

研究内容

脳神経伝達物質・甲状腺ホルモン濃度に関連するメタボローム抽出手法の検討

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

応募者および研究分担者は、これまで化学物質やその代謝物に由来する毒性影響発現メカニズムに注目し、ヒトや動物の生体試料を用いて化学物質の曝露により変動するメタボローム・リピドームや DNA メチル化などのオミクスデータの解析してきた。しかしこれら化学物質・各種オミクスデータはいずれも多変量のデータであるため、多変量同士の相互関係や、動物実験などにおける複数時点で採取したデータの解析には依然課題が残っている。さらに、オミクスデータの解釈や、複数のオミクスデータを組み合わせて解釈するためには未だ多くの課題が残っているのが現状である。背後の環境・生活因子の影響で変動しやすいバイオマーカーとしてメタボロームの信頼性を高めるには、他のオミクスデータや年齢、体重などを含むメタデータの利用や、*in vitro/in vivo* 試験で得られた他の計測結果との連携を進める必要がある。

本申請では申請者がこれまでの研究で進めてきた、上記知見に関わる知見を共有し、実試料におけるオミクスデータの活用を高度化することを目的とする。特に本年度は、ノンターゲットメタボロミクスの計測データからのピーク検出・化合物アノテーション・ピークアライメントに関わるプロトコルの共有を行った

研究概要

今年度までに高速液体クロマトグラフ-タンデム飛行時間型質量分析計 (LC-QToFMS) によるノンターゲットメタボロミクス分析法の前処理および測定条件について共有を進めたので、本年度は LC-QToFMS によるノンターゲット分析により得られたデータから、ピークピッキング・アノテーション・アラインメントおよびデータクリーニングを行うためのプロトコルの共有を進めた。また、本研究において共有した手法に基づく解析結果について学会発表を行ったほか、愛媛大学との共同研究において、有機ハロゲン化合物の曝露に伴い変動する甲状腺ホルモン濃度及びメタボロームの抽出に関わり、これらの成果が国際誌に投稿・受理された。

研究内容

ノンターゲットメタボロミクスデータ解析法の共有

本年度は LC-QToFMS により取得されたノンターゲットメタボロミクスデータの解析手法について共有を進めた。試料の計測方法はこれまで共有を進めた通り、内部標準物質添加後に抽出を行い、その後抽出液を限外ろ過フィルタにより試料を精製した。LC-QToFMS による計測には HILIC カラムを用い、それぞれ positive, negative モードでデータを取得した。

生データの解析には MS-DIAL ver 4.9.0 を用い、データの抽出条件や内部標準物質・QC 試料によるピーク強度の補正、ピークアラインメントのためのパラメータ設定について共有した。また、MS-DIAL metabolomics MSP spectral kit, MassBank of North America, Human Metabolome Database, Global Natural Product Social Molecular Networking の各サイトにおいて公開されているマススペクトルライブラリを組み合わせ、インハウスライブラリを構築し各ピークのアノテーションのために使用する手法について共有した。さらに、データクリーニングにおいて、QC 試料の繰り返し測定における変動係数が大きいピークのフィルタリングやブランクの減算、同一名、同一

InchiKey でアノテーションされた化合物のフィルタリングを R で行う方法についても共有した。

これらの手法は一度共有したものの、新規手法やソフトウェアの更新により処理が簡略化、あるいは高度化することも想定されるため、この一度で終わらず継続的に手法の共有を続けていく必要があると考える。また、本年度は機器分析により得られたデータの抽出・クリーニングが中心であり、メタボロームと生体内パスウェイの関係解析など、生物学的な意味合いを解析する部分までは踏み込まなかったため、今後はこれらについても共有を進める必要がある。

メタボロミクスデータの解析

愛媛大学において計測が実施された試料データの解析を行った。ネコを対象とした研究においては、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の曝露と関連するメタボロームの探索を行った。解析には直行部分最小二乗法判別分析 (Orthogonal PLS discriminant analysis :OPLS-DA) により曝露群において変動するメタボロームを絞り込み、候補として選定されたメタボロームは MBROLE 2.0 データベースを用いてパスウェイエンリッチメント解析を行った。その結果、酸化ストレス・異物代謝・エネルギー代謝に関連するパスウェイの変動が認められた。これらの結果は国際誌に投稿・受理された (Nomiyama et al., 2022, Science of The Total Environment. 2022;842:156490)

環境化学物質・メタボロームのスクリーニング分析に基づく曝露影響解析

環境中に存在する化学物質が、ヒト・動物の健康に悪影響を及ぼしていることが懸念されている。既存研究の多くにおいては、残留性有機汚染物質など、特定の化合物群をターゲットとした計測を行い、曝露影響の調査が進められてきた。一方、毒物・環境汚染物質のデータベースである T3DB には 3600 種以上、EPA DSStox データベースには 90 万種以上の化学物質が登録されている。このような多様な化学物質

をすべてモニタリングすることは困難であるが、近年質量分析計を用いた、ノンターゲット・ワイドターゲットな分析法が環境モニタリングにおいて注目されている。

本研究ではこれらの化学物質を生体試料中の生理活性物質と同時にデータを取得し、それらの組成を比較することで、曝露モニタリングと曝露影響解析を同時に行うことを検討した。

血清試料は上述の HILIC カラムに加え、C18 カラムにおいても計測を試みた。環境化学物質は高分解能 MS スペクトルの一致 (MSI level3)、メタボロームは高分解能 MS/MS スペクトルの一致に基づきアノテーションを行った (MSI level2)。データの解析にはスパーズ正準相関分析を用い、いずれも多変量である環境化学物質・メタボロームデータから共通する成分を抽出することができた。目的変数・説明変数がいずれも多変量であるデータの解析は、実環境であるヒト・野生動物試料の解析手法として重要な手法となることが期待される。今後はアノテーションされた環境化学物質の同定や、ライブラリ・標準物質を充実させることで、より幅広い対象の環境化学物質・メタボロームをスクリーニング対象に加えたい。

関連業績

Nomiyama, K., Yamamoto, Y., Eguchi, A., Nishikawa, H., Mizukawa, H., Yokoyama, N., Ichii, O., Takiguchi, M., Nakayama, SMM., Ikenaka, Y. & Ishizuka, M. (2022). Health impact assessment of pet cats caused by organohalogen contaminants by serum metabolomics and thyroid hormone analysis. *Science of The Total Environment*, 842, 156490.

高分解能質量分析計を用いた曝露・曝露影響解析の試み

江口 哲史

日本毒性学会学術年会 49.1 S29-4 2022 年

ノンターゲット分析によるヒト血清中環境化学物質の探索と曝露影響
解析の試み

江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邊 応宏, 戸高 恵美子, 森 千里