

次世代ゼブラフィッシュ発生毒性試験と LSKB毒性機構解析システム

田中利男

三重大学大学院医学系研究科システムズ薬理学

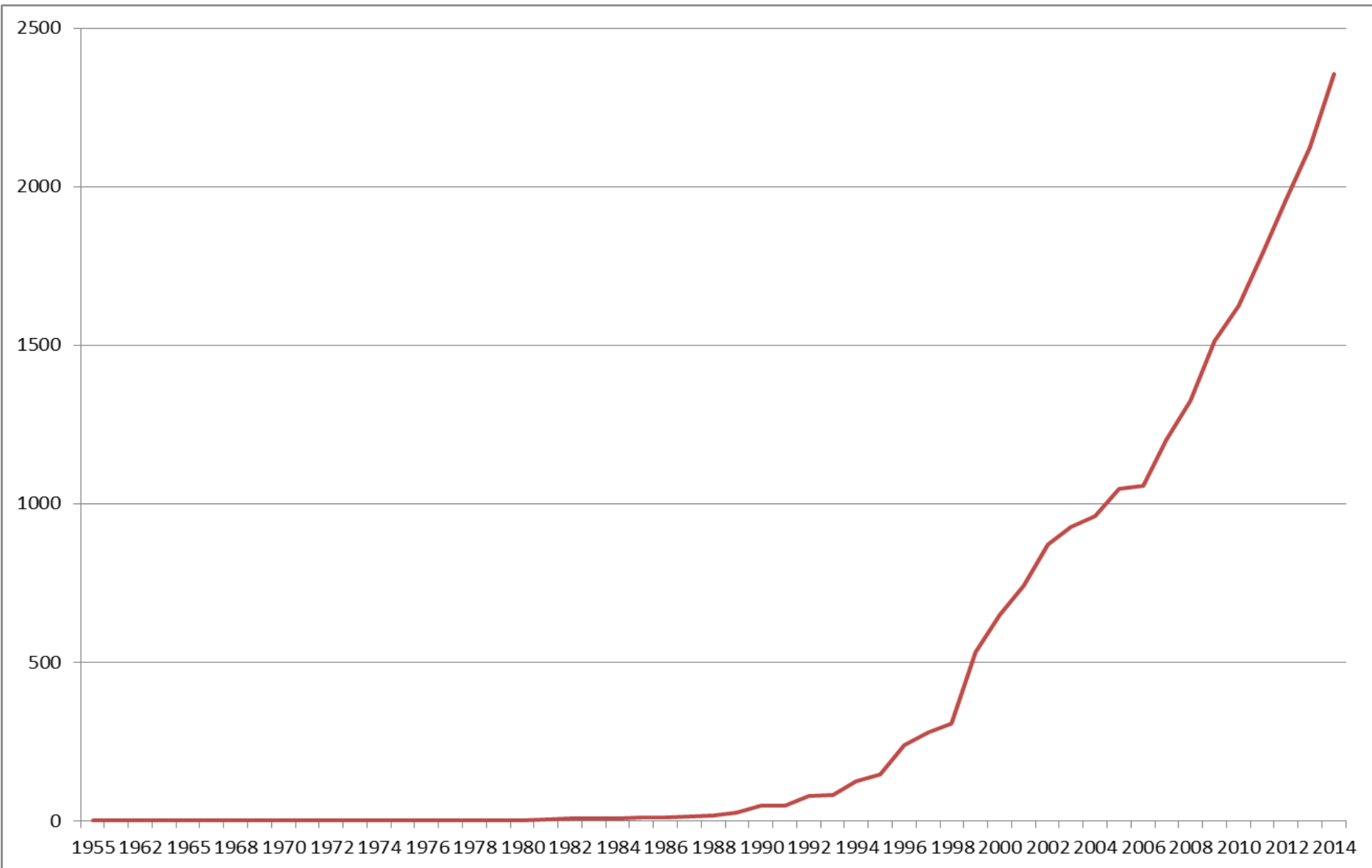
2022年10月26日(水) 12:30-13:00

情報計算生物化学(CBI)学会2022年大会

LS-04ワールドフュージョンランチョンセミナー

タワーホール舟堀 2階桃源

Rapid Increase of Zebrafish-Based BioMedical Publication



疾患モデル生物の特徴と選択

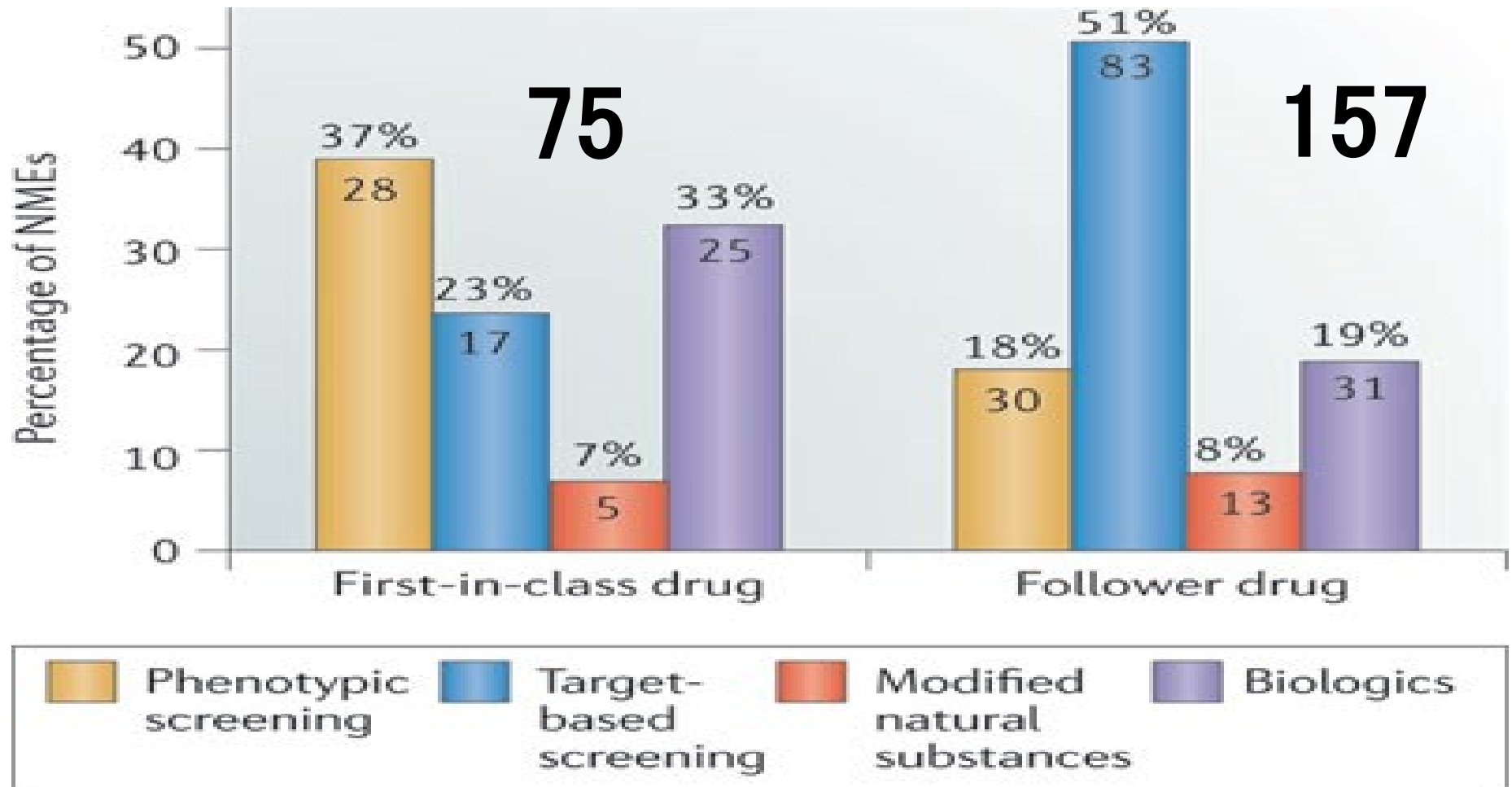
外挿性

スループットコスト

遺伝子操作

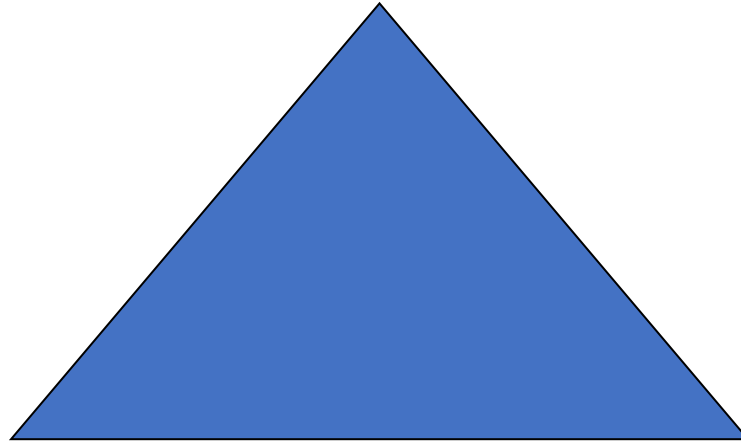
	外挿性	スループットコスト	遺伝子操作	
ヒト	+++++	+	+++++	
ラット	++++	++	++++	+
マウス	++++	++	++++	++
ゼブラフィッシュ	+++ 	++++ 	S +++	++++
線虫	++	++++	++	++++
酵母	+	++++	++	++++
細菌	+	+++++	+	+++++

New Drugs Discovered : 1999–2008



Comparative Genomics of Disease Models

Human (2003)



Rat/Mouse
(2005/2002)

Zebrafish
(2011)

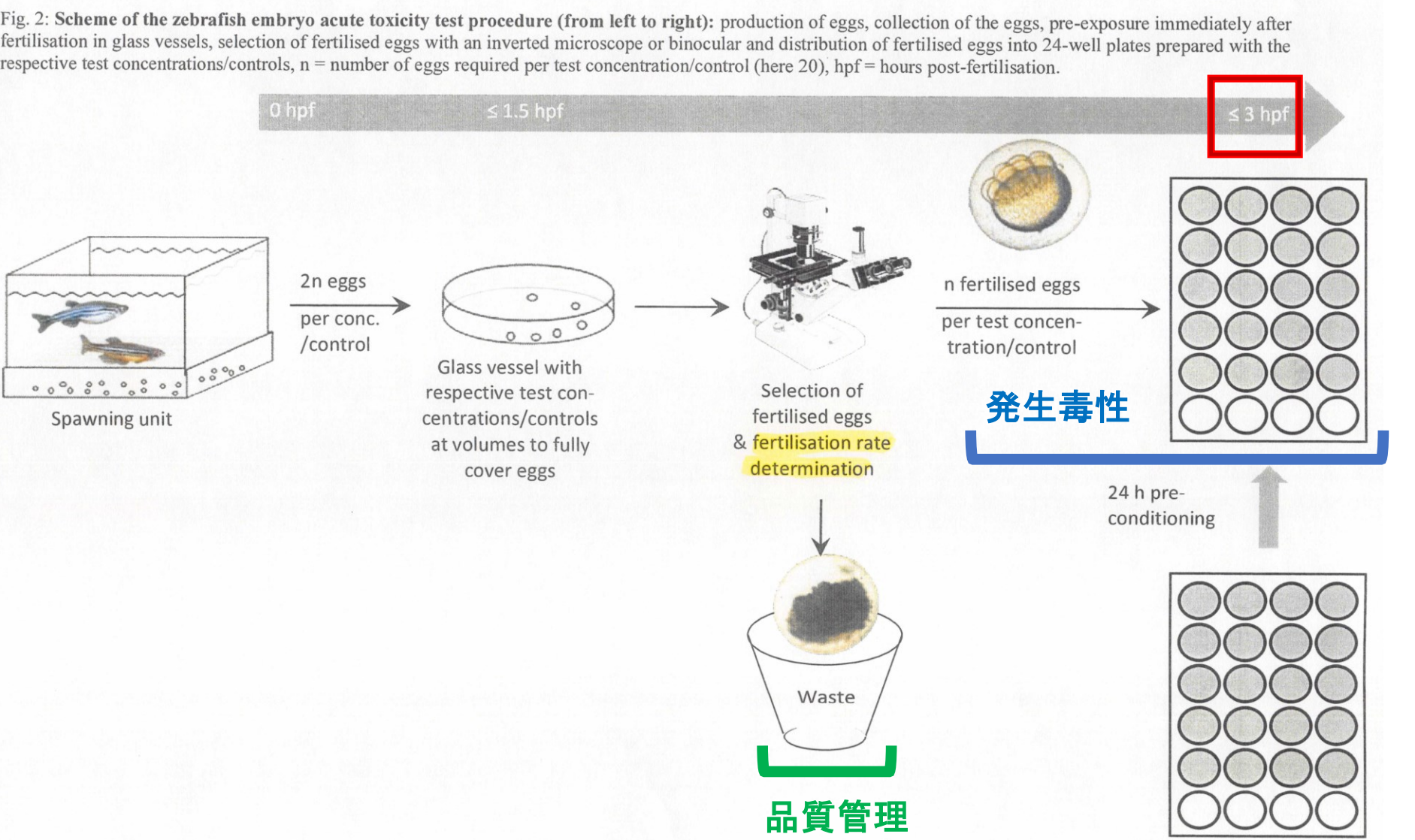
Low Throughput

High Throughput

OECD(2013) Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test 236

OECD/OCDE

236



品質管理ゼブラフィッシュ発生毒性試験プロトコル

品質管理プロセス

timelapse

3hpf 4hpf 5hpf

発生毒性プロセス

6hpf-5dpf

受精卵
分注

< 1.5hpf

(個別化品質管理、
個別化発生毒性)

6hpf薬物暴露開始

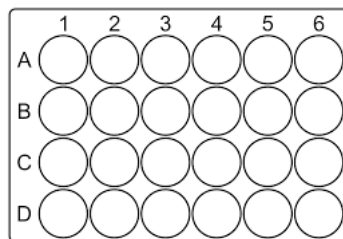
6hpf-5dpf薬液毎日交換

3,4,5hpf,5dpfデジタル画像撮影

従来の国際的標準プロトコル(TG236)

(グループ品質管理、
グループ発生毒性)

品質管理プロセス
死卵除去<3hpf



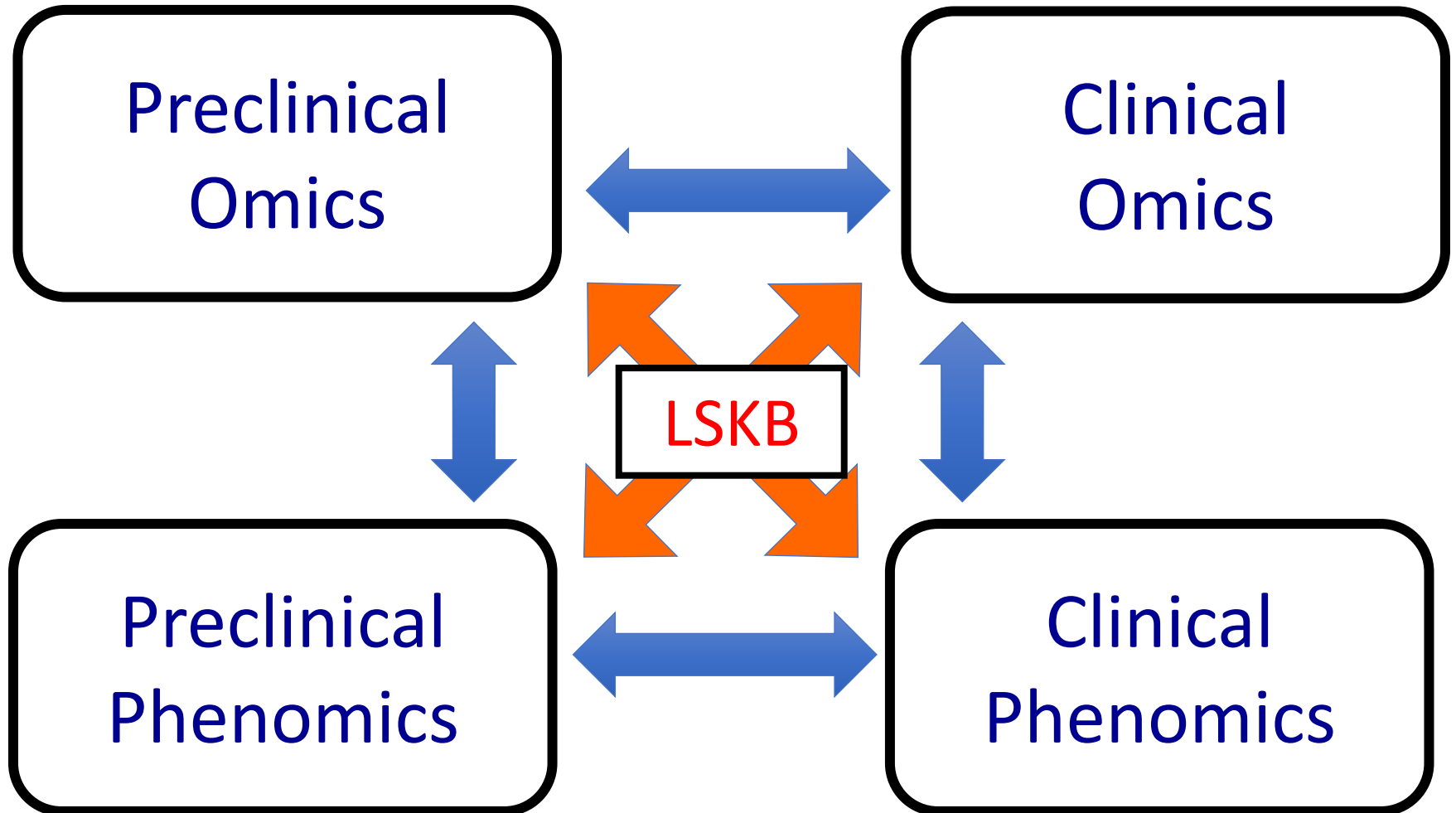
次世代(DX)発生毒性スクリーニングシステム

DX:デジタルトランスフォーメーション

デジタル技術（デジタル高密度画像）により、既存のレガシーシステム(OECDプロトコル)を克服し、以下の革新的イノベーションを実現する。

- 1) 受精卵品質管理システム
- 2) ハイスループットプレートシステム化
- 3) **LSKBによるAI毒性機構解析**
- 4) ビッグデータ自動データベース化
- 5) 全自動スクリーニングシステム
- 6) AI発生毒性自動分類診断

LSKB(Deep Learning:BERT)による毒性機構解析システム

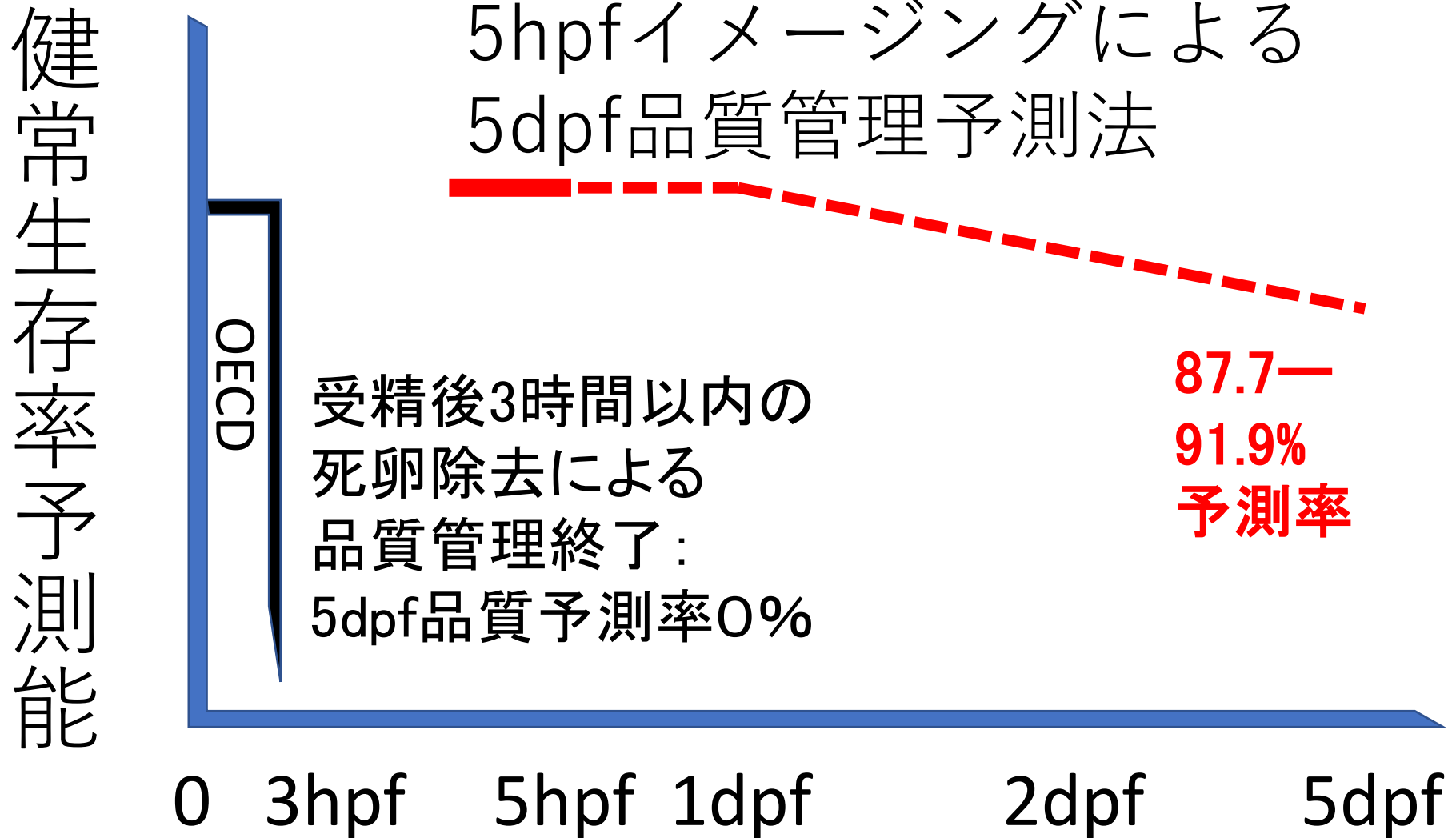


ゼブラフィッシュ受精卵品質管理予測法

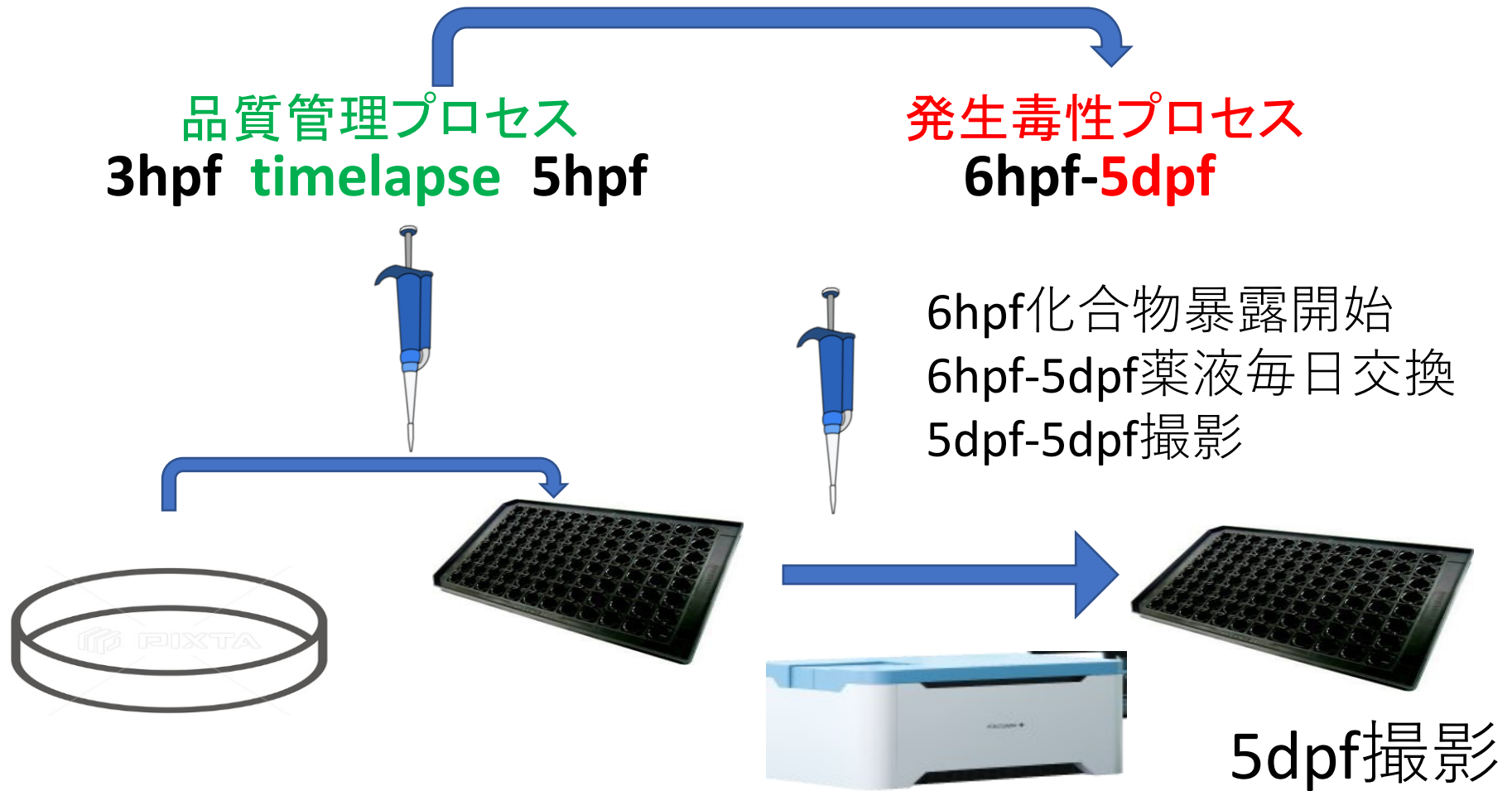
次世代発生毒性試験法

5hpfイメージングによる

5dpf品質管理予測法



新しいゼブラフィッシュ発生毒性試験プロトコル

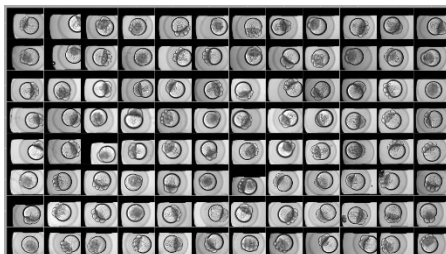
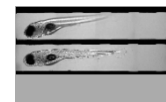
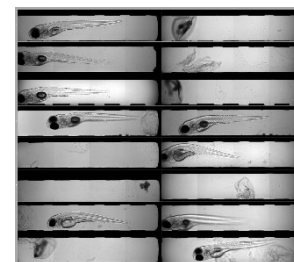
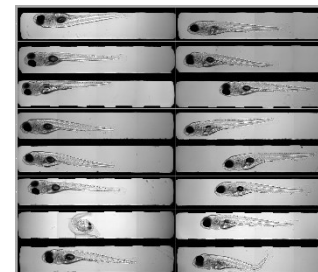
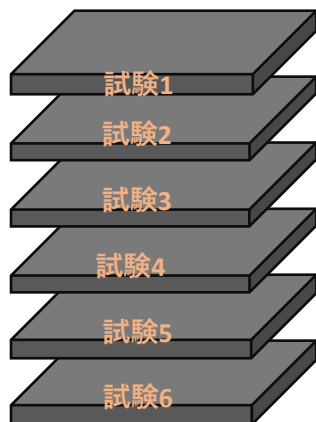
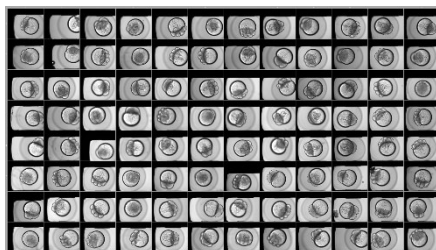
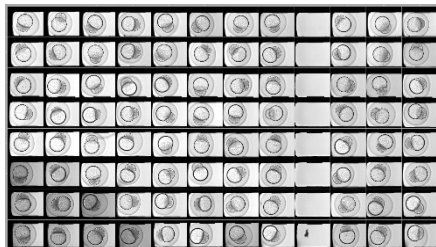
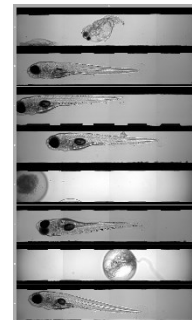
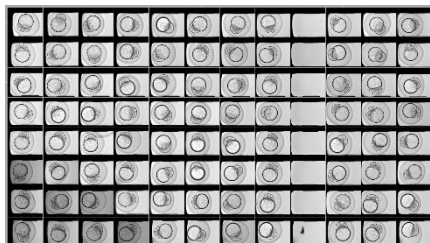


- 1) 受精卵品質管理 (デジタル画像保存) >> AI自動画像定量診断
- 2) 発生毒性試験 (デジタル画像保存) >> AI自動画像定量分類
- 3) ハイスループット (96wellplate 4枚/192ZF/週/1人) >> 全自動化

プレート撮影を行ったとき生まれる 大量の画像ファイル

96well plate イメージング

大量の画像ファイル



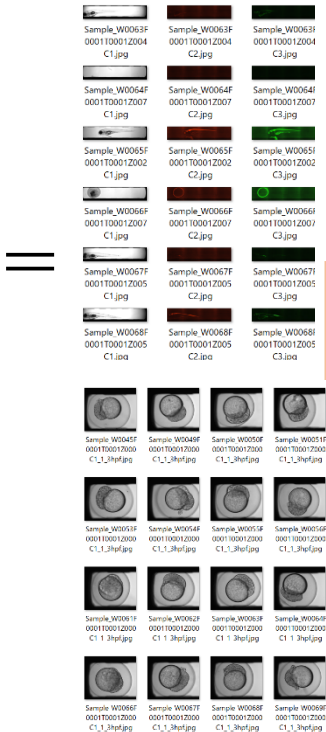
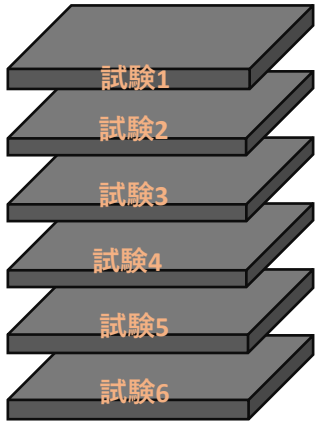
96well Z Fplate 撮影

大量の画像
ファイル

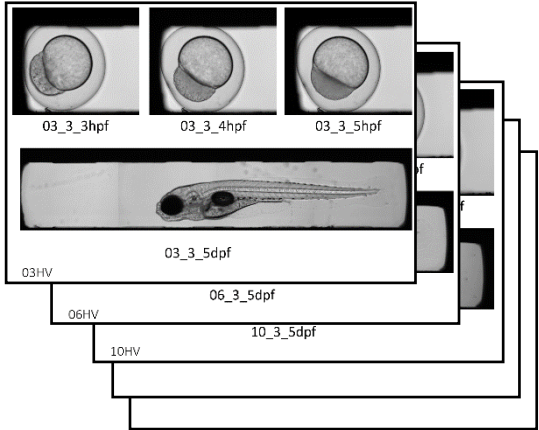
画像取り出し
画像前処理

パワーポイント
へ自動出力
枚数制限なし

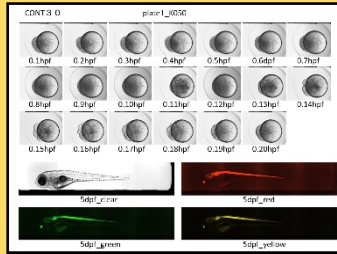
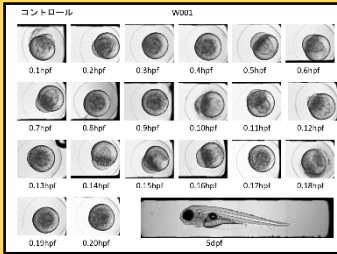
96well × plate数 × 1well当たり撮影数



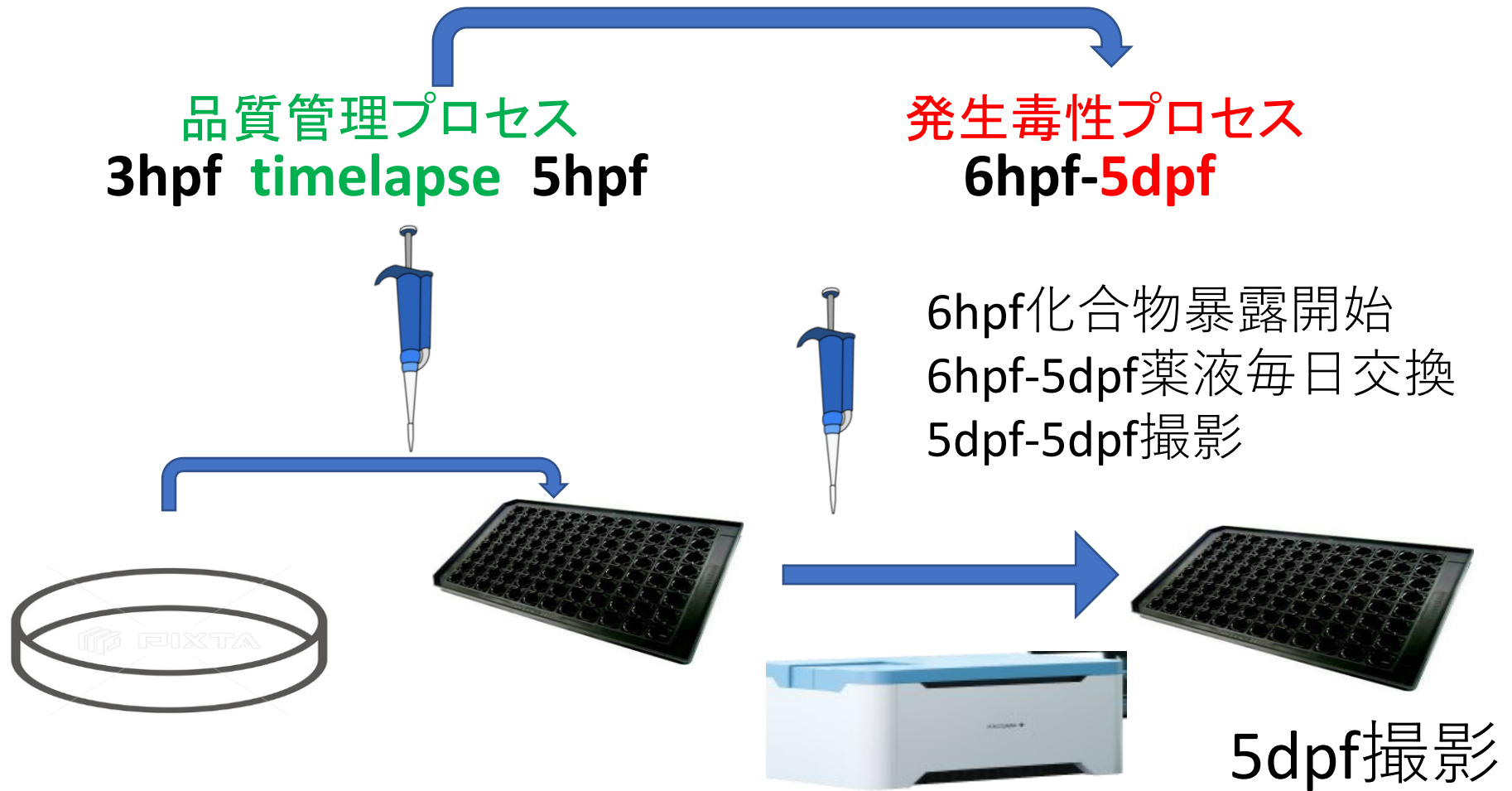
- 1) `imgel`
(`tiff>jpg`変換)
- 2) `bat`ファイル(`windows`環境でのコマンド列テキストファイル)
- 3) `python`
(`pptx,openpyxl`)



レイアウトも様々な作成できる

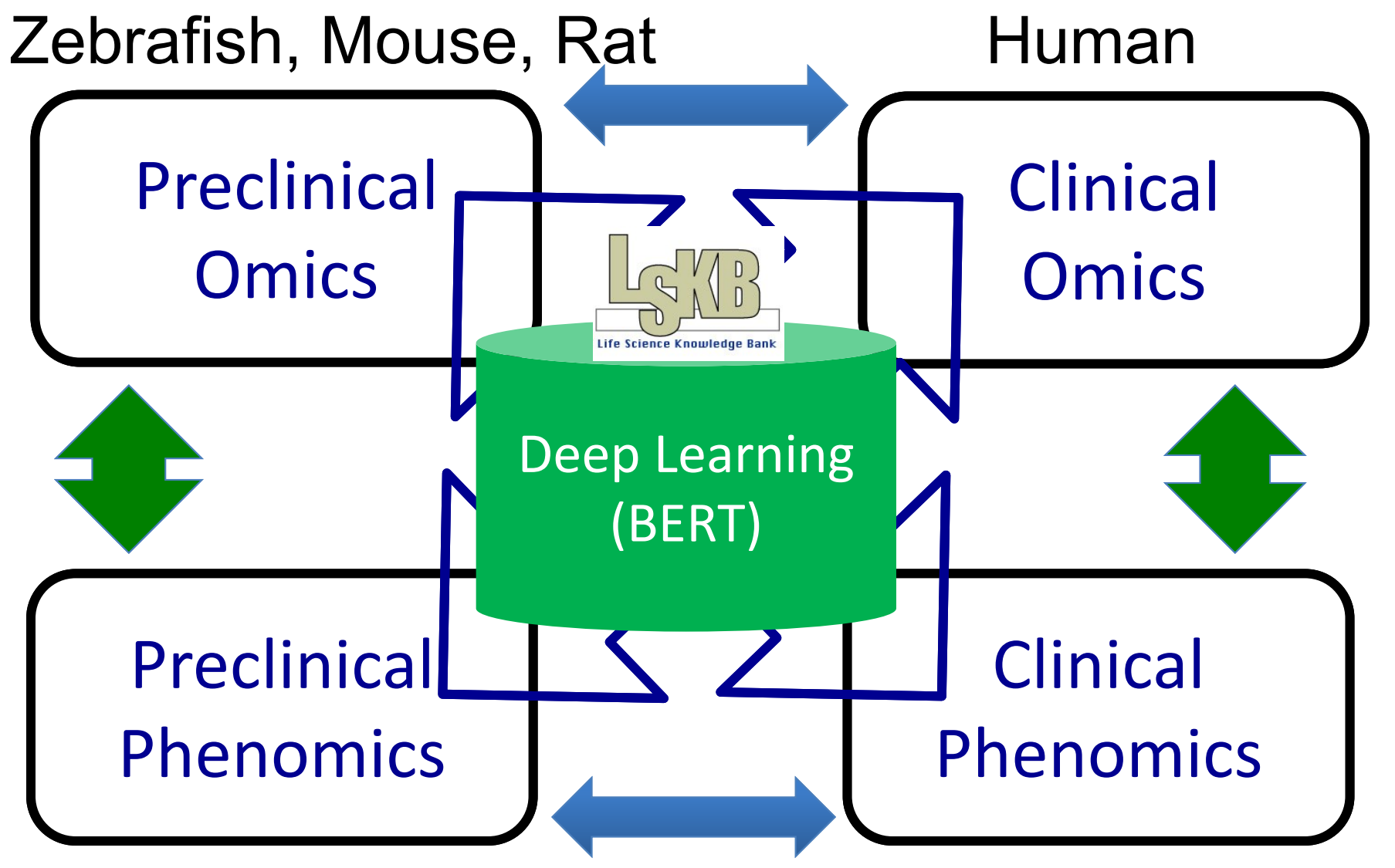


新しいゼブラフィッシュ発生毒性試験プロトコル



- 1) 受精卵品質管理 (デジタル画像保存) >> AI自動画像定量診断
- 2) 発生毒性試験 (デジタル画像保存) >> AI自動画像定量分類
- 3) ハイスループット (96wellplate 4枚/192ZF/週/1人) >> 全自動化

LSKB(Deep Learning:BERT)による毒性機構解析システム



催奇形性に関連する遺伝子リスト

Toxicity Teratogenesis

(beta version)

T046:Pathologic Function

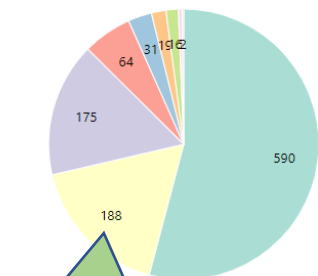


Filter Condition(s) Send Gene ID Send Gene ID to Venn Diagram A ▾

Show 25 entries

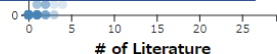
Column visibility Copy Excel

Association Class ▾



記載内容の分類

- Etiology
- Biomarker & Indicator
- Altered Expression
- Polymorphism
- etc



Gene ID	Gene Symbol	Gene Title	Organism	Association Class	# of Literature	# of Literature LV1	# of Literature LV2	# of PubMed Abstract (Associations)	Pathway	Gene Expression
1	51185	CRBN	cereblon	Homo sapiens	<ul style="list-style-type: none">Etiology (GR)Biomarker & Indicator (PM)Etiology (PM)Inhibition (PM)Polymorphism (PM)	28	18	17	14	0
2	4524	MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase	Homo sapiens	<ul style="list-style-type: none">Etiology (GR)Polymorphism (GR)Biomarker & Indicator (PM)Etiology (PM)Polymorphism (PM)	7			3	0
3	324	APC	APC regulator of WNT signaling pathway	Homo sapiens	<ul style="list-style-type: none">Polymorphism (GR)Biomarker & Indicator (PM)Etiology (PM)Polymorphism (PM)			1	1	1
4	57167	SALL4	spalt like transcription factor 4	Homo sapiens	<ul style="list-style-type: none">Etiology (GR)Biomarker & Indicator (PM)Etiology (PM)			2	1	0
5	6910	TBX5	T-box transcription factor 5	Homo sapiens	<ul style="list-style-type: none">Etiology (GR)Biomarker & Indicator (PM)Etiology (PM)Inhibition (PM)	2	1	1	5	0

関係性の項目

- PubMed 文献共起
- BERTによる Association Class (PubMed/GeneRIF)
- Pathway
- Gene Expression
- GeneRIF
- SNP

Showing 1 to 25 of 871 entries (filtered from 2,440 total entries)

Previous 1 2 3 4 5 ... 35 Next

Tox. Target Explorer: Developmental Toxicity

Developmental toxicity

Embryotoxicity

Teratogenesis

Pseudohermaphroditism

oestrogen deficiency

Hyperestrogenism

DevTox Nomenclature:
Observation
Syndrome
etc

発生毒性関連の疾患/所見をInput

Literature mining

AI-based Curation

OMIM/MedGen
etc

Gene Expression

SNPs
Information
Pathway

Evidenceとともに
毒性・有害事象に関わる
ターゲットをリストアップ

Association Class

- Etiology
- Biomarker & Indicator
- Altered Expression
- Polymorphism
- etc

Species

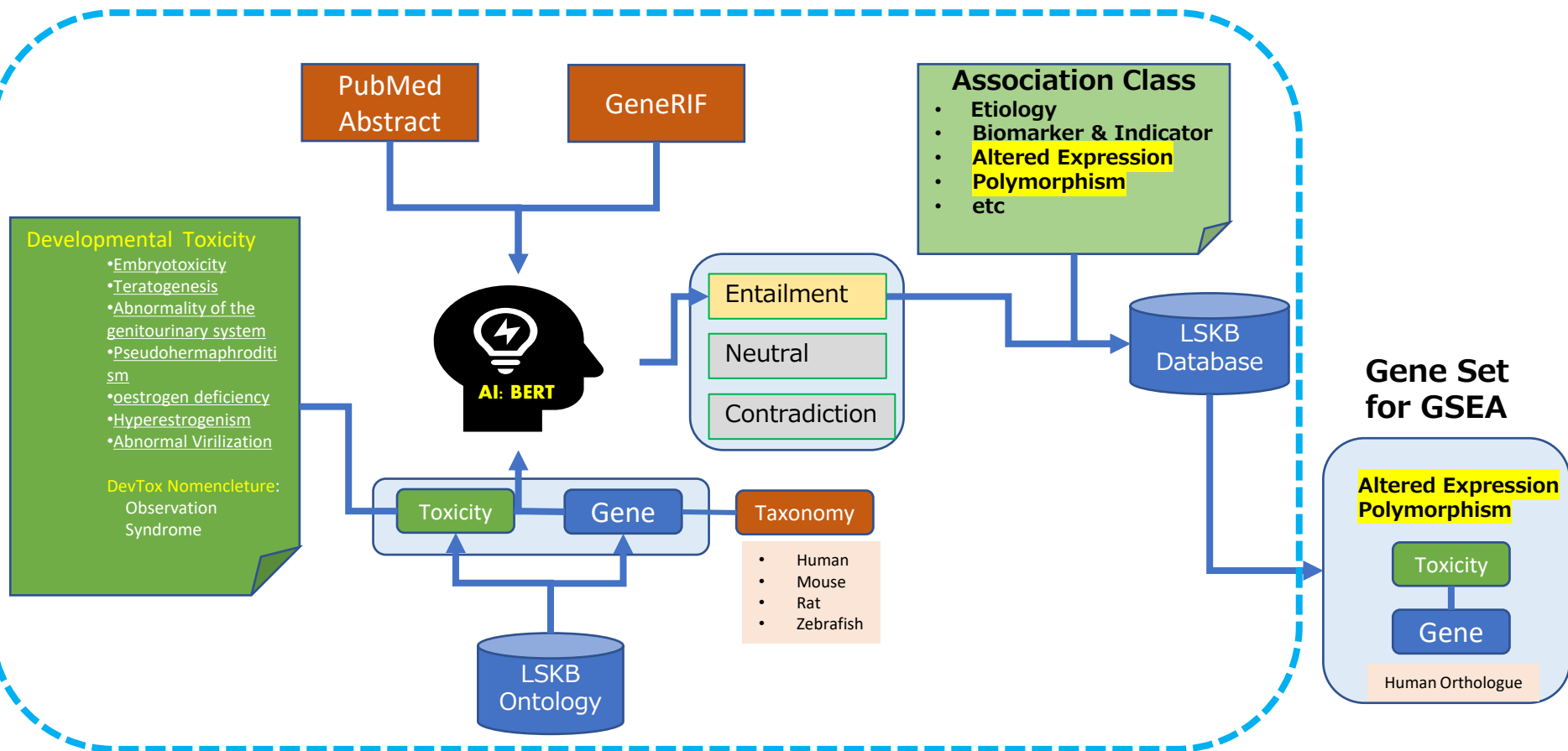
- Human
- Mouse
- Rat
- Zebrafish
- etc

Rank	Gene ID	Gene Symbol	Gene Title	Organism	# of Disease	Association Class	HPD	Gene Expression	Gene Expression (Ortholog)	Gene RIF	Gene RIF (Associations)	SNP(s)	# of Literature	Pathway	Gene in Disease Summary
4	7024	TGF				Up Regulation (PM)				39	12	10	701	23	
5	39	3339	heart shock protein family A (Hsp70) member 5	Homo sapiens	4	Down Regulation (GR) Enhancement (PM) Biology (PM) Inhibition (PM) Polymorphism (PM) Up Regulation (PM)	0	0							
6	45	1655	cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6	Homo sapiens	6	Biology (GR) Polymorphism (GR) Biomarker & Indicator (PM) Down Regulation (PM) Enhancement (PM) Biology (PM) Inhibition (PM) Polymorphism (PM) Up Regulation (PM)	0	0		3	2	0.09	475	4	
7	2038	24	ATP binding cassette subfamily A member 4	Homo sapiens	3	Biomarker & Indicator (PM) Biology (PM) Polymorphism (PM)	0	0							
8	66	1401	C-reactive protein	Homo sapiens	6	Enhancement (GR) Biology (GR) Up Regulation (GR) Biomarker & Indicator (PM) Enhancement (PM) Biology (PM) Inhibition (PM) Polymorphism (PM)	0	0		6	3	10	612	3	
9	187	1648	DNA damage inducible transcript 3	Homo sapiens	3	Biology (GR) Biomarker & Indicator (PM)	0	0		11	2	10	655	11	

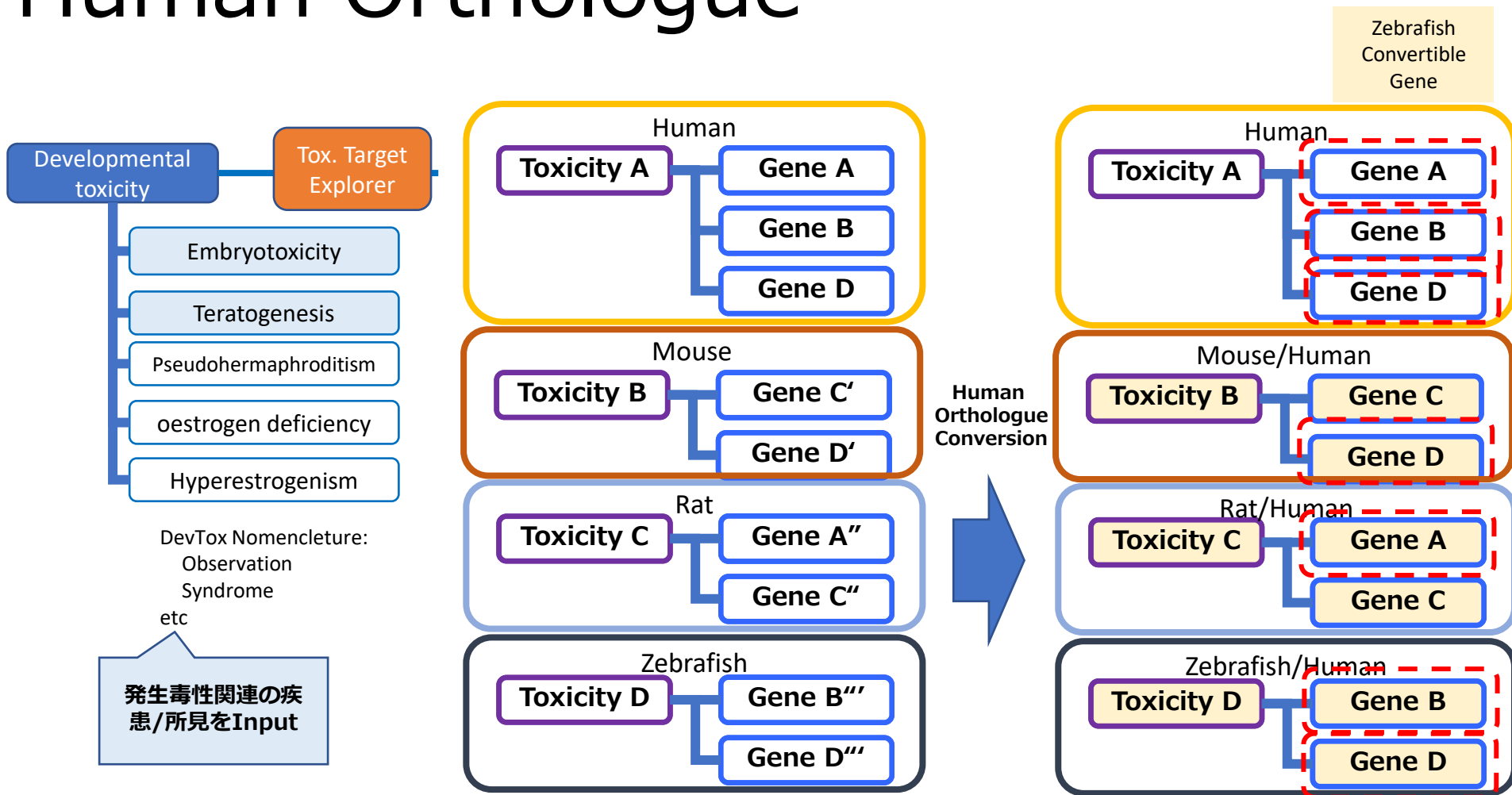
Showing 1 to 25 of 10,112 entries (filtered from 22,011 total entries)

Previous 2 3 4 5 ... 405 Next

LSKB: 発生毒性用GSEA Gene Set 作成プロセス



Tox. Target Explorer: Species & Human Orthologue





Developmental Toxicity estimation support by GSEA



Developmental toxicity

Target Explorer

Text-Mining and AI curation
PubMed literature
GeneRIF
Open Data
UniProt
MedGen
Pathway
Gene Ontology
SNPs

Toxicity A

Gene A

Gene B

Gene D

Toxicity B

Gene D

Toxicity C

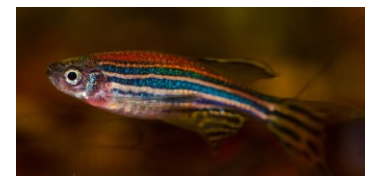
Gene A

Gene Expression

GSEA

Up-regulated
Down-regulated

Zebrafish



Gene A

Gene B

Gene C

Gene D

Gene E

Toxicity A

Toxicity B

正常
浮腫
輕症
重症
畸形

GSEA/Phenotype Comparison

黄: Up regulated
青: Down regulated
数字: FDRq-Value
赤字: 0.25以下

		18	19	21	23	14		20	15	9	10	12	11
	Drug	スルファサラジン	エリストロマイシン	アモキシリン	アモキシリン	サリドマイド		バルプロ酸	サリドマイド	サリドマイド	バルプロ酸	バルプロ酸	サリドマイド
	Amount	80	30	30	80	30		80	80	30	30	30	30
	Phenotype	健常	健常	健常	健常	健常		浮腫	浮腫	軽症	軽症	重症	重症
		ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP		ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP	ZF_EXP
	Toxicity	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v		FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v	FDRq-v
異常男性化	Abnormal Virilization	0.953	0.531	0.869	0.781	0.957		0.135	0.965	0.878	0.987	0.197	0.538
泌尿生殖系異常	Abnormality of the genitourinary system	0.438	0.296	0.887	0.27	0.951		0.68	0.966	0.672	0.987	0.707	0.898
頭蓋骨融合症	Craniosynostosis	0.953	0.985	0.887	0.358	0.955		0.983	0.82	0.069	0.948	0.03	0.152
うつ状態	Depressivity	0.296	0.296	0.801	0.67	0.772		0.593	0.727	0.065	0.478	0.707	0.705
憩室症	Diverticulum	0.968	0.531	0.628	0.33	0.772		0.135	0.727	0.894	0.948	0.673	0.538
脳脱出症	Exencephaly	0.953	0.951	0.801	0.358	0.955		1	0.878	0.678	0.736	0.886	0.152
尾側発育不全	Familial caudal dysgenesis	0.968	0.964	0.887	0.781	0.772		0.629	0.727	0.896	0.987	0.285	0.152
ヘルニア	Hernia	0.953	0.763	0.869	0.827	0.772		0.089	0.907	0.07	0.174	0.617	0.097
尿道下裂	Hypospadias, penile	0.953	0.979	0.63	0.968	0.955		1	0.455	0.065	0.523	0.617	0.176
病変	Lesion	0.518	0.296	0.63	0.358	0.772		0.43	0.878	0.069	0.322	0.707	0.561
エストロゲン欠	oestrogen deficiency	0.198	0.296	0.63	0.315	0.645		0.629	0.82	0.016	0.316	0.03	0.053
羊水過少症	Oligohydramnios	0.625	0.979	0.801	0.354	0.955		0.66	0.878	0.672	0.51	0.707	0.152
病的瘻	pathologic fistula	0.296	0.979	0.63	0.602	0.955		0.051	0.998	0	0.015	0.707	0.053
遺残胎児構造	Persistent Embryonic Structure	0.605	0.687	0.801	0.692	0.772		0.43	0.727	0.016	0.322	0.707	0.305
下顎突出	Protrusion	0.953	0.979	0.801	0.395	0.772		0.773	0.901	0.423	0.987	0.707	0.283
脊柱側弯症	Scoliosis	0.968	0.278	0.869	0.765	0.772		1	0.965	0.423	0.485	0.075	0.613
懸垂繊維種	Skin tags	0.298	0.992	0.887	0.968	0.759		0.68	0.878	1	0.987	0.384	0.921
脊椎披裂	Spina Bifida	0.968	0.975	0.966	0.412	0.772		1	0.727	1	0.555	0.285	0.123
奇形発生	Teratogenesis	0.968	0.964	0.887	0.333	0.772		0.784	0.878	0.065	0.174	0.131	0.152

次世代ゼブラフィッシュ発生毒性試験の LSKB毒性機構解析システム

- 1) LSKB (Life Science Knowledge Bank) の概要
 - 多彩なInteraction
- 2) Deep Learning (BERT)により PubMed/GeneRIF を解釈
 - 多様な仮説の自動生成により 遺伝子と疾患の関連性を取得
- 3) 毒性 副作用関連遺伝子情報
 - 複数の疾患/プロセスから エビデンスに基づく 関連遺伝子の探索
- 4) Zebrafish 発生毒性試験の遺伝子発現データ解析
 - (1) Zebrafish 発生毒性用Gene Set作成
 - (2) 医薬品による発生毒性フェノタイプ発現機構との相関関係
 - (3) 医薬品による発生毒性フェノタイプと毒性機構予測解析
 - (4) 各医薬品選択的発生毒性フェノタイプと毒性機構予測解析
 - (5) 各医薬品選択的発生毒性フェノタイプと毒性機構予測解明