

## 検証を行ったバイオマーカー(グレードIV→III)

- グルタチオン(GSH)枯渇マーカー(ラット単回投与, 肝臓)  
Kiyosawa *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 32, 469-486, 2007  
Gao *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* 247, 211-221, 2010
- リン脂質症マーカー(ラット反復投与, 肝臓)  
Hirode *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* 229, 290-299, 2008
- リン脂質症マーカー(ラット初代培養肝細胞)
- 血液凝固不全マーカー(ラット反復投与, 肝臓)  
Hirode *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 34, 281-293, 2009
- PPAR $\alpha$ アゴニストマーカー(ラット単回肝臓, ラット肝細胞, ヒト肝細胞)  
Tamura *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 31, 471-490, 2006

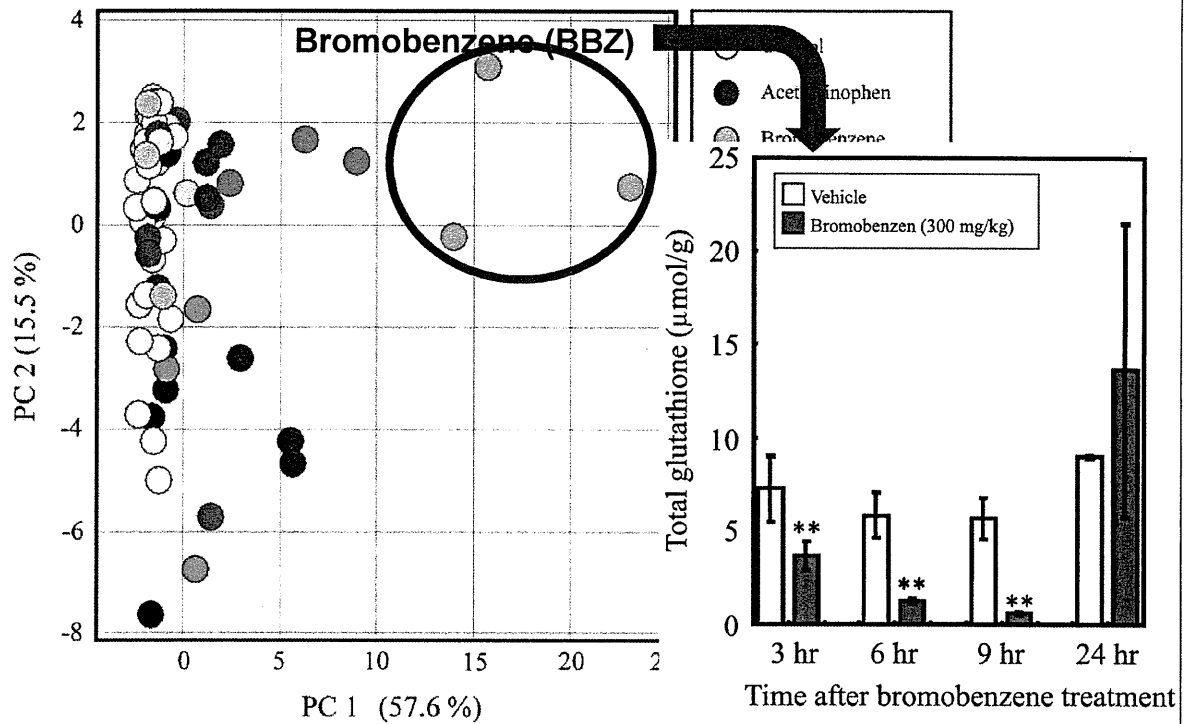
## 検証を行ったバイオマーカー(グレードIV→III)

- グルタチオン(GSH)枯渇マーカー(ラット単回投与, 肝臓)  
Kiyosawa *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 32, 469-486, 2007  
Gao *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* 247, 211-221, 2010

ラット *in vivo* 肝臓でホロン(PHO)投与でGSH量変化と逆相関する遺伝子を抽出:161プローブセット

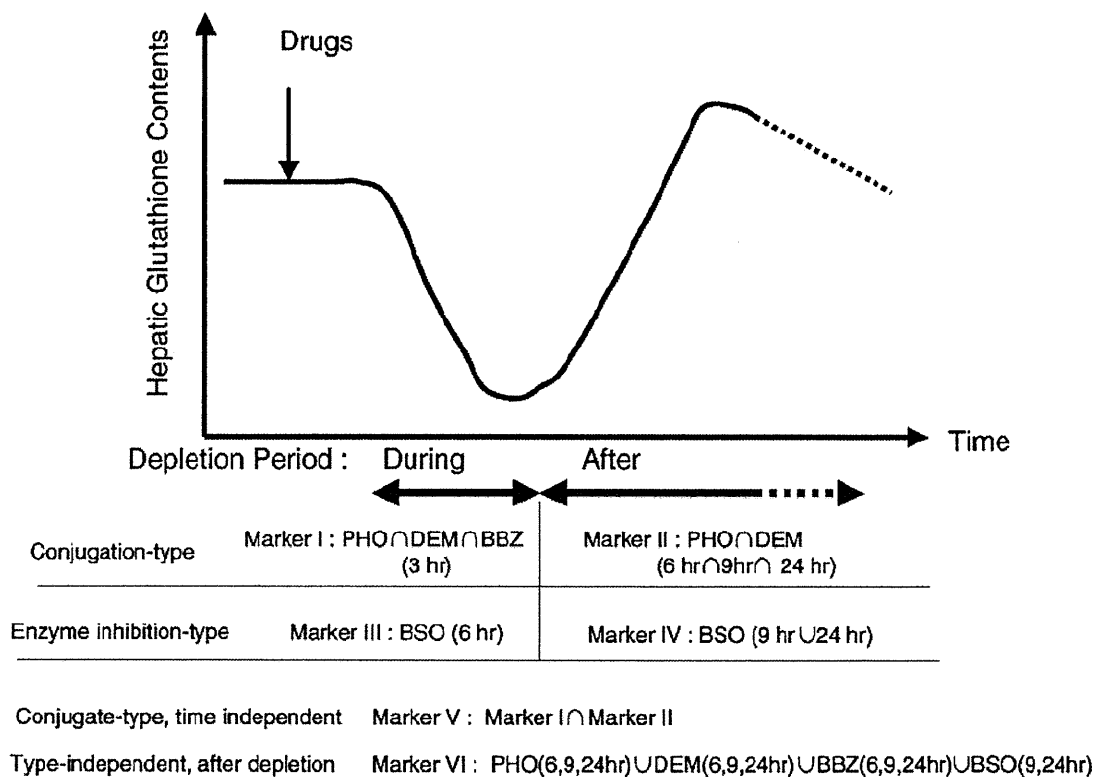


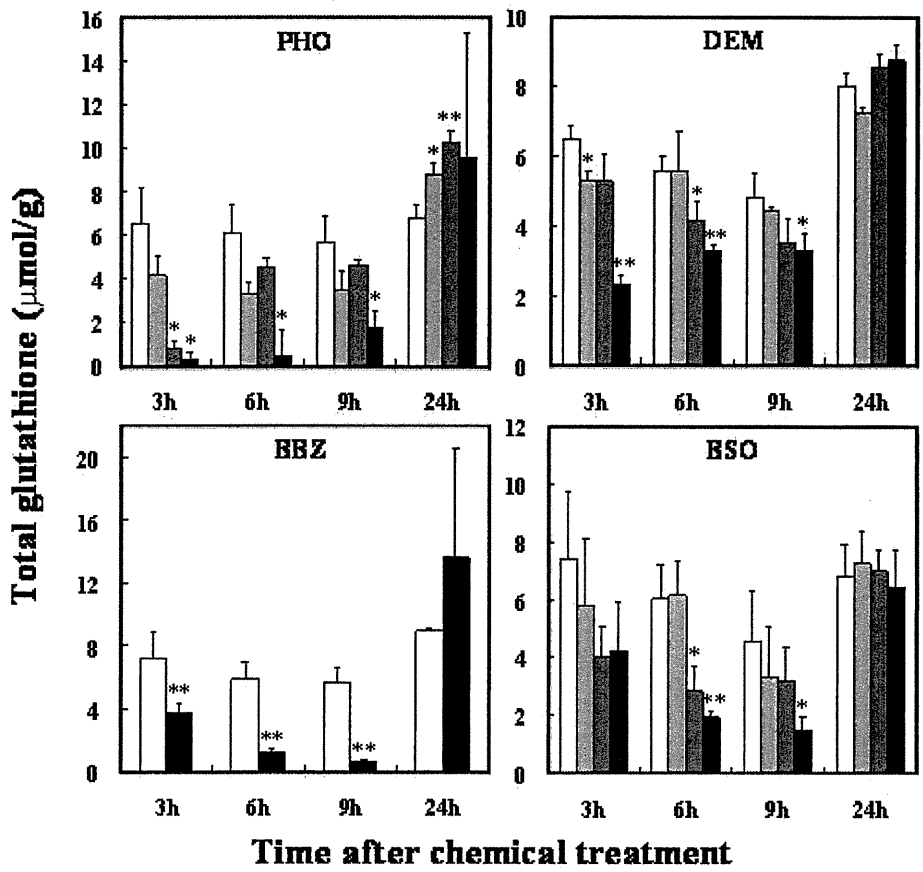
TG-GATEsの15化合物の24hデータを用いて主成分分析(PCA)



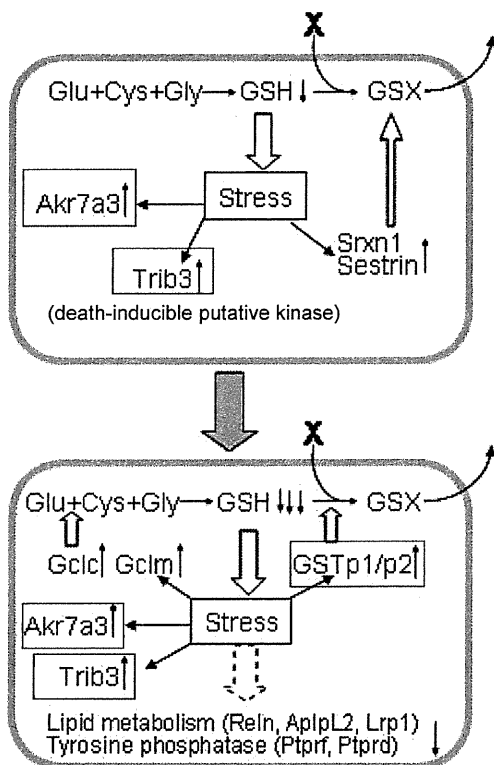
GSH減少・回復のタイムコースとGSH枯渇メカニズムを考慮して改めて遺伝子セット抽出

(Gao et al., *Toxicol. App. Pharmacol.* 247, 211-221, 2010)

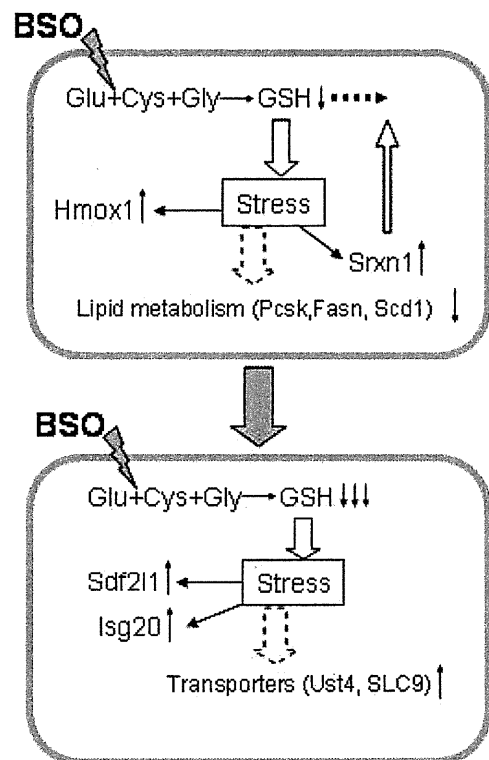




### A. Conjugate-type



### B. Enzyme inhibition-type



# TGP1 score (Kiyosawa *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* **31**, 433-448, 2006)をヒートマップで表示

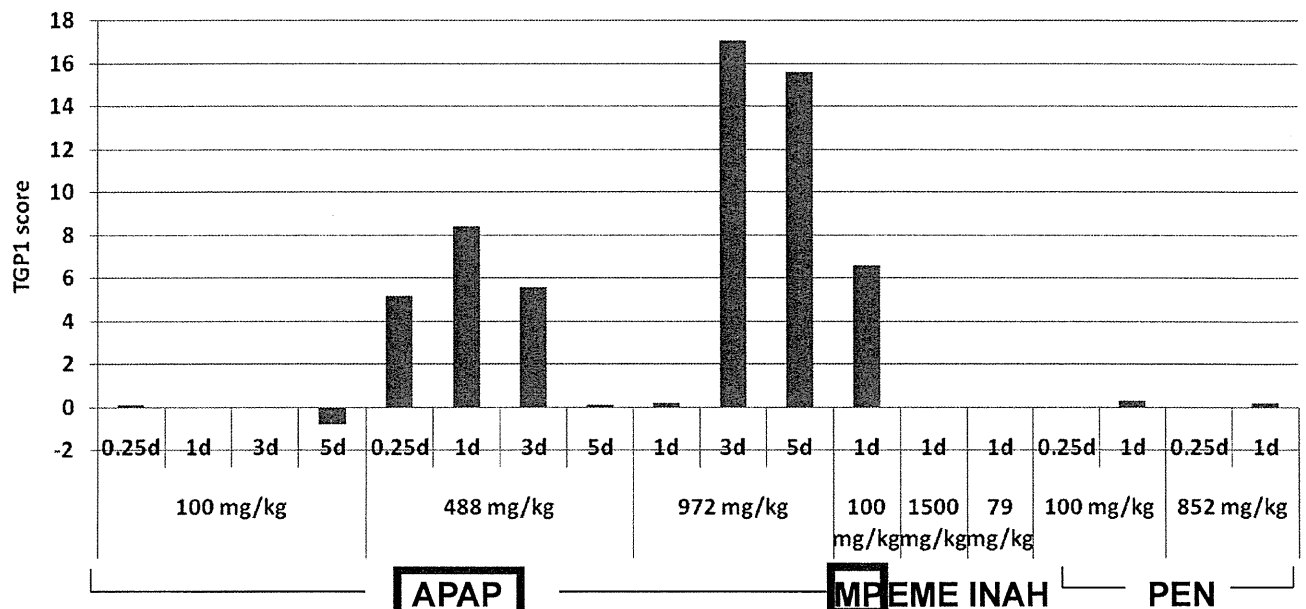
A

	3 hr	3 hr	3 hr	6 hr	6 hr	6 hr	9 hr	9 hr	9 hr	24 hr	24 hr	24 hr
	Low	Middle	High	Low	Middle	High	Low	Middle	High	Low	Middle	High
INAH	4.3	2.5	-0.8	39	80.9	40.2	-3.2	32.9	12	22.2		
TAA	-0.1	0	-0.1	0.7	0.6	-6.8	2.1	-0.3	1.1	-2.4	-8.3	-2.5
ET	-0.8	0.3	1.2	0	1.7	1.9	-3.3	0.7	1.2	3.1	76.7	166.8
HCB	-1.4	-7.4	-0.9	-3.9	-8	-16	-2.1	-0.4	-0.6	-0.9	0	5.6
	0.2	2.9	72.3	3	45.1		2.5	15.5	301.1	-0.4	2.3	133.4
	56.7	26.6	2.6	145.1	197.2	-0.1	232.8			30.1		
	27.5	31.8	163.7	39.3	176.5		80.3	327.9		206.9	26.4	
PH	0.3	1.7	4.8	1.7	-0.1	-22	12.4	7.4	2.2	0.1	-0.6	0.3
GBC	-4	-0.3	-0.1	-8.2	-7.1	0.2	0.2	-1.2	0.1	-6.5	-4.8	0.6
	57.7	36.1	155.3	113.6			175.5			4.5	36.2	
EME	0	0	-0.1	1.8	-0.3	6.3	-6.5	-1.2	-1.4	-0.5	4.3	0.7
PEN	-4.1	0.6	-0.6	17.8	0.3	13.8	-0.1	5.2	11.9	-0.9	-0.2	-0.2
	27.9			128.9			89.3			1.2	117.5	
BSO	0.6	0.1	0.7	-0.1	-0.2	0.1	6.1	3.2	26.8	1.4	-1.3	35.8
	42.4	67.7		154.3			38.2			3.7	84	
GMC	-0.1	0	-0.5	-0.2	5.9	21.2	0.2	0.3	-1.6	2.3	0.7	-0.2

Probe set ID	Gene name	Gene symbol
1368121_at	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	Akr7a3
1386321_s_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3
1388122_at	glutathione S-transferase, pi 1	Gstp1

## 外部データ (NCBI GEO GSE8858) を用いて検証

TGP1 scoreで評価



☐ : 陽性化合物

## 検証を行ったバイオマーカー(グレードIV→III)

●リン脂質症マーカー(ラット反復投与, 肝臓)

Hirode *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* 229, 290-299, 2008

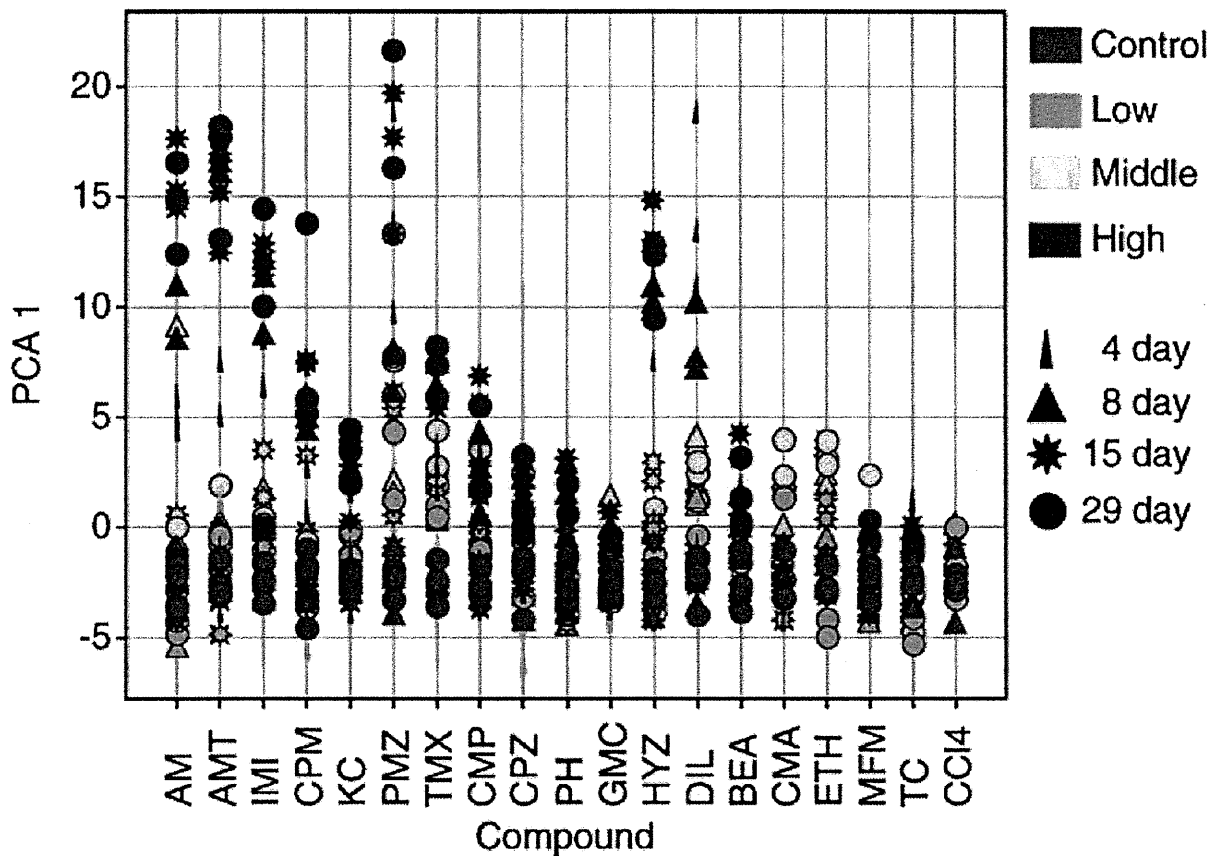
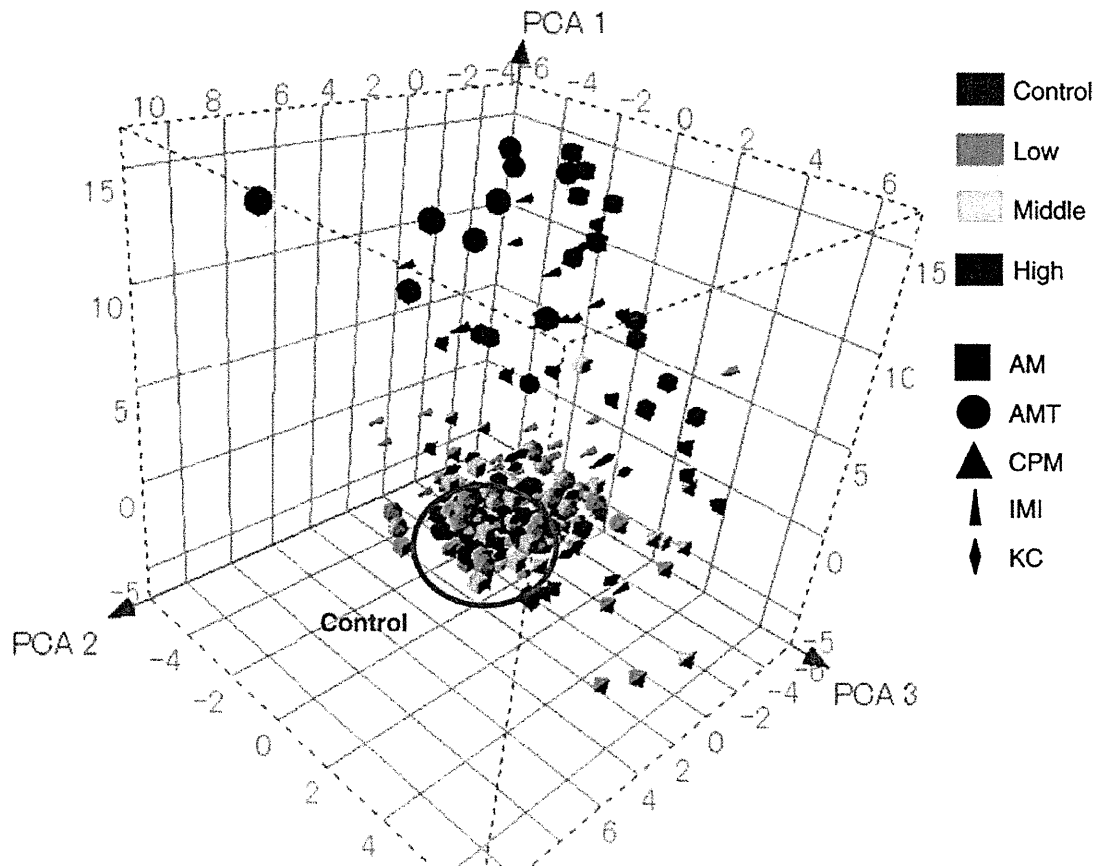
リン脂質症を引き起こす5化合物 [amiodarone (AM), amitriptyline (AMT), clomipramine (CPM), imipramine (IMI), ketoconazole (KC)] それぞれ3, 7, 14, 28日間連続投与後24時間で摘出した肝臓の発現データを用い, いずれかの時点で変動のあった遺伝子をANOVA(ウェルチの方法)で抽出



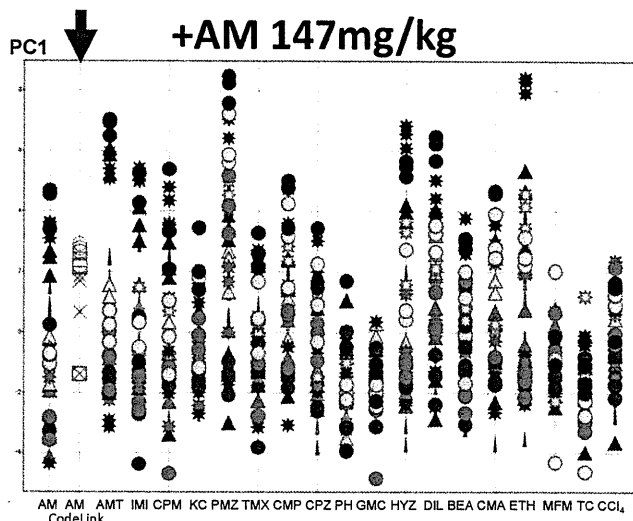
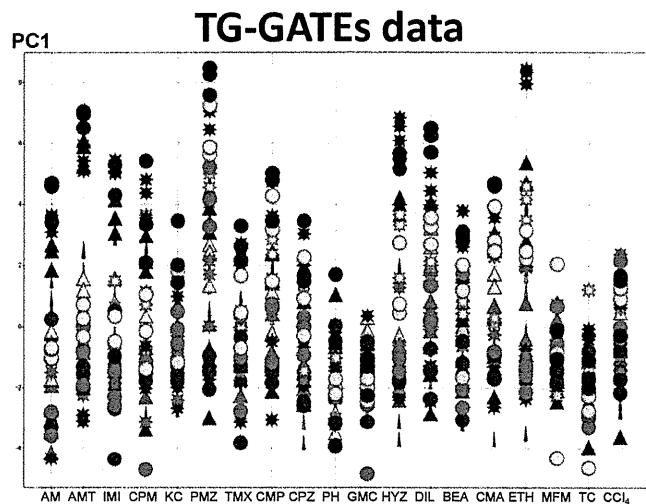
5化合物で共通に変動のあったもの : 78 probe sets



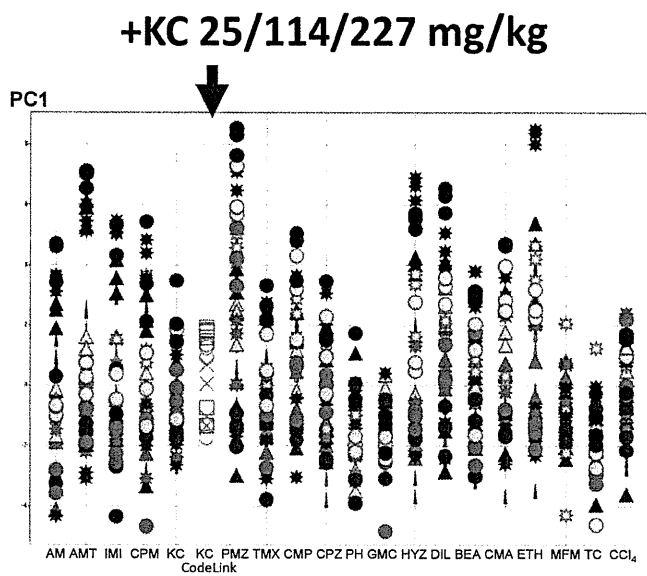
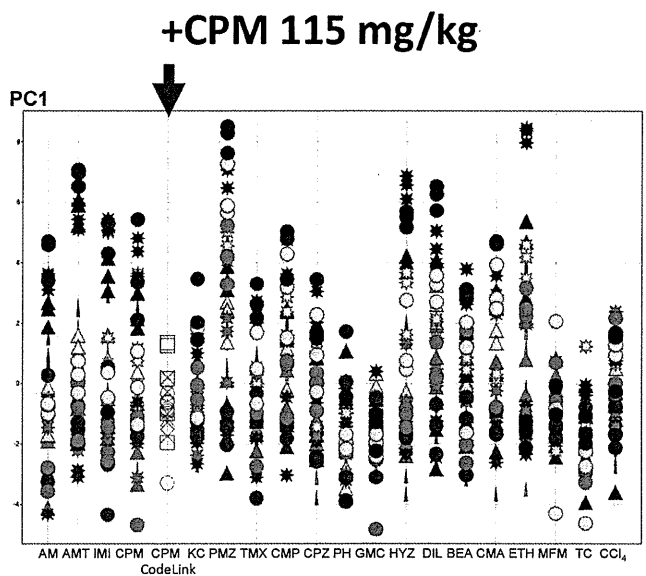
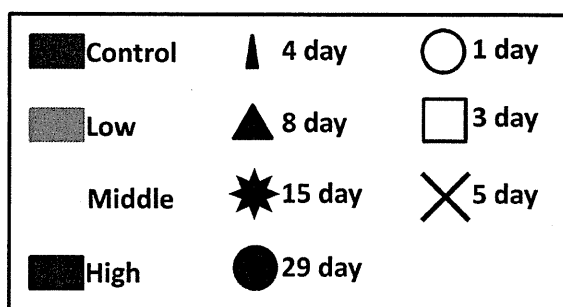
PCAを行う



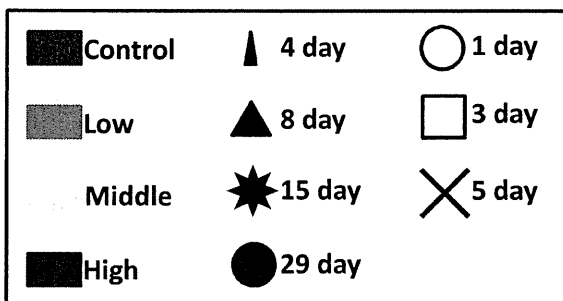
# 遺伝子数を絞って外部データ (NCBI GEO GSE8858) で検証



	TGP Dose(mg/kg)		
	Low	Middle	High
AM	20	60	200
CPM	10	30	100
KC	10	30	100



	TGP Dose(mg/kg)		
	Low	Middle	High
AM	20	60	200
CPM	10	30	100
KC	10	30	100



## 選択された14 probe sets

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol
1387759_s_at	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	Ugt1a1
1387022_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Aldh1a1
1371076_at	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 15	Cyp2b15
1387118_at	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 1	Cyp3a1
1371089_at	glutathione S-transferase Yc2 subunit	Yc2
1370613_s_at	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	Ugt1a1
1368977_a_at	fractured callus expressed transcript 1	Fxc1
1387669_a_at	epoxide hydrolase 1, microsomal	Ephx1
1370698_at	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	Ugt2b17
1372602_at	starch binding domain 1	Stbd1
1368275_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	Sc4mol
1371875_at	mannosidase, beta A, lysosomal	Manba
1371809_at	mitochondrial ribosomal protein S18B	Mrps18b
1373924_at	calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1	Cpped1

リン脂質症マーカーとして提案されている遺伝子セット  
・・・他に2種類

いずれもラット*in vivo*肝臓データに適用  
しかし共通遺伝子少ない



検証のため*in vitro*の系を構築




メカニズムを含めて比較解析




# 方法

雄性ラット [CrI:CD(SD)], 6週齢  
 門脈より灌流, コラゲナーゼで消化, 肝臓を取り出し細切,  
 100µmナイロンメッシュで濾過, 3回洗浄



↓  
 コラーゲンコート24ウェルプレート(2 × 10<sup>5</sup>cells/well)に撒く 

↓ 約20時間後  
 化合物・リン脂質症検出色素曝露 

↓ 24時間後  
 リン脂質症および脂肪化の検出  
 HCS LipidTOX Phospholipidosis and Steatosis detection kit  
 (Invitrogen) を用いて固定・染色

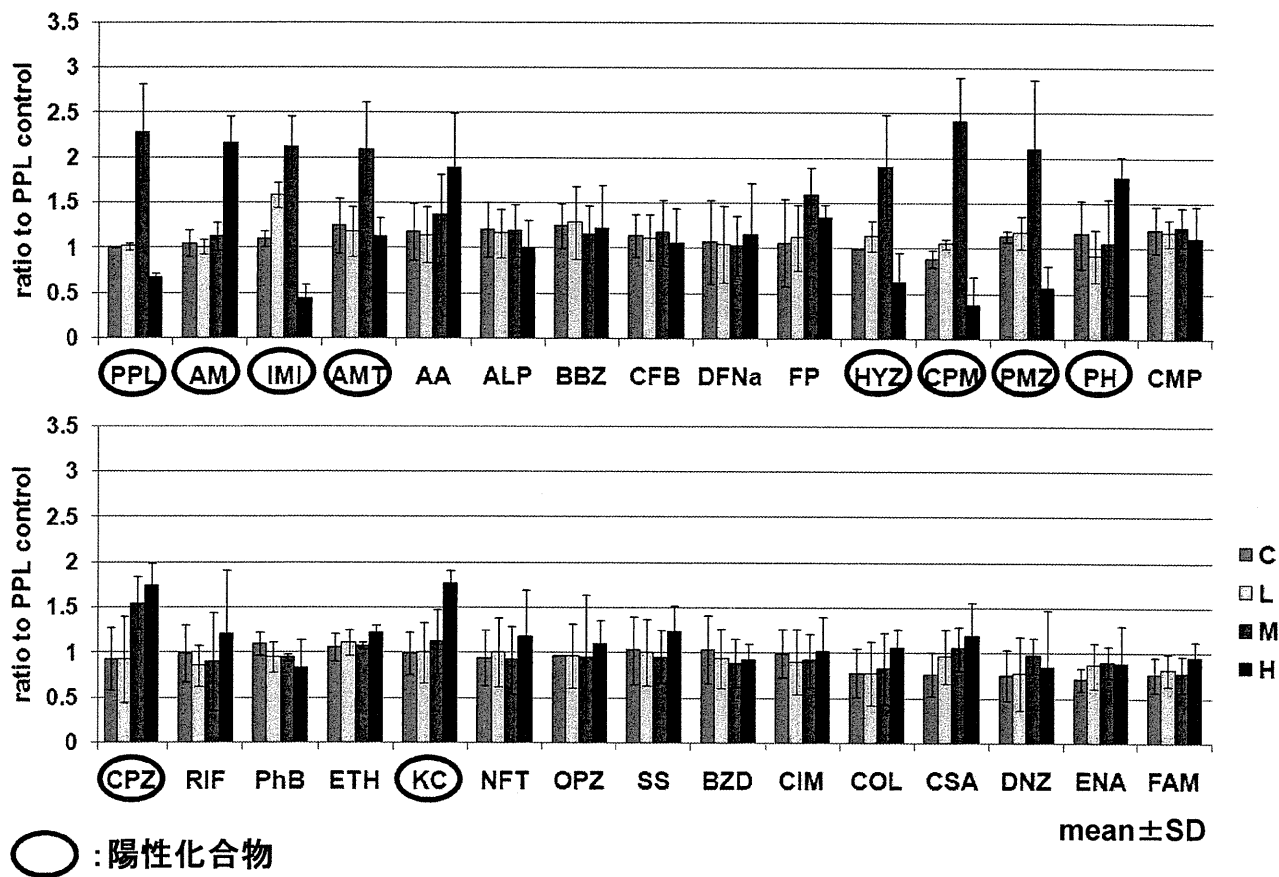
↓  
 イメージアナライザーFLA-5100   
 (Fuji Film)で蛍光画像取得, 定量

## 使用した化合物

compound name	abbrv.	L_dose (µM)	M_dose (µM)	H_dose (µM)	vehicle	TGP pathology (vacuolization)
propranolol	PPL	5	30	150	DMSO	-
amiodarone	AM	0.28	1.4	7	DMSO	day8-29
imipramine	IMI	4	20	100	DMSO	day8-29
amitriptyline	AMT	2.4	12	60	DMSO	day8-29
hydroxyzine	HYZ	6	30	150	culture medium	day15-29
clomipramine	CPM	1.6	8	40	DMSO	day29
promethazine	PMZ	3.2	16	80	DMSO	ND
perhexiline	PH	0.4	2	10	DMSO	ND
chloramphenicol	CMP	18	90	450	DMSO	ND
chlorpromazine	CPZ	0.8	4	20	DMSO	ND
rifampicin	RIF	2.8	14	70	DMSO	9-24h
phenylbutazone	PhB	16	80	400	DMSO	9h
ethionamide	ETH	24	120	600	DMSO	3,6,24h, day4-29
ketoconazole	KC	0.6	3	15	DMSO	day4-29
allyl alcohol	AA	0.8	4	20	culture medium	ND
allopurinol	APL	5.6	28	140	DMSO	ND
bromobenzene	BBZ	80	400	2000	DMSO	ND
clofibrate	CFB	12	60	300	DMSO	ND
diclofenac	DFNa	16	80	400	DMSO	ND
fluphenazine	FP	1.2	6	30	culture medium	ND
nitrofurantoin	NFT	5	25	125	DMSO	ND
omeprazole	OPZ	4.8	24	120	DMSO	ND
sulfasalazine	SS	4	20	100	DMSO	ND
benziodarone	BZD	1	5	25	DMSO	ND
cimetidine	CIM	12	60	300	DMSO	ND
colchicine	COL	200	1000	5000	culture medium	24h,day15
cyclosporin A	CSA				DMSO	ND
danazol	DNZ	1.4	7	35	DMSO	ND
enalapril	ENA	80	400	2000	culture medium	ND
famotidine	FAM	28	140	700	DMSO	ND

 : 陽性化合物

## リン脂質症検出*in vitro*アッセイの結果



## マーカー抽出の方法

ラット初代培養肝細胞の遺伝子発現データにおいて、  
リン脂質症を引き起こす化合物で共通に変動する遺伝子を抽出

up: 463  
down: 737

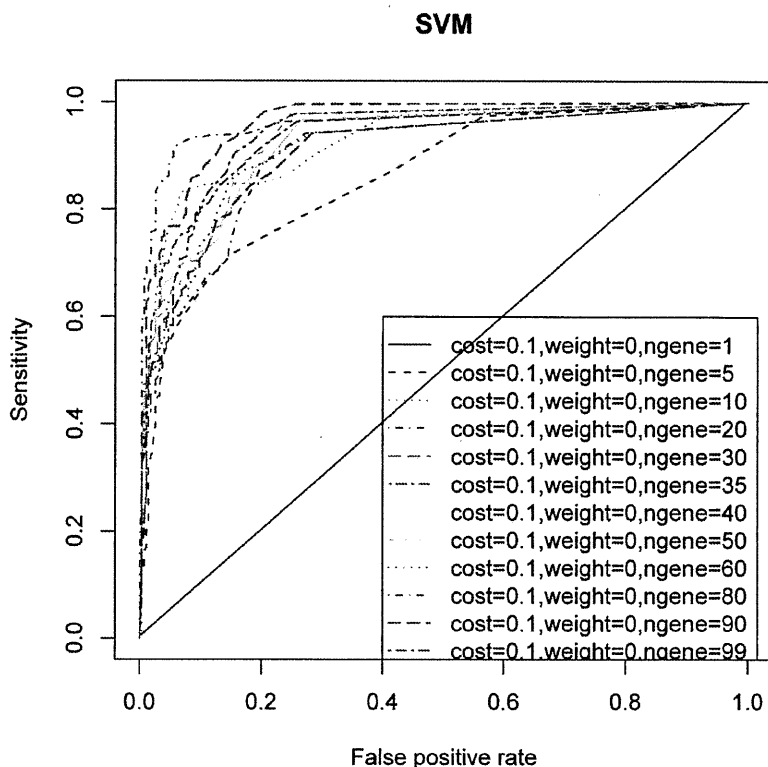
使用化合物: amiodarone (AM), imipramine (IMI), amitriptyline (AMT), hydroxyzine (HYZ), clomipramine (CPM), promethazine (PMZ), perhexiline (PH)  
化合物処置: 24h曝露, 対照群+3用量  
データ取得: Affymetrix Rat Genome 230 2.0 array, MAS 5.0を使用.  
データ処理: 全プローブセットのmeanを1とする(global (mean)補正).  
max intensity < 0.01 または all Absent のプローブセットを除外.  
対照群 vs 各用量で R を用いて rank product を計算し,  $p < 0.05$  のプローブセットを抽出.  
7化合物中4化合物以上で同方向に共通変動した遺伝子を選択.

## Support vector machine (SVM)を用いた判別モデル構築

上記7化合物を陽性, 32化合物を陰性として学習.  $\log_2$  ratio 値 (vs 対照群)を用いた. 判別モデルのランキングに基づき, support vector 数が最小となる遺伝子数を選択. Affymetrix の annotation grade A のもののみ抽出して判別マーカーとする.

# 判別モデルの学習セットとROCカーブ

化合物略称	化合物名	ラベル	時点	用量
AMT	amitriptyline	24h	M	
IMI	imipramine	24h	L,M	
HYZ	hydroxyzine	24h	M	
CPM	clomipramine	24h	M	
PMZ	promethazine	24h	M	
AM	amiodarone	24h	H	
KC	ketoconazole	24h	H	
PH	perhexiline	24h	H	
MDP	methyldopa	2,8,24h	LMH	
PCT	phenacetin	2,8,24h	LMH	
RAN	ranitidine	2,8,24h	LMH	
TAC	tacrine	2,8,24h	LMH	
TC	tetracycline	2,8,24h	LMH	
TRI	triamterene	2,8,24h	LMH	
CBZ	carbamazepine	2,8,24h	LMH	
FFB	fenofibrate	2,8,24h	LMH	
INAH	isoniazid	2,8,24h	LMH	
TAA	thioacetamide	2,8,24h	LMH	
DOX	doxorubicin	2,8,24h	LMH	
FUR	furosemide	2,8,24h	LMH	
SUL	sulindac	2,8,24h	LMH	
VPA	valproic acid	2,8,24h	LMH	
COL	colchicine	2,8,24h	LMH	
CMP	chloramphenicol	2,8,24h	LMH	
APL	allopurinol	2,8,24h	LMH	
ETH	ethionamide	2,8,24h	LMH	
NFT	nitrofurantoin	2,8,24h	LMH	
CIM	cimetidine	2,8,24h	LMH	
BZD	benziodarone	2,8,24h	LMH	
BBZ	bromobenzene	2,8,24h	LMH	
FAM	famotidine	2,8,24h	LMH	
PhB	phenylbutazone	2,8,24h	LMH	
RIF	rifampicin	2,8,24h	LMH	
SS	sulfasalazine	2,8,24h	LMH	
DNZ	danazol	2,8,24h	LMH	
CSA	cyclosporine A	2,8,24h	LMH	
OPZ	omeprazole	2,8,24h	LMH	
DFNa	diclofenac	2,8,24h	LMH	
CFB	clofibrate	2,8,24h	LMH	
ENA	enalapril	2,8,24h	LMH	



## 抽出されたマーカー遺伝子

以下の72プローブセット

1368491_at Dnase2b	1386967_at Rhoq	1367712_at Timp1	1399096_at Add3
1387659_at Gda	1368695_at C4bpb	1373258_at Ctsf	1368191_a_at Slc22a1
1389746_at RGD1564228	1372675_at RGD1306954	1374806_at Sfn	1392534_at Pmepa1
1384428_at Tmem181	1386893_at Grn	1390860_at Igf2bp3	1372806_at Vps35
1373939_at Nagk	1387024_at Dusp6	1375560_at Dhdpsl	1373245_at Col4a1
1370475_at Cyp2b3	1374877_at LOC687295	1376249_at Fuca2	1389559_at RGD1564420
1372304_at Commd4	1370789_a_at Prlr	1371946_at RGD1303130	1377049_at Pnpla7
1368074_at Gale	1371021_at Arsb	1379255_at Atp6ap2	1370959_at Col3a1
1381982_at Uap111	1370949_at ---	1372809_at LOC290595	1388547_at Cldn4
1367514_at LOC361635	1389106_at Fbxw9	1372897_at Plod2	1398930_at Atp6v0b
1398254_at Renbp	1386884_at Htra1	1370310_at Hmgcs2	1393170_at RGD1561431
1371871_at Rab12	1370280_at Hprr1	1368309_at Txnrd2	1389123_at Ccl6
1367562_at Sparc	1390848_at Rbm19	1372741_at Sccpdh	1396279_at Atp6ap2
1367913_at Cygb	1375972_at LOC100360533	1370155_at Col1a2	1374396_at Atp6v1c1
1378196_at Slc43a1	1388675_at Spns1	1371143_at Serpina7	1369029_at Plscr1
1398363_at Wdr54	1391435_at Pltp	1373970_at Il33	1368741_at C9
1368718_at Aldh1a7	1372013_at Ifitm1	1371357_at Igfbp7	1373617_at Emp2
1372687_at Crct1	1389581_at Il33	1392547_at MGC105649	

リン酸化や細胞内小胞輸送, トランスポーターに関連したものが多い。

# TG-GATEsデータの判別結果-1

化合物略称	ラベル	化合物名	Low: 24hr	Middle: 24hr	High: 24hr	化合物略称	ラベル	化合物名	Low: 24hr	Middle: 24hr	High: 24hr
AMT		amitriptyline	0.907	0.986	1.000	CCL4		carbon tetrachloride	0.000	0.000	NA
IMI		imipramine	0.930	0.985	1.000	DIL		diltiazem	0.006	0.033	0.968
HYZ		hydroxyzine	0.349	0.912	1.000	SLP		sulpiride	0.009	0.016	0.931
CPM		clomipramine	0.461	0.751	1.000	EBU		ethambutol	0.002	0.037	0.913
PMZ		promethazine	0.301	0.892	1.000	FP		fluphenazine	0.030	0.044	0.842
AM		amiodarone	0.861	0.966	0.987	TMD		trimethadione	0.869	0.815	0.824
KC		ketoconazole	0.020	0.101	0.934	ADP		adapin	0.056	0.161	0.819
PH		perhexiline	0.081	0.356	0.912	GF		griseofulvin	0.059	0.628	0.745
MDP		methyl dopa	0.019	0.008	0.019	CHL		chlorpheniramine	0.001	0.015	0.713
PCT		phenacetin	0.009	0.003	0.010	LBT		labetalol	0.025	0.013	0.671
RAN		ranitidine	0.001	0.000	0.008	QND		quinidine	0.036	0.668	0.513
TAC		tacrine	0.006	0.050	0.006	K09		K09	0.016	0.025	0.372
TC		tetracycline	0.003	0.005	0.004	GBC		glibenclamide	0.150	0.063	0.356
TRI		triamterene	0.000	0.001	0.001	TMX		tamoxifen	0.053	0.282	0.341
CBZ		carbamazepine	0.000	0.000	0.000	AJM		ajmaline	0.004	0.004	0.293
FBF		fenofibrate	0.001	0.000	0.000	CPX		ciprofloxacin	0.370	0.111	0.250
INAH		isoniazid	0.000	0.000	0.000	K11		K11	0.005	0.008	0.248
TAA		thioacetamide	0.000	0.000	0.000	TZM		triazolam	0.139	0.089	0.192
DOX		doxorubicin	0.000	0.000	0.000	K10		K10	0.052	0.091	0.175
FUR		furosemide	0.002	0.000	0.000	K03		K03	0.005	0.005	0.172
SUL		sulindac	0.003	0.002	0.000	BDZ		bendazac	0.391	0.411	0.167
VPA		vaiproc acid	0.000	0.000	0.000	TRZ		thioridazine	0.019	0.006	0.113
COL		cotichine	0.050	0.000	0.000	HPL		haloperidol	0.004	0.015	0.098
CMP		chloramphenicol	0.009	0.037	0.036	FT		flutamide	0.017	0.011	0.084
APL		allopurinol	0.012	0.050	0.025	DIS		disopyramide	0.000	0.009	0.068
ETH		ethionamide	0.012	0.023	0.018	TCP		ticlopidine	0.031	0.029	0.064
NFT		nitrofurantoin	0.006	0.035	0.014	BCT		bucetin	0.024	0.042	0.054
CIM		cimetidine	0.008	0.015	0.012	MTS		methyltestosterone	0.005	0.025	0.053
BZD		benziodarone	0.003	0.001	0.012	NPAA		phenylanthranilic acid	0.014	0.016	0.031
BBZ		bromobenzene	0.001	0.004	0.008	EE		ethinylestradiol	0.114	0.074	0.029
FAM		famotidine	0.001	0.002	0.006	K14		K14	0.045	0.024	0.027
PhB		phenylbutazone	0.000	0.000	0.004	MXS		moxisylyte	0.010	0.013	0.024
RIF		rifampicin	0.003	0.001	0.003	K13		K13	0.014	0.016	0.024
SS		sulfasalazine	0.035	0.010	0.001	CLM		chlormadinone	0.001	0.000	0.024
DNZ		danazol	0.002	0.001	0.001	LS		lomustine	0.019	0.014	0.019
C SA		cyclosporine A	0.003	0.001	0.000	NIM		nimesulide	0.003	0.002	0.018
OPZ		omeprazole	0.000	0.000	0.000	LNX		lornoxican	0.014	0.012	0.016
DFNa		diclofenac	0.000	0.000	0.000	K07		K07	0.013	0.003	0.015
CFB		clofibrate	0.000	0.000	0.000	K06		K06	0.001	0.001	0.014
ENA		enaipapri	0.000	0.000	0.000	ACZ		acetazolamide	0.008	0.016	0.014
						K15		K15	0.001	0.002	0.013

数字はprobability, ピンク: ポジティブ判定(probability>0.5)

# TG-GATEsデータの判別結果-2

化合物略称	ラベル	化合物名	Low: 24hr	Middle: 24hr	High: 24hr	化合物略称	ラベル	化合物名	Low: 24hr	Middle: 24hr	High: 24hr
WY		WY-14643	0.006	0.003	0.011	MCT		monocrotaline	0.001	0.001	0.001
PML		pemoline	0.018	0.010	0.009	ACA		acarbose	0.005	0.003	0.000
MFM		metformin	0.001	0.001	0.007	ETN		ethanol	0.002	0.001	0.000
DTL		dantrolene	0.003	0.005	0.007	CPP		chlorpropamide	0.000	0.000	0.000
DSF		disulfiram	0.086	0.162	0.006	CAP		captopril	0.004	0.010	0.000
DEN		nitrosodiethylamine	0.003	0.001	0.006	CPA		cyclophosphamide	0.000	0.000	0.000
ET		ethionine	0.007	0.002	0.006	ASA		aspirin	0.000	0.000	0.000
K05		K05	0.002	0.001	0.005	MEX		mexiletine	0.000	0.000	0.000
PHE		phenytoin	0.004	0.001	0.003	NIC		nicotinic acid	0.000	0.000	0.000
GFZ		gemfibrozil	0.013	0.010	0.003	SST		simvastatin	0.001	0.001	0.000
IPA		iproniazid	0.007	0.018	0.003	ETP		etoposide	0.000	0.000	0.000
AAF		acetamidofluorene	0.003	0.003	0.003	TLB		tolbutamide	0.010	0.001	0.000
AA		allyl alcohol	0.002	0.003	0.003	TIO		tiopronin	0.000	0.000	0.000
NFZ		nitrofurazone	0.066	0.080	0.003	ANIT		naphthyl isothiocyanate	0.001	0.002	0.000
K08		K08	0.005	0.004	0.002	VA		vitamin A	0.000	0.000	0.000
K04		K04	0.011	0.052	0.002	DZP		diazepam	0.001	0.001	0.000
K02		K02	0.002	0.001	0.002	TEO		theophylline	0.010	0.022	0.000
MEF		mefenamic acid	0.004	0.002	0.002	MP		methapyrilene	0.000	0.000	0.000
MLX		meloxicam	0.000	0.001	0.002	IBU		ibuprofen	0.060	0.003	0.000
CMN		chlormezanone	0.000	0.000	0.002	MTX		methotrexate	0.000	0.000	0.000
BEA		bromoethanamine	0.005	0.008	0.002	PEN		penicillamine	0.000	0.000	0.000
CPZ		chlorpromazine	0.000	0.000	0.002	IM		indomethacin	0.000	0.000	0.000
K12		K12	0.000	0.001	0.002	PTU		propylthiouracil	0.001	0.000	0.000
BBr		benzbromarone	0.004	0.001	0.001	MTZ		methimazole	0.000	0.000	0.000
VMC		vancomycin	0.002	0.001	0.001	PAN		puromycin aminonucleoside	0.000	0.000	0.000
EME		erythromycin ethylsuccinate	0.002	0.002	0.001	PB		phenobarbital	0.000	0.000	0.000
K01		K01	0.000	0.000	0.001	CSP		cisplatin	0.002	0.000	0.000
NIF		nifedipine	0.002	0.002	0.001	PAP		papaverine	0.001	0.002	0.000
HCB		hexachlorobenzene	0.001	0.001	0.001	APAP		acetaminophen	0.000	0.003	0.000
K16		K16	0.000	0.000	0.001	NPX		naproxen	0.002	0.000	0.000
TBF		terbinafine	0.001	0.000	0.001	GMC		gentamicin	0.001	0.015	0.000
CAF		caffeine	0.031	0.009	0.001	K17		K17	0.003	0.000	0.000
CBP		carboplatin	0.001	0.000	0.001	CLT		cephalothin	0.000	0.000	0.000
CMA		coumarin	0.000	0.001	0.001	TAN		tannic acid	0.002	0.002	0.000
AZP		azathioprine	0.007	0.012	0.001						

## 外部データの判別結果

化合物略称	化合物名	ラベル	Low: 24hr	Middle: 24hr	High: 24hr
AMT	amitriptyline		0.978	0.991	1.000
IMI	imipramine		0.915	0.972	1.000
HYZ	hydroxyzine		0.226	0.835	1.000
AM	amiodarone		0.955	0.996	1.000
PMZ	promethazine		0.266	0.819	0.994
CPM	clomipramine		0.279	0.721	0.986
KC	ketconazole		0.008	0.034	0.886
PH	perhexiline		0.080	0.307	0.855
MDP	methyldopa		0.022	0.004	0.010
TAC	tacrine		0.005	0.019	0.007
RAN	ranitidine		0.000	0.000	0.002
TC	tetracycline		0.001	0.003	0.002
PCT	phenacetin		0.002	0.000	0.001
TRI	triamterene		0.000	0.000	0.000
CBZ	carbamazepine		0.000	0.000	0.000
DOX	doxorubicin		0.000	0.000	0.000
INAH	isoniazid		0.000	0.000	0.000
FFB	fenofibrate		0.000	0.000	0.000
TAA	thioacetamide		0.000	0.000	0.000
SUL	sulindac		0.001	0.001	0.000
FUR	furosemide		0.000	0.000	0.000
VPA	valproic acid		0.000	0.000	0.000
COL	colchicine		0.031	0.000	0.000
CMP	chloramphenicol		0.004	0.014	0.024
APL	allopurinol		0.016	0.031	0.018
NFT	nitrofurantoin		0.006	0.031	0.013
BBZ	bromobenzene		0.001	0.003	0.012
BZD	benziodarone		0.003	0.001	0.009
ETH	ethionamide		0.001	0.005	0.006
CJM	cimetidine		0.003	0.004	0.004
FAM	famotidine		0.000	0.001	0.002
RIF	rifampicin		0.000	0.000	0.001
PhB	phenylbutazone		0.000	0.000	0.001
SS	sulfasalazine		0.023	0.005	0.001
DNZ	danazol		0.001	0.001	0.000
CSA	cyclosporine A		0.001	0.000	0.000
DFNa	diclofenac		0.000	0.000	0.000
OPZ	omeprazole		0.000	0.000	0.000
CFB	clofibrate		0.000	0.000	0.000
ENA	enalapril		0.000	0.000	0.000
CCL4	carbon tetrachloride		0.000	0.000	NA
AM	amiodarone	na	0.000	0.000	na

外部データ:

NCBI GEO Accession No. GSE19662

AM 1 ppm (約1.55  $\mu$ M)

ラット肝細胞に24h曝露

Agilent-014879 Whole Rat Genome

Microarray 4x44K G4131Fのデータ.

ノーマライズされたデータをダウンロードし、

対照群に対するlog<sub>2</sub> ratioにして解析

※ AM TGPでの用量: 0.28, 1.4, 7  $\mu$ M

黄色が外部データ.

数字はprobability.

ピンク: ポジティブ判定(probability>0.5)

← 陰性と判定された

## 小括

● *In vitro*のラット肝細胞のデータからリン脂質症を判別する判別モデルをSVMを用いて作成した.

● アッセイ結果の判別の性能はまずまず良好だが、フェノタイプが弱い場合は判別が難しい.

● 外部データでの検証はプラットフォームが同一のデータがみつからず、うまくいかなかった.

● 抽出された遺伝子にはリン酸化や細胞内小胞輸送, トランスポーターに関連したものが多く, 生物学的にも妥当なものであった.

## 検証を行ったバイオマーカー(グレードIV→III)

- グルタチオン(GSH)枯渇マーカー(ラット単回投与, 肝臓)

Kiyosawa *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* **32**, 469-486, 2007

Gao *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* **247**, 211-221, 2010

- リン脂質症マーカー(ラット反復投与, 肝臓)

Hirode *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* **229**, 290-299, 2008

- リン脂質症マーカー(ラット初代培養肝細胞)

- 血液凝固不全マーカー(ラット反復投与, 肝臓)

Hirode *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 281-293, 2009

- PPAR $\alpha$ アゴニストマーカー(ラット単回肝臓, ラット肝細胞, ヒト肝細胞)

Tamura *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* **31**, 471-490, 2006

## グレードIVマーカー抽出, 評価の方法

反復投与のラット肝臓の遺伝子発現データにおいて, 血液凝固不全を引き起こす化合物で共通に変動する遺伝子を抽出

使用化合物: 血液生化学検査でPT延長, APTT延長, Fbg低下のいずれかがみられた化合物

clofibrate (CFB), omeprazole (OPZ), ethionine (ET), thioacetamide (TAA), benzbromarone (BBr), propylthiouracil (PTU), WY-14643 (WY), amiodarone (AM)

化合物処置: 3, 7, 14, 28日間反復経口投与, 対照群+3用量

サンプリング: 最終投与24時間後に肝臓抽出

データ取得: Affymetrix Rat Genome 230 2.0 array, MAS 5.0を使用.

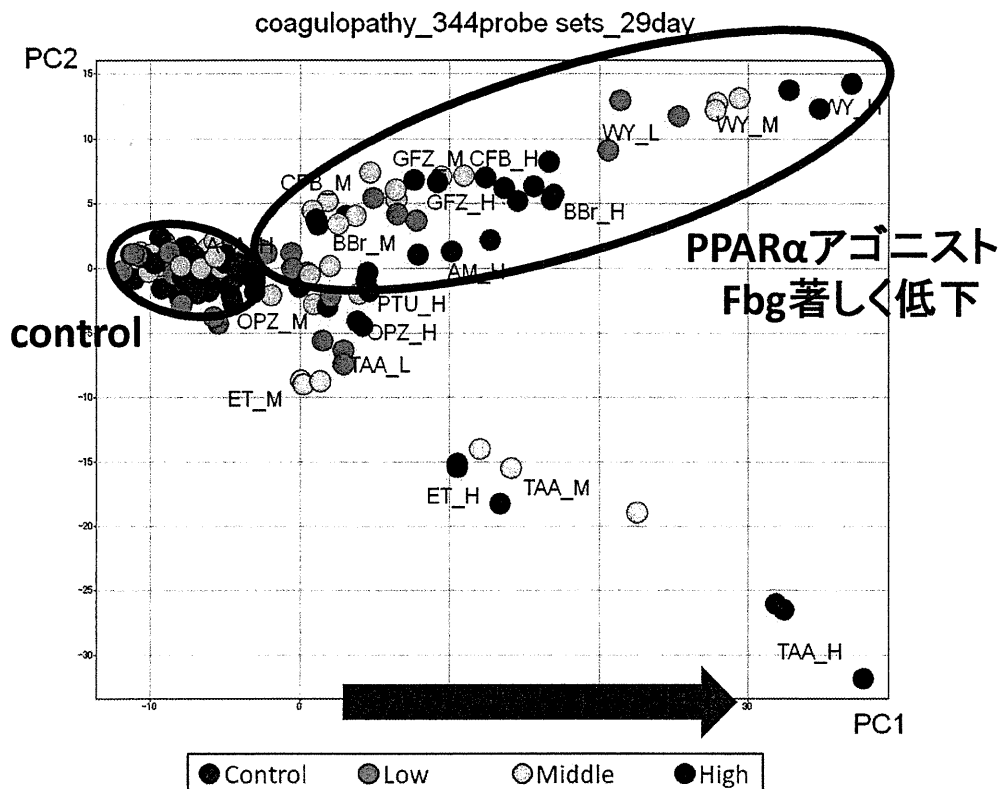
データ処理: global (mean)補正, all Absentのプローブセットを除外.

各化合物について, 時点ごとにANOVAで $p < 0.05$ の遺伝子を抽出して全時点union. 8化合物共通変動遺伝子のうち, Affymetrixのannotation grade Aのものに絞った.

↓  
主成分分析(PCA)で評価

上記8化合物の抽出した遺伝子(344プローブセット)のデータをZ-score化してPCAを行った.

## PCAの結果



## 判別モデルの構築と検証

### SVMを用いて判別モデル構築

学習セット: 反復投与全時点, 高用量の対照群に対するratioをZ-score化した値を用いた. 陽性化合物としてグレードIVマーカー抽出に用いた8化合物のうち, Fbg低下が激しいものを除いた5化合物を用いた. 陰性化合物として11化合物を用いた.

344プローブセットのうち, annotation grade A (Affymetrix) でMann-WhitneyのU検定で $p < 0.01$ の遺伝子を選択し, SVMによる判別モデルに適用. 変動倍率, U検定の $p$ 値, SVM Marginを統合したランキングに従いROCカーブのAUC最大となる遺伝子数を選択し, 判別マーカーとした.

### TG-GATEsのデータに適用して判別し, 検証

↓ PT, APTT, Fbgの測定結果と比較

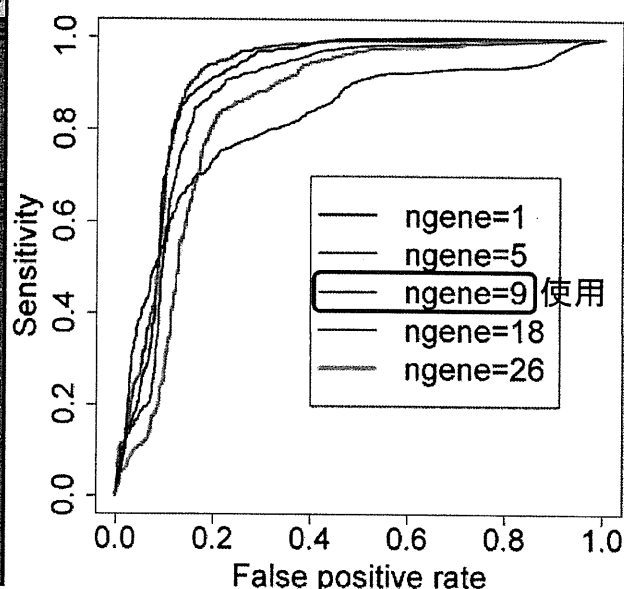
### 外部データに適用して判別し, 検証

NCBI GEOのデータのうち, Affymetrix Rat Genome 230 2.0 arrayで取得された, 陽性化合物投与後のラット肝臓の遺伝子発現データを用いた. CELファイルをダウンロードし, TG-GATEsのデータと同様にデータ処理後, 判別モデルにかけた.

## 判別モデルの学習セットとROCカーブ

Compound No	Abbr.	Compound Name	High: 4day	High: 8day	High: 15day	High: 29day
00006	CPS	clofibrate				
00012	OPZ	omeprazole				
00013	ET	ethionine				
00017	TAA	thioacetamide				
00021	BBr	benzbromarone				
00022	PTU	propylthiouracil				
00030	WY	WY-14843				
00033	AM	amiodarone				
00010	AA	allyl alcohol				
00020	NFT	nitrofurantoin				
00024	CPA	cyclophosphamide				
00026	PHE	phenytoin				
00031	GFZ	gemfibrozil				
00042	GBC	glibenclamide				
00045	PH	perhexiline				
00047	KC	ketoconazole				
00048	TC	tetracycline				
00049	LS	lomustine				
00053	MFM	metformin				

SVM+Mann-Whitney U-test



グレードIVマーカー抽出に用いた8化合物のうち、Fbg低下が激しいものを除いた5化合物を陽性として学習に用いた。

344プローブセットのうち、Mann-WhitneyのU検定で $p < 0.01$ の遺伝子を選択後、SVMによる判別モデルに適用。ランキングに基づき、ROCカーブのAUC最大となる遺伝子数を選択。

## 抽出されたマーカー遺伝子

### 以下の9プローブセット

1386884_at	Htra1	HtrA serine peptidase 1
1368674_at	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver
1368077_at	Fbp1	fructose-1,6- biphosphatase 1
1371789_at	Clpp	ClpP caseinolytic peptidase, ATP-dependent, proteolytic subunit homolog (E. coli)
1371809_at	Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B
1386917_at	Pc	pyruvate carboxylase
1389903_at	Pttg1ip	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
1368651_at	Pklr	pyruvate kinase, liver and RBC
1377033_at	Serpinf2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 2

1つ(serpinf2)はKEGGのcomplement and coagulation cascadesに含まれている。その他解糖系やピルビン酸代謝に関連する遺伝子が多い。





# TG-GATEsデータの判別結果-3

学習セット →

			low								middle								high							
			3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d
00103	MEX	mexiletine	0.000	0.004	0.002	0.006	0.001	0.004	0.008	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.000	0.001	0.004	0.079	0.010	0.000	0.001	0.005	0.001	
00104	TJO	tiopronin	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.007	0.000	0.002	0.000	0.003	0.004	0.007	0.004	0.003	0.001	0.004
00105	K11	K11	0.005	0.001	0.005	0.007	0.002	0.004	0.004	0.002	0.003	0.010	0.008	0.001	0.004	0.003	0.004	0.006	0.002	0.023	0.020	0.457	0.229	0.086	0.013	0.006
00106	K12	K12	0.000	0.002	0.000	0.029	0.001	0.001	0.002	0.008	0.001	0.002	0.006	0.349	0.012	0.002	0.014	0.145	0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.011	0.124	0.030
00107	K13	K13	0.003	0.002	0.002	0.005	0.001	0.000	0.001	0.002	0.003	0.002	0.005	0.006	0.005	0.001	0.001	0.012	0.006	0.002	0.001	0.006	0.006	0.001	0.001	0.050
00108	ACZ	acetazolamide	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.018	0.001	0.015	0.000	0.001	0.003	0.002	0.006	0.002	0.001	0.006	0.001	0.004	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000
00109	DSF	disulfiram	0.002	0.002	0.006	0.248	0.042	0.033	0.013	0.021	0.006	0.001	0.068	0.182	0.165	0.316	0.133	0.002	0.004	0.080	0.006	0.001	0.011	0.001	0.001	0.000
00110	PMZ	promethazine	0.002	0.002	0.005	0.003	0.004	0.004	0.005	0.040	0.001	0.002	0.012	0.009	0.015	0.002	0.068	0.029	0.000	0.001	0.003	0.022	0.291	0.007	0.149	0.525
00111	K14	K14	0.000	0.002	0.002	0.001	0.002	0.006	0.029	0.006	0.003	0.003	0.001	0.000	0.003	0.002	0.028	0.012	0.001	0.001	0.004	0.002	0.019	0.014	0.061	0.010
00112	K15	K15	0.003	0.009	0.003	0.034	0.006	0.001	0.007	0.001	0.001	0.003	0.012	0.066	0.020	0.019	0.023	0.002	0.000	0.006	0.009	0.009	0.059	0.041	0.070	0.115
00113	COL	colchicine	0.005	0.003	0.005	0.001	0.001	0.002	0.000	0.002	0.006	0.008	0.063	0.086	0.020	0.001	0.001	0.006	0.009	0.015	0.480	0.119	0.001	0.004	0.004	0.008
00114	TLB	tolbutamide	0.002	0.006	0.003	0.002	0.001	0.005	0.008	0.001	0.003	0.007	0.006	0.002	0.011	0.001	0.003	0.001	0.001	0.007	0.000	0.035	0.091	0.021	0.004	0.045
00115	SLP	sulfpiram	0.001	0.003	0.004	0.001	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.005	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002
00116	ACA	acarbose	0.002	0.001	0.001	0.000	0.004	0.002	0.001	0.002	0.001	0.000	0.003	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.001	0.004	0.000	0.002	0.004	0.004	0.003	0.003
00117	SST	simvastatin	0.003	0.002	0.003	0.002	0.007	0.001	0.003	0.000	0.005	0.001	0.006	0.003	0.008	0.010	0.015	0.006	0.002	0.002	0.014	0.156	0.000	0.143	0.250	0.136
00118	AJM	ajmaline	0.002	0.003	0.007	0.002	0.011	0.007	0.005	0.003	0.001	0.006	0.006	0.005	0.004	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.211	0.023	0.029	0.024	0.008	0.006
00119	DTL	datrolene	0.003	0.001	0.004	0.015	0.004	0.005	0.004	0.021	0.001	0.001	0.002	0.104	0.126	0.064	0.092	0.034	0.001	0.000	0.002	0.095	0.321	0.026	0.383	0.541
00120	TZM	triazolam	0.002	0.002	0.003	0.001	0.015	0.002	0.002	0.003	0.002	0.001	0.014	0.002	0.006	0.006	0.017	0.017	0.003	0.001	0.005	0.005	0.201	0.036	0.007	0.011
00121	CPM	clomipramine	0.000	0.002	0.000	0.001	0.025	0.002	0.003	0.001	0.002	0.002	0.002	0.009	0.040	0.005	0.009	0.008	0.001	0.001	0.005	0.005	0.205	0.014	0.047	0.098
00122	TMD	trimethadione	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.001	0.002	0.002	0.005	0.024	0.005	0.005	0.001	0.014	0.004	0.002	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
00123	TBF	terbinafine	0.000	0.001	0.002	0.006	0.020	0.006	0.003	0.006	0.002	0.001	0.006	0.013	0.166	0.122	0.031	0.064	0.002	0.003	0.003	0.251	0.000	0.000	0.000	0.000
00124	MLX	mefloxicin	0.003	0.003	0.011	0.002	0.002	0.005	0.001	0.004	0.004	0.000	0.005	0.003	0.001	0.011	0.002	0.001	0.002	0.002	0.023	0.445	0.222	0.010	NA	NA
00125	LNK	loroxicam	0.001	0.001	0.002	0.002	0.028	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.000	0.005	0.008	0.002	0.002	0.015	0.002	0.003	0.001	0.026	0.253	0.053	0.005	0.005
00126	CLM	chlormadinone	0.001	0.002	0.001	0.001	0.000	0.000	0.009	0.002	0.001	0.004	0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.003	0.001	0.006	0.002	0.001	0.001	0.000	0.005	0.002
00127	DNZ	danzol	0.000	0.003	0.006	0.041	0.003	0.007	0.003	0.001	0.001	0.003	0.002	0.001	0.011	0.004	0.006	0.001	0.001	0.001	0.008	0.574	0.003	0.034	0.035	0.044
00128	K16	K16	0.000	0.001	0.000	0.002	0.022	0.002	0.001	0.006	0.000	0.001	0.002	0.005	0.004	0.003	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000	0.009	0.017	0.012	0.004	0.006
00129	BDZ	benzazac	0.001	0.002	0.002	0.007	0.003	0.007	0.002	0.001	0.001	0.014	0.002	0.161	0.006	0.019	0.010	0.002	0.000	0.008	0.031	0.372	0.206	0.286	0.204	
00130	BZD	benziodarone	0.001	0.001	0.001	0.019	0.004	0.033	0.002	0.014	0.004	0.002	0.002	0.291	0.074	0.036	0.096	0.068	0.002	0.014	0.032	0.386	0.000	0.517	0.579	
00131	ETP	etoposide	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.007	0.002	0.005	0.001	0.006	0.003	0.030	0.001	0.004	0.002	0.006	0.002	0.003	0.001	0.015	0.003	0.002	0.002	0.002
00132	CSP	cisplatin	0.002	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	0.003	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.005	0.004	0.005	0.001	0.006	0.025	0.306	0.000
00133	CBP	carboplatin	0.002	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.000	0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.005	0.005	0.003	0.006	0.005	0.267
00134	BEA	bromethamine	0.004	0.001	0.038	0.002	0.002	0.001	0.002	0.005	0.002	0.001	0.014	0.023	0.005	0.001	0.002	0.004	0.003	0.014	0.000	0.100	0.019	0.001	0.021	0.015
00135	ETH	ethionamide	0.008	0.079	0.279	0.067	0.000	0.004	0.002	0.001	0.005	0.013	0.198	0.003	0.003	0.006	0.009	0.002	0.029	0.383	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
00136	NIM	nimesulide	0.001	0.008	0.005	0.006	0.002	0.002	0.003	0.001	0.001	0.002	0.007	0.106	0.002	0.008	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.025	0.142	0.116	0.157
00137	ETN	ethanol	0.000	0.000	0.001	0.002	0.012	0.012	0.009	0.003	0.000	0.000	0.000	0.002	0.004	0.005	0.004	0.006	0.000	0.000	0.000	0.004	0.009	0.054	0.009	0.010
00138	PCT	phenacetin	0.000	0.000	0.000	0.016	0.002	0.002	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.028	0.001	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.251	0.512	0.148	0.245
00139	BCT	bucetin	0.003	0.004	0.004	0.009	0.001	0.004	0.008	0.003	0.001	0.000	0.002	0.003	0.003	0.007	0.002	0.001	0.001	0.002	0.348	1.001	0.060	0.167	0.007	
00140	NPAA	phenylanthranilic acid	0.000	0.003	0.005	0.166	0.003	0.007	0.010	0.004	0.001	0.002	0.013	0.029	0.019	0.068	0.024	0.000	0.001	0.006	0.000	0.226	0.068	0.000	0.000	0.000
00141	CLT	cephalothin	0.002	0.005	0.005	0.001	0.002	0.001	0.002	0.005	0.006	0.007	0.015	0.016	0.006	0.002	0.005	0.003	0.075	0.021	0.010	0.014	0.001	0.007	0.010	
00142	CSA	cyclosporine A	0.000	0.003	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.002	0.004	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.014	0.011
00143	PAN	puromycin aminonucleoside	0.000	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.007	0.233	0.001	0.001	0.000	0.026	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000	0.111	0.016	0.000	NA	NA	NA	NA
00144	AAF	acetamidofluorene	0.002	0.006	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.027	0.085	0.006	0.063	0.216	0.018	0.016	0.032	0.061	0.420	0.008	0.125	0.350	0.000	0.000
00145	DN	nitrosodietilamine	0.005	0.020	0.015	0.003	0.004	0.018	0.002	0.007	0.006	0.003	0.006	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
00146	TCP	ticlopidine	0.002	0.024	0.035	0.178	0.019	0.054	0.001	0.002	0.005	0.005	0.076	0.000	0.175	0.000	0.175	0.190	0.049	0.0						

## 外部データの判別結果

GEO ID	Compound	Abbr.	Dose	Time	Probability	判別結果
GSE24363	thioacetamide	TAA	15 mg/kg	48 h	0.01149029	Negative
			50 mg/kg	48 h	1	Positive
			150 mg/kg	48 h	1	Positive
GSE31307	clofibrate	CFB	不明	72 h	0.00020518	Negative
	ethionine	ET	不明	72 h	0.99423674	Positive

いずれもポジティブ化合物のラット肝臓Rat230 2.0 Chipデータ。  
NCBI GEOから各データセットのCELファイルをダウンロードし、TG-GATEsのデータと同様にデータ処理後、判別モデルにかけた。

TAAは濃度依存的に陽性の判別結果が出た。CFBは陽性化合物にもかかわらず陰性と判別されたが、用量不足の可能性もある。



外部データについても判別可能。

## 小括

- ラット反復投与の肝臓の発現データからPCAを用いて血液凝固不全を評価するグレードIVマーカーの検証を行った。その過程で、SVMを用いた判別モデルを作成し、評価法を陰性、陽性の判定ができるこの方法に変更した。
- グレードIVの段階で344プローブセットであったマーカー遺伝子数を9遺伝子と、大幅に減じることができた。
- 判別モデルの性能は内部データでは矛盾するケースはあるもののまずまず良好であった。外部データでもほぼ正しく判別可能であった。
- 血液凝固異常はフェノタイプが容易に測定できるが、機序解明や、多数のマーカーを一斉に解析する場合には有用と考えられる。

## 検証を行ったバイオマーカー(グレードIV→III)

- グルタチオン(GSH)枯渇マーカー(ラット単回投与, 肝臓)  
Kiyosawa *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* **32**, 469-486, 2007  
Gao *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* **247**, 211-221, 2010
- リン脂質症マーカー(ラット反復投与, 肝臓)  
Hirode *et al.*, *Toxicol. App. Pharmacol.* **229**, 290-299, 2008
- リン脂質症マーカー(ラット初代培養肝細胞)
- 血液凝固不全マーカー(ラット反復投与, 肝臓)  
Hirode *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 281-293, 2009
- PPAR $\alpha$ アゴニストマーカー(ラット単回肝臓, ラット肝細胞, ヒト肝細胞)  
Tamura *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* **31**, 471-490, 2006

## ラット用グレードIVマーカー抽出の方法

ラット肝臓(*in vivo*)および初代培養肝細胞(*in vitro*)の遺伝子発現データにおいて, PPAR $\alpha$ アゴニストで共通に変動する遺伝子を抽出

使用化合物: clofibrate (CFB), WY-14643 (WY), gemfibrozil (GFZ)

データ取得: Affymetrix Rat Expression array 230AまたはRat Genome 230 2.0 array, MAS 5.0を使用.

データ処理: global (mean)補正, 半数以上のサンプルでAbsentのプローブセットを除外. 時点ごとに, 3化合物中2化合物以上で共通に中用量, 高用量の両方で1.5倍以上変動し, かつ(*in vivo*の場合は) *t*検定で $p < 0.05$ のプローブセットを抽出.

In vivo 24h & in vitro 24h または In vivo 29d & in vitro 24hの共通変動遺伝子を抽出.

