

金井 弥栄

国立がん研究センター研究所・副所長・分子病理分野長

ヒト消化器上皮細胞の標準エピゲノム解析と解析技術開発

§1. 研究実施体制

(1) 「国立がん研究センター」グループ

① 研究代表者: 金井 弥栄 (国立がん研究センター研究所、副所長・分子病理分野長)

② 研究項目

- ・研究の統括
- ・純化細胞調製
- ・標準エピゲノム解析
- ・IHEC 対応
- ・標準エピゲノムデータ活用促進

(2) 「国立がん研究センター」グループ

① 主たる共同研究者: 柴田 龍弘 (国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野、分野長)

② 研究項目

- ・標準エピゲノム解析
- ・エピゲノム解析技術開発
- ・IHEC 対応
- ・標準エピゲノムデータ活用促進

(3) 「東京大学」グループ

① 主たる共同研究者: 伊藤 隆司 (東京大学大学院理学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・標準エピゲノム解析
- ・エピゲノム解析技術開発

- ・IHEC 対応
- ・標準エピゲノムデータ活用促進

(4)「東京大学」グループ

① 主たる共同研究者: 鈴木 穰 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、准教授)

③ 研究項目

- ・標準エピゲノム解析
- ・IHEC 対応
- ・標準エピゲノムデータ活用促進

§2. 研究実施内容

1. 純化細胞調製 (金井)

・正常肝細胞: 肝炎ウイルス感染を伴わず慢性肝炎・肝硬変症に罹患していない大腸がん肝転移症例の肝部分切除術標本において、肝静脈枝にカニューレションしてコラゲナーゼ灌流を行い、低速遠心により平均 4×10^7 個/症例の純化細胞を調製した。抗肝細胞抗体を用いた免疫細胞化学で、肝細胞の純化程度が概ね 90%超であることを確認した。3 症例分の純化正常肝細胞より、核酸を抽出しあるいはホルマリン固定し、解析手順の至適化を含むエピゲノム解析に供給した。その後も新規症例から、継続して純化細胞を調製している。上清分画に小型肝細胞 (オバール細胞) が含まれることを免疫細胞化学的に確認し、小型肝細胞の純化手順の至適化を行っている。

・正常胃上皮細胞: 胃 (亜)全摘出術標本の胃体部より得られた正常胃粘膜組織から、腺管分離・コラゲナーゼ消化による細胞分散を経て、蛍光活性セルソーター (FACS) で腺窩上皮・腺頸部増殖帯上皮・胃底腺上皮細胞 (傍細胞・主細胞) を分離するため、抗 MAC5AC・Ki-67・Proton pump subunit・Pepsinogen I 抗体等の候補抗体を収集した。平成 24 年度には、(a) 遠心・沈殿操作を妨げる粘液を除去する方法、(b) コラゲナーゼの処理時間、(c) 膜タンパク以外の抗原に対する抗体を用いて FACS を行う際の界面活性剤の処理法、等の手順を至適化する。

・正常大腸上皮細胞: 使用予定の抗 EpCAM 抗体が、FACS 精製に適していることを確認した。

2. メチローム解析 (伊藤・柴田)

伊藤等が独自に開発した全ゲノムバイサルファイトシーケンシングの鋳型調製法 Post-Bisulfite Adaptor-Tagging (PBAT) 法に、頑強性と効率の更なる向上を目的に改良を加えた。

(a) 開始ゲノム DNA の断片化によるバイサルファイト変換効率の向上

開始ゲノム DNA の断片化を行っても、PBAT 法による鋳型調製は可能であったが、バイサルファイト処理時の DNA 収率が低下するために、微量試料の解析には適さないことが分かった。そこで、高温で変性状態を保ったままバイサルファイト処理を行う方法の検討に着手した。

(b) バイサルファイト処理済 DNA 断片の 3'末端ブロッキングによる副反応の抑制

ゲノム DNA 同士のプライミングによる副反応の抑制を目的に、バイサルファイト処理済 DNA に対してターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼと ddNTP による 3'末端ブロッキングを試みたところ、鋳型収率の向上を認めた。

(c) 新規アダプタプライマーによるペアエンドリードの実現とプライミングのランダム性向上

PBAT 法では、第2鎖合成用プライマーにイルミナ社の Y 字型アダプタに特徴的なステム部分が残っていると、鋳型の調製効率が極端に低下する。そのため、従来はステム部分を除去したアダプタを用いて鋳型を調製し、シングルエンドリードを行ってきた。しかし、第2鎖合成用プライマーの改良によって、ペアエンドリードに必須のステム部分を残したままでも十分量の鋳型を得ることが可能になった。これによってペアエンドリードが実現し、出力とマッピング精度の向上が達成された。

現在、IHEC 指定の対照細胞 IMR90を対象に、上記の改良点を導入した PBAT 法と既存手法 MethylC-Seq の性能比較実験を進行中である。性能が証明できれば、直ちに純化正常肝細胞に適用する。微量試料に適した PBAT 法を、我が国の標準解析手法とすることを、CREST タイプ B 白髭チームに、すでに提案している。平成 24 年度以降、IHEC 全体の標準手法とすることを、国際科学運営委員会 (ISSC) に働きかける方針である。

全ゲノムシーケンズを行ない、一塩基多型等によるマッピング効率低下を防ぐため、鋳型ライブラリを調製し、高速シーケンサーによるシーケンズ解析を開始した。平成 24 年度には、これらデータセットを用いて、複数の *in silico* エピゲノム解析パイプラインのパフォーマンス比較を行い、有効なアルゴリズムの選別とフィルター条件の至適化を行う。また、IMR90・純化正常肝細胞・大腸上皮細胞等において、IHEC データベース登録のための実際のデータ算出を行う。

3. ヒストン修飾解析 (ChIP-seq) (金井・鈴木・柴田)

白髭チームとの合同ミーティングにおいて、同チームが作製を目指すオリゴクローナル抗体を用いた ChIP を、我が国の IHEC チームの標準手法とすることに同意した。オリゴクローナル化の前に、すでに特異性等が確認された抗 H3K4me3・H3K9me3・H3K27me3・H3K27ac・H3K4me1・H3K36me3モノクローナル抗体の供与を受け、1 症例の純化正常肝細胞において免疫沈降を行った。沈降 DNA を用い、actively transcribed gene (ACTB, EEF1A1, GAPDH) ならびに methylation silenced gene/region (satelliteII, CNR1, KCNA1) について ChIP-定量 PCR を施行し、十分な沈降特異性と沈降効率が得られることを確認した。鋳型ライブラリを調製し、高速シーケンサーによるシーケンズ解析を開始した。

正常大腸上皮細胞純化に用いる予定の抗 EpCAM 抗体を用いた FACS 後の ChIP-定量 PCR を試行し、妥当な結果が得られることを確認した。平成 24 年度中に、純化正常肝細胞に加え、純化正常大腸上皮細胞においても、IHEC データベースに登録するための実際のデータ算出に着手する。

4. 非コード RNA (ncRNA) 解析 (柴田)

Long ncRNA の探索のために、2 症例の純化正常肝細胞から鋳型ライブラリを作製し、高速シーケンサーによる解読を開始した。Refseq, Ensembl, lincRNA などの各種遺伝子データベースから既知の ncRNA を抽出した独自の ncRNA レファレンスデータベースを構築した。さらに RNA シーケンズデータの解析方法論について、既知の ncRNA の同定方法 (Burrows-Wheeler Aligner を用いて上記データベースにマッピングさせ、reads per kilobase of exon model per million mapped reads [RPKM]を算出する)ならびに未知の ncRNA 探索方法(マッピングされなかったリードについて、TopHat, Cufflinks 等のアルゴリズムによりスプライス部位を推定してヒトのリファレンスゲノム配列へアラインメントし、新規 ncRNA 検出と発現量測定を行う)、を既存の臨床試料のデータを用いて予行した。平成 24 年度には、純化正常肝細胞等において、IHEC データベースに登録するためのデータ産生を行う。

5. エピゲノム解析技術開発

・5-ヒドロキシメチルシトシン(hmC)解析 (伊藤): 細菌由来の DNA メチレーズを S-アデノシルメチオニン(SAM)非存在下で DNA と反応させ、5-hmC を脱 hm 化して C に変換する反応(Nat ChemBiol 5, 400, 2009)に基礎的検討を加えた。市販の M.HhaI 標品には SAM が結合した分子種が混在し、5-hmC の脱メチル化と C のメチル化の双方が進行するが、M.SssI にはこのような問題がないことが示唆された。M.SssI による脱 hm 化反応条件の至適化を試みている。

これと平行して、タングステン酸による 5-hmC のチミン誘導体への変換反応(ChemCommun 47:11231, 2011)についても、モデル合成オリゴヌクレオチドを対象に検討を行い、追試に成功した。現在、反応条件の至適化と、より複雑な DNA への適用を進めている。

・第 3 世代高速シーケンサーのエピゲノム解析への活用 (柴田): PacBio RS シーケンサーによる 5-メチルシトシン (mC)・5-hmC の直接検出に向けて、機器の設置・試験稼働を開始した。

6. IHEC 対応と標準エピゲノムデータ活用促進（金井・鈴木・柴田）

ISSC の定例電話会議に参加し、IHEC の要請を把握した。韓国 NIH で開催された Korea-Japan IHEC Research Communication Meeting において、進捗について発表した。韓国 IHEC チームの Bae 教授らと、解析手技と試料の共有の可能性について意見交換し、アジアの2国間の協調関係を強化することで合意した。NIH エピゲノムロードマップのデータベースを担当するベイラー大学 Roth 教授を訪問し、データベース構築に関する意見交換を行った。

公開前のデータを両チームで共有するための簡易型データベースと、可視化ウェブツールを開発することで、白髭チームと合意した。現在、ChIP-Seq の模擬データを用い、データベースの形式を確定し、可視化ツールの実装を行っている。最終的にデータを National bioscience database center (NBDC)・日本 DNA データバンク (DDBJ)を通じて公開する手順について、NBDC の高木博士と打ち合わせた。シーケンスデータを NBDC の定めるデータ形式に変換して移管すること、およびその実務担当者が決定された。IHEC 関連課題の統合データベースを最終確定する際の協力体制については、同様の模擬データを用いてプロトコルを協議中である。