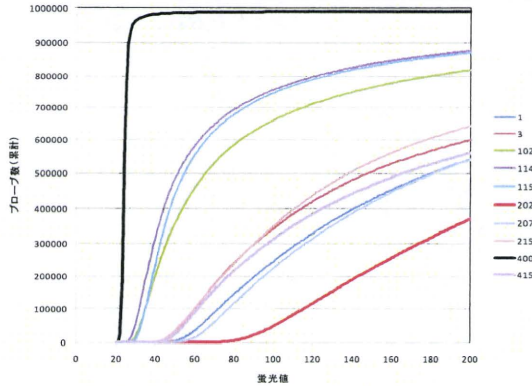


7.背景ターゲットによるアプローチ

非常に暗いプローブが値を有しているのは、光学的な状況から差が生じるものと考えた。しかし、暗いプローブの蛍光値は、光学的な背景の差よりも、クロスハイブリダイゼーションから発生する蛍光値の方が強い可能性も考えられる。



400(黒線): 検体なしの実験
BIOBCDなどが付着して、蛍光している可能性が存在する

202(赤線): EuLBM-25-75-050518
全スポットで明るくなっている。全体的にクロスハイブリダイゼーションの量が多くなった可能性がある

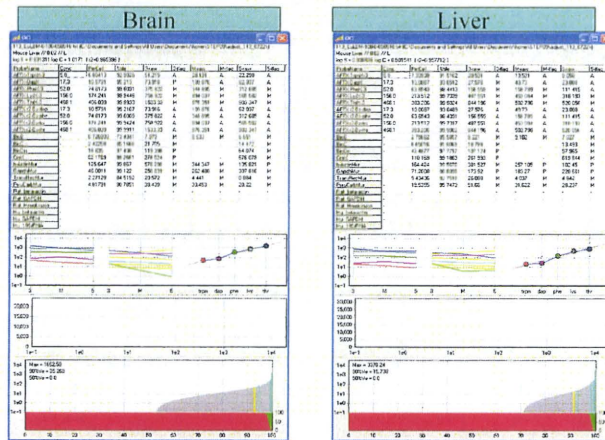
アイデア

下から5%の明るさのプローブに比例した量をMLANG上の背景物質(全プローブと結合し得る仮想ターゲット)として与える

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ

背景ターゲットを与え、計算を実施した。

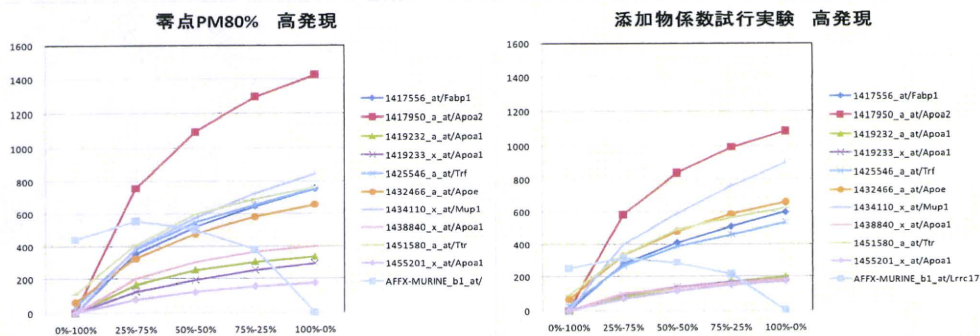


多くのプローブセットが濃度0と推定された。
通常、単一の臓器で使用される遺伝子は限定されており、半分程度が0となっているのは正しい結果と考えられる

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 零点を与えた場合vs.背景ターゲットを与えた場合

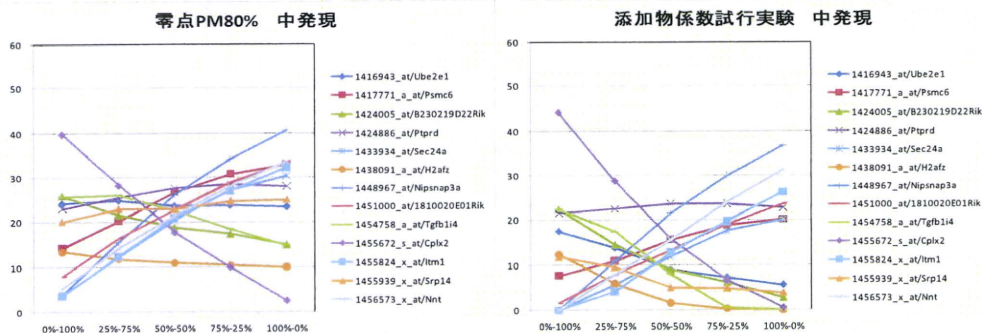
高発現域



背景ターゲットを与えたほうが、全体的に低い。Apoa1関連プローブセットがほぼ同じ値となった。

7.背景ターゲットによるアプローチ 零点を与えた場合vs.背景ターゲットを与えた場合

中発現域

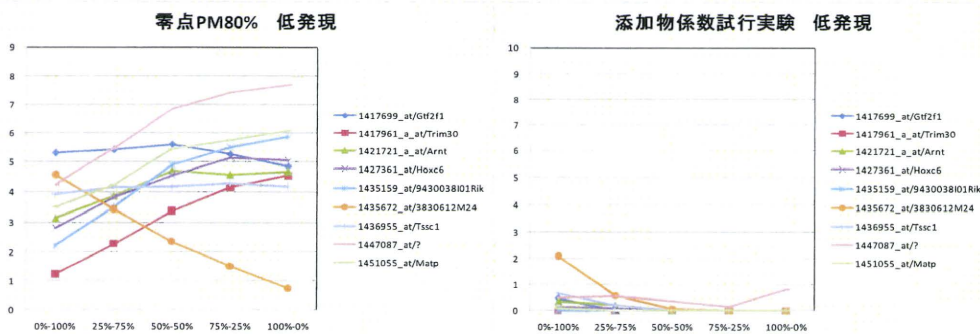


背景ターゲットを与えたほうが、全体的に低い。臓器ごとの発現遺伝子が明確になったものと思われる

7.背景ターゲットによるアプローチ 零点を与えた場合vs.背景ターゲットを与えた場合



低発現域



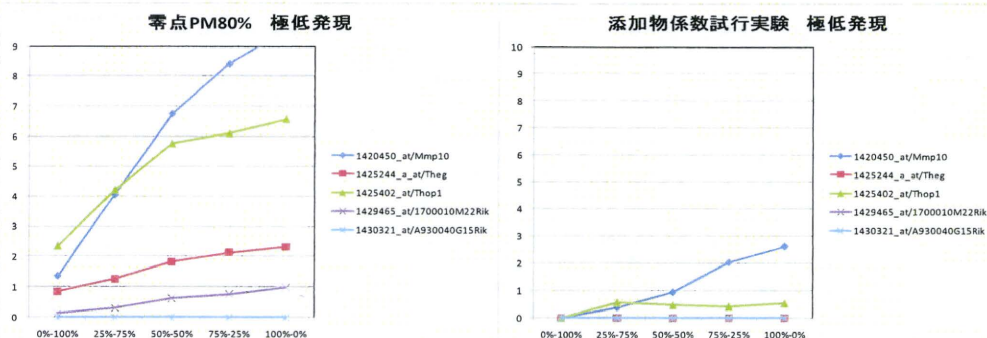
背景ターゲットを与えたほうが、全体的に低い。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 零点を与えた場合vs.背景ターゲットを与えた場合



極低発現域

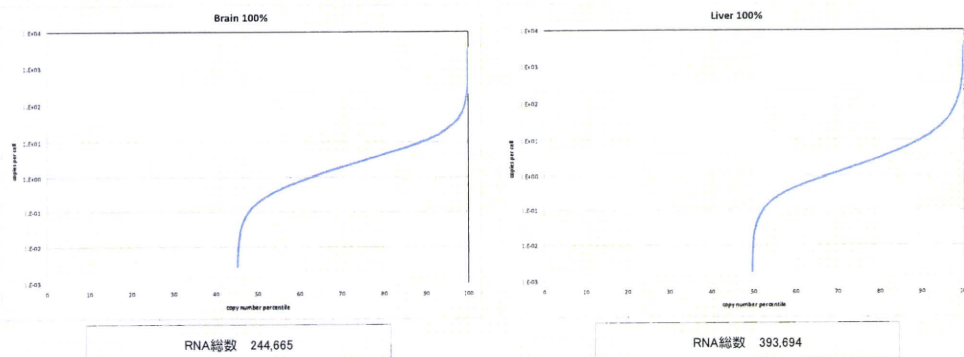


背景ターゲットを与えたほうが、全体的に低い。THEGは精巢特異的な遺伝子なので、脳・肝臓で発現しているとは考えにくく、0であるほうが良好な推定結果と考えられる

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 係数学習後の補正結果

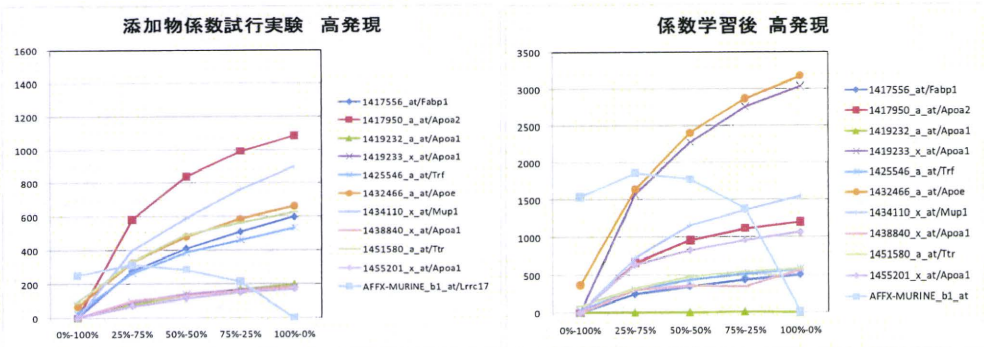
背景ターゲットを設定し、係数学習を進めた係数を用いて補正を行った。



全体の半分近くの遺伝子が0となっている。RNAコピー総数は、脳において約24万、肝臓において約29万であり、肝臓の活動を支えるために多くのタンパク質が必要である状態が窺えて、適切な推計結果と思われる。

7.背景ターゲットによるアプローチ 背景ターゲットを与えた場合 係数学習前vs.係数学習後

高発現域



添加物係数を与えたほうが、全体的に低い。Apoa1関連プローブセットがほぼ同じ値となった。

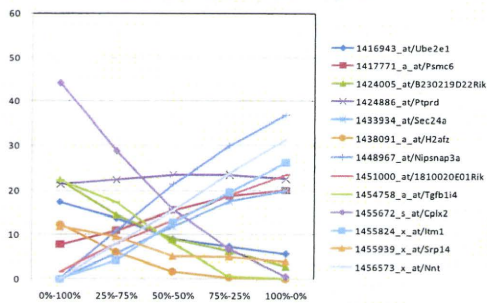
7.背景ターゲットによるアプローチ

背景ターゲットを与えた場合 係数学習前vs.係数学習後

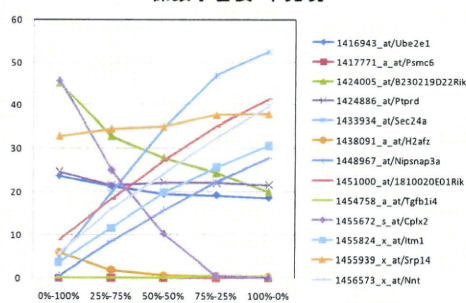


中発現域

添加物係数試行実験 中発現



係数学習後 中発現



添加物係数を与えたほうが、全体的に低い。臓器ごとの発現遺伝子が明確になったものと思われる

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

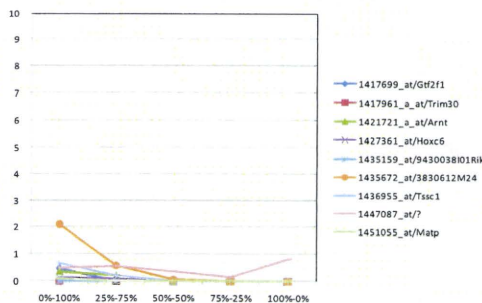
7.背景ターゲットによるアプローチ

背景ターゲットを与えた場合 係数学習前vs.係数学習後

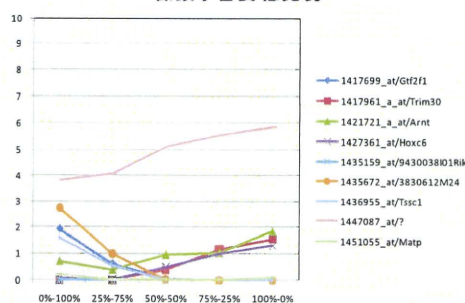


低発現域

添加物係数試行実験 低発現



係数学習後 低発現



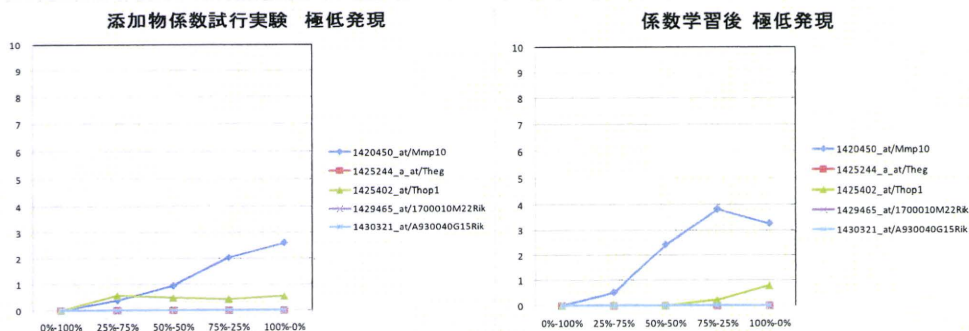
添加物係数を与えたほうが、全体的に低い。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ

背景ターゲットを与えた場合 係数学習前vs.係数学習後

極低発現域



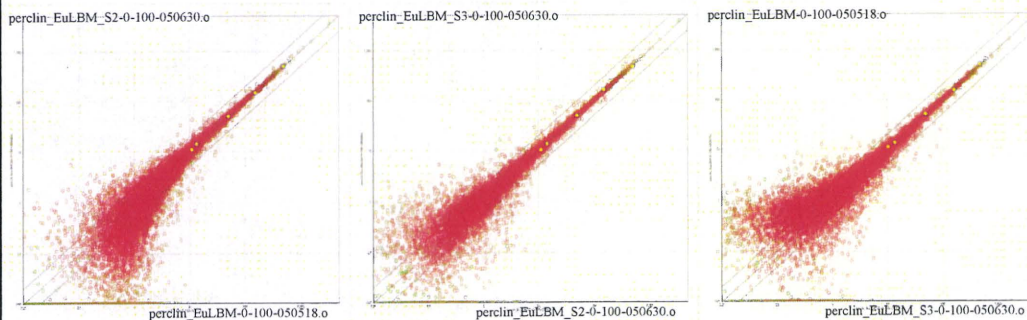
添加物係数を与えたほうが、全体的に低い。たとえば、THEGは精巣特異的な遺伝子なので、脳・肝臓で発現しているとは考えにくい

7.背景ターゲットによるアプローチ

散布図による確認

Liver-Brain-Mixtureの三重化実験データを用いて、低発現域における偏差を確認した。

Liver0%-Brain100% 三重化データをサイクリックに散布図を作成した



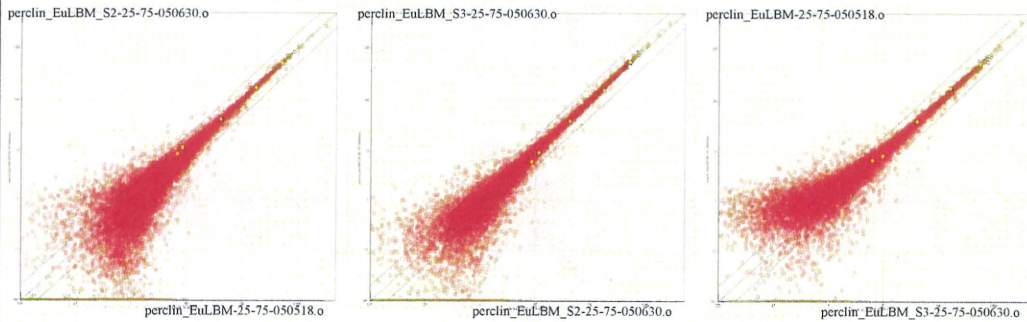
EuLBM-0-100-050518が他の2チップよりも、少し大きな値となっているが、1コピー以下である

7.背景ターゲットによるアプローチ 散布図による確認



Liver-Brain-Mixtureの三重化実験データを用いて、低発現域における偏差を確認した。

Liver25%-Brain75% 三重化データをサイクリックに散布図を作成した



EuLBM-25-75-050518が他の2チップよりも、少し大きな値となっているが、1コピー以下である

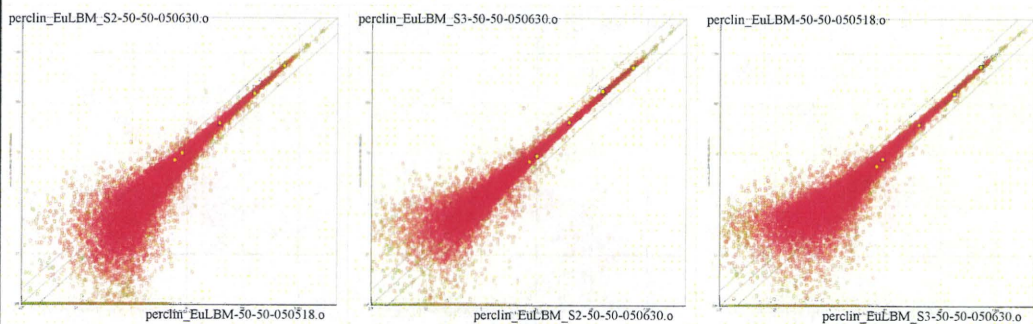
Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 散布図による確認



Liver-Brain-Mixtureの三重化実験データを用いて、低発現域における偏差を確認した。

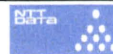
Liver50%-Brain50% 三重化データをサイクリックに散布図を作成した



EuLBM-50-50-050518が最も高く、EuLBM_S3-50-50-050630が最も低く出ている。しかし、その差も1コピー以下である

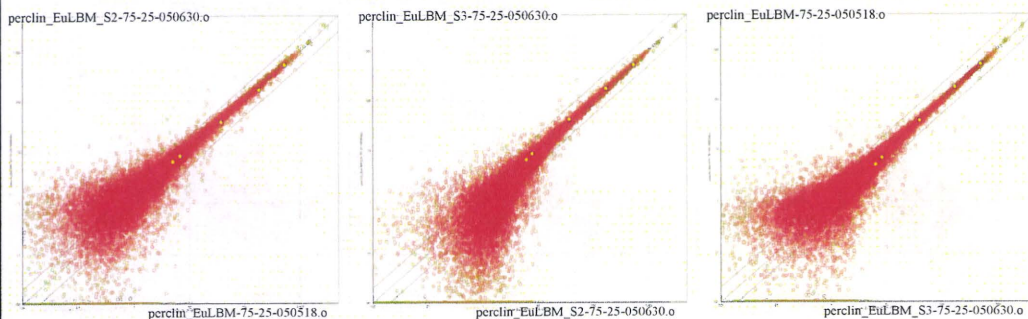
Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 散布図による確認



Liver-Brain-Mixtureの三重化実験データを用いて、低発現域における偏差を確認した。

Liver25%-Brain75% 三重化データをサイクリックに散布図を作成した



EuLBM_S3-75-25-050630が最も低く出ている。その差は1コピー以下である

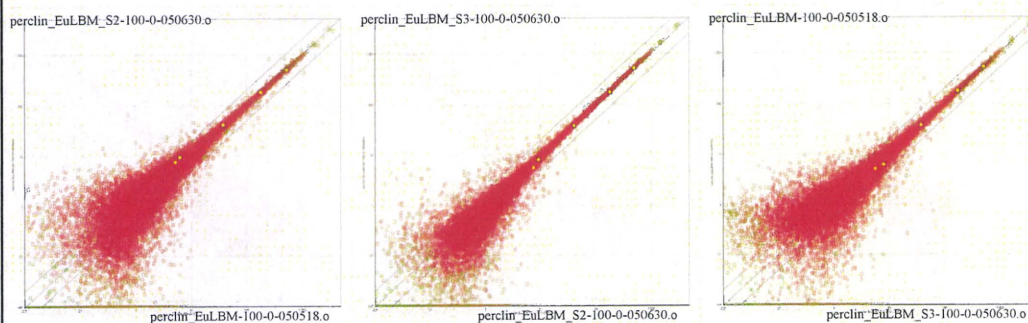
Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

7.背景ターゲットによるアプローチ 散布図による確認



Liver-Brain-Mixtureの三重化実験データを用いて、低発現域における偏差を確認した。

Liver25%-Brain75% 三重化データをサイクリックに散布図を作成した



EuLBM_S3-25-75-050518が小さく、EuLBM-100-0-050518が最も大きい、その差は、1コピー以下である

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

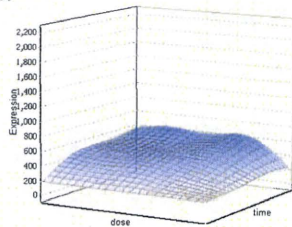
7.背景ターゲットによるアプローチ TTG020(TCDD処置)補正結果



TTG020(TCDD処置)の結果を用いて、実データに対する補正の精度を確認した。

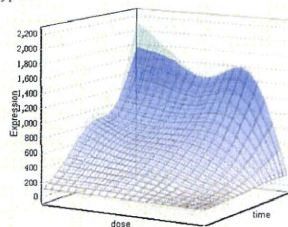
MAS5、MLANG、QPCRによる測定結果を比較した。

TTG020-L_SpNC_0_480715_at
Cyp1a2



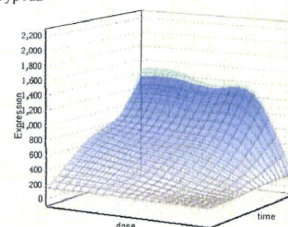
MAS5

perclin_TTG020-L_20110126
Cyp1a2



MLANG

TTG020-L_QPCR_SpNC_0
Cyp1a2



QPCR

MAS5では飽和により見えなかった値を含め再現されている。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

8.まとめ



- ・ べき乗分布で光学的背景レベルを導き出すのは、数値計算上の安定性に問題があった。
- ・ 一定比で添加しているRNAを用いて、背景レベルを導き出すのは、最低濃度が高めに出てしまい、直線性が失われて、安定性が低下していると考えられた。
- ・ 仮想的に全プローブと弱いハイブリダイゼーションが発生する背景となるターゲットRNAを導入することで、低発現の異常な変動を抑えることができた。
 - 肝臓、脳で、半数のプローブセットが0と推定された。
 - 三重化された実験において、偏差は1コピー以内に抑えられた。
- ・ 試行した三手法で、背景ターゲットを導入する方法が、安定した値を算出することができた。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

2011年2月1日(火) 15:00~17:30
東京国際フォーラム G403室

平成22年度厚生労働科学研究補助金 化学物質リスク研究事業
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究
-網羅的定量的大規模トキシゲノミクスデータベースの維持・拡充と
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発-

**既構築Perce llomeデータベース解析
—特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと
既知情報からの局所カスケードの描出—**

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
菅野 純

目 的

分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関
連遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発を目的とする

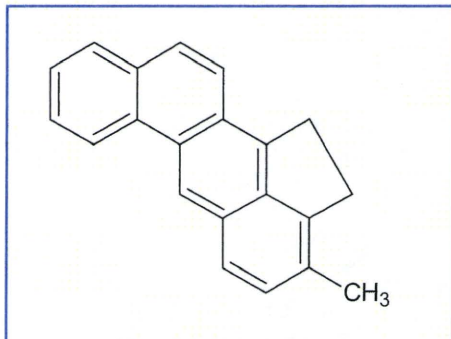
今年度(平成22年度): ダイオキシン受容体(AhR)シグナルのネットワークの検証

⇒ AhR欠失マウスに、AhRのリガンドである3-メチルコラントレン(3MC) (0, 10,
30, 100 mg/kg) を単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)し、投与2、4、8
、24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析

比較

AhR欠失マウス ⇔ 野生型マウス [C57BL/6]

3-メチルコラントレン [3-methylcholanthrene]



多環性芳香族化合物

淡黄色針状結晶

CAS 番号: 56-49-5

分子量: 268.35

純度: 98%

最小致死量: 336 mg/kg [マウス経口]

発がん性物質

Sigma-Aldrich社製

3-メチルコラントレン (3MC) 単回経口投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

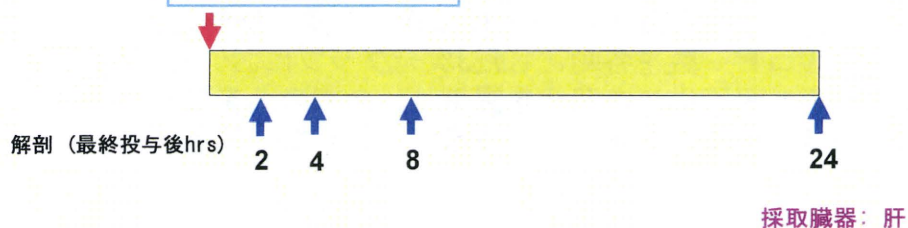
単回強制経口投与

V: コーンオイル

L: 10 mg/kg

M: 30 mg/kg

H: 100 mg/kg



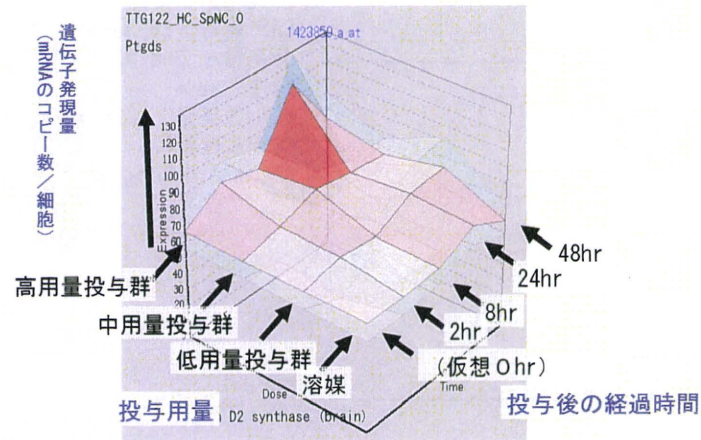
比較

AhR欠失マウス ⇔ 野生型マウス [C57BL/6]

遺伝子発現変動解析実験 表示例

C57BL/6 マウス (♂) (各点n=3、計48匹)

濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフ
あわせて、各平面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す



Ptgds
prostaglandin D2 synthase (brain)

RSortによる解析 :

各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替える、独自に開発したソフト

RSort解析 3-メチルコラントレン 肝

野生型マウスとAhR欠失マウスの比較

有意 ($P < 0.05$) に増加および減少したPS数と、目視で生物学的変化と示唆されたPS数
(→)

野生型マウス

増加

2,088 ps
→ 659 ps

減少

304 ps
→ 26 ps

AhR欠失マウス

増加

692 ps
→ 172 ps

減少

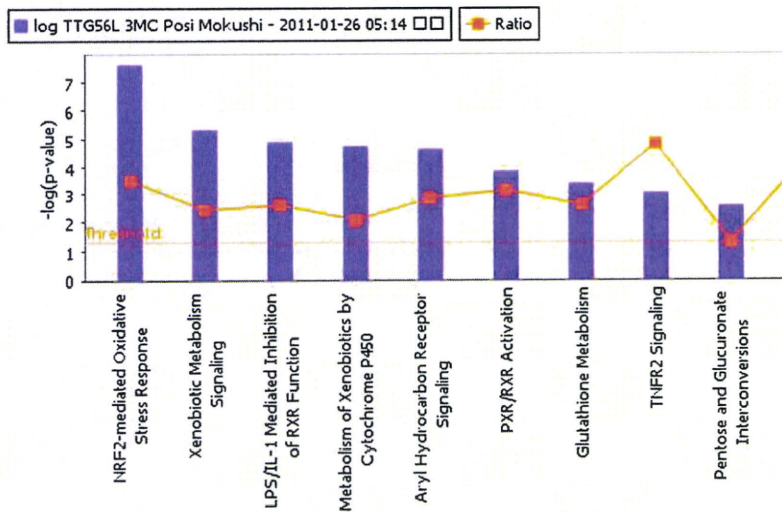
2,025 ps
→ 44 ps

3-メチルコラントレン投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

野生型マウス

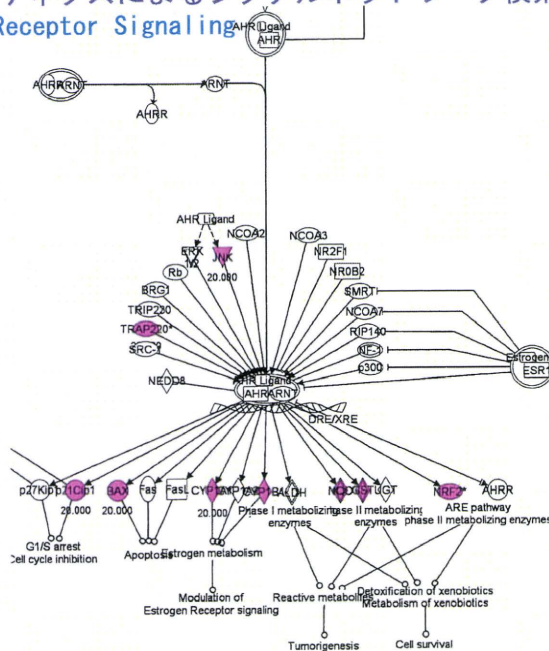
- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの：659 ps
- ・市販のインフォマティクス (IPA) による検索：[Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling, Xenobiotic Metabolism Signaling, Metabolism of Xenobiotics by P450, Nrf2-mediated Oxidative Stress](#)
- ・Cyp1a1, Cyp1b1, Tiparp, Nqo1をはじめ多くの、また変動幅の大きな発現増加
→肝でAhR関連シグナルの活性化：薬物代謝酵素の誘導、酸化的ストレスシグナルが活性化されている
- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの：26 ps
- ・市販のインフォマティクス (IPA) による検索：シグナルネットワークの抽出なし
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

市販のインフォマティクスによるシグナルネットワーク検索 (IPA) :
 Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling, Xenobiotic Metabolism Signaling,
 Metabolism of Xenobiotics by P450, Nrf2-mediated Oxidative Stress



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

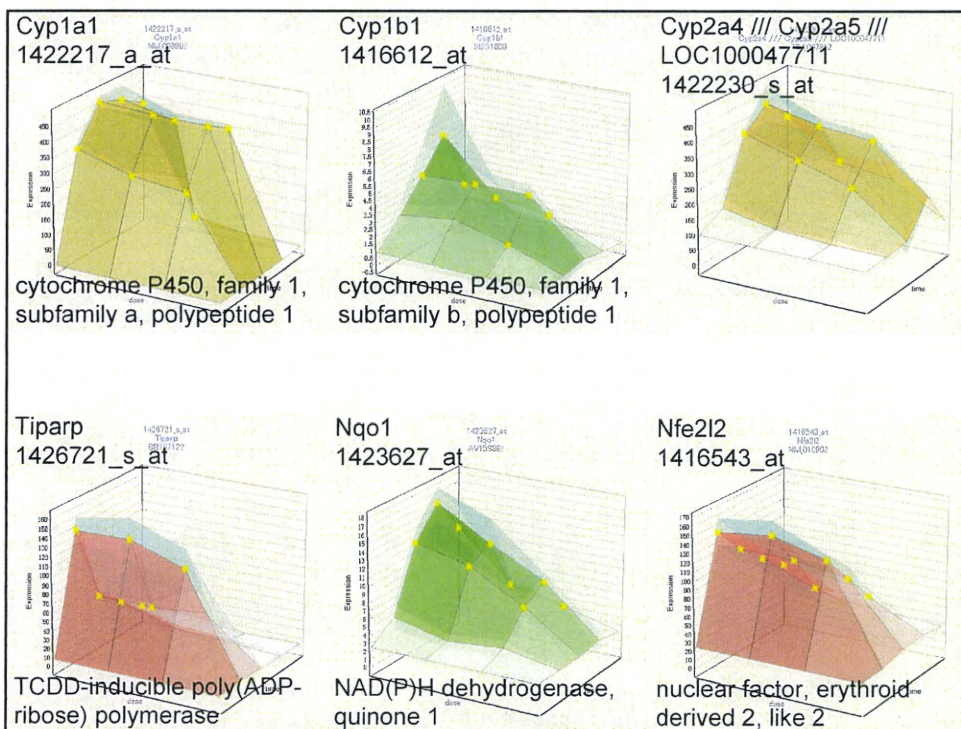
市販のインフォマティクスによるシグナルネットワーク検索 (IPA) :
 Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling

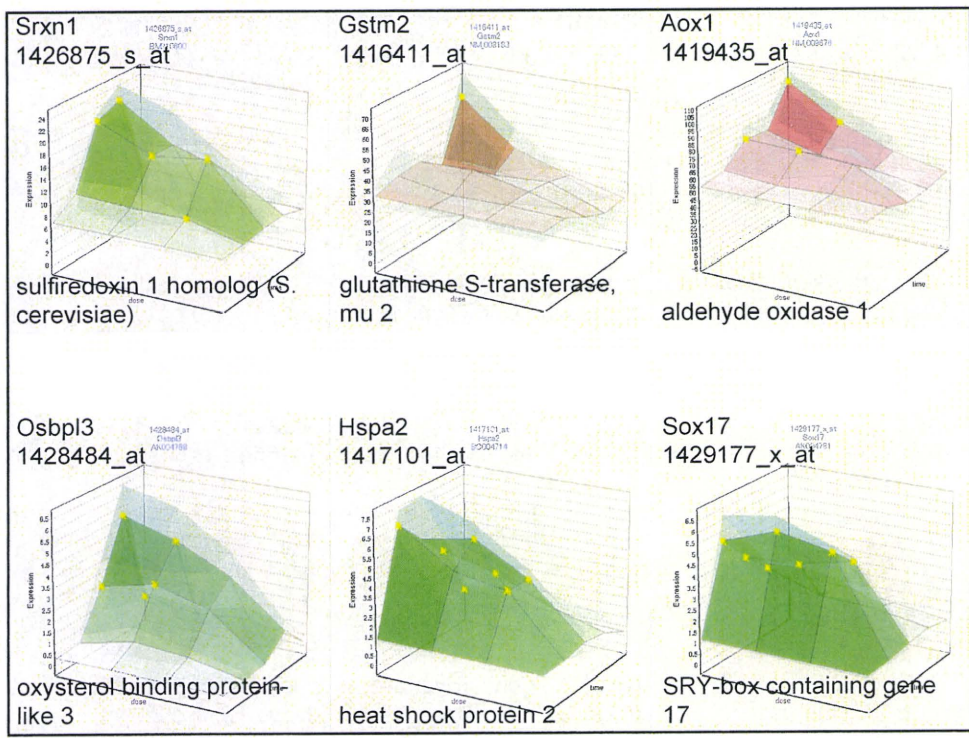
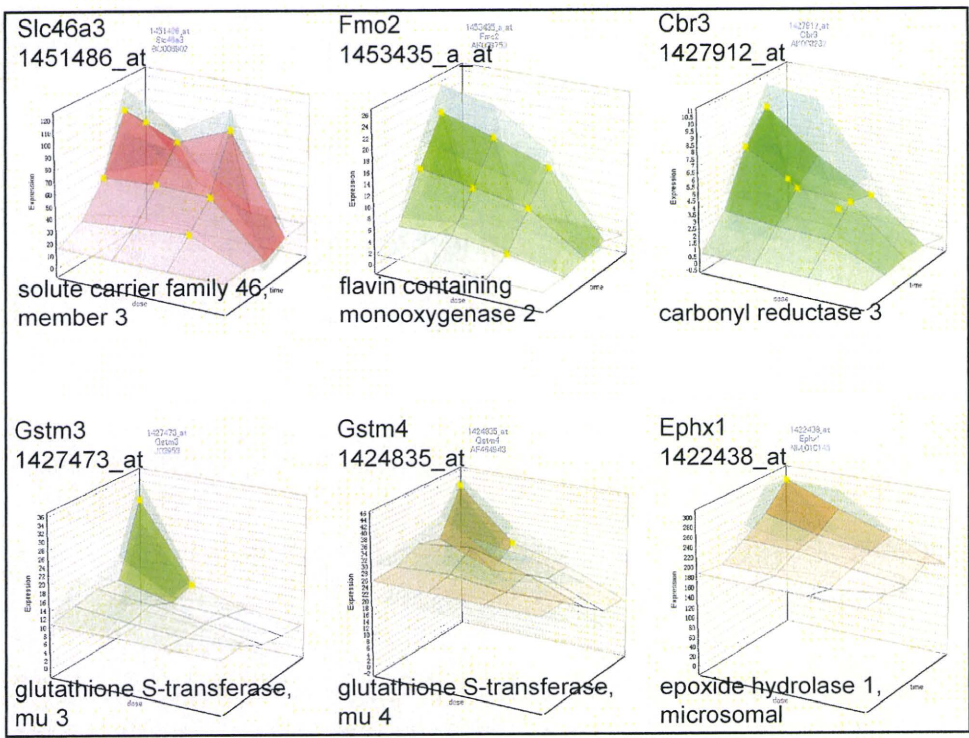


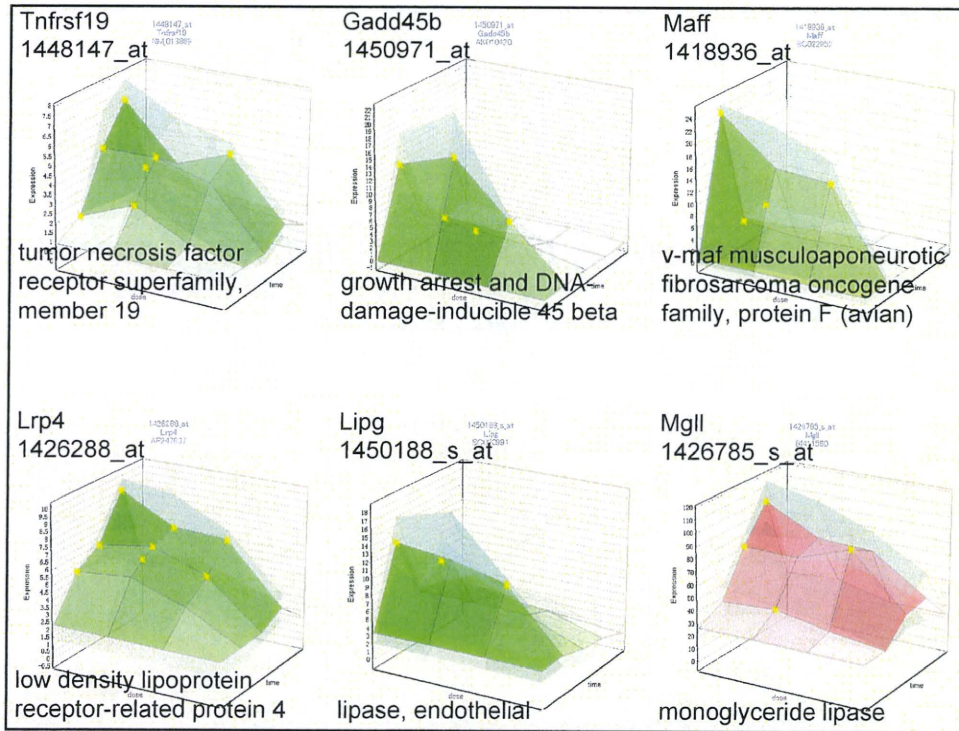
3-メチルコラントレン投与時の
肝における網羅的遺伝子発現変動解析

野生型マウス肝での発現増加した遺伝子

発現変化を3次元表示 例







3-メチルコラントレン投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

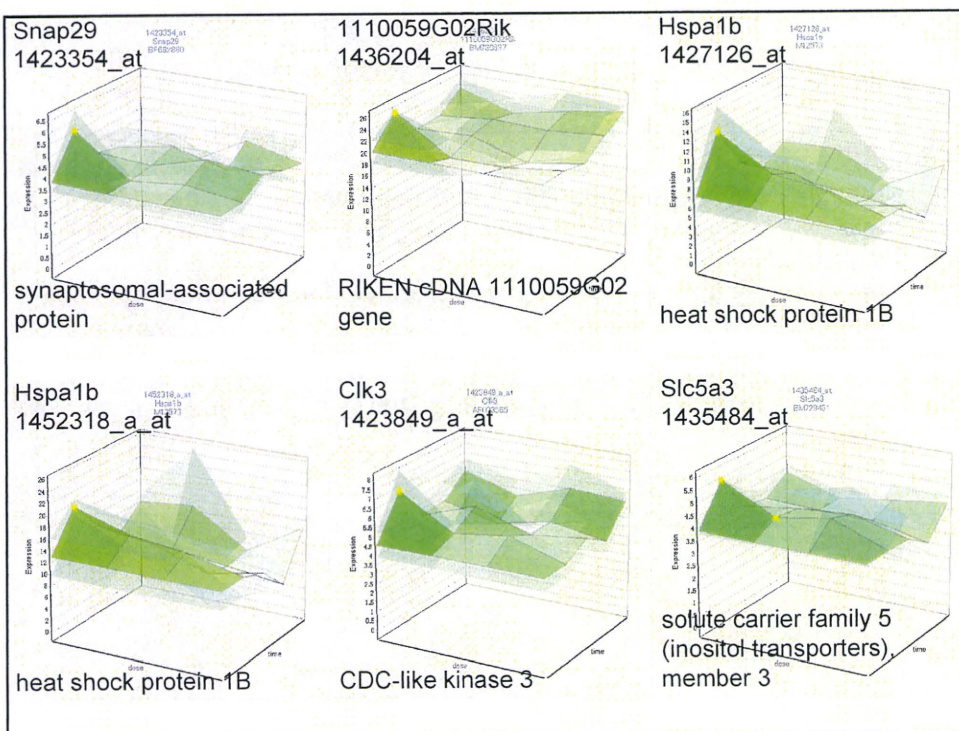
AhR欠失マウス

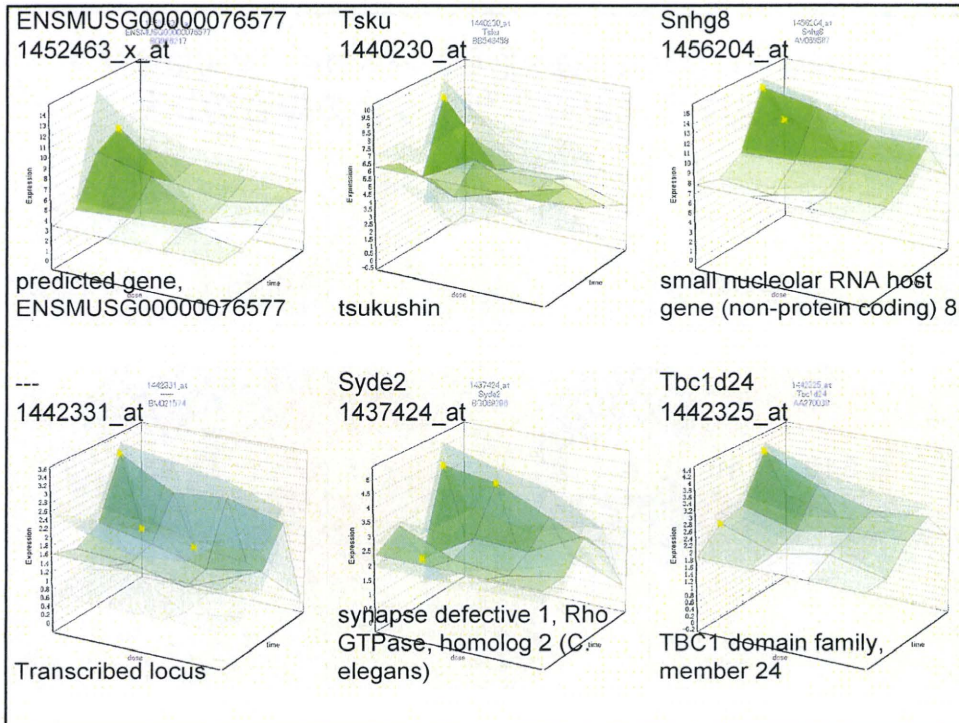
- ・ 生物学的に発現**増加**が示唆されたもの : 172 ps
- ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索 : シグナルネットワークの抽出なし
- ・ 現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。
- ・ 生物学的に発現**減少**が示唆されたもの : 44 ps
- ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索 : シグナルネットワークの抽出なし
- ・ 現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

3-メチルコラントレン投与時の
肝における網羅的遺伝子発現変動解析

AhR欠失マウス肝での発現増加した遺伝子

発現変化を3次元表示 例

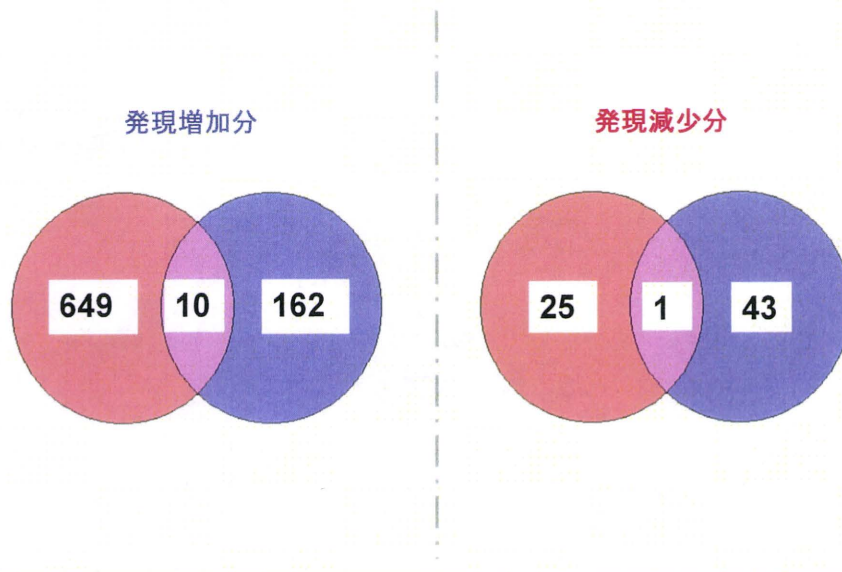




3MCを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析

AhR欠失マウスと野生型マウスの場合の比較

3MCを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析
AhR欠失マウスと野生型マウスの場合の比較



AhRシグナルに関連すると考えられる遺伝子の多くはAhR欠失マウスにて発現変動が著しく抑制されたこととなる

遺伝子の発現変動について
野生型マウスとAhR欠失マウスで比較 例