

これを用いて、遺伝子発現を、変化の倍率表示ではなく発現の絶対値表示で、ゼロから幾つ増えたか計算しデータベースを得ることにより、遺伝子発現カスケードの抽出を今まで以上の精度で行なうことが出来ると期待される。すなわち、概念的には、今までの毒性学が生体というブラックボックスを扱う際に、インプットの化合物とアウトプットの症状とを統計学的な回帰モデルで結んでいたのに対し、ここでは、ブラックボックスの中身を実際に遺伝子カスケードとして見るということである。(図4-6)

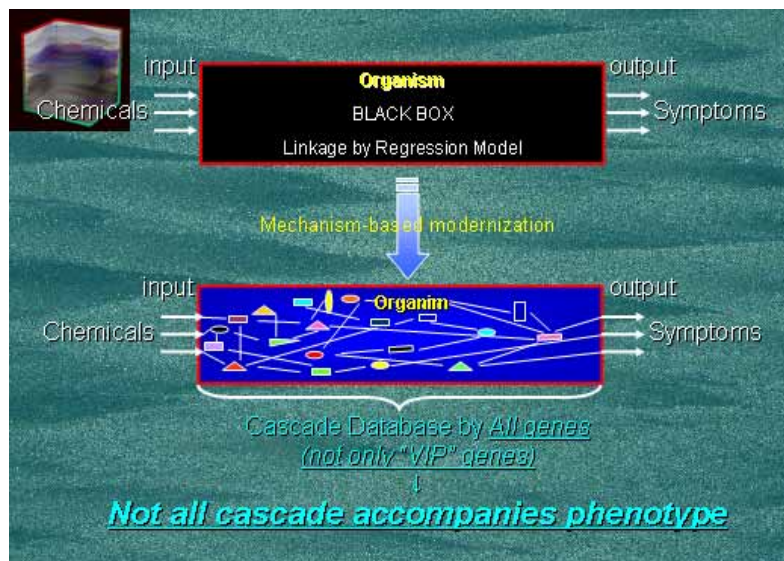


図4-6

### 形質非依存的アプローチ：

今までに、VIP、いわゆる重要な遺伝子、症状とリンクする重要な遺伝子で、これらのカスケード研究は存在するが、この手法では、すべての遺伝子を対象として考えている。その場合は、すべての遺伝子カスケードがフェノタイプを伴うわけではないため、フェノタイプは一旦データ解析の参照対象から外すことにしている。これを助ける要素としてノックアウトマウスを使う理由があり、ラットではなく、あえてマウスを採用している。

標準プロトコルでは、用量を4段階ないし5段階、時間を振ってコピー数との関係を調べている。この場合は48枚のGeneChipからのデータの表示例になる。(図4 - 7)

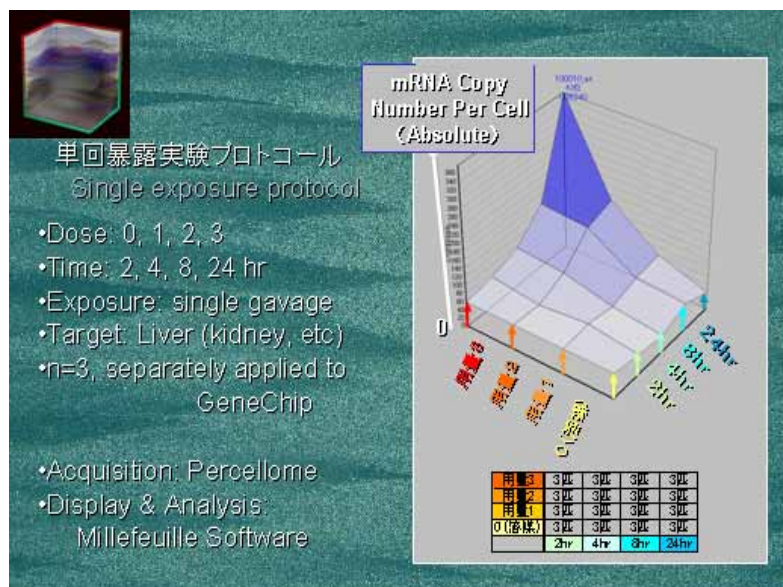


図4 - 7

現在、使用しているマウスのマイクロアレイは、一度に4万5,000 種類の遺伝子プローブセットを測定するので、この様な曲面を4万5,000 枚描くことができる。順調に3年間で90ないしは100 に到達するペースで計画が進んでいる。(図4 - 8)

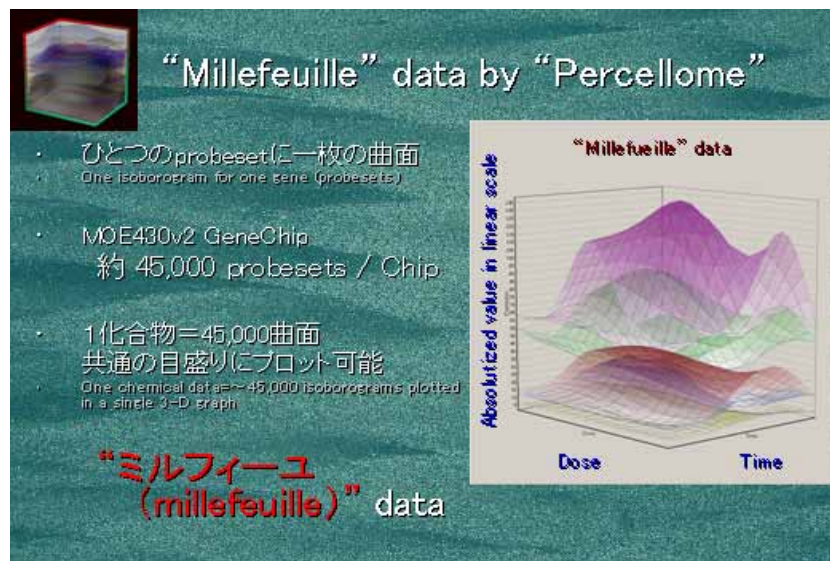


図4 - 8

例として、ダイオキシンをマウスに投与したときの肝臓の遺伝子初期変化で示すと次のようになる。表示法は、縦軸がコピー数、水平方向x軸が用量、Y軸が時間、格子点が3匹の平均である。本図（図4 - 9）はダイオキシンで誘導されることで有名なCYP1A1であるが、同じデータを二通りで表示してあり、見易さの点から選択することができる。

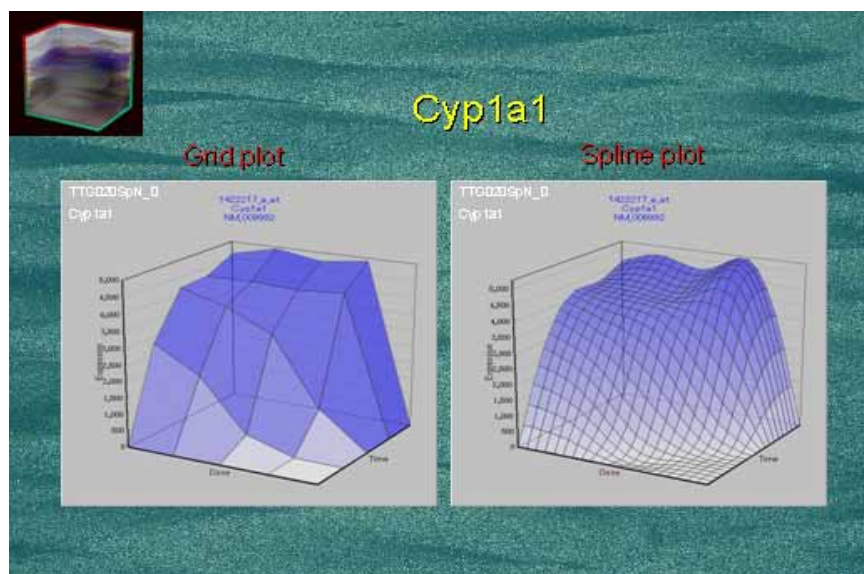


図4 - 9

データベースに集積されたデータを用いて検索を行うと、例えば、2時間目にしか変動しない遺伝子をすばやく抽出することができる。実際、4万5,000のうちから拾うと、実は十数個しかないということが簡単にわかる。

データベースの構築を進め将来に向けてコンソーシアムを立ち上げることを目標にした場合に、異なった測定系の間でのデータ互換性確保のための検証が重要となる。その結果、用量相関性など基本性能が満たされれば、どんな系でも絶対量化できるということが判明した。CodeLink チップやAgilent 社の単色マイクロアレイについて評価を行い、さらに改良を進めた結果、異なったプラットフォーム間でのデータ互換性が認められた。これを拡張すると、PerceIome 法はグローバル標準化手法を適用することが難しいスポット数の少ないマイクロアレイやPCR への有用性が期待される。2つの異なったプラットフォームで前述のLiver-Brain-Mix を各々1回測定すると、両方にて測定され、直線性が良いプローブセットに関しては、個別に換算関数が得られるという互換性が取れるということである。同じ原理で、バージョンアップの前後の新旧チップ、1回増幅プロトコルと2回増幅プロトコルの間でもの系の間でも直接換算ができる遺伝子が見つかるようになる。これを定量PCR に応用したところ、PCR の原理とチップの原理が全く異なるにも拘らず得られたデータは驚くほど似ていた。

繰り返しになるが、一度フェノタイプを忘れることを提案する理由は、例え話でいうとこうなる。ウイルス性肝炎がA型とB型とnon-A、non-B しかなかった時代は患者さんを3種類に分類していたが、ある日突然C型がてくると、同じデータなのにそれを4種類に再分類することになる。マイクロアレイデータで考えると、先に既知のフェノタイプで遺伝子の分類(クラスター)を固めてしまうと、背後に隠れている未知の情報を埋もれさせてしまう危険があるということによる。発現遺伝子のクラスターを何らかの方法で、それだけの情報から先につくっておいて、それを今分かっているフェノタイプとどういう関係にあるかを、後でオーバーラップさせる。そうすると新しい発見がある。これが我々が提唱するフェノタイプを一度忘れてクラスタリングするということである。

### **Millefeuille データとその解析法：**

解析にあたっては、曲面データである Millefeuille データが非常に理解し易く、人の顔のモンタージュ写真で、似た人を集める感覚で遺伝子発現データを把握することができる。(図4-10)

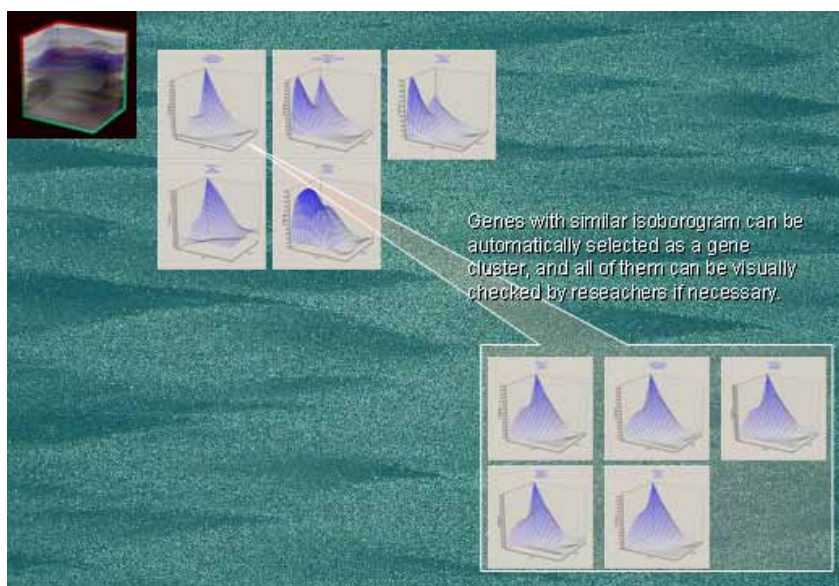


図4 - 10

ブラックボックスをいろいろな化合物で多方面から串刺しにしたときに、交点に位置する遺伝子クラスターが見つければ、そのクラスターは常に一緒に動く遺伝子の塊であるということで、あるカスケードの常連であるということがわかる、といった研究戦略で解析が進められている。

今後の展望：

現在進めているのは、成熟マウスを対象としたプロジェクトであるが、今後、吸入毒性、あるいは胎児毒性などに拡張して行く予定である。(図4 - 11)