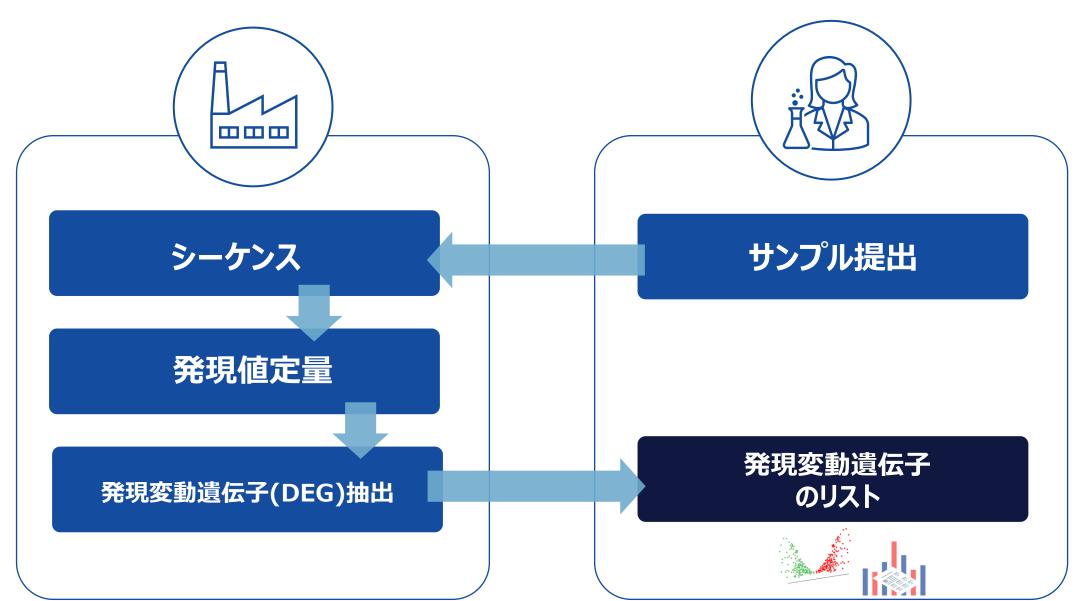


## RNA-Seq受託データからメカニズムを発見する

フィルジェン株式会社 バイオインフォマティクス部 (biosupport@filgen.jp)

### はじめに





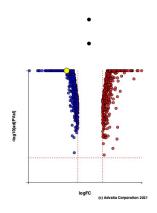
### はじめに



### 納品されるデータ

## 発現変動遺伝子 のリスト

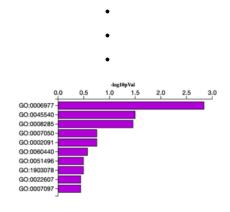
gene_id	TEST	control	log2FoldC	pvalue	padj	gene_name
ENSMUSO	3000	1	14.5	2.50E-73	1.70E-69	A1BG
ENSMUSO	4000	20	12.55	6.00E-62	5.60E-58	A1BG-AS1
ENSMUS	1111	3	13.54	8.00E-60	8.20E-57	A1CF
ENSMUSO	15000	50	16.55	1.00E-44	6.80E-42	A2LD1



わかるのは 遺伝子発現<mark>UP/DOWN</mark>のみ

### GO解析

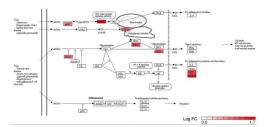
Category	GOID	Description	GeneRatio	pvalue	padj
BP	GO:00061	chemotaxis	155/1345	1.30E-20	5.48E-17
BP	GO:00455	taxis	155/1345	2.72E-20	5.45E-17
BP	GO:00754	defense resp	85/1345	3.13E-20	6.37E-17
BP	GO:00104	cell chemota	65/1345	3.00E-19	4.64E-16



大量のGO結果からの 解釈は困難

### パスウェイ解析

KEGGID	Description	pvalue	padj	keggID
mmu0406	Viral protein ir	9.13E-16	2.25E-13	mmu:124!
mmu0406	Cytokine-cytol	4.44E-14	3.54E-12	mmu:219
mmu0464	Hematopoietic	9.72E-10	7.05E-08	mmu:125
mmu0532	Rheumatoid a	7.29E-09	8.26E-08	mmu:169
mmu0514	Malaria	5.49E-08	2.89E-06	mmu:218:



どのような影響を及ぼすかは 考察が必要

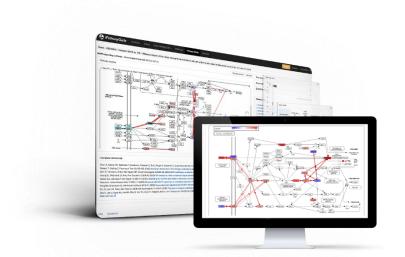
### はじめに





### 論文情報やデータベースなどを 発現変動リストと照らし合わせて考察する必要がある







「MAPK経路に関与し、細胞膜に存在する発現変動遺伝子は、アポトーシスにどのように影響するのか」



「被験者を薬剤Xで治療することにしたら、このメカニズムはどう影響するのか」

頭の中で思い描いた研究のストーリーをほぼ自動的に答えることができます。

### より良いアルゴリズム



### ·パスウェイに対する独自のImpact Analysis

- -Draghici et al. 2007 (800+ citations)
- -Tarca et al. 20009 (650+ citations)



- ・独自のメカニズム推論エンジン
  - DE 遺伝子は、どのようにして観察されたbiological processを引き起こすだろうか?
- ・ドラッグリポジショニング予測
- ・多数査読付き出版物に引用実績があり、世界中で利用されている実績の高い解析ツールです。



### フリーのソフトウェア



## Impact of outdated gene annotations on pathway enrichment analysis

To the Editor: Pathway enrichment analysis is a common technique for interpreting gene lists derived from high-throughput experiments<sup>1</sup>. Its success depends on the quality of gene annotations. We analyzed the evolution of pathway knowledge and annotations over the past seven years and found that the use of outdated resources has strongly affected practical genomic analysis and recent literature: 67% of ~3,900 publications we surveyed in 2015 referenced outdated software that captured only 26% of biological processes and pathways identified using current resources.

706 | VOL.13 NO.9 | SEPTEMBER 2016 | NATURE METHODS

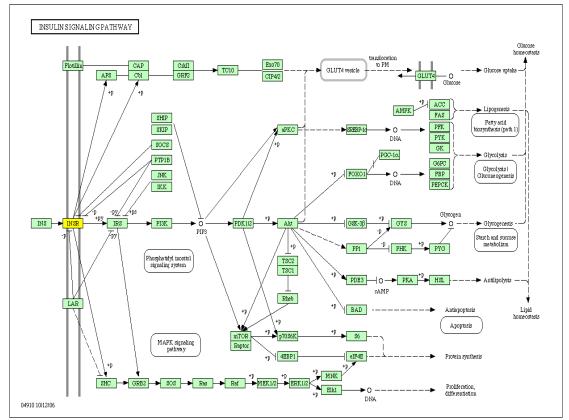


2015年に調査した約3,900の出版物のうち、67%が古いソフトウェアを参照しており、現在のリソースを使用して特定された生物学的プロセスとパスウェイのわずか26%しかカバーしていませんでした。

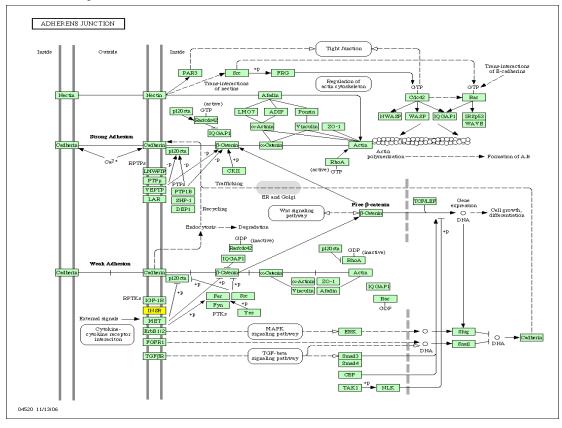
### **Enrichiment VS ImpactAnalysis**



#### インスリンシグナル伝達経路



#### Adherens junction経路

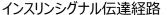


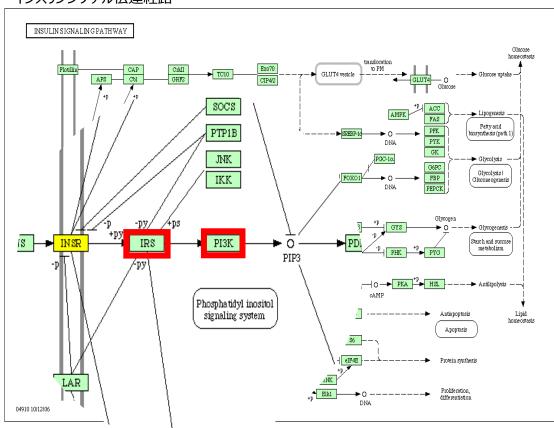
- Enrichiment解析(DAVID,IPA)では、INSRのパスウェイにおける役割や位置づけは考慮されていない →この条件では両パスウェイは影響を受けないものと判断される。
- ImpactAnalysisでは、INSRは重要なエントリーポイントであり、その遮断はインスリンシグナル伝達経路に ADVAI 大きな影響を与え、Adherens junction経路はあまり影響を受けないことが検出できる。



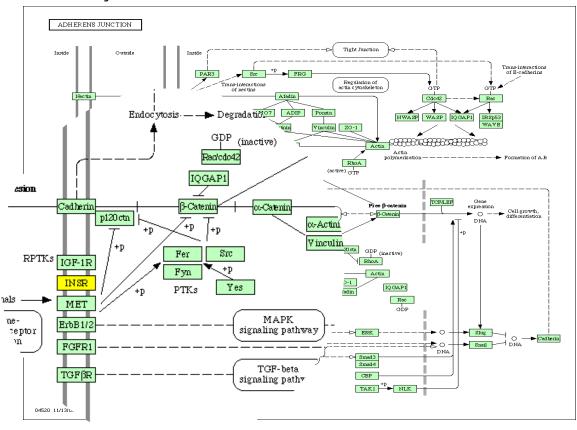
### **Enrichiment VS ImpactAnalysis**







#### Adherens junction経路



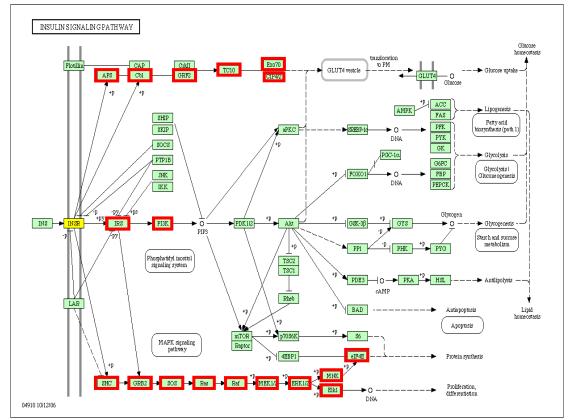
- Enrichiment解析(DAVID,IPA)では、INSRのパスウェイにおける役割や位置づけは考慮されていない。 →この条件では両パスウェイは影響を受けないものと判断される。
- ・ **ImpactAnalysis**では、<mark>INSR</mark>は重要なエントリーポイントであり、その遮断はインスリンシグナル伝達経路に 大きな影響を与え、Adherens junction経路はあまり影響を受けないことが検出できる。



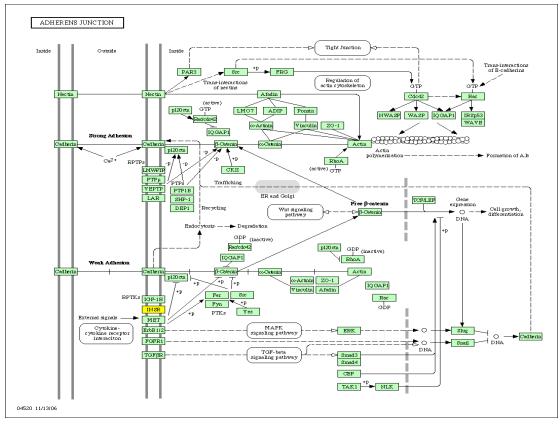
### **Enrichiment VS ImpactAnalysis**



#### インスリンシグナル伝達経路



#### Adherens junction経路



- Enrichiment解析(DAVID,IPA)では、INSRのパスウェイにおける役割や位置づけは考慮されていない。 →この条件では両パスウェイは影響を受けないものと判断される。
- ImpactAnalysisでは、INSRは重要なエントリーポイントであり、その遮断はインスリンシグナル伝達経路に ADVAI 大きな影響を与え、Adherens junction経路はあまり影響を受けないことが検出できる。



### 必要なデータ



### ·発現差異解析 / Differential expression analysis (DEA)の結果を使用

- •gene symbol (UNIPROT ID)
- ·log2FC、
- ·p値

の情報が必要です。

それ以外の列を削除してタブ区切りテキストファイルとして保存します。

\*変動なしの遺伝子も含むリスト(全遺伝子)を使用します。

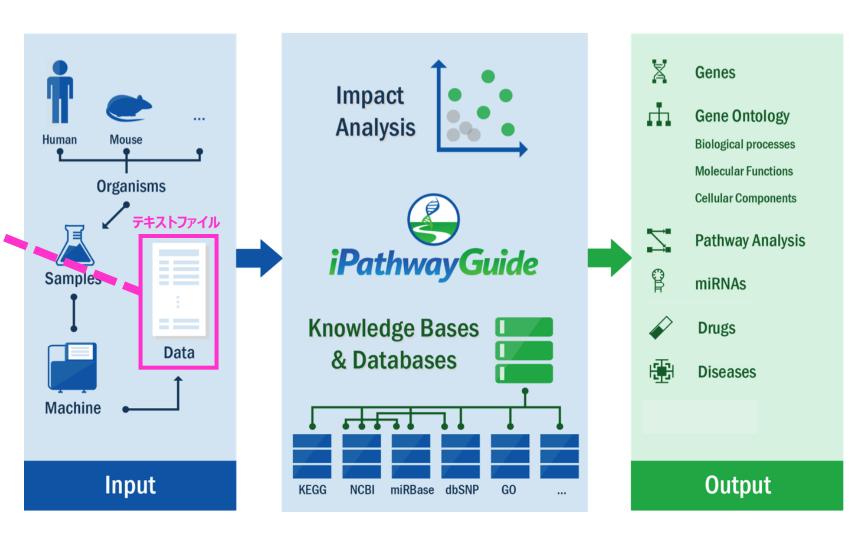
gene_id	TEST	control	log2FoldC	pvalue	padj	gene_name	4	А	В	С	D
ENSMUSO	3000	1	14.5	2.50E-73	1.70E-69	A1BG	1	gene_id	log2(fold_change)	Corrected_	_p_value
ENSMUSC	4000					A1BG-AS1	2	1/2-SBSRNA4	0.121744	0.999906	
ENSMUSC	1111	20		8.00E-60			3	A1BG	-0.402168	0.999906	
		\					4	A1BG-AS1	-0.711454	0.999906	
ENSMUSC	15000	50	10.55	1.00E\44	6.80E-42	AZLDI	5	A1CF	0.899812	1	

### 目的



4	А	В	С	D
1	gene_id	log2(fold_change)	Corrected_	_p_value
2	1/2-SBSRNA4	0.121744	0.999906	
3	A1BG	-0.402168	0.999906	
4	A1BG-AS1	-0.711454	0.999906	
5	A1CF	0.899812	1	
6	A2LD1	-0.045497	0.999906	
7	A2M	-0.192883	0.999906	
8	A2ML1	0.976507	1	
9	A2MP1	1.79769e+308	1	
10	A4GALT	-0.52375	0.999906	
11	A4GNT	-0.0533446	1	
12	AA06	0	1	
13	AAA1	0	1	
1/1	ΔΔΔς	-0.0156521	ก จจจจกร	

- •gene symbol (UNIPROT ID)
- ·log2FC、
- ·p値



データ分析プラットフォームとその機能を詳しくご紹介します。

### デモンストレーション



- 影響を受けた
  - biological processes
  - cellular locations
  - molecular functions
- 影響を受けるパスウェイを特定する
- ・ 上流の重要な調節因子/毒性物質/薬剤を特定する
- ・ 根本的なメカニズムの解明
- ・ 結果の共有と共同研究

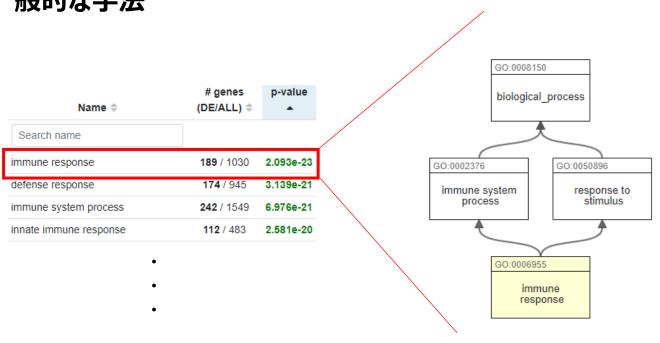


# LET'S EXPLORE

### Gene Ontology (GO) 解析









### 数百以上のGO結果

### 上位の結果を見ると抽象的 なGO termが多くみられる





GOは用語が階層構造になっており深い階層になるほど具体的な用語になる。左図では右のGOグラフの方がより具体的な生物学的なGO名と言える

上位の2つのGOは似た意味合いを持つ ことが分かる。

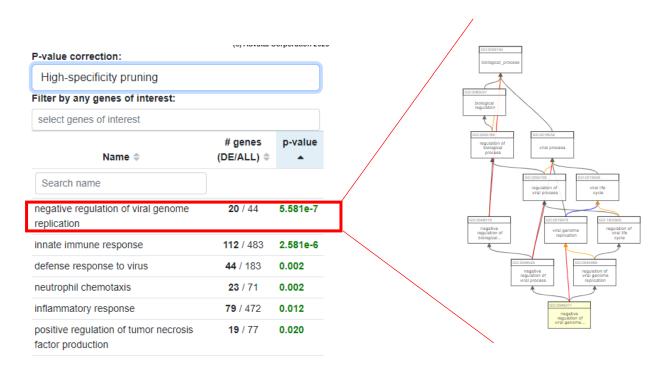
この2つのGO termには189の共通する変動遺伝子が含まれる(上図)。

→この余分や重複が冗長性としてノイズになってしまい数百以上のGO結果につながる。

### Gene Ontology (GO) 解析

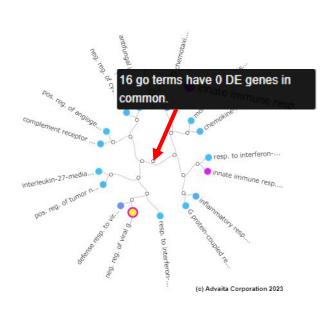


### **iPathwayGuide**



削減されたGO結果

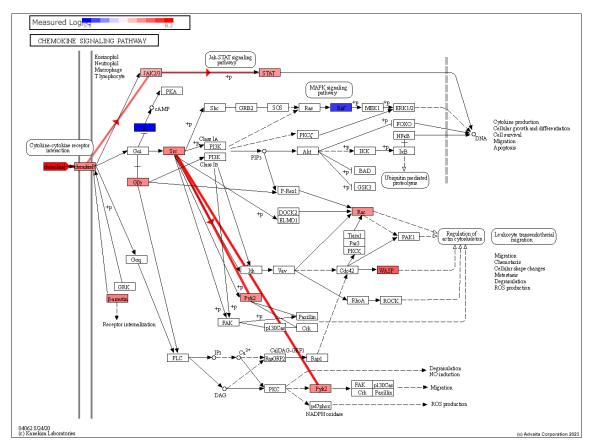
上位の結果を見ると<mark>具体的</mark>なGO termが多くみられる

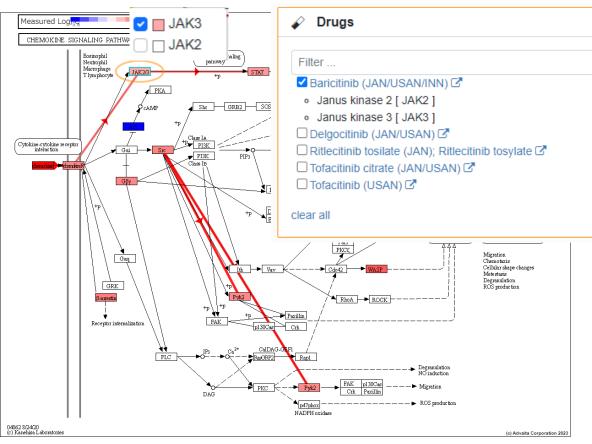


上図では16つのGo termには0個の 共通する変動遺伝子が含まれる。 →冗長性のないGOが上位に検出で きていることが分かる。

### パスウェイ解析







遺伝子の発現がパスウェイ上で定義された相互作用と一致するような形で挙動するかを視覚化

パスウェイ上の特定の遺伝子に作用する薬剤を検索あるいは、 指定の薬剤がパスウェイ上の遺伝子作用するか検索が可能

例えば「遺伝子Aが遺伝子Bを抑制する」ことが知られていて 遺伝子Aがアップレギュレーションされ 遺伝子Bがダウンレギュレーションされていれば Coherent Cascadesとして表示されます。

### 上流因子

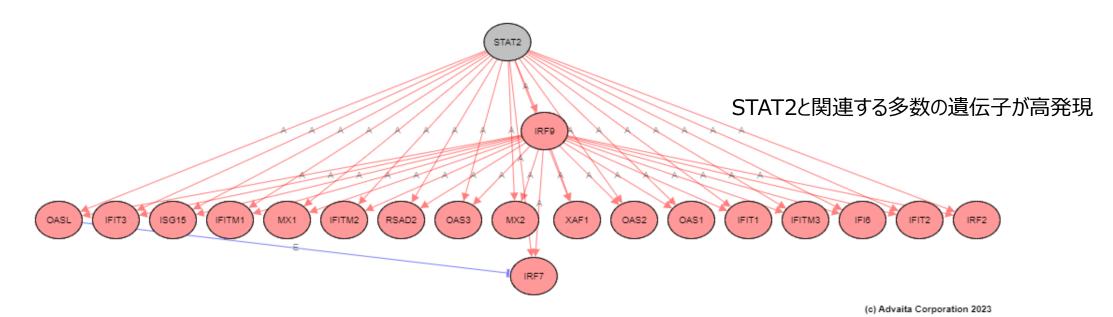




上流因子に重要な 遺伝子 薬剤 関連が予想される miRNAについて閲覧可能

Symbol \$	Entrez \$	Log <sub>2</sub> FC	adjpv \$	consistent (+)/DE targets \$	measured targets (DE/all) \$	p-value
Search sy	Search (					
IRF9	10379	2.864	0.014	19/20	20/41	1.271e-14
STAT2	6773	2.265	0.064	19/21	21/46	5.000e-13

発現変動として抽出されて いないが上流因子に重要な 遺伝子として有意があるもの がある



この遺伝子により調整される遺伝子が多数あるため、本来見逃してしまう重要な因子に気づくことができる。 さらにこの相互作用の証拠となる論文やデータベースのリンクも用意される。

### ネットワーク

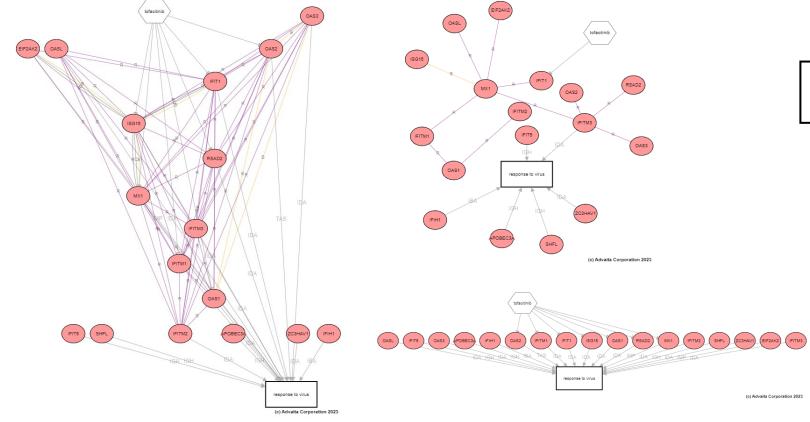


<sup>Bp</sup> Biological Processes	
Mf Molecular Functions	
<sup>Cc</sup> Cellular Components	
$\Sigma$ Pathways	
Diseases	
Hupstream Genes (activated)	

GOやパスウェイ、上流因子などの解析結果からネットワークに使用したいものを指定

例えばGO結果AとBに共通する遺伝子はその2つの結果を選択するだけで作図できる。

negative regulation of viral genome replication	20 / 44	5.581e-7
✓ innate immune response	<b>112</b> / 483	2.581e-6



左図は2つのGO結果に共通する遺伝子の相互作用が・・

Response to virus

とどのような関係があるか



を加えるとこの表現にどのような 影響を及ぼすか

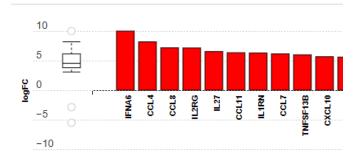
表したもの。このように特定の生物学的プロセスや 薬剤を入力するとネットワーク図上に簡単に反映 できる。

さらに同じ条件を様々な視覚化の切り替え可能

### 結果で現れた遺伝子について調べる



#### X Differentially expressed pathway genes on Cytokine-c



解析結果閲覧中に気になる遺伝子が見つかった 見つけた遺伝子がどのようなものか知りたい

		Filter
Gene details	_	Any association :
ii Gene details	<b>-</b>	References were la
Title:	C-C motif chemokine ligand 4	
Identifier:	6351 <b>☑</b> *	
Symbol:	CCL4	← Newer
Aliases:	ACT2, G-26, HC21, LAG1, LAG-1, MIP1B, SCYA2, SCYA4, MIP1B1, AT744.1, MIP-1-beta	Tagoma, A. et al
Summary:	The protein encoded by this gene is a mitogen-inducible monokine and is one of the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T-cells. The encoded protein is secreted and has chemokinetic and inflammatory functions. [provided by RefSeq, Dec 2012]	group. Journal o Faccioli, L.A.P. e details Wang, HD. et a

Filter		
Any association sources		
References were last updated of	on Oct 11, 2023	
← Newer		Older →
Tagoma, A. et al., 2022. Plass group. Journal of diabetes inv	2 0. 0 2.	the risk of diabetes in the gestational diabetes risk
<ul> <li>Faccioli, L.A.P. et al., 2022. Li details</li> </ul>	iver cirrhosis: An overview of experimental models	in rodents. Life sciences, 301, p.120615. Ta more
	lication value of biofluid-based biomarkers for the opp.963–971. FT more details	diagnosis and treatment of spinal cord injury. Neural

□ Literature references for CCL4

遺伝子をクリックすると、 遺伝子の説明や関連する論文にアクセスできる。 さらに論文は日々アップデートされるので 最新の情報を得ることが可能。

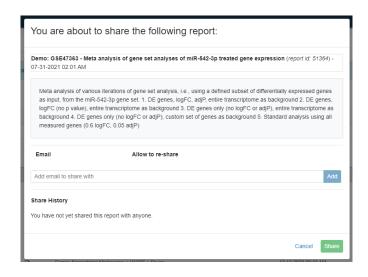
Literature references for CCL	<del>-</del>	
covid-19		
Any association sources		
References were last updated on Oct	11, 2023	
← Newer		Older →
Kesmez Can, F. et al., 2021. Effect journal of clinical practice, 75(12), p.	of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL 10 levels on the e14970. FT fewer details	severity in COVID 19 infection. International
Int J Clin Pract. 2021 Oct 22; 75 (12).	doi: 10.1111/ijcp.14970.	
Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IF	P-10/CXCL 10 levels on the severity in COV	ID 19 infection
Fatma Kesmez Can, Zülal Özkurt, Nu	rinnisa Öztürk, Selma Sezen	
Abstract:		
_	st observed in December 2019 and has affected the eded to predict the clinical progression of the disea	*

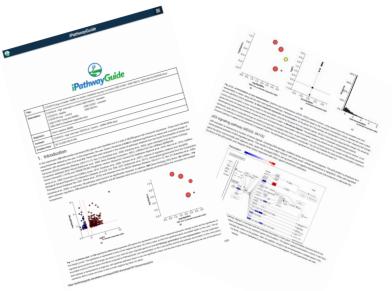
関連論文に特定のワードを入力することでより、最適な論文を見つけることが可能。

例えばCCL4遺伝子にて「Cancer」や「Covid-19」を入力すると CCL4でがんに関連する論文や CCL4で新型コロナに関する論文が表示される。 論文のリンクも含まれる。

### 共有







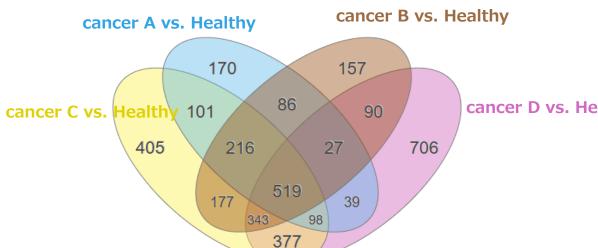
iPathwayGuideの結果は、ライセンスを持っていないユーザーにも共有することができる。

共有したい結果から共有相手のメールアドレスを入力するだけ。

実験結果のサマリーレポートをPDF出力することも可能

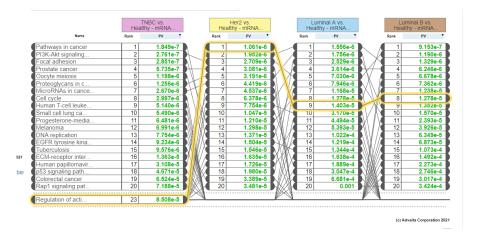
### メタ分析

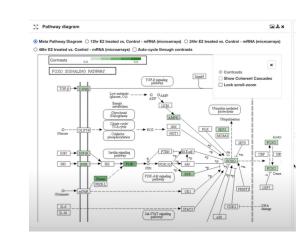


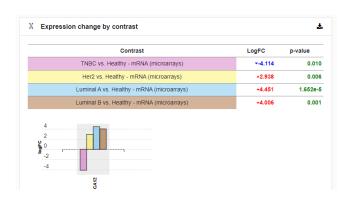


cancer D vs. Healthy

iPathwayGuideは複数の実験間での比較が可能。 例)AvsBとAvsCのデータセットの比較(最大5つの実験データの比較)







遺伝子、miRNA、GO、パスウェイ、上流調 節因子、疾患の対照間の相対的な順位比較

パスウェイ図ですべての実験で 差次的に発現する遺伝子を確認

バイオマーカーの探索



お問い合わせ先:フィルジェン株式会社

TEL: 052-624-4388 (9:00~17:00)

FAX: 052-624-4389

E-mail: biosupport@filgen.jp