


共同研究報告


Error-Corrected Next-Generation Sequencing (ecNGS)

2024.12.6.

花王株式会社 安全性科学研究所 松村奨士

共同研究の目標、方向性

- **目的** 新規遺伝毒性試験法としてecNGSの実用可能性を検証する
(*in vitro, in vivo*変異原性試験)
 - **現状** HESI GTTCではDuplex SequencingによるTC法の検討が進められている
(TC:ターゲットキャプチャ、ゲノムの一部を選択する手法)
- 
- **方針** 他の有用なアプローチ(e.g. Hawk-Seq™ + WGS)を検証し、選択の幅を広げる



※ ・Hawk-Seq™: 花王が開発したecNGS
・WGS: 全ゲノムシーケンス

MMS研究会にて共同研究(2022年9月～)第一弾として、花王の方法に基づく検討の推進

参加機関の情報、実施内容

●共同研究参加機関(4機関)

国立衛研、エーザイ(株)、帝人ファーマ(株)、花王(株)

●実施内容

- ・エーザイ、帝人ファーマ、花王含む3社で実験を行う
- ・3社間で、感度、施設間再現性の検証
→検討内容は2024年内に論文化を目指す

共同研究の進め方の大枠

Step1: 事前検討

- ・複数のシーケンサーにて、Hawk-Seq解析下のエラー頻度を比較
- ・共同研究で使用するシーケンサーの選定



- ・シーケンサー間でエラー率に差あり。共同研究Step2ではNovaSeqに統一
- ・論文化を完了 (Hosoi et al., Genes Environ. 2024, <https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-024-00313-9>)

Step2: 技術移管および施設間再現性の確認

- ・ライブラリ調製手法の移管、各社にて最適条件の決定
- ・変異原曝露サンプル(全32検体)の解析・解析施設間差の確認



- ・全機関で変異原による変異頻度の上昇を明確に確認。高い施設間再現性も確認。
 - ・原稿案を作成済み
- 今後、関係機関の確認後、2025年2月までにG&Eへ投稿目標

Step2の結果の論文化を以て終了予定

G&Eへの投稿費用について

●Step2の論文化に向けて

- エーザイ(株)、帝人ファーマ(株)、花王(株)にて取得したデータをまとめた内容(詳細は補助資料)
- G&Eへの投稿費用 836ユーロ \approx 135,432円(1ユーロ = 162円で計算)
(JEMS会員割引適用後)

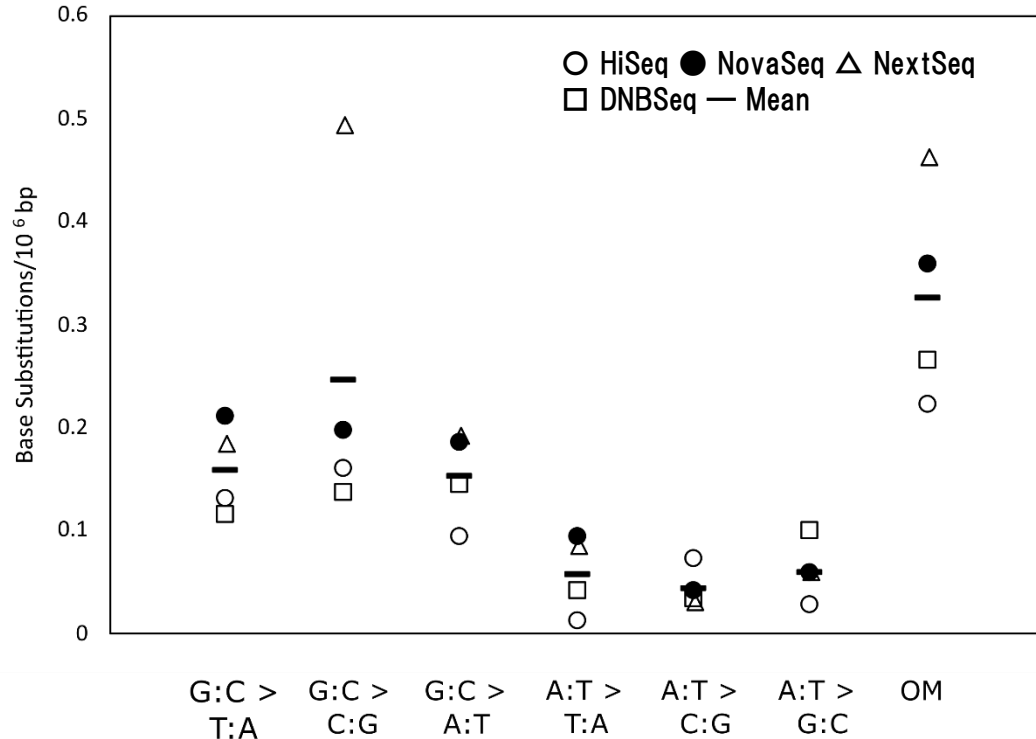
上記、投稿費用について、MMS研究会にご支援をお願いしたく、ご承認のほどよろしくお願いいたします

予備資料:
Step1、Step2のデータ概要

Step1: 事前検討の結果概要

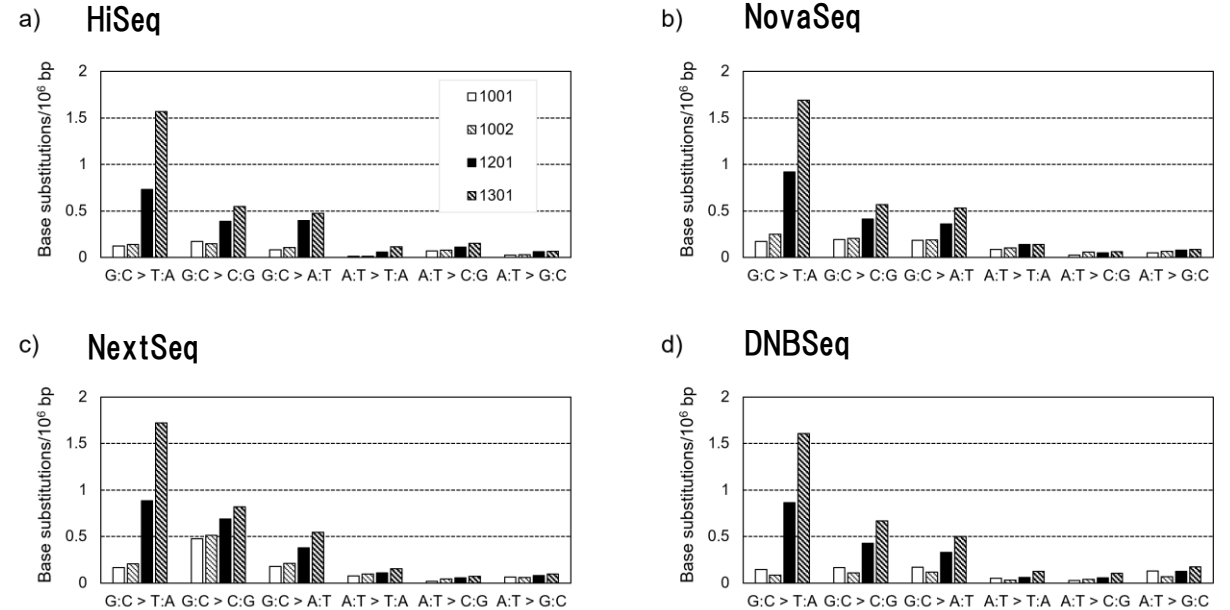
シーケンサーによる変異解析への影響の解析(マウスDNAサンプルを使用)

シーケンサー間のエラー頻度比較(4機種)



- ・シーケンサー間でエラー頻度に差有り
- ・NextSeqではG:C to C:G変異の頻度が高い傾向

シーケンサー間のエラー頻度比較(4機種)



- ・いずれのシーケンサーでも明確な変異頻度上昇を確認
- ・各シーケンサーの変異パターンは高い類似性を確認 (コサイン類似度による比較(データは割愛))

上記内容をG&Eへ投稿済み

Step2: 提供サンプルの概要

DNA: *gpt* deltaマウス(肝臓) 変異原: Benzo[*a*]pyrene (BP)、*N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)、*N*-Methyl-*N*-nitrosourea (MNU)

	Dose (mg/kg)	<i>gpt</i> assay (Mean ± SD)	Animal No.	Kao	Teijin pharma	Eisai
BP (Liver)	0 (Olive oil)	2.43 ± 0.81	1002	○	○	○
			1003	○	○	○
			1004	○	○	○
			1005	○	○	○
	150	9.14 ± 2.35 *	1201	○	○	○
			1203	○	○	○
			1204	○	○	○
			1205	○	○	○
	300	19.91 ± 9.79 *	1301	○	○	○
			1302	○	○	○
			1303	○	○	○
			1305	○	○	○
ENU (Liver)	0 (Saline)	3.85 ± 3.19	3001	○	○	○
			6001	○	○	○
			6002	○	○	○
			6003	○	○	○
	75	6.61 ± 2.73	3201	○	○	○
			3202	○	○	○
			6201	○	○	○
			6203	○	○	○
	150	23.48 ± 18.58 *	3302	○	○	○
			6301	○	○	○
			6302	○	○	○
			6303	○	○	○

	Dose (mg/kg)	<i>gpt</i> assay (Mean ± SD)	Animal No.	Kao	Teijin pharma
MNU (Liver)	0 (Saline)	3.85 ± 3.19	3001	○	○
			6001	○	○
			6002	○	○
			6003	○	○
	12.5	4.5 ± 1.21	5101	○	○
			5102	○	○
			8101	○	○
			8102	○	○
	25	9.6 ± 4.03 *	5202	○	○
			8201	○	○
			8202	○	○
			8203	○	○

32 samples

▪ All samples indicated significant increase in colony number in *gpt* assay at high dose

Step2: *gpt* assayとの感度比較

< Comparison of fold increase with *gpt* assay >

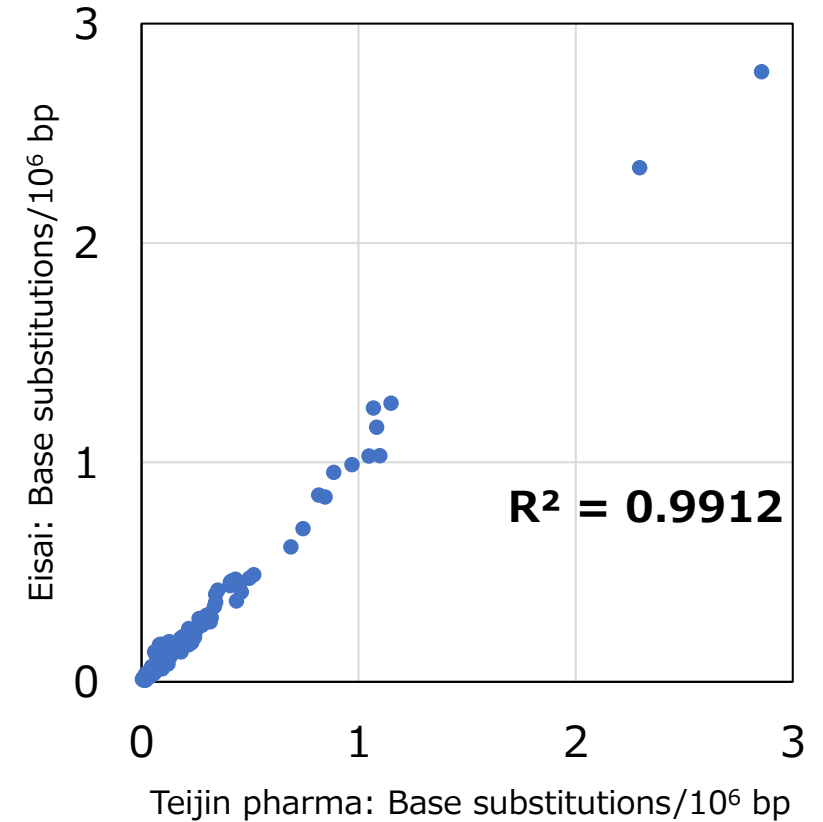
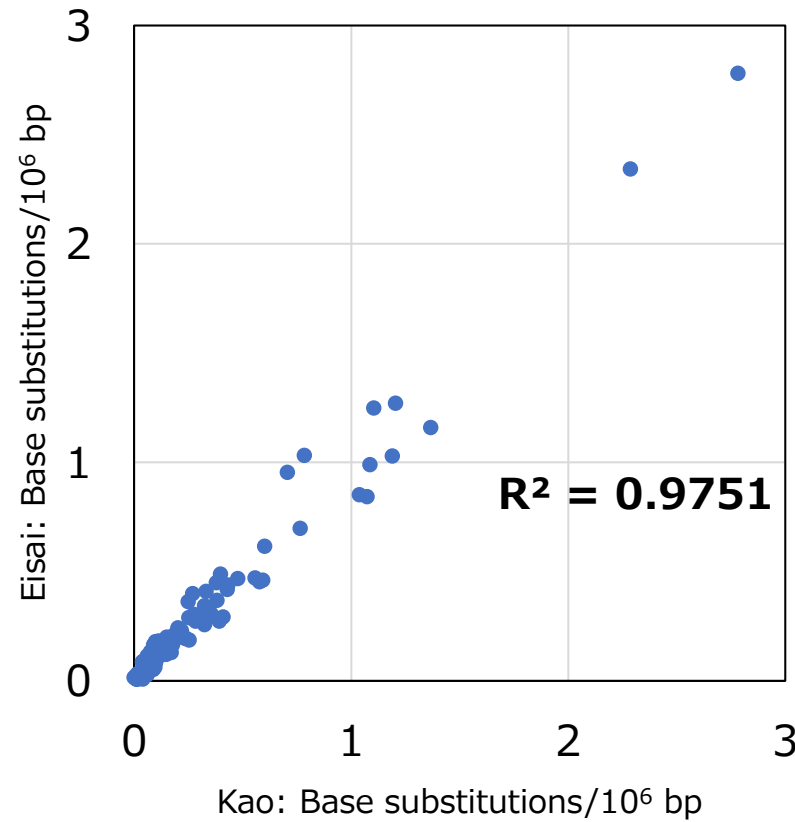
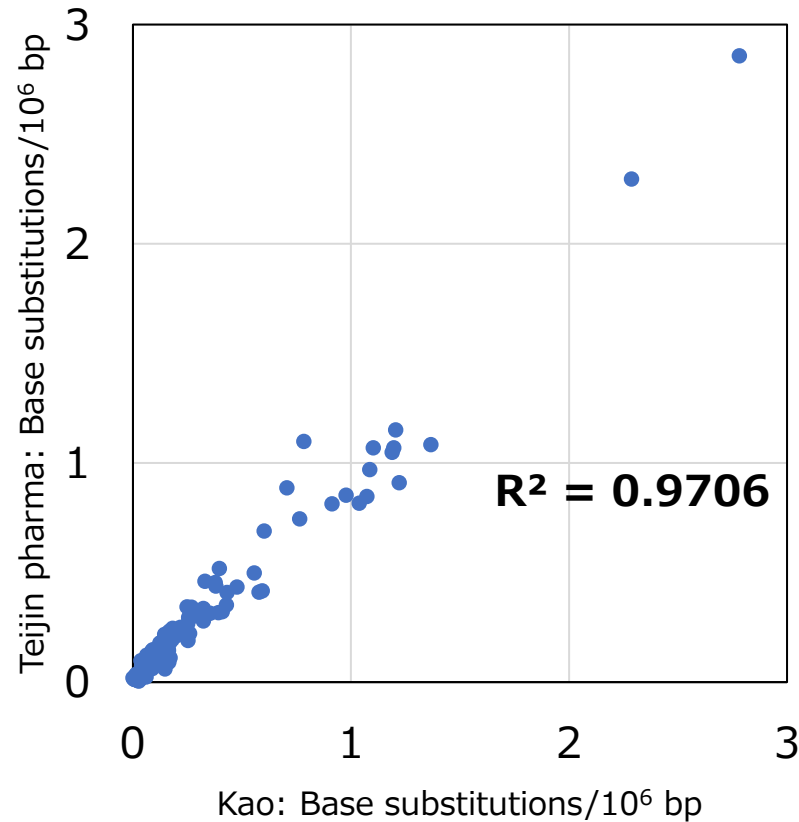
Table. Fold increase Ctrl: control, LD: low dose, HD: high dose, NT: not tested

		Hawk-Seq™						<i>gpt</i> assay	
		Kao		Teijin pharma		Eisai		Colony num. (x 10 ⁻⁶)	Fold increase
		Freq. (x 10 ⁻⁶ bp)	Fold increase	Freq. (x 10 ⁻⁶ bp)	Fold increase	Freq. (x 10 ⁻⁶ bp)	Fold increase		
BP	Ctrl	0.14	1	0.17	1	0.17	1	2.43	1
	LD	0.28	1.96	0.28	1.64	0.27	1.54	9.14	3.76
	HD	0.67	4.62	0.67	3.98	0.68	3.94	19.91	8.19
ENU	Ctrl	0.15	1	0.14	1	0.16	1	3.85	1
	LD	0.71	4.82	0.65	4.74	0.68	4.35	6.61	1.72
	HD	2.25	15.39	2.23	16.15	2.24	14.21	23.48	6.10
MNU	Ctrl	0.15	1	0.14	1	NT	NT	3.85	1
	LD	0.26	1.77	0.28	2.02	NT	NT	4.5	1.17
	HD	0.67	4.56	0.62	4.49	NT	NT	9.6	2.49

- ・ENU, MNUは*gpt* assayと同等以上の感度であった
- ・BPは*gpt* assayに比べ感度が低い傾向が再現された

Step2: 施設間の相関係数

個体ごとの6種類の塩基対置換の頻度の相関係数を算出



いずれの施設の組み合わせでも高い相関係数を示し、高い再現性が確認された