

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

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

研究題目

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）
- ② 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

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 純化細胞調製（金井）

・正常肝細胞：肝部分切除術標本の肝静脈枝からのコラゲナーゼ灌流と低速遠心で、1 症例当たり 10^7 細胞以上の純化肝細胞を採取する手技を確立した。純化率 90%以上であることを免疫細胞化学的に確認している。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等の肝転移症例老（60 歳以上）若（60 歳未満）男女 4 人と、B 型・C 型肝炎ウイルス感染を伴う慢性肝炎ないし肝硬変症症例各 1 人、合計 6 人の手術検体から肝細胞を純化して、IHEC データベースに登録するためのエピゲノムプロファイル解析に供した。平成 25 年度には、肝部分切除術標本より、磁気活性セルソーター MACS によりクッパー細胞・類洞内皮細胞を純化する手順を確立する。

・大腸上皮細胞：(a)陰窩分離法、(b) 陰窩分離法と EasySep (STEMCELL Technologies 社細胞分離用磁気ビーズによる EPCAM 陽性細胞の分離)併用、による吸収上皮細胞純化を試行し、白血球の混入が 3%以下で細胞収量の多い(a)を採用することにした。確立した純化手順は、(1) 大腸組織片を 3mM EDTA 含有 Hanks' solution に 37℃、30 分間浸漬し、メスの背側を用いて粘膜上皮層を剥離する、(2) リン酸緩衝液に粘膜上皮層を懸濁・洗浄後、クロマチン免疫沈降 (ChIP)用にホルマリン固定し、また DNA・RNA 抽出用に RNeasy 小管に浸漬して -80℃で保存する、の通りである。フローサイトメトリーによる純化率確認を全検体について行っている。確立した手順に従って、IHEC データベースに登録するエピゲノムプロファイル解析に供せるよう、老若男女 5 人の上行結腸・S 状結腸・直腸の正常上皮細胞の純化を完了した。平成 25 年度中に、上行結腸・S 状結腸・直腸の老若男女各 4 人（計 12 人）の純化を終了する。

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 (WGBS)の鋳型調製法 Post-Bisulfite Adaptor-Tagging (PBAT)法について、初出英文論文（文献 1.）ならびに実施例となる英文論文（文献 2.・3.）を刊行した。PBAT 法は、他の CREST B チームにも採用されることになった。純化正常肝細胞において、PBAT 法を WGBS の従来法である MethylC-Seq および Infinium 450K array (Illumina)と同時に実施して直接性能比較を行い、PCR 増幅によるバイアスを排除して微量検体に適用可能である PBAT 法の特長に加えて、GC リッチ領域のカバレッジにおける優位性も証明した。この結果を IHEC 年次総会で発表し、IHEC 全体の標準手法とすることを、国際科学

運営委員会 (ISSC) に働きかけた。既に、海外の IHEC チームからプロトコルの照会を受けている。

PBAT 法で調製したライブラリを用いて WGBS を施行し、独自に開発した BMap を核とする WGBS 解析パイプラインを運用した。老若男女 4 人の純化正常肝細胞と、B 型・C 型肝炎ウイルス感染に伴う慢性肝炎ないし肝硬変症 2 人の純化肝細胞、すなわち IHEC データベースに登録する“6 epigenomes”の WGBS を終了した。平成 25 年度には、得られたシーケンス結果を用い、正常肝細胞分化ならびに肝炎ウイルス感染に伴う前がん状態の成立に関わる DNA メチル化プロファイル抽出等の、データマイニングを進める。

3. ヒストン修飾解析 (ChIP-seq) (金井・鈴木・柴田)

IHEC 対応型 CREST 白髭チームとの協議により共通使用を申し合わせた H3K4me3・H3K9me3・H3K27me3・H3K27ac・H3K4me1・H3K36me3 モノクローナル抗体の提供を受け、純化正常肝細胞を用いて ChIP 条件を最適化を行った。免疫沈降後、高発現遺伝子のプロモーター領域・エンハンサー領域・遺伝子体部、低発現遺伝子のプロモーター領域、高度にメチル化されている繰り返し配列等の回収率を定量 PCR で解析し、ChIP 条件を評価した。この結果、1%ホルマリンにより室温 5 分固定後、高周波型超音波ホモジナイザーでクロマチン破碎する手順を確立した。確立した手順により、IHEC データベースに登録する肝の“6 epigenomes”の ChIP-seq を終了した。平成 25 年度には、粘液が付着し、前処置過程にコラゲナーゼ処理による単細胞化を含まない、大腸ならびに胃の上皮細胞独自の ChIP 条件を最適化し、大腸の“12 epigenomes”の ChIP-seq を行う。

4. 非コード RNA (ncRNA) 解析 (柴田)

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。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) を算出する方法を確立した。確立した方法を用いて、IHEC データベースに登録する肝の“6 epigenomes”の ncRNA 解析を終了した。

5. エピゲノム解析技術開発 (伊藤・柴田)

・PBAT 法の改良: 当初からの課題であったペアエンドリードを、カスタムシーケンスプライマーの導入によって安定に実現する方法を見出した。しかし、カスタムシーケンスプライマーによるペアエンド法の鋳型調製収率は、未だシングルエンド法のそれには及ばず、リード長と鋳型断片長との関係もあって、シーケンス出力の倍増には至っていない。そこで、平成 25 年度には、ペアエンド法による出力倍増を目指す。また、GC リッチ領域のカバレッジにおける優位性を保持しながら、AT リッチ領域のカバレッジの改善も目指す。

・5-ヒドロキシメチルシチシン(hmC)解析: タングステン酸による 5-hmC の 5hmU-glycol への変換反応の追試に成功した。タングステン酸による方法においては、変換反応自体よりもその後の 5hmU-glycol を含む DNA 上でのプライマー伸長に問題があることがわかった。そこで、平成 25 年度には、これを乗り越える DNA 合成酵素の探索を行う。新たに報告された過ルテニウム酸カリウムを用いる酸化バイサルファイト(oxBS)-Seq と Tet-assisted バイサルファイト (TAB)-seq の追試に成功した。この際、酸化剤である過ルテニウム酸カリウムの適切な調製法と、酸化剤処理済 DNA のバイサルファイト変換を安定して施行する方法を見いだした。また、TAB-Seq に最も適した酵素の候補を見いだした。平成 25 年度には、純化細胞ゲノム DNA を用いて 5-hmC 解析の実用レベルのプロトコルを開発するとともに、oxBS-Seq・TAB-Seq の WGBS に PBAT を取り入れ他に類をみない高感度解析法の確立を目指す。

・第 3 世代高速シーケンサーのエピゲノム解析への活用: PacBio RS シーケンサーを稼働し、平均 4Kb・最大 16kb 程度のシーケンス解読情報を安定して取得できることを確認した。5-mC・

5-hmC を、各塩基ごとの複製時間の延長を加味して検出するアルゴリズムを導入した。

・1 細胞レベルでのエピゲノム解析: ナノ流路を搭載した BioMark HD system (Fluidigm)を用いた 1 細胞レベルでのエピゲノム解析の予備検討として、がん細胞株で既知遺伝子の発現量を測定した。平成 25 年度には、coding RNA よりも有意に発現量の少ない ncRNA が検出可能か検討する。

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・伊藤)

ソウルで開催された IHEC 年次総会に参加し、我が国における研究の進捗を発表するとともに、各国の進捗ならびに IHEC ISSC 各ワーキンググループの要請を把握した。ISSC 定例電話会議も継続している。情報発信・収集と国際協調に務めるため、CREST/IHEC チームの合同ホームページ開設を準備した。米国 GENBOREE Database との互換性を重視しつつ、独自のデータ投入・解析に柔軟に対応できるデータベースを開発した。本データベースは、IHEC チーム間で統一的なデータ加工を行う必要性と、各研究グループで独自に保有する臨床情報等付帯データの統合的な解析を、可能な限り両立させるように設計した。模擬的なデータを投入し、格納形式・検索の利便性について検証した。平成 25 年度には、データを共有・可視化し個々の研究者の解析に資するため、取得した標準エピゲノムデータ全てをデータベースとブラウザに投入・格納する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Fumihito Miura, Yusuke Enomoto, Ryo Dairiki and Takashi Ito, “Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, No. 17, pp.136e, 2012 (DOI: 10.1093/nar/gks454)
2. Hisato Kobayashi, Takayuki Sakurai, Fumihito Miura, Misaki Imai, Kentaro Mochiduki, Eikichi Yanagisawa, Akihiko Sakashita, Takuya Wakai, Yutaka Suzuki, Takashi Ito, Yasuhisa Matsui and Tomohiro Kono, “High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice”, *Genome Res.*, in press.
3. Kenjiro Shirane, Hidehiro Toh, Hisato Kobayashi, Fumihito Miura, Hatsune Chiba, Takashi Ito, Tomohiro Kono and Hiroyuki Sasaki, “Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases”, *PLoS Genet.*, in press.