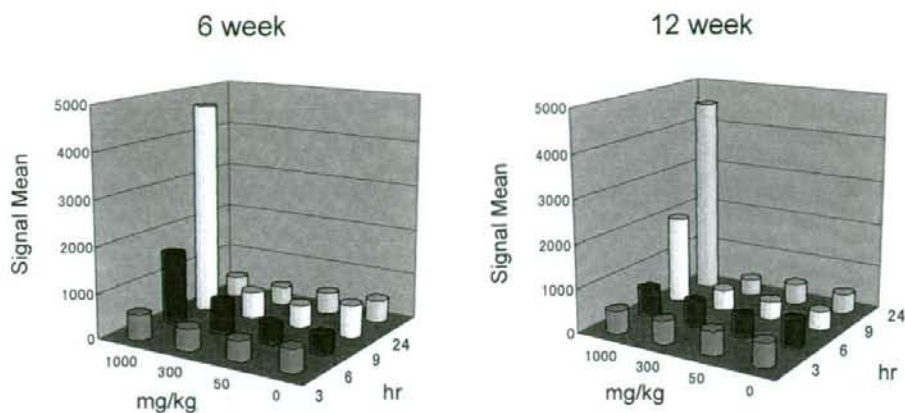


Effects of Acetaminophen on the expression of Heme oxygenase-1

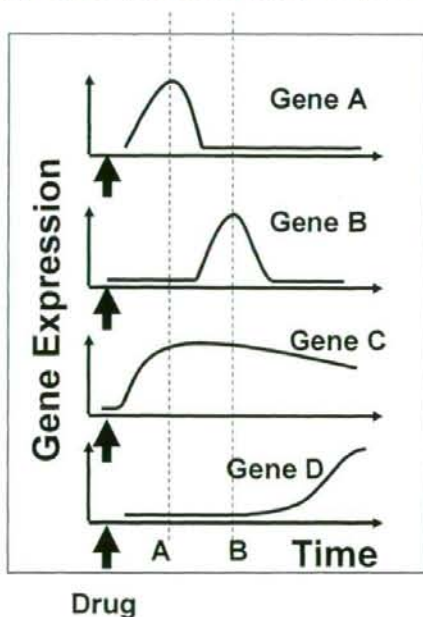


Hmox-1は細胞ストレスのバイオマーカーとなるか？

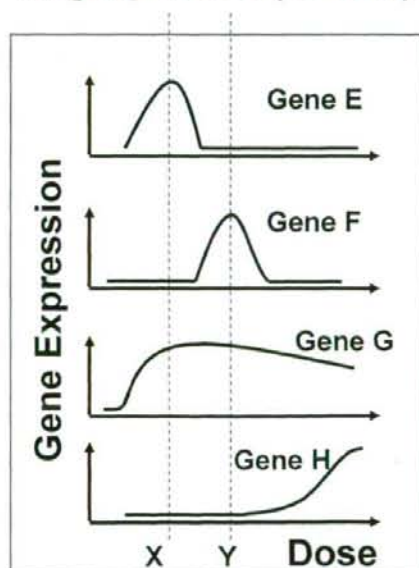


ピークとなる時間が異なる閾値が存在する

Time-dependent expression profile



Drug-dependent expression profile



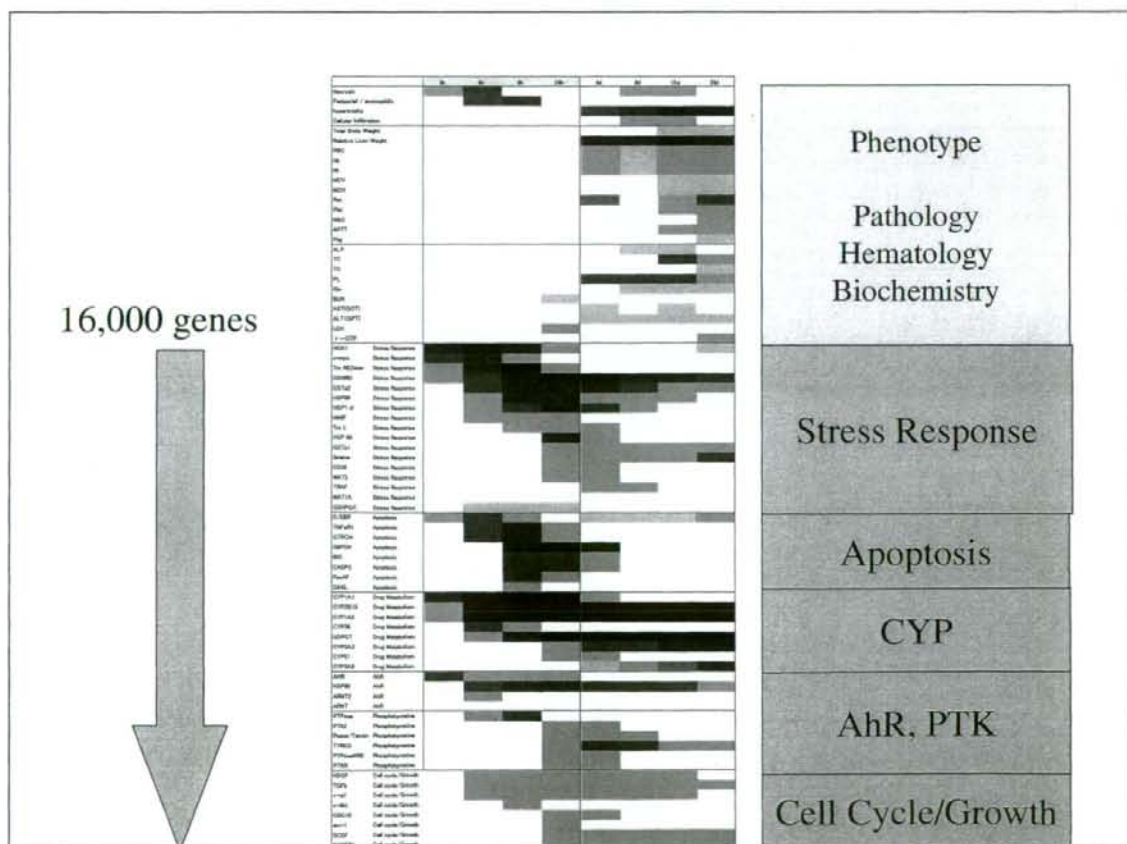
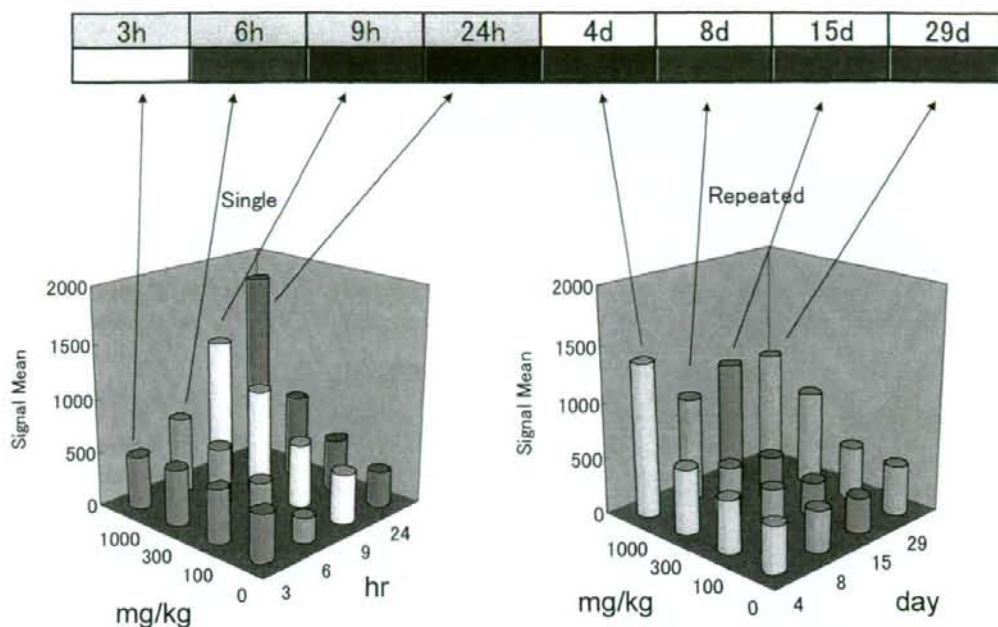
網羅的遺伝子解析の問題点

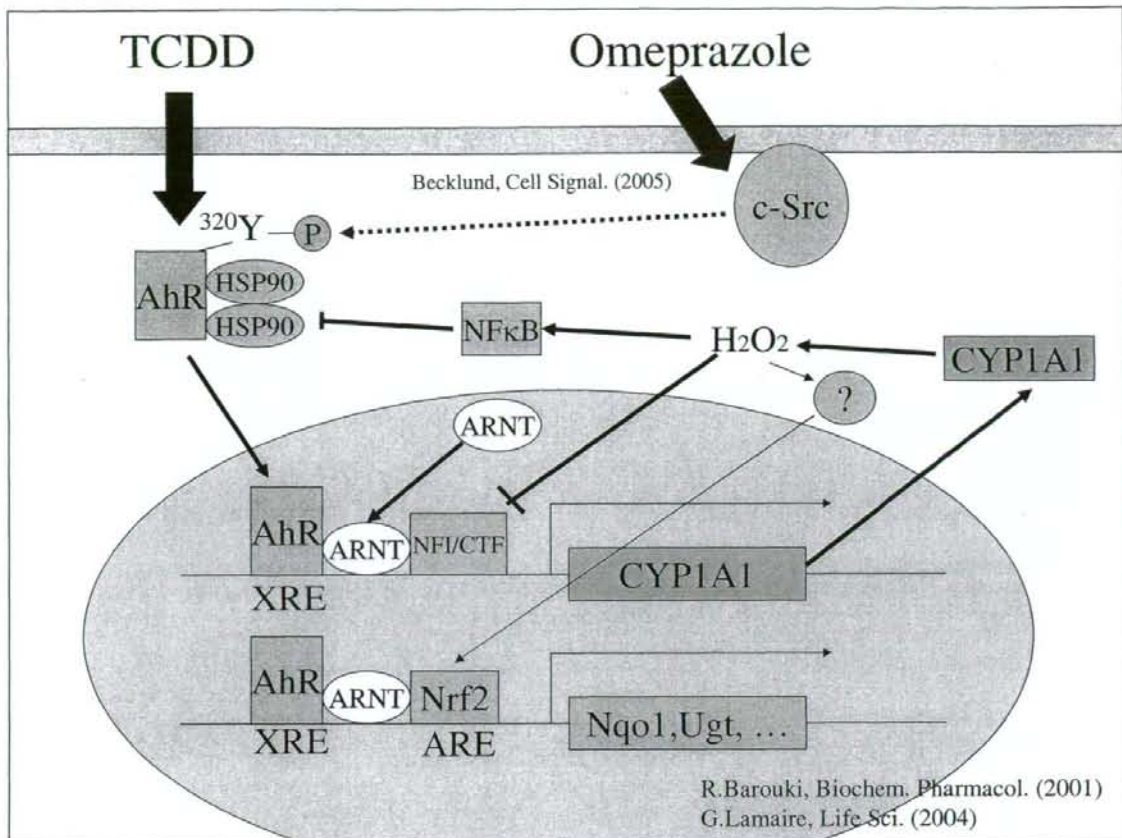
- 例数に比べデータ数が膨大である
→統計手法の適用が困難
 有効な“フィルタリング”の必要性
- 用量・時間依存性のデータ解析法が未熟
- 結果の意味づけが困難である
 毒性メカニズムの解析が必須

Omeprazole: 100, 300, 1000mg/kg

Pathology	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d
Periportal / eosinophilic hypertrophy		■	■	■	■	■	■	■
Cellular Infiltration					■	■	■	■
Total Body Weight						■	■	■
Relative Liver Weight					■	■	■	■
RBC					■	■	■	■
Hb					■	■	■	■
Ht					■	■	■	■
MCV					■	■	■	■
MCH					■	■	■	■
Ret					■	■	■	■
Plat					■	■	■	■
WBC					■	■	■	■
APTT					■	■	■	■
Fbg					■	■	■	■
ALP					■	■	■	■
TC					■	■	■	■
TG					■	■	■	■
PL					■	■	■	■
Glu					■	■	■	■
BUN				■	■	■	■	■
AST				■	■	■	■	■
ALT				■	■	■	■	■
LDH				■	■	■	■	■
γ-GTP								■

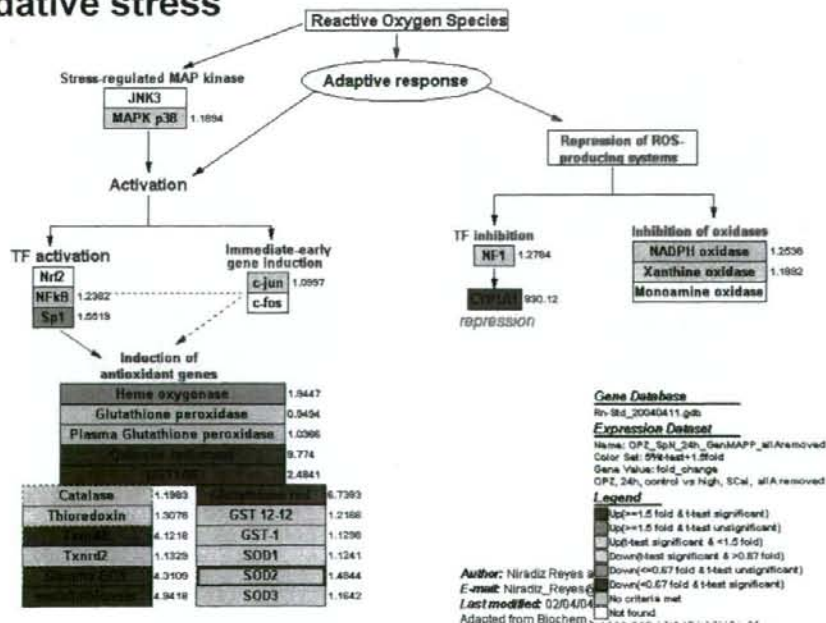
Effect of omeprazole on the expression changes of glutathione reductase

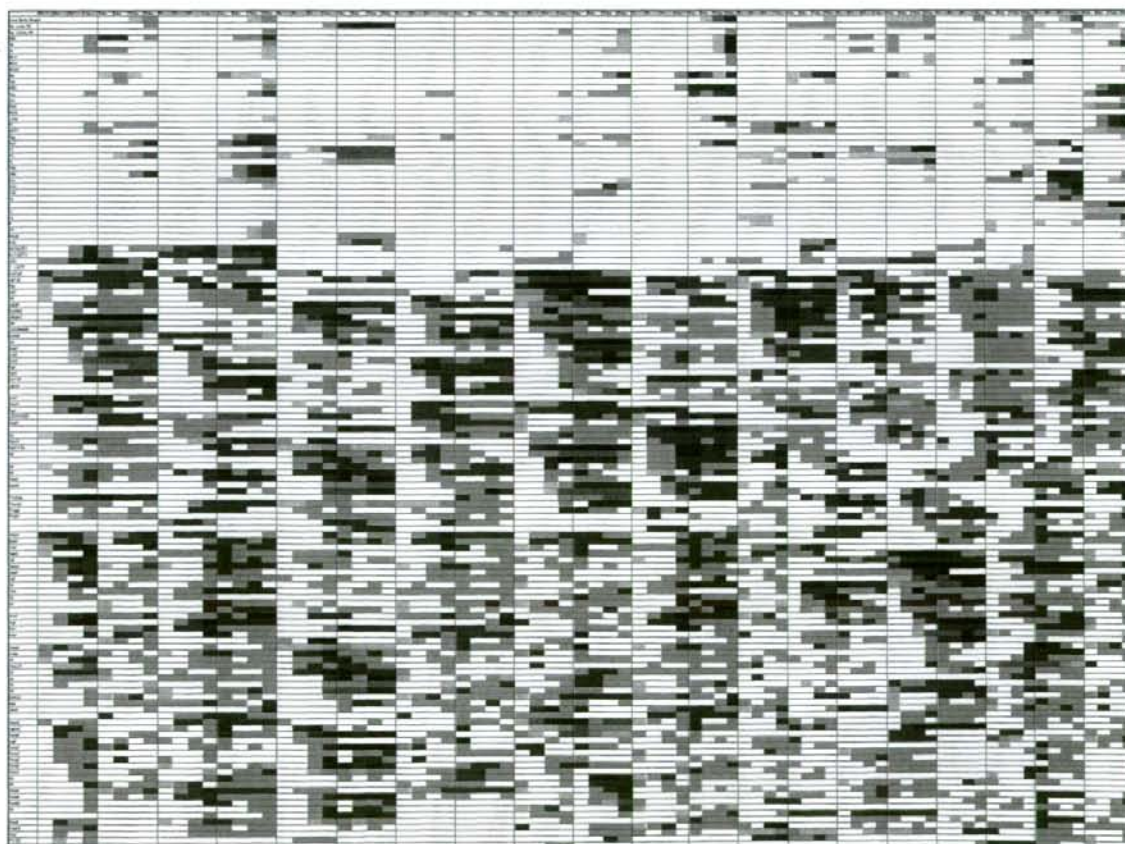
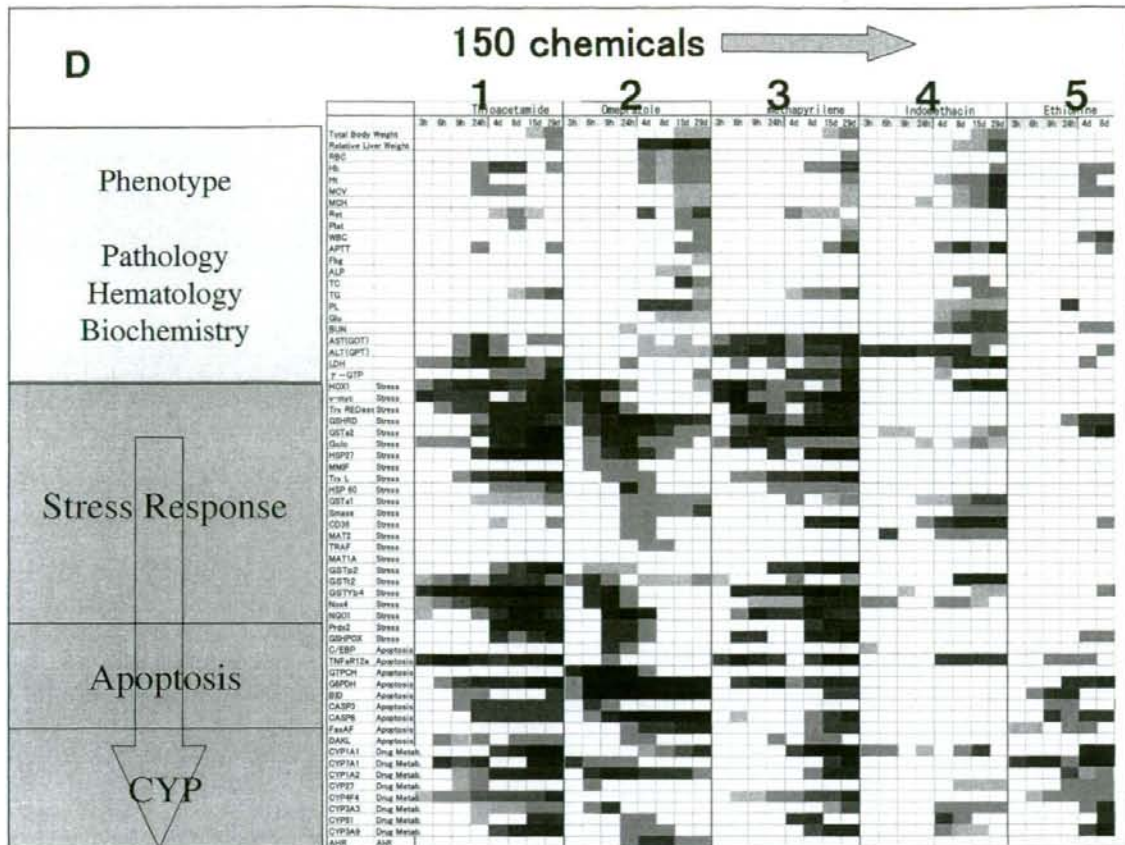




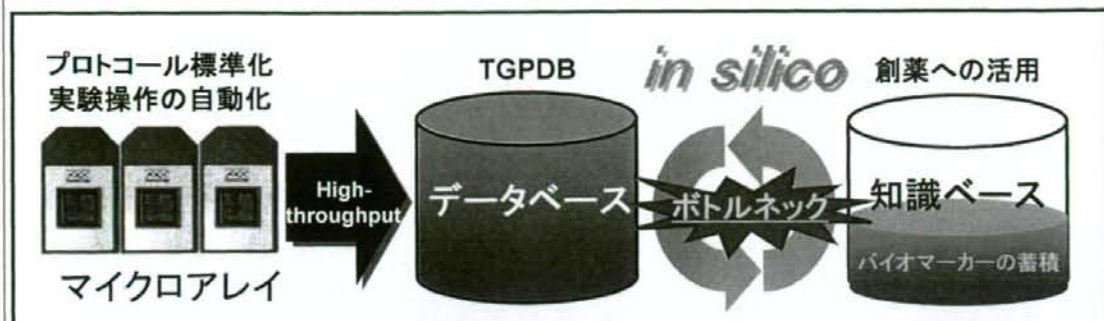
Omeprazole (OPZ) 24h pathway visualization with GenMAPP2

Oxidative stress





トキシコゲノミクス研究のボトルネック



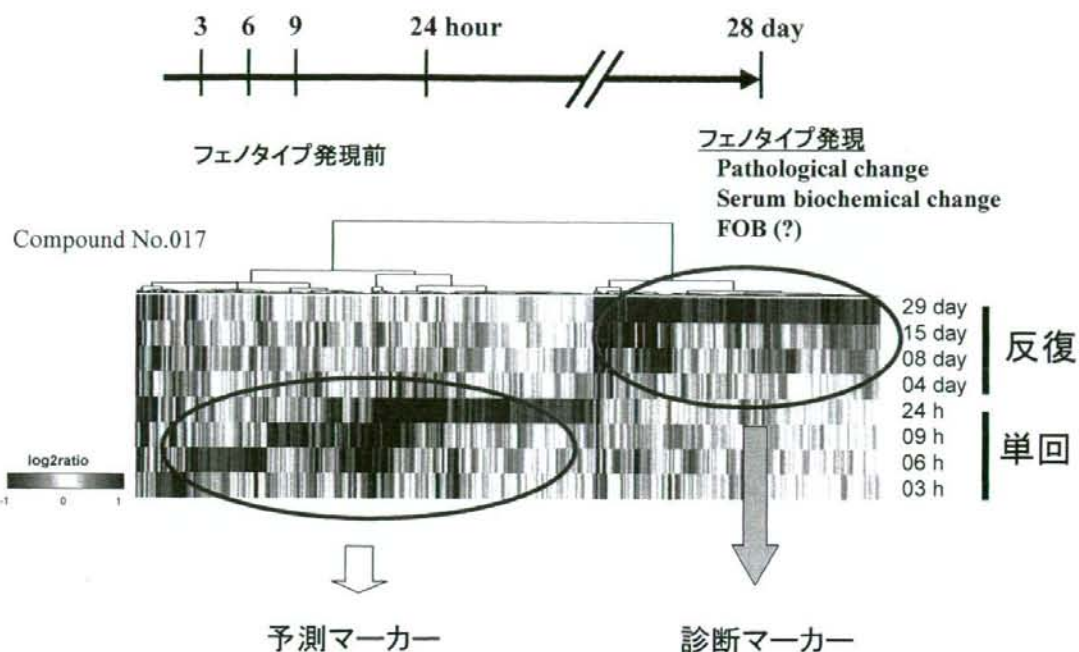
マイクロアレイ技術の発達により、網羅的遺伝子発現データ取得のスループットは劇的に向上した一方で、データベースからの知識探索・活用は自動化できないためにスループットは低い

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

解析・予測のストラテジー

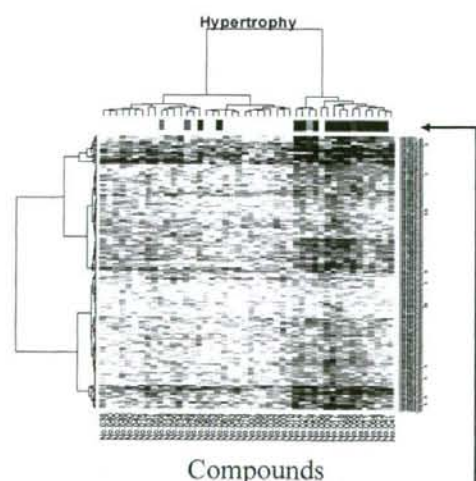
- フェノタイプアンカーリング
病変変化の標準化(?)
 - バイオマーカー遺伝子リストの取得
一覧性のよいスコア化方式の開発
 - 判別分析
PAM, SVM: 予測結果の定量的表示
 - 主成分分析
予測結果の定量的表示
- 毒性メカニズムに基づいた予測

時間依存的な遺伝子発現変化とその使い分け



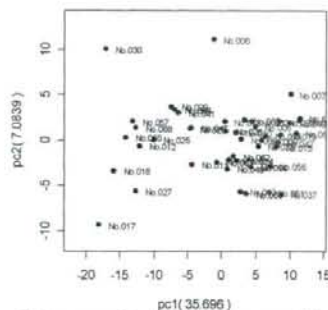
「将来の」肝肥大と関連する遺伝子群

24時間時点でのクラスタリング

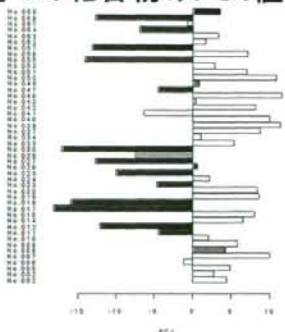


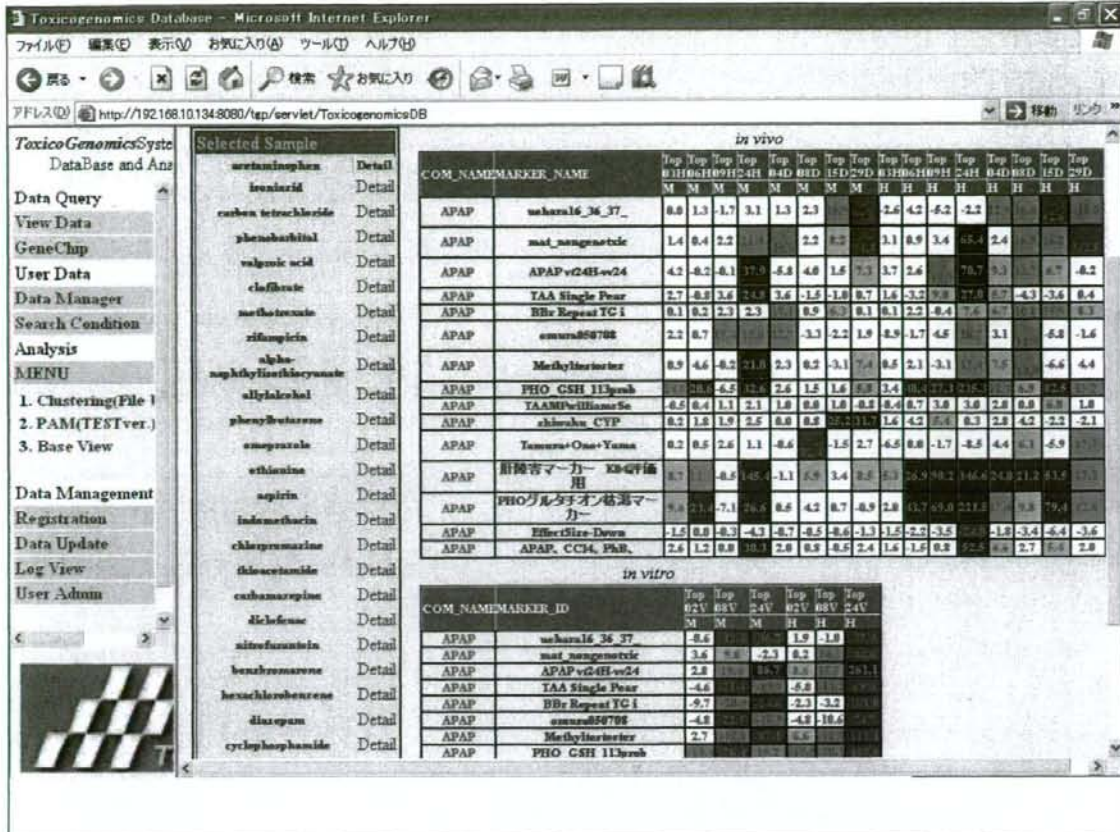
3時間から29日までの
累積発現数

関連遺伝子によるPCA

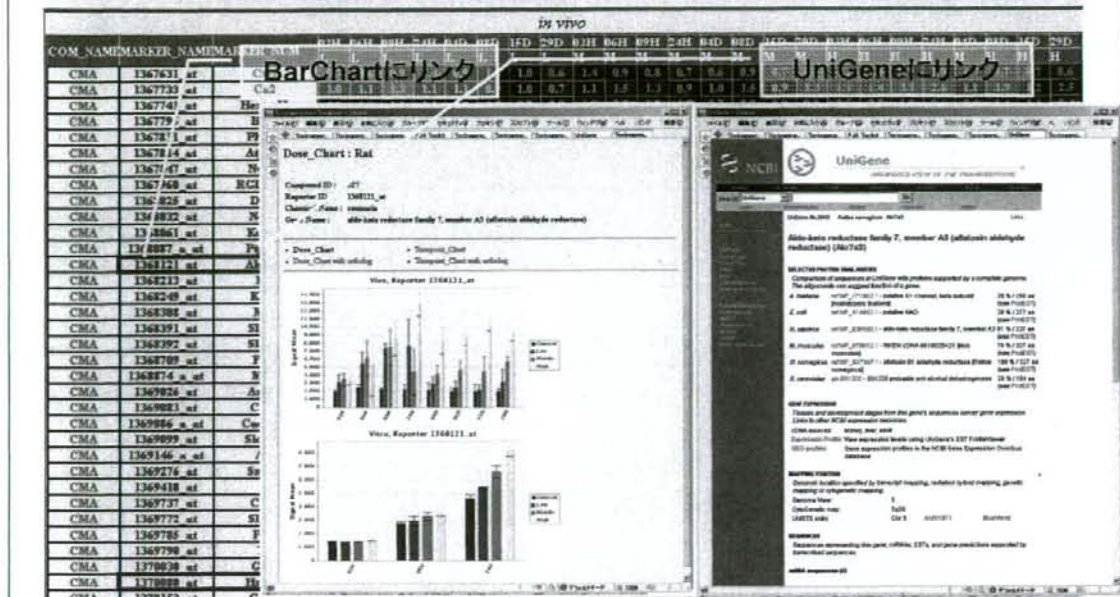


種々の化合物のPC1値





バイオマーカー情報の管理, データベースの効率的解析から 個別の遺伝子の詳細な発現解析までを階層的に支援するツール

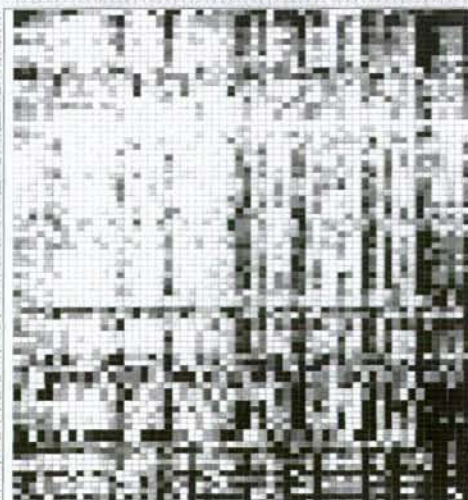


バイオマーカーを活用した化合物評価

スコア低 ← → スコア高

横軸: 化合物

縦軸: バイオマーカー

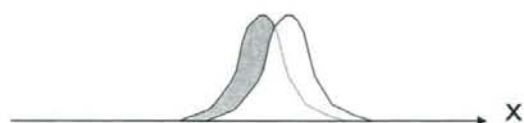
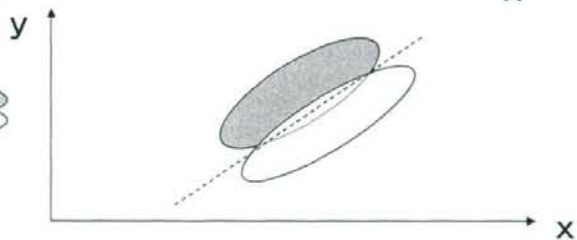
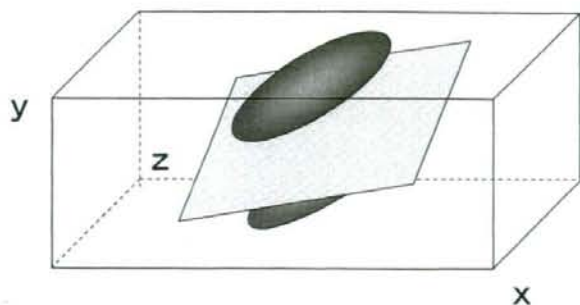
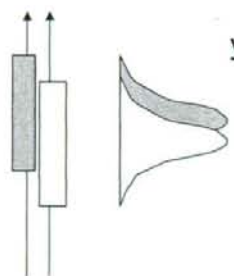


バイオマーカーレベルのプロファイル
類似性評価: 「Knowledge array」

Sig Gene Hypertrophy & ALT modified Single Posi-Nega
uehara_033AM_H_welch0.05_fold1.5_down_15and29D
mat_lipidosis_down_050427
TAA Single Pearson minus less 0.6

PPAR α Specific Gene
Sig Gene Cellular Infiltration & ALT 24H Posi-Nega
uehara_033AM_H_welch0.05_fold1.5_up_15Dand29D
BBr Repeat TG inverse association 163 gene
酸化ストレス
Sig 90gene AND APAP 8H_24H same change
vitro_cluster1
Sig gene necrosis & ALT UP modified Single
ONO PPAR α single24h
Hamp
Tamura PPARAlpha SigGene

多変量 解析の イメージ

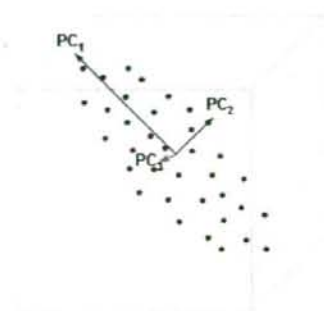


n次元
▲
⋮
3次元
↑
2次元
↑
1次元

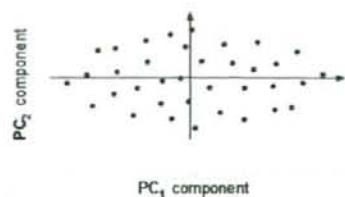
主成分分析



a



b

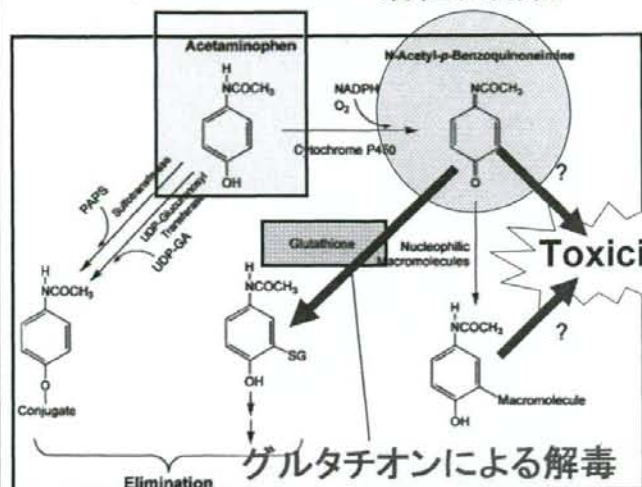


c

解析例：薬剤起因性肝臓グルタチオン欠乏評価

アセトアミノフェン 活性代謝物

＜バイオマーカー探索の流れ＞



高用量アセトアミノフェン (APAP) 投与による肝臓グルタチオン枯渇は、肝細胞障害の大きな要因と考えられている

肝臓グルタチオン含量に反相関した発現変動を示す遺伝子群は、APAP型の肝障害惹起リスクを評価するためのバイオマーカーとなるか？

グルタチオン枯渇剤phoroneを用いたマイクロアレイ解析

グルタチオン抱合による代謝活性化体の解毒
Drug Metab Dispos. 2003, 31(12):1499-506

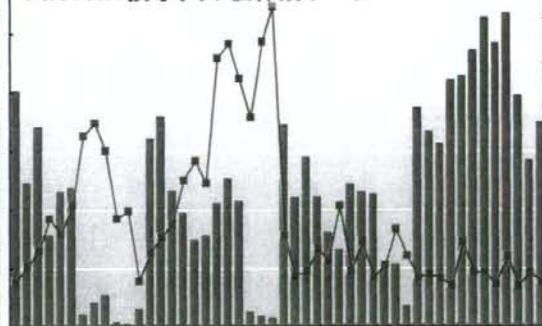
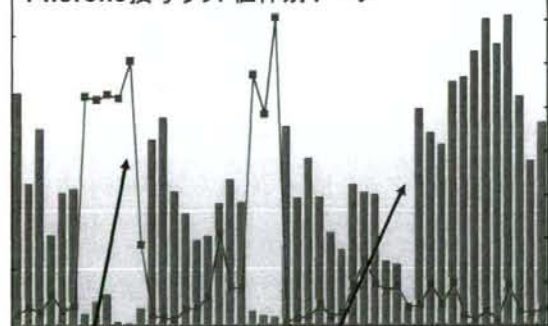
解析例：薬剤起因性肝臓グルタチオン欠乏評価

Heme oxygenase 1

Glutamate cysteine ligase, modifier subunit

Phorone投与ラット個体別データ

Phorone投与ラット個体別データ

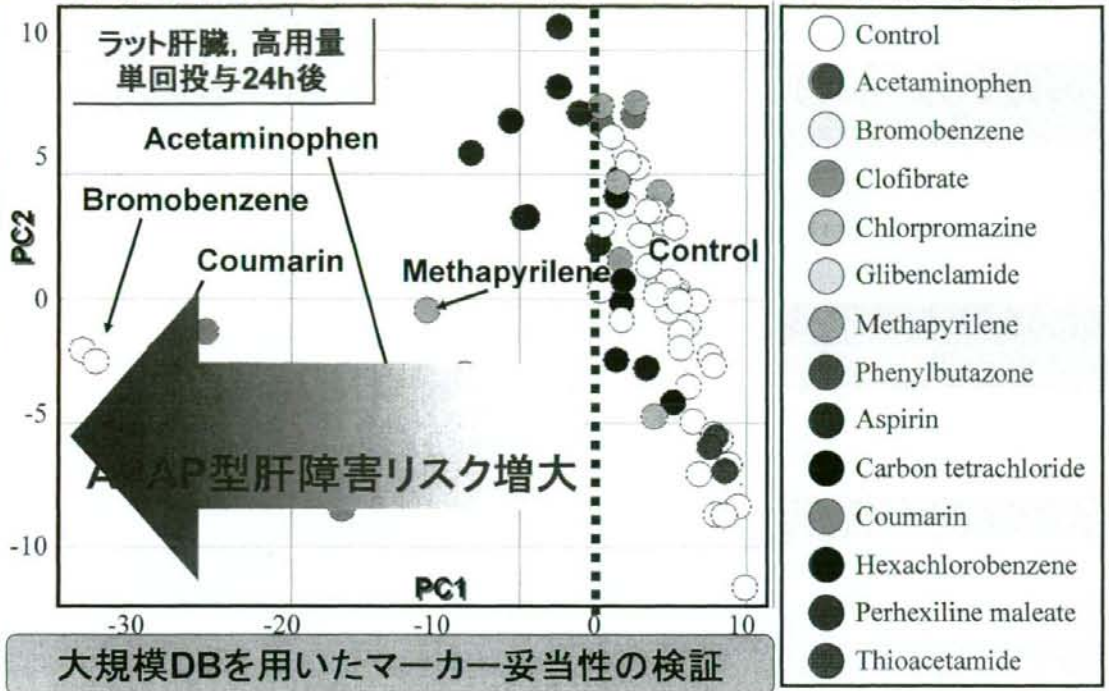


mRNAレベル 肝臓グルタチオン含量

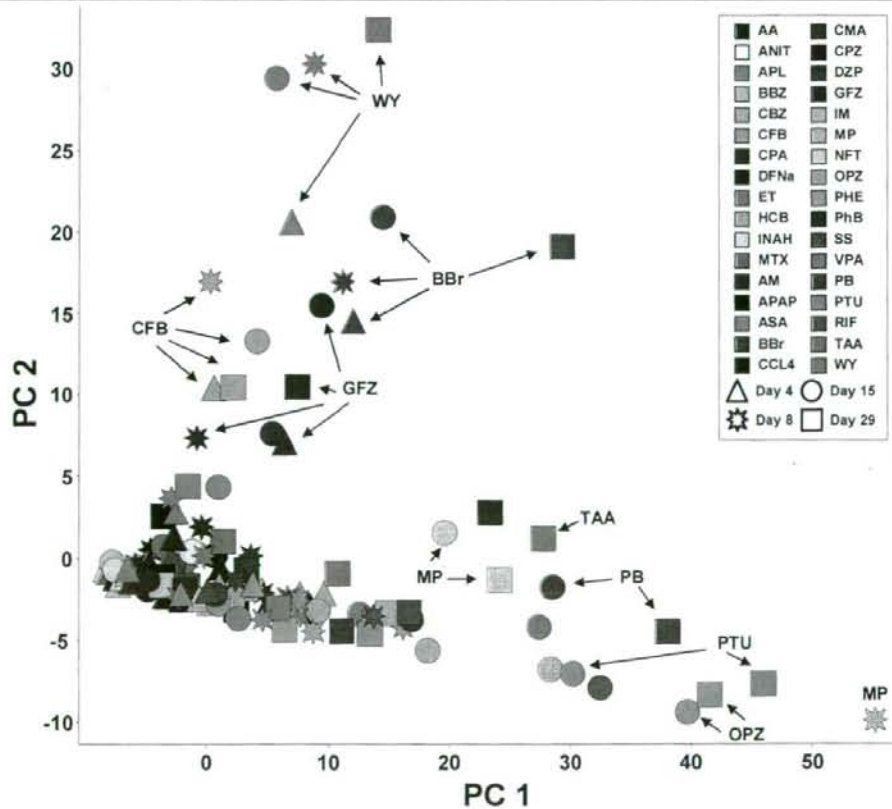
肝臓グルタチオン含量に反相関した発現変動を示す130プローブセット

グルタチオン欠乏評価バイオマーカーとして活用

解析例：薬剤起因性肝臓グルタチオン欠乏評価



血中脂質低下マーカー



Supervised classification

LDA: linear discriminant analysis

MLDA : Maximum likelihood discriminant analysis

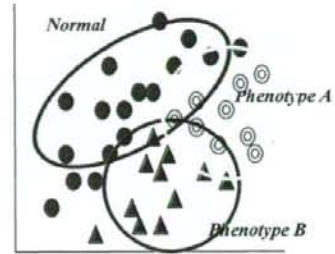
DQDA : diagonal quadratic discriminant analysis

DLDA : diagonal linear discriminant analysis

KNN : K-nearest neighbor

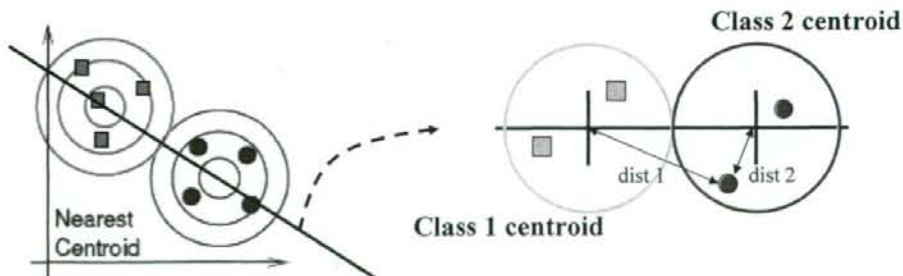
SVM : Support vector machine

PAM : Prediction analysis of microarrays



Quantitative evaluation using PAM

Nearest centroids : Characterize each class by mean (centroid) and covariance structure.



Class probability for each class is based on distance from centroid of each class.

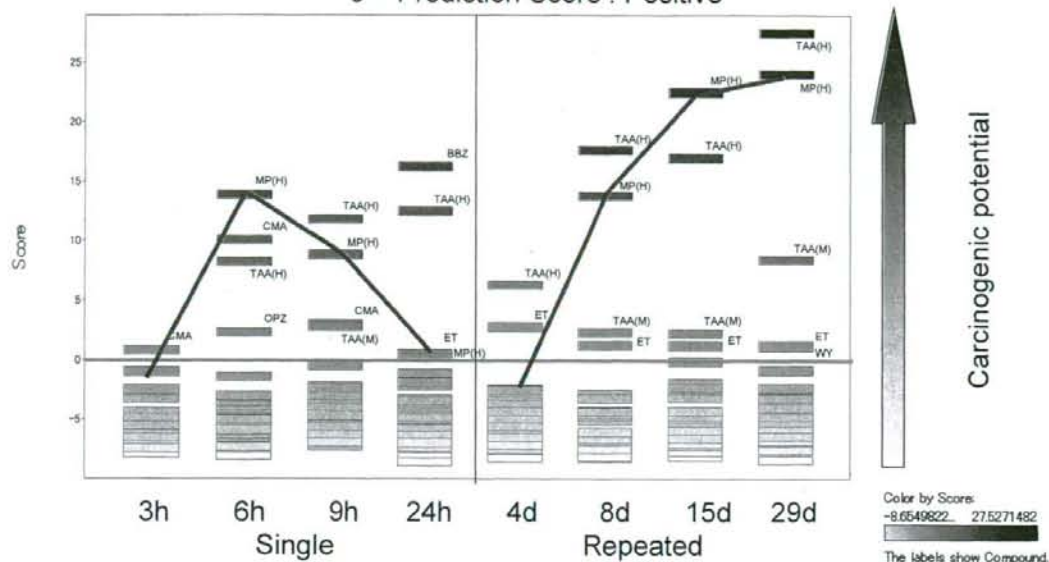


binary class model

quantitative prediction of potential to induce phenotype

Visualization by "PAM Prediction Score"
 $= \text{Log}_{10} [\text{class probability (positive)} / \text{class probability (negative)}]$

Prediction Score < 0 : Negative
 0 < Prediction Score : Positive



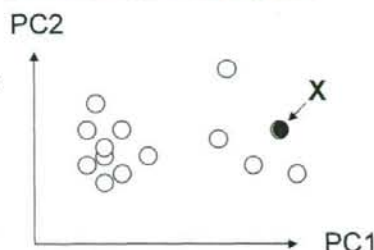
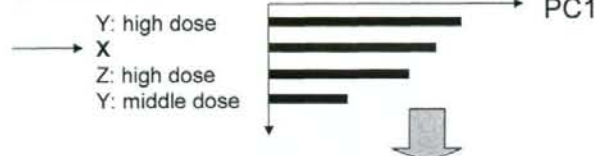
解析・予測のストラテジー

- フェノタイプアンカーリング
 病理変化の標準化(?)
 - バイオマーカー遺伝子リストの取得
 一覧性のよいビューワーの開発
 - 判別分析
 PAM, SVM: 予測結果の定量的表示
 - 主成分分析
 予測結果の定量的表示
- 毒性メカニズムに基づいた予測

A: Marker check

X

Marker	Phenotype	3h	6h	9h	24h
M1	F1				
M2	F2				
M3	F3				
M4	F4				
M5	F5				

B. PCA analysis using M1**C: Sort by PC1**

A list of genes with high eigenvector is acquired for further analysis

D. Scores vs. marker M2 for F2

Drugs	3h	6h	9h	24h
X	NA	NA	NA	?
P				
Q				
R				
S				

Suggestions for further tests

トランスクリプトームによる毒性メカニズム解析の問題点

発現量の低いもの

時間・空間的制御

機能タンパク質の二次的修飾

タンパク質相互作用

データの再現性

機能未知遺伝子

発現制御領域未知遺伝子

In vivo, vitroの乖離

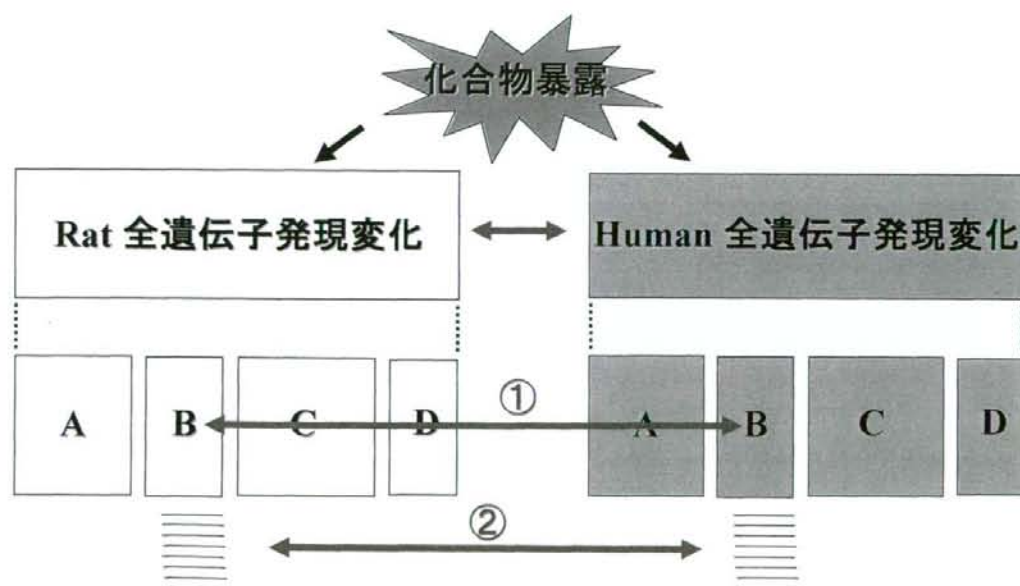
種差

例：バルプロ酸

- ラットin vitroから変動遺伝子の抽出
- オールソログ変換→ヒトin vitroで変動遺伝子
共通性少ない

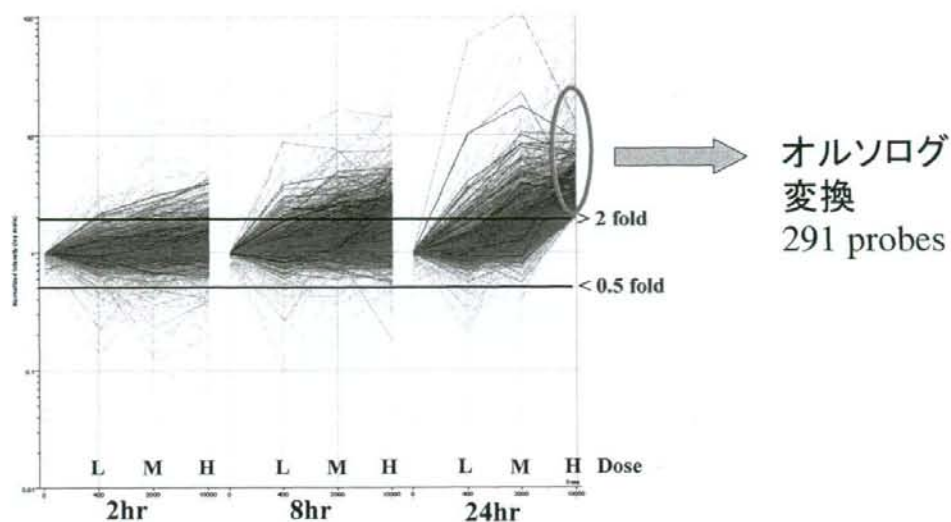


- 遺伝子機能別に対応を見ると共通性見出せる

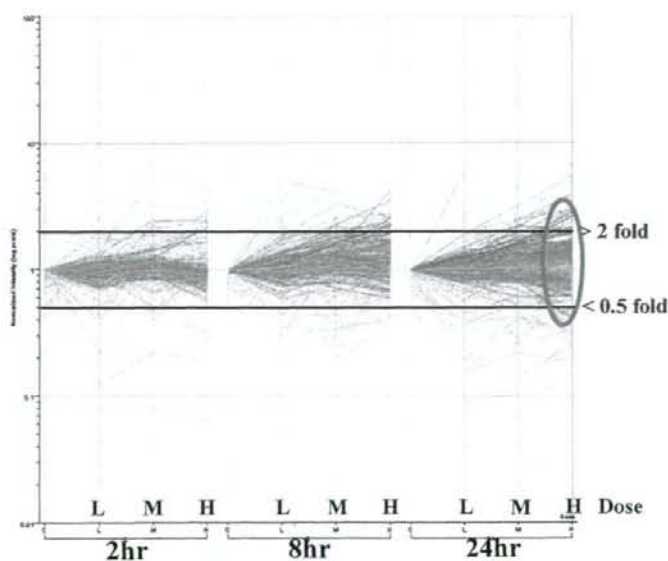


- ① 機能カテゴリレベルでの比較
- ② 個々の遺伝子をオールソログ変換して比較

バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化(Rat in vitro, 1572 probes)



バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化(Human in vitro, 291 probes)



Rat 1572 probes を機械的にオルソログ変換した291 probesの
遺伝子発現変化→変動の傾向は一致していない。

VPA暴露時発現量増加遺伝子(24 hrs)のGOカテゴリ分類

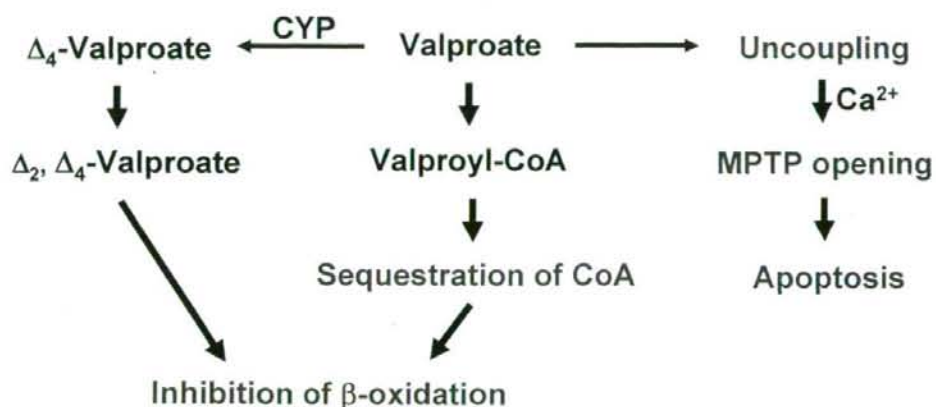
GO terms		P-value
GO:0016491	oxidoreductase activity	0.000394
GO:0006629	lipid metabolism	0.00229
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.00624
GO:0019752	carboxylic acid metabolism	0.00624
GO:0006082	organic acid metabolism	0.00624
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.00838
GO:0004497	monooxygenase activity	0.00838
GO:0006118	electron transport	0.00874
GO:0042598	vesicular fraction	0.0123
GO:0005792	microsome	0.0245

■:CYPを含む、酸化還元反応に関与する遺伝子群

(Fisher's exact test)

■:代謝関連の遺伝子群(主として脂質代謝系)

VPAの毒性メカニズム



VPAはミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の阻害および呼吸鎖不全を引き起こす。脂質代謝およびストレス応答遺伝子を含む酸化還元酵素のGOカテゴリに有意な変化が見られたことは上記のメカニズムと合致する。

VPA暴露時変動遺伝子の脂質関連GOカテゴリのP-value

GO terms		Rat vivo	Rat vitro	Human
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.0115	0.00180	0.000659
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.0115	0.00172	1.29E-07
GO:0006629	lipid metabolism	0.0244	0.0186	1.29E-07
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	0.0512	0.0158	0.342
GO:0019395	fatty acid oxidation	0.0677	0.135	0.174

(P-value by Fisher's exact test)

機能カテゴリレベルでの比較では各実験系の間で比較的良好な対応関係が見られる。

Rat における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

