

# PCSK9 遺伝子 — GENEVESTIGATOR® を使った解析事例

© NEBION AG, 2015 年 11 月

**PCSK9** 遺伝子は血中の LDL コレステロール量の調節にとって重要な酵素として知られています。この研究で我々はこの遺伝子の様々な組織、細胞株、ガンでの発現調節といくつかの生物種(ヒト、マウス、ラット)での発現変動の特性を明らかにし、関連する実験条件で PCSK9 と潜在的に共発現している遺伝子を同定します。この研究は GENEVESTIGATOR® を使ったコンピューターでの遺伝子発現解析の事例です。

## 概要

プロタンパク質変換酵素サブチリジン/ケキシン 9 型(PCSK9)は血漿中のコレステロールの恒常性の調節に対して極めて重要な酵素です。それは低比重リポタンパク質(LDL)受容体パスウェイおよび肝臓での LDL の分解の天然阻害剤として働きます。GENEVESTIGATOR® を使った詳細な解析により PCSK9 の発現は栄養状態およびスタチン治療により直接間接の両方で調節されていることが確かめられました。さらに、PCSK9 の恒常性は炎症性大腸炎や消化管癌のような消化管の疾患で変動しています。脂肪酸代謝に関連するいくつかの遺伝子が主な共発現する遺伝子として確認されました。最後に、我々の解析結果は PCSK9 が気管支上皮細胞で高発現しておりこの組織で主要な役割を果たしている可能性があることを示しています。

要するに我々の解析結果は LDL の代謝における PCSK9 の顕著な役割を裏付けます。実際、PCSK9 が LDL 受容体に結合して肝臓で LDL を分解することを阻害していくつかのモノクローナル抗体が最近家族性高コレステロール血症およびその合併症の新規の治療薬として承認されています。

## 基本情報

PCSK9 遺伝子の発現解析はヒト(HS)、マウス(MM)、ラット(RN)の複数のマイクロアレイプラットフォームで実施されました。基になるキュレーションされたデータベースは次のような実験条件を対象とする3つの生物種の 86,263 サンプルを含みます。

- 組織及び細胞種: HS: 324, MM: 244, RN: 89
- 細胞株: HS: 1,420, MM: 55, RN: 13
- ガン: HS: 597
- 発現変動 (比較条件): HS: 3, 477, MM: 929, RN: 7,140
  - 薬剤および化合物: HS: 1,562, MM: 280, RN: 6,904
  - 疾患: HS: 1,274, MM: 203, RN: 110
  - ホルモン、サイトカインなど: HS: 615, MM: 261, RN: 108
  - 遺伝子型: HS: 77, MM: 367, RN: 18

PCSK9 の解析に次のプローブセットを使用しました。

プラットフォーム	プローブセット
Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	227759_at
Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	1437453_s_at
Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array	1385640_at

このレポートの全ての発現量は log2 変換された値の平均値±標準偏差です。それぞれのプラットフォームで変換された log2 発現量は 5~18 の範囲に入り、全ての転写産物の平均の発現量はおおよそ 10 です。

## 機能解析と適応症の研究結果

### 1. 組織や初代培養細胞での発現

PCSK9 は様々なヒト ( $9.88 \pm 0.74$ ) やマウス ( $8.57 \pm 1.64$ ) の組織で中程度に発現する遺伝子である一方、ラット ( $13.04 \pm 2.02$ ) では有意に高発現することが認められます。我々は性別間で PCSK9 の発現に差異を認めませんでした。

PCSK9 の発現が高い上位 5 つの組織／初代培養細胞 (詳細は図 1)

ヒト (324 組織中の上位 5 個)	マウス (244 組織中の上位 5 個)	ラット (89 組織中の上位 5 個)
赤血球前駆細胞	後腎胞	肝臓、肝細胞
2 型肺胞上皮細胞	肝臓	神経細胞 (小脳)
気管支上皮細胞	大腸	大腸
肝細胞	回腸	精母細胞
結腸陰窩	パネート細胞	網膜ミュラー細胞

Dataset: 324 anatomical parts (sample selection: HS\_AFFY\_U133PLUS\_2-0)  
 1 gene (gene selection: HS\_AFFY\_U133PLUS\_2-0)

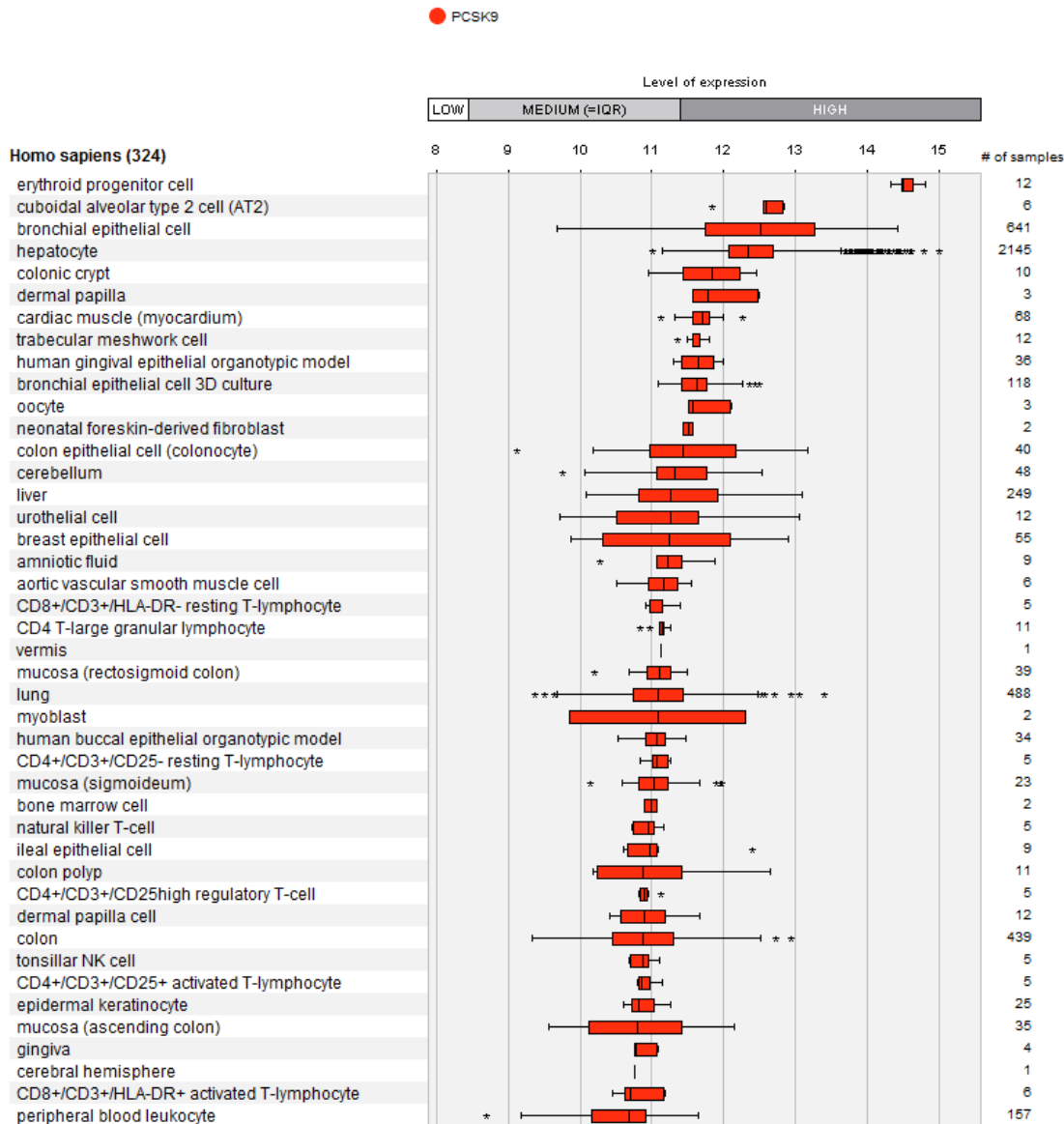


図 1: 様々な組織や初代培養細胞ごとに集約したヒトの PCSK9 遺伝子の発現量を降順に並べた例。注目する生物種(ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル)ごとに解析した全ての組織の全体の画像は発現量の平均値 (csv ファイル)と合わせて提供されます。

## 2. ガンでの発現

PCSK9 遺伝子の発現量が高いガンは順に結腸および胃の腺癌、類内膜癌、肝細胞癌です。ガンではない組織全体での発現量と比較した時、遺伝子の発現に対するガンの特別な影響はありません(図 2)。ガンのデータは最も幅広い癌種を対象とするヒトのマイクロアレイプラットフォームでのみ解析しました。

Dataset: 1218 anat./neopl. categories (sample selection: HS\_AFFY\_U133PLUS\_2-0)  
 1 gene (gene selection: HS\_AFFY\_U133PLUS\_2-0)

● PCSK9

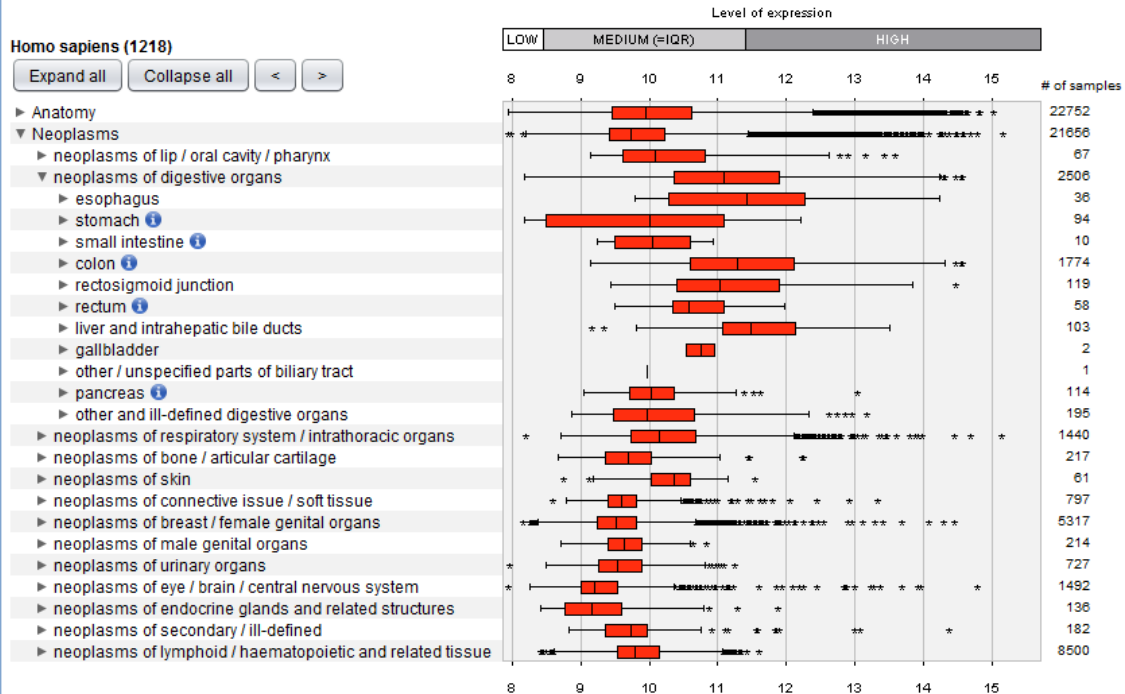


図 2: ガンでの PCSK9 遺伝子の発現解析の例。ここでは体組織で分類された主ながんのツリー表示を示しています。より詳細な表示および詳細な発現量の csv ファイルは要望に応じて提供可能です。

### 3. PCSK9 遺伝子の発現を上昇および低下させる最も有意な発現変動要因

1,700 以上の化合物を対象にした毒性および薬理ゲノミクスの特に豊富な研究が行われているヒトおよびラットのプラットフォームで化合物について調査することで、PCSK9 は様々なスタチン(アトルバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、フルバスタチン)治療により肝細胞で有意に発現が上昇( $\geq 2$ -fold,  $p=0.01$ )したり、脂質修飾剤(クロフィブラート、フェノフィブラート)を用いた治療に応じて腎臓で有意に発現が上昇したりすることが分かります(図 3)。さらに、PCSK9 の発現上昇の原因となる薬剤や化合物はメタピリレン(抗ヒスタミン剤)、ゲフィチニブ(抗がん剤)、ドクサピン(抗うつ剤)、ラベタロール( $\beta$  受容体遮断薬)、ケトコナゾール(抗真菌薬)です。その一方、我々は発現を低下させる薬剤として例えば乾癬の皮膚のプロダルマブ治療、気管支上皮のデシタピン(代謝拮抗物質)治療、肝臓のエストロゲン治療とプロゲステロン治療、鎮痛剤と解熱剤(アスピリン、パラセタモール、フェナセチン)を特定しています。

疾患や実験条件に関して、我々は PCSK9 が潰瘍性大腸炎やクローン病の患者の大腸で有意に発現が上昇( $\geq 2$ -fold,  $p=0.01$ )したり、結腸直腸がんや卵巣がん(全てヒト)あるいは飢餓(ラット)により有意に発現が上

昇したりすることを検出しています。発現が低下する実験条件は高脂肪食の摂取(マウスの肝臓)、肺腺癌、TGF-b 治療、気管支細胞の分化(全てヒト)です。

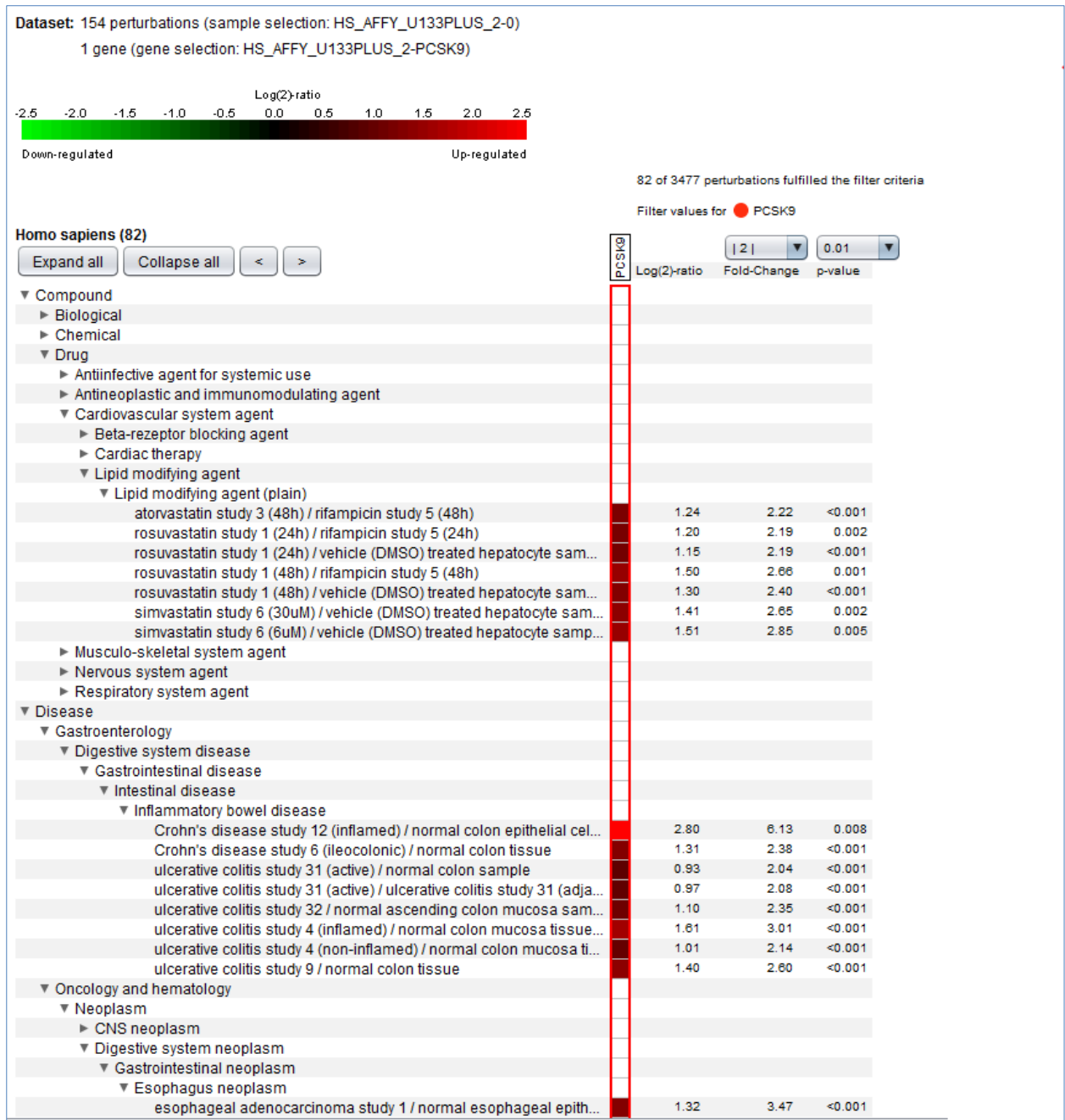


図 3: 強く発現が上昇している発現変動(実験群と対照群)のサブセットの例。興味のある生物種(ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル)ごとの全ての有意な発現変動の全体のグラフ、ひいては平均発現量の値(csv ファイル)は zip ファイルで提供されます。

## MODEL FINDING

実験モデルとして適している PCSK9 の発現量が上位の細胞株

細胞株	由来	発現量(log2 ± SD)	サンプル数
<b>ヒト - ガン</b>			
CAL27	舌扁平上皮癌	14.89 ± 0.86	3
IM95	胃腺癌	15.10 ± 0.39	3
KB	鼻咽頭扁平上皮癌	14.67 ± 0.25	2
<b>ヒト - 正常組織</b>			
iPSC	皮膚繊維芽細胞	13-14.2	8
NPrEC	前立腺上皮細胞	12.64 ± 0.26	16
ESC	胚性幹細胞	11.68 ± 1.16	53
<b>マウス</b>			
iKras1	膵管癌	12.03 ± 0.71	2
MIccl2	小腸上皮	12.52 ± 0.21	35
mIMCD-3	髄質集合管	11.84 ± 0.32	2
Min6	不死化膵臓 B 細胞	11.04 ± 0.10	2
<b>ラット</b>			
RLAK	気道前駆細胞	14.71 ± 0.23	45

マウス/ラットの見込みがあるモデル

マウス系統(近交系)	変異遺伝子/説明	Fold-change (p-value)	組織
PPARα <sup>-/-</sup> (SV129)	PPAR alpha	+1.99 (p=0.009)	肝臓
KRAP <sup>-/-</sup> (C57BL/6J)	Ki-ras induced actin-interacting protein	-3.00 (p=0.035)	肝臓
ラット系統(近交系)	変異遺伝子/説明	Fold-change (p-value)	組織
FHH (Sprague Dawley)	自然発症高血圧ラット	1.57 (<0.001)	腎臓

## ネットワーク解析

### 1. 関連する発現変動にわたってどの遺伝子が最も強く PCSK9 と相関するか?

PCSK9 の共発現遺伝子を探すために、我々は実験群と対照群の間で PCSK9 の発現が少なくとも 2 倍変化 (p=0.01)する全ての発現変動(PCSK9 応答性の発現変動)にわたって(ピアソンの相関係数により)共発現解析を実行します。解析結果はヒトの上位 50 の表発現遺伝子のみ出力します(図 4)。

円グラフで標的遺伝子は中心に、関連する遺伝子はその周りに相関スコアに対応する距離で表示されます。遺伝子は中心に近いほど、選択したデータセットにわたって標的遺伝子とより強く相関しています(ピアソンの相関係数の軸を参照)。中心の周りの位置は最適な葉ノードの順序の階層型クラスタリングにより決定されます。すなわち互いにより強く相関する遺伝子がグループ化されます。

PCSK9 に関して、相関の円グラフで最も相関が強い遺伝子として中程度に相関する遺伝子(<0.8)のみ表示されます。PCSK9 と共発現あるいは一緒に発現調節される上位の遺伝子は SCD (ステアロイル CoA 不飽和酵素)、DHCR7 (7-デヒドロコレステロールレダクターゼ)、SQLE (スクアレノエポキシダーゼ)、HMGCS1 (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 合成酵素 1)です。PCSK9 の脂質代謝における役割を裏付ける結果です。相互相関が 0.845 より大きい遺伝子が線で結ばれます。

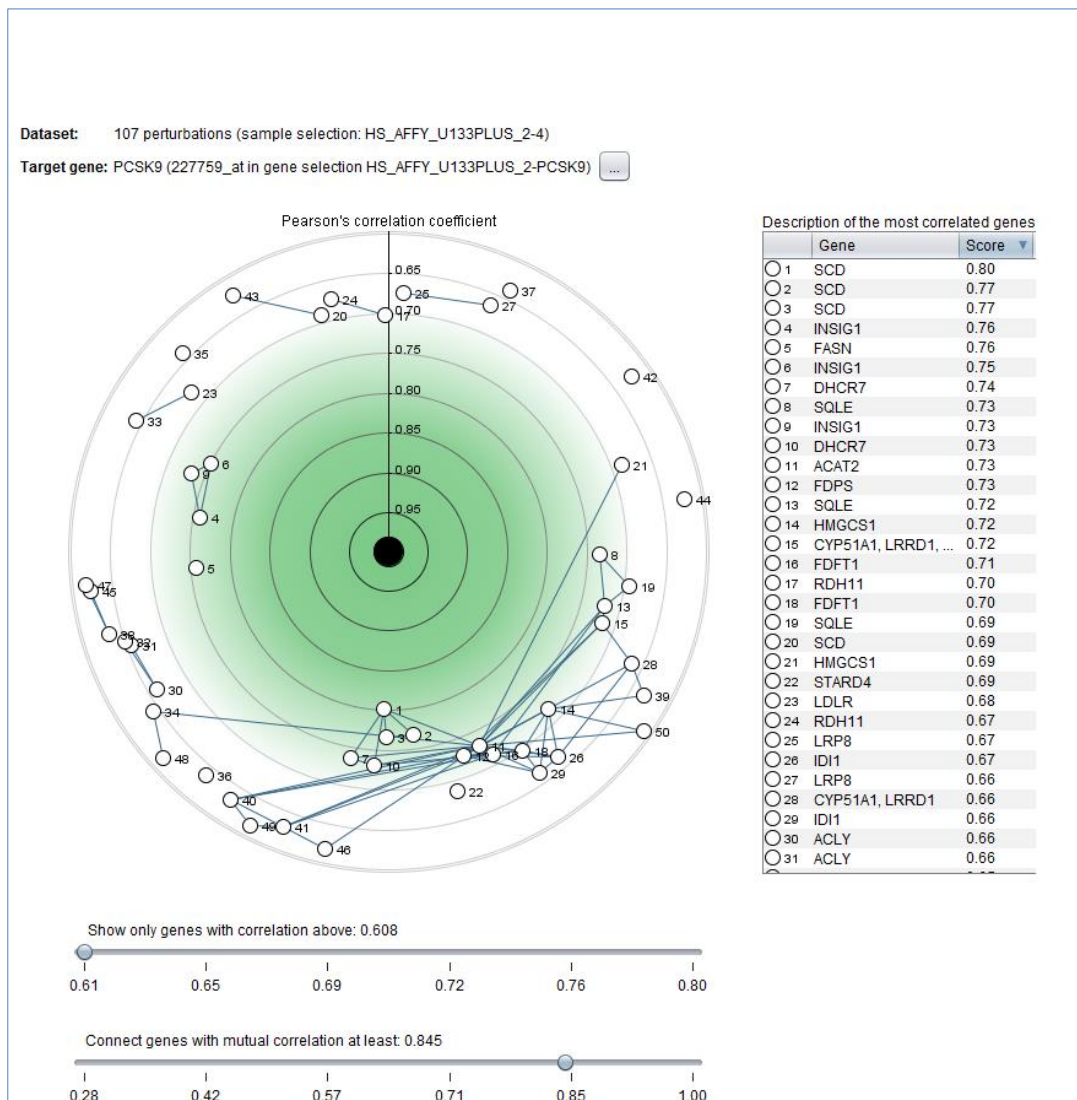


図 4: 関連する発現変動にわたって PCSK9 と正の相関を持つ共発現遺伝子の上位 50 個を表示した円グラフ。全ての遺伝子の完全なリストと詳細な情報は csv ファイルで提供されます。

## 2. これらの遺伝子が組織間でどのようにクラスター化されるか?

その後の共発現遺伝子の組織によるクラスタリングは、空間的に一緒に局在して発現変動も一緒に調節される転写産物を見つける手助けになります。図5は前ページのリストの遺伝子を組織の部位ごとにクラスタリングした結果を表示しています。

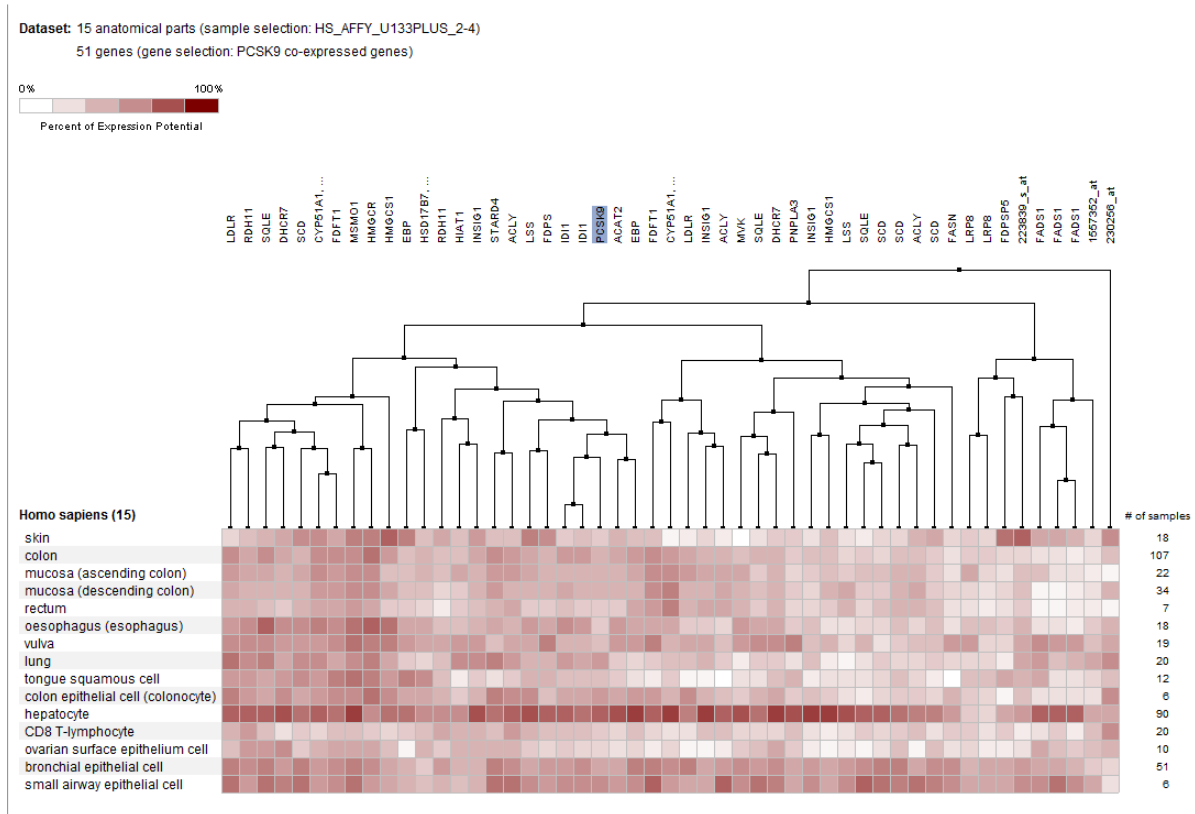


図 5: PCSK9 と一緒に発現が調節される遺伝子の組織の部位でのクラスタリング

### 個別の解析

GENEVESTIGATOR®は個別の実験(例えば、GEO のアクセッション番号)や複数の実験(例えば、特定の疾患や組織)を選択して特定のサンプルセット間での発現変動解析のような詳細解析が可能です。

### お問い合わせ先

Nebion 社のデータベースコンテンツ、解析ツール、解析サービスについての詳細は菱化システム (support@rsi.co.jp)までお問い合わせ下さい。