

遺伝子発現プロファイルの生物学的解釈

By

Stuart M. Tugendreich, Ph.D. and Jean-Noel Billaud Ph.D.

White Paper

RNA-seq データの解釈を行うには、発現変動を示す遺伝子や転写産物に関する以下の主要な疑問に答える必要があります。1) 発現プロファイル中の遺伝子発現レベルの差異は、対象の細胞または組織において、どのような生物学的意義として理解できるでしょうか？ 2) この生物学的意義は、他の実験系から得られたデータの解釈とどのような関連があるのでしょうか？ また他の研究分野のデータの解釈との間に有益な類似性があるのでしょうか？

Ingenuity® Pathway Analysis (IPA™) は、これらの疑問に答えるための理想的なソフトウェアで、2003 年後半のリリース以降、25,000 以上の出版物で引用され¹⁾、RNA-seq に限定した場合

でも、4,000 回以上引用されています²⁾。IPA の基盤となるナレッジベース (QIAGEN Knowledge Base) は、専門家によりマニュアルで抽出、精査された 670 万を超える文献由来の知見 (2019 年 5 月現在) をカバーし、発現が有意に亢進または減少した遺伝子や転写産物群の発現変動データの解釈に使われます。例えば、1) どのシグナル伝達経路または代謝経路が活性化または不活性化されているのか？ 2) どの上流制御分子が活性化または阻害され、観察された発現プロファイルに至るのか？ 3) 遺伝子やタンパク質の発現変動は、どのような下流の生物学的プロセス、表現型、または疾患に影響を与えるのか？³⁾ などの解釈に使用されています。

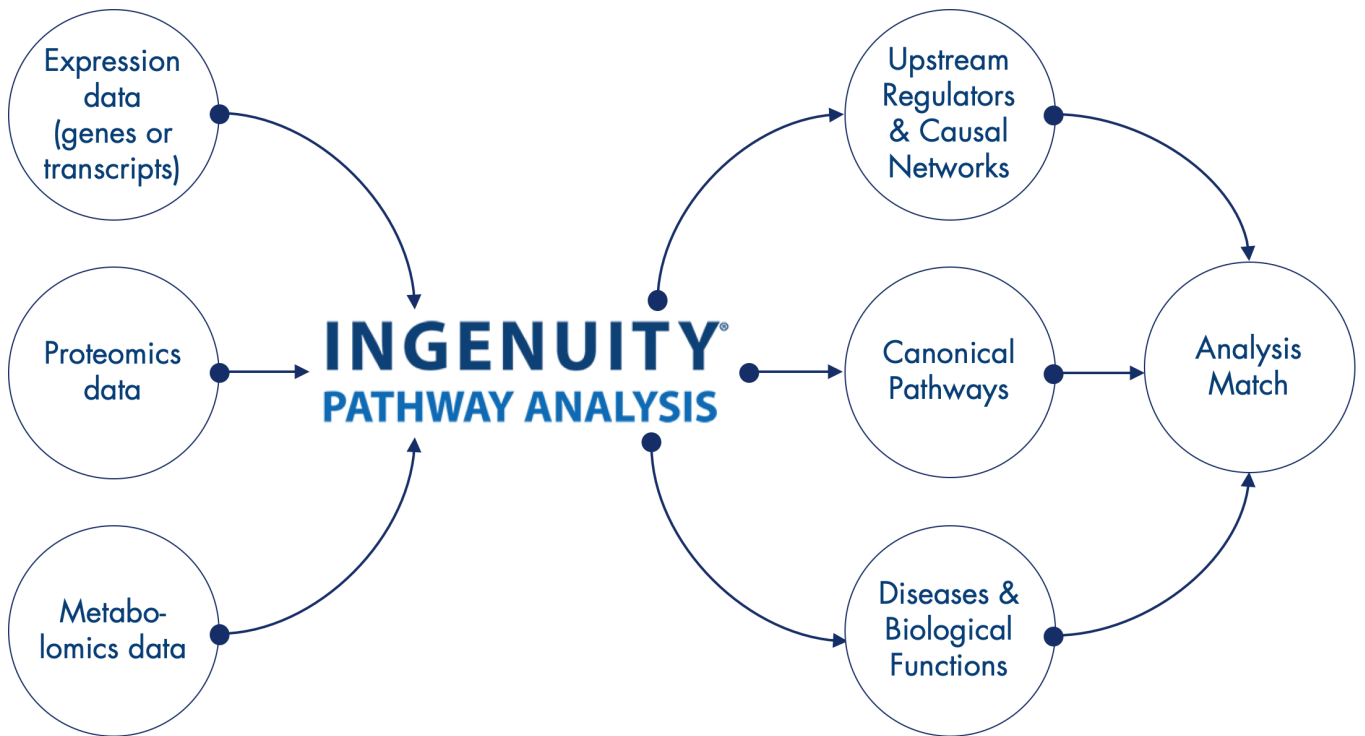


図1. Ingenuity Pathway Analysis に「オミックス」データを入力すると、上流の制御因子、活性化または不活性化パスウェイ、生物学的機能、疾患に関する生物学的解釈が得られる。

今回は、Analysis Match (IPAの新機能、以下AM) について詳しく説明します。AM を用いれば、IPA の生物学的解釈を他の解釈の結果と比較できます。AM は、上流の制御分子や下流の生物学的プロセスなどの予測からシグネチャ(特性)を作成し、同様に作成した他の解釈のシグネチャと比較します。この比較は、公共レポジトリや世界的コンソーシアム由来の膨大な遺伝子発現データから解析された解釈結果(以下、事前解釈結果)を含みます。このIPA の事前解釈結果は、大規模で継続的に増加しており、2019年5月現在、52,000以上の解釈結果によって構成されています。これらの事前解釈結果は、Gene Expression Omnibus (GEO)、The Cancer Genome Atlas (TCGA)、ArrayExpress、およびSequence Read Archive (SRA) などのソースから入手した310,000を超える個々の生物学的サンプルから抽出され、同じ解析手法で再処理されたものがIPA の事前解釈結果としてデータベース化されています。

IPA による発現プロファイルの解釈例と事前解釈結果との比較

本稿では一例として、高脂血症治療薬 Gemfibrozil (PPAR α アゴニスト) で処理したラットの肝臓に由来する RNA-seq データに焦点を当てて説明します (GSE 55347)⁴⁾。この解析では、ラットに Gemfibrozil (700 mg/kg) を7日間経口投与した試験群とコーン油のみを投与したコントロール群を比較しました。RNA-seq 解析は、DESeq2 アルゴリズムのデフォルト設定を用いて OmicSoft ArrayStudio で行い、964 遺伝子を IPA Core Analysis で解析しました。

IPA は、まず PPAR α によって活性化される上流調節ネットワーク(図2)を予測しました。PPAR α は、Gemfibrozil によって活性化が予想される核内受容体です(図2: オレンジ)。IPA は、PPAR α が最も有意な上流調節因子として活性化されていることを予測しましたが(z-score=4.6)、偶然にこの結果が予測される確率は0.001%未満です。さらに、QIAGEN Knowledge Base の20,000以上の生物学的プロセスから、PPAR α に制御されている遺伝子群によって活性化される生物学的プロセスを検索し、IPA は脂肪酸のベータオキシデーシオンの亢進を予測しました(図2: オレンジ色)。

この予測は、専門家がマニュアルで作成する網羅的で高品質な QIAGEN Knowledge Base によって可能になるもので、解析を IPA に統合された公共のデータソースのみに限定すると、興味深いことに PPAR α はまったく予測されません(データ非表示)。同様に、上流予測能力を持たない DAVID⁵⁾ の場合では、PPAR α または他の分子が観察された発現変化を上流で制御するの可否かを予測することができません。

IPA による解釈で重要なステップは、AM による解析で自身の IPA 解釈の結果が、過去の自身の解釈または事前解釈結果と類似あるいは異なる生物学的意義を持つかを調べられることです。AM は、自身の解釈(上流の制御因子や変動が予測される生物学的プロセスや疾患など)がどれほど一般化されているかを確認するために役立ち、他の類似の解釈が得られる状況を見出すことを可能にします。IPA の AM は、以前に IPA で実行した解釈と上述の52,000を超える解釈との類似性の検

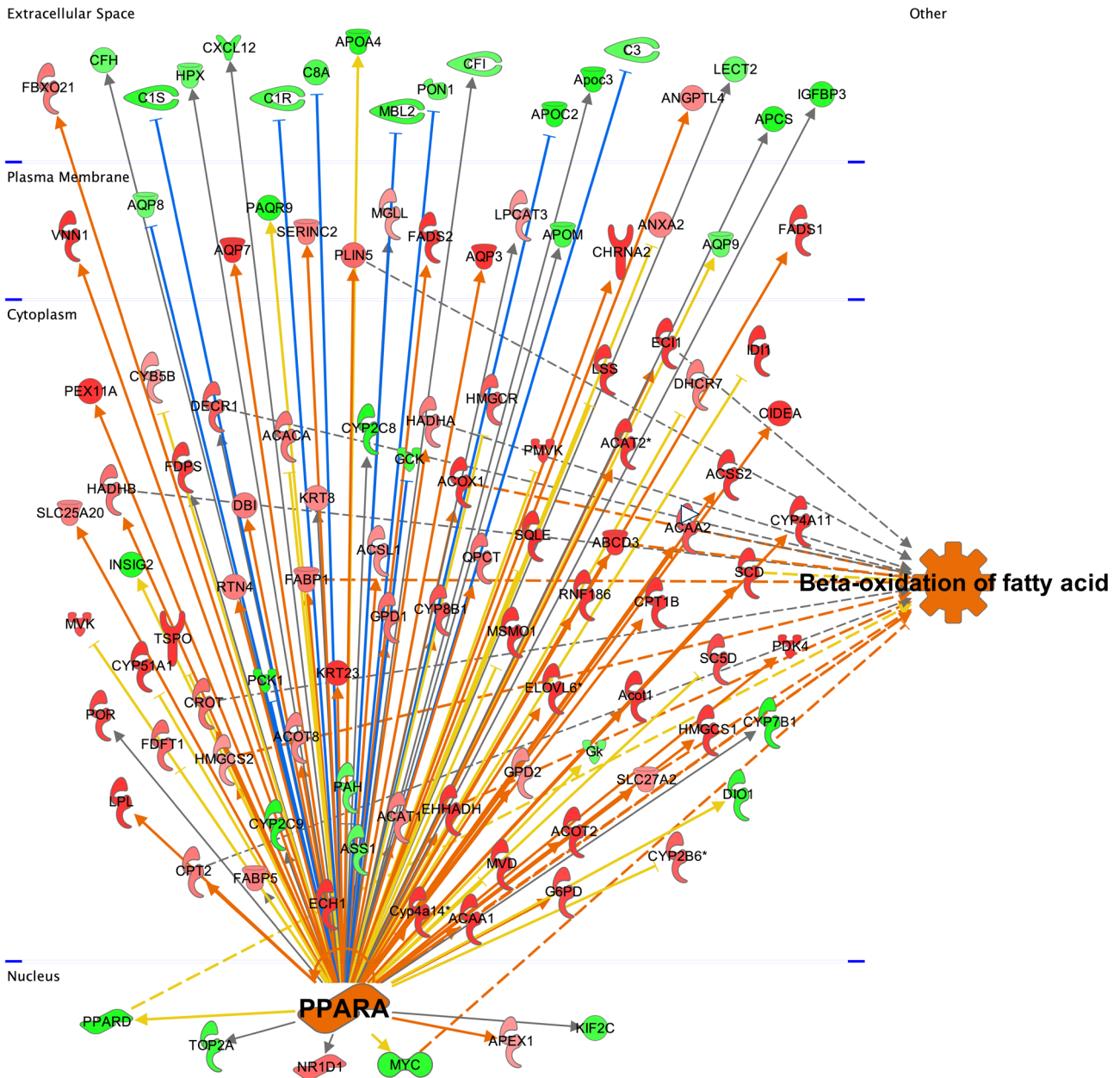


図 2. PPAR α は、Gemfibrozil 投与ラットの肝臓において活性化された上流調節因子であると予測された (z-score=4.6、p 値 =1.96E-47)。PPAR α はリガンド依存性の転写因子であり、その主要な作用部位は、IPA で表示された細胞内のレイアウト図に見られているように核内である。ネットワーク内の他の分子 (赤と緑) は、PPAR α に転写を制御される分子であり、赤色の分子は Gemfibrozil 処理でその発現が亢進し、緑色の分子は抑制されることを示している。この遺伝子セットの重要な機能は脂肪酸のベータオキシデーシオンの亢進である。ベータオキシデーシオンは、この遺伝子セットと有意に重複し (p = 7.00E-25)、その活性は亢進すること (オレンジ色) が予測された。

素を可能にします。表 1 は、Gemfibrozil 投与ラット肝臓に由来する解析結果を、AM で解析した結果を示しています。類似する結果の多くは、Fenofibrate、Tesaglitazar、Rosiglitazone、Pioglitazone、および Amorfrutin のような Gemfibrozil に類似の作用機序の化合物に曝露されたヒト細胞またはマウス由来のもので、類似性が見られた解釈の中には、高脂肪食、肥満（マウス）などが含まれ、高脂肪食はマウスで PPAR α を活性化することが知られており⁶⁾、これらの状態は、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）から生体を防御する可能性があります⁷⁾。負の相関がある結果は、皮膚炎の疾患モデルや、白色から褐色

脂肪組織への分化に重要な要因（PRDM16）のノックダウン、3-nitropropionic acid（毒素）をマウスに投与した結果など、多岐にわたります。3-nitropropionic acid の作用は、PPAR α のアゴニスト、Fenofibrate で相殺されることがわかっています⁸⁾。各解釈のどの構成要素が解釈間で一致したかを検討するために、28 のマッチングおよびアンチマッチング分析のすべてを表 1 から抜粋し、ヒートマップを作成しました。Gemfibrozil（クエリー）の検索には、表 1 のように、CP（Canonical Pathways）、UR（Upstream Regulators）、CN（Causal Networks）、および DE（Downstream Effects）の 4 つの指標が使われました。

Analysis Name	Project	case.disease...	case.tissue	comparison.category	comparison.contrast	CP	UR	CN	DE	...
Gemfibrozil microarray PM	Microarray Gem...					78.45	72.11	61.64	56.41	67.15
6- normal control [liver] N	MouseDisease	normal control	liver	Treatment vs. Control	Tissue:Compound => liver -> tesaglitazar vs saline	87.71	62.45	65.64	39.89	63.92
5- normal control [liver] N	MouseDisease	normal control	liver	Treatment vs. Control	Tissue:Compound => liver -> fenofibrate vs saline	78.45	58.31	62.52	47.67	61.74
4- diet induced obesity [si] HumanDisease		diet induced obesity	subcutaneous adip...	Treatment vs. Control	Treatment => amorfrutin 4 vs DMSO	67.94	54.88	54.77	33.71	52.82
3- obesity [subcutaneous] HumanDisease		obesity	subcutaneous adip...	Treatment1 vs. Treatment2	Tissue:Treatment => subcutaneous adipose tissue -> differentiation medi...	73.38	50.00	46.90	38.14	52.11
2- normal control [white a] MouseDisease	MouseDisease	normal control	white adipose tissue	Treatment vs. Control	Transfection:Treatment => PRDM16 shRNA -> rosiglitazone vs none	62.02	50.00	44.72	47.67	51.10
1- normal control [white a] MouseDisease	MouseDisease	normal control	white adipose tissue	Treatment vs. Control	Transfection:Treatment => control shRNA -> rosiglitazone vs none	62.02	46.90	46.90	47.67	50.87
7- normal control [embryo] MouseDisease	MouseDisease	normal control	embryo	Other Comparisons	Treatment:CultureCondition => DMSO -> N2B27 medium vs serum	67.94	53.85	50.99	30.15	50.73
1- normal control [liver] a	MouseDisease	normal control	liver	Treatment vs. Control	Treatment => amiodarone vs DMSO	67.94	57.45	41.23	30.15	49.19
42- hypercholesterolemia	MouseDisease	hypercholesterolemia	visceral adipose tis...	Treatment1 vs. Treatment2	Tissue:ExperimentGroup => visceral adipose tissue -> high fat diet 9 wee...	73.38	57.45	61.64		48.12
8- lung adenocarcinoma [l] HumanDisease		lung adenocarcino...	lung	Treatment vs. Control	Dosage => 10.56 ug/ml vs 0 ug/ml	67.94	52.92	41.23	30.15	48.06
1- obesity [mesenteric ad] HumanDisease		obesity	mesenteric adipos...	Treatment1 vs. Treatment2	Tissue:Treatment => mesenteric adipose tissue -> differentiation medium...	67.94	57.45	65.57		47.74
44- hypercholesterolemia	MouseDisease	hypercholesterolemia	gonadal adipose ti...	Treatment vs. Control	Tissue:SubjectTreatment => gonadal adipose tissue -> high fat diet:piogl...	62.02	37.71	53.85	36.93	47.63
8- normal control [embryo] MouseDisease	MouseDisease	normal control	embryo	Other Comparisons	Treatment:CultureCondition => tazemetostat -> N2B27 medium vs serum	67.94	50.14	44.72	25.13	46.98
1- normal control [liver] N	MouseDisease	normal control	liver	Treatment vs. Control	SubjectTreatment => calorie restriction vs normal diet	62.02	45.36	40.17	39.89	46.86
7- diet induced obesity [in] MouseDisease	MouseDisease	diet induced obesity	inguinal adipose tis...	Treatment1 vs. Treatment2	SubjectTreatment => high fat diet:rosiglitazone vs low fat diet	73.38	38.00	45.83	30.15	46.84
2- Alzheimer's disease [Al] MouseDisease	MouseDisease	Alzheimer's diseas...	hippocampus	Disease vs. Normal	DiseaseState => Alzheimer's disease (AD) vs normal control	67.94	43.59	44.72	30.15	46.60
1- diet induced obesity [in] MouseDisease	MouseDisease	diet induced obesity	liver	Other Comparisons	AnimalStrain(maternal) => BFMJ vs C57BL/6N	67.94	57.45	60.83		46.55
1- lung adenocarcinoma [l] HumanDisease		lung adenocarcino...	lung	Treatment vs. Control	SamplingTime => 24 hpi vs 0 hpi	58.83	50.00	30.00	45.23	46.02
2- normal control [embryo] MouseDisease	MouseDisease	normal control	embryo	Treatment vs. Control	Treatment:TreatTime[hours] => 12 -> miconazole vs DMSO	67.94	55.68	56.57		45.05
60- adrenocortical carcino	TCGA	adrenocortical carc...	adrenal gland	Other Comparisons	NOTCH2_Somatic_Mutation_IDNASeq_Status => MUT vs WT	-55.47	-45.83	-34.64	-45.23	-45.29
94- atherosclerosis.hyper	MouseDisease	atherosclerosis.hyp...	liver	Other Comparisons	AnimalStrain(maternal) => SMJ vs C57BL/6J	-73.38	-57.45	-51.96		-45.70
1- normal control [fetal ne] MouseDisease	MouseDisease	normal control	fetal neostriatum	Treatment vs. Control	Treatment => 3-nitropropionic acid vs none	-67.94	-48.99	-40.00	-30.15	-46.77
6- liver carcinoma [liver] N	OncoGEO	liver carcinoma	liver	Treatment vs. Control	Treatment => N-nitrosodimethylamine (DMN) vs none	-67.94	-48.11	-37.42	-39.89	-48.34
3- normal control [embryo] MouseDisease	MouseDisease	normal control	embryo	Treatment vs. Control	GeneticModification:Treatment => none -> knockdown IRF3 vs control	-62.02	-55.68	-33.17	-42.64	-48.38
7- liver carcinoma [liver] p	OncoGEO	liver carcinoma	liver	Treatment vs. Control	Treatment => phenol vs none	-73.38	-47.96	-40.00	-33.71	-48.76
2- atopic dermatitis [skin] HumanDisease		atopic dermatitis	skin	Disease vs. Normal	DiseaseState => atopic dermatitis vs normal control	-78.45	-56.04	-62.45		-49.24
3- normal control [white a] MouseDisease	MouseDisease	normal control	white adipose tissue	Treatment vs. Control	Transfection:Treatment => none -> PRDM16 shRNA vs control shRNA	-67.94	-44.72	-43.59	-52.22	-52.12

表 1. Gemfibrozil RNA-seq の解析結果との類似性について、52,000 以上の事前解析結果と比較し、強く一致する（ピンク色）または一致しない（シアン色）ものを、類似性スコアが、+45%または-45%のカットオフを使用して表示した。一番上の行は、同じ解析者の研究によって得られたデータだが、RNA-seq ではなく、マイクロアレイによる解析の結果である。それ以下の行にある残りのデータは、事前解析結果に由来する結果である。

図3は、Gemfibrozilの解釈結果のUpstream Regulator (UR) シグネチャの一部を示しています。PPAR α 自体がシグネチャの中にあることに注目してください (図3の赤矢印)。ヒートマップは両方の軸でクラスター化され、4つの分析クラスター (図3の行) とUpstream Regulatorの2つの主要なクラスター (図3の列、一部のみ表示) があることがわかります。

一番下の「スーパークラスター」 (大きな赤い枠内) の解釈では、すべての解析結果がPPAR α を強く活性化し、Fenofibrateやpirinixic acidなどのPPAR α アゴニストの活性化パターンに似ていることが予測されました。CiprofibrateやBezafibracなどの化合物は、IPAが使用するQIAGEN Knowledge Baseによって因果関係を裏付ける文献が示される限り、それらの化合物を

特定の遺伝子群の上流の制御因子であると、IPAは予測します (図3の列)。SREBF1、SREBF2、SIRT2のように、中段のクラスター (青い四角) の分析は、赤い四角のPPAR α アゴニストと同じ調節因子のいくつかを活性化しますが、PPAR α 自体は活性化されないため、類似の解析結果の中でも個々の因子をどのように識別するかに着目すべきです。緑色のボックス内の分析は、個々の因子が、Gemfibrozil解析の結果と全く一致せず、予想どおりGemfibrozil (クエリー) に反する結果、つまり解釈が似ていない状態を教示してくれます。

興味深いことに、アンチマッチング結果のうちの二つは、PPAR α 自体を有意に阻害すると予測され、一つは、マウス白色脂肪組織におけるPRDM16遺伝子のノックダウン (図3の上段) です。

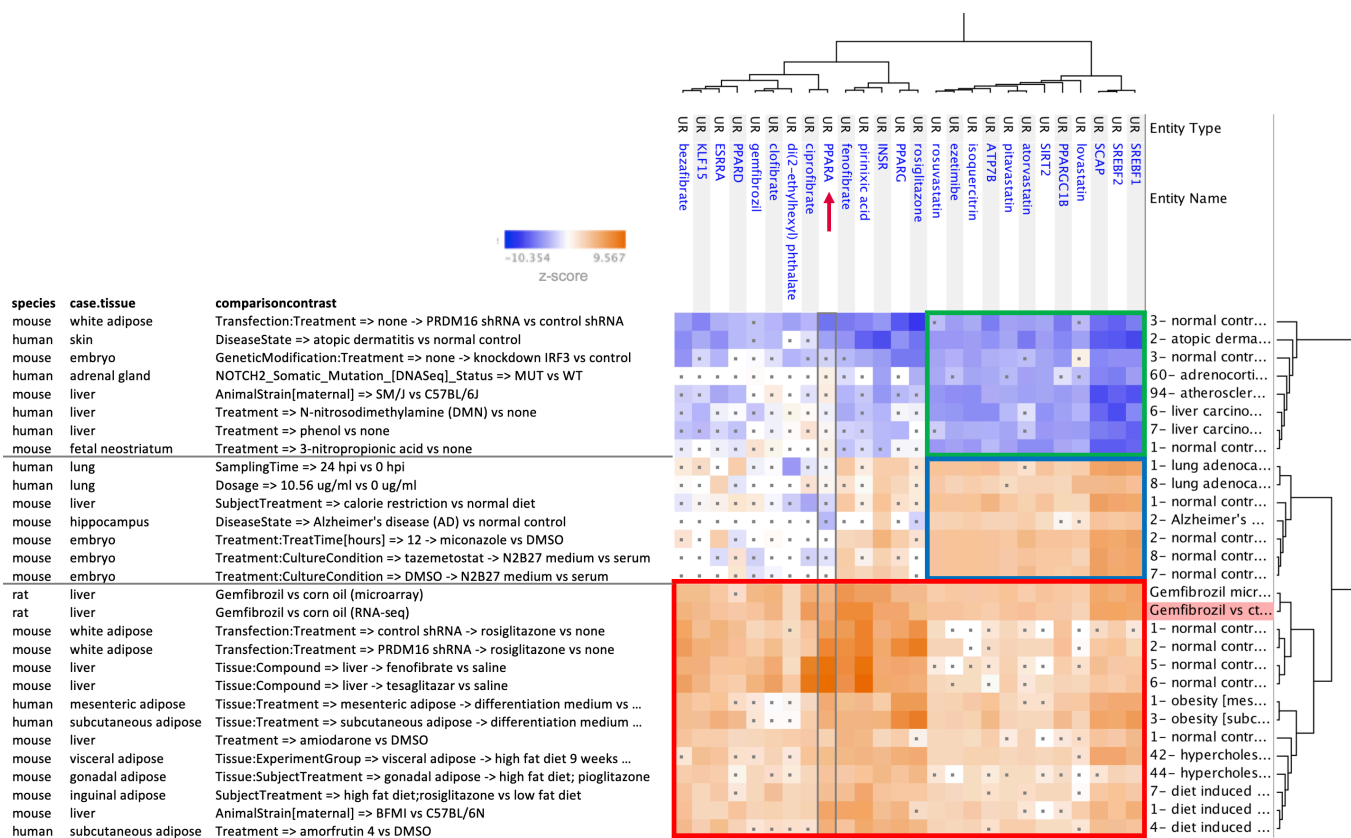


図3. クエリーと比較して28のマッチングまたはアンチマッチング解釈結果に由来するUpstream Regulator (上流調節因子シグネチャ) (Gemfibrozilをピンク色で強調) を示している。この図では一部の結果のみが表示され、Gemfibrozil分析用のUpstream Regulatorの実際のシグネチャには100の“entity”が存在している。z-scoreに基づき、ヒートマップのオレンジ色は活性化、青色は不活性化という予測が示されている (左上のカラースケールを参照)。特定のヒートマップセル中のドットは、統計的に有意でない ($-2 \leq z\text{-score} \leq 2$) という結果を示している。

このノックダウンによって、PPARA、PPARG、および PPARGC1A 遺伝子の発現レベルが下がり、脂肪細胞分化は阻害されます (図 4)。PPAR α が阻害されている (Gemfibrozil の結果と逆相関がある) もう一つの解釈は、正常な皮膚とアトピー性皮膚炎患者からの皮膚の比較解析由来の結果で、アトピー性皮膚炎が PPAR α シグナル伝達を抑制することを示唆しています (E-MTAB-729)⁹⁾。このことは、PPAR α アゴニストがこの疾患の治療薬として役立つ可能性を示唆しています。興味深いことに、2012 年にはマウスモデルで、PPAR α アゴニスト (pirinixic acid) が実際にアトピー性皮膚炎を好転させることが示されました¹⁰⁾。

PPAR α と同様に、pirinixic acid 自体がアトピー性皮膚炎分解析における「抑制された」上流調節因子として強く予測され (図 3)、この分子も、治療法として適用できることを示唆しています。これらの機能は、AM の重要な強みであり、潜在的な治療薬や新たなターゲットの予測を可能にします。

AM のもう 1 つの重要な機能は、ヒートマップに複数のタイプのシグネチャエンティティをまとめられることです。図 5 に示すように、カノニカルパスウェイと上流調節因子は、シグネチャエンティティ間の既知および未知の類似性を明らかにするヒートマップにまとめられています。このクラスターは、コレステロール生

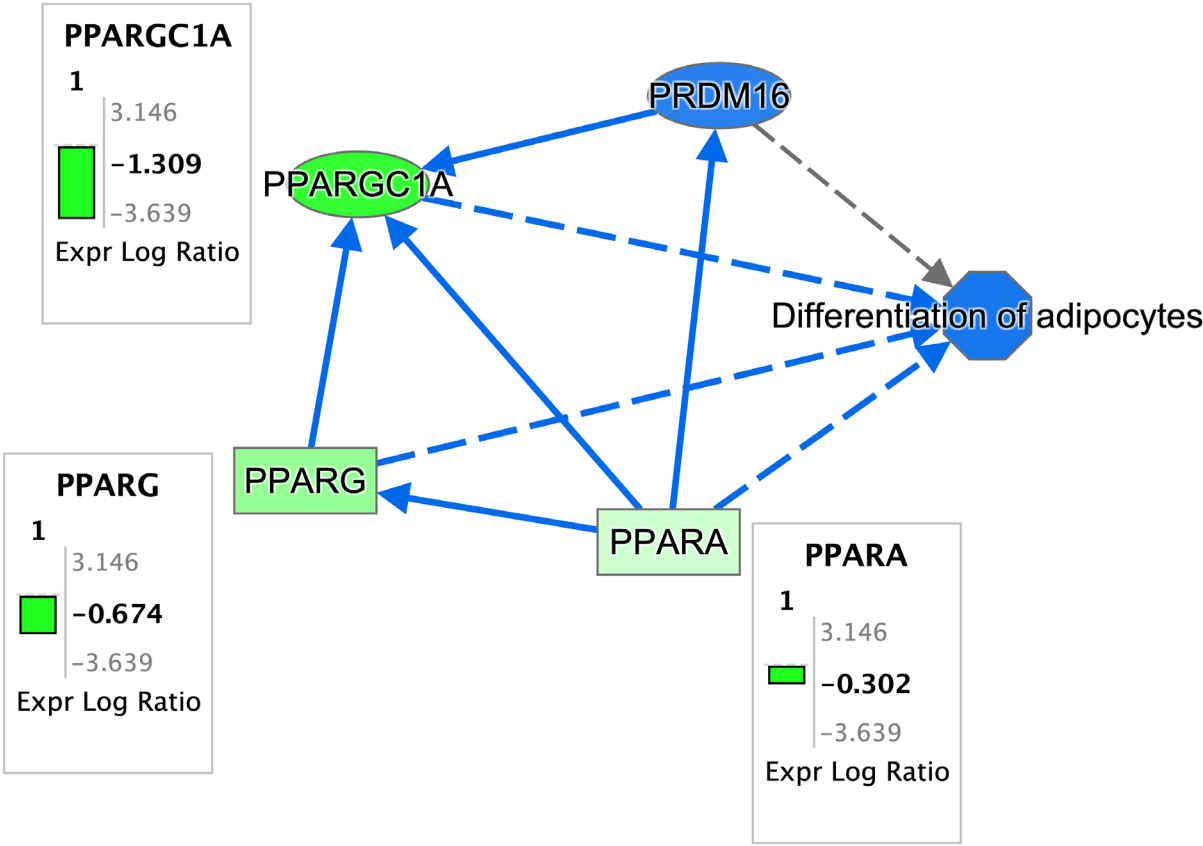


図 4. IPA は、PRDM16 (青色) のノックダウンが PPAR 関連遺伝子 (緑色) の発現抑制にどのようにつながるかを示しており、この経路から、脂肪細胞の分化の抑制 (青色) が予測される。図に示されている各関係は、参考文献によって裏付けられている。

合成経路とコレステロール生物学に必須の上流調節因子との間に存在する密接な関連性を示唆しています。

図 5 に示すクラスターの上流の調節因子には、コレステロールおよび脂肪酸の合成および取り込みに関与する遺伝子の重要な転写因子 (SREBP) をコードする SREBF1 および SREBF2¹¹⁾、小胞体から SREBP の核への輸送に関与するタンパク質 SCAP¹²⁾ (SREBP は、ゴルジ体でのタンパク質分解切断後に核に放出される)、SREBF1 の発現の調節因子である PPAR α ¹³⁾、そして

HMGCR¹⁴⁾ が含まれます。図 6 では、これらの分子がコレステロール生合成代謝標準経路 (薄色表示) における重要な段階をどのように調節するかを示しています。

IPA の AM は、IPA で解析中の解釈と、自身で行った過去の解釈結果や 52,000 件以上もの事前解釈結果を短時間で比較する機能を持ちます。これによって、有意な公的情報に迅速かつ簡単にアクセスすることや、解析中の結果のより深い解釈が可能になります。

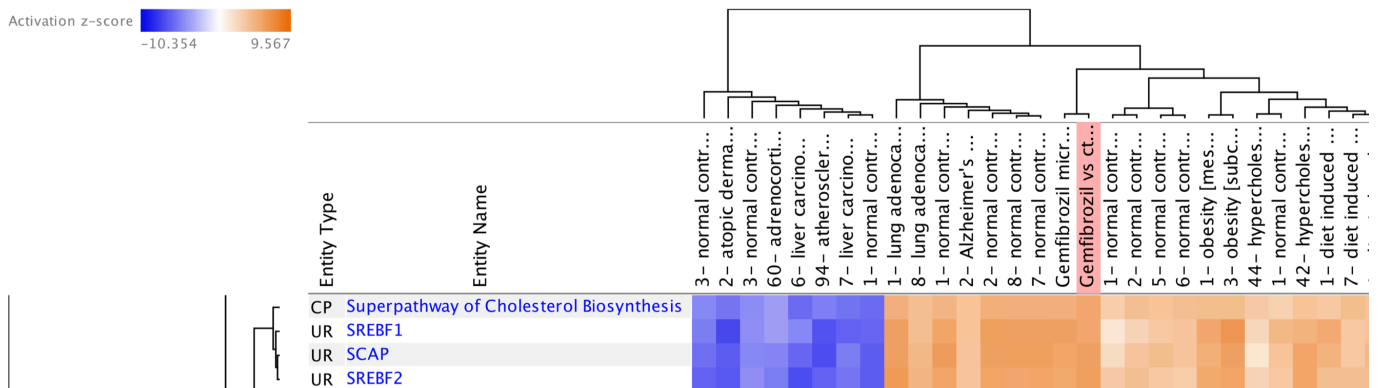


図 5. IPA では、Upstream Regulator とカノニカルパスウェイのシグネチャを組み合わせることもできる。ヒートマップの左側に表示されているエンティティの密接な相関は、エンティティ間で関連する機能を示唆している。

IPA ならびに Analysis Match の利点のまとめ

今回の例では、ヒト、マウスおよびラットのように異なる生物種や、脂肪組織、胚、皮膚、肝臓のように多種多様な組織、さらには、マイクロアレイや RNA-seq のような解析手法の差異に関わらず、類似の IPA 解釈を有する情報に瞬時にアクセスできることを示しました。AM は、各解釈間の類似性を明らかにし、上流の調節因子が特定のカノニカルパスウェイに似た活性化パターンを示しているなど、生理現象のメカニズム理解に貢献し、上流の調節因子の探索やそのレベルでの類似性の発見を可能に

します。さらに、AM は、対象となる生理現象の分子メカニズムの理解を支援する可能性がある「非類似性」を特定することができ、潜在的に疾病の治療における利点がある薬物、化合物、または標的分子を明らかにできる可能性も持っています。このように IPA と AM が協調し、膨大な量の文献情報と遺伝子発現情報が統合されて解析に利用することで、研究により実証可能な仮説など、より多くの新しい生物学的洞察が得られることに貢献します。

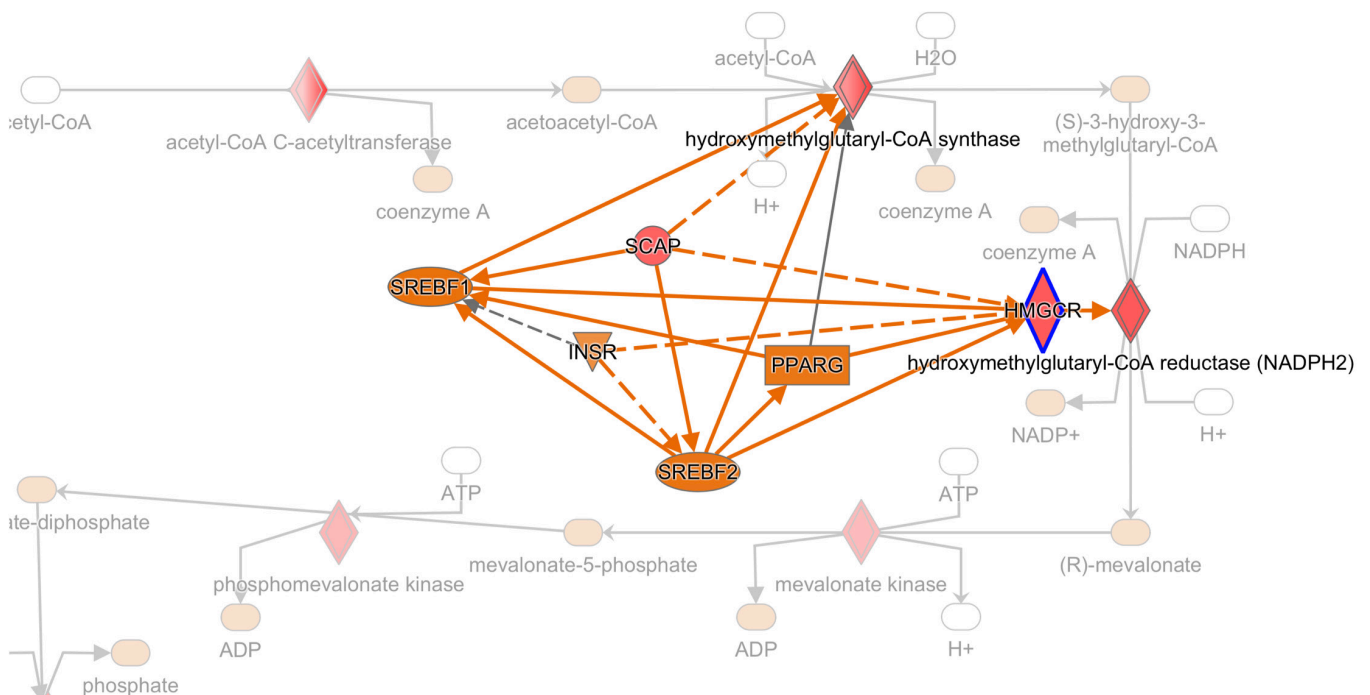


図 6. IPA のコレステロール生成経路のスーパーパスウェイの初期段階（色の薄い部分）に図 5 のクラスターからの上流調節因子を加え、文献情報を介して連結した。パスウェイは HumanCyc からキュレーションされたもの。

参考文献

- 1 Ingenuity Pathway Analysis first release. www.bionity.com/en/news/30709/stanford-university-licenses-ingenuity-pathways-analysis-collaborates-on-systems-biology-solutions.html
- 2 PMC search. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=%22ingenuity+pathway%22+AND+rna-seq
- 3 Krämer, A., Green, J., Pollard, J. Jr., and Tugendreich, S. (2014) Causal Analysis Approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 30 (4): 523–30. doi:10.1093/bioinformatics/btt703
- 4 Wang, C., et al. (2014) The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat Biotechnol. Sep*; 32(9): 926–932, doi: 10.1038/nbt.3001
- 5 DAVID. <https://david.ncifcrf.gov>
- 6 Patsouris, D., Reddy, JK, Müller, M., Kersten, S. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology. Mar*;147(3):1508-16
- 7 Abdelmegeed, MA., Yoo, SH., Henderson, LE., Gonzalez, FJ., Woodcroft, KJ., Song, BJ. (2011) PPAR α Expression Protects Male Mice from High Fat-Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *Journal of Nutrition, Apr* 1;141(4):603-610. doi: 10.3945/jn.110.135210.
- 8 Bhateja, DK., Dhull, DK., et al. (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation attenuates 3-nitropropionic acid induced behavioral and biochemical alterations in rats: possible neuroprotective mechanisms. *Eur J Pharmacol. Jan* 5;674(1):33-43. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.10.029.
- 9 Rebane, A., Zimmermann, M., et al. (2012) Mechanisms of IFN- γ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol. May*;129(5):1297-306. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.020.
- 10 Chiba, T., Takeuchi, S., et al. (2012) Topical application of PPAR α (but not β/δ or γ) suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Allergy. Jul*;67(7):936-42. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02844.x
- 11 Horton, JD., Goldstein, JL., Brown, MS. (2002) SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver. *J Clin Invest. May* 109 (9): 1125–31. doi:10.1172/JCI0215593.
- 12 Shao, W., Espenshade, PJ. (2012) Expanding Roles for SREBP in Metabolism. *Cell Metab. Oct* 3;16(4):414-9. doi:10.1016/j.cmet.2012.09.002.
- 13 Morán-Salvador, E., López-Parra, M., et al. (2011) Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J. Aug*;25(8):2538-50. doi: 10.1096/fj.10-173716.
- 14 Sugawara, A., Takeuchi, K., et al. (2001) Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology. Jul*;142(7):3125-34.

トランスクリプトミクス、プロテオミクスについての関連資料(英語)もご覧ください
go.qiagen.com/IPA-transcriptomics-whitepaper-JP



記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの免責事項については、各 QIAGEN キットの Handbook または User Manual をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, Ingenuity®, IPA™ (QIAGEN Group). 本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。2302619 11/2019 © 2019 QIAGEN, all rights reserved.