

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701087

 研究課題名（和文） 新規のゲノムワイドな DNA メチル化検出法の医療応用  
 : 脱メチル化薬の効果予測

 研究課題名（英文） Detection method for quantifying global DNA methylation by  
 fluorescence correlation spectroscopy

研究代表者

梅津 知宏 (UMEZU TOMOHIRO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40385547

研究成果の概要（和文）：1分子蛍光分析という新たなアプローチでのゲノムワイドな DNA メチル化度決定法（SMMA: Single Molecule Methylation Assay）を構築し、臨床サンプルを用いて、SMMA によって疾病発症とメチル化の関係、脱メチル化薬の効果予測が可能かを検証し、医療応用を目指した。初年度において、SMMA 法の確立を行い、次年度では、SMMA 法による「脱メチル化薬の効果予測」を試みた。MDS 患者 22 例で検討した結果、末梢血の顆粒球分画が特徴的なゲノムワイドの低メチル化を示し、この変化が 5-azaC 投与により変化し、治療抵抗性との関連が示唆された。このことより、SMMA 法によるゲノムワイドな DNA メチル化度は 5-azaC 治療の分子マーカーとなりうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A method for quantifying global DNA methylation using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) has been established. The single-molecule methylation assay (SMMA) is based on two methodologies. One methodology, FCS, estimates the translational diffusion coefficient of molecules in solution, whereas the other methodology uses the high affinity of methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) to bind specifically to methylated DNA. We studied the specific binding rates of fluorescence-labeled MBD2 and methylated DNA from biological samples using the automated FCS system. Using a standard curve with methylated control DNA, we developed the SMMA index to assess the global DNA methylation level of the biological samples. A marked decrease in the SMMA index was observed when human leukemia cell lines (U937 and K562) were cultured with DNA demethylating agents. Our findings clearly indicate the applicability of SMMA as a simple and rapid tool for quantifying global DNA methylation. SMMA may prove useful for genome-wide comparative methylation analyses of malignancies and as an indicator of the demethylation effects of epigenetic drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：ゲノム・DNA メチル化・脱メチル化薬・1分子蛍光分析法・MBD2

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム DNA のメチル化修飾やヒストン

修飾に代表されるエピジェネティクスは、細胞の発生・分化やプログラミングに大きく

関与し、最近さかんに研究されている分野である。ヒトを含む多くの真核生物においてゲノム DNA のメチル化は、シトシン (C) 塩基の次にグアニン (G) 塩基が続く「CpG 配列」のシトシンに付加される。メチル化をうける CpG 配列は、ゲノム DNA の多くの領域では散在的に存在するが、CpG は配列が高頻度に出現する領域が転写開始点を含む遺伝子のプロモーター領域に存在し、「CpG アイランド」と呼ばれている。ゲノム上に散在する CpG 配列がメチル化されているのに対し、CpG アイランドの多くは非メチル化状態に保たれ、遺伝子発現を制御している。

(2) DNA のメチル化異常は、種々の疾病に関与する事が報告され、がん細胞では「ゲノム DNA 全体の低メチル化」と、「がん抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの高メチル化」が見受けられる。ゲノム全体の低メチル化は染色体を不安定な状態にして発がんに関与し、CpG アイランドの高メチル化はがん抑制遺伝子の転写を阻害して発がんに関与する。従って、一見正常に見える組織に蓄積している DNA メチル化異常は、発がんリスクの診断に有用であることが期待され、DNA メチル化解析の重要性が高まっている。また、臨床応用の場面においては、個々の検体における DNA メチル化度を数値化することが求められている。

(3) 腫瘍化に関与する遺伝子やタンパク質を特異的な標的とした分子標的治療薬が開発され、今後がん治療の中心となると予想されるが、その中でもヒストン脱アセチル化酵素阻害薬や脱メチル化薬などのエピジェネティクスを標的とした分子標的薬が注目されている。現在、DNA 脱メチル化薬は欧米で認可され、本邦でも 5-azacytidine (商品名: Vidaza) や Decitabine などの「エピジェネティクス・分子標的薬」の臨床試験が始まり、造血幹細胞移植が行えない高リスクの骨髄異形成症候群 (MDS) と急性骨髄性白血病 (AML) の治療薬として期待されている。

## 2. 研究の目的

DNA メチル化異常をはじめとするエピジェネティックな変化は、癌や生活習慣病発症の一因として注目されている。本研究課題では、1 分子蛍光分析という新たなアプローチでのゲノムワイドな DNA メチル化度決定法 (SMMA: single molecule methylation assay) を構築し、この SMMA 法によって疾病発症とメチル化の関係、脱メチル化薬の効果予測が可能かを検証し、医療応用を目指す。

(1) 初年度では、1 分子蛍光分析法を用いたゲノムワイドな DNA メチル化度決定法

(SMMA: single molecule methylation assay) を用いて、健常人 (年齢別)、急性白血病 (AML) 患者および骨髄異形性症候群 (MDS) 患者の末梢血から抽出した DNA のメチル化度を SMMA で計測し、加齢・がんと DNA メチル化の関係を検証する。SMMA 法の確立として、バイサルファイトシーケンス、DNA メチル化アレイなど従来の DNA メチル化検出法と比較し、SMMA の有効性を検証する。その後、実サンプル (健康人 (各年齢層)、急性白血病、MDS) を対象に SMMA Index を測定し、医療応用が可能かを検証する。

(2) 次年度は、SMMA Index による脱メチル化薬の効果予測を目指し、がん由来細胞株を脱メチル化薬で暴露した際の SMMA Index の変化を観察する。さらに、MDS 患者における脱メチル化薬投与前後の SMMA Index の変化を測定する。

## 3. 研究の方法

SMMA (single molecule methylation assay) では、TAMRA (蛍光物質) でピンポイント標識した MBD2 (Methyl-CpG binding protein 2) とゲノム DNA の結合を 1 分子蛍光分析システム (MF20) で測定し DNA メチル化度を数値化する (図 1)。

1 分子蛍光分析法の原理は、レーザー光を照射することで得られる小さな領域 (共焦点領

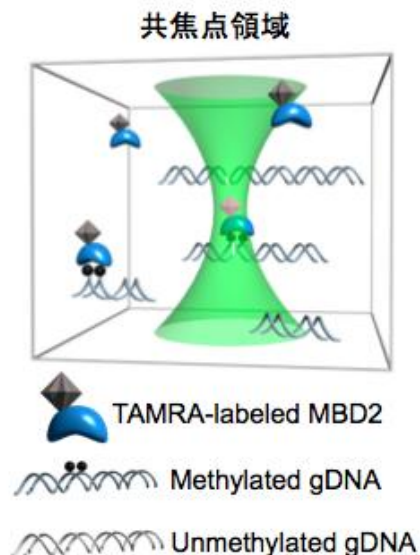


図1 一分子蛍光分析法によるメチル化DNAとMBD2の結合の検出

域) に、蛍光物質が通過することで発生する蛍光シグナルを計測し、その通過時間 (並進拡散時間) を質量として換算する。特長は、固相化せずに溶液中で自由拡散している分子を解析可能なことから、より生体内に近い環境での分子間相互作用を検証することが

できる。本研究課題ではメチル化 DNA 結合タンパクファミリーのひとつである MBD2 (Methyl-CpG binding protein 2) の生体内でのメチル化 DNA との結合能力に注目し、クルードな DNA 抽出液中のメチル化 DNA と蛍光標識した MBD2 との相互作用を利用したメチル化検出法を着想した (図 1)。これは、ただ CpG がメチル化しているかを検出するのではなく、生体内で活性をもつ (MBD2 が結合できる) メチル化部位を検出した上でのメチル化度として検証することができる。

(1) MBD2 は他の MBD に比べてメチル化 DNA 結合能が高く、本研究ではこの点に注目し、クルードな DNA サンプル中からのメチル化 DNA の検出のためのプローブとして MBD2 を採用した。また、全自動ゲノム抽出ロボット (Magratation System 6GC: Precision System Science) を用いてゲノム抽出を行う。抽出した DNA (500ng) を、MseI (NEB) にて酵素処理 (37 度で一晩) し、200~1000bp に断片化する。その後、精製カラムにてタンパク除去後、吸光度測定して濃度と精製度を確認する。断片化 DNA (10ng) と TAMRA 標識 MBD2 (5nM) を混合し、室温で 20 分反応させる。反応液を 384well ガラスボトムプレートにアプライし、MF20 で測定する。測定条件は各サンプルにつきレーザー照射 5 秒で 15 回測定を行う。また、SMMA Index の確立のため、コントロール DNA (ヒト胎盤由来) を Whole Genome Amplification (REPLI-Human Control Kit) することにより 0%メチル化 DNA を、M. SssI (NEB) にて全 CpG をメチル化した 100%メチル化 DNA を作成する。100%メチル化 DNA、50%メチル化 DNA、0%メチル化 DNA と MBD2 を反応させ、MF20 で測定すると、メチル化 DNA の比率が多いほど MBD2 が DNA と結合し、質量が増加するため並進拡散時間 (Diffusion time) も増大する。この時間の違いからメチル化 DNA の比率 (SMMA Index) を算出するフォーミュラの作成が可能となる。初年度は、DNA メチル化解析は、特定の CpG アイランドなどの特定のゲノム領域についての解析と、ゲノム全体のメチル化異常を調べる網羅的な解析に大別される。メチル化の検出原理の違いによって、得られるメチル化パターンのデータの意義が大きく異なってくる。よって、以下の 3 つの異なる検出法と比較する。

①バイサルファイトシーケンス：単一の CpG アイランドにおけるメチル化パターンを検出。

②DNA メチル化アレイ：CpG アイランドにおけるメチル化度を網羅的に解析。

(2) さらに、実サンプルは健常人および急性白血病患者の末梢血を採取し、全血から全

自動ゲノム抽出ロボットを用いて得て、SMMA Index し、以下の項目を検証する。

①健常人 (各年齢層) の加齢と DNA メチル化度の関係 (目標 100 例)。

②急性白血病患者の病型と DNA メチル化度の関係 (目標 100 例)。

③MDS 患者の病型と DNA メチル化度の関係 (目標 100 例)。

(3) 次年度は、脱メチル化薬の作用機序の解明および脱メチル化薬の効果予測を目指し、以下の実験を行う。

①脱メチル化薬 (5-azacytidine、decitabine) を白血病細胞株 (K562、U937) の培養系に添加し SMMA Index を測定するという系において、脱メチル化薬の添加濃度によって、ゲノムワイドなメチル化度は変化するのかを解析する。

②脱メチル化薬はゲノムワイドに脱メチル化を引き起こすのか、それとも特定の高メチル化部位をターゲットにするのか、SMMA Index の測定および DNA メチル化アレイを用いて解析する。

③5-azacytidine、decitabine は 5~7 日間投薬、3 週間休薬というスケジュールで数クールにわたって治療が行われる。したがって、治療前、治療後 (投与後 5~7 日目)、休薬中という 3 ポイントで繰り返し SMMA Index を測定する。投薬前後および休薬中における脱メチル化薬に感受性の高い患者と低い患者の SMMA Index の変化から、薬剤感受性を示すパターンを見だし、投薬早期に脱メチル化薬の効果予測を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 初年度は、研究計画に従い「SMMA を医療応用するための検証」を目的とし、SMMA 法の確立と、脱メチル化薬を処理した株細胞を材料として従来の DNA メチル化検出法と SMMA 法の比較を行った。

①人工的に作成した 0%メチル化 DNA と 100%メチル化 DNA によって検量線を作成し、一分子蛍光分析によるメチル化 DNA と MBD2 の結合度 (並進拡散時間: Diffusion time) を DNA メチル化度 (SMMA index) として換算する事に成功した。

②DNA のメチル化解析は、「特定の CpG アイランドなどの特定のゲノム領域についての解析」と、「ゲノム全体のメチル化度を調べる網羅的な解析」に大別されるが、SMMA 法で得られた結果は、特定の CpG アイランドなどの特定のゲノム領域についての解析であるバイサルファイトシーケンスよりも、ゲノム全体の網羅的な解析である DNA メチル化アレイと類似したパターンを示した (図 2)。

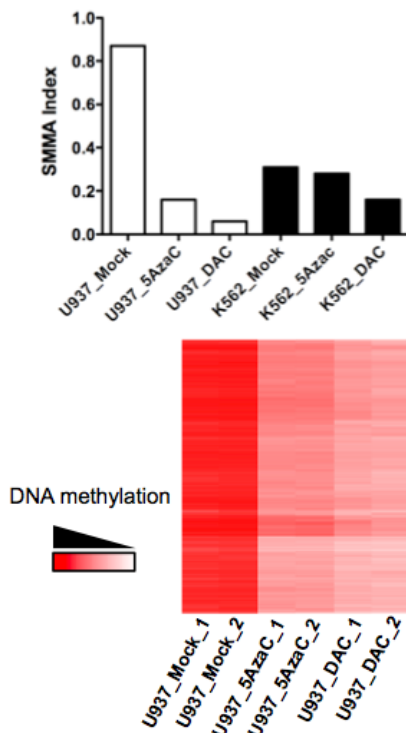


図2 SMMA法(上部)とDNAメチル化アレイ(ヒートマップ・下部)の比較

以上の研究成果は Analytical Biochemistry 2011 (415(2):145-150)に publish された。  
 ③研究計画に従い「実サンプル (ヒト試料) を用いた SMMA Index 解析」を目的とし、健康人および急性白血病患者、骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の末梢血を採取し、SMMA Index を測定した。健康人 (各年齢層別) における加齢と DNA メチル化度の関係を解析した結果、大きな相関は見られなかった。一方で、健康人 (30例) と急性白血病患者 (30例) における DNA メチル化度の比較では、急性白血病患者において顕著な SMMA Index の低下が見られた。

(2) 近年、骨髄異形成症候群 (MDS) において脱メチル化薬の臨床応用が進んでいるが、その分子機構については不明の点が多い。また、現時点では有効例の予測、治療抵抗性の予測に有用な分子マーカーはない。そこで次年度では、「脱メチル化薬の効果予測と臨床応用」を目指して、脱メチル化薬 (5-AzaC、商品名: VIDAZA) 投与前後における MDS 患者の DNA メチル化度を解析した。

①MDS 患者由来の末梢血 (全血)、顆粒球分画、単核球分画から抽出した DNA におけるメチル化度は、健康人と比較して有意に低下していた。特に顆粒球分画での低メチル化が見られた。

②MDS 患者の末梢血では、病系に関わらず健康人と比較してゲノム全体が低メチル化で

あったものの、治療前のメチル化度は症例により様々であり、SMMA index から脱メチル化薬の有効性の予測をする事は困難であった。

③治療前、治療後 (投与後 5-7 日目)、休薬中という 3 ポイントで継時的に SMMA Index を測定した結果、脱メチル化薬に感受性の高い患者と低い患者との比較では SMMA index の変化のパターンが異なることが明らかとなった。

A タイプ: 5-AzaC 投与開始後に DNA メチル化度の低下および次の投与時には DNA メチル化度が回復している。

B タイプ: 5-AzaC 投与開始後に DNA メチル化度の低下するが、その後 DNA メチル化度が回復しない。

C タイプ: 5AzaC 投与しても DNA メチル化度の変化が乏しくなる。

以上の SMMA index の変化と血液学的初見とを合わせて解析した結果、SMMA index の変化のパターンと治療抵抗性との関係が示唆された。

現在、これらの結果は投稿論文として準備中である。

医療応用を目指すには、非侵襲性、簡便、低コストな手法とする必要があるが、本研究の結果から、全血と顆粒球分画の結果がほぼ相関することより、実用化に際しては全血で簡便に測定可能であると思われる。

現在、DNA 脱メチル化薬は欧米で認可され、本邦でも 5-azacytidine (商品名: Vidaza) や Decitabine などの「エピジェネティクス分子標的薬」の臨床試験が始まっている。興味深いことに、血液難病である骨髄不全症候群では著効例が散見され、他に治療薬のない本疾患では画期的な治療薬として期待されている。すなわち、医療分野ではメチル化研究は単に病態解明のみならず、治療に直結しているといえる。しかしながら、ゲノム全体のメチル化プロファイリングを行っても、これらの脱メチル化薬の標的遺伝子は報告例により様々であり、その分子機構は不明な点が多い。

このようなメチル化研究の大きなジレンマは、複数の生体高分子の相互作用によって起こる生命現象を分子として捉えられない点に起因している。本研究の特色は、固相化せずに溶液中で自由に拡散しているメチル化 DNA 結合タンパクとメチル化 DNA という 2 つの生体分子の相互作用を 1 分子に近いレベルで計測を行う点であり、従来の網羅的メチル化プロファイリング手法とは異なるアプローチである。すなわち、1 分子での測定により、メチル化 DNA の動態を判定することで、メチル化診断 (加齢・疾病との関係)、脱メ

チル化薬の作用機序の解明と効果予測などの医療応用が実現すると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Ohyashiki JH, Yoneta M, Hisatomi H, Iwabuchi T, Umezu T, Ohyashiki K. The C allele of JAK2 rs4495487 is an additional candidate locus that contributes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. BMC Med Genet. 2012 13:6. doi:10.1186/1471-2350-13-6. 査読有

(2) Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Detection method for quantifying global DNA methylation by fluorescence correlation spectroscopy. Anal Biochem. 2011 415(2):145-50. doi: 10.1016/j.ab.2011.04.035. 査読有

(3) Ohyashiki K, Umezu T, Yoshizawa S, Ito Y, Ohyashiki M, Kawashima H, Tanaka M, Kuroda M, Ohyashiki JH. Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. PLoS One. 2011 6(2):e16408. doi: 10.1371/journal.pone.0016408. 査読有

(4) Kitahara T, Umezu T, Ando K, Kodama A, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Non-random chromosomal deletion clustering at 20q in Waldenström macroglobulinemia. Hematology. 2011 16(3):139-42. doi: 10.1179/102453311X12953015767338. 査読有

[学会発表] (計6件)

①浅野倫代、小林千晶、廣田綾子、梅津知宏、大屋敷一馬、大屋敷純子：骨髓異形成症候群におけるメチル化度測定による治療効果予測。第170回東京医科大学医学会総会(2012年11月17日、東京)

②浅野倫代、大屋敷純子、梅津知宏、藤本博昭、後藤守孝、赤羽大悟、北原俊彦、吉澤成一郎、大屋敷一馬：Epigenetic aberration in leukocytes of patients with myelodysplastic syndrome. 第74回日本血液学会学術集会(2012年10月19-21日、京都)

③浅野倫代、大屋敷純子、梅津知宏、大槻和重、大屋敷一馬：骨髓異形成症候群(MDS)のDNAメチル化度の評価；Single Molecular Methylation Assay (SMMA)法の有用性。第6回日本エピジェネティクス研究会年会(2012年5月14-15日、東京)

④大屋敷純子、梅津知宏、大屋敷倫代、小林千晶、大屋敷一馬：1分子蛍光分析法によるDNAメチル化度の定量法の開発。日本人類遺伝学会第56回大会。(2011/11/12、幕張)

⑤大屋敷倫代、梅津知宏、吉澤成一郎、大屋敷純子、大屋敷一馬：非ホジキンリンパ腫の血清miR-92aレベルは免疫状態と関係し、再発予測因子となる。リンパ網内系学会(福岡, 2011/7/1-2)

⑥Ohayashiki K, Umezu T, Ohayashiki JH: A Novel Global DNA Methylation Detection by Fluorescence Spectroscopy, and Possible Evaluation System of Demethylating Status for Myelodysplastic Patients. 11th MDS symposium (Edinburgh, 2011, 5/18-21)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：1分子蛍光分析法によるDNAメチル化度の決定方法

発明者：大屋敷純子・梅津知宏

権利者：大屋敷一馬

種類：特許

番号：特願2010-167412号

出願年月日：22年7月26日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 知宏 (UMEZU TOMOHIRO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40385547