

# 研究報告書

一般課題：A

(平成27年度)

平成29年4月28日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 独立行政法人国立病院機構東京医療センター

住所 東京都目黒区東が丘2丁目5番1号

研究者氏名 山澤 一樹



(研究課題)

遺伝性乳がん・卵巣がんにおいてメチル化・ヒドロキシメチル化が果たす役割の解明

---

平成28年2月1日付助成金交付のあった標記一般課題：Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

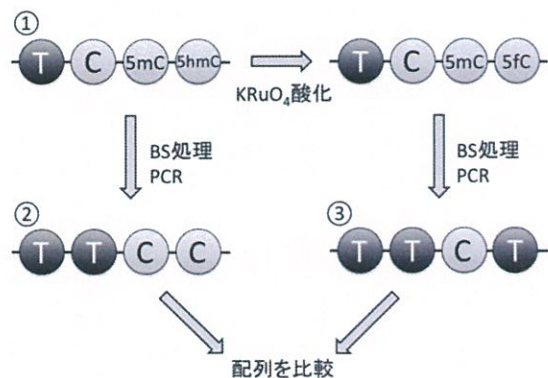
## 背景と目的

2009年、5-メチル化シトシン (5-methyl C: 5mC) の酸化反応により得られる 5-ヒドロキシメチル化シトシン (5-hydroxymethyl C: 5hmC) がマウス神経細胞や ES 細胞のゲノム DNA に存在することが報告された (Kriaucionis et al. *Science* 2009, Tahiliani et al. *Science* 2009)。その後、ヒドロキシル化酵素 TET1-3 による脱メチル化カスケードの存在が示され、5hmC は 5mC→C という DNA 脱メチル化反応の途中で合成される中間代謝産物であることが判明した (Guo et al. *Cell* 2011)。以来、5hmC は「第 6 の塩基」として大きな注目を集めているが、がんと 5hmC の関連は依然として不明である。本研究は特に遺伝性腫瘍において、5mC および 5hmC が病態にどのように関与しているかを解明することが目的である。特に 5hmC が脱メチル化機構の中間代謝産物であることに着目し、遺伝性腫瘍において脱メチル化を促すことによるエピゲノム治療法を開発することを目指す。

## 方法

従来のバイサルファイト (BS) 法では、5hmC と 5mC とを識別することは不可能であったが、酸化バイサルファイト (oxBS) 法を代替法として導入することにより、一塩基レベルの解像度でより詳細かつ正確な解析が可能となった。すなわち BS 法では、C が T に変換される一方で、5mC および 5hmC は変換されず C と判定される。oxBS 法では、まず過ルテニウム酸カリウム (KRuO<sub>4</sub>) を用いた酸化反応によって 5hmC のみが 5-formylcytosine (5fC) に変換される。引き続いてのバイサルファイト処理により、C と 5fC が T に変換される一方で、5mC は変換されず C と判定される。従って、①元の配列、②バイサルファイト処理、③KRuO<sub>4</sub> 酸化+バイサルファイト処理の三者の配列を比較することにより、一塩基の解像度で C、5mC、5hmC の同定が可能である (図 1)。具体的には BS による定量値 (メチル化比率) は 5mC と 5hmC の合計であり、一方で oxBS によるそれは 5mC のみを含むため、BS から oxBS を差し引きすることで 5hmC の定量値が得られる。

(図 1)



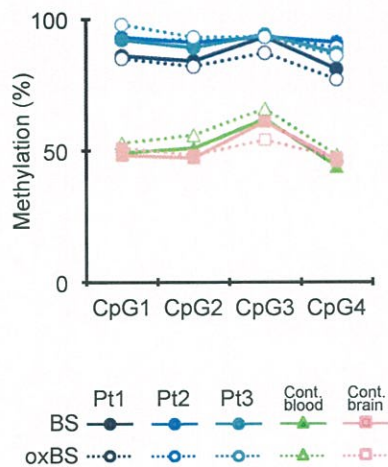
元の配列	①未処理	②BS	③oxBS
C	C	T	T
5mC	C	C	C
5hmC	C	C	T

まず、遺伝性腫瘍の解析に先行して pilot study として、メチル化異常に起因し肝芽腫などの腫瘍を好発する先天異常症候群の解析を行った。まず、oxBS 処理サンプルを用いて、メチル化異常が確認されているゲノム領域においてパイロシーケンス法を行い、通常の BS 法によるメチル化比率から差し引くことで 5hmC を定量した (oxBS-pyro)。次に、oxBS 処理サンプルを DNA メチル化解析ビーズアレイ (Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip) で解析し、ゲノムワイドな 5hmC の分布を検討した (oxBS-array)。

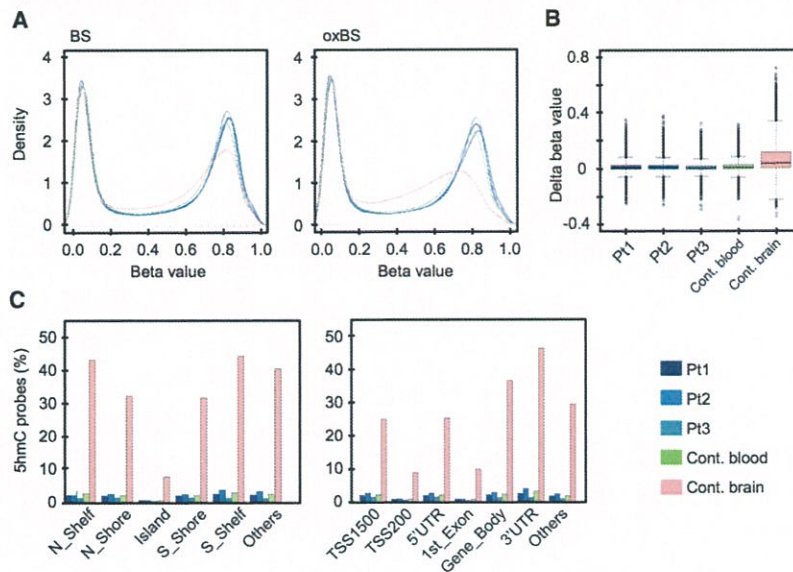
## 結果

患者末梢血 DNA においては、正常コントロールと同様に 5hmC の含有量が非常に少なく、特徴的な分布パターンは認められなかった。一方で正常脳 DNA には多量の 5hmC が含まれており、これは既報と一致した (図 2、3)。

(図2) 患者末梢血 (Pt1-3) および正常コントロールの末梢血、脳を用いた oxBS-pyro 解析



(図3) 患者末梢血 (Pt1-3) および正常コントロールの末梢血、脳を用いた oxBS-array 解析



血液中には 5hmC は含有量が少なく、5hmC が果たす役割は不明であったが、一方で脳組織には 5hmC が多く含まれていることが確認された。また 5hmC の解析にあたり、oxBS-pyro 法、oxBS-array 法が有用であることが実証された。

現在、この手法を用いて遺伝性腫瘍患者の末梢血及びがん病変部の検体の解析を施行中である。末梢血で 5hmC 含有量が少ないこと、個体差やデータの再現性、コストの問題など解決すべき課題があるものの、本研究によって遺伝性腫瘍における methylome/hydroxymethylome を明らかとし、エピゲノム治療法を開発する端緒としたい。