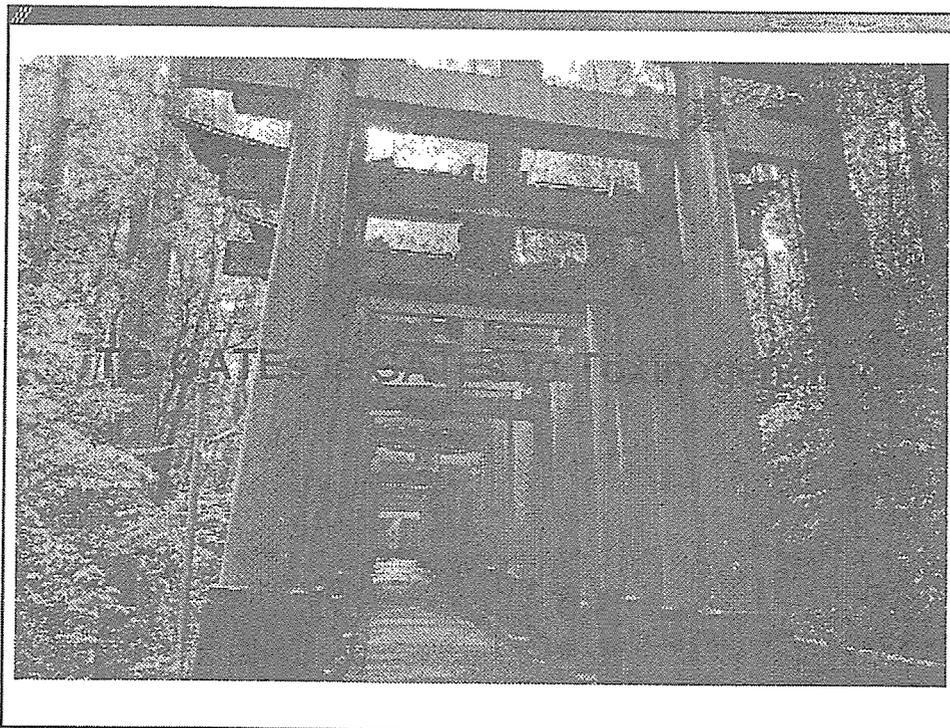
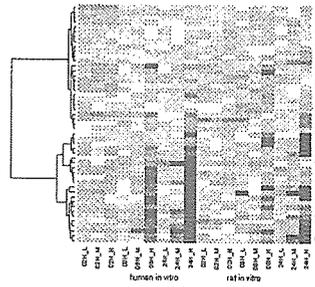
SULT1A1:sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1  
(human: 215299\_x\_at ,rat:1370019\_at)



PPP1R15A:protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A  
(human:202014\_at ,rat:1370174\_at)



TYMS:thymidylate synthetase  
(human:202589\_at ,rat:1373942\_at)



#### 別添 4

厚生労働省科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

#### 分担研究報告書

薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究

分担研究者 中山裕之 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

#### 研究要旨

妊娠期および泌乳期のラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。妊娠後期および泌乳期において Phase I と Phase II の薬物代謝酵素遺伝子の一部、および核内受容体遺伝子の発現が未経産ラットに比べて減少した。これらの結果は real-time PCR 法によって確認された。

ブタ血清投与ラットの肝線維化病変では MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス/細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現増加が認められた。肝線維化病態発現には胸腺および脾臓がケモカインの産生を通して密接に関与していることが示された。

#### A. 研究目的

妊娠および授乳が肝臓の CYP 総含有量および薬物代謝酵素活性の減少に関係することが知られているが、各々の CYP アイソザイムの発現詳細については少数の報告があるのみである。また、ブタ血清をラットの腹腔内に反復投与すると、肝炎や肝線維化が起こることが知られているが、その病態の発現機構、特に分子生物学的機構についてはほとんど知られていない。本研究では妊娠と授乳による CYP アイソザイムの発現を調べ、さらにブタ血清投与肝線維症における分子病態を解析した。

#### B. 研究方法/C. 研究結果/D. 考察

##### 1. 妊娠期および泌乳期のラット肝臓における遺伝子発現プロファイルの変化

正常な妊娠および授乳が肝臓の CYP 総含有量および薬物代謝酵素活性の減少に関係することが知られている。しかし、妊娠および哺乳時の各々の CYP アイソザイム発現詳細については少数の報告があるのみである。本研究では、western blot 解析および免疫組織学的検索を用いて、ラットの妊娠中期、妊娠末期および哺乳期における肝臓 CYP 蛋白の発現変化を探索した。解析には CYP の各アイソザイム

対する九つの抗体を用いました(CYP1A1、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2C12、CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1、CYP3A1 およびCYP4A1)。同週齢、未妊娠のF344ラットと比較して、妊娠中期(GD 13)におけるCYP2B2、CYP2C6とCYP4A1の発現量および妊娠末期(GD 19)における、CYP2B2、CYP2C6、CYP4A1、CYP1A1、CYP2B1、CYP2E1の発現量の著しい減少が見られたが、分娩後の28日目(PPD 28)に、controlとの同じレベルに戻った。妊娠および哺乳期におけるCYP2C12、CYP2D1およびCYP3A1の発現変化は認められなかった。すべての肝臓サンプルにおいてCYP2D4は検出されなかった。免疫組織学的検索では、CYP1A1が類洞及び静脈内皮細胞で陽性と示した。一方、他のCYPは主に小葉中心の肝細胞で発現が見られた。cDNA microarray分析を用いて妊娠におけるラット肝臓中の遺伝子発現プロファイルの変化を探索したところ、およそ16,000の遺伝子のうち、妊娠中期における394(257 up, 137 down)および妊娠末期における1092(513 up and 579 down)遺伝子の発現の著しい変化が確認された。これらの変化はリアルタイムPCRの結果とも一致した。妊娠におけるラット肝臓中の遺伝子発現プロファイルは胎児と母親に対する化学物質の毒性発現機序を明らかにする基盤となると考えられる。

以上の研究により薬物投与ラットの肝臓における組織病変と遺伝子発現プロフ

ファイルの変化との関係が明らかになった。

## 2. ブタ血清誘発肝線維化モデルラットの病態解析

肝臓はエネルギー合成、代謝、解毒といった多様な機能を有する器官であり、肝障害、特に肝線維症および肝硬変は長期にわたり生体に重篤な影響を及ぼす。そのため、多くの実験動物モデルが作出され、利用されてきた。例えば、ラットを用いた実験モデルとしては、四塩化炭素、アルコールあるいはジメチルニトロソアミンの投与や胆管結紮による肝線維症が知られており、これらはいずれも肝細胞が傷害され、壊死した後に生じる壊死後性肝線維化を特徴としている。一方、異種血清をラットの腹腔内に反復投与することで、肝炎や肝線維化が起こることが知られており、中でもブタ血清はラットの肝線維化惹起物質として汎用されている。ラットを用いたブタ血清誘発肝線維化モデルは、上述した肝線維化モデルとは異なり、肝細胞の壊死を殆ど伴うことなく、線維化を誘導することから、肝線維症や肝硬変の治験モデルとして利用されているにもかかわらず、その病態の発現機構、特に分子生物学的機構についてはほとんど知られていない。

本研究では、この点を解明すべく、Brown Norway (BN) ラットおよびWistarラットを用い、まずブタ血清誘発ラット肝線維化モデルの初期病態について主に

病理組織学的検索を実施し、ついで病態発現初期における遺伝子発現解析と炎症および免疫細胞の関与について詳細な解析を行った。さらに、本モデルには免疫系の関与が示唆されたため、胸腺および脾臓の摘出術を実施し、肝線維化への影響を検討した。得られた結果は以下の通りである。

#### (1) 初期病態

6週齢雄のBNラットおよびWistarラットにブタ血清(PS)(0.5 ml / head)を週2回、腹腔内投与し、1, 2, 3, 4および8週間後に剖検し、肝臓について病理組織学的検索ならびに炎症細胞および細胞外基質に関する免疫組織化学的検索を実施した。さらに、MMP-1、MMP-8、TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3の変動をみるため、RT-PCR、Gel reverse zymographyおよび免疫組織化学的検索を実施した。また、血清については、ELISA法を用い、TIMP-1およびTIMP-2の発現を観察した。その結果、BNラットで投与2週間後から、およびWistarラットで投与4週間後から、それぞれ炎症細胞浸潤が観察され、BNラットで投与4週間後から、およびWistarラットで投与8週間後から、それぞれ肝線維化病変が確認された。炎症細胞の動態をみると、マクロファージ、リンパ球および好酸球が炎症初期から浸潤し、その後、活性化星細胞の増数および肥満細胞の浸潤がみられた。また、形成された線維中隔の構成要素の主体はtype III collagenであ

った。TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3は、いずれの系統でも、RT-PCRで発現の増加が確認された。一方、MMP-1およびMMP-8には変化はみられなかった。Gel reverse zymographyを用いた検索では、TIMP-1およびTIMP-2が両系統の8週投与群でのみ有意な活性の増強を示し、TIMP-3には変化はみられなかった。免疫組織化学的検索では、全ての群の胆管上皮細胞および小葉中心静脈周囲の肝細胞でTIMP-1およびTIMP-2の陽性像が得られ、PS投与群と対照群との間に差はみられなかった。また、ELISA法を用いた検索で、血清では肝臓より早期にTIMP-1およびTIMP-2の有意な増加がみられた。

以上の結果から、ブタ血清誘発肝線維化モデルではその進展にラット系統差がみられ、また、病変初期にマクロファージおよびリンパ球の浸潤が一定期間持続した後に肝線維化を生ずることが明らかとなった。また、本モデルでは、type III collagenが主体となった線維中隔が形成され、TIMP-1およびTIMP-2の発現増加が病態の発現に関与していることが示唆された。壊死後性肝線維化モデルと比較して、TIMPの発現が微弱で、MMPの発現がみられないことは、肝細胞壊死がほとんどみられない本モデルの特徴のひとつと考えられた。

#### (2) 病態発現初期における遺伝子発現解析

2および4週投与群の肝臓について、