

別紙 研究内容

研究課題名

ヒト、ペット動物を対象としたオミクスデータ解析に関する知見の共有

代表者

千葉大学予防医学センター 江口 哲史

共同研究者

愛媛大学沿岸環境科学研究センター 野見山 桂

研究目的

近年化学物質の毒性解析手法として利用されているメタボローム分析は、未だ決定版となるプロトコルがなく、様々な分析手法が提案されている。分析・解析手法を確立には分析・解析技術の共有が不可欠であり、知見を蓄積・共有し、分析・解析技術を向上する必要がある。

本年度はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いた複数ポイントで採取されたネコ血清中メタボロームデータの解析を試み、時間ごとに共通して得られるメタボロームの特定を試みた。

研究概要

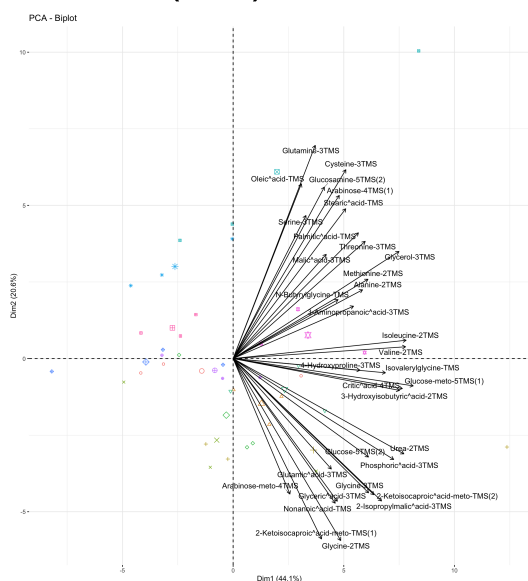
本年度は愛媛大学から提供を受けた、複数の時間で採取されたネコ血清のメタボローム組成のデータについて解析を試みた。対象はPBDEの投与・非投与の2群、各3検体であり、それぞれ0時間から54日目までの15ポイントで血清試料を採取した。データの解析には直行部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) および Multivariate INTeegrative method 部分最小二乗法-判別分析 (MINT PLS-DA) を用いた。また、愛媛大学と共同研究を進めていたイヌ脳中のメタボローム解析に関する研究が、国際誌に投稿・受理された。

研究内容

複数の時間で採取された PBDEs 曝露ネコ血清のメタボローム組成の変動

はじめに主成分分析により、曝露後のネコ血清中メタボロームの変化について解析を試みた。解析は曝露後 1 日内的変化 (Figure 1A) と、6 週ごとの変化 (Figure 1B) に分けて解析を試みた。興味深いことに、短期、長期いずれにおいても曝露群・非曝露群は基本的に plot 内の近い位置に示されており、時間の変化が主に分散の主要因である可能性が示唆された。

A. 短期影響 (0-20h)



B. 長期影響 (0h - 54weeks)

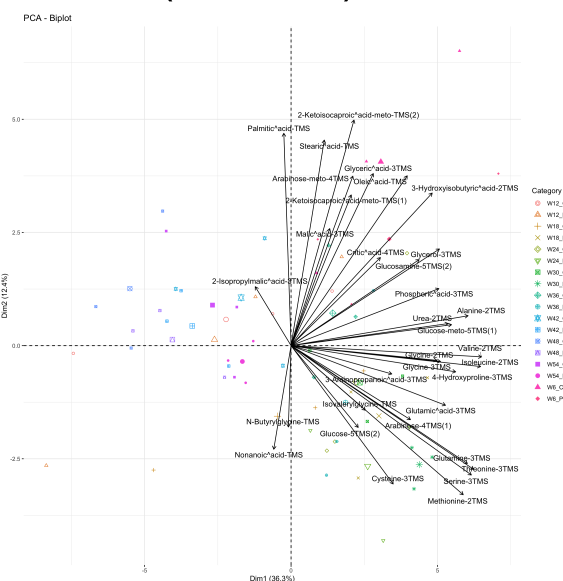


Figure 1: 主成分分析を用いた曝露・非曝露群ネコ血清中におけるPBDEs投与後の時間経過に基づくメタボローム組成変化の検討 (A: 1日内的変化, B: 週単位での変化)

このため、続いて個別時間ごとの OPLS-DA および、MINT PLS-DA による解析を試み、PBDEs 曝露の影響について検討した。個別時間ごとに OPLS-DA を実施した結果、いずれの時間においても曝露・非曝露群は分離されるものの、モデルの信頼性を示す permutation p-value はほぼすべてのモデルで $p > 0.05$ であり、下回ったモデルについても多重比較の調整を行うと有意なモデルとは言えない結果だった。これには対象検体数が少ないこと、個体差の影響を排除しきれないことが原因と考えられる。

続いて全データを利用し、分類前に操作やロットの違いなどに基づくシステム的な影響を考慮したモデルが作成できる、MINT PLS-DA を用いた解析を試みた。

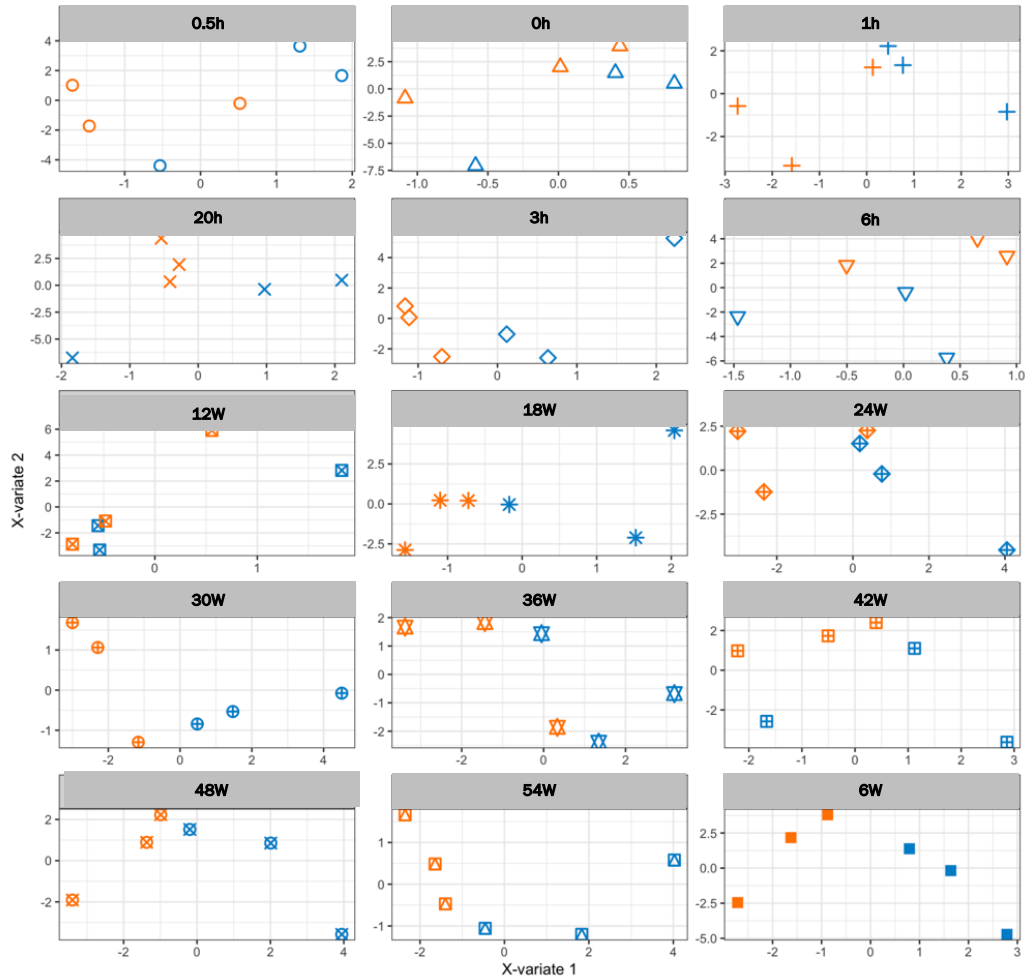


Figure 2: MINT PLS-DAを用いた曝露・非曝露群ネコ血清中におけるPBDEs投与後の時間経過に基づくメタボローム組成変化の検討

解析の結果、0.5時間、6時間、12週、24週を除き、曝露群・非曝露群を分類できる傾向が認められた (Figure 2)。一日単位の検体において、2群を分類する際に有効な一貫したメタボロームは認められなかったが、週単位の長期曝露時においてはグルコース、グルタミンは一貫した傾向を示していた。今後はこれらに加え、一貫性について1,2つの採取時間について緩和した上で、分類に寄与するメタボロームについても探索を試み、生体内機能を解釈することでPBDEs曝露が及ぼす影響について解明を試みる予定である。

引用文献

Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 20(8-10), 341-351.

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13(11), e1005752.

Rohart, F., Esлами, A., Matigian, N., Bougeard, S., & Le Cao, K. A. (2017). MINT: a multivariate integrative method to identify reproducible molecular signatures across independent experiments and platforms. *BMC bioinformatics*, 18(1), 128.

Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., & Junot, C. (2015). Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *Journal of proteome research*, 14(8), 3322-3335.

Thévenot, E. A. (2016). roppls: PCA, PLS (-DA) and OPLS (-DA) for multivariate analysis and feature selection of omics data. <http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/roppls.html>

成果発表

Nomiyama, K., Eguchi, A., Takaguchi, K., Yoo, J., Mizukawa, H., Oshihoi, T., ... & Iwata, H. (2019). Targeted metabolome analysis of the dog brain exposed to PCBs suggests inhibition of oxidative phosphorylation by hydroxylated PCBs. *Toxicology and applied pharmacology*, 377, 114620.