

DNAメチル化異常を伴う疾患の鑑別診断チップの開発 —プラダーウィリー / アンジェルマン症候群鑑別チップ—

鴻海俊太郎*¹・永田伊智郎*²・山根衣寿美*²・井上頼江*²・大場光芳*³・山野博文*⁴

Development of Differential Diagnostic Chip for Diseases Accompanying DNA Methylation Abnormality
- Prader-Willi / Angelman Syndrome Discrimination chip -

Shuntaro KOHNO, Ichiro NAGATA, Izumi YAMANE, Yorie INOUE, Mitsuyoshi OHBA, Hirofumi YAMANO

Synopsis : In-vitro diagnosis of genetic abnormalities using DNA chips is now becoming universal, and even the ones, which can evaluate some kinds of disease risks have been developed recently.

DNA primarily encodes a protein, and it is the substantial body of the gene. In addition, the role of DNA is not only a simple information accumulator but also has the function of regulating the transcription to RNA itself. The most prominent one is a promoter and numerous research studies related to it have been promoted.

DNA methylation in the promoter region is one of a crucial regulatory mechanisms in gene expression. It is said that various diseases such as cancer, depression and diabetes might be caused by methylation abnormality in the sequence.

In this paper, we report a new development of DNA chip related to diagnoses with Prader-Willi syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS), both of which are typically congenital genetic disorders with methylation abnormalities.

Keywords : Prader-Willi syndrome ; Angelman syndrome ; SNRPN ; CpG island ; bisulfite treatment

1. 緒言

DNAチップを用いた遺伝子異常の体外診断は、今や普遍的なものになりつつあり、疾病リスクを評価するようになるまで登場している。まさに黎明期と言って良いであろう。そして、DNAチップは既に次の段階へと進み始めている。

DNAは、主としてタンパク質をコードしており、遺伝子の実質的な本体である。しかし、DNAの役割は単純な情報の蓄積体であるだけではなく、それ自身にRNAへの転写を調節する機能も有している。その最も著名なものが、プロモーターであろう。プロモーターにおける発現調節機構の一つとして近年注目度が高まっているものに、DNAのメチル化修飾が挙げられる。具体的には、DNA中のシトシン (C) 残基が受けるメチル化修飾が発現調節に関わっ

ており、特に、プロモーター領域で多く見られる、5'-CG-3'の順となる配列中のシトシン残基メチル化が重要とされている(この5'-CG-3'配列が多発する領域はCpGアイランドと呼ばれている)。メチル化修飾を受けた配列は、発現・転写が抑制される。このような制御機構は、個々の細胞にとって必要な時期に必要なタンパク質を発現させ、不要の時には発現を抑制させる役割を担っていると推定されている。つまり、このDNAメチル化程度が異常をきたすと、コードするタンパク質の需要と供給のバランスが乱される結果となる。このことから容易に想像がつくように、メチル化程度の異常は、疾患の原因となり得る。近年では、メチル化異常とがん、うつ病、糖尿病など、様々な疾患との関連が取り沙汰されている。

本稿に記すプラダーウィリー症候群 (Prader-Willi syndrome, PWS) とアンジェルマン症候群 (Angelman syndrome, AS) は、メチル化異常を伴う代表的な先天性

*1 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ 医療検査チーム 主事

*2 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ 医療検査チーム

*3 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ 医療検査チーム チームリーダー

*4 技術研究所 研究部 研究部長 兼 ライフサイエンス技術グループ グループリーダー

遺伝子疾患である。これらの疾患に関連するSNRPN (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N) 遺伝子は、インプリンティング (刷り込み) 遺伝子に分類される。SNRPNのCpGアイランドには、以下のような特徴がある。健康人では、この領域のDNAメチル化率が50%である。PWS患者の99%以上において、そのメチル化率は100%である^{1,2)}。一方、AS患者の7割程度は、同上領域のメチル化率が0%である^{1,3)}。このような特性を生かして、我々は、CpGアイランドのメチル化率が0, 50, 100%のいずれであるかを検査することにより、PWS/AS罹患の鑑別診断ができるキットの開発を企図した。本報では、① バイサルファイト処理後の塩基配列から検査内容に適したプライマーを設計し、② そのプライマーを材料に、まずは、検査対象となる遺伝子配列だけを含むプラスミド検体を用いてプローブの選定を行った。そして、③ 選定したプローブを用いてゲノムDNAサンプルを試験して、設計したプライマーおよび選定したプローブの妥当性を評価した。

2. 実験方法

2.1 DNAチップ

DNAチップの作製方法は前報に記されたとおりとした⁴⁾。

2.2 DNAサンプル

検査対象となるSNRPNのCpGアイランドのバイサルファイト処理後配列 (メチル化体、非メチル化体とも) を人工的に作製し、プラスミド内に挿入したものをファスマック社より購入した。これらメチル化体配列プラスミドおよび非メチル化体プラスミドを混合して、人為的にメチル化率が0, 50および100%のサンプルを調製した。これらをプラスミド検体と呼び、以降の実験に用いた。

ゲノム DNA (gDNA) サンプルは、いずれもClontech社より販売されているものを購入した。その内訳を以下に記す。健康人サンプル (メチル化率50%) は、ヒト白血球gDNAを用いた。メチル化率0%を模した遺伝子操作細胞株由来DNAとして、EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA (以下、DKO) を使用した。高メチル化率 (100%想定) のサンプルはEpiScope® Methylated HCT116 gDNA (以下、Me) を用いた。

2.3 gDNA検体のバイサルファイト処理

EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN社製) を用いて、gDNAサンプルをバイサルファイト処理した。処理条件

は、同キットの添付文書に従い、95°C for 5 min, 65°C for 85 min, 95°C for 5 min, 65°C for 175 min とした。処理後サンプル中のDNA濃度をNanodrop 2000 (ThermoFisher社製) で測定し、次節のPCRの際の鋳型量計算に用いた。

2.4 PCR (polymerase chain reaction)

PCRには、BIOTaq™ HS DNA Polymerase (BIOLINE社製) を用いた。プライマーは、SNRPNのバイサルファイト処理後配列から設計した (詳細は3.1節に記す)。そのプライマー配列をTable 1に示す。Reverse側については、蛍光色素IC5により標識されたプライマー (ThermoFisher社製) を用いた (その配列は、Table 1では逆相補鎖表記としている)。鋳型量は25 ngとした。サーマルサイクラーは、Applied Biosystems社製のveritiを用いた。PCR条件は、以下のとおりである。Initial step: 95°C for 10 min, Reaction: 40 cycles of (95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec), Final step: 72°C for 7 min.

2.5 ハイブリダイズ反応、蛍光強度測定

チップ上には、目的とするSNRPN遺伝子のCpGアイランドをバイサルファイト処理した際に生じる配列 (CpGメチル化体および非メチル化体それぞれに対応するもの) に相補的な配列が固定化されている。したがって、増幅産物中のメチル化体あるいは非メチル化体の含有量・含有率に応じて、それぞれに対応するスポット上に固定化された相補鎖プローブと水素結合し、2本鎖を形成する (ハイブリダイズ反応)。これ以降の手順は、当社においてこれまで開発されてきたDNAチップと同様である。すなわち、チップ上のスポットに結合したPCR産物に由来する蛍光強度を測定することにより、サンプルDNA当該領域のメチル化率を計算することができる原理である (詳細後述)。

上記で得られたPCR産物に、最終濃度で0.75×SSC (saline sodium citrate buffer, 11.3 NaCl, 1.13 sodium citrate, 単位:mM) および0.075% SDS (sodium dodecyl sulfate) となるようにそれぞれの試薬を添加して、ハイブリダイズ反応液を作製した。この液中にDNAチップニードルを浸漬して (55°C, 1 hr), インキュベートした。インキュベート終了後、チップを0.1% SDS含有0.5×SSC中で振盪して洗浄した。さらに1.0×SSCで洗浄後、同液に浸漬した状態で蛍光強度を測定した。

蛍光強度測定には、遺伝子解析装置 (BIOSHOT HT-32

Table 1 Primer sequences.

Primer	Sequence (5' → 3')
Forward primer	GGAGGGAGTTGGGATTTTGTAT
Reverse primer	IC5-TTCAATACTCCAATCCTAAAACTTAAAATA

東洋鋼鈹(株)製⁵⁾を用いた。測定結果から、露光時間4 secの励起光で惹起される蛍光強度を自動計算し(推定蛍光強度法)、メチル化率を示す判定値の算出に用いた。

2.6 データ解析および判定値算出

上述の方法により測定された蛍光強度から、下記の数式によりメチル化率を示す判定値(index)を算出した。

$$\text{判定値 (index)} = \frac{\text{メチル化体プローブの蛍光強度}}{\text{メチル化体プローブの蛍光強度} + \text{非メチル化体プローブの蛍光強度}} \times 100$$

3. 結果および考察

3.1 プライマーおよびプローブの設計

ゲノムDNA中のある領域のメチル化程度を知りたいときに、バイサルファイト処理後PCRは、これまでも有用なツールであり続けてきた。しかし、この手法を用いてDNAのシトシンメチル化率を調べたい時、CpGがプライマー配列中には全く含まれていないことが必要である。なぜならば、バイサルファイト処理により、メチル化されていないシトシンは最終的にチミンに変換されるが、メチル化されているとこの変換が起きないからである。つまり、この化学処理により、CpGの部分で2種類の配列が生成されることを意味する。そうすると、設計したプライマーは理論上、処理により変換された配列か、変換されていない配列のいずれか一方しか増幅できないことになる。

SNRPNのCpGアイランド元来の配列と、そのバイサルファイト処理後の配列をFig.1に示す。ただし、CpGsはすべてメチル化された状態で、バイサルファイトによる変換を受けないものと仮定して配列を示した(Fig.1 (b))。Fig.1 (b)の配列からメチル化体、非メチル化体の区別なくPCR増幅が可能なプライマーを考案した。すなわち、

forward, reverseともCpGを含まない配列となるように検索した。その結果、Fig. 1 (b)において灰色網掛け部分をプライマー配列として選択した(配列は前掲のTable 1を参照)。なお、reverseプライマーは、実際にはFig. 1 (b)に記された配列の逆相補鎖を用いるので、Table 1では逆相補鎖表記としている。

このプライマーセットにより、Fig.1に示した24カ所のCpGのうち、最大で22カ所のCpGのメチル化程度を調べることができる。そこで、次にCpGメチル化体あるいは非メチル化体を検出するプローブを考案した。図示されているように、CpGアイランド(CG配列が頻出する領域)では、複数のCGが近接あるいは隣接している。したがって、検出用のプローブを単一CGのメチル化の有無を調べるように設計するのは難しい。そこで、本チップ用のプローブは複数CpGが含まれるものを設計した。

本チップでは、Genusらの同領域のCpGにおける研究報告⁶⁾を参照して、Fig.1 (b)に示されるPCR産物配列(灰色網掛け部分間の配列)を7つの領域に分割した(Fig.2)。それぞれの領域についてメチル化体プローブおよび非メチル化体プローブを3~6種類ずつ設計した。

3.2 プラスミド検体PCR産物を用いたハイブリダイゼーションによるプローブの選定

プラスミド検体を鋳型として、2.4節に記したものと同一の方法でPCRを行った。PCR産物を2.5節と同じ方法にてチップ上でハイブリダイズし、洗浄後、蛍光強度を測定した。

任意のメチル化および非メチル化プローブの組み合わせからメチル化率を示す判定値を算出し、2.2節に記したサンプル本来のメチル化率と相関性が最も高く、かつ、値のバラつき(3σより判断)が小さいものを選定した。Table 2に、サンプルの実際のメチル化率と特に近かった



Fig.1 DNA sequences of SNRPN CpG island (a) before bisulfite treatment and (b) after bisulfite treatment. 24 CpGs are highlighted in blue. The primer set, prepared for this study, shown in gray.

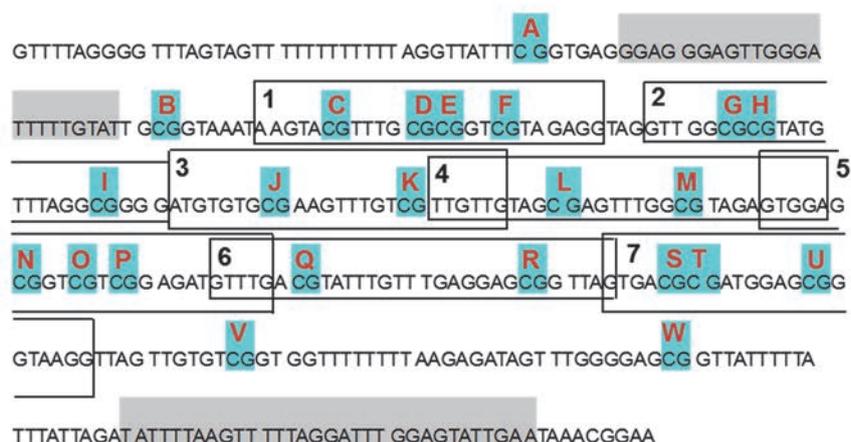


Fig.2 23 CpGs and 7 regions for candidate of hybridization probes. 23 CpGs (A-W)6 are highlighted in blue. The primer set, prepared for this study, shown in gray. 7 regions for probe design are indicated by the frames with numbers.

Table 2 The list of methylation rate calculated from each combination of un-methylated and methylated probes.

(a)

UN-ME	0%		50%		100%	
	Mean	3 σ	Mean	3 σ	Mean	3 σ
1-M1	N.D.		83.4	1.3	97.1	0.5
1-M2	N.D.		85.1	1.1	97.4	0.5
1-M3	N.D.		89.5	1.0	98.1	0.3
2-M1	5.1	1.8	68.1	2.0	96.7	0.6
2-M2	4.9	1.7	70.9	1.7	97.0	0.7
2-M3	5.1	1.5	78.4	1.2	97.9	0.4
3-M1	2.2	0.8	47.2	2.1	94.4	1.0
3-M2	2.1	0.7	50.5	1.7	95.0	1.0
3-M3	2.2	0.6	60.4	1.7	96.3	0.5
4-M1	2.9	0.9	55.3	1.9	94.6	1.6
4-M2	2.7	0.8	58.6	1.7	95.2	1.5
4-M3	2.9	0.7	67.8	1.7	96.4	1.0
5-M1	1.3	0.4	33.7	1.9	82.0	1.8
5-M2	1.2	0.4	36.7	1.7	83.6	2.5
5-M3	1.3	0.4	46.4	1.4	87.5	1.0

(b)

UN-ME	0%		50%		100%	
	Mean	3 σ	Mean	3 σ	Mean	3 σ
1-M2	1.8	0.2	55.0	2.5	93.8	1.3
1-M3	2.8	0.5	61.8	2.4	94.9	1.0
1-M6	4.8	0.7	70.5	2.2	96.4	0.7
2-M2	1.4	0.2	47.4	2.9	93.2	1.2
2-M3	2.2	0.4	54.3	2.5	94.4	0.9
2-M6	3.8	0.6	63.7	2.4	96.1	0.7
3-M2	1.1	0.2	41.4	2.3	88.1	1.4
3-M3	1.8	0.3	48.3	2.0	90.1	1.2
3-M6	3.1	0.5	58.0	1.9	93.0	0.9
4-M2	2.2	0.6	60.6	2.5	94.0	0.7
4-M3	3.4	0.7	67.1	2.4	95.0	0.7
4-M6	5.8	1.3	75.1	2.1	96.5	0.5
5-M2	3.7	0.7	72.6	2.0	95.5	1.7
5-M3	5.7	0.9	77.8	2.0	96.3	1.4
5-M6	9.6	1.2	83.8	1.5	97.4	1.0

UN-ME: un-methylated and methylated probe No., respectively. (a) The values obtained from the 5th region in Fig. 2. (b) The values calculated from the 7th region. In each tables, the combination of probes, which shows the most equivalent values in calculation to nominal methylation rates of the prepared samples, is shown in bold style.

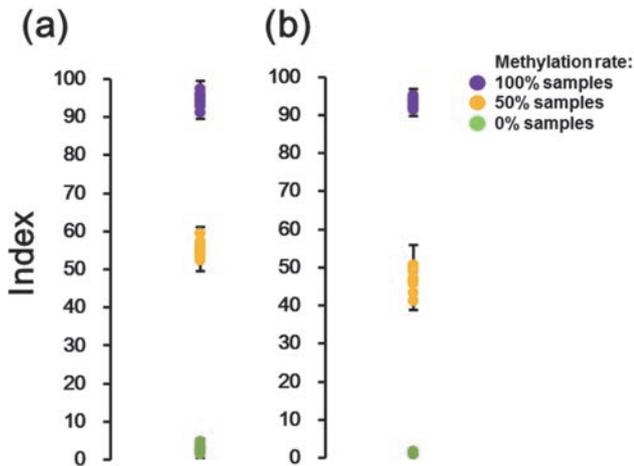


Fig.3 The examination of plasmid samples on DNA chips. The data obtained from 5th (un-methylated and methylated probes: 4-M1, a) and 7th (un-methylated and methylated probes: 2-M2, b) region in Fig. 2. Bars represent mean values $\pm 3\sigma$.

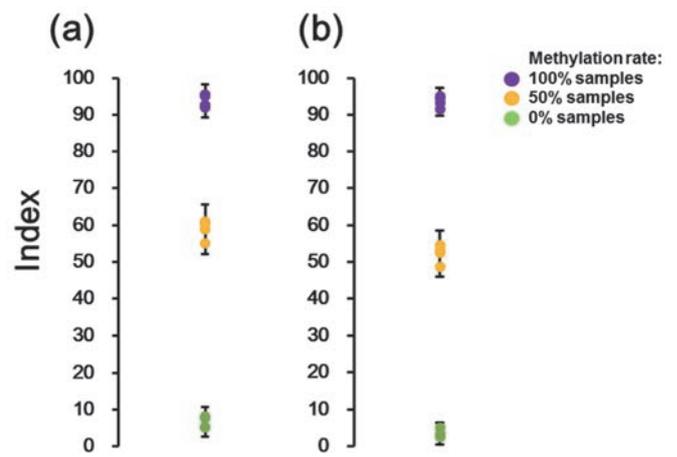


Fig.4 The examination of gDNA samples on DNA chips. The data obtained from 5th (un-methylated and methylated probes: 4-M1, a) and 7th (un-methylated and methylated probes: 2-M2, b) region in Fig. 2. Bars represent mean values $\pm 3\sigma$.

5 および 7 番目の領域 (Fig. 2) のプローブ群から得られた判定値の一覧を示す。Table 2 において、UN-MEは非メチル化-メチル化プローブ番号を表しており、5番目の領域では、4-M1の組み合わせ (Fig.3 (a), Table 2), 7番目の領域では、2-M2の組み合わせが理論値に近く、かつ、判定値の分離の良いものであった (Fig.3 (b), Table 2)。上記の5 番目および 7 番目の領域では、プローブに CpG がともに 3 か所比較的密集して含まれており、そのことが他の領域 (1 番目の領域を除けば、CpG が 2, 3 か所しかなく、かつ、それらの CpG 間隔が疎である) と比較して検査性能が高かった原因であると推察される。

3.3 gDNA検体を用いたプローブおよび閾値の検証

次に、遺伝子DNA低メチル化細胞株DKO (メチル化率0%と想定される)、正常ヒト白血球遺伝子DNA (メチル化率50%)、高メチル化処理DNAサンプルMe (想定メチル化率100%) の3種類のサンプルを用いて、3.2節と同様の実験を行い、メチル化程度を評価した。これらサンプルのチップでの評価により得られた判定値 (Fig. 4, 前節で選定した5番目の領域の4-M1プローブ、および7番目の領域の2-M2プローブの組み合わせより算出) は、前出のプラスミド検体を用いた際の判定と同等と見なせるものであった。

前節3.2にて検討したプラスミド検体の結果と同様に、5番目の領域の4-M1プローブでは、0%と50%サンプルの間の判定値の差に比して、50%と100%サンプル間の判定値差が小さく、より接近した値を取った。一方、7番目の領域の2-M2プローブは、0, 50, 100%サンプルを検査した際の判定値の間隔がより均等に近く、より理想的であると判断できる。

4. 結言

本研究により、SNRPN遺伝子CpGアイランドのメチル化率が0, 50, 100%のいずれであるかを判別できるプローブ群が選定された。これらを用いたgDNAサンプルの評価結果から、本チップは、現在PWSおよびAS患者の診断に用いられているメチル化解析と同等の鑑別能を有している可能性が示唆された。以上の検討結果から、本チップは、実際の患者サンプルの鑑別診断に適用可能な段階に達したと判断できる。

引用文献

- 1) K. Kosaki, M.J. McGinniss, A.N. Veraksa, W.J. McGinniss and K.L. Jones : *Am. J. Med. Genet.*, **73** (1997), 308.
- 2) D.J. Driscoll, J.L. Miller, S. Schwartz and S.B. Cassidy : *GeneReviews*[®] [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1330/>
- 3) A. Dagli, J. Mueller and C.A. Williams : *GeneReviews*[®] [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1144/>
- 4) 中村憲章, 平山幸一, 山野博文: *東洋鋼鈑*, **39** (2017), 33.
- 5) 森弘惇一, 津田稔也, 山野博文: *東洋鋼鈑*, **40** (2019), 35.
- 6) E. Genus, M.D. Rycke, A.V. Steirteghem and I. Liebaers : *Hum. Mol. Genet.*, **12** (2003), 2873.