

## 2.2.15. 離脱速度比例定数（結合強度）の算出 ターゲットの複数個所への合致



### 課題

単一のプローブがターゲット内の複数個所と合致するケースが存在する



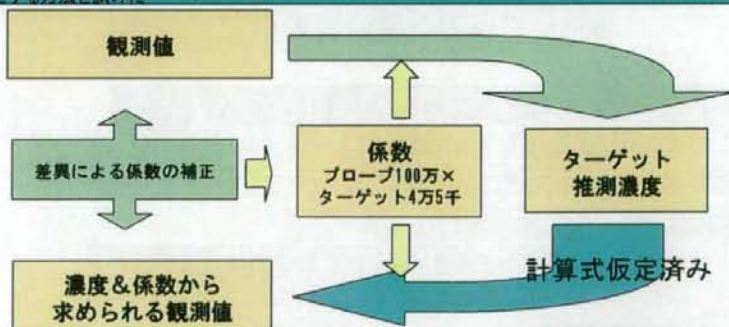
別の結合個所が存在する場合には、別の溶質が存在するとみなせる。しかし、複数溶質に対するLangmuirの式の中で、結合力（離脱速度の逆数）と濃度の積が現れており、結合力の和をそのRNAに対する結合力とみなして取り扱うことが可能である。

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.16. 係数補正による係数の同定



プローブとターゲットのペアの塩基配列に基づいた結合力の同定は、ターゲット範囲外での結合など、未知要素が多く、困難なので、観測値から推測値を求め、更に観測値を推定し、その誤差で、係数を補正する方法を試みた



複数のチップ、実験条件で、繰り返し実施することで本来あるべき係数に近づいていく

ただし、計算時間がかかる。また、収束が保証できない

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.16.係数補正による係数の同定 計算方法（概要）



### 濃度 $C_j$ 、係数 $\alpha_{ij}$ が決定されている場合

①Hybridization後の吸着個数 $N_{ij}$ を繰り返し計算で求め、そのあと②Washing後の吸着個数 $n_{ij}$ 、③Washing後の全吸着個数 $n_i$ を順次計算する

### 観測値 $n_i$ 、係数 $\alpha_{ij}$ が決定されている場合

適切な方法で濃度初期値を求める

$C_j$ が決定されている場合の計算方法を用いて、観測値を求め、結果の値との差がある場合には濃度の補正を行い、繰り返し計算をする

### 複数のチップで

プローブ配列から適切な初期値を求める（後述）

観測値から真の値を求める。その値から観測されるべき値を計算する。その差異から係数の変更を行う

Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.16.係数補正による係数の同定 係数決定アルゴリズム



Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.16.係数補正による係数の同定

### 計算前提

次のことを前提として計算を行う

**Imaxを 20000で固定する**

GSCの実験で求められた知見に基づく

**明らかにエラーと考えられる状況を排除する**

発現量が最大値Imaxの95%を超過しているプローブ

エラープローブとして計算しない

すべての実験条件でエラープローブとして判定されることはないはずなので、適切な推測が可能はずである

## 2.2.16.係数補正による係数の同定

### 係数計算範囲

- ・ Hybridizationにおける阻害が発生すると思われる範囲で、計算を実施する範囲を、計算時間を考慮し、次のようにする。
  - 中央に位置する場合、13mer以上連続
  - 端に位置する場合、12mer以上連続
- ・ 係数初期値を次のようにする。
  - 25mer一致→1
  - 一致数が1個減るごとに、1.4倍
  - 端の塩基を含まないと、32倍

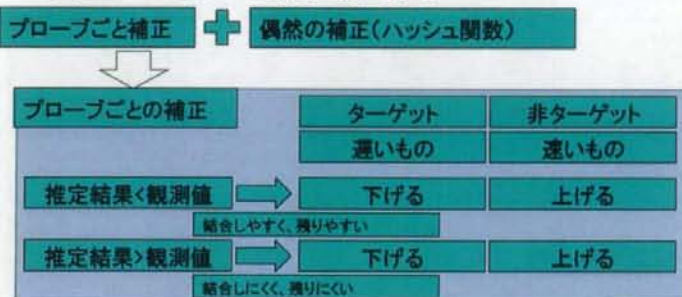
例1	第1塩基から12mer連続	$1.4^{13} \approx 100$
----	---------------	------------------------

例2	第2塩基から23mer連続	$1.4^2 \times 32 \approx 64$
----	---------------	------------------------------

## 2.2.16.係数補正による係数の同定

### 係数補正方法

- ・ 偶然の補正と評価関数による探索で収束させることもできるが、時間がかかる。次の方法で補正する



Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

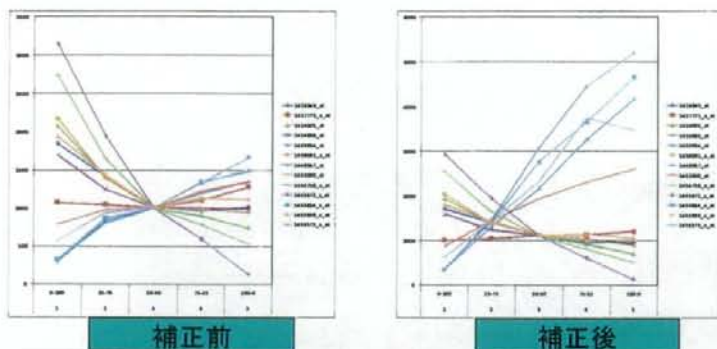
## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

- ・ 学習による方法を用いて係数が同定可能か、また、発現値飽和の補正の可能性を探る
- ・ 対象 LBM 15チップ
  - 各チップ1回ずつの学習
  - 中央は13mer連続一致、端は12mer連続一致を影響を及ぼしているものとして計算を行う。
    - ・ 対象となる関係: 8,307,1055対

Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

- 飽和補正結果(LBM: 単Langmuir(昨年度実施))
- 中発現域(50%:50%で1000程度)

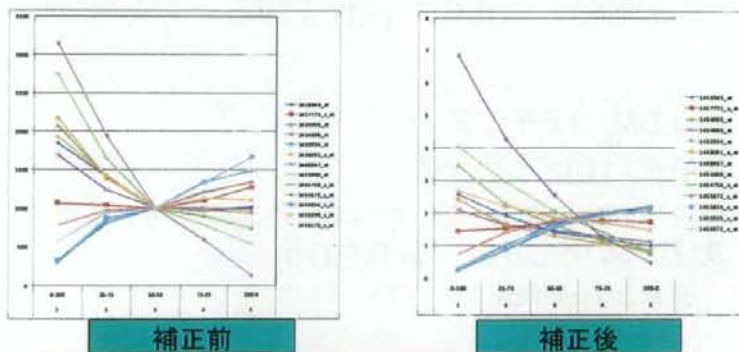


この範囲での直線引き伸ばしは良い結果となっている

Copyright(C)2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

- 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir)
- 中発現域(50%:50%で1000程度)



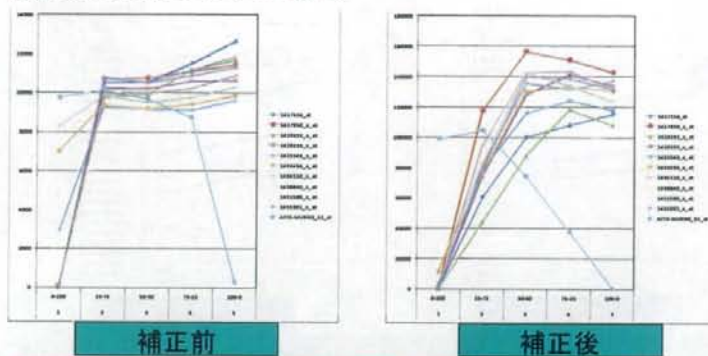
Brain側発現遺伝子の直線性が確保された

Copyright(C)2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)



- ・ 飽和補正結果(LBM: 単Langmuir(昨年度実施))
- ・ 高発現域(50%:50%で、10000以上)



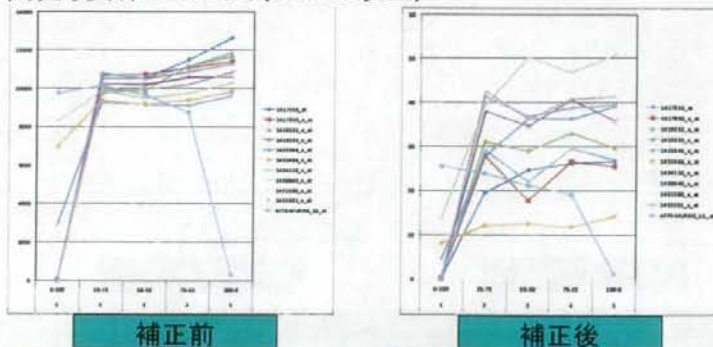
50%までは直線に引き延ばされている

Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)



- ・ 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir)
- ・ 高発現域(50%:50%で、10000以上)



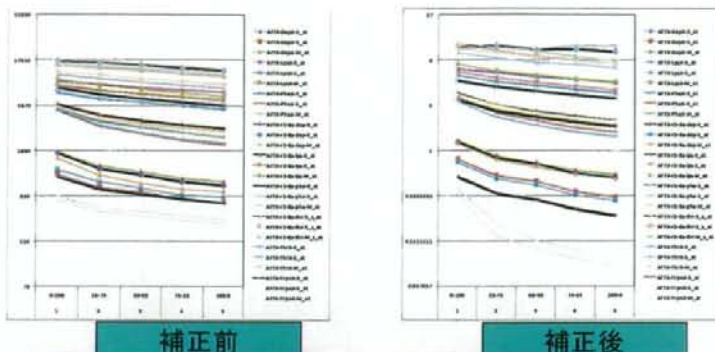
飽和最大値( $I_{max}$ )の再考が必要である

Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)



### ・ LBM(GSC:多Langmuir)



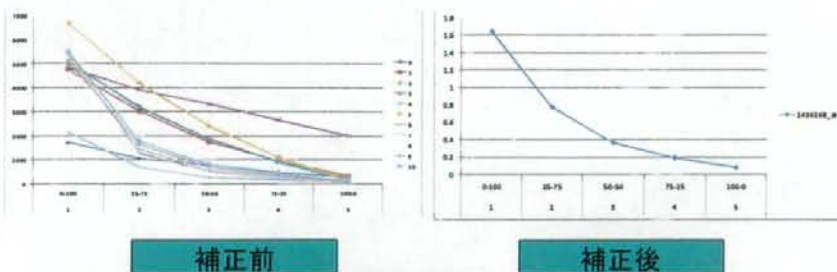
補正前はPMの平均値  
4番目(Dap)がうまく補正できているように思われる

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)



### ・ LBM(下に凸なProbeSet:多Langmuir)



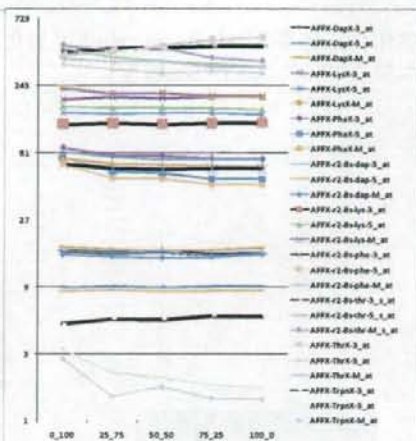
補正後、下に凸な状況は残っているが、最大の落ち込みProbeよりも緩やかな凸にはなっている

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

絶対化計算(Percellome)  
絶対化計算をすることで、Liver、Brain固有の偏差を打ち消せる部分があると考えられるので実施してみる

補正&絶対化計算を行うと、GSCは水平になる。

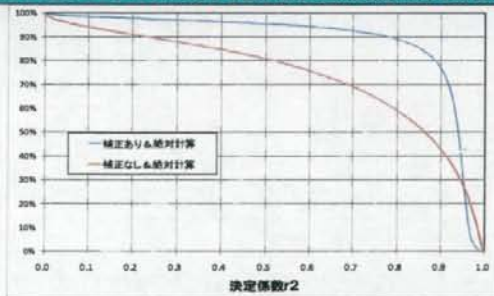


Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

### ・ LBM(補正&絶対計算後の直線性)

LBMは、配合割合を変更しているだけなので、推定精度は直線になるはずである。直線に近づいたかの指標として、全プローブセットに対する線形近似の決定係数の降順累積グラフを示す



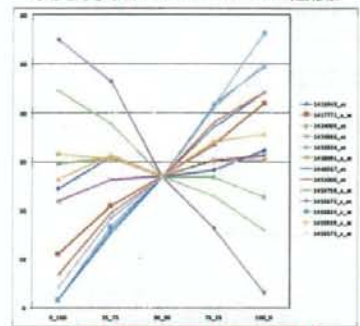
Percellome絶対計算の直線性と比して格段に改善していると考えられる  
決定係数1付近が少ないのは、ControlRNAを用いた補正の結果と思われる

Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

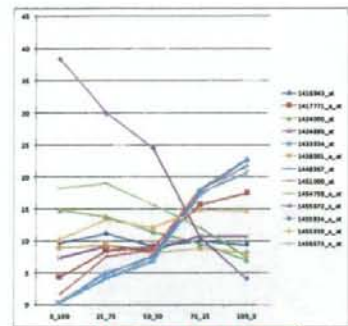


## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

- 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir&絶対化)
- 中発現域(50%:50%で1000程度)



補正無&絶対計算

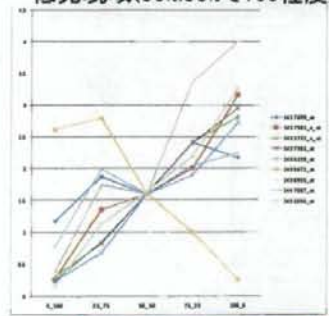


補正&絶対計算

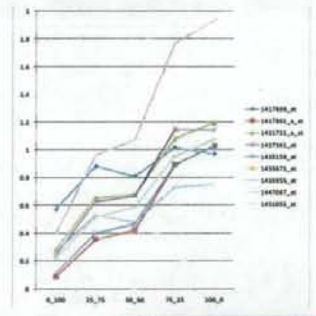
50:50において発現量の差異が大き、どちらが真値か?

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

- 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir&絶対化)
- 低発現域(50%:50%で100程度)



補正無&絶対計算



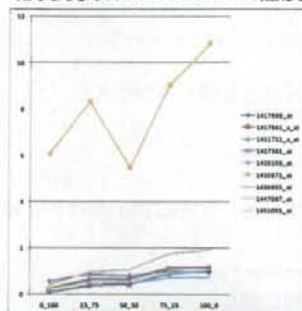
補正&絶対計算

1435672\_atは、補正後非常に大きな値となった

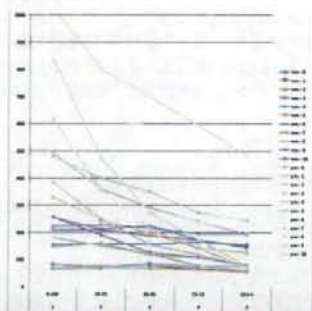
## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)



- ・ 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir&絶対化)
- ・ 低発現域(50%:50%で100程度)



補正&絶対計算



1435672 at Probe発現値

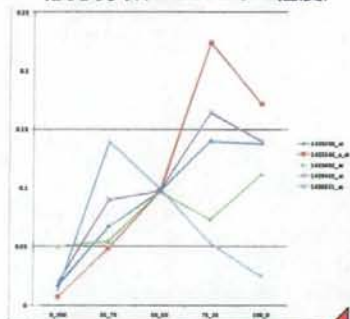
Brain側が多く、Liver側で少ないProbeは典型的な抑制カーブを描いている。このような抑制がなかったものとした場合の濃度を推定している。こちらが真値ではないだろうか？

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

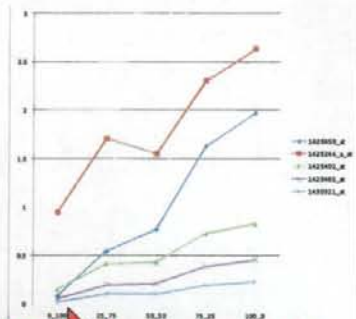


- ・ 飽和補正結果(LBM: 多Langmuir&絶対化)
- ・ 低発現域(50%:50%で10程度)



補正無&絶対計算

縦軸のスケールの  
大きさの差



補正&絶対計算

1430321 atは、Liverで大きな抑制を受けている

Copyright©2009-2009 NTT DATA Corporation

## 2.2.17.係数補正による係数の同定(試行1)

### ・ まとめ

- 多くのプローブセットで線形性が確保された。
  - ・ 決定係数累積%グラフ
  - ・ LBMが濃度に関して等間隔の実験であることを与えずに補正を行っている。
- 特に、下に凸な状況の補正が行われた。
- 発現量が小さな領域では、今までよりもかなり大きな値が推定された。

### ・ 課題

- 最大飽和係数( $I_{max}$ )の再検討
  - ・ 高発現値のプローブセットで線形性が再現できなかった。飽和最大値は全体で一つの重要なパラメータなので、再度検討する。
- 係数対象の最少長さの同定
  - ・ 今回は端12mer、中央13merで打ち切った、どこまで行えばよいのか？
- 係数対象のターゲット外の遺伝子領域の合致に関して
  - ・ RNAの中で、ターゲットされている部分は一部であり、プローブには、ターゲット以外の箇所も結合する。また、添加RNAも結合する。これらがどの程度影響するのか不明である。

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

研究分担者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究要旨

遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系の確立を目的として今年度は、胚性幹(ES)細胞を分化させた胚様体(EB)を用いる *in vitro* の系を導入し、この遺伝子発現経時データベースを構築後、催奇形性の種差が著しいサリドマイドを、EB に持続適用した際の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、肢部での背腹軸形成異常の報告がある遺伝子の発現増加などを見いだした。EB は、より早期の胚の代替モデルとなり得ることからも、この系は有用な方法であるものと考えられた。

A. 研究目的

遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系を確立すること。このために、平成20年度は、EBを用いる *in vitro* の系を導入し、この遺伝子発現経時データベースを構築後、催奇形性モデル物質として、ヒトで催奇形を示すがげっ歯類では示さないという種差が著しい催奇形性物質(サリドマイド)をEBに持続適用した際の、EB(day1~day7)に対する経時的な網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。

B. 研究方法

ES細胞はTT2を使用し、GeneChip MOE430v2(Affymetrix社)(約45,000プローブセット)を用いて遺伝子発現変動解析を検討した。ES細胞の分化は、LIF非存在下で2日間天井培養(day2)、その後得られたEBを浮遊培養することによりおこなった。EB形成に向けた、1滴20 $\mu$ lあたりのES細胞数は800個とし1プレートあたり40滴とした。EBに対する遺伝子発現変動解析は、サリドマイド(0、10 $\mu$ M)存在下で培養・分化させたEB(day1~day7)を一日毎にサンプリングしたRNAを用いて検討した。天井培養開始が14時である

ため、EBのサンプリングを14時とした。EBは、180個~60個(分化日数によって異なる)をプールして1サンプルとし、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶解させた。

サリドマイド(BIOMOL)は、10mMのストックDMSO溶液を作製し、EBには10 $\mu$ Mとなるように1,000倍希釈により適用した。対照群には0.1%となるようにDMSOを添加した。濃度設定に関しては、文献を参考に胚線維芽細胞に対し細胞毒性を示さない最大濃度として10 $\mu$ Mを選定した(Miyata et al, Drug Metab Dispos 31: 469-475, 2003)。なお、ヒトに3mg/kgのサリドマイドを経口投与した際の血液中の最大濃度は約5 $\mu$ Mと報告されている(Chung et al, Clin Cancer Res, 10: 5949-, 2004)。したがって、本実験の群構成を0および1000mg/kg投与群とし、胚RNAのサンプリングは投与後2, 8, 24時間後におこなった。(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物

実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月版)。

### C. 研究結果

先ず、無処置野生型ES細胞を用いた、EBにおける遺伝子発現変動の経時データベース [EB形成0-7日](TIME POINT:14点を作成した。すでに取得済みのマウス無処置野生型胚のデータベースとの対比もでき、BrachyuryやCardiac actinなど、いくつかの分化マーカーについて、両データベース間で似た発現パターンを示すことを確認できた。

次いで、サリドマイド(0, 10  $\mu$ M)存在下で培養・分化させ、経時的にサンプリングしたEBのRNAサンプルにつき網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。対照群と投与群とで比較し、以下の2条件を満たす遺伝子群(プローブセット: p.s.)を選別した。すなわち、1)最大発現コピー数が0.3より大、2) t-testでのP値が0.1未満。その結果、発現が減少又は増加するものとして計1,077p.s.が見いだされ、このうち生物学的変動と考えられたものとして計72 ps(増加:63, 減少9)が見いだされた。この発現増加しているものの中には、シグナルカスケードとしてはWntシグナル(Wnt9B, Fzd3)機能不明であるが肢芽と菱脳分節(rhombomere)に発現するLix1(limb expression 1 homolog)や肢部の背腹軸形成異常が報告されているLmx1bが見いだされた。現在、昨年度検討した、妊娠マウスへのサリドマイド投与実験での解析結果と照合しつつ再解析中である。

### D. 考察

以上の結果から、サリドマイド(10  $\mu$ M)存在下で培養・分化させEBでは、Wntシグナルおよび肢芽に発現する遺伝子の発現に影響を与えることが明らかとなった。今後、先行し検討した *in vivo* 実験との比較検討をおこない、サリドマイド誘発催奇形の分子機序につきさらに詳細に検討する予定である。

他方、本実験結果からES分化系であるEBを用

いた *in vitro* 実験系の基本的な実験部分は整備できたものと考えられた。マウス野生型胚は胎生4~6日は、技術的にサンプリングが困難であり、事実上解析できないステージであるが、このES分化系を用いれば、ES細胞はマウス胎生3日の胚盤胞の内部細胞塊由来であるため、このステージの胚の代替モデルとなり得る。この意味でも、EBを用いる実験系は有用なものと考えられた。

他方、本解析法の今後の検討課題として、催奇形性物質を含む多様な化学物質の投与実験などを考慮し、より一般化させる必要性、およびバイオインフォマティクスの進捗を適宜取り入れることによる、より精度の高い解析法の開発の必要性が考えられた。本研究を通して、ヒトにおける発生毒性評価を、高精度で迅速に予測できることが期待される。

### E. 結論

遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系の確立を目的として、今年度は、胚性幹(ES)細胞を分化させた胚様体(EB)を用いる *in vitro* の系を導入し、この遺伝子発現経時データベースを構築後、催奇形性の種差が著しいサリドマイドを、EBに持続適用した際の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、肢部での背腹軸形成異常の報告がある遺伝子の発現増加などを見いだした。EBは、より早期の胚の代替モデルとなり得ることからも、この系は有用な方法であるものと考えられた。今後は、システムバイオロジーの進捗を適宜取り入れることにより、より精度の高い解析法の確立を目指す。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 1) 書籍

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司

「第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析」編集委員: 野村護、堀井郁夫、吉田武美、「非臨床試験ガイドライ

ンへの対応と新しい試み」  
株式会社 エル・アイ・シー、東京、2008

## 2) 雑誌

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. Development 135: 3511-3519, 2008.

## 2. 学会発表

北嶋 聡、菅野 純

トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、高木 篤也、関田 清司、今井 清、菅野 純

Percellome 手法を用いたフタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y

Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of Mesp2. 第 41 回日本発牛生物学学会、2008 年 6 月

Takahashi Y, Kitajima S, Yasuhiko Y, Kanno J and Saga Y

Delta-like 3(Dl3) does not substitute for Delta-like 1 (Dl1) in somitogenesis in vivo but modulates Dl1/Notch signaling in the posterior PSM.、第 41 回日本発牛生物学学会、2008 年 6 月

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純

発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害 [第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会]2008 年 6 月

高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小野昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、菅野 純  
p53+/-マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

エストロゲン受容体(α型)ノックダウンマウスの神経行動解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

今井 清、坪井 優、向井 大輔、山下 龍、関田 清司、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純

フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純

シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome 解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

2009年 2月23日(月) TTGI 班会議

## 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・  
毒性部

北嶋 聡



## 目的

遺伝子発現変動に立脚した  
高精度の発生毒性評価系の確立



## 背景1

### 高精度の発生毒性評価系の必要性

#### 1) 種差の問題

例) サリドマイド

#### 2) 検出感度の問題

例1) 対照群での奇形発生

例2) 同一母体内での胎児間の差

例3) 見過ごされやすい異常

[機能障害, 免疫障害, 腫瘍, 発生頻度の変化, 短命等]

→ 実験動物で催奇形性という所見が認められなくても  
ヒトでの催奇形性を正確に予見しなければならない

胎生6.25-9.75日胚全胚を用いたマイクロアレイ解析

## 背景2

### 遺伝子発現からみた胎児の特徴

adultとは異なり胎児では  
発生に関与する遺伝子群が  
激しく経時的に変化する

→ 特定のシグナルカスケードを描出できる可能性

## 高精度な発生毒性評価系を構築するには

化学物質投与 → 遺伝子発現変化 → 毒性発現

網羅的遺伝子  
発現解析

毒性

毒性発現の有無に関わらず  
遺伝子発現変化に着目した  
解析技術へ

### I. これまでの取り組み

1. 本手法の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 無処置野生型マウス・全胚における遺伝子発現変動の経時データベースの作成  
[マウス胎生6.25-9.75日][TIME POINT: 12点]
3. 催奇形性モデル物質「サイクロバミン」をマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析[標的分子の探索]
4. 催奇形性モデル物質「サリドマイド」をマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析[標的分子の探索]

### II. 本論

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の  
経時データベースの作成  
[EB形成0-7日][TIME POINT: 14点]
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析  
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

## I. これまでの取り組み

1. 本手法の実用性の検討  
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
2. 無処置野生型マウス・全胚における遺伝子発現変動の経時データベースの作成  
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT: 12点)
3. 催奇形性モデル物質「サイクロハミン」をマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析(標的分子の探索)
4. 催奇形性モデル物質「サリドマイド」をマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析(標的分子の探索)

## II. 本論(今年度報告)

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の  
本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚嚢体(EB)形成における遺伝子発現変動の  
経時データベースの作成  
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析  
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

## マウス胎生6.25-9.75日胚 [C57BL/6CrSlc]

Time point 12点



## データ活用例

### Mesp1の発現と似た経時変化を示す遺伝子群

ピアソン相関係数  $\alpha > 0.8$

