

# ケーススタディー： DNA メチル化キャプチャ法による 効率的なエピゲノムマーカー探索手法の確立

## はじめに

今回は、岩手医科大学 医歯薬総合研究所の教授であり、いわて東北メディカル・メガバンク機構 副機構長も兼務されている清水厚志先生にお時間をいただき、アジレントのターゲットエンリッチメントシステムである SureSelect のカスタムデザイン（ゲノムキャプチャのためのターゲット領域を自由に選択することが可能なキット）をエピゲノム解析に用いたご感想をお伺いしました。

## Q. 岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構と 東北大学東北メディカル・メガバンク機構について教えてください。

岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構と東北大学東北メディカル・メガバンク機構は、震災復興支援事業である「東北メディカル・メガバンク（TMM）計画」を共同で実施し、2020 年度末には節目にあたる 10 年を迎えます。TMM 計画は、参加者約 15 万人の方からコホート研究のための調査票に加え健診情報や生体試料を提供いただき、それらの生体情報も併せて保管することでバイオバンクとしての機能も有しており、外部研究機関へ生体試料・生体情報を分譲することを可能としています。

生体情報解析部門はウェットラボとドライラボから構成され、生体試料から DNA や RNA を取り出し、ゲノム・オミックス情報に変換しています。また、提供いただいた生体試料を効率的に情報に変換する技術開発を進めているほか、得られた情報を利用して個別化予防に貢献するための疾患発症リスク予測法の開発も行っています。



清水厚志 先生

岩手医科大学 医歯薬総合研究所  
生体情報解析部門 部門長・教授  
いわて東北メディカル・メガバンク機構  
副機構長

## Q. SureSelect カスタムデザインを用いたご研究の概要について教えてください。

私たちは、これまで、東北メディカル・メガバンク計画におけるコホート参加者の DNA メチル化情報を調べるために NGS を使い、CpG のメチル化率を調べ、疾患との関連の解析をしてきました。

その中で、キャプチャーシーケンシングでのエピゲノム解析を行う前段階として、既に設計されているキャプチャーシーケンシングのシステムが、対象としている多因子疾患の発症リスク評価に有効かどうかを検討しました。

ご存じの通り、採血してそのまま使う全血には、様々な血球成分が入っています。そこで、細胞の種類を減らしてマーカーを見つけやすくすることを考え、単球と CD4 陽性 T リンパ球に着目し、コホート参加者の血液からセルソーターでこれらの細胞を取り出して、解析サンプルとしました。そして、単球と CD4 陽性 T リンパ球の全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを 100 人規模で行った結果、3000 万箇所の CpG のメチル化状態の多様性がわかり、さらに疾患に関連する既知のエピゲノムマーカーも調べ、これらの関連解析を行いました。

遺伝性疾患のゲノム解析の場合は、疾患の患者と健常人を比べるためにレアな多型を集めるため、エキソンに着目した Exome 解析を行うこととなります。一方で、多因子疾患の場合はエキソンの中に機能喪失を起こすような変異が入ることは少ないため、個人間の多様性が大きい SNPs (SNVs) を集めて解析するのが通常の方法です。そこで、我々はエピゲノム解析でも同じことが言えるのではないかと考えて、がんなどの細胞の特性が変わってしまう疾患は制御領域が重要で、多因子疾患は個人間の多様性が大きい領域が重要なのではないかと仮説を立てました。

その上で、100 人規模での全ゲノムバイサルファイトシーケンシング解析を行い、個人によって DNA メチル化率が異なる領域と疾患に関連する既知のエピゲノムマーカーとの関連を調べると、エピゲノムの多様性が大きいところが疾患マーカーとの関連性が強いことが分かりました。

つまり、多因子疾患の解析にはエピゲノムの多様性が大きいところを調べることが重要であることが分かり、キャプチャーシーケンシングで多様性が大きい注目すべきところを集めて解析すればよいということになりました。そこで、末梢血単核球 (PBMC、顆粒球や好中球がなく、単球・T 細胞を含む) を解析対象とするために、最初のデザインとして、単球と CD4 陽性 T リンパ球からメチル化の多様性が大きい領域のターゲットエンリッチメントを行うカスタムパネルを作成して、解析しました。

ただ、大きいコホートや過去のバイオバンクでは、基本的に全血でしか保存されていないため、全血を対象とした解析を検討する必要があります。そこで、次に、全血の大多数を占めている好中球の全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行い、メチル化の多様性が大きい領域を解析しました。

そして、その結果を用い、第二のデザインでは、単球と CD4 陽性 T リンパ球とともに好中球でメチル化の多様性が大きい領域を集めるプローブを加えたカスタムパネルを作成して、全血のエピゲノム関連解析を行いました (図)。

現在では、第三のデザインとして、さらに疾患のエピゲノムマーカーを可能な限り網羅し、また、全血用に設計したパネルでうまくいかなかったところを削ったデザインを作成して、解析しています。

既存のカタログ製品にあるような制御領域に着目したデザインではなく、多因子疾患に着目したデザインであることが私たちのカスタムデザインの特徴です。

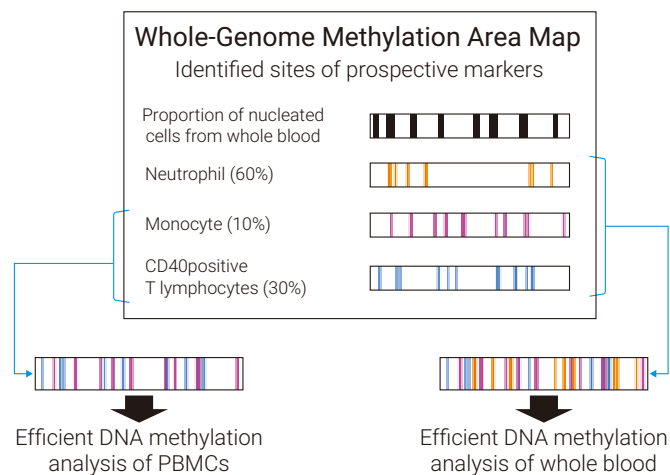


図 1. キャプチャーシーケンシングでの解析対象

## Q. CpG を網羅的に見たい一方で、CpG の見たい箇所を増やすとコストが高くなる点もデザイン作成の際に考慮されたかと思えます。デザインを作成される際に、対象箇所の取捨選択はどのようにされましたか？

網羅的に見ようとするコストが高くなりますが、重要度が低いところを除くことでコストを減らすことができるのが、キャプチャーシーケンスのメリットです。

ゲノムの SNV 解析においては 1 か 0 のデジタルなデータなので、データ量が少なくても解析できます。

しかし、メチル化解析はメチル化の割合に多様性のあるアナログのデータであるため、全ゲノムバイサルファイトシーケンスをするよりも、キャプチャーシーケンスで depth を稼ぐほうが解析を行う上で有利です。そのため、エピゲノム解析ではキャプチャーシーケンスをするメリットがあります。

カスタムデザインの基本的な設計方針としては、それまでに見つかった新しいエピゲノムマーカーは搭載し、一方で、プローブを設計したものの、リードが取れなかったところは除外しました。

Exome 解析の場合はエキソンを網羅するという観点から、リードが取れなかった領域はプローブを増やしていました。しかし、リードを得るためにデータ量が多く必要な領域は、もともとキャプチャーシーケンスに向かない領域です。そのため、このような領域を解析対象に含めるのは、多様性のあるアナログのデータとして解析していくメチル化解析にはコストの観点から適さないと判断し、このような領域は削って、解析の対象にしないことにしました。

## Q. アジレントのカスタムデザインを選んだ理由をお聞かせ頂けますでしょうか？

他社製品に比べて、アジレントはデザインがしやすいことと、アジレントは Exome の経験もあり、アレイの経験もあるので、ユーザーが相談したときにしっかりと応えてくれることがアジレントを選んだ理由です。カスタマーサポートが充実していて、安心して相談できる点がアジレントの強みだとユーザーとして感じています。

## Q. カスタムデザイン以外で、お役に立ったアジレント製品はありますか？

試薬としては、アジレントのカatalog製品である SureSelect XT Human Methyl-seq も使用しています。まだがんなどの疾患と多因子疾患の両方を網羅するセットは設計できていませんので、がんや重篤な疾患を解析する場合は SureSelect XT Human Methyl-seq、多因子疾患・生活習慣病の場合はカスタムデザインと使い分けています。

ハードウェアに関しては、TapeStation（全自動電気泳動装置）を使用しています。また、我々は 1000 人規模での解析を処理することがありますので、ライブラリ調製は Bravo（NGS ライブラリ調製自動化システム）を使って自動化しています。特に Bravo については、アジレントに新しくプログラムを組んで頂き、サポートしてもらえるのがありがたいです。

関連情報はこちら

[http://www.agilent.com/chem/NGS\\_Target\\_Enrichment.jp](http://www.agilent.com/chem/NGS_Target_Enrichment.jp)

## Q. 弊社の対応の満足度などはいかがでしょう？

日本の窓口になっているアジレント社員の方々は、研究者の研究促進をサポートするという姿勢を見せていただき、安心してお願いできます。さらに、困ったときのサポートもよくそこを心配なく、いいのは大きいです。よく新しい何かを会社に依頼するときには、しっかり対応してくれるかが心配なのですが、アジレントにはその心配がありません。

## Q. 今後のご研究の構想を教えてくださいませんか？

研究グループでは前向きコホート研究を進めています。これは、疾患の原因を調べるのではなく、未病の段階で変化を見つけて、予防するという観点での研究になります。我々が注目している多因子疾患に関連するエピゲノムは徐々に変化が起こっていき、それが影響して発症するというものなので、早期にその疾患マーカーの変化を見つけ、生活習慣の改善を行うことができるようになることを目指していきます。

また、東北メディカル・メガバンクでは3世代コホートを進めており、新生児が生まれたときの臍帯血についてエピゲノム解析をすることを考えています。

臍帯血のエピゲノム解析については、DOHaDと呼ばれる、幼少期の生活習慣や妊娠中の母体内での環境が将来の疾患発症に影響を与えるという仮説があり、マウスで研究が進んでいるのとともに、ヒトでも研究が進められています。この観点から、臍帯血のメチル化解析をすることで将来的にどういう病気にかかりやすいかを見つけて、できるだけ早い段階で生活習慣を改善できるような仕組みが出来れば、前向きコホートで研究を進めた意味があるだろうと考えています。

## Q. 多因子疾患に関連するメチル化マーカーを探索したあと、実際に運用していくときのツールは何か検討されていますでしょうか？

少数のCpGを対象にしている場合はパイロシーケンス法を用いたメチル化解析法を選ぶことになるかと思えます。

あるいは、慶應義塾大学医学部病理学教室の金井先生が高速液体クロマトグラフィーの方法でDNAメチル化を計算するシステムを作成されていて、対象のCpGがより少数の場合はこれを使うことも考えられます。

ただ、ゲノム情報での疾患発症リスク解析では、少数の多型が疾患を説明できるわけではなく、多数の弱い影響を持った多型が一つの疾患を形成しています。このまま解析を続けていくと、もしかすると数万～数十万箇所のエピゲノム情報を解析しないと、正しく疾患発症リスク評価ができないかもしれません。

そうすると、キャプチャーシーケンシング法をより安くするか、対象領域を解析できるマイクロアレイを作成する必要があるかもしれません。

## Q. メチル化状態の個人差が大きい部分は、人種間で違いがあるのでしょうか？

現時点では大規模なメチル化解析を経たデータが出ていないため、直接比べていませんが、ゲノム情報のPolygenicモデルの解析では、人種の影響が大きいことが明らかになっています。

そのため、エピゲノムについても人種間でマーカーが異なっていて、今後多数のCpGを解析すると全く違った様式が見られるのではないかと考えます。

## Q. 最後に、アジレントへのご要望があれば教えてください。

アジレントはマイクロアレイ、NGSなど新しい医療・生命科学を探索する上で必要な機器が発明された際に速やかにキットとして製品を開発してきました。これにより、最先端の研究者だけでなく、幅広い研究者が新しい技術を活用できるようになり、研究全体の裾野が広がりました。

今後も新しい装置が発明された場合は、キット化をして、ユーザーが研究を進めるサポートができるように開発してほしいです。

先生方のご研究のお役に立てるように、今後も開発とサポートを行っていきます。本日はありがとうございました。



[ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎0120-477-111

mail : email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2020

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, October 2020

5994-2724JAJP



Trusted Answers