

# がん検出に おける メチル化 シーケンス

カスタム出版元

**TheScientist**  
EXPLORING LIFE, INSPIRING INNOVATION

## 3ページ

がんにおける  
エピジェネティック・  
ランドスケープの変化

## 4ページ

メチル化シーケンス:  
変換とキャプチャ

## 6ページ

メチル化シーケンス  
ワークフローの理解  
(説明図)

## 7ページ

メチル化シーケンスの  
臨床応用

協力

T W I S T  
BIOSCIENCE

# 果敢な戦いには 優れたツールを

がんの個人的治療に向けた革新的なソリューションを積極的に追求するなら、以下を可能にするTwistにお任せください。

- ✚ がん遺伝子の効率的な解明
- 🌀 がんのエピジェネティックな特徴の高分解能マッピング
- ≡ 費用対効果の高い変異体とがん遺伝子の検証
- 🔬 生物製剤治療の迅速なイノベーションおよび開発

詳しくは、[twistbioscience.com/stronger-together](https://twistbioscience.com/stronger-together) をご覧ください。

T W I S T  
BIOSCIENCE

# がんにおける エピジェネティック・ ランドスケープの変化

**D**NAメチル化パターンの変化は、がんにおいて最も早くかつ広範囲にみられるゲノム変化の1つです。<sup>1</sup>各タイプのがんに、メチロームと呼ばれる独自の特徴的なメチル化のパターンがあり、これを使用してがんの種類や疾患進行の程度を特定することができます。<sup>2</sup>メチル化シーケンスの技術的進歩により、いまや関心領域のメチル化を迅速に調査することが可能になり、メチル化パターンはがんスクリーニングのための優れたバイオマーカーとなる可能性を秘めています。

## 低メチル化・高メチル化によって起こること

DNAメチル化の状態から、疾患の病理が明らかになる可能性があります。例えば、DNAの広範な低メチル化は転写活性と関連しています。腫瘍において、低メチル化は反復配列を抑制し、有害な有糸分裂組換えの可能性を増大させることでゲノムの安定性を損なわせます。<sup>1, 2</sup>がん原性における低メチル化の影響を示す特に興味深い例が、ウイルスゲノムの再活性化です。細胞はメチル化を介して組み込まれたヒトパピローマウイルスゲノムからの発現を抑制し、ウイルスゲノムの潜伏状態を持続します。がんにおいて生じる脱メチル化の過程により、HPVゲノムの抑制が解除されて再発現が誘発され、子宮頸癌が進行する可能性があります。<sup>2</sup>

がんにはDNAの高メチル化もみられ、<sup>3</sup>通常はCpGアイランドという、シトシン-グアニン対が高頻度に出現する500~1000塩基対の長さを持つDNA領域にみられます。CpGアイランドは主にヒト遺伝子の最初のエクソンとプロモーター領域に出現し、正常な体細胞では比較的、非メチル化され転写活性を示し

「メチル化シーケンスの技術的進歩により、いまや関心領域のメチル化を迅速に調査することが可能になり、メチル化パターンはがんスクリーニングのための優れたバイオマーカーとなる可能性を秘めています。」

ます。<sup>2</sup>ところが、がんにおいては、主要なプロモーター領域の高メチル化によって、腫瘍抑制やDNA修復に関与する遺伝子を含む様々な遺伝子が抑制（サイレンシング）され、腫瘍形成が促進されます。この現象は、ごくわずかな遺伝子変異を伴う網膜芽細胞腫という小児がんが最初に観察されました。<sup>4</sup>網膜芽細胞腫の患者において、網膜芽細胞腫抑制遺伝子(*RBI*)プロモーターの異常な高メチル化が認められています。<sup>5</sup>乳癌および卵巣癌では、DNA二重鎖切断修復に重要な遺伝子である*BRCA1*の高メチル化と抑制が起こります。<sup>3</sup>

## miRNAへの注目

microRNA (miRNA) におけるがん関連性DNAメチル化変化の重要性にも、多くの注目が集まっています。18~25

ヌクレオチドのこれらのノンコーディングRNAは、mRNA分子をサイレンシングまたは分解することによって遺伝子翻訳を阻害します。<sup>2, 6</sup>がんにおいてはmiRNAの発現によって広範囲な異常調節が起こり、腫瘍の大半で全体的な下方制御が観察されます。<sup>7</sup>一部の症例では、腫瘍抑制に重要な役割を果たす遺伝子を含む

CpGの高メチル化が起こります。結腸癌におけるmiR-124aというmiRNAの高メチル化によって、がん抑制因子である網膜芽細胞腫(RB)タンパク質をリン酸化し不活化するがん遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ6(*CDK6*)の抑制が解除されます。<sup>2</sup>このタイプのmiRNAサイレンシングの例は膀胱癌にも認められ、膀胱癌では、miRNA-127の高メチル化により発がん因子であるB細胞性リンパ腫6(*BCL-6*)の異常調節が起こります。<sup>2</sup>

研究者たちは、がんにおける動的なDNAメチル化の重要性を理解し始めたばかりです。医師や科学者が個々の患者のエピジェネティック修飾を迅速かつ正確に評価できる次世代技術のおかげで、早期診断、新規治療および個別化治療が前進する可能性があります。

# メチル化 シーケンス： 変換とキャプチャ

**D**NAメチル化の変化は、がん発生の早い時期に起こります。これらのメチル化パターンの変化は循環血中の遊離DNAに現れ、診断や疾患モニタリングのための潜在的なバイオマーカーとして注目されています。<sup>1,2</sup> リキッドバイオブシーにより、研究者や臨床医は血液またはその他の体液を採取することで、腫瘍からの細胞または核酸を分析することができます。この非侵襲的アプローチにより、メチル化パターンの変化が明らかになるばかりでなく、同じ患者で繰り返し実施することが可能となり、異質な腫瘍のわずかな領域から生検を採取することによって生じるバイアスを回避することができます。<sup>1</sup> しかしながら、一般的な血漿検体中の遊離DNAの量は少ないため、これらの検体の正確な分析には技術的な課題があります。

「新しい酵素変換技術により、従来のバイサルファイトシーケンスに関連する多くの技術的問題が解決できます。」

## 酵素変換の利点

研究者は一般的に、バイサルファイトシーケンスを用いてDNAメチル化検出を行います。DNAが亜硫酸水素ナトリウムに曝されると、非メチル化シトシンが化学的にウラシルに変換される一方で、メチル化シトシンはこの化学修飾から保護されます。変換後、研究者はPCRを用いてサンプルを増幅し、次世代シーケンス技術を用いて増幅産物をシーケンシングします。この方法には、1塩基分解能や比較的シンプルなライブラリ調製方法など、多くの利点があります。<sup>3</sup> それでもなお、バイサルファイト処理には高温と高pHが必要で、そのために鎖切断や脱ピリミジン反応が起こり、DNAを損傷する可能性があります。<sup>3</sup> この反応系において非メチル化シトシンは特に分解されやすく、GCリッチ領域でのカバレッジ低下を招きます。CpGアイランドのメチル化ががん研究者にとって特に関心の高い分野であることを考慮すると、これは問題です。<sup>2</sup>

新しい酵素変換技術により、従来のバイサルファイトシーケンスに関連する多くの技術的問題が解決できます。これらの技術は、バイサルファイト変換の手順を、非メチル化シトシンを修飾する酵素に置き換えるものです。酵素変換の一例では、まずTET酵素がメチル化シトシン（5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシン）を酸化させると、次の段階でこれらは脱アミノ化から保護され、このとき保護されない非メチル化シトシンがAPOBEC酵素によってウラシルに変換されます。<sup>4</sup> この2段階のプロセスによって、品質が向上し、より正確な読取りが可能になります。<sup>5</sup> 酵素変換は、反応に高温

や高pHを必要としないため、バイサルファイトシーケンスよりもDNA損傷が少なくて済みます。サイクル数の少ない増幅ステップでより高いライブラリ収量につながる利点があります。増幅中のPCRサイクル数を少なくすると、ライブラリの複雑性が高まり、シーケンシング中の重複が少なくなります。<sup>5</sup> 酵素変換に切り替えるもう1つの重要な利点は、ゲノムカバレッジの均一性です。バイサルファイト変換にみられるGCリッチ領域の分解の問題が解消され、すべてのDNA領域が均一にカバーされるだけでなく、メチル化シトシンが最大15%多く検出されます。<sup>6</sup>

## ターゲットキャプチャでより正確に

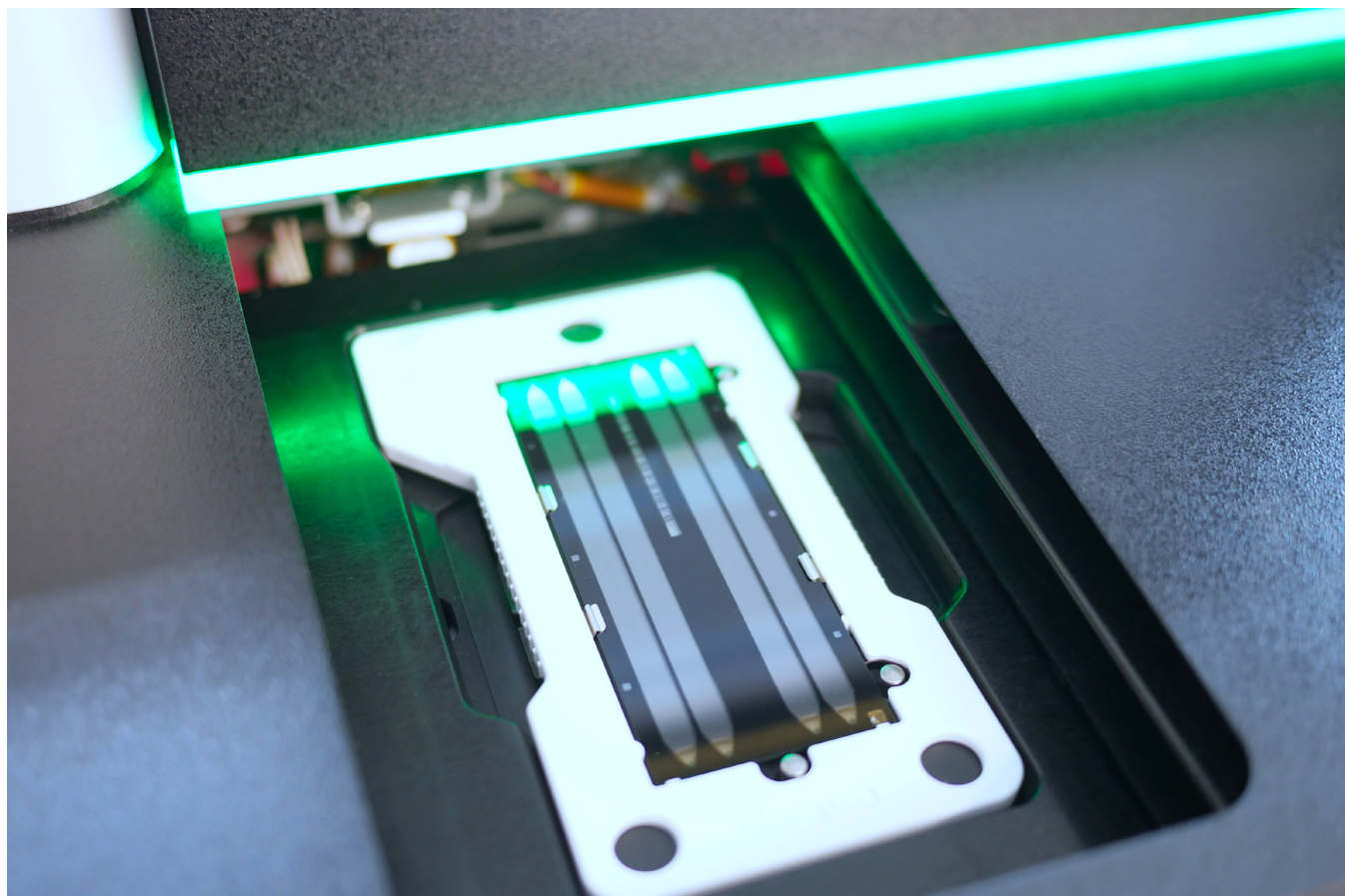
科学者は、全ゲノムのメチル化シーケンスを用いて全ゲノムのメチル化パターンを評価する場合がありますが、ターゲットエンリッチメントを実施することで、時間と費用を節約できます。この戦略により、標的配列とハイブリダイズしてこれを単離するプローブを使用し、プロセス中の不要な配列を除去することで、関心領域に対するシーケンシングの深度を高めることができます。<sup>7</sup> 研究者はプローブパネルを用いて、がん遺伝子などの関連する一連の配列用にサンプルを濃縮できます。メチル化シーケンスのワークフローでは、サンプルDNAが豊富にある場合、変換前にターゲットエンリッチメントを行うことができます。あるいは、低インプットの高感度アッセイでは、変換後のPCRステップにより目的の配列の収量が増大するため、変換後のターゲットエンリッチメントが推奨されます。しかし、変換中に生成される固有のDNA配列を考慮する必要のあるため、

「カスタムターゲットキャプチャライブラリキットは、配列を均一にキャプチャする均一性の高いパネルが作成できる最新のオリゴ合成技術を使用して構築されています。これらの改善により、稀な変異体に対する無駄な読取りが少なくなり、読取り深度が向上します。」

変換後にターゲットエンリッチメントを実施する場合は、パネル設計に新たな課題が生じます。非メチル化シトシンは、変換および PCR 増幅後にチミンとして配列決定されるため、変換された一部の DNA 配列の複雑性が下がって捕捉することが難しくなり、オフターゲット率が高くなります。幸い、新たに市販されているカスタムメチル化パネルは、変換後の標的部位でメチル化、非メチル化、センス、アンチセンスの 4 種類すべての DNA をキャプチャできる革新的なデザインにより、感度が向上しています。ついに、研究者は高度に最適化された市販のメチル化シーケンスワークフローを使用することで、オフターゲットキャプチャを低減し、検査室

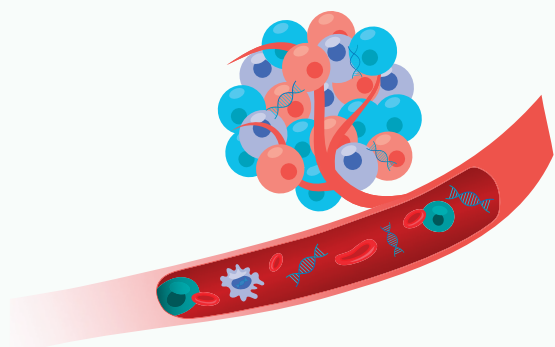
での時間を節約することができるようになったのです。これらのワークフロー内のカスタムターゲットキャプチャパネルは、配列を均一にキャプチャする均一性の高いパネルが作成できる最新のオリゴ合成技術を使用して構築されています。これらの改善により、稀な変異体に対する無駄な読取りが少なくなり、読取り深度が向上します。

以上をまとめると、これらの新しい技術により、科学者は複数の患者サンプルで微量の遊離 DNA からでも特異的なメチロームを迅速かつ正確に評価することが可能となり、がん研究者にとっては一歩前進です。



# メチル化シーケンスワークフローの理解

メチル化は最も研究されているエピジェネティック修飾の1つです。DNAメチルトランスフェラーゼは、シトシン-ホスホグアニン (CpG) ジヌクレオチドのシトシン残基にメチル基を付加することで、転写を抑制したりゲノム不安定性を促進したりします。



## ● サンプル調製

DNAの単離と精製

## ● ライブラリ調製

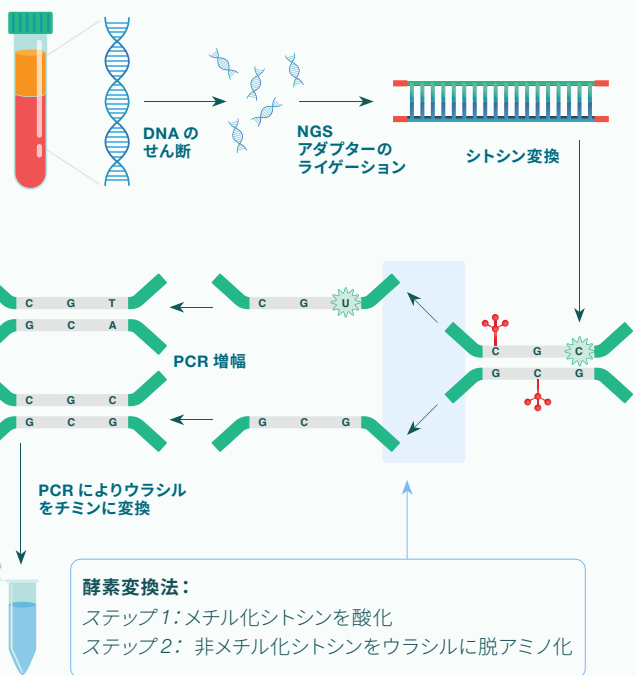
変換、ターゲットキャプチャ、DNA増幅の実施

### がん検出のためのメチル化シーケンス

異常なDNAメチル化はがん進行のごく早期に起こるため、メチル化シーケンスは早期のがんスクリーニングのための有望な診断バイオマーカーとなります。

腫瘍細胞はDNA断片を血流中に放出します。科学者は患者からリキッドバイオプシー検体を採取して血中循環腫瘍DNA (ctDNA) を解析し、メチル化シーケンスによって異常なメチル化パターンを調べます。

科学者は、がんスクリーニングに ctDNA のメチル化シーケンスを用いることで、がん患者の予後を理解し、様々な種類のがんに共通するメチル化の特徴を発見して、より良い治療計画を提供することができます。



### ライブラリ調製: 変換

### バイサルファイト変換と酵素変換

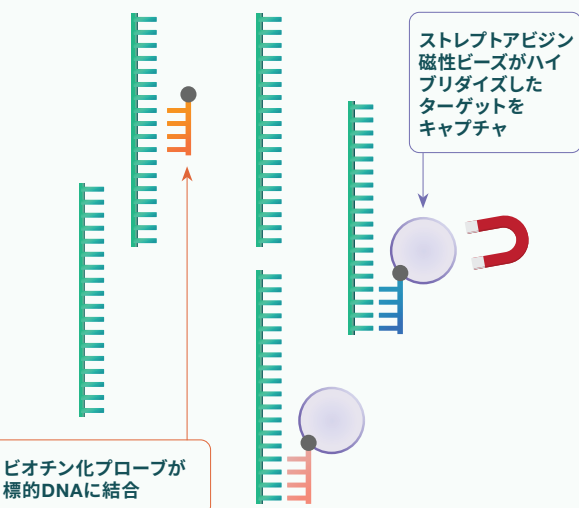
- ・どちらも非メチル化シトシンをウラシルに変換します。
- ・バイサルファイト処理によりDNA、特に非メチル化シトシンが分解され、低濃度サンプルのシーケンシング感度が低下します。
- ・酵素変換はDNAを損傷せず、バイサルファイト変換よりも多くの CpG 配列を検出します。

### ライブラリ調製: ターゲットの取得

## ● シーケンシング/解析

参照配列とデータを整理させ、メチル化を特定

- ・研究者は、変換前または変換後にターゲットキャプチャを実施して、目的の配列を濃縮します。
- ・カスタムプローブパネルが、メチル化、非メチル化、センス、アンチセンス鎖をキャプチャします。
- ・特殊なブロッキング試薬により、メチル化DNAの検出が増強され、オフターゲットキャプチャが低減します。



# メチル化シーケンスの臨床応用

**が**んを検出および診断するための新たな手法は、臨床ですぐにも必要です。がん診断のための従来の方法の多くは、生検や画像検査に依存しており、検体採取のバイアスを受けやすかったり、解像度が限定的であったり、患者を電離放射線に曝露させてがん幹細胞集団を濃縮させる可能性があったりします。<sup>1,2</sup> さらに、患者にとって迅速な検出は必要不可欠です。転移前の早期に治療を開始することで、生存の機会や治療成功の可能性が高まります。<sup>3</sup>

がんのタイプそれぞれに、再現性のあるメチル化の特徴があります。これらのエピジェネティック修飾は多くの症例で腫瘍のステージおよびタイプと相関しており、早期の検出・診断、非侵襲的スクリーニング、および疾患モニタリングのための理想的なバイオマーカーとなります。<sup>2</sup> 例えば、いくつかの既知のがん関連遺伝子の高メチル化は、前立腺癌において悪性腫瘍と良性組織とを確実に高い感度で特異的に鑑別することができます。<sup>4</sup>

## メチル化シーケンスの役割

マイクロアレイおよび PCR 法によるメチル化バイオマーカー同定は、臨床において有用である一方、メチル化シーケンスによりメチロームのカバレッジが向上し、がんにおける全般的なメチル化パターンの変化を研究者がより深く理解して、新しいバイオマーカーを発見することが可能になります。<sup>5</sup> 破壊された腫瘍細胞から放出された DNA 断片である血中循環腫瘍 DNA (ctDNA) を含有する液体検体の

リキッドバイオプシーでメチル化シーケンスを実施することは、臨床においてメチル化パターンを検出する非侵襲的な選択肢となります。<sup>6</sup>

メチル化シーケンスは特に小児がんに有用となる可能性があります。というのも、小児がんでは遺伝子変異の割合は低いことが多いですが、DNA メチル化に顕著な変化が認められるためです。<sup>7,8</sup> 最近の文献では、脳脊髄液中の ctDNA のエピジェネティック変化を分析することにより、髄芽腫の発症を検出し、がんのサブタイプを同定したことが報告されています。これにより、治療反応および疾患再発のモニタリングにこの技術を用いる可能性が示唆されました。<sup>7</sup>

## プレジジョン・メディシン (精密医療) の可能性

可能性はがんの早期検出にとどまりません。エピジェネティック検査は、プレジジョン・メディシンに非常に有望です。がんは、個々の腫瘍のレベルでさえ不均一で、空間的にも経時的にも変化する可能性があります。残念ながら、手術や化学療法、放射線療法を含む標準的ながん治療の大半は、この不均一性を考慮するものではありません。患者特異的メチロームのスクリーニングはがんのサブタイプを理解および分類する上で重要な役割を担っており、治療に対する患者の反応を予測するのに有用であることがすでに証明されています。<sup>9</sup> *BRCA1* 変異を有する乳癌患者はプラチナ製剤ベースの化学療法に対する感受性が高く、一方で、*GSTP1* メチル化を有する患者はドキシルピシン治療が奏功する傾向があります。<sup>9,10</sup> 神経膠芽細胞腫

では、*O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA* メチルトランスフェラーゼ (*MWT*) プロモーターの高メチル化を有する患者は、抗腫瘍アルキル化剤に対する反応が良好です。<sup>11</sup>

## がん治療の未来

それぞれのがんが独特に持つエピジェネティックなマーカーを研究することにより、研究者はがんの発症、進行、治療感受性に関する有力な情報を得られるだけでなく、がんのメチロームを標的とする医薬品を開発できる可能性があります。これらの治療法はエピドラッグと呼ばれ、そのいくつかはすでに使用されています。腫瘍抑制遺伝子の高メチル化を逆転させることでその再活性化を誘発する複数の DNA メチル化阻害剤が FDA により承認されています。<sup>2</sup> これらの薬剤は、新たな免疫療法と併用することで 2 倍の有効性が証明される可能性があります。がん細胞は、細胞表面分子の発現をエピジェネティックにサイレンシングして免疫標的に対する抵抗性を弱めることで、免疫系を逃れます。腫瘍関連抗原の抑制をエピドラッグにより解除することで、がん細胞および腫瘍が免疫系によって除去されやすくなる可能性があります。実際、様々な種類のがんに対するエピドラッグと免疫療法の併用が現在、臨床試験段階にあります。<sup>2</sup>

酵素を用いたメチル化シーケンスなどの新しいメチル化解析技術により、科学者ががんの各サブタイプやステージでのエピジェネティック修飾をより深く理解できることで、患者は早期診断、個別化治療および最新のエピジェネティック療法の恩恵を受けられるようになります。

## 参考文献

### 1 | がんにおけるエピジェネティック・ランドスケープの変化

#### 参考文献

- 1) W.J. Locke et al., "DNA methylation cancer biomarkers: translation to the clinic," *Front Genet*, 10:1-22, 2019.
- 2) M. Kulis, M. Esteller, "DNA methylation and cancer," *Adv Genet*, 70:27-56, 2010.
- 3) K. Skvortsova et al., "The DNA methylation landscape in cancer," *Essays Biochem*, 63:797-811, 2019.
- 4) A.P. Feinberg et al., "Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression," *Nat Rev Genet*, 17:284-99, 2016.
- 5) V. Greger et al., "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma," *Hum Genet*, 83:155-58, 1989.
- 6) C. Moutinho, M. Esteller, "MicroRNAs and epigenetics," *Adv Cancer Res*, 135:189-200, 2017.
- 7) B.T. Joyce et al., "MiRNA-processing gene methylation and cancer risk," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 27(5): 550-57, 2018.

### 2 | メチル化シーケンス：変換とキャプチャ

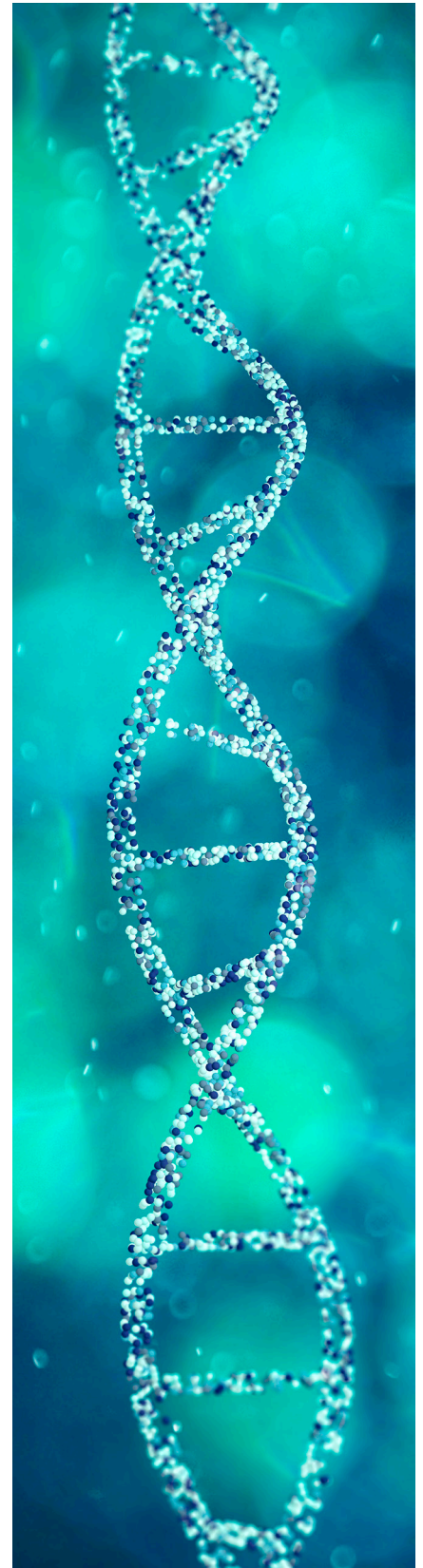
#### 参考文献

- 1) H. Luo et al., "Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA," *Trends Mol Med*, 27(5):482-500, 2021.
- 2) W.J. Locke et al., "DNA methylation cancer biomarkers: translation to the clinic," *Front in Genet*, 10:1-22, 2019.
- 3) Y. Li, T.O. Tollefsbol, "DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis," *Methods Mol Biol*, 791, 11-21, 2011.
- 4) E.K. Schutsky et al., "APOBEC3A efficiently deaminates methylated, but not TET-oxidized, cytosine bases in DNA," *Nucleic Acids Res*, 45:7655-65, 2017.
- 5) A. Hoppers, et al., "Enzymatic methyl-seq: next generation methylomes," *J Biomol Tech*, 31, S15, 2020.
- 6) L. Williams et al., "Enzymatic methyl-seq: the next generation of methylome analysis," *New England Biolabs*, 2019.
- 7) I. Kozarewa et al., "Overview of target enrichment strategies," *Curr Protoc Mol Biol*, 112:7.21.1-7.21.23, 2015.

### 3 | メチル化シーケンスの臨床応用

#### 参考文献

- 1) J.C.M. Wan et al., "Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumor DNA," *Nat Rev Cancer*, 17:223-38, 2017.
- 2) A. Roberti et al., "Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine," *Clin Epigenetics*, 81(11), 2019.
- 3) "Why is early diagnosis important?," Cancer Research UK, January 11, 2021, <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important>.
- 4) S. Yegnasubramanian et al., "Hypermethylation of CpG Islands in primary and metastatic human prostate cancer," *Cancer Res*, 64:1975-86, 2004.
- 5) C. Shu et al., "Comparison of methylation capture sequencing and Infinium MethylationEPIC array in peripheral blood mononuclear cells," *Epigenetics Chromatin*, 13, 51, 2020.
- 6) M. Berdasco, M. Esteller, "Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation," *Nat Rev Genet*, 20:109-27, 2019.
- 7) J. Li et al., "Reliable tumor detection by whole-genome methylation sequencing of cell-free DNA in cerebrospinal fluid of pediatric medulloblastoma," *Sci Adv*, 6(42):eabb5427, 2020.
- 8) A.P. Feinberg et al., "Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression," *Nat Rev Genet*, 17:284-99, 2016.
- 9) O.A. Stefansson et al., "BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer," *Epigenetics*, 7(11):1225-29, 2012.
- 10) E. Dejeux et al., "DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response," *Mol Cancer*, 9:68, 2010.
- 11) M. Esteller et al., "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents," *NEJM*, 343(19):1350-54, 2000.



# メチル化 解析を 次の レベルへ

新しいTwist NGSメチル化検出システムにより、DNA  
損傷をもたらすバイサルファイト変換を回避する  
ことで、メチル化シトシンを最大15%多く検出。

このエンドツーエンドのサンプル調製法は、優れた  
ターゲットエンリッチメントと新しい酵素変換法を  
組み合わせて、新たな知見の解明に役立ちます。

NGSメチル化検出のための高感度で効率的かつ  
完全なソリューションを体験してください。

詳しくは、[twistbioscience.com/epigenetics](https://twistbioscience.com/epigenetics)をご覧ください。

T W I S T  
BIOSCIENCE