

# Rを用いたメタボロームデータ解析: Metabolome data analysis using R

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

山本 博之

# メタボロミクスにおけるデータ解析



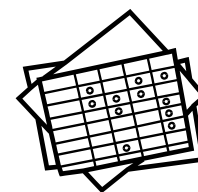
## 質量分析装置



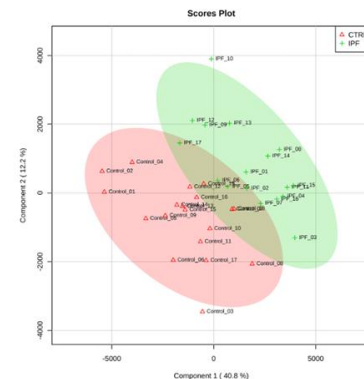
## 解析ソフトウェア MS-DIAL



## Excelデータ



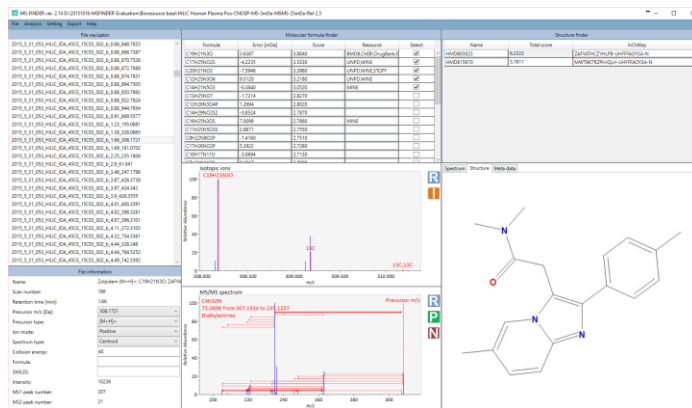
## MetaboAnalyst



質量分析装置から得られた信号を解析

代謝物名が不明の未知ピークの構造を推定

## 構造推定ソフトウェア MS-FINDER



リポジトリへの登録  
● MetaboBank ●

# メタボロミクスにおけるデータ解析

Rで全て実行



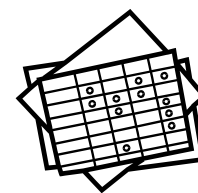
## 質量分析装置



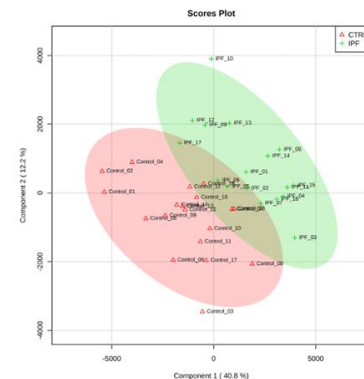
## 解析ソフトウェア MS-DIAL



## Excelデータ



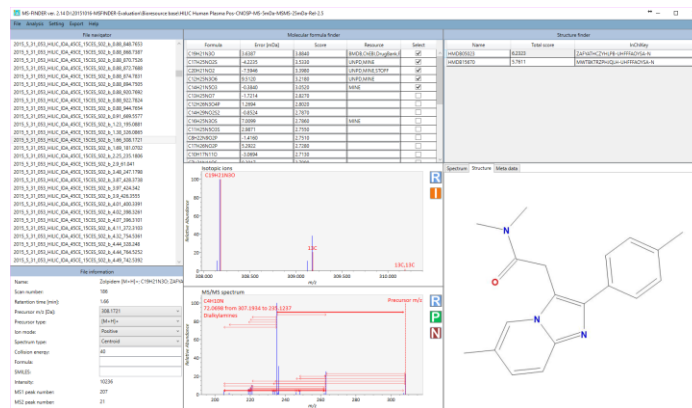
## MetaboAnalyst



質量分析装置から得られた信号を解析

代謝物名が不明の未知ピークの構造を推定

## 構造推定ソフトウェア MS-FINDER



リポジトリへの登録

MetaboBank

# メタボロミクスにおけるデータ解析



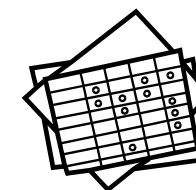
## 質量分析装置



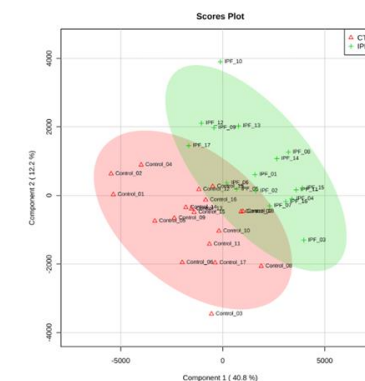
## 解析ソフトウェア MS-DIAL



## Excelデータ



## MetaboAnalyst



質量分析装置から得られた信号を解析

## MS Data Handling

mzR、Msnbase (BioConductor)  
rmzTab-M、MRMConverter、  
Chromatogtams、Spectraなど

## Peak Picking, Grouping and Alignment

### LC-MS Focussed or General

xcms、IPO、Autotuner、yamss、  
cosmiq (BioConductor)  
xMSanalyzer、apLCMS、warpgroup、  
AMDORAP、anviGCMS、enviPick、  
massFlowR、KPIC2など

## Statistical analysis

ChemoSpec、pcaMethods、  
multtest、biosigner、  
OmicsMarkeR、RankProd、  
ropis、OmicsLonDA、impute、  
MOFA(Bioconductor)  
MetaboAnalystRなど

# メタボロミクスにおけるデータ解析

## 質量分析データ処理

### 質量分析装置



質量分析装置から得られた信号を解析

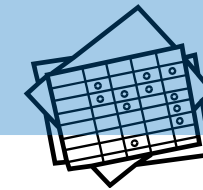


### 解析ソフトウェア MS-DIAL

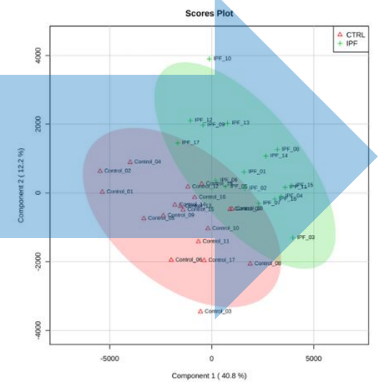


## 統計解析

### Excelデータ



### MetaboAnalyst



### MS Data Handling

mzR、Msnbase (BioConductor)  
rmzTab-M、MRMConverter、  
Chromatograms、Spectraなど

### Peak Picking, Grouping and Alignment

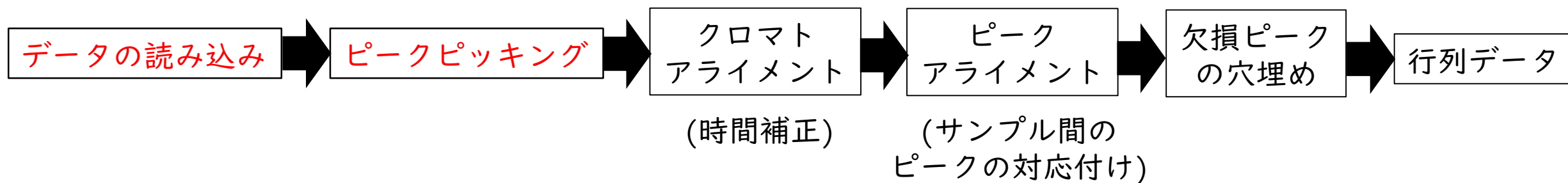
### LC-MS Focussed or General

**xcms**、IPO、Autotuner、yamss、  
cosmiq (BioConductor)  
xMSanalyzer、apLCMS、warpgroup、  
AMDORAP、anviGCMS、enviPick、  
massFlowR、KPIC2など

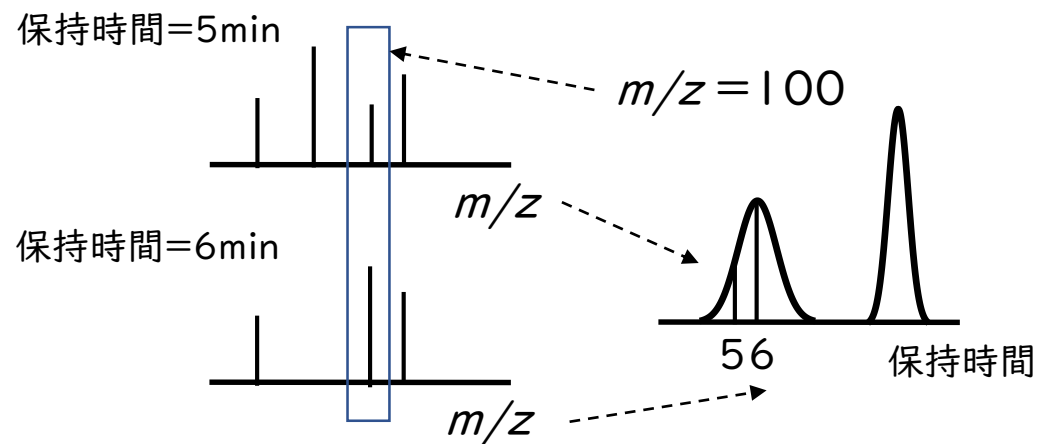
### Statistical analysis

ChemoSpec、pcaMethods、  
multtest、biosigner、  
OmicsMarker、RankProd、  
ropls、OmicsLonDA、impute、  
MOFA(Bioconductor)  
MetaboAnalystRなど

# 質量分析データ処理(1)



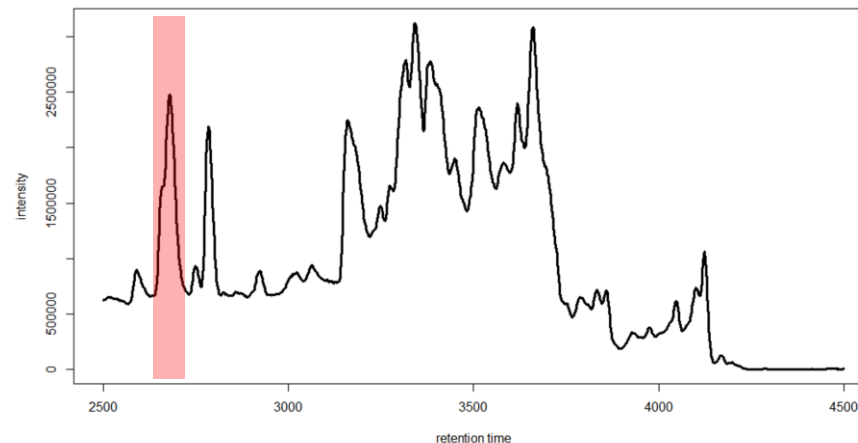
## データの読み込み



マススペクトル

クロマトグラム

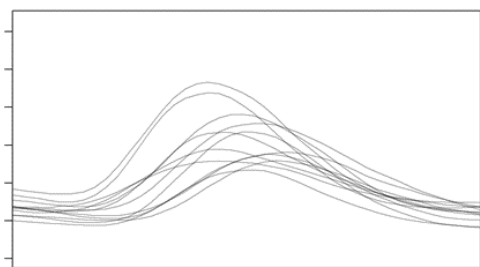
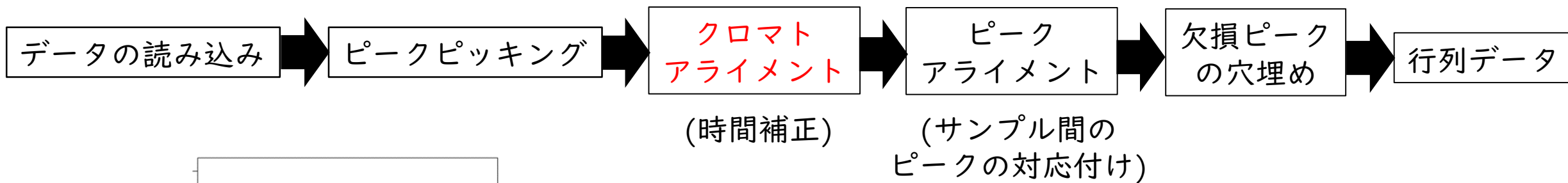
## ピークピッキング



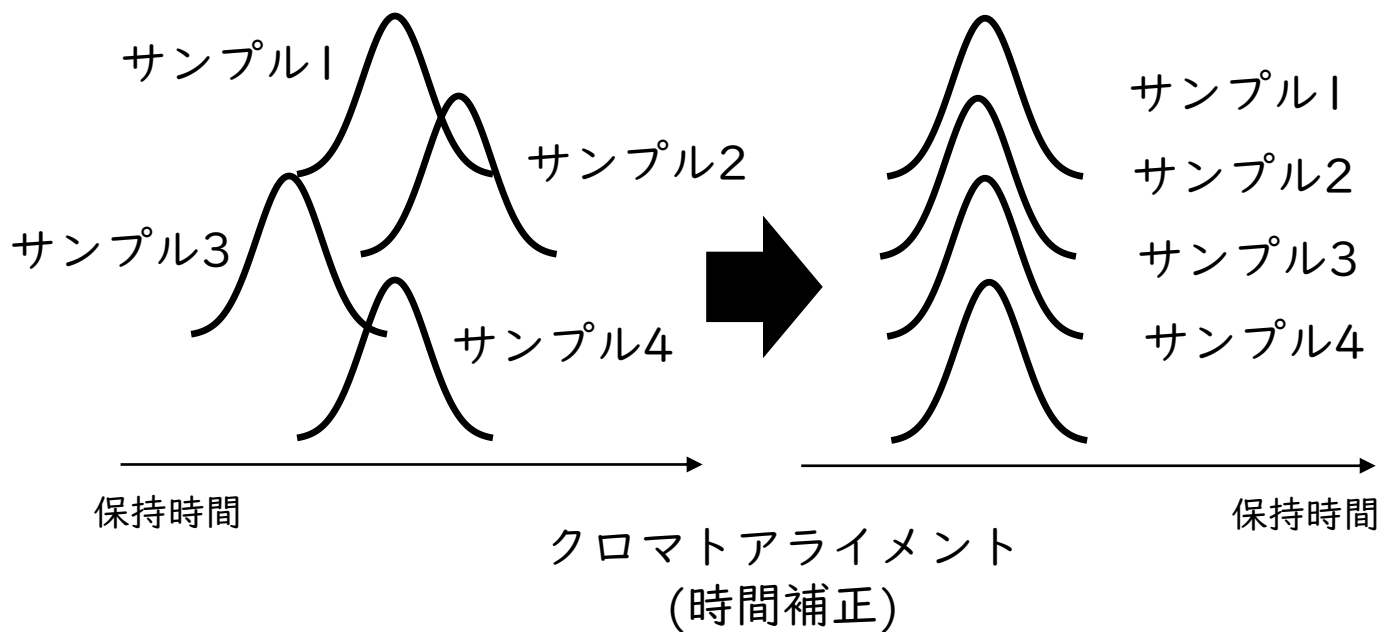
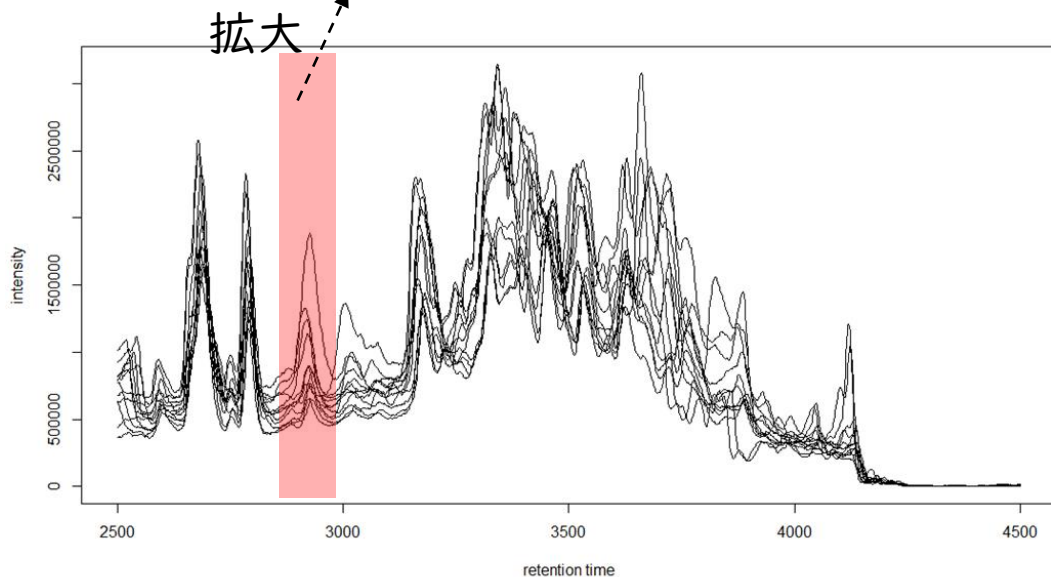
ガウス型関数に近い形状の領域を拾い上げる



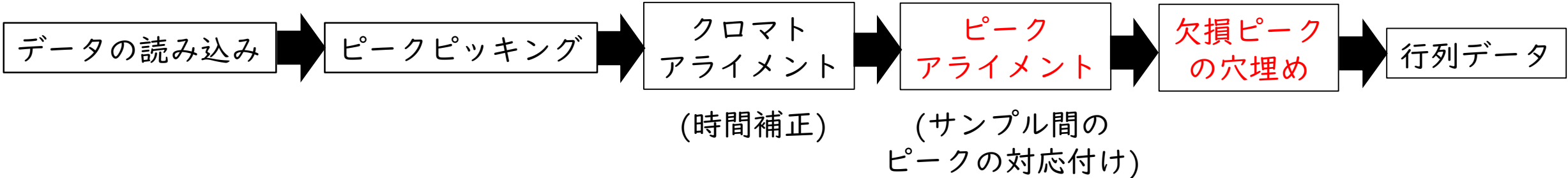
# 質量分析データ処理(2)



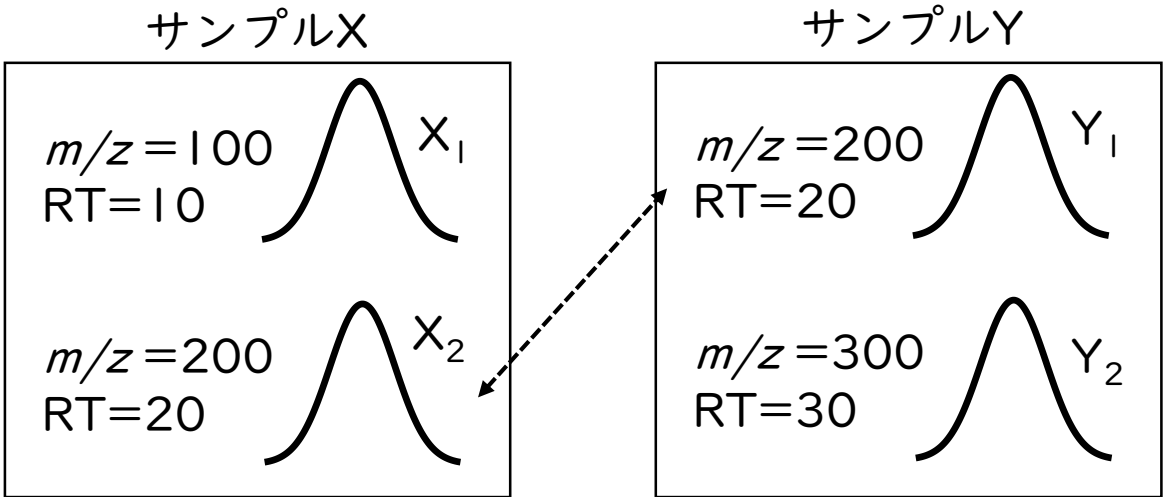
クロマトアライメント



# 質量分析データ処理(3)

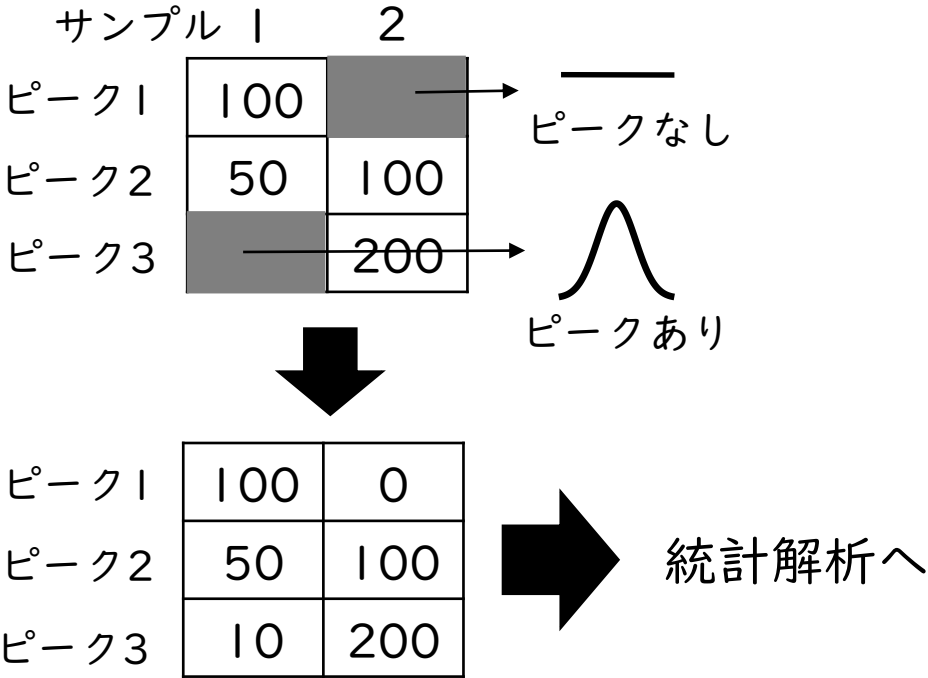


## ピークアライメント



$m/z$ とRTが同じなので、同一代謝物由来のピーク  
(実際は測定の誤差があるので、ある範囲に入るピーク)

## 欠損ピークの穴埋め





# メタボロミクスにおけるデータ解析

質量分析データ処理

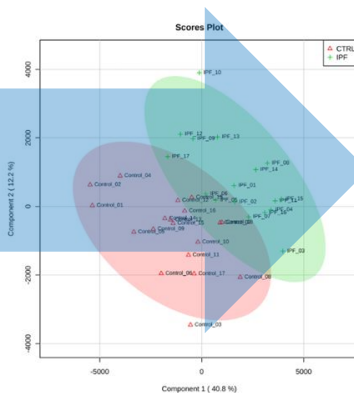
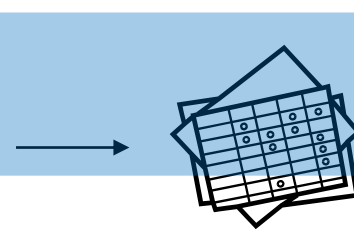
質量分析装置

解析ソフトウェア MS-DIAL

統計解析

Excelデータ

主成分分析



質量分析装置から得られた信号を解析

MS Data Handling

mzR、Msnbase (BioConductor)  
rmzTab-M、MRMConverter、  
Chromatogtams、Spectraなど

Peak Picking, Grouping and  
Alignment

LC-MS Focussed or General

xcms、IPO、Autotuner、yamss、  
cosmiq (BioConductor)  
xMSanalyzer、apLCMS、warpgroup、  
AMDORAP、anviGCMS、enviPick、  
massFlowR、KPIC2など

Statistical analysis

ChemoSpec、pcaMethods、  
multtest、biosigner、  
OmicsMarkeR、RankProd、  
ropls、OmicsLonDA、impute、  
MOFA(Bioconductor)  
MetaboAnalystRなど

loadings (2021.9リリース)

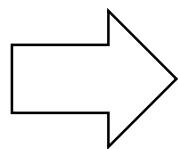


露崎さん、西田さん、久米さんにより毎月開催されている

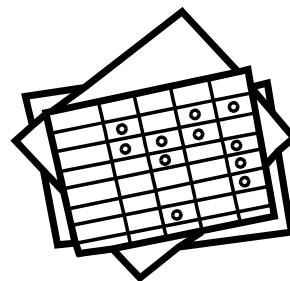
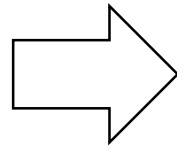
BioPackathon (<https://sites.google.com/view/biopackathon/>)で開発



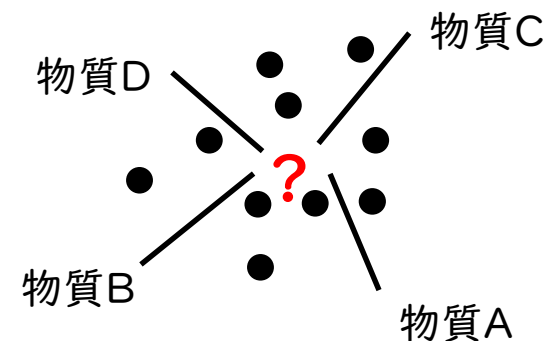
# 多変量解析によるメタボロームデータの解析の流れ



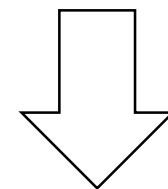
質量分析  
データ処理



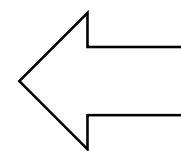
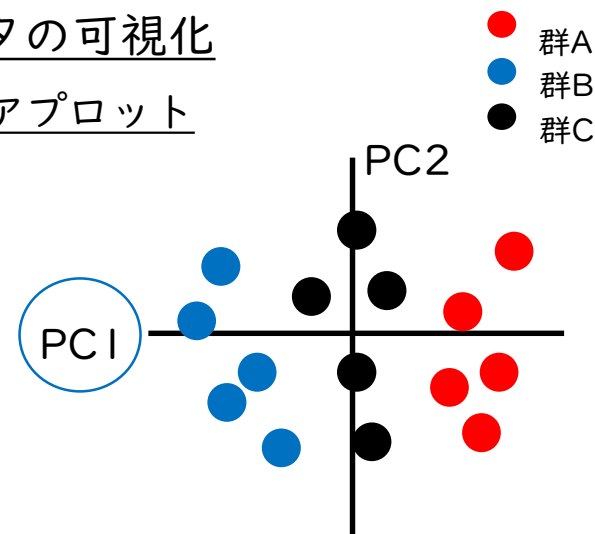
メタボロームデータ



主成分分析  
PLS(群情報あり)

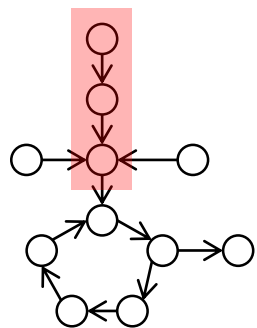
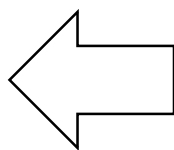
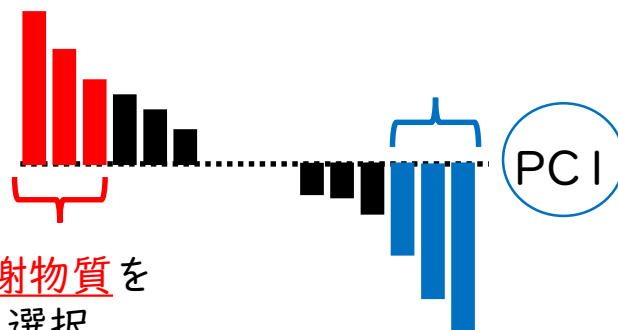


1. データの可視化  
スコアプロット



2. 代謝物質の選択

ローディングプロット

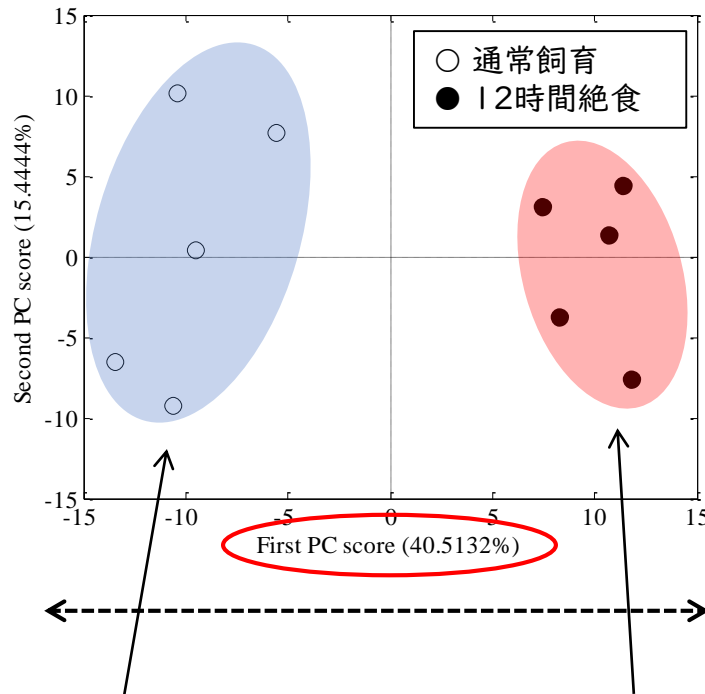


代謝経路を選択

(データベースとの照合)  
3. パスウェイとの関連

# 絶食マウスでの主成分分析の解析例

## データの可視化



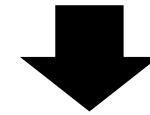
通常飼育  
マウスで低値(-)      絶食12時間  
マウスで高値(+)

重み(主成分)係数を用いて変数を選ぶ

$$\text{主成分スコア} = (\text{変数1}) \times \underline{w_1} + (\text{変数2}) \times \underline{w_2} + \dots + (\text{変数P}) \times \underline{w_p}$$

$$\begin{array}{|c|} \hline t \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline x_1 \\ \hline \end{array} w_1 + \begin{array}{|c|} \hline x_2 \\ \hline \end{array} w_2 + \dots + \begin{array}{|c|} \hline x_p \\ \hline \end{array} w_p$$

主成分スコアは、各変数のデータを重みwを係数として足し合わせたものであり、wの値が大きい変数が主成分スコアと関連が強く、wの値が小さい変数が主成分スコアと関連が弱い



主成分係数wの値が大きい上位10個  
もしくは30個程度の代謝物を選ぶ

# 一般的なローディング(主成分負荷量)の定義

杉山高一、多変量データ解析入門、朝倉書店(2001) 35ページ

『主成分と変数の相関係数を、主成分の因子負荷量(factor loading)という』

塩谷實、多変量解析概論、朝倉書店(2001) 114ページ

『共分散行列を用いた主成分分析の場合、第 $i$ 主成分 $U_i$ と $j$ 番目の成分変数 $X_j$ の間の相関係数を $X_j$ の $U_i$ への因子負荷量という』  
(その後に、相関係数行列についても同じであることが書かれている)

中村永友、Rで学ぶデータサイエンス 多次元データ解析法、

共立出版(2009) 102ページ

『得られた主成分と本来の変数の相関係数を主成分負荷量あるいは因子負荷量という』

主成分分析の主成分負荷量といえは、「主成分スコアと各変数との相関係数」として定義され、主成分負荷量を用いて重要な代謝物が選ばれる。

# 主成分係数(重み、固有ベクトル)と主成分負荷量の比較

## 正に値が大きな上位10個

ピーク	主成分係数	主成分負荷量
384.2/3993	0.1279	0.7489
491.2/3398	0.1260	0.7375
449.1/3290	0.1197	0.7007
322.1/3392	0.1195	0.6997
439.3/4056	0.1134	0.6638
438.3/4056	0.1127	0.6597
301.2/3389	0.1085	0.6352
354.2/3618	0.1076	0.6299
300.2/3392	0.1075	0.6293
410.3/3937	0.1064	0.6228

## 負に値が大きな上位10個

ピーク	主成分係数	主成分負荷量
306.1/2928	-0.1132	-0.6628
414.2/3060	-0.0943	-0.5523
246.1/2517	-0.0939	-0.5498
591.3/3003	-0.0926	-0.5419
288.1/2798	-0.0923	-0.5402
590.3/3003	-0.0916	-0.5365
546.3/3015	-0.0888	-0.5200
532.3/3729	-0.0884	-0.5177
547.2/3015	-0.0881	-0.5156
576.3/2860	-0.0844	-0.4944

主成分負荷量(=主成分スコアと各代謝物の相関係数)の値が0.7以上が3物質であり、  
-0.7以下の代謝物は確認できなかった。

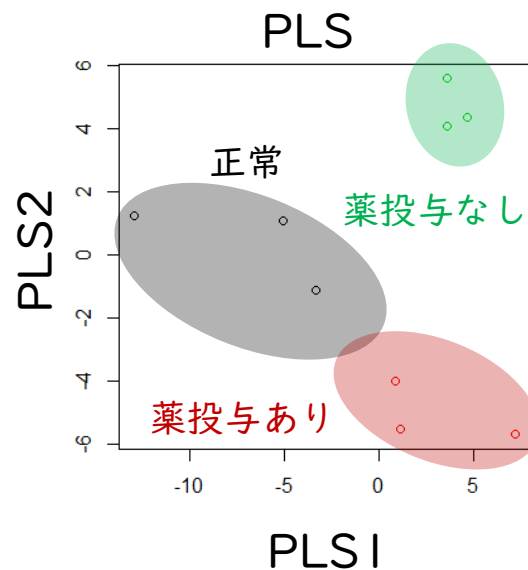
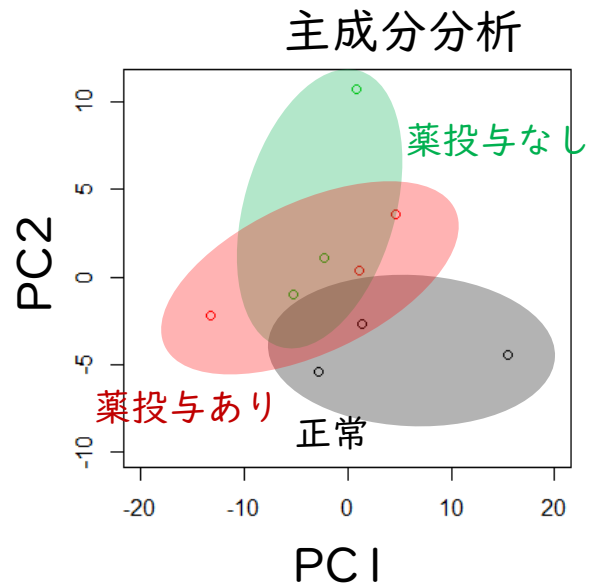


主成分係数と主成分負荷量は比例関係にあり、値が大きな代謝物の並び順は変わらないが、主成分負荷量を用いて重要な代謝物を選ぶことで、統計的な基準(相関係数の値)で重要な代謝物を選ぶことが出来る。

# 主成分分析とPLSの解析例

高脂血症ウサギの肝臓のメタボローム解析

3群比較 : Wild type、**高脂血症ウサギ**、**薬剤投与後の高脂血症ウサギ**



重み(PLS)係数を用いて変数を選ぶ

$$\text{PLSスコア} = (\text{代謝物1}) \times \underline{w_1} + (\text{代謝物2}) \times \underline{w_2} + \dots + (\text{代謝物P}) \times \underline{w_p}$$

$$t = x_1 w_1 + x_2 w_2 + \dots + x_p w_p$$

- PLS係数による変数の選び方

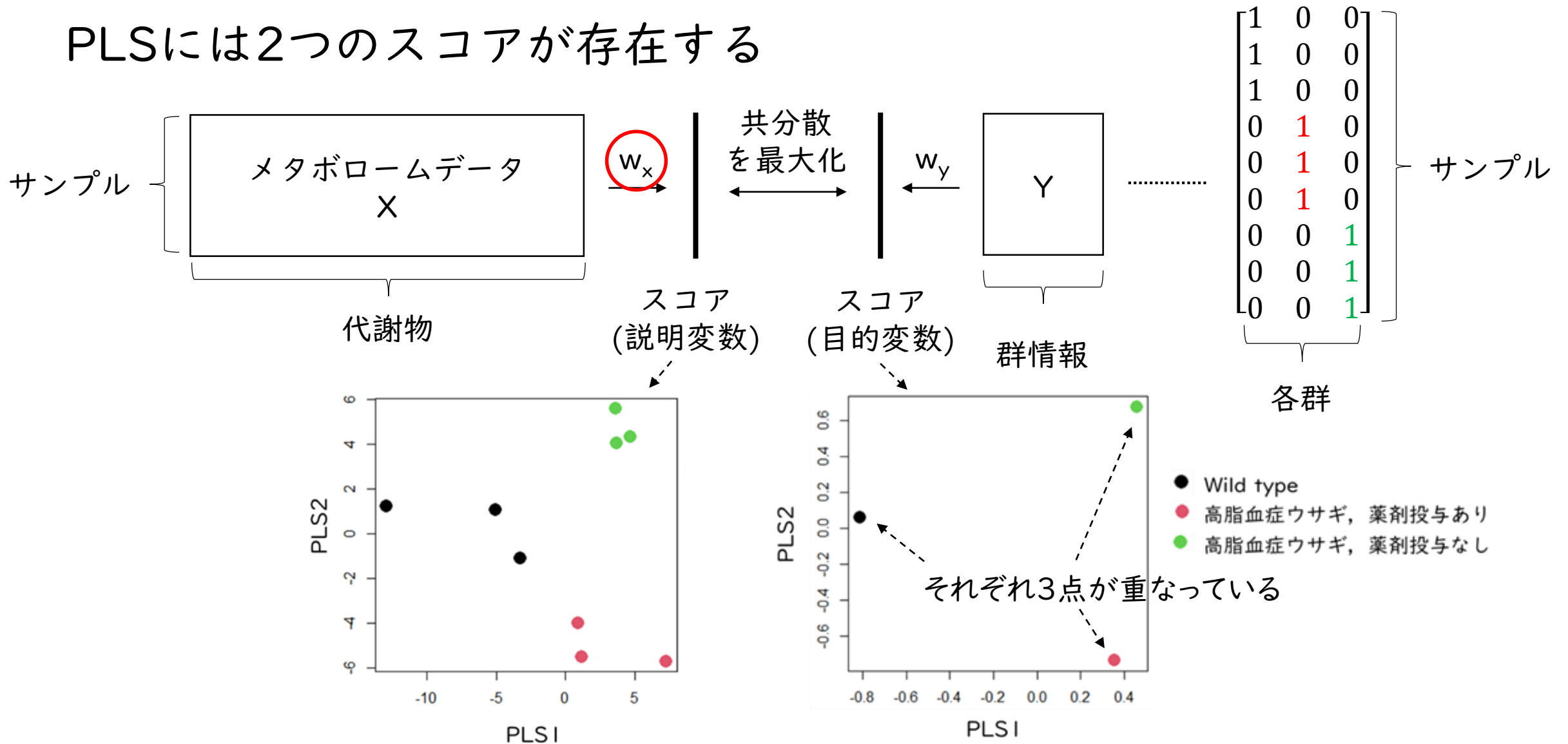
- PLS係数 $w$ は、各代謝物に対する重要度を示す重みであり、PLS係数 $w$ が大きいものが重要な代謝物となる
- PLS負荷量を定義し、統計的な基準で重要な代謝物を選ぶ

主成分分析の結果、主成分スコアで群間の差が表れなかったとき、PLSが用いられることが多い

Yamamoto H., "PLS-ROG: Partial least squares with rank order of groups.", Journal of Chemometrics, 31(3) (2017) e2883.

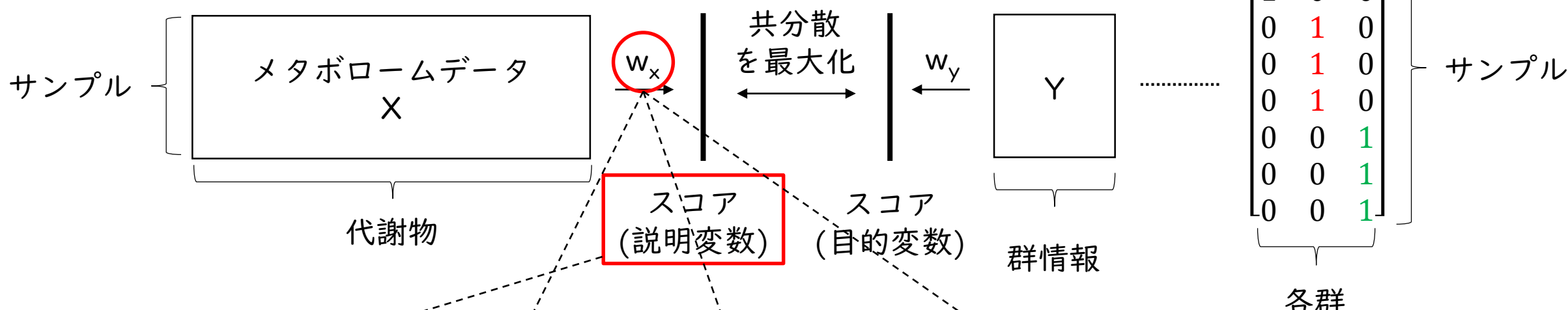


# PLSには2つのスコアが存在する



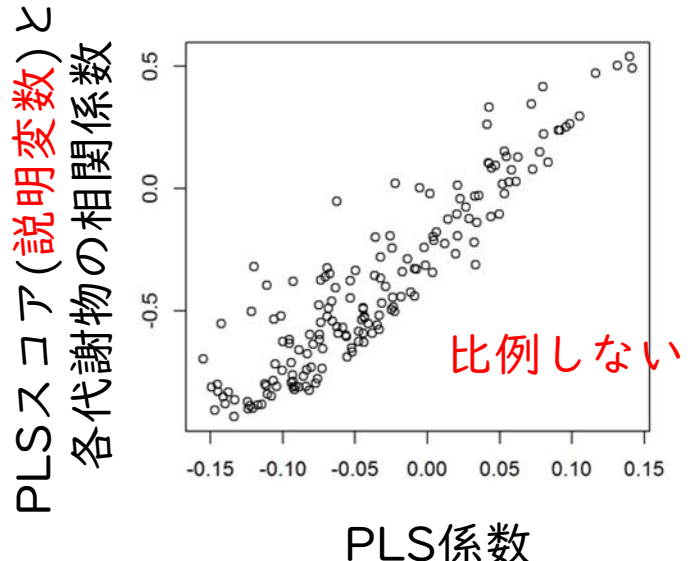
説明変数のスコア、目的変数のスコアいずれも同様の位置(左、**右上**、**右下**)に配置されており、傾向が一致していることが確認できる。

# PLS係数とPLS負荷量(1)



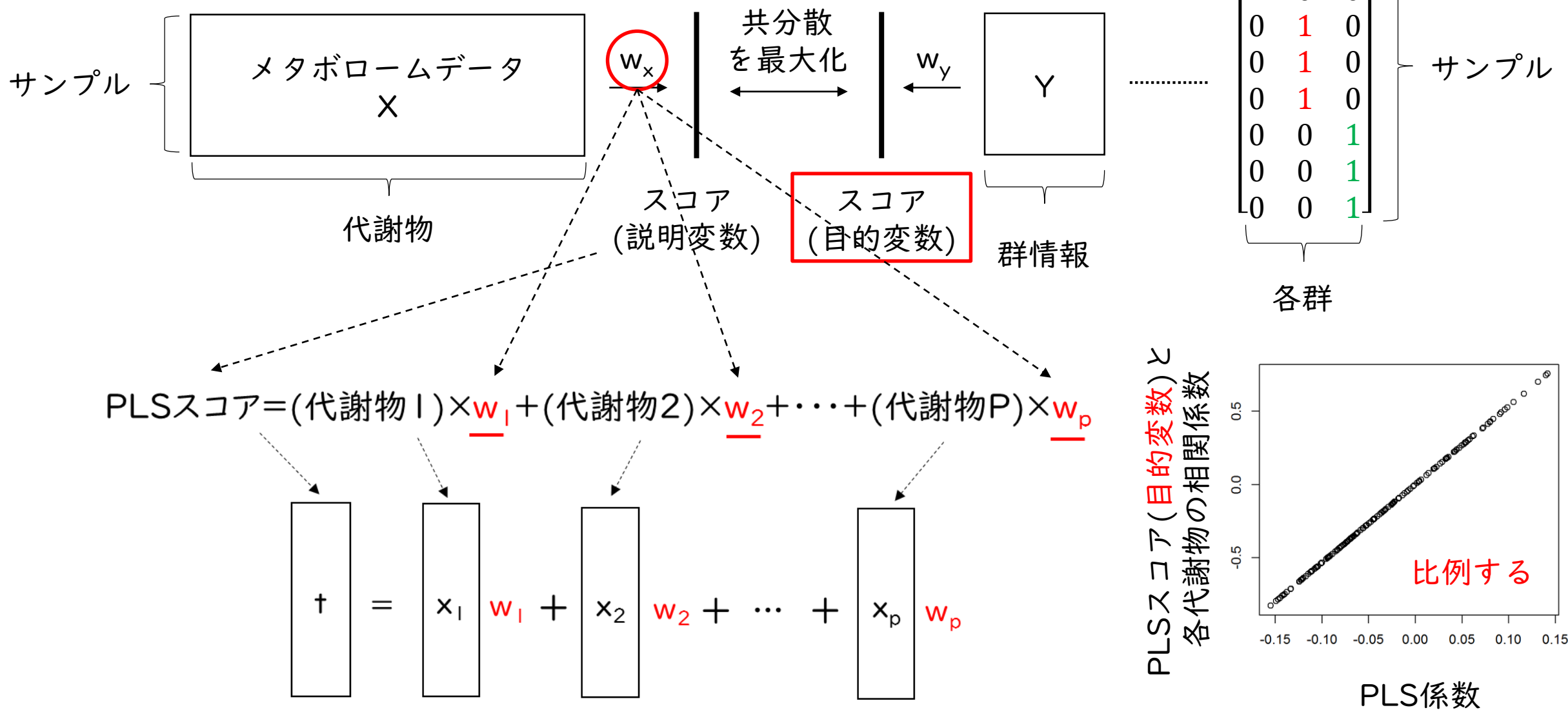
PLSスコア = (代謝物1) ×  $\underline{w_1}$  + (代謝物2) ×  $\underline{w_2}$  + ... + (代謝物P) ×  $\underline{w_p}$

$t = x_1 w_1 + x_2 w_2 + \dots + x_p w_p$



PLS負荷量は、PLSスコア(説明変数)と各代謝物の相関係数として定義することが出来ない。

## PLS係数とPLS負荷量(2)

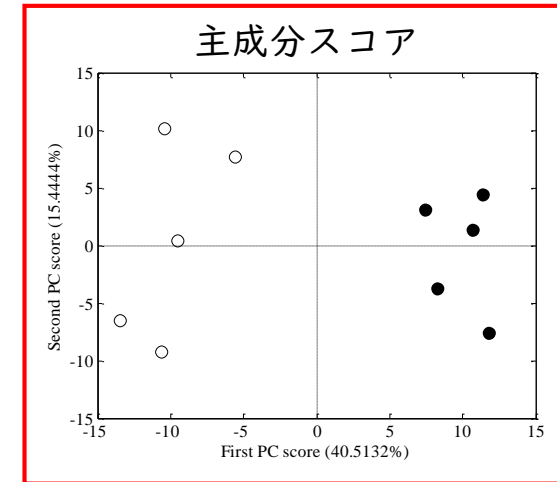


PLS負荷量は、PLSスコア(目的変数)と各代謝物の相関係数として定義することが出来る。

# 主成分係数、主成分負荷量、PLS係数、PLS負荷量

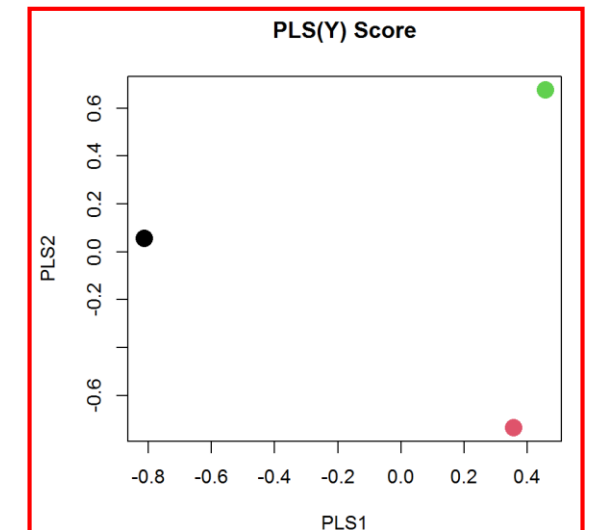
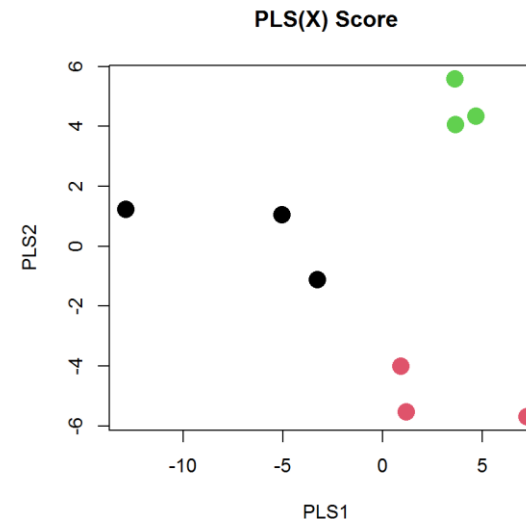
## • 主成分分析の場合

- **主成分係数**は「主成分スコアと各代謝物レベルの相関係数」に比例する  
→ **主成分負荷量**は「主成分スコアと各代謝物レベルの相関係数」と定義する



## • PLSの場合

- **PLS係数**は「PLSスコア(説明変数)と各代謝物レベルの相関係数」に比例しない
- **PLS係数**は「PLSスコア(目的変数)と各代謝物レベルの相関係数」に比例する  
→ **PLS負荷量**は「PLSスコア(**目的変数**)と各代謝物レベルの相関係数」と定義する



# loadingsパッケージを用いた主成分分析、PLS

- パッケージのインストール
  - `install.packages( "loadings" )`
- ライブラリの読み込み
  - `library(loadings)`

## • 主成分分析

- `pca <- prcomp(X)`
- `pca <- pca_loadings(pca)`
- `pca$loading$R`
- `pca$loading$p.value`

(prcomp関数はstatsのものを利用)

## • PLS

- `pls <- pls_svd(X,Y)`
- `pls <- pls_loadings(pls)`
- `pls$loading$R`
- `pls$loading$p.value`

(pls\_svd関数の部分は、chemometrics  
パッケージのpls\_eigen関数も利用可能)

# 本ワークショップの進め方

- 全体の説明 (発表資料) (15分)
  - <https://github.com/hiroyukiyamamoto/metabolomeanalysisworkshop/blob/master/vignettes/発表資料.pdf>
- xcmsによる質量分析データ処理(10分)
  - <https://hiroyukiyamamoto.github.io/metabolomeanalysisworkshop/articles/xcms.html>
- loadingsパッケージによる主成分分析と主成分負荷量を用いた代謝物の選び方 (15分)
  - <https://hiroyukiyamamoto.github.io/metabolomeanalysisworkshop/articles/pca.html>
- loadingsパッケージによるPartial least squares(PLS)とPLS負荷量を用いた代謝物の選び方(20分)
  - <https://hiroyukiyamamoto.github.io/metabolomeanalysisworkshop/articles/pls.html>

それぞれの資料を口頭で説明する形で進めて行きます



# 本ワークショップの楽しみ方(1)

- Githubのwebサイトからコピーして、ローカルで実行

## ライブラリとデータの読み込み

はじめに、loadingsパッケージのデモデータfastingを読み込む。実際の解析の場合は、csvファイルをread.csv関数などでデータを読み込んで利用する。

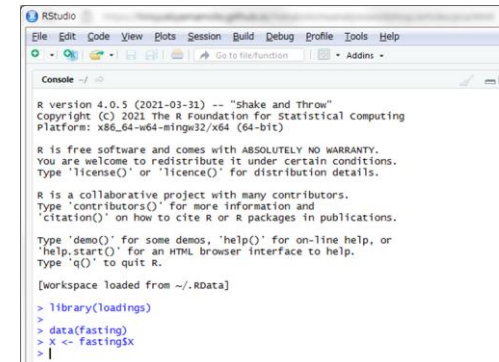
```
library(loadings)

data(fasting)
X <- fasting$X
```

fastingの変数Xに、各行にサンプル、各列に代謝物のメタボロームデータが含まれている。

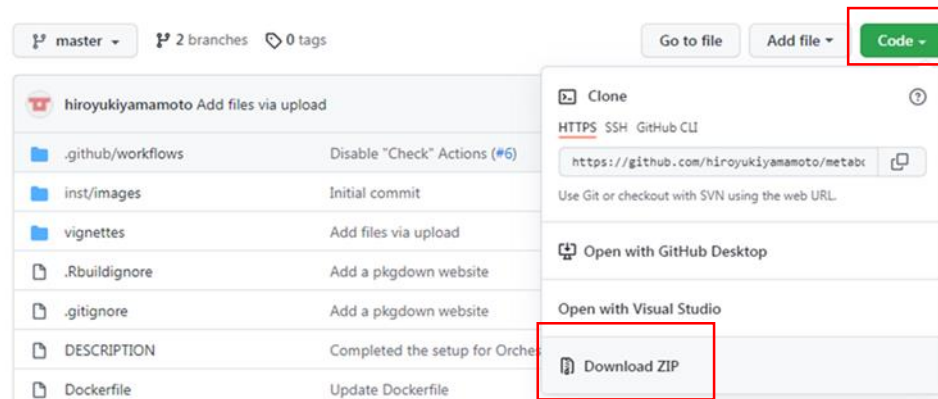
Copy to clipboard

カーソルを合わせると、Copy to clipboardが表示



- ワークショップのファイルを全てコピーして、ローカルで実行

<https://github.com/hiroyukiyamamoto/metabolomeanalysisworkshop>



Githubのツール(Github Desktopなど)でクローンして使っても良い

# 本ワークショップのその他の楽しみ方(2)

- Orchestraで実行

- <http://app.orchestra.cancerdatasci.org/> からログイン

Choose a workshop

Show  entries

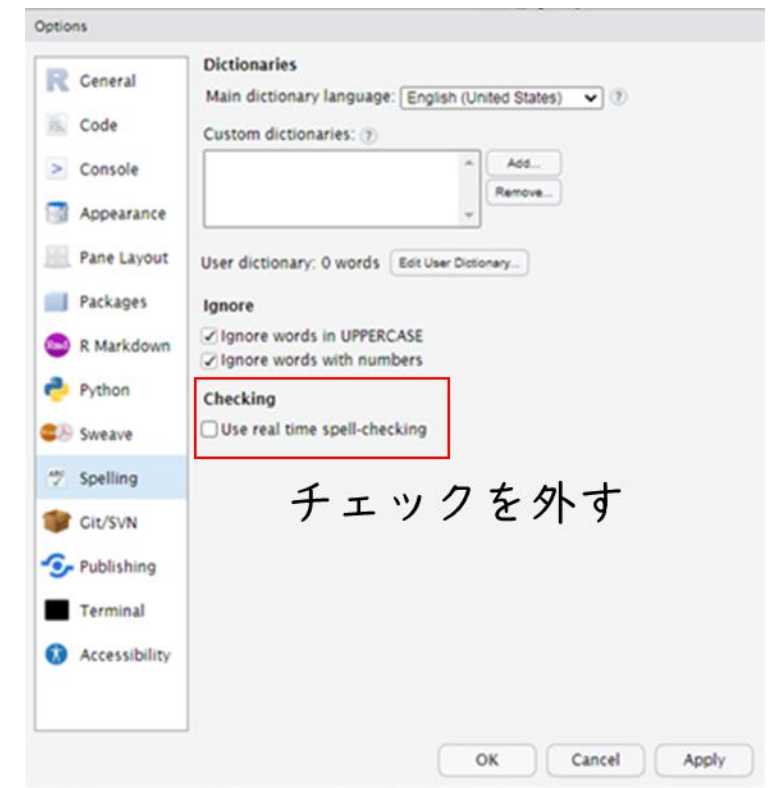
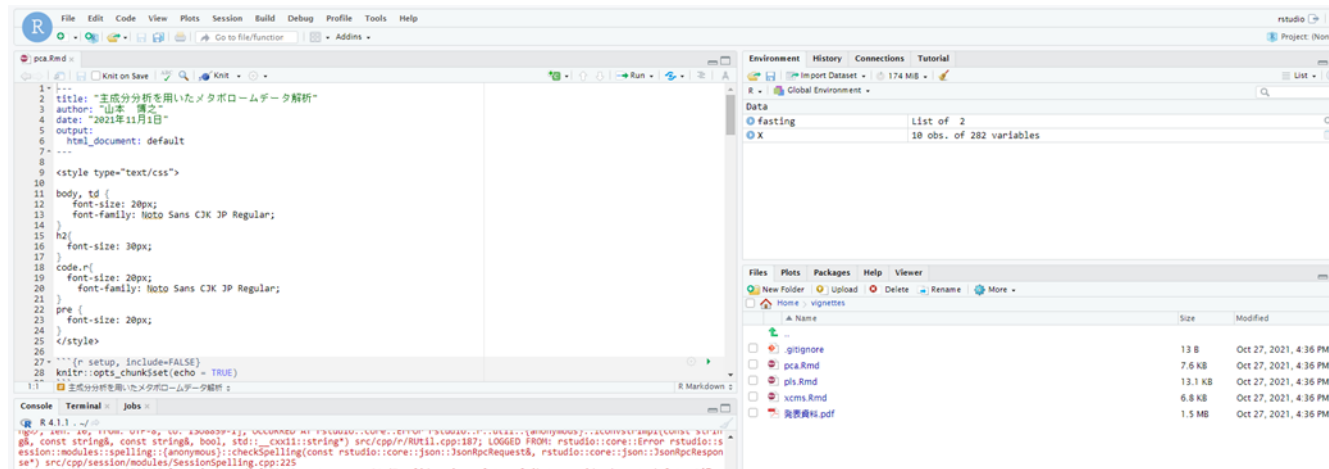
Search:

Title	Created	Launches	Actions
<a href="#">Rを用いたメタボロームデータ解析: Metabolome data analysis using R</a>	2021-10-16	7	<div>Launch</div>

Showing 1 to 1 of 1 entries (filtered from 74 total entries)

Previous  Next

Rstudio Serverがブラウザで利用可能



Github、DockerHubの設定、Orchestraの準備など全て西田さんにやっていただきました。