

博士論文

**5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis as an
Epigenetic and Epitranscriptomic Regulator**

(5-ハイドロキシメチルシトシンはエピジェネティック及びエピトランスクリプトミック
制御を介して膠芽腫形成に必須な役割を果たす)

平成 24 年度博士課程進学
農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
高井 弘基

指導教員 秋山 徹

概要

膠芽腫 (glioblastoma) は、WHO grade IV に分類される最も悪性度の高い脳腫瘍である。頭蓋内部に発生する腫瘍のうち、約 10% を占め、悪性脳腫瘍の中では最も頻度が高い。周辺組織への高い浸潤能や顕著な血管新生能を有しており、生命活動を律する脳という臓器の特殊性からも外科手術による全摘出は困難である。診断は主に MRI を用いて行われ、腫瘍の周辺が白く造影されるほか、腫瘍内部に壊死層を認めることが多い。高い浸潤能により、造影される腫瘍の周辺にまで細胞は浸潤しており、外科的な全摘出を困難なものとしている。原発性脳腫瘍全体の統計的な 5 年生存率が約 76% であるのに対し、膠芽腫は 10% 未満であり^{1,2}、平均的な予後は 1.5 年程度にとどまることから、膠芽腫に対する新たな治療法の開発が希求されている。

がん組織を構成する細胞集団は均一でなく、一部の細胞群が高い造腫瘍能をもつことがわかっている。これらの細胞は高い薬剤排出能力や DNA 修復能力を有しているとともに、自己複製能や多分化能などの幹細胞様の性質を持つことから、がん幹細胞 (cancer stem cells) と呼ばれる。膠芽腫においても、膠芽腫がん幹細胞が分離・同定されており³⁻⁸、当研究室においてはヒト膠芽腫の多数の検体から膠芽腫がん幹細胞の分離・培養を試み、複数の無血清培養細胞の樹立に成功している⁹。

5-hydroxymethylcytosine (5hmC) は、5-methylcytosine (5mC) が Ten-Eleven Translocation (TET) family によって酸化されることにより生じる DNA 塩基である。5hmC はシトシンの脱メチル化プロセスにおける中間体とされるほか、特異的な結合タンパク質を介して転写制御にも関与すると考えられている¹⁰⁻¹⁴。

本研究では、東京大学医学部附属病院の脳神経外科より膠芽腫検体の提供を受け、無血清培養により、がん幹細胞を維持した状態で培養した。次に、それらの膠芽腫細胞を解析することで、膠芽腫において TET1 が高発現しており、ゲノム中の全シトシンの約 1% に相当する多量の 5hmC が存在することを見出した。RNAi による抑制実験の結果、TET1 の酵素活性は膠芽腫の生育や、幹細胞性・造腫瘍性の維持に必須であることが明らかとなった。膠芽腫細胞と正常な神経幹細胞のゲノムにおける 5hmC のマッピング比較解析の結果、膠芽腫細胞においては、*EGFR*, *AKT3*, *CCND2*, *CDK6*, *BRAF* など、“glioblastoma core pathway” と呼ばれる、膠芽腫において高頻度に活性化しているシグナル伝達経路¹⁵ や、造腫瘍性の維持に寄与する因子群の遺伝子座に 5hmC が多く存在することが明らかとなった。

TET1 が造腫瘍性を維持する分子メカニズムを明らかとするため、質量分析計を用いたアプローチによって、新規 5hmC 結合タンパク質 chromatin target of PRMT1 (CHTOP) を同定した。加えて、CHTOP が methylosome と呼ばれるタンパク質メチル化複合体と相互作用しており、5hmC の存在する遺伝子座へと methylosome を誘導し、周辺のヒス

トンをメチル化することで、造腫瘍性の維持に寄与する因子群の転写を促進することを明らかとした。

この部分に記述されていた内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

これらの結果から、TET1あるいはmethylosomeは膠芽腫に対する分子標的薬の有望な標的となると考えられる。また、TET1のノックアウトマウスが正常に生育することから、TET1に対する分子標的薬は副作用の少ない抗がん剤となることが期待される。

この部分に記述されていた内容は、医薬品に関する特許申請に関わるため公表できない。5年以内に特許取得予定。

目次

| | |
|---|----|
| 概要 | 1 |
| 目次 | 3 |
| 略語 | 5 |
| 1. 序論 | 8 |
| 1-1 <u>膠芽腫</u> | |
| 1-2 <u>がん幹細胞</u> | |
| 1-3 <u>膠芽腫がん幹細胞</u> | |
| 1-4 <u>ハイドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)</u> | |
| 1-5 <u>5hmC とゲノムの積極的脱メチル化</u> | |
| 1-6 <u>転写制御因子としての 5hmC</u> | |
| 1-7 <u>TET ファミリーとがん</u> | |
| 1-8 <u>本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。</u> | |
| 1-9 <u>本研究の位置づけ</u> | |
| 2. 結果 | 13 |
| 2-1 膠芽腫における 5hmC の増加とその機能 | 13 |
| 2-1.1 <u>膠芽腫細胞の分類</u> | |
| 2-1.2 <u>膠芽腫ゲノム中の 5hmC 量の増加</u> | |
| 2-1.3 <u>TET1 の酵素活性は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である</u> | |
| 2-1.4 <u>5hmC は膠芽腫の発生に重要な遺伝子群の遺伝子座に存在する</u> | |
| 2-1.5 <u>CHTOP は 5hmC を認識し、結合する</u> | |
| 2-1.6 <u>CHTOP は methylosome と共に 5hmC と結合する</u> | |
| 2-1.7 <u>CHTOP-methylosome 複合体は 5hmC と結合し、H4R3 のジメチル化を介し、がん遺伝子の転写を活性化する</u> | |
| 2-1.8 <u>CHTOP は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である</u> | |

2-1.9 CHTOPは5hmC量の維持に必須である

2-2

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

2-3

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

3. 考察 19

3-1 膠芽腫の由来と5hmC量の上昇の関係性

3-2 ゲノムの高ハイドロキシメチル化の直接的要因

3-3 一般的ながんにおいては5hmC量は低下している

3-4 IDH familyの変異とDNAメチル化

3-5 ~ 3-12 本項に記述されている内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

3-13 TET1のターゲティングによる膠芽腫治療

3-14 本研究から示唆されるTET1以外の標的

4. 材料と方法 23

5. 引用文献 30

図と表 41

謝辞 71

略語

| | |
|----------------|---|
| (h)MeDIP | (hydroxy)methylated DNA immunoprecipitation |
| 2-HG | 2-hydroxyglutarate |
| 2-OG | 2-oxoglutarate |
| 5caC | 5-carboxymethylcytosine |
| 5fC | 5-formylcytosine |
| 5hmC | 5-hydroxymethylcytosine |
| 5hmU | 5-hydroxymethyluracil |
| 5mC | 5-methylcytosine |
| ACSL | acyl-CoA synthetase long-chain |
| AKT | v-akt murine thymoma viral oncogene homolog |
| AML | acute myeloid leukemia |
| BRAF | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B |
| BSA | bovine serum albumin |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| CCN | cyclin |
| CD* (*=number) | cluster of differentiation |
| CDK | cyclin-dependent kinase |
| cDNA | complementary DNA |
| ChIP | chromatin immunoprecipitation |
| CHTOP | chromatin target of PRMT1 |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| dsDNA | double-stranded DNA |
| EGF | epidermal growth factor |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| EMSA | electrophoretic mobility shift assay |
| Eomes | eomesodermin |
| ERH | enhancer of rudimentary homolog |
| Esrrb | estrogen-related receptor beta |
| FBS | fetal bovine serum |
| FDR | false discovery rate |
| FGF | fibroblast growth factor |
| GAR | glycine and arginine rich |

| | |
|----------------|--|
| GB* (*=number) | glioblastoma |
| GBM | glioblastoma multiforme |
| G-CIMP | glioma-CpG island methylator phenotype |
| GFP | green fluorescent protein |
| GO | gene ontology |
| GST | glutathione S-transferase |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HE | hematoxylin and eosin |
| hNPC | human neural progenitor cell |
| Hoxa1 | homeobox A1 |
| IDH | isocitrate dehydrogenase |
| JAK2 | Janus kinase 2 |
| JBP | J-binding protein |
| KEGG | Kyoto encyclopedia of genes and genomes |
| LC/MS | liquid chromatography/mass spectrometry |
| MBD | methyl-CpG binding domain protein |
| MeCP2 | methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome) |
| MEP50 | methylosome protein 50 |
| mESC | mouse embryonic stem cell |
| MGMT | O-6-methylguanine-DNA methyltransferase |
| MS | mass spectrometry |
| mut | mutant |
| MW | molecular weight |
| N.D. | not detected |
| Nanog | Nanog homeobox |
| NURD | nucleosome remodeling deacetylase |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PI(3)K | phosphoinositide 3-kinase |
| PRMT | protein arginine methyltransferase |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction |
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription polymerase chain reaction |
| RAS | rat sarcoma viral oncogene |
| RB | retinoblastoma |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNAi | RNA interference |
| RTK | receptor tyrosine kinase |

| | |
|----------|---|
| RXRA | retinoid X receptor, alpha |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| shRNA | short hairpin RNA |
| siRNA | small interfering RNA |
| SLC19A1 | solute carrier family 19 (folate transporter), member 1 |
| SOX2 | SRY (sex determining region Y)-box 2 |
| ssDNA | single-stranded DNA |
| TDRD | tudor domain containing |
| TET | ten-eleven translocation |
| TET1 CD | TET1 catalytic domain |
| TSS | transcription start site |
| TTS | transcription termination site |
| UTR | untranslated region |
| WT | wild-type |

1. 序論

1-1 膠芽腫

膠芽腫 (glioblastoma) は、WHO grade IVに分類される最も悪性度の高い脳腫瘍である。主な特徴として、周辺組織への高い浸潤能や顕著な血管新生能が挙げられる。急速に増大するため、腫瘍内には壊死巣を伴う場合が多い。高い浸潤能を有するため、腫瘍と正常脳組織との境界が不明瞭であり、生命活動を律する脳という臓器の特殊性からも外科手術による全摘出は困難である。一般的に、手術による摘出後には、化学療法としてアルキル化剤であるテモゾロミドを投与するが、根治療法はない。最近の統計では、原発性脳腫瘍全体の統計的な5年生存率が76%であるのに対し、膠芽腫は10%未満であることがわかっており^{1,2}、膠芽腫に対する新たな治療法の開発が希求されている。

1-2 がん幹細胞

がん組織は、がんの発生において複数の突然変異が段階的・偶発的に積み重なることで生まれる遺伝的多様性や、周辺微小環境からの選択圧によって、極めて多様性に富んだ細胞集団から構成されていると考えられている。放射線療法、化学療法などによって、一部のがん細胞を排除することができても、放射線や薬剤がもたらす選択圧によって、耐性を獲得した腫瘍細胞の亜集団が選択され、再増大することが、がん再発の主要因と考えられている。

膠芽腫をはじめとする多くのがん種において、がん組織の未分化性と悪性度に相関があることが知られている。幹細胞生物学的アプローチから、がん組織を構成する細胞集団のうち、ごく少数の細胞のみが高い造腫瘍能をもつことが明らかとなった^{16,17}。これらの細胞は高い薬剤排出能力やDNA修復能力を有しているとともに、多分化能や自己複製能などの幹細胞様の性質を持つことから、がん幹細胞 (cancer stem cells) と呼ばれる。1990年代、急性骨髄性白血病におけるがん幹細胞の存在が示唆され¹⁸、さらに2000年代には固形がんである乳がんにおいてもがん幹細胞の存在が示されたことを端緒とし¹⁹、他のがん種においても次々とがん幹細胞の存在が報告された^{3,4,20-25}。また本論文における研究対象である神経膠芽腫においても、膠芽腫幹細胞が分離・同定されている^{3-8,26,27}。がん幹細胞は一般的に分裂速度が遅く、細胞周期を標的としている従来のがん剤や放射線治療に対し耐性である^{28,29}。現在、がん幹細胞を標的とした抗がん剤や新たながん治療法が開発が進められている。

1-3 膠芽腫がん幹細胞

他のがん種と同様に、膠芽腫においても膠芽腫がん幹細胞が分離・同定されている³⁻⁸。膠芽腫幹細胞は上述のがん幹細胞としての性質のほか、特筆すべき性質として、血管内皮

細胞やそれを取り巻く間葉系の細胞である周皮細胞への分化能を有することが近年の研究により明らかとなっている³⁰⁻³²。腫瘍組織からがん幹細胞を分離する手法としては、表面抗原を指標としたサイトメトリーが利用される。膠芽腫においては一般に CD133 (Prominin-1) や CD15 (SSEA-1 or Lewis X) が表面抗原として用いられる。CD133 は 5 回膜貫通型の糖タンパク質であり、膠芽腫に限らず大腸がんや肺がんの幹細胞の表面抗原としても利用される^{22,24,33}。一方で CD15 は 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine 分子を指し、細胞膜上の糖脂質や糖タンパク上に広く存在する糖鎖エピトープである。膠芽腫におけるより有効ながん幹細胞マーカーの探索は現在でも進められており、これまでに Integrin $\alpha 6$ 、L1CAM、A2B5 などが報告されている³⁴⁻³⁶。

表面抗原を指標としないがん幹細胞の分離法としては、無血清培養によって球状の細胞塊 (スフィア) を形成させる手法がある。膠芽腫組織を物理的に剪断した後、酵素処理によって単一の細胞に分散し、epidermal growth factor (EGF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加した無血清培地で培養すると、通常の神経幹細胞と同様なスフィアを形成し、幹細胞様の性質や造腫瘍性を維持したまま継代培養が可能である^{6,7}。このスフィアを構成する細胞は、CD133 などのがん幹細胞マーカーだけでなく、SOX2 や Nestin などの神経幹細胞マーカーも発現しており、免疫不全マウス脳内に移植すると腫瘍を形成する。また、培地中に血清を添加すると速やかに培養皿の底面に接着し、造腫瘍性を失うことも知られている^{37,38}。これらの手法によって分離された膠芽腫がん幹細胞は、血清培養細胞よりも生体内に近い状態を維持しており、これまで見出されなかった治療標的の探索対象として有望視され、様々なシグナル伝達経路などの活性化が報告されている³⁸⁻⁴¹。

1-4 ハイドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)

ハイドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) は、メチルシトシン (5-methylcytosine, 5mC) の 5 位のメチル基が酸化され、アルコールの状態となった DNA 塩基である。1971 年、ラットやマウスなどの齧歯類とカエルの脳においてその存在が確認された⁴²。後の解析により、この報告における 5hmC の定量性が低いことが指摘されているが、2009 年以降、複数のグループによって哺乳類における 5hmC の存在が再び報告されたことを契機とし⁴³⁻⁴⁷、現在その生理的意義や機能が解明されつつある。

哺乳類において特にゲノムの 5hmC 量が高いのは、脳組織のうち、特に小脳のプルキンエ細胞である。プルキンエ細胞は転写の盛んなユークロマチン領域の多い細胞として知られ、全てのシトシンのうち約 0.5%、全ての 5mC と比較すると約 40%にあたるシトシンが 5hmC である⁴⁸。

5hmC の哺乳類における存在が報告されて以降、5hmC を産生する酵素の探索が盛んに行われた。トリパノソーマにおいてチミンを水酸化し、5-hydroxymethyluracil (5hmU, also called base “J”) を産生する酵素として J-binding proteins (JBP) family があるが、JBP による 5hmU の産生がチミンの 5 位のメチル基の酸化を介することから、JBP1/2 の

哺乳類におけるパラログである Ten-Eleven Translocation (TET) family に関する解析が進められ、哺乳類においては TET が 5mC を酸化することで 5hmC を生み出す活性があることが見出された^{13,49,50}。

5hmC の生理学的意義に関しては、マウス胚性幹細胞 (mouse embryonic stem cells, mESC) において特に解析が進んでいる。5hmC が受精後、発生と共に減少していくことから、5hmC と細胞の全能性との関連が示唆された⁵¹⁻⁵⁶。網羅的シーケンシング技術を利用した解析によると、mESC のゲノム中においては *Nanog* や *Esrrb* などの全能性関連因子のプロモーター部位に TET1 依存的な 5hmC の産生が確認され、RNAi を用いて TET1 を抑制するとそれらの遺伝子の発現量が低下する。一方で TET1 は分化関連因子である *Eomes* や *Hoxa1* のプロモーター部位に PRC2 複合体を誘導することでそれらの転写を抑制することも判明しており、TET1 は転写の活性化・抑制の二方向性の機能によって、mESC の全能性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている^{57,58}。

1-5 5hmC とゲノムの積極的脱メチル化

リン酸化・メチル化をはじめとするヒストン修飾の多くが可逆である一方、DNA のメチル化は比較的安定な修飾であると考えられてきた。しかしながら、バイサルファイトシーケンス法や、5mC 特異的抗体を用いた染色実験などから、胚発生の特定の段階、特に接合子や始原生殖細胞において、DNA メチル化の減少が起きることが知られていた⁵⁹⁻⁶²。さらに、DNA メチル化パターンの網羅的解析により、DNA メチル化が細胞の分化過程で動的に制御されていることが明らかとなった^{63,64}。積極的脱メチル化は、哺乳類のライフサイクルにおいて 2 度起きるとされている^{65,66}。最初の脱メチル化は受精後の接合子において、次の脱メチル化は始原生殖細胞の発生において起こる。受精直後、発生段階初期においては、雌性前核の脱メチル化が細胞分裂の開始とともに受動的に始まるのに対し、雄性前核は細胞分裂が始まる前に積極的脱メチル化が起こり、このとき 5hmC が雄性前核のみ過渡的に生じることが明らかとなっている⁶⁷。

ヒストンにおけるリジンの脱メチル化反応が、メチル基の酸化反応を介することから⁶⁸⁻⁷³、5mC の酸化体である 5hmC を中間体とする積極的脱メチル化機構に関する解析が進められた。実際に、TET1 を過剰発現した HEK293FT 細胞において、修飾されていないシトシンの含量が増加する⁴⁹。上項で述べた mESC においても、TET family の抑制が各プロモーター上の 5mC 量を上昇させることがわかっている^{51,52}。TET ファミリーは 5mC を酸化して 5hmC へと変換するだけでなく、5hmC をさらに酸化することでホルミルメチルシトシン (5-formylmethylcytosine, 5fC)、続いてカルボキシメチルシトシン (5-carboxymethylcytosine, 5caC) を生み出し、さらに 5caC がグルコシル化を介したヌクレオチド除去修復経路によって新しいシトシンと入れ替えられることで、結果的に脱メチル化が起こるとする仮説が有力視されている^{11,74}。しかしながら、上述の JBP1/2 によるチミンの酸化反応と同様に、5hmC が cytidine deaminase family によって脱アミノ化され

ることで 5hmU へと変換される経路や、TET 自身に 5hmU を産生する活性があることも指摘されており⁷⁵⁻⁷⁸、生体内におけるシトシンの代謝経路は、発生段階や組織型などの背景に依存して決定されていると考えられている。

1-6 転写制御因子としての 5hmC

一方で、着床前のマウス胚において 5hmC が受動的に減少していくことや⁷⁹、神経発生を通じて 5hmC が存在し続ける遺伝子座があることがわかっている⁸⁰⁻⁸²。TET ファミリーと 5hmC に関する一連の研究において、5hmC がユークロマチン領域と共局在することも広く報告されている⁵³。最近では、放射性同位体と質量分析計を組み合わせた詳細な追跡実験の結果、5hmC の量が細胞周期依存的に変化せず、安定に維持されていることが判明した⁸³。また、5hmC が 5fC や 5caC と比べて豊富に存在し、少なくとも *in vitro* では特定のタンパク質群と相互作用することなどから^{14,84}、5hmC の生理学的意義が積極的脱メチル化のみではないことも示唆されている。

1-7 TET ファミリーとがん

TET family は初め、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) において高頻度に転座が起きている遺伝子として同定された⁸⁵⁻⁸⁷。急性骨髄性白血病において高頻度な欠失が起きているのは TET2 であるが、TET2 に変異が入っている多くの急性骨髄性白血病検体においてゲノムワイドなメチル化パターンの異常が起きていることが明らかとなっている^{88,89}。また、TET やヒストン脱メチル化酵素などの dioxygenase の基質となる 2-OG は、isocitrate dehydrogenase (IDH) family によって産生されるが、急性骨髄性白血病や神経膠芽腫の一部のサブタイプにおいてはこの IDH にも高頻度な変異がみられ、特に変異型 IDH によって産生される 2-hydroxyglutarate が、dioxygenase に対する弱い阻害活性をもつことも明らかとなっている⁹⁰。

本研究では、神経膠芽腫の無血清培養細胞において TET1 が高発現しており、全シトシンの約 1%にも及ぶ多量の 5hmC が存在することを明らかとした。また、5hmC が RTK/RAS/PI(3)K シグナルや p53 シグナル、RB シグナルなど、腫瘍形成に重要なシグナル伝達経路の構成因子の遺伝子座に広く存在し、転写を正に制御していることを見出した。また、5hmC による転写制御の分子メカニズムを解析し、新規 5hmC 認識タンパク質 CHTOP を同定した。さらに、CHTOP の複合体を精製し、CHTOP が methylosome と呼ばれるタンパク質メチル化複合体を 5hmC の存在する遺伝子座に誘導することで、ゲノムワイドな転写制御を行い、膠芽腫の造腫瘍性維持に必須な役割を果たすことを解明した。

1-8

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

1-9 本研究の位置づけ

上項で述べたように、これまで 5hmC は DNA の積極的脱メチル化の中間体として認識されてきた。一方で、5hmC が単純な中間体としてではなく、転写制御を行う可能性も指摘されているが、その具体的なメカニズムは不明であった。本研究では、膠芽腫の特定のサブタイプにおいて、ゲノム中の 5hmC の量が顕著に高いことを見出した。さらに、膠芽腫細胞を用い、5hmC に結合するタンパク質を網羅的に探索し、新規 5hmC 認識タンパク質 CHTOP を同定した。また、CHTOP の複合体を同定し、CHTOP が methylosome と呼ばれるアルギニンメチル化複合体を 5hmC の存在する遺伝子座にリクルートすることで、転写を促進し、膠芽腫の造腫瘍性の維持に必須であることを見出した。

この部分に記述されていた内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

以上の結果は、5hmC による転写制御の分子メカニズムを初めて明らかとただけでなく、5hmC が膠芽腫治療における有望なターゲットであることを示唆している。

この部分に記述されていた内容は、医薬品に関する特許申請に関わるため公表できない。5年以内に特許取得予定。

2. 結果

2-1 膠芽腫における 5hmC の増加とその機能

2-1.1 膠芽腫細胞の分類

本研究で使用した膠芽腫細胞は、東京大学医学部附属病院より供与されたものである。まず、これらの検体、及び無血清条件下で培養した細胞について、qPCR、マイクロアレイ、RNA-seq を用いて遺伝子発現パターンを解析し、分類を行った。膠芽腫には、Proneural, Mesenchymal, Neural, Classical の4つのサブタイプがあることが知られており⁹¹⁻⁹⁴、本研究で使用した膠芽腫検体・無血清培養細胞に関しても、これら4つのサブタイプに分類することができた (Fig. S1A and S1B)。

2-1.2 膠芽腫ゲノム中の 5hmC 量の増加

RNAi ライブラリーを使用した網羅的スクリーニングによって、膠芽腫においてがん幹細胞マーカーCD133 の発現を正に制御する因子を約 150 同定した (高井弘基 修士論文 2011)。次に、同定された 150 の遺伝子の中でも、特に 5hmC 産生酵素である TET1 に着目した。膠芽腫細胞のゲノム DNA を抽出し、anti-5hmC 抗体あるいは anti-5mC 抗体を用いたドットプロット法によって解析すると、正常な神経幹細胞や、血清培養によって維持される既存の膠芽腫細胞と比較して、無血清培養によってがん幹細胞を維持した状態で培養した膠芽腫細胞はゲノムの 5hmC 含量が顕著に高く、5mC 含量が低いことが判明した (Fig. 1A)。これらの株において、qPCR によって TET family (TET1~TET3) の mRNA 量を絶対定量し、比較すると、TET1 の発現量が特に高いことも判明した (Fig. 1B)。さらに、質量分析計を用いてゲノム DNA 中の 5hmC を絶対定量した結果、ゲノム中の全シトシンの約 1%にも及ぶ 5hmC が存在することが見出された (Fig. 1C)。同様の結果は、摘出直後の膠芽腫組織においても確認された (Fig. 1D and 1E)。これまでに、Proneural サブタイプに属する膠芽腫のごく一部においては、isocitrate dehydrogenase (IDH) family に属する IDH1, IDH2 に点変異がみられ、これらの変異はゲノムのメチル化を亢進させるという報告があることから⁹³、本研究で使用した膠芽腫細胞について、IDH に変異が入っていないことを確認した (Fig. S1C)。また、UCSC Cancer Genomics Browser (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>) を用いて、サブタイプ間の TET family の発現量を比較すると、TET1 の発現の上昇は、Proneural サブタイプで起きていることが判明した (Fig. S1D)。膠芽腫検体の切片染色による解析では、Mesenchymal サブタイプに属する GB1 細胞と比較して、Proneural サブタイプに属する GB2~GB5 細胞では TET1 の発現上昇と 5hmC 量の上昇、5mC 量の低下が起きていることが確認された (Fig. S1E)。また、当研究室で樹立した膠芽腫細胞の 5hmC 量をサブタイプ間で比較すると、5hmC 量の上昇は Proneural サブタイプで起きていることが確認された (Fig. S1F)。

2-1.3 TET1 の酵素活性は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である

TET family のうち、TET1 の発現量が特に高いことから、膠芽腫の造腫瘍性維持に対する TET1 の重要性を検討した。まず、shRNA, siRNA それぞれ 2 配列を用意し、それぞれ TET1 のタンパク量を抑制することを確認した (Fig. S2A)。また、レスキュー実験のため、TET1 の野生型、あるいは不活性型変異体を強制発現するレンチウイルスを用意し、RNAi による抑制条件下で強制発現が可能であることを確認した (Fig. S2B)。TET1 の抑制により 5hmC 量が低下し、また、TET1 野生型の強制発現によって 5hmC 量が回復し、変異体の強制発現では回復しないことを併せて確認した (Fig. S2C)。ゲノム中の 5hmC 量が高いことが確認された膠芽腫細胞について、shRNA を用いて TET1 を抑制した結果、膠芽腫細胞の生育が抑制されることが判明した (Fig. 2A)。また、TET1 の野生型を強制発現すると、細胞の生育が回復し、一方で TET1 の不活性型変異体を強制発現した場合には、生育は回復しないことも判明した (Fig. 2A)。同様に、siRNA を用いて TET1 を抑制し、形成されるスフィアを計数すると、スフィア数が顕著に抑えられることが確認された (Fig. 1B)。また、スフィア数に関しても、TET1 野生型の強制発現によって回復し、不活性型の強制発現では回復しないことが確認された (Fig. 2C)。さらに、shRNA を用いて TET1 を長期に抑制した膠芽腫細胞を、免疫不全マウスの脳内に移植すると、生存期間が延長することが見出された (Fig. 2D)。このとき、マウスの脳を摘出し、切片染色によって膠芽腫を可視化すると、TET1 を抑制した膠芽腫細胞を移植したマウスでは腫瘍が形成されていないことが見出された (Fig. 2E)。

2-1.4 5hmC は膠芽腫の発生に重要な遺伝子群の遺伝子座に存在する

次に、anti-5hmC 抗体あるいは anti-5mC 抗体を用いた (h)MeDIP-seq 法により、膠芽腫細胞におけるゲノム上の 5hmC, 5mC のマッピングを行った。膠芽腫細胞 GB2 と、正常なヒト神経幹細胞における 5hmC のピークを比較すると、膠芽腫細胞において顕著にピーク数が多いことが判明した (Fig. 3A)。また、両者において、5hmC のピークは遺伝子の promoter や intragenic (遺伝子の内部、エキソン、イントロンを含む領域) な領域に多く存在することが見出された (Fig. 3B and 3C)。5hmC が存在する遺伝子群について GO 解析を行った結果、がん関連遺伝子群に 5hmC が多く存在することが判明した (Table 1)。特に、*EGFR*, *AKT3*, *CDK6*, *CCND2*, *BRAF* などの、膠芽腫において高頻度な変異がみられ、膠芽腫の発生に重要な役割を果たす遺伝子群の遺伝子座に、5hmC の存在が確認された (Fig. 3D)。これらの結果は、(h)MeDIP-qPCR 法によって確認された (Fig. 3E)。RNAi によって TET1 を抑制すると、これらの遺伝子の発現が低下し、また、TET1 の野生型の強制発現によって発現が回復することも確認された (Fig. 3F)。一方で、正常な神経幹細胞において TET1 を抑制しても、これらの遺伝子群の発現量は低下しなかった (Fig. 3F)。

2-1.5 CHTOP は 5hmC を認識し、結合する

以上の結果から、5hmC は膠芽腫細胞においては脱メチル化の中間体としてではなく、転写制御に関与すると考え、5hmC に結合するタンパク質を膠芽腫の核抽出物より同定することを試みた。まず、それぞれ 3 カ所の C, 5mC, 5hmC をもつ 26 mers の 2 本鎖 DNA を用意し、3'末端をビオチン標識した (Fig. S3A)。このオリゴを膠芽腫細胞の核抽出物と混合し、ビオチンプルダウンにより、5hmC に結合するタンパク質を精製し、質量分析によって同定した (Fig. S3B)。その結果、5hmC 結合タンパク質候補群が得られた (Table 2)。これらの候補タンパク質を、5hmC に結合したペプチド数を 5mC に結合したペプチド数で除したスコアによって順位づけした結果、既に 5hmC 結合タンパク質として報告のあった high mobility group protein B2 が最も高いスコアを示した。さらに、次にスコアの高いタンパク質として、CHTOP が得られた。

CHTOP は、248 アミノ酸からなるタンパク質であり、種間保存度が非常に高い。ヒトとマウスの間では 7 アミノ酸しか違いがないほか、ヒト、マウス、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュの間でも 60.9% のアミノ酸相同性がある。特徴的なドメイン構造として、GAR domain (glycine and arginine rich domain) を持つ。GAR domain はグリシンとアルギニンに富んだ領域であり、同様のドメインを持つタンパク質としては、fibrillarin や nucleolin などの核小体タンパク質が知られている。CHTOP についても、強制発現することで核小体に局在することが知られている⁹⁵。また、RNA との結合性があることや、mRNA の核外輸送に関与することが示唆されているが⁹⁶、その機能についてはこれまでほとんど知られていなかった。CHTOP が 5hmC に結合することは、プロッティングにより確認された (Fig. 4A)。また、バキュロウイルスを用いてリコンビナント CHTOP タンパク質を精製した (Fig. S3C)。このリコンビナント CHTOP を用いて同様のプルダウンアッセイを行うと、CHTOP が 5hmC に結合することから、CHTOP は 5hmC を直接認識していることが示唆された (Fig. 4A)。また、CHTOP と 5hmC の結合は、同様のオリゴとリコンビナント CHTOP を使用したゲルシフト実験によっても確認された (Fig. S3D)。

CHTOP が SDS-PAGE 上で 2 本のバンドを呈することから、CHTOP が受ける翻訳後修飾に関しても解析した。2 本のバンドを PAGE ゲルより切り分け、質量分析によって翻訳後修飾を解析した結果、CHTOP の多数のアルギニン残基が、ジメチル化を受けていることが判明した。アルギニンのジメチル化には非対称的ジメチル化と対照的ジメチル化があるが、HEK293FT 細胞に CHTOP を強制発現し、非対称的ジメチル化修飾酵素 PRMT1、対照的ジメチル化修飾酵素 PRMT5 をそれぞれ siRNA によってノックダウンすると、PRMT1 をノックダウンした場合にのみ、CHTOP の 2 本のバンドが下の 1 本に収束し、非対称的ジメチル化のシグナルが消失することが見出された (Fig. 4B)。さらに、大腸菌より精製した未修飾な GST-CHTOP タンパク質を、同様に精製した GST-PRMT1 と混合し、メチル化反応を行うと、CHTOP が非対称的ジメチル化を受け、バンドが上に移動することも見出された (Fig. 4C)。

PRMT1によるCHTOPの非対称的ジメチル化が5hmCの認識に重要であるかどうかを明らかとするため、PRMT1をノックダウンした状態で、5hmCオリゴによるプルダウン実験を行った。その結果、PRMT1をノックダウンした状態では、CHTOPは5hmCに結合できないことが判明した (Fig. 4D)。また、CHTOPのGAR domainの後端に存在する連続した5つのアルギニン残基をアラニンに置換した変異体 "GAR mutant" は、5hmCに対する結合能を失っていることが明らかとなった (Fig. 4E)。

2-1.6 CHTOPはmethylosomeと共に5hmCと結合する

CHTOPの機能解析のため、まず、shRNA, siRNAそれぞれ2配列を用意し、それぞれCHTOPのタンパク量を抑制することを確認した (Fig. S4A)。また、レスキュー実験のため、CHTOPの野生型、あるいはGAR mutantを強制発現するレンチウイルスを用意し、RNAiによる抑制条件下で強制発現が可能であることを確認した (Fig. S4B)。

次に、CHTOPの複合体を同定することを試みた。FLAG-CHTOPをHEK293FT細胞に導入し、FLAG抗体を用いて複合体を精製した後、銀染色に供し、CHTOPと共沈したタンパク質をゲルより切り出し精製後、質量分析によって同定した (Fig. 5A)。その結果、PRMT1, PRMT5, methylosome protein 50 (MEP50), enhancer of rudimentary homolog (ERH)がCHTOPと結合することが判明した (Table 3)。これらのタンパク質群は、methylosomeと呼ばれるアルギニンメチル化複合体の最小構成因子であった。膠芽腫細胞においてもCHTOPがmethylosomeと結合していることは、免疫沈降実験によって確認された (Fig. 5B)。また、膠芽腫細胞を用いて5hmCオリゴを用いたプルダウン実験を行った結果、CHTOP及びmethylosomeが5hmCと結合していることも示された (Fig. 5C)。

2-1.7 CHTOP-methylosome複合体は5hmCと結合し、H4R3のジメチル化を介し、がん遺伝子の転写を活性化する

以上の結果から、CHTOPは膠芽腫細胞において、5hmCの存在する遺伝子座にmethylosomeを誘導するリクルーターとして機能していると考えた。CHTOP依存的にmethylosomeがクロマチンと相互作用しているかを検討するため、salt extraction analysisを行った。TET1あるいはCHTOPをノックダウンした膠芽腫細胞の核画分より、高塩濃度のバッファを用い、クロマチンと強く相互作用していないタンパク質を精製し、含まれるmethylosomeの量をブロットニングにより比較した。その結果、TET1あるいはCHTOPのノックダウンによって、クロマチンと相互作用していないmethylosomeの量が増加することが判明した (Fig. 5D)。またこのとき、PRMT1によって産生されるヒストンH4R3の非対称的ジメチル化 (H4R3me2a) 及びPRMT5によって産生される対照的ジメチル化 (H4R3me2s) の量が低下していることが確認された (Fig. 6A)。

TET1, CHTOPをそれぞれノックダウンすると、(h)MeDIP-seqによって得られた

5hmC の存在する遺伝子座における PRMT1, PRMT5, H4R3me2a, H4R3me2s の量がそれぞれ低下していることが ChIP により確認された (Fig. 6B)。また、PRMT1, PRMT5 をそれぞれノックダウンすると、同様に H4R3me2a, H4R3me2s の量が低下していることが、ChIP により確認された (Fig. S5A)。TET1, CHTOP をノックダウンしたとき、H4R3me2a, H4R3me2s と協調して変動することが報告されている H3K27me3, H3K36me3, H4ac の量を検討した結果、H3K27me3 のみ、増加していることが確認された (Fig. S5B)。また、CHTOP, PRMT1 のノックダウンにより、5hmC を伴うがん関連遺伝子の発現量が低下していることが確認された (Fig. 6C and 6D)。PRMT5 のノックダウンでは、これらの遺伝子群の発現量は低下しなかった (Fig. 6D)。

CHTOP-methylosome による転写制御がグローバルなものかどうか検討するため、TET1, CHTOP, PRMT1, PRMT5 をノックダウンした膠芽腫細胞における transcriptome の変化を、RNA-seq により解析した。その結果、これらの遺伝子をノックダウンしたときの transcriptome の変動が、互いに強い正の相関を持つことが明らかとなった (Fig. 6E and 6F, Fig. S5C)。

2-1.8 CHTOP は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である

RNAi を用いて CHTOP を抑制した結果、膠芽腫細胞のスフィア形成が抑制されることが判明した (Fig. 7A)。また、CHTOP の野生型を強制発現すると、スフィア形成が回復し、一方で CHTOP の GAR mutant を強制発現した場合には、生育は回復しないことも判明した (Fig. 7B)。同様に、shRNA を用いて CHTOP を抑制すると、細胞の生育が抑えられることが確認された (Fig. 7C)。また、細胞の生育に関しても、CHTOP 野生型の強制発現によって回復し、GAR mutant の強制発現では回復しないことが確認された (Fig. 7C)。さらに、shRNA を用いて CHTOP を長期に抑制した膠芽腫細胞を、免疫不全マウスの脳内に移植すると、生存期間が延長することが見出された (Fig. 7D)。このとき、マウスの脳を摘出し、切片染色によって膠芽腫を可視化すると、CHTOP を抑制した膠芽腫細胞を移植したマウスでは腫瘍が形成されていないことが確認された (Fig. 7E)。

以上の結果から、膠芽腫細胞においてはゲノム中の全シトシンのうち、約 1% に及ぶ 5hmC が含まれており、5hmC の存在する遺伝子座に CHTOP が methylosome を誘導することで、ヒストン H4R3 のジメチル化を介してがん関連遺伝子の転写を促進し、膠芽腫の造腫瘍性維持に必須な役割を果たすことが示唆された (Fig. 7F)。

2-1.9 CHTOP は 5hmC 量の維持に必須である

膠芽腫細胞と正常神経幹細胞における CHTOP タンパク質の量をプロッティングにより比較すると、膠芽腫細胞において CHTOP の発現量が高いことが見出された (Fig. S6A)。また、CHTOP のノックダウンによって、5hmC の量が低下し、また、野生型 CHTOP の強制発現によって 5hmC 量が回復し、一方で GAR mutant の強制発現では回復しないこ

とが見出された (Fig. S6B)。このことから、CHTOP が膠芽腫ゲノムにおける 5hmC 量の維持に重要であることが示唆された。転写因子 SOX2 が CHTOP の転写を介して 5hmC 量を制御していることを示す結果が既に得られており (里智博 修士論文 2014)、膠芽腫における SOX2 の発現上昇と 5hmC 量の上昇との関わりを現在解析中である。

2-2

本項に記述されている内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

2-3

本項に記述されている内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

3. 考察

3-1 膠芽腫の由来と 5hmC 量の上昇の関係性

膠芽腫には Proneural, Mesenchymal, Neural, Classical の 4 つのサブタイプが存在し、1 つの膠芽腫は 1 つのサブタイプに分類され、サブタイプ毎に異なる起源細胞を持つと考えられてきた。一方で、近年の single cell sequencing 技術の発達により、1 つの膠芽腫組織のなかに、別々のサブタイプに属する細胞が混在していることが明らかとなった⁹⁷。この研究では、膠芽腫組織中の 1 つ 1 つの細胞の遺伝子発現パターンを比較解析することで、膠芽腫発生における clonal evolution をモデル化し、あるサブタイプに属する膠芽腫細胞が、clonal evolution の過程で別のサブタイプに変化することで、1 つの膠芽腫組織内にサブタイプの heterogeneity が生まれることを示唆している。また、興味深いことに、single-cell RNA-seq 解析に使用された 5 つの膠芽腫検体においては、それぞれの属するサブタイプに関わらず、全ての検体が共通して Proneural に属する膠芽腫細胞を含んでおり、かつ、全ての検体に共通して存在するサブタイプは Proneural のみであることが報告されている。また、膠芽腫発生のマウスモデルを利用した研究から、神経幹細胞由来の膠芽腫細胞は Proneural サブタイプに属し、神経細胞からの脱分化によって生じた膠芽腫細胞は Mesenchymal 様の遺伝子発現パターンを示すことが見出されている⁹⁸⁻¹⁰⁰。さらに、膠芽腫は WHO grade IV に属する腫瘍であるが、悪性度が一段階低い WHO grade III の神経膠腫は、そのほとんどが Proneural サブタイプに属することが知られている^{91,94}。これらの報告から、膠芽腫の起源となる細胞は、多くの場合は神経幹細胞であると推察される。single-cell analysis は発展途上の技術であり、今後解析される検体数が増えてゆくことで、さらに多くの知見が得られることが期待される。

本研究においては、正常神経幹細胞と、Proneural サブタイプに属する膠芽腫において、TET1 の発現量が特に高いことを明らかとした (Fig. 1)。このことから、正常神経幹細胞に由来する膠芽腫細胞は、TET1 の発現が高く、Proneural サブタイプに属すると推察される。このことを確認するには、神経幹細胞由来の膠芽腫を発症するマウスモデルを導入し、実際に神経幹細胞由来の膠芽腫細胞においてゲノムの 5hmC 量が増加しているかどうかを確認することが必要である。このようなマウスモデルは、今後 TET1 をターゲットとする分子標的薬を創製する上で、*in vivo* における阻害剤の抗腫瘍効果を検討するためにも有用である。

3-2 ゲノムの高ハイドロキシメチル化の直接的要因

本研究では、Proneural サブタイプに属する膠芽腫細胞において TET1 の発現量が高く、ゲノムの高ハイドロキシメチル化が起きていることを明らかとした。しかしながら、正常神経幹細胞においては、TET1 の発現量が同様に高いにもかかわらず、5hmC 量は膠

芽腫と比較して低い (Fig. 1A and 1B)。よって、膠芽腫においてゲノムの高ヒドロキシメチル化が起きている直接的原因は明らかでない。CHTOP タンパク質の量を比較したところ、膠芽腫細胞において CHTOP の発現量が高いことが見出された (Fig. S6A)。また、CHTOP のノックダウンによって、5hmC の量が低下することが判明した (Fig. S6B)。これらの結果から、CHTOP が 5hmC 量の維持に重要であることが示唆された。CHTOP が 5hmC 量の維持に関与する分子メカニズムとしては、CHTOP が 5hmC に結合することで、脱メチル化に必要な machinery の接近を阻害することなどが考えられる。

CHTOP の上流因子解析の結果、転写因子 SOX2 が CHTOP の転写を介して 5hmC 量を制御していることを示す結果が既に得られている (里智博 修士論文 2014)。SOX2 は、Proneural サブタイプにおいて高頻度に genomic amplification が確認されており¹⁰¹、膠芽腫における SOX2 の発現上昇と 5hmC 量の上昇との関わりを現在解析中である。

3-3 一般的ながんにおいては 5hmC 量は低下している

これまでに、脳腫瘍を含む様々ながんにおいて、本研究の結果とは相反して、5hmC 量が低下していることが報告されている¹⁰²⁻¹⁰⁵。本研究とこれらの報告の相違点として、本研究では無血清培養によって primary glioblastoma の検体より膠芽腫がん幹細胞を維持して培養しているのに対し、既報告では培地に血清を添加している点や、既報告においては腫瘍のサブタイプを考慮していない点が挙げられる。実際に、血清培地で維持される HeLa 細胞や U87MG, U138MG, U251MG 細胞などにおいては、5hmC 量が DNA, RNA 共に極めて低いことが本研究により明らかとなっている (Fig. 1A and 12E)。

3-4 IDH family の変異と DNA メチル化

Proneural サブタイプに属する膠芽腫のごく一部において、IDH family に変異が入っていることが確認されている^{91,93,106-109}。IDH は、本研究でも使用した TET による酸化反応の基質である 2-OG を産生する酵素であり、IDH の loss-of-function 型変異は、2-OG の減少につながり、TET をはじめとする酸化酵素の活性が抑えられることで、ゲノムの高メチル化を引き起こすと考えられている^{93,110}。特定の高メチル化状態を伴う膠芽腫の表現型を、glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) と呼ぶ⁹³。また、IDH の gain-of-function 型変異によって、がん細胞に特異的な代謝産物 "oncometabolite" とされる 2-hydroxyglutarate (2-HG) が産生され、2-HG が TET をはじめとする酸化酵素に対する弱い阻害効果をもつことも明らかとなっている⁹⁰。

IDH の変異をもつ膠芽腫の頻度は、primary glioblastoma では 8%以下と非常に低く、一方で secondary glioblastoma や再発の glioblastoma では約 50%程度と高い^{91,106}。本研究で使用した膠芽腫細胞は、全て primary glioblastoma であり、IDH family の変異が入っていないことを確認した (Fig. S1)。また最近のマウスモデルを用いた報告では、non-

G-CIMP タイプの膠芽腫が、Proneural に属する膠芽腫から生じることが確認されている¹¹⁰。以上のことから、本研究で見出されたゲノム中の 5hmC 量の増加は、IDH の変異をもたない Proneural サブタイプの膠芽腫においてみられる現象であると考えられる。上述の single cell analysis の発達によって、今後がん組織の clonal evolution と 5hmC 量の増減の関係が明らかとなることが期待される。

3-5 ~ 3-12

この部分に記述されている内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

3-13 TET1 のターゲティングによる膠芽腫治療

本研究によって、TET1 が膠芽腫治療における有望なターゲットとなることが示唆された。TET1 のノックアウトマウスが正常に発生することから^{111,112}、TET1 に対する阻害薬が副作用の少ない抗がん剤となることが期待される。

この部分に記述されていた内容は、医薬品に関する特許申請に関わるため公表できない。5年以内に特許取得予定。

3-14 本研究から示唆される TET1 以外の標的

本研究においては、PRMT1, PRMT5 などのアルギニンメチル化酵素や、CHTOP など、TET1 以外にも膠芽腫の発生に重要な役割を果たす因子群が同定された。PRMT1 をはじめとする PRMT family によるアルギニンメチル化は、アセチル化やリン酸化などとのクロストークにより様々な細胞内プロセスに関与していると考えられている¹¹³⁻¹¹⁶。ヒストンや RNA pol II の C 末ドメインのメチル化されたアルギニンは Tudor domain-containing proteins (TDRDs) によって認識されることが構造学的にも明らかとなっており¹¹⁷⁻¹²⁰、PRMT1 を初めとするアルギニンメチル化酵素によるヒストンメチル化は、転写の活性化に関与すると考えられている^{121,122}。

近年では、アルギニンメチル化とがん発生の関連性が指摘されている¹²³。例としては、PRMT5 の活性が Janus kinase 2 (JAK2)-V617F による直接のリン酸化や、cyclin D1-CDK4 による MEP50 のリン酸化によって行われているという報告や^{124,125}、PRMT5 が p53 を直接メチル化し、その機能を制御しているという報告¹²⁶がある。また、PRMT5 の過剰発現は乳がんの発生を促進することが知られており¹²⁷、PRMT5 が receptor tyrosine kinase シグナルの制御に関与しているという報告¹²⁸も存在する。PRMT1 についても、acute myeloid leukemia の発生に PRMT1 の活性に関与しているという報告がなされている^{129,130}。

近年では、メチル化リジンに対する化学プローブが続々と開発されている^{131,132}。今後、メチル化アルギニンに対する化学プローブが開発され、膠芽腫治療へとつながる知見が得られることが期待される。

4. 材料と方法

本項の内容からは、医薬品に関する特許申請、及び学術論文として出版予定の内容が削除されている。5年以内に出版、特許取得予定。

抗体、プライマー

本論文で使用した全ての抗体を Table 4 に、全てのプライマーを Table 5 に示す。

細胞と組織

膠芽腫検体は、東京大学附属病院脳神経外科にて手術後、供与された。検体の供与はインフォームド・コンセントに基づき、治験審査委員会の承認を得て行われた。検体は洗浄後、物理的に剪断した後、酵素処理によって単一の細胞に分散し、DMEM/F12 (Life Technologies) に B27 supplement minus vitamin A (Life Technologies) 、及び EGF と FGF2 (20 ng/ml each, Wako Pure Chemical Industries) を加えた培地で培養した。正常神経幹細胞は、Fetal のものは Lonza 社、ES 細胞由来のものは Millipore 社より購入し、同様の培地にて培養した。HEK293FT、HeLa、U87MG 細胞は、10%の FBS を加えた DMEM (Nissui) 培地で培養した。Cell viability の検定には、CellTiter-Glo (Promega) を使用した。

RNA 干渉と強制発現

レンチウイルスの調製は、H1 プロモーター下で shRNA を発現する CS-Rfa-CG ベクター、パッケージングベクター pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev の 3 者を HEK293FT 細胞に導入することで行った。導入には、Polyethyleneimine “MAX” (Polysciences) を用いた。全てのプラスミドは、理化学研究所バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチームの三好浩之氏により提供された。ウイルスの精製は、培養上清を 25,000 rpm、4°C、90 分間超遠心することで行った (SW28 rotor, Beckman) 。shRNA に用いた配列を以下に示す。

shTET1#1, 5'-GCATATTCCTTTGAAATAA-3'

shTET1#2, 5'-GAACTAAACAAGATTAAGT-3'

shCHTOP#1, 5'-CTAAATGAGCGCTTTACTA-3'

shCHTOP#2, 5'-CCAAGATGTCTCTAAATGA-3'

TET1 及び CHTOP の強制発現には、CMV プロモーター下で TET1 あるいは CHTOP を発現する CSII-CMV-Rfa-IREs2-Venus ベクターを用いた。レンチウイルスの感染効率

は GFP あるいは Venus の蛍光によって 95%以上であることを確認した。

siRNA は、Silencer Select Pre-designed siRNA targeting human TET1 (Life Technologies, ID. s37192 and s37193)、human CHTOP (ID. s25092 and s25093)、human PRMT1 (ID. s6917 and s6919)、human PRMT5 (ID. s20376 and s20377)を用いた。siRNA の導入には、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いた。

RNA の回収と qRT-PCR

Total RNA の回収には、NucleoSpin RNA Clean-up kit (Macherey-Nagel) を用い、RNA の逆転写には、PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いた。qPCR 反応には、Sybr Green I と LightCycler480 (Roche Applied Science) を使用した。発現量のノーマライズには、TATA box-binding protein (TBP) の mRNA を使用した。TET1~TET3 の mRNA の絶対定量では、TET1~TET3 の全長配列を含んだ濃度既知のプラスミドを用いて検量線を作成して行った。qRT-PCR に使用したプライマーを Table 5 に示す。

(h)MeDIP

細胞を proteinase K 及び RNase A によって消化した後、ゲノム DNA を phenol/chloroform 法によって抽出した。ゲノム DNA は Handy Sonic (TOMY) を用いて 200~500 bp に剪断した。4 µg の剪断した DNA に対し、4 µl の anti-5hmC 抗体 (Active Motif) あるいは 4 µg の anti-5mC 抗体 (Abcam) を加え、IP buffer (10 mM sodium phosphate pH 7.0, 140 mM NaCl, 0.05% Triton X-100) 中で 4°C 一晩反応させた。次に 30 µl の Dynabeads Protein G (Life Technologies) を加え、4°C 2 h の反応後、IP buffer で 3 回洗浄した。DNA の溶出は、Dynabeads を proteinase K で 55°C 3 h 処理することで行い、DNA は再び phenol/chloroform 法によって精製した。

(h)MeDIP シーケンス

Input DNA 及び(h)MeDIP 法によって精製した DNA について、アダプターとの連結・増幅処理を行った (BioLabs NEB Next ChIP-Seq Library Prep Reagent Set for Illumina)。作製したライブラリは、Illumina HiSeq 2000 を用い、single-end 50 bp reads で解析した。得られたリードは、Bowtie2 v2.1.0 software¹³³ のデフォルトオプションを用い、human reference sequence (hg19) に対してアラインした。duplicate reads を除去した後、ピーク呼び出しは DROMPA software を使用し、input DNA に対する濃縮率を比較することで行った¹³⁴。

RNA シーケンス

精製した Total RNA を用い、Illumina TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero

Gold LT Sample Prep Kit を用いて cDNA ライブラリを作製した。作製したライブラリは、Illumina HiSeq 2000 を用い、single-end 50 bp reads で解析した。得られたリードは TopHat2 v2.0.9¹³⁵ を用い、ヒトゲノム (GRCh37/hg19) に対してアラインした。RPKM value の算出には、Cufflinks v2.1.1¹³⁶ を使用し、FDR<0.05 で発現量の変化が確認された遺伝子群を抽出した。

ドットプロット

精製したゲノム DNA サンプルは、熱変性した後 Hybond N+ membrane (GE Healthcare) にスポットした。スポットティングには、Dot-blot apparatus (Bio-Rad) を使用した。メンブレンを乾燥後、UV (70,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) によってクロスリンクを行い、5% skimmed milk in TBS-Tween 中で常温、3 h ブロッキング処理を行った。メンブレンを洗浄後、anti-5hmC polyclonal antibody (Active Motif, 1:10000 in TBS) or anti-5mC monoclonal antibody (Abcam, 1:1000 in TBS) 中で 4°C 一晩反応させた。検出は HRP-conjugated IgG secondary antibody を用い、Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用いて発光後、LAS-4000EPUVmini Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) によって検出した。DNA のノーマライズのため、それぞれのスポットを SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies) によって可視化した。

5hmC 結合タンパク質の精製

GB2 細胞 (1.0×10^6 cells) を 10 cm にて 1 週間培養した。細胞は Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science) を添加した buffer A (10 mM HEPES-NaOH pH7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) に懸濁し、type B pestle を用いて 10 strokes 破碎した。破碎液を 1,000 g、4°C、5 min 遠心し、沈殿した核画分を 1 ml の buffer C (HEPES-NaOH pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 25% Glycerol) に懸濁して氷上で 30 分処理した。懸濁液を 21,500 g、4°C、20 min 遠心し、上清を核抽出物とした。核抽出物に対して終濃度 0.1%の NP40 を加え、10 μg の unmodified oligonucleotides と 100 μl の Dynabeads Streptavidin (Life Technologies) を加えて 4°C、1 h 処理することでプレクリア処理を行った。プレクリア後のサンプルを 2 つに分割し、それぞれ 5 μg の methylated、hydroxymethylated oligonucleotides (synthesized by Gene Design Inc.) と 50 μl の Dynabeads Streptavidin を加えて 4°C、1 h 処理した。ビーズを 1 ml の 0.1% NP40 wash buffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP40) で 3 回、detergent-free wash buffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl) で 1 回洗浄後、100 μl の acid elution buffer (100 mM Glycine-HCl pH1.5, 250 mM NaCl) で 4°C、1 h 処理した。得られた抽出物は 10 μl の 1 M Tris pH 8.8 によって中和し、質量分析に供した。

5hmC 結合タンパク質の同定

Shotgun proteomic 解析は linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific) と nanoflow LC system (Dina-2A, KYA Technologies) を用いて行った¹³⁷。得られた MS 及び MS/MS データより、RefSeq (National Center for Biotechnology Information) human protein database (32,968 protein sequences as of Sep 12, 2011) に対し、Mascot ver. 2.4.01 (Matrix Science) を用いて得られたタンパク質を同定した。Methionine oxidation、N-terminal acetylation、N-terminal glutamine への pyro-glutamination 及び Ser、Thr、Tyr の phosphorylation について variable modifications とした。また、最大 2 つの missed cleavages を許容し、ペプチドの質量について 3 ppm、MS/MS ピークについて 0.8 Da を許容範囲とした。タンパク質の同定に関しては、最低 1 つの MS/MS が存在し、Mascot score が $P < 0.01$ であることを基準とした。

5hmC の絶対定量

2.24 mg のゲノム DNA を、50 mM trimethylamine acetate (pH 5.3), 0.023 units/ μ l nuclease P1 (Wako Pure Chemical Industries) and 0.01 units/ μ l bacterial alkaline phosphatase C75 (Takara Bio) 反応液 8 μ l 中で 37°C、2 h 処理し、ヌクレオシドに分解した。1 μ l の反応液を LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) 及び HP1100 liquid chromatography system (Agilent Technologies) を用いて解析した。ヌクレオシドは、ZIC-cHILIC column (150 mm x 2.1 mm i.d., 3.5 μ m, Merck Millipore) を guard column (20 mm x 2.1 mm i.d., 5 μ m, Merck Millipore) と連結したものを、0.1 ml/min flow rate で multistep linear gradient によって分離した。linear gradient の組成: solvent A [5 mM NH₄OAc (pH 5.3) in water] and B (acetonitrile): 90-40% B for 0-30 min, 40% B for 30-40 min, 40-90% B for 40-45 min and 90% B for 45-55 min。溶出物は直接 electrospray ion source of the mass spectrometer に供し、 m/z 220-500 の範囲でスキャンした。クロマトグラムの UV trace は 254 nm とした。

5hmC の絶対定量においては、1 μ l の消化物を、標品として 10 pmol の deuterium-labeled 5hmC (5hmC-d₃) (Toronto Research Chemicals) と共に質量分析した。ゲノムに含まれていた 5hmC と 5hmC-d₃ は同時に溶出され、同時に検出された。5hmC の定量は、5hmC-d₃ のピーク強度に対する割合から算出した。ゲノムに含まれる C の量は、UV 吸収スペクトルの積分値から、C の既知の molar absorption coefficient¹³⁸ を用いて算出した。

ChIP アッセイ

細胞はディッシュ上で、終濃度 1% のホルマリンによって常温にて 15 min 処理して固定した。終濃度 125 mM のグリシンによって常温 15 min 処理して中和した後、PBS で 2 回

洗浄後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) に懸濁し、Handy Sonic (TOMY) を用いて破碎した (sonication 30 s at level 5, interval 30 s x 8 set) 。21,500 g、15min 遠心後、上清に含まれる DNA について、断片長が約 250 bp であることを確認した。上清を ChIP dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl pH8.1, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1.1% TritonX-100, 0.01% SDS, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) を用いて 10 倍希釈した。40 µl の Dynabeads Protein G (Life Technologies) を加えて 4°C で一晩プレクリアを行った。ビーズは 1 ml の low salt buffer (20 mM Tris-HCl pH8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% SDS) で 2 回、high salt buffer (20 mM Tris-HCl pH8.1, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% SDS) で 2 回、LiCl buffer (10 mM Tris-HCl pH8.1, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate) で 2 回、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0) で 2 回洗浄した。DNA は 100 µl の elution buffer (10 mM DTT, 1% SDS, 0.1% NaHCO₃) を用い、常温で 15 min 処理して抽出した。終濃度 200 mM の NaCl 中で 65°C 一晩処理することで脱クロスリンクし、proteinase K で処理後 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した。

リコンビナントタンパク質の強制発現と 5hmC 結合アッセイ

リコンビナント CHTOP は、HaloTag technology (Promega) を用い、Sf9 細胞を用いて生産し、精製した。バキュロウイルスの調製には、Bac-to-Bac system (Life Technologies) を使用した。HaloTag を利用したタンパク精製は、HaloLink Resin (Promega) を使用し、HaloTag の切断は AcTEV Protease (Life Technologies) を使用した。

FLAG タグ結合タンパク質の生産は、pcDNA3 (Life Technologies) に cDNA をクローニングし、HEK293FT 細胞に対して Polyethyleneimine “MAX” (Polysciences) を使用して導入することで行った。24 時間後、回収した細胞を lysis buffer (125 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40) を用いて溶解し、氷上で 20 min 静置後、21,500 g、4°C、20 min.遠心し、上清を細胞抽出液とした。抽出液に対して 40 µl の Dynabeads Streptavidin を加え、4°C で 1 h 処理することでプレクリアを行った後、2 µg の methylated あるいは hydroxymethylated oligonucleotides 及び 20 µl の Dynabeads Streptavidin を加え、4°C で 1 h 処理した。ビーズは wash buffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 0.4% NP40) で 3 回洗浄し、SDS-PAGE にて分離後、anti-FLAG M2 antibody (Sigma) を使用しブロッティングを行った。

CHTOP の強制発現と複合体精製

HEK293FT 細胞に対して FLAG-CHTOP を導入し、lysis buffer (125 mM HEPES-

NaOH pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40) を用いて溶解した。氷上で 20 min 処理後、21,500 g、4°C、20 min 遠心し、上清を細胞抽出液とした。上清に anti-FLAG M2 antibody (Sigma) 及び Dynabeads Protein G を加え、4°C で 1 h 処理した。ビーズを BC300 buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7.6, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% Glycerol) で 3 回、BC100 buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7.6, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% Glycerol) で 1 回洗浄し、FLAG peptide (Sigma) を用いた交換反応によって溶出後、SDS-PAGE によって展開し、SilverQuest Staining Kit (Life Technologies) を用いて銀染色を行った。

CHTOP 複合体の同定

CHTOP と共沈したタンパク質は、銀染色後、ゲルより切り出して精製し、LC-MS/MS によって解析した¹³⁹。タンパク質の同定は、スペクトルデータを Proteome Discoverer Version 1.3 (Thermo Scientific) を用い、SEQUEST に対してアノテーションすることで行った (FDR<0.05)。タンパク質データベースとして NCBI human protein database を使用した。ペプチドの質量について 10 ppm、MS/MS ピークについて 0.5 Da を許容範囲とした。Carbamidomethyl cysteine を fixed modification として指定した。

Salt-extraction アッセイ

細胞核を分離した後、段階的塩濃度の buffer (15 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.5 ~ 1.0 M NaCl) にそれぞれ懸濁し、氷上で 30 min 処理することでタンパク質を抽出した。21,500 g、4°C、20 min 遠心し、上清を核抽出物とし、ブロットイングに供した。Total nuclear protein の精製は、細胞核を RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) で溶解することで行った。

ゲルシフトアッセイ

リコンビナント CHTOP は HaloTag technology (Promega) を用いて調製した。リコンビナント human MBD1 は Abnova 社より購入した (catalog No. H00004152-P01 Lot No. 1010713)。1 µg のタンパク質を、修飾されたシトシンを含む 20 ng の合成二本鎖 DNA と混合し、37°C で 30 min、EMSA buffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 10% glycerol) 中で処理した。処理液を非変性条件下で 1.5% のアガロースゲルで展開し、バンドシフトを検討した。

マウス脳への膠芽腫細胞移植

レンチウイルス感染 1 週間後、細胞の一部を分取し、Total RNA を精製後、qRT-PCR によってノックダウン効率を判定した。ノックダウンを確認できた細胞について、飼育環

境に1週間順化した5週齢のマウス1匹につき 1.0×10^4 細胞を、右前頭葉（正中線より2 mm 右側、coronal suture より1 mm 前方、3 mm の深さ）に移植した。マウスは最低6ヶ月の間モニターし、生存曲線を描いた。全ての動物実験は、東京大学の動物実験委員会の承認のもと、その研究ガイドラインに従って行われた。

マイクロアレイ

GB1-3、GB5細胞のマイクロアレイデータは、Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0 microarray platform (Affymetrix) を使用して取得した。15の膠芽腫細胞の遺伝子発現プロファイルは、Gene Expression Omnibus database GSE7181 and GSE8049⁹²より取得した。データ解析には GenePattern software¹⁴⁰ 及び R を用いた。P-value は pairwise Wilcoxon's test により算出した。

Gene ontology 解析

GO 解析は DAVID¹⁴¹ を用いて行った。解析は KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) の term に限定して行った (FDR < 0.05)。

細胞質・核画分の分離

回収した細胞を、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science) を添加した buffer A (10 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) に懸濁し、type B pestle を用いて 10 strokes 破碎した。破碎液を 1,000 g、4°C、5 min 遠心し、上清を分取した後さらに 21,500 g、4°C、20 min 遠心し、上清を細胞質画分とした。初めの遠心によって得られた沈殿について、hypertonic buffer (HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 25% Glycerol) で2回洗浄し、さらに hypertonic buffer に懸濁して氷上で 30 min 処理した後、21,500 g、4°C、20 min. 遠心し、得られた上清を核画分とした。

イムノブロットイング

SDS-PAGE によって分離したタンパク質は PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) に転写した。メンブレンは 5% skimmed milk in TBS-Tween によって常温 2 h 処理し、ブロッキングした。次にメンブレンを TBS で希釈した 1 次抗体で常温 1 h 処理した。2 次抗体として、anti-rabbit or mouse IgG HRP-linked secondary antibody を使用し、TBS で 1:10000 希釈したもので常温 30 min 処理した。発光基質としては Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用い、撮影には LAS-4000EPUVmini Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) を使用した。

5. 引用文献

- 1 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
- 2 Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development* **21**, 2683-2710, doi:10.1101/gad.1596707 (2007).
- 3 Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401, doi:10.1038/nature03128 (2004).
- 4 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).
- 5 Ignatova, T. N. *et al.* Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* **39**, 193-206, doi:10.1002/glia.10094 (2002).
- 6 Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15178-15183, doi:10.1073/pnas.2036535100 (2003).
- 7 Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research* **64**, 7011-7021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364 (2004).
- 8 Yuan, X. *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392-9400, doi:10.1038/sj.onc.1208311 (2004).
- 9 Takai, H. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell reports* **9**, 48-60, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.071 (2014).
- 10 Shen, L., Song, C. X., He, C. & Zhang, Y. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. *Annual review of biochemistry* **83**, 585-614, doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035513 (2014).
- 11 He, Y. F. *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303-1307, doi:10.1126/science.1210944 (2011).
- 12 Ito, S. *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300-1303, doi:10.1126/science.1210597 (2011).
- 13 Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935, doi:10.1126/science.1170116 (2009).

- 14 Spruijt, C. G. *et al.* Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **152**, 1146-1159, doi:10.1016/j.cell.2013.02.004 (2013).
- 15 TCGA. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-1068, doi:10.1038/nature07385 (2008).
- 16 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111, doi:10.1038/35102167 (2001).
- 17 Pardal, R., Clarke, M. F. & Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 895-902, doi:10.1038/nrc1232 (2003).
- 18 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* **3**, 730-737 (1997).
- 19 Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3983-3988, doi:10.1073/pnas.0530291100 (2003).
- 20 Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* **65**, 10946-10951, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018 (2005).
- 21 Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* **67**, 1030-1037, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030 (2007).
- 22 O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110, doi:10.1038/nature05372 (2007).
- 23 Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 973-978, doi:10.1073/pnas.0610117104 (2007).
- 24 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, doi:10.1038/nature05384 (2007).
- 25 Schatton, T. *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**, 345-349, doi:10.1038/nature06489 (2008).
- 26 Chen, J. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**, 522-526, doi:10.1038/nature11287 (2012).
- 27 Chen, J., McKay, R. M. & Parada, L. F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* **149**, 36-47, doi:10.1016/j.cell.2012.03.009 (2012).
- 28 Feuring-Buske, M. & Hogge, D. E. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation

- of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **97**, 3882-3889 (2001).
- 29 Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760, doi:10.1038/nature05236 (2006).
- 30 Wang, R. *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**, 829-833, doi:10.1038/nature09624 (2010).
- 31 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824-828, doi:10.1038/nature09557 (2010).
- 32 Cheng, L. *et al.* Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153**, 139-152, doi:10.1016/j.cell.2013.02.021 (2013).
- 33 Bertolini, G. *et al.* Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16281-16286, doi:10.1073/pnas.0905653106 (2009).
- 34 Bao, S. *et al.* Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer research* **68**, 6043-6048, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1079 (2008).
- 35 Ogden, A. T. *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* **62**, 505-514; discussion 514-505, doi:10.1227/01.neu.0000316019.28421.95 (2008).
- 36 Lathia, J. D. *et al.* Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell stem cell* **6**, 421-432, doi:10.1016/j.stem.2010.02.018 (2010).
- 37 Zheng, H. *et al.* PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer cell* **17**, 497-509, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.020 (2010).
- 38 Ikushima, H. *et al.* Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell stem cell* **5**, 504-514, doi:10.1016/j.stem.2009.08.018 (2009).
- 39 Lee, J. *et al.* Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer cell* **13**, 69-80, doi:10.1016/j.ccr.2007.12.005 (2008).
- 40 Li, Z. *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* **15**, 501-513, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018 (2009).
- 41 Penuelas, S. *et al.* TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer cell* **15**, 315-327, doi:10.1016/j.ccr.2009.02.011 (2009).

- 42 Penn, N. W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K. & Yura, R. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *The Biochemical journal* **126**, 781-790 (1972).
- 43 Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F. & Leonhardt, H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic acids research* **38**, e181, doi:10.1093/nar/gkq684 (2010).
- 44 Kinney, S. M. *et al.* Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *The Journal of biological chemistry* **286**, 24685-24693, doi:10.1074/jbc.M110.217083 (2011).
- 45 Kraus, A. M., Park, Y. J., Plass, C. & Schmeiser, H. H. Determination of genomic 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human DNA by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **6**, 560-565, doi:10.4161/epi.6.5.15678 (2011).
- 46 Globisch, D. *et al.* Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PloS one* **5**, e15367, doi:10.1371/journal.pone.0015367 (2010).
- 47 Munzel, M. *et al.* Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angewandte Chemie* **49**, 5375-5377, doi:10.1002/anie.201002033 (2010).
- 48 Kriaucionis, S. & Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929-930, doi:10.1126/science.1169786 (2009).
- 49 Zhang, H. *et al.* TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell research* **20**, 1390-1393, doi:10.1038/cr.2010.156 (2010).
- 50 Borst, P. & Sabatini, R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annual review of microbiology* **62**, 235-251, doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162750 (2008).
- 51 Ito, S. *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133, doi:10.1038/nature09303 (2010).
- 52 Koh, K. P. *et al.* Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell* **8**, 200-213, doi:10.1016/j.stem.2011.01.008 (2011).
- 53 Ficuz, G. *et al.* Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398-402, doi:10.1038/nature10008 (2011).
- 54 Pastor, W. A. *et al.* Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic

- stem cells. *Nature* **473**, 394-397, doi:10.1038/nature10102 (2011).
- 55 Xu, Y. *et al.* Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular cell* **42**, 451-464, doi:10.1016/j.molcel.2011.04.005 (2011).
- 56 Williams, K. *et al.* TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**, 343-348, doi:10.1038/nature10066 (2011).
- 57 Wu, H. *et al.* Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes & development* **25**, 679-684, doi:10.1101/gad.2036011 (2011).
- 58 Wu, H. *et al.* Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**, 389-393, doi:10.1038/nature09934 (2011).
- 59 Oswald, J. *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology : CB* **10**, 475-478 (2000).
- 60 Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. & Haaf, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-502, doi:10.1038/35000654 (2000).
- 61 Hajkova, P. *et al.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of development* **117**, 15-23 (2002).
- 62 Sasaki, H. & Matsui, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature reviews. Genetics* **9**, 129-140, doi:10.1038/nrg2295 (2008).
- 63 Meissner, A. *et al.* Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**, 766-770, doi:10.1038/nature07107 (2008).
- 64 Lister, R. & Ecker, J. R. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome research* **19**, 959-966, doi:10.1101/gr.083451.108 (2009).
- 65 Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature reviews. Genetics* **14**, 204-220, doi:10.1038/nrg3354 (2013).
- 66 Seisenberger, S., Peat, J. R. & Reik, W. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Current opinion in cell biology* **25**, 281-288, doi:10.1016/j.ceb.2013.02.013 (2013).
- 67 Iqbal, K., Jin, S. G., Pfeifer, G. P. & Szabo, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3642-3647, doi:10.1073/pnas.1014033108 (2011).
- 68 Shi, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953, doi:10.1016/j.cell.2004.12.012 (2004).
- 69 Klose, R. J., Kallin, E. M. & Zhang, Y. JmJc-domain-containing proteins and histone

- demethylation. *Nature reviews. Genetics* **7**, 715-727, doi:10.1038/nrg1945 (2006).
- 70 Tsukada, Y. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-816, doi:10.1038/nature04433 (2006).
- 71 Klose, R. J. & Zhang, Y. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 307-318, doi:10.1038/nrm2143 (2007).
- 72 Mosammaparast, N. & Shi, Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annual review of biochemistry* **79**, 155-179, doi:10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946 (2010).
- 73 Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K. & Helin, K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & development* **22**, 1115-1140, doi:10.1101/gad.1652908 (2008).
- 74 Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L. & Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423-434, doi:10.1016/j.cell.2011.03.022 (2011).
- 75 Rai, K. *et al.* DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* **135**, 1201-1212, doi:10.1016/j.cell.2008.11.042 (2008).
- 76 Kangaspeska, S. *et al.* Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**, 112-115, doi:10.1038/nature06640 (2008).
- 77 Metivier, R. *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45-50, doi:10.1038/nature06544 (2008).
- 78 Pfaffeneder, T. *et al.* Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nature chemical biology* **10**, 574-581, doi:10.1038/nchembio.1532 (2014).
- 79 Inoue, A. & Zhang, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* **334**, 194, doi:10.1126/science.1212483 (2011).
- 80 Szulwach, K. E. *et al.* 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature neuroscience* **14**, 1607-1616, doi:10.1038/nn.2959 (2011).
- 81 Loenarz, C. & Schofield, C. J. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. *Chemistry & biology* **16**, 580-583, doi:10.1016/j.chembiol.2009.06.002 (2009).
- 82 Hahn, M. A. *et al.* Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis. *Cell reports*, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.011 (2013).
- 83 Bachman, M. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA

- modification. *Nature chemistry* **6**, 1049-1055, doi:10.1038/nchem.2064 (2014).
- 84 Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S. & Heintz, N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* **151**, 1417-1430, doi:10.1016/j.cell.2012.11.022 (2012).
- 85 Ono, R. *et al.* LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer research* **62**, 4075-4080 (2002).
- 86 Lorsbach, R. B. *et al.* TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* **17**, 637-641, doi:10.1038/sj.leu.2402834 (2003).
- 87 Bejar, R., Levine, R. & Ebert, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 504-515, doi:10.1200/JCO.2010.31.1175 (2011).
- 88 Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839-843, doi:10.1038/nature09586 (2010).
- 89 Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* **18**, 553-567, doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015 (2010).
- 90 Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* **19**, 17-30, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014 (2011).
- 91 Verhaak, R. G. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020 (2010).
- 92 Lottaz, C. *et al.* Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer research* **70**, 2030-2040, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1707 (2010).
- 93 Noushmehr, H. *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell* **17**, 510-522, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017 (2010).
- 94 Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell* **9**, 157-173, doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019 (2006).
- 95 Zullo, A. J., Michaud, M., Zhang, W. & Grusby, M. J. Identification of the small protein rich in arginine and glycine (SRAG): a newly identified nucleolar protein

- that can regulate cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12504-12511, doi:10.1074/jbc.M809436200 (2009).
- 96 Chang, C. T. *et al.* Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. *The EMBO journal* **32**, 473-486, doi:10.1038/emboj.2012.342 (2013).
- 97 Patel, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**, 1396-1401, doi:10.1126/science.1254257 (2014).
- 98 Friedmann-Morvinski, D. *et al.* Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* **338**, 1080-1084, doi:10.1126/science.1226929 (2012).
- 99 Huse, J. T. & Holland, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature reviews. Cancer* **10**, 319-331, doi:10.1038/nrc2818 (2010).
- 100 Liu, C. *et al.* Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* **146**, 209-221, doi:10.1016/j.cell.2011.06.014 (2011).
- 101 Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462-477, doi:10.1016/j.cell.2013.09.034 (2013).
- 102 Haffner, M. C. *et al.* Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* **2**, 627-637 (2011).
- 103 Kraus, T. F. *et al.* Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **131**, 1577-1590, doi:10.1002/ijc.27429 (2012).
- 104 Muller, T. *et al.* Nuclear exclusion of TET1 is associated with loss of 5-hydroxymethylcytosine in IDH1 wild-type gliomas. *The American journal of pathology* **181**, 675-683, doi:10.1016/j.ajpath.2012.04.017 (2012).
- 105 Orr, B. A., Haffner, M. C., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S. & Eberhart, C. G. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PloS one* **7**, e41036, doi:10.1371/journal.pone.0041036 (2012).
- 106 Parsons, D. W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812, doi:10.1126/science.1164382 (2008).
- 107 Kang, M. R. *et al.* Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 353-355, doi:10.1002/ijc.24379 (2009).
- 108 Krell, D. *et al.* Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in

- glioblastoma. *PloS one* **6**, e19868, doi:10.1371/journal.pone.0019868 (2011).
- 109 Sturm, D. *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell* **22**, 425-437, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024 (2012).
- 110 Ozawa, T. *et al.* Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer cell* **26**, 288-300, doi:10.1016/j.ccr.2014.06.005 (2014).
- 111 Dawlaty, M. M. *et al.* Combined deficiency of tet1 and tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Developmental cell* **24**, 310-323, doi:10.1016/j.devcel.2012.12.015 (2013).
- 112 Dawlaty, M. M. *et al.* Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell stem cell* **9**, 166-175, doi:10.1016/j.stem.2011.07.010 (2011).
- 113 Daujat, S. *et al.* Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Current biology : CB* **12**, 2090-2097 (2002).
- 114 Guo, Z. *et al.* Methylation of FEN1 suppresses nearby phosphorylation and facilitates PCNA binding. *Nature chemical biology* **6**, 766-773, doi:10.1038/nchembio.422 (2010).
- 115 Sakamaki, J. *et al.* Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 6085-6090, doi:10.1073/pnas.1015328108 (2011).
- 116 Yamagata, K. *et al.* Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Molecular cell* **32**, 221-231, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.013 (2008).
- 117 Chen, C., Nott, T. J., Jin, J. & Pawson, T. Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 629-642, doi:10.1038/nrm3185 (2011).
- 118 Liu, K. *et al.* Crystal structure of TDRD3 and methyl-arginine binding characterization of TDRD3, SMN and SPF30. *PloS one* **7**, e30375, doi:10.1371/journal.pone.0030375 (2012).
- 119 Sims, R. J., 3rd *et al.* The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* **332**, 99-103, doi:10.1126/science.1202663 (2011).
- 120 Yang, Y. *et al.* TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks. *Molecular cell* **40**, 1016-1023, doi:10.1016/j.molcel.2010.11.024 (2010).
- 121 Wang, H. *et al.* Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional

- activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-857, doi:10.1126/science.1060781 (2001).
- 122 Chen, D. *et al.* Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**, 2174-2177 (1999).
- 123 Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **13**, 37-50, doi:10.1038/nrc3409 (2013).
- 124 Liu, F. *et al.* JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer cell* **19**, 283-294, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.020 (2011).
- 125 Aggarwal, P. *et al.* Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer cell* **18**, 329-340, doi:10.1016/j.ccr.2010.08.012 (2010).
- 126 Jansson, M. *et al.* Arginine methylation regulates the p53 response. *Nature cell biology* **10**, 1431-1439, doi:10.1038/ncb1802 (2008).
- 127 Powers, M. A., Fay, M. M., Factor, R. E., Welm, A. L. & Ullman, K. S. Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4. *Cancer research* **71**, 5579-5587, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0458 (2011).
- 128 Hsu, J. M. *et al.* Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nature cell biology* **13**, 174-181, doi:10.1038/ncb2158 (2011).
- 129 Cheung, N., Chan, L. C., Thompson, A., Cleary, M. L. & So, C. W. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nature cell biology* **9**, 1208-1215, doi:10.1038/ncb1642 (2007).
- 130 Shia, W. J. *et al.* PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* **119**, 4953-4962, doi:10.1182/blood-2011-04-347476 (2012).
- 131 James, L. I. *et al.* Discovery of a chemical probe for the L3MBTL3 methyllysine reader domain. *Nature chemical biology* **9**, 184-191, doi:10.1038/nchembio.1157 (2013).
- 132 Liu, F. *et al.* Discovery of an in vivo chemical probe of the lysine methyltransferases G9a and GLP. *Journal of medicinal chemistry* **56**, 8931-8942, doi:10.1021/jm401480r (2013).
- 133 Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* **9**, 357-359, doi:10.1038/nmeth.1923 (2012).
- 134 Nakato, R., Itoh, T. & Shirahige, K. DROMPA: easy-to-handle peak calling and

- visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**, 589-601, doi:10.1111/gtc.12058 (2013).
- 135 Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* **14**, R36, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36 (2013).
- 136 Trapnell, C. *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature biotechnology* **31**, 46-53, doi:10.1038/nbt.2450 (2013).
- 137 Kozuka-Hata, H. *et al.* Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome. *PloS one* **7**, e43398, doi:10.1371/journal.pone.0043398 (2012).
- 138 Fox, J. J. & Shugar, D. Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. II. Natural and synthetic pyrimidine nucleosides. *Biochimica et biophysica acta* **9**, 369-384 (1952).
- 139 Yokoyama, A. *et al.* Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochemical and biophysical research communications* **410**, 749-753, doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.033 (2011).
- 140 Reich, M. *et al.* GenePattern 2.0. *Nature genetics* **38**, 500-501, doi:10.1038/ng0506-500 (2006).
- 141 Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842, doi:10.1093/bioinformatics/btq033 (2010).

図と表

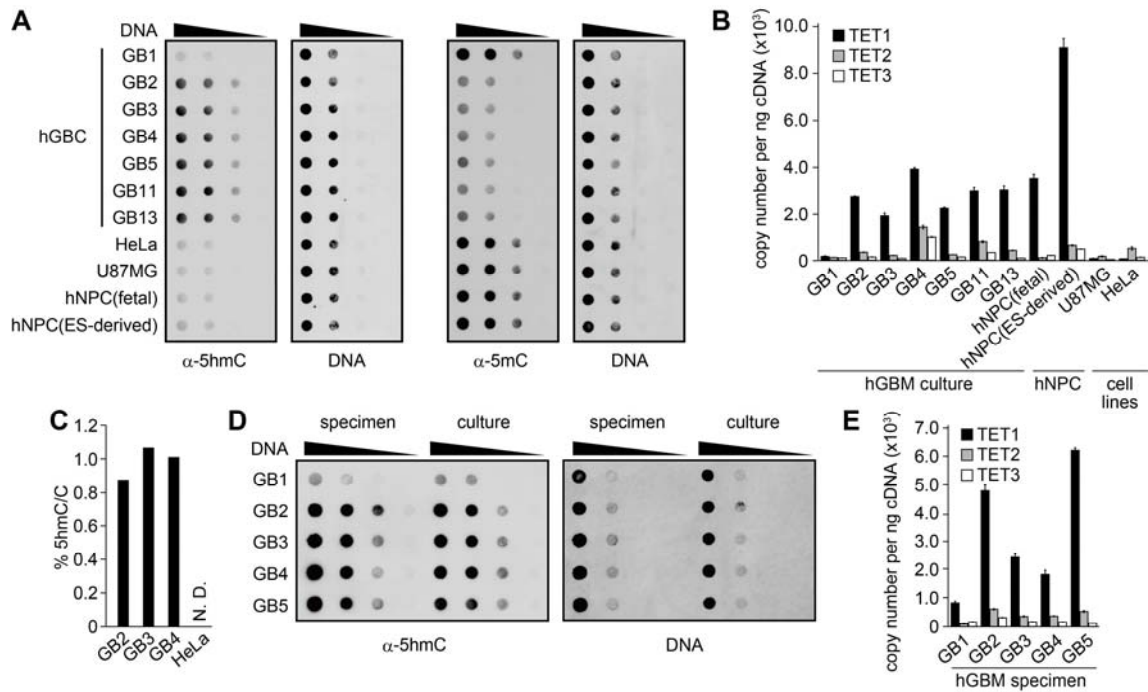


Figure 1. 膠芽腫におけるゲノムの 5hmC 化の亢進

- (A) ヒト膠芽腫細胞と正常神経幹細胞からゲノム DNA を抽出し、5hmC と 5mC 量をドットプロットにより比較解析した。
- (B) 膠芽腫細胞、ヒト正常神経幹細胞、がん細胞培養株における TET1~TET3 の mRNA 量を qRT-PCR により絶対定量した。Copy number は、TET1~TET3 の cDNA を含む既知濃度の plasmid を使用して検量線を引き、算出した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (C) 質量分析により、5hmC の絶対量を測定した。N.D., not detected.
- (D) 膠芽腫検体と、対応する膠芽腫無血清培養細胞における 5hmC 量をドットプロットにより比較解析した。
- (E) 膠芽腫検体における TET1~TET3 の発現量を qRT-PCR により絶対定量した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。

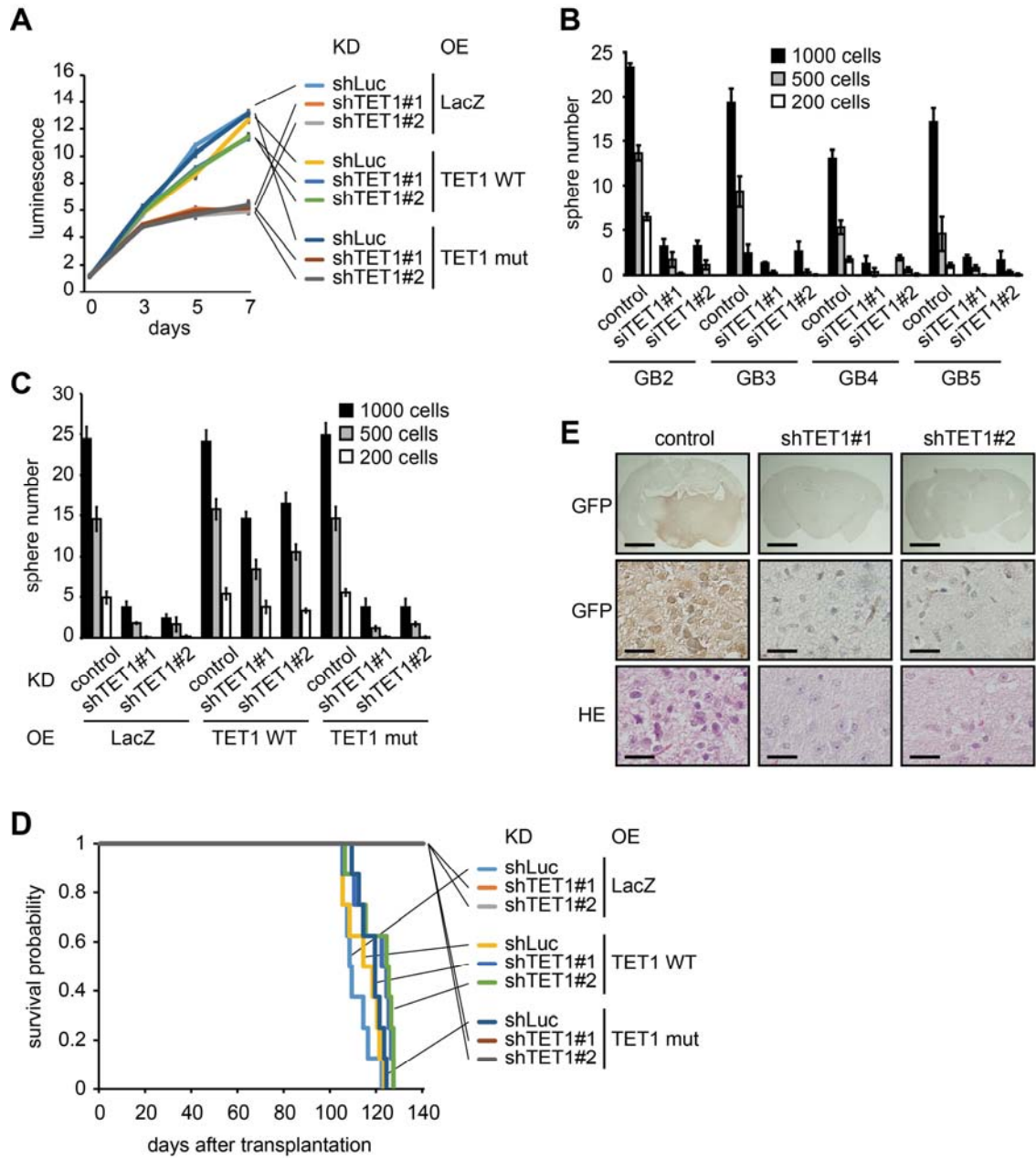


Figure 2. TET1 の酵素活性は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である

- (A) レンチウイルスを利用し、RNAi によって TET1 を抑制した場合の GB2 細胞の生育速度を検討した。また、レンチウイルスを用いて TET1 WT（野生型）、TET1 mut（不活性型変異体）を強制発現し、生育速度が回復するか検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (B) siRNA によって TET1 を抑制した場合に、膠芽腫細胞が形成するスフィア数を計数した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (C) shRNA によって TET1 を抑制した GB2 細胞のスフィア数を計数した。また、レンチウイルスを用いて TET1 WT、TET1 mut を強制発現し、スフィア数が回復するか検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (D) 1.0×10^4 個の GB2 細胞を脳に移植した免疫不全マウスのカプランマイヤー生存曲線を示した。TET1 のノックダウンと強制発現には、レンチウイルスを用いた。また、レンチウイルスを用いて TET1 WT、TET1 mut を強制発現し、造腫瘍性が回復するか検討した。1 群につき 8 匹のマウスを使用した。
- (E) Panel D と同様に GB2 を移植したマウスの脳を、移植後 100 日目に摘出した後、パラフィン切片を作製し、HE 染色と GFP 染色によって腫瘍を可視化した。Scale bars, 2 mm (Upper panels) and 50 μ m (Lower panels).

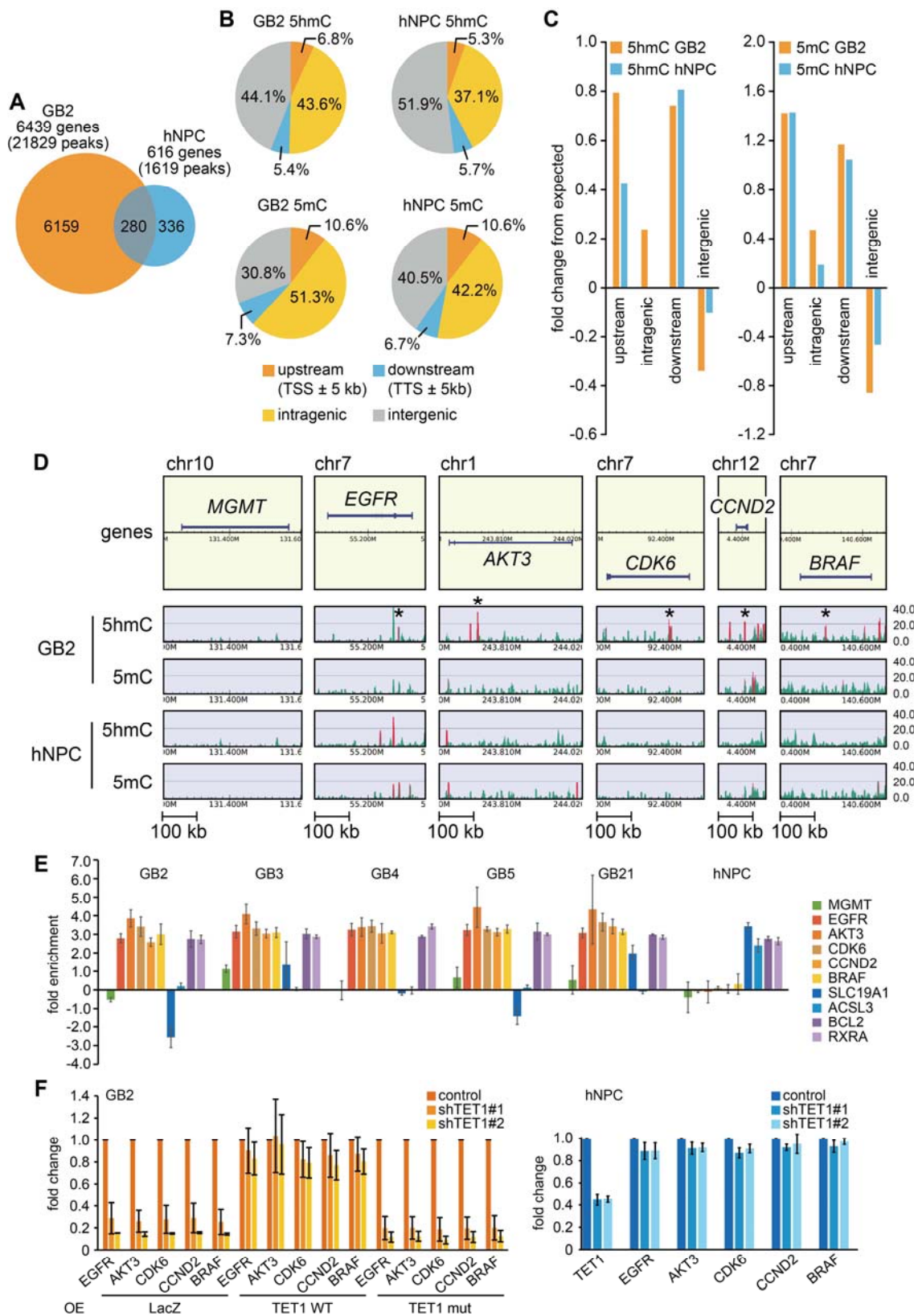


Figure 3. 5hmC は膠芽腫発生に重要な遺伝子群に有意に多く存在する

- (A) GB2 細胞とヒト正常神経幹細胞において、(h)MeDIP-seq により 5hmC のピークが確認された遺伝子数をベン図で示した。
- (B) 5mC, 5hmC ピークの確認された部位を、upstream (転写開始点より前後 5 kb の領域), downstream (転写終結点より前後 5 kb の領域), intragenic (遺伝子内部の領域), intergenic (遺伝子をコードしない領域) の 4 領域に分類し、それぞれの割合を示した。
- (C) GB2 において、5hmC 及び 5mC が、Panel B の 4 領域について、ランダムに存在すると仮定した場合の期待値よりどの程度多く存在しているかを示した。
- (D) 5hmC が存在する遺伝子のうち、膠芽腫発生に重要とされる遺伝子の例を示した。シグナル強度が有意とされるピークを赤で示した。Panel E に示す(h)MeDIP-qPCR によって 5hmC の存在を確認したピークをアスタリスクで示した。*MGMT* 遺伝子をネガティブコントロールとして示した。
- (E) 膠芽腫細胞及びヒト正常神経幹細胞において、hMeDIP-qPCR によって 5hmC の局在を確認した。*SLC19A1* と *ACSL3* は正常神経幹細胞、*BCL2* と *RXR α* は膠芽腫と正常神経幹細胞の両者におけるポジティブコントロールとして使用した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (F) 膠芽腫細胞及び正常神経幹細胞において TET1 をノックダウンした場合の、Panel D に示した遺伝子群の発現量変化を qRT-PCR によって検討した。また、レンチウイルスを用いて TET1 WT、TET1 mut を強制発現し、発現量が回復するか検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。

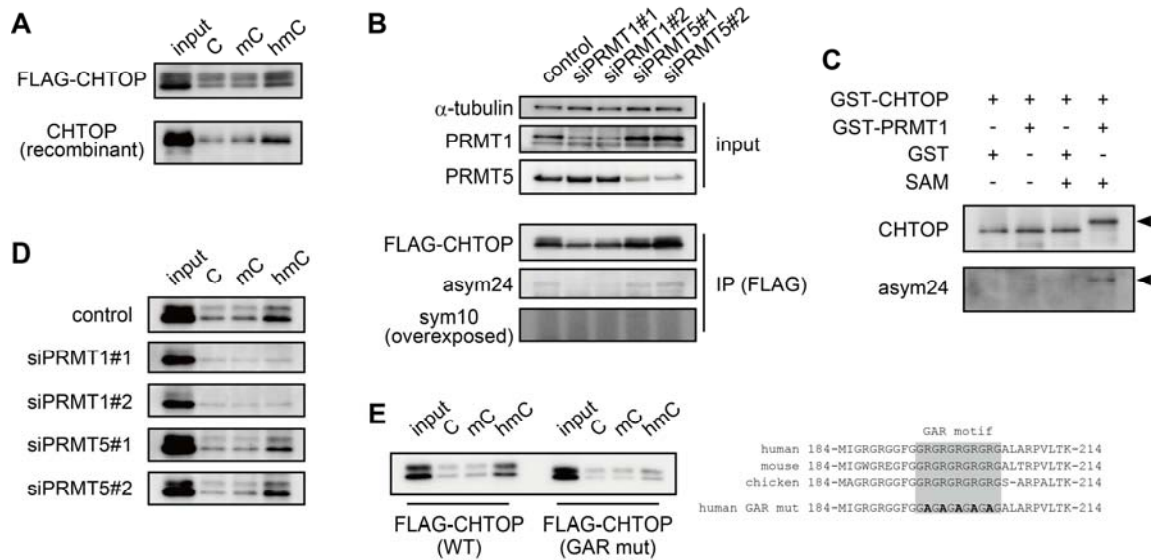


Figure 4. CHTOP は膠芽腫細胞において 5hmC と結合する

(A) C、5mC、5hmC の各修飾シトシンを含んだ合成オリゴをビオチン標識

し、FLAG-CHTOP を強制発現した HEK293FT 細胞の抽出物 (Upper panel) もしくはバキュロウイルスシステムを用いて調製した精製 CHTOP タンパク質 (Lower panel) と混合し、ビオチン-アビジン結合を利用したプルダウンを行った後、ブロッティングに供した。C, unmodified cytosine; mC, 5-methylcytosine; hmC, 5-hydroxymethylcytosine.

(B) FLAG-CHTOP を HEK293FT 細胞に強制発現し、PRMT1 あるいは PRMT5 を siRNA を用いてノックダウンした後、FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、ブロッティングに供した。asym24, antibody against asymmetrically dimethylated arginine; sym10, antibody against symmetrically dimethylated arginine.

(C) 大腸菌を用いて調製した GST-CHTOP を、同様に調製した GST-PRMT1 と混合し、CHTOP がメチル化を受けるかブロッティングによって検討した。非対称的ジメチル化を受けた CHTOP のバンドを矢頭で示した。

- (D) FLAG-CHTOP を強制発現した HEK293FT 細胞において PRMT1 あるいは PRMT5 を siRNA を用いてノックダウンし、Panel A と同様のプルダウンとブロッキング実験に供した。
- (E) FLAG-CHTOP WT (野生型) あるいは FLAG-CHTOP GAR mut (GAR motif 変異型) を HEK293FT 細胞に強制発現し、Panel A と同様のプルダウンとブロッキング実験に供した。GAR motif の配列を Right panel に示した。

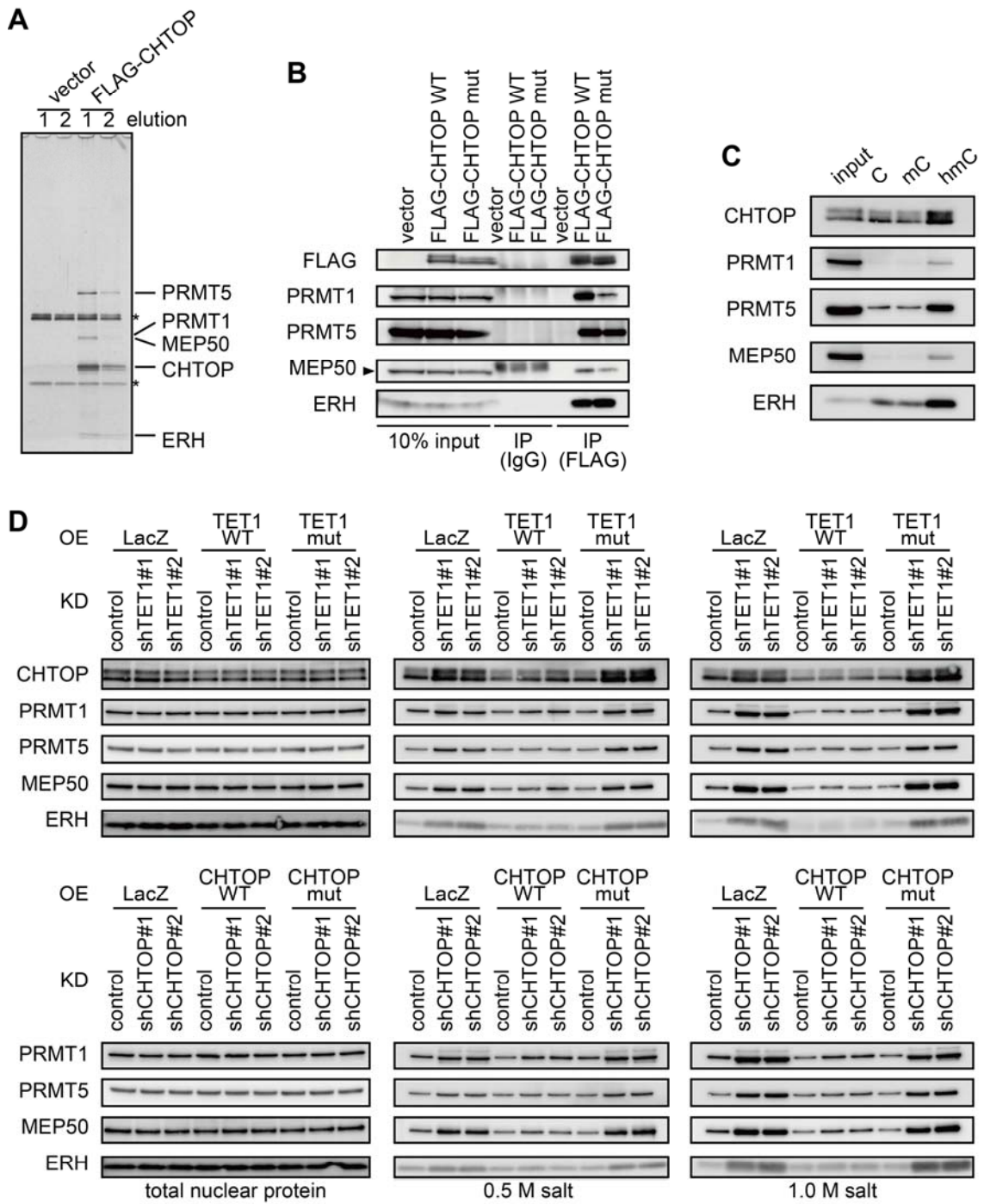


Figure 5. CHTOP は methylosome とともに 5hmC に結合する

- (A) FLAG-CHTOP を HEK293FT 細胞に強制発現し、その核抽出物より FLAG-CHTOP を免疫沈降後、SDS-PAGE によって展開し、銀染色に供した。CHTOP と共沈したタンパク質について、ゲルより切り出し、質量分析によって同定した。アスタリスクは IgG 鎖を示す。
- (B) Panel A と同様に GB2 細胞に FLAG-CHTOP を強制発現し、免疫沈降後にブロットティングに供した。
- (C) GB2 細胞を用いて、Figure 4A と同様な化学合成オリゴを用いたプルダウン実験を行い、ブロットティングを行った。
- (D) TET1 (Upper panels) あるいは CHTOP (Lower panels) をノックダウンした GB2 細胞より核を分画し、各塩濃度の buffer を用いて抽出した核抽出物をブロットティングに供した。また、野生型、変異型の TET1 あるいは CHTOP を強制発現し、抽出量の変化を検討した。

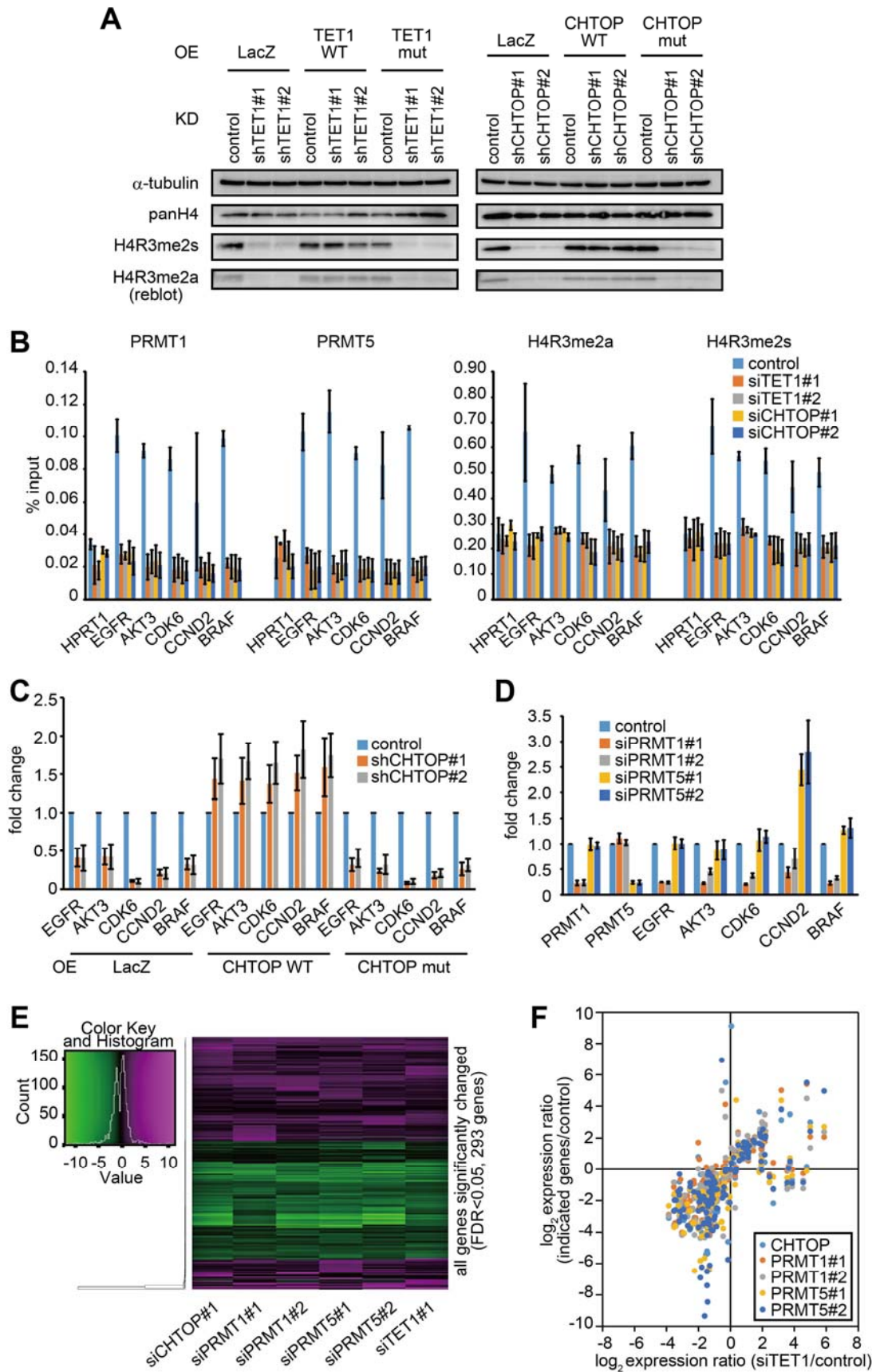


Figure 6. CHTOP-methylosome 複合体は H4R3 をメチル化し、がん関連遺伝子の転写を活性化する

- (A) レンチウイルスを用いて TET1 あるいは CHTOP をノックダウンした GB2 細胞における H4R3me2a と H4R3me2s 量をブロットティングにより検討した。
- (B) siRNA を用いて TET1 あるいは CHTOP をノックダウンした GB2 細胞を用いて、(h)MeDIP によって 5hmC の存在が確認された遺伝子座について、PRMT1, PRMT5, 各ヒストン修飾に対する ChIP を行った。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (C) CHTOP をノックダウンした GB2 細胞において、Figure 3 において 5hmC の存在が確認された造腫瘍性関連遺伝子の発現量を qRT-PCR によって検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (D) PRMT1 あるいは PRMT5 をノックダウンした GB2 細胞における造腫瘍性関連遺伝子の発現量を qRT-PCR によって検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (E) TET1, CHTOP, PRMT1, PRMT5 をそれぞれノックダウンした GB2 細胞における遺伝子発現パターンの変動を RNA-seq によって解析し、ヒートマップで示した。発現量が有意に ($FDR < 0.05$) 変動した遺伝子について示した。
- (F) Panel E の RNA-seq 結果について、Scatter plot で表した。横軸に TET1 をノックダウンした場合の発現量変化を、縦軸に CHTOP, PRMT1, PRMT5 をノックダウンした場合の発現量変化とし、それぞれプロットした。

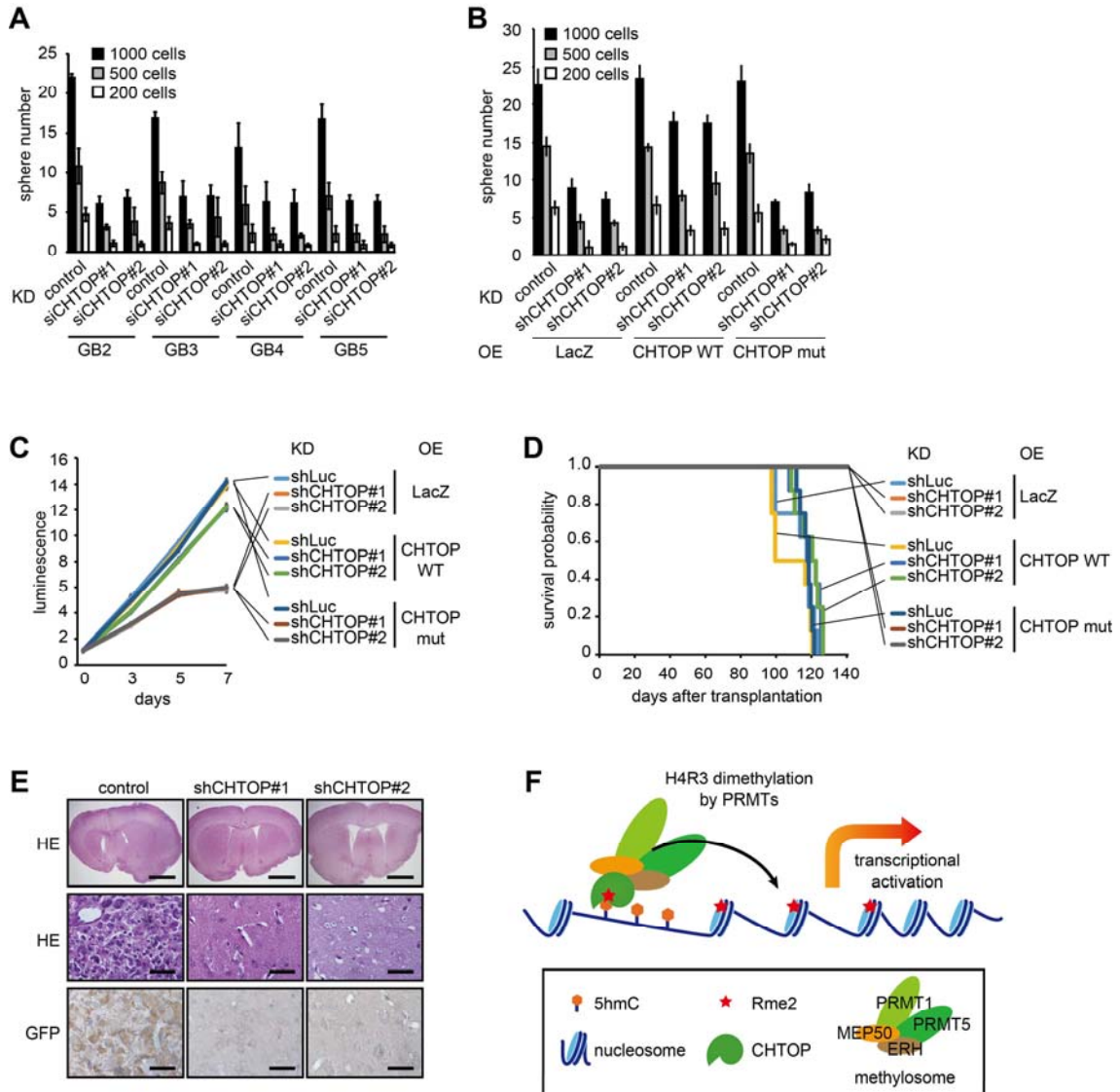


Figure 7. CHTOP は膠芽腫の造腫瘍性維持に必須である

- (A) siRNA を用いて CHTOP を抑制した膠芽腫無血清培養細胞のスフィア数を計数した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (B) shRNA を用いて CHTOP を抑制した GB2 細胞のスフィア数を計数した。また、CHTOP WT あるいは CHTOP GAR mut を強制発現した場合にスフィア数が回復するか検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (C) shRNA を用いて CHTOP を抑制した GB2 細胞の生育速度を計数した。また、CHTOP WT あるいは CHTOP GAR mut を強制発現した場合に生育速度が回復するか検討した。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (D) 1.0×10^4 個の GB2 細胞を脳に移植した免疫不全マウスのカプランマイヤー生存曲線。CHTOP のノックダウンと強制発現はレンチウイルスを用いた。また、レンチウイルスを用いて CHTOP WT、CHTOP GAR mut を強制発現し、造腫瘍性が回復するか検討した。1 群につき 8 匹のマウスを用いた。
- (E) Panel D と同様に GB2 を移植したマウスの脳を、移植後 100 日目に摘出した後、パラフィン切片を作製し、HE 染色と GFP 染色によって腫瘍を可視化した。Scale bars, 2 mm (Upper panels) and 50 μ m (Lower panels).
- (F) CHTOP が methylosome を 5hmC の存在する遺伝子座に誘導し、ヒストンのメチル化を介してがん関連遺伝子の転写を活性化するメカニズムを模式図で示した。

Figure 8~15 の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

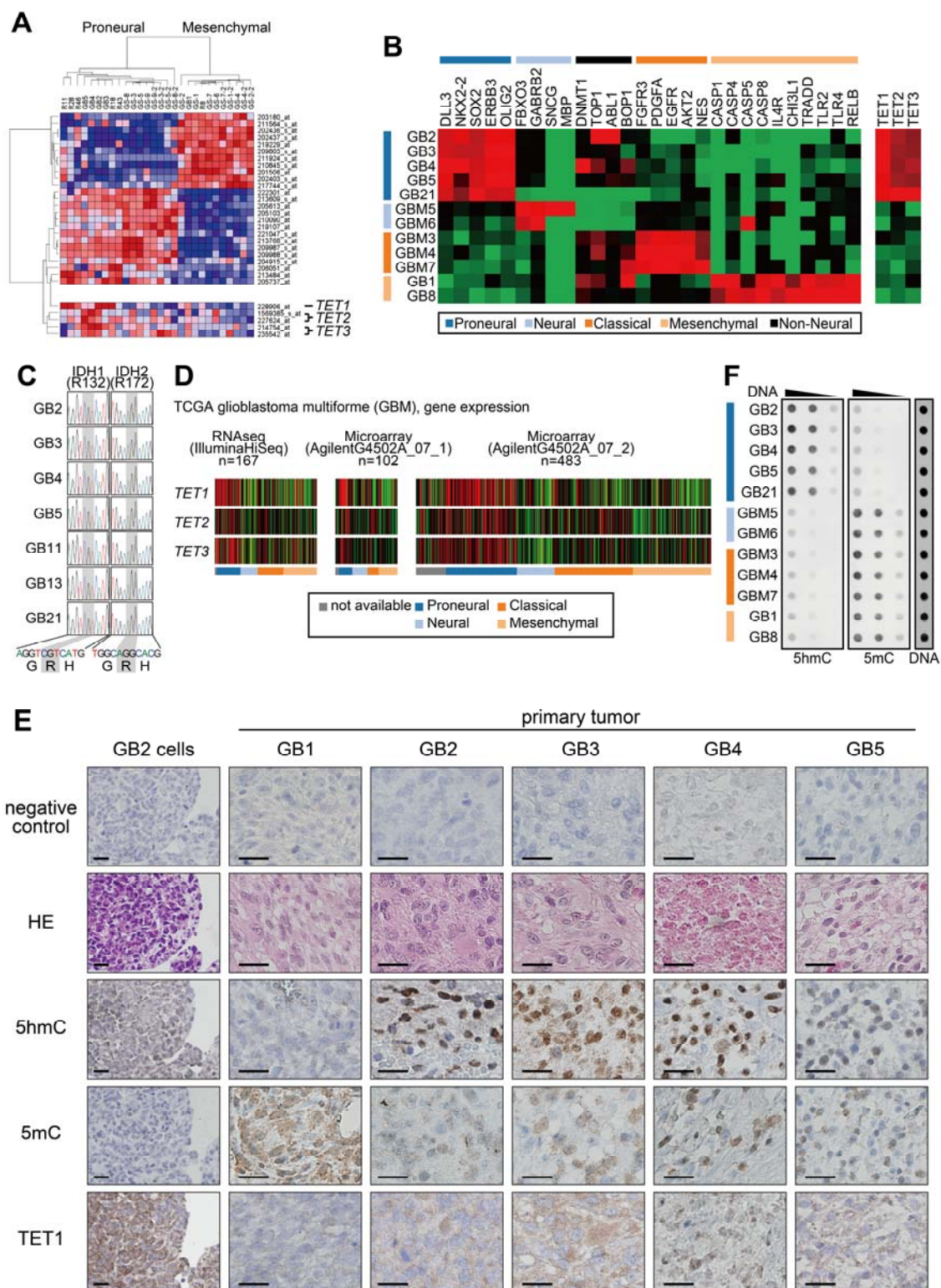


Figure S1. 膠芽腫の各サブタイプにおける TET family の発現

- (A) Proneural, Mesenchymal タイプの膠芽腫細胞における TET family の発現量をヒートマップで示した（発現量高：赤～発現量低：青）。
- (B) 本研究で使用した膠芽腫細胞について、qPCR によって各サブタイプに特徴的な遺伝子の発現量を検討し、サブタイプの分類を行った（発現量高：赤～発現量低：緑）。
- (C) 本研究で使用した Proneural タイプの膠芽腫細胞には、IDH1 の変異 (R132) 及び IDH2 の変異 (R172) が入っていないことをシーケンシングによって確認した。
- (D) Proneural, Mesenchymal, Neural, Classical の 4 つのサブタイプにおける TET family の発現量を示した（発現量高：赤～発現量低：緑）。解析には UCSC Cancer Genomics Browser (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>) を使用した。
- (E) GB2 細胞及び本研究で使用した膠芽腫検体（GB1~GB5）のパラフィン切片を作製し、HE 染色、5hmC, 5mC, TET1 の染色を行った。Scale bars, 12.5 μm .
- (F) Proneural, Mesenchymal, Neural, Classical の 4 つのサブタイプにおける 5hmC の量をドットプロットにより比較した。

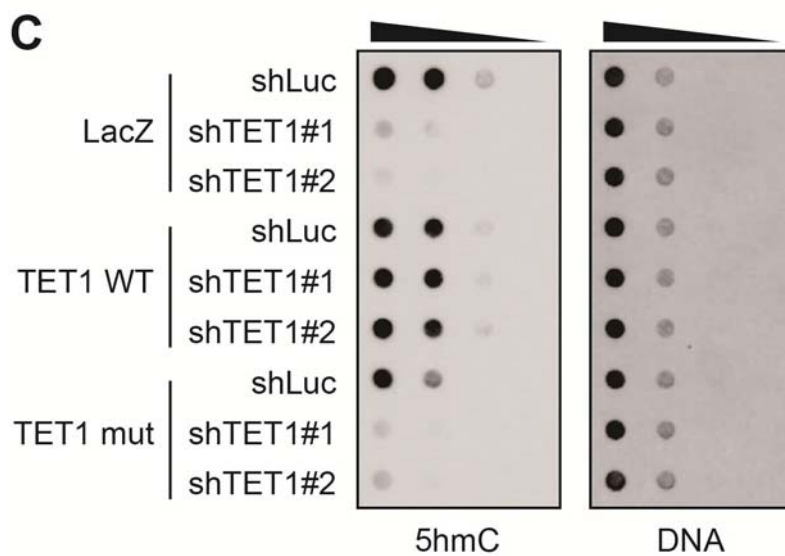
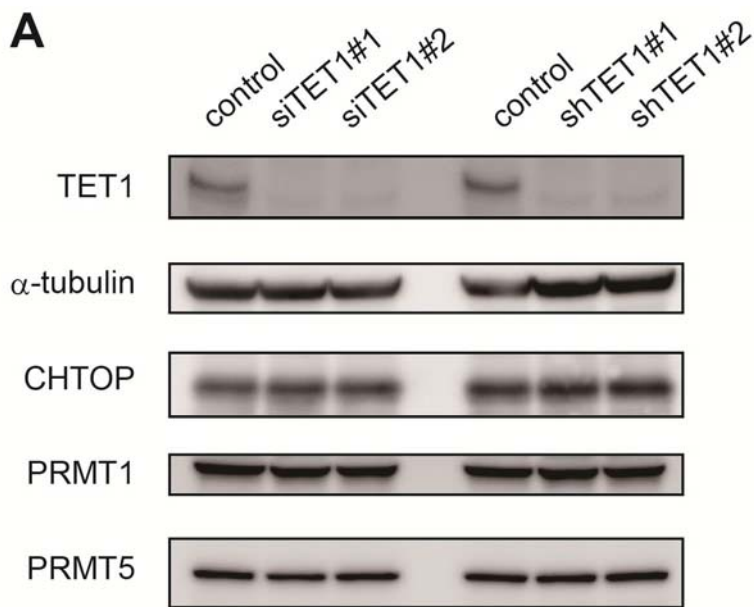


Figure S2. TET1 のノックダウンと強制発現の確認

- (A) siRNA あるいは shRNA を用いて TET1 をノックダウンした GB2 細胞において、ノックダウンをブロッティングによって確認した。このとき、CHTOP, PRMT1, PRMT5 の量についても検討した。
- (B) レンチウイルスを利用して TET1 野生型及び変異型を GB2 細胞に強制発現し、ブロッティングによって確認した。
- (C) Panel B と同様に GB2 細胞において TET1 をノックダウンあるいは強制発現し、5hmC の量をドットプロットによって検討した。

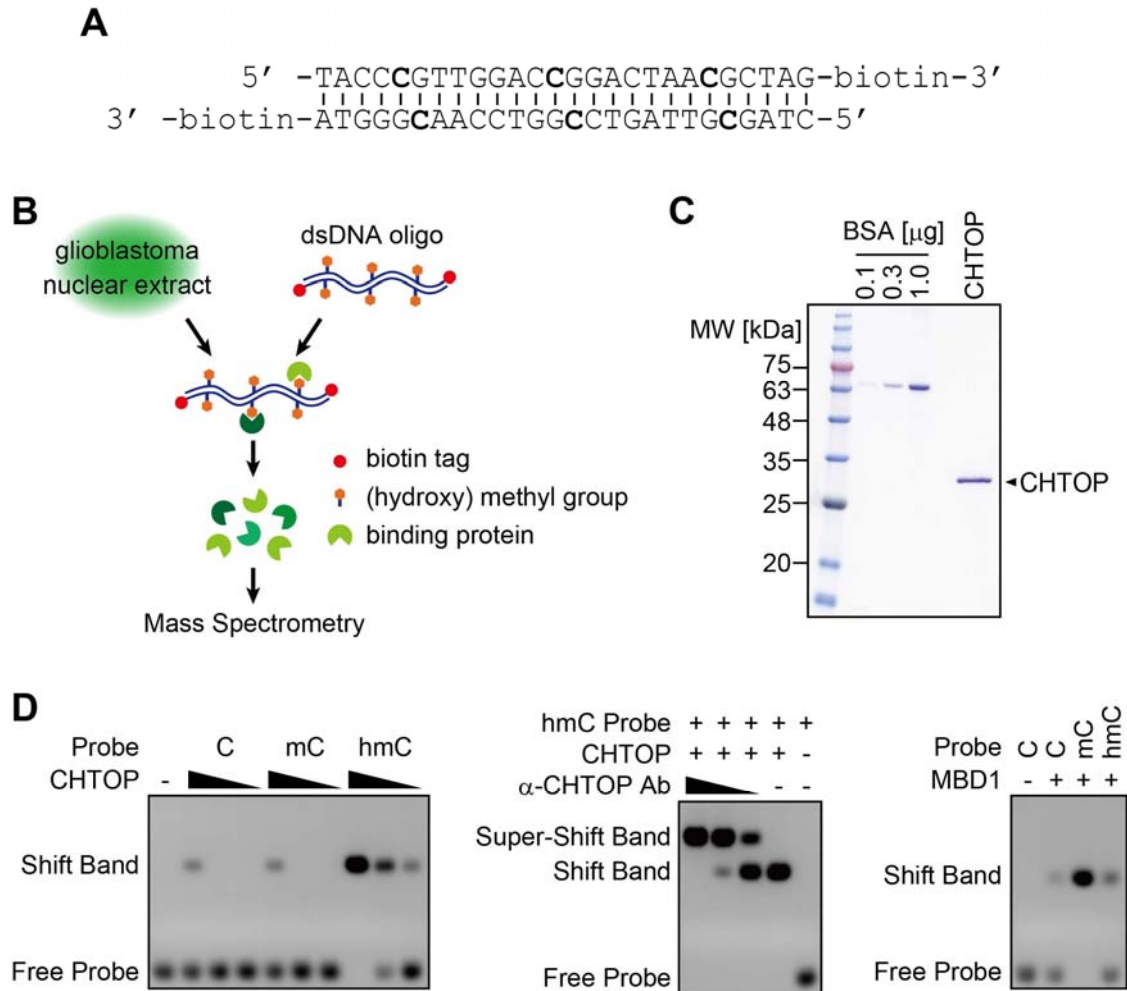


Figure S3. 5hmC 結合タンパク質の探索

(A) 5hmC 結合タンパク質の探索において使用した合成 DNA の配列。修飾シトシンの箇所を太字で示した。

(B) 5hmC あるいは 5mC 結合タンパク質の精製過程を模式図で示した。

(C) 本研究で使用した、バキュロウイルスを利用して精製したリコンビナント CHTOP タンパク質を SDS-PAGE によって展開し、CBB 染色した。

(D) Panel A に示したオリゴと、Panel C に示した CHTOP タンパク質を用い、ゲルシフト実験を行った。5mC 結合タンパク質として、MBD1 を使用した。

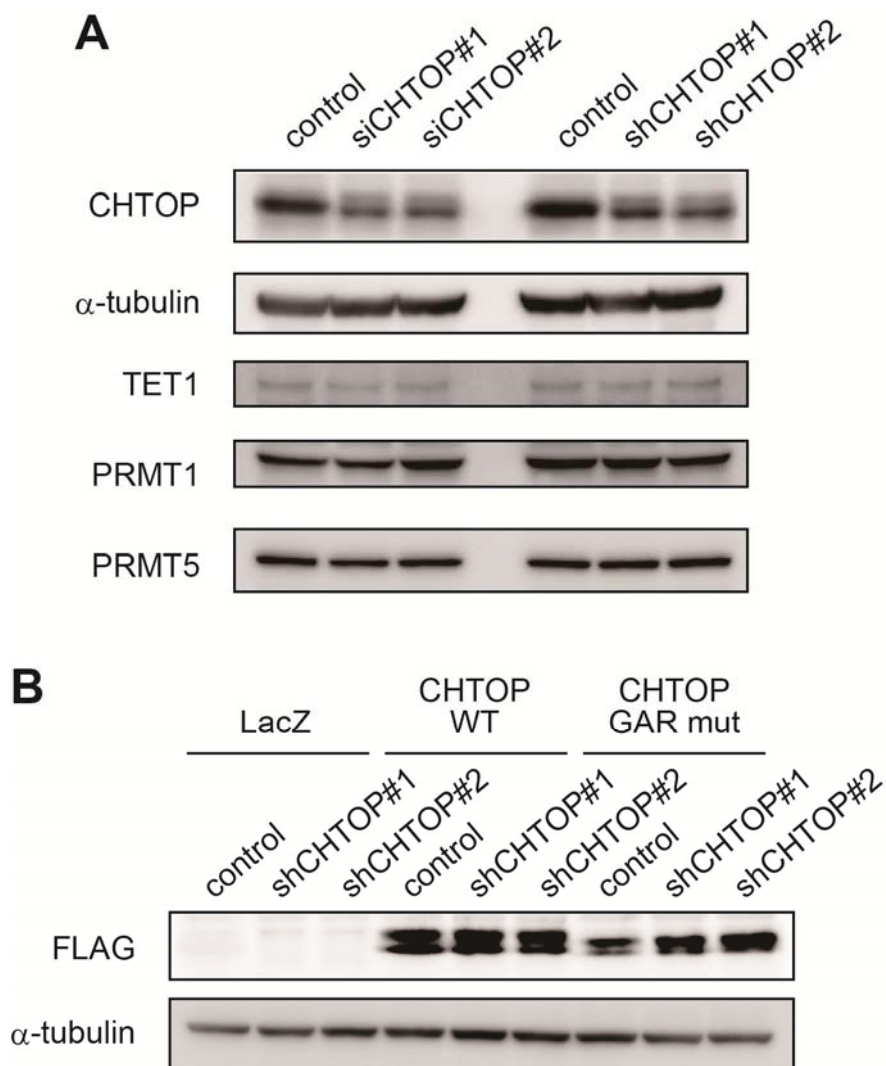


Figure S4. CHTOP のノックダウンと強制発現の確認

(A) GB2 細胞において、siRNA あるいは shRNA を用いて CHTOP をノックダウンし、ブロッティングによってノックダウンを確認した。このとき、TET1, PRMT1, PRMT5 の量についても検討した。

(B) レンチウイルスを利用して CHTOP 野生型及び変異型を GB2 細胞に強制発現し、ブロッティングによって確認した。

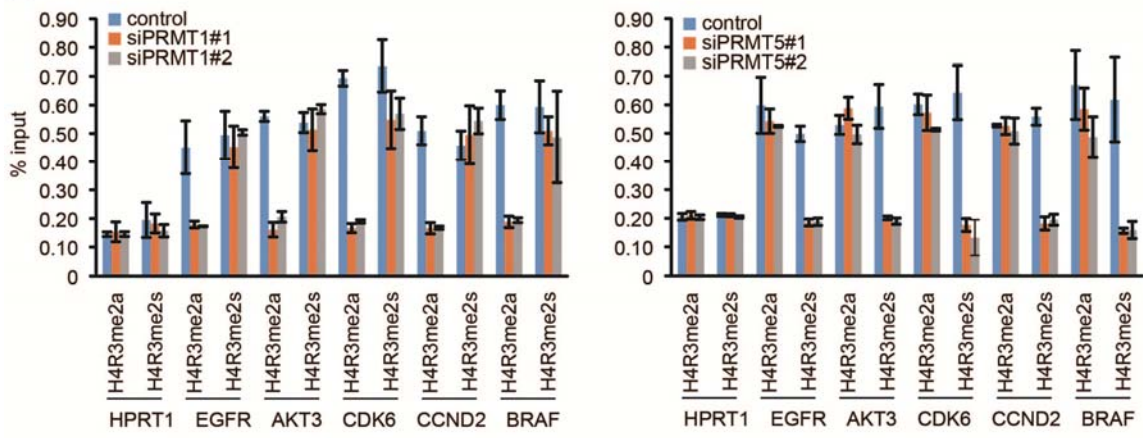
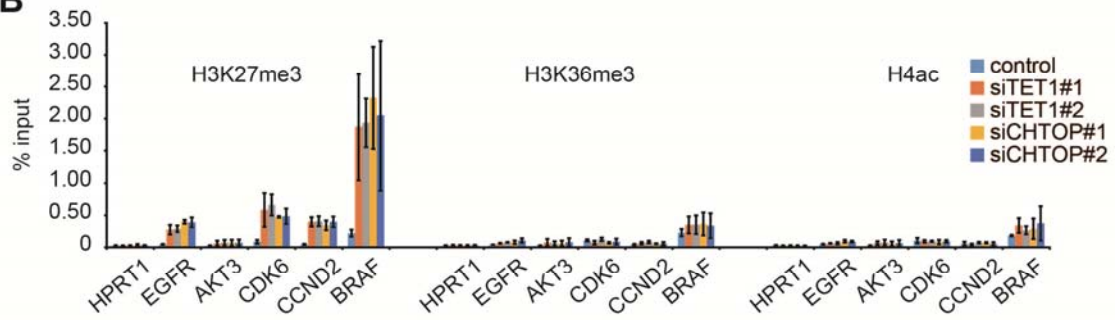
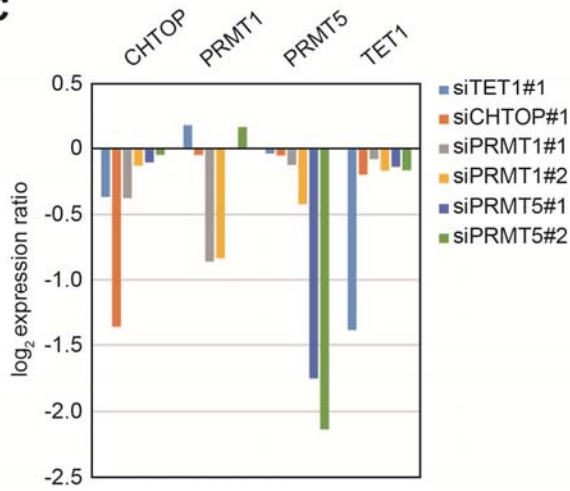
A**B****C**

Figure S5. PRMT1, PRMT5, TET1, CHTOP のノックダウンによるヒストン修飾への影響

- (A) GB2 細胞において、siRNA を用いて PRMT1, PRMT5 をノックダウンし、(h)MeDIP により同定した 5hmC の存在する遺伝子座において、それぞれのヒストン修飾に対する抗体を用いて ChIP 解析を行った。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (B) GB2 細胞において、TET1 及び CHTOP をノックダウンし、(h)MeDIP により同定した 5hmC の存在する遺伝子座において、それぞれのヒストン修飾に対する抗体を用いて ChIP 解析を行った。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を表す。
- (C) Figure 6E, 6F に示した GB2 細胞の RNA-seq 解析において、siRNA によってノックダウンした各遺伝子がノックダウンされていることを確認した。

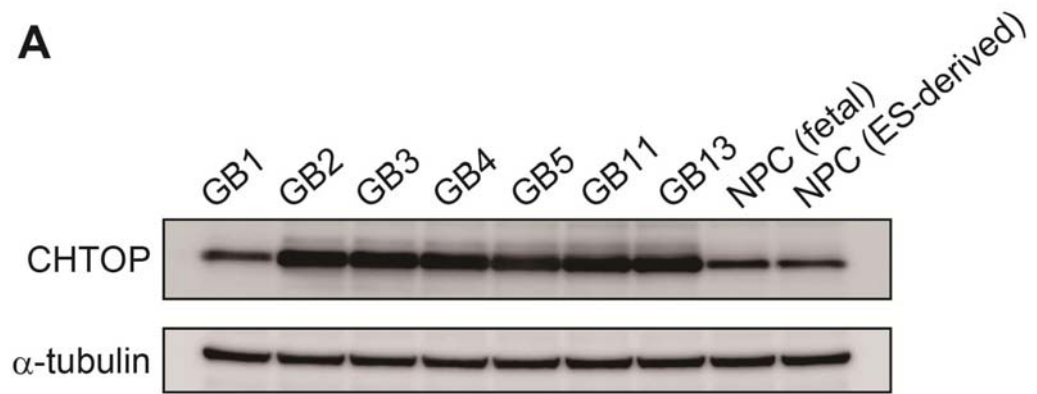
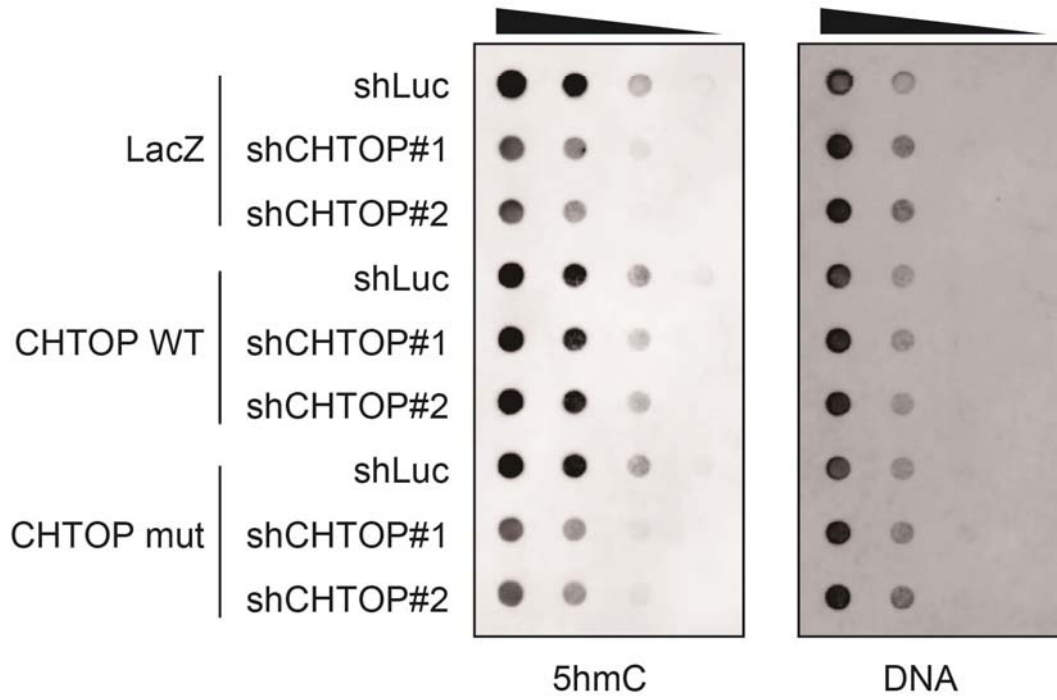
A**B**

Figure S6. CHTOP は 5hmC 量の維持に必要である

(A) 膠芽腫細胞とヒト正常神経幹細胞における CHTOP のタンパク質量をブロッキングにより比較した。

(B) CHTOP をノックダウンした GB2 細胞よりゲノム DNA を抽出し、ドットブロットに供した。また、CHTOP の野生型、変異型の強制発現によって、5hmC 量がどのように変化するかを検討した。

Figure S7~S11 の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

Figure S12 の内容は、医薬品に関する特許申請に関わるため公表できない。5 年以内に特許取得予定。

Table 1. GB2細胞、正常神経幹細胞を用いた(h)MeDIP-seq解析

5hmCを伴う遺伝子のGene Ontology解析

GB2細胞

| Term | Count | P- Value | Fold Enrichment | FDR |
|---|-------|----------|-----------------|----------|
| hsa04144:Endocytosis | 87 | 7.32E-06 | 1.50E+00 | 9.14E-05 |
| hsa05222:Small cell lung cancer | 45 | 4.81E-05 | 1.70E+00 | 6.01E-04 |
| hsa05200:Pathways in cancer | 137 | 5.01E-05 | 1.33E+00 | 6.25E-04 |
| hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis | 64 | 2.17E-04 | 1.48E+00 | 2.71E-03 |
| hsa04510:Focal adhesion | 86 | 6.32E-04 | 1.36E+00 | 7.86E-03 |
| hsa04722:Neurotrophin signaling pathway | 56 | 1.55E-03 | 1.43E+00 | 1.91E-02 |
| hsa04720:Long-term potentiation | 34 | 2.30E-03 | 1.59E+00 | 2.83E-02 |
| hsa04114:Oocyte meiosis | 50 | 2.45E-03 | 1.44E+00 | 3.02E-02 |
| hsa05215:Prostate cancer | 42 | 2.53E-03 | 1.50E+00 | 3.12E-02 |
| hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton | 88 | 2.72E-03 | 1.30E+00 | 3.35E-02 |
| hsa04320:Dorso-ventral axis formation | 16 | 2.95E-03 | 2.03E+00 | 3.62E-02 |
| hsa04012:ErbB signaling pathway | 41 | 2.97E-03 | 1.50E+00 | 3.65E-02 |
| hsa00640:Propanoate metabolism | 19 | 3.11E-03 | 1.89E+00 | 3.82E-02 |

正常神経幹細胞

| Term | Count | P- Value | Fold Enrichment | FDR |
|-------------------------|-------|----------|-----------------|----------|
| hsa04510:Focal adhesion | 18 | 9.47E-05 | 2.96E+00 | 1.09E-03 |
| hsa04360:Axon guidance | 12 | 1.60E-03 | 3.07E+00 | 1.82E-02 |

(h)MeDIP-seq解析のマップ率

| Sample Name | Total reads | Filtered reads | Mapped reads | Mapping rate(%) | Method |
|-----------------|-------------|----------------|--------------|-----------------|------------|
| GB2_5hmC_IP | 50970156 | 17919617 | 33050539 | 64.8 | hMeDIP-seq |
| GB2_5hmC_input | 63247491 | 6765934 | 56481557 | 89.3 | hMeDIP-seq |
| GB2_5mC_IP | 47192476 | 3303078 | 43889398 | 93.0 | MeDIP-seq |
| GB2_5mC_input | 58362583 | 5932412 | 52430171 | 89.8 | MeDIP-seq |
| hNPC_5hmC_IP | 40947715 | 3257293 | 37690422 | 92.0 | hMeDIP-seq |
| hNPC_5hmC_input | 40661592 | 2597058 | 38064534 | 93.6 | hMeDIP-seq |
| hNPC_5mC_IP | 38415417 | 3530291 | 34885126 | 90.8 | MeDIP-seq |
| hNPC_5mC_input | 44703196 | 2794829 | 41908367 | 93.7 | MeDIP-seq |

Table 2. 質量分析による5hmC結合タンパク質の探索

| gi number | RefSeq ID | Description | peptide number 5hmC | peptide number 5mC | log ₂ (5hmC/5mC) ratio |
|-----------|-------------|---|------------------------|-----------------------|---|
| 11321591 | NP_002120.1 | high mobility group protein B2 [Homo sapiens] | 17 | 5 | 1.77 |
| 4885375 | NP_005310.1 | histone H1.2 [Homo sapiens] | 92 | 28 | 1.72 |
| 28875797 | NP_056422.2 | chromatin target of PRMT1 protein isoform 1 [Homo sapiens] | 23 | 7 | 1.72 |
| 4885377 | NP_005311.1 | histone H1.3 [Homo sapiens] | 57 | 20 | 1.51 |
| 4504301 | NP_003529.1 | histone H4 [Homo sapiens] | 21 | 9 | 1.22 |
| 4885379 | NP_005312.1 | histone H1.4 [Homo sapiens] | 63 | 28 | 1.17 |
| 4504425 | NP_002119.1 | high mobility group protein B1 [Homo sapiens] | 32 | 20 | 0.68 |
| 4758302 | NP_004441.1 | enhancer of rudimentary homolog [Homo sapiens] | 27 | 17 | 0.67 |
| 148529014 | NP_001914.3 | DNA damage-binding protein 1 [Homo sapiens] | 23 | 15 | 0.62 |
| 73747829 | NP_039269.2 | DNA ligase 3 isoform alpha precursor [Homo sapiens] | 155 | 112 | 0.47 |
| 4506387 | NP_002865.1 | UV excision repair protein RAD23 homolog B [Homo sapiens] | 17 | 13 | 0.39 |
| 66933016 | NP_000875.2 | inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 [Homo sapiens] | 36 | 28 | 0.36 |
| 28329436 | NP_778243.1 | aprataxin isoform a [Homo sapiens] | 40 | 32 | 0.32 |
| 31543419 | NP_009185.2 | bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase [Homo sapiens] | 57 | 46 | 0.31 |
| 20127586 | NP_060789.2 | tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 [Homo sapiens] | 21 | 17 | 0.30 |
| 156523968 | NP_001609.2 | poly [ADP-ribose] polymerase 1 [Homo sapiens] | 1032 | 870 | 0.25 |
| 190684675 | NP_006288.2 | DNA repair protein XRCC1 [Homo sapiens] | 80 | 68 | 0.23 |
| 4505931 | NP_002681.1 | DNA polymerase beta [Homo sapiens] | 40 | 34 | 0.23 |
| 28195386 | NP_003097.1 | transcription factor SOX-2 [Homo sapiens] | 17 | 15 | 0.18 |
| 4506491 | NP_002907.1 | replication factor C subunit 4 [Homo sapiens] | 24 | 22 | 0.13 |
| 4885381 | NP_005313.1 | histone H1.5 [Homo sapiens] | 81 | 76 | 0.09 |
| 238776833 | NP_005773.3 | THO complex subunit 4 [Homo sapiens] | 19 | 18 | 0.08 |
| 4503841 | NP_001460.1 | X-ray repair cross-complementing protein 6 [Homo sapiens] | 101 | 97 | 0.06 |
| 4504277 | NP_003519.1 | histone H2B type 2-E [Homo sapiens] | 16 | 16 | 0.00 |
| 7669492 | NP_002037.2 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens] | 13 | 15 | -0.21 |
| 34098946 | NP_004550.2 | nuclease-sensitive element-binding protein 1 [Homo sapiens] | 17 | 20 | -0.23 |
| 10863945 | NP_066964.1 | X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens] | 79 | 95 | -0.27 |
| 4504257 | NP_003509.1 | histone H2B type 1-C/E/F/G/I [Homo sapiens] | 14 | 20 | -0.51 |
| 4504253 | NP_002096.1 | histone H2A.x [Homo sapiens] | 9 | 15 | -0.74 |
| 4504239 | NP_003500.1 | histone H2A type 1 [Homo sapiens] | 10 | 19 | -0.93 |
| 4504251 | NP_003507.1 | histone H2A type 2-A [Homo sapiens] | 8 | 18 | -1.17 |

Table 3. 質量分析によるCHTOP複合体の同定

CHTOP upper band

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|--|--------|----------|
| 4930075 | Chain C, Crystal Structure Of Human P32, A Doughnut-Shaped Acidic Mitochondrial Mat | 905.78 | 67.94 |
| 56205590 | chromosome 1 open reading frame 77 [Homo sapiens] | 506.27 | 34.65 |
| 238054406 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 1; AltName: Full=67 kDa cytokeratin; AltNan | 156.62 | 42.39 |
| 545257 | cytokeratin 9 [Homo sapiens] | 102.98 | 45.82 |
| 195972866 | keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens] | 32.90 | 20.72 |
| 239938650 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; AltName: Full=Cytokeratin-2e; S | 25.18 | 10.49 |
| 157831406 | Chain A, Structural And Electrophysiological Analysis Of Annexin V Mutants. Mutagenesi | 13.19 | 16.30 |
| 15431310 | keratin, type I cytoskeletal 14 [Homo sapiens] | 10.87 | 7.63 |
| 48429165 | RecName: Full=THO complex subunit 4; Short=Tho4; AltName: Full=Ally of AML-1 and | 10.60 | 28.79 |
| 119617041 | keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), | 9.08 | 10.33 |
| 40046856 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 8.61 | 21.67 |
| 57209199 | voltage-dependent anion channel 2 [Homo sapiens] | 7.72 | 15.60 |
| 62202489 | CIP29 protein [Homo sapiens] | 7.28 | 25.33 |
| 34785048 | RPS6 protein [Homo sapiens] | 4.73 | 14.98 |
| 20141302 | RecName: Full=Dermcidin; AltName: Full=Preproteolysin; Contains: RecName: Full=Surv | 3.24 | 20.00 |

CHTOP lower band

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|--|---------|----------|
| 4930075 | Chain C, Crystal Structure Of Human P32, A Doughnut-Shaped Acidic Mitochondrial Mat | 1507.31 | 67.94 |
| 56205590 | chromosome 1 open reading frame 77 [Homo sapiens] | 995.73 | 44.55 |
| 238054406 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 1; AltName: Full=67 kDa cytokeratin; AltNan | 387.31 | 39.29 |
| 545257 | cytokeratin 9 [Homo sapiens] | 240.30 | 48.23 |
| 195972866 | keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens] | 198.73 | 38.18 |
| 239938650 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; AltName: Full=Cytokeratin-2e; S | 157.80 | 49.45 |
| 119617032 | keratin 6B, isoform CRA_a [Homo sapiens] | 65.18 | 12.26 |
| 119617041 | keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), | 43.83 | 16.30 |
| 15431310 | keratin, type I cytoskeletal 14 [Homo sapiens] | 38.24 | 12.29 |
| 51702210 | RecName: Full=14-3-3 protein epsilon; Short=14-3-3E | 28.23 | 42.35 |
| 194377176 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 6.63 | 4.69 |
| 48429165 | RecName: Full=THO complex subunit 4; Short=Tho4; AltName: Full=Ally of AML-1 and | 6.30 | 20.62 |
| 62202489 | CIP29 protein [Homo sapiens] | 5.39 | 19.33 |
| 40795897 | hornerin precursor [Homo sapiens] | 3.08 | 4.04 |
| 20141302 | RecName: Full=Dermcidin; AltName: Full=Preproteolysin; Contains: RecName: Full=Surv | 3.04 | 20.00 |

PRMT1 and MEP50 (WDR77)

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|--|--------|----------|
| 133777777 | Protein arginine methyltransferase 1 [Homo sapiens] | 786.84 | 73.47 |
| 14495615 | WDR77 protein [Homo sapiens] | 141.93 | 46.36 |
| 238054406 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 1; AltName: Full=67 kDa cytokeratin; AltNan | 140.68 | 40.99 |
| 239938650 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; AltName: Full=Cytokeratin-2e; S | 117.01 | 42.25 |
| 195972866 | keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens] | 90.47 | 39.90 |
| 239938886 | RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 9; AltName: Full=Cytokeratin-9; Short=CK-9; | 67.97 | 32.74 |
| 125294 | RecName: Full=Creatine kinase B-type; AltName: Full=B-CK; AltName: Full=Creatine kin | 66.82 | 46.19 |
| 194385944 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 48.44 | 32.19 |
| 119617041 | keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), | 37.56 | 23.55 |
| 4930075 | Chain C, Crystal Structure Of Human P32, A Doughnut-Shaped Acidic Mitochondrial Mat | 36.74 | 41.15 |
| 294662289 | Chain A, The Catalytically Active Fully Closed Conformation Of Human Phosphoglycerate | 33.01 | 25.00 |
| 56205590 | chromosome 1 open reading frame 77 [Homo sapiens] | 32.39 | 30.69 |
| 15431310 | keratin, type I cytoskeletal 14 [Homo sapiens] | 27.67 | 13.35 |
| 870747 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (hnRNP D) [Homo sapiens] | 21.48 | 24.65 |
| 157836015 | Chain B, Human Septin 2 In Complex With Gdp | 17.36 | 19.60 |
| 194374795 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 10.42 | 7.91 |
| 6729803 | Chain A, Heat-Shock 70kd Protein 42kd Atpase N-Terminal Domain | 8.96 | 13.68 |
| 194377254 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 8.05 | 7.01 |
| 38014602 | MRPS27 protein [Homo sapiens] | 7.07 | 11.71 |
| 194384092 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 6.98 | 10.29 |
| 291084757 | pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial isoform | 6.15 | 6.69 |
| 425518 | anti-colorectal carcinoma heavy chain [Homo sapiens] | 5.12 | 8.08 |
| 194374633 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 4.63 | 11.11 |

PRMT5

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|--|--------|----------|
| 238054406 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 1; AltName: Full=67 kDa cytokeratin; AltName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1A/1B; AltName: Full=Heat shock 70 kDa prot | 403.56 | 53.42 |
| 147744565 | RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1A/1B; AltName: Full=Heat shock 70 kDa prot | 382.74 | 57.10 |
| 239938886 | RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 9; AltName: Full=Cytokeratin-9; Short=CK-9; | 316.41 | 59.87 |
| 195972866 | keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens] | 291.83 | 49.32 |
| 189054900 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 262.30 | 46.31 |
| 239938650 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; AltName: Full=Cytokeratin-2e; S | 228.88 | 67.45 |
| 119617032 | keratin 6B, isoform CRA_a [Homo sapiens] | 76.86 | 16.52 |
| 15431310 | keratin, type I cytoskeletal 14 [Homo sapiens] | 74.77 | 28.81 |
| 119617041 | keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), | 69.42 | 31.16 |
| 56205590 | chromosome 1 open reading frame 77 [Homo sapiens] | 33.12 | 35.64 |
| 4930075 | Chain C, Crystal Structure Of Human P32, A Doughnut-Shaped Acidic Mitochondrial Mat | 31.52 | 41.15 |
| 89574179 | succinate dehydrogenase complex subunit A [Homo sapiens] | 20.14 | 12.73 |
| 194383960 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 4.65 | 3.56 |
| 292495005 | RecName: Full=Desmoglein-1; AltName: Full=Cadherin family member 4; AltName: Full- | 3.62 | 3.15 |
| 119582089 | annexin A6, isoform CRA_b [Homo sapiens] | 2.99 | 11.92 |
| 74755309 | RecName: Full=Filaggrin-2; Short=FLG-2; AltName: Full=Intermediate filament-associate | 0.00 | 1.21 |

Note : 189054900 unnamed protein product [Homo sapiens] is PRMT5.

ERH

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|---|--------|----------|
| 51317296 | RecName: Full=Enhancer of rudimentary homolog | 360.14 | 39.42 |
| 195972866 | keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens] | 248.14 | 52.74 |
| 238054406 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 1; AltName: Full=67 kDa cytokeratin; AltName: | 237.20 | 43.32 |
| 239938650 | RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; AltName: Full=Cytokeratin-2e; S | 193.42 | 56.81 |
| 239938886 | RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 9; AltName: Full=Cytokeratin-9; Short=CK-9; | 132.65 | 53.61 |
| 15431310 | keratin, type I cytoskeletal 14 [Homo sapiens] | 52.86 | 31.36 |
| 119617041 | keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), | 39.09 | 19.75 |
| 4930075 | Chain C, Crystal Structure Of Human P32, A Doughnut-Shaped Acidic Mitochondrial Mat | 24.43 | 41.15 |
| 119590564 | heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10), isoform CRA_d [Homo sapiens] | 14.08 | 33.80 |
| 51338652 | RecName: Full=40S ribosomal protein S28 | 10.82 | 30.43 |
| 56205590 | chromosome 1 open reading frame 77 [Homo sapiens] | 10.72 | 24.26 |
| 298508360 | Chain C, Ternary Complex Of Macrophage Migration Inhibitory Factor (Mif) Bound Both | 9.03 | 17.54 |
| 20141302 | RecName: Full=Dermcidin; AltName: Full=Preproteolysin; Contains: RecName: Full=Sur | 7.30 | 20.00 |
| 7245517 | Chain B, Structure Of The Human PinLC8 DIMER WITH A BOUND PEPTIDE | 7.13 | 38.82 |
| 338269 | small nuclear ribonucleoprotein E [Homo sapiens] | 6.92 | 44.44 |
| 74755309 | RecName: Full=Filaggrin-2; Short=FLG-2; AltName: Full=Intermediate filament-associate | 5.98 | 0.96 |
| 3088341 | ribosomal protein S21 [Homo sapiens] | 3.68 | 35.19 |
| 194375299 | unnamed protein product [Homo sapiens] | 3.39 | 6.01 |

negative control (BSA)

| Accession | Description | Score | Coverage |
|-----------|---|---------|----------|
| 30794280 | albumin [Bos taurus] | 1128.64 | 73.97 |
| 39578728 | oocyst wall protein 6 precursor [Cryptosporidium parvum] | 69.81 | 3.72 |
| 38373984 | ubiquitin [Helicoverpa armigera] | 3.24 | 21.05 |
| 2914360 | Bovine Annexin Vi (Calcium-Bound) | 2.13 | 2.67 |
| 1071864 | lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) - bovine | 2.11 | 3.11 |
| 108480 | 3-phosphatidylinositol kinase (EC 2.7.1.-) 85K chain B - bovine | 2.07 | 2.63 |
| 6524898 | fructose biphosphate aldolase [Mycoplasma sp. 'bovine group 7'] | 1.83 | 10.34 |
| 1827613 | Chain B, Odorant-Binding Protein From Bovine Nasal Mucosa | 1.68 | 6.92 |
| 2981714 | Chain B, Structure Of The C Domain Of Synapsin Ia From Bovine Brain With Calcium At | 0.00 | 7.07 |

Table 4. 本研究で使用した抗体

| Antigen | Provider | Clone | Catalog number |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|-----------------------|
| 5hmC | Active motif | | 39769 |
| 5mC | Eurogentec | 33D3 | BI-MECY-0100 |
| TET1 | GeneTex | GT1462 | GTX627420 |
| CHTOP | Abcam | | ab123603 |
| PRMT1 | Bethyl Laboratories | | A300-723A |
| PRMT5 | Abcam | EPR5772 | ab109451 |
| MEP50 (WDR77) | Abcam | | ab57722 |
| ERH | Abcam | | ab96130 |
| panH4 | Millipore | 62-141-13 | 05-858 |
| H4R3me2a | Active motif | | 39705 |
| H4R3me2s | Abcam | | ab5823 |
| H3K27me3 | Millipore | | CS200603 |
| H3K36me3 | Abcam | | ab9050 |
| H4 pan-acetyl | Millipore | | 06-598 |
| asymmetrically dimethylated arginine | Millipore | asym24 | 07-414 |
| symmetrically dimethylated arginine | Millipore | sym10 | 07-412 |
| α -tubulin | Calbiochem | DM1A | CP06 |

本表の内容からは、学術論文として出版予定の内容が削除されている。5年以内に出版予定。

Table 5. 本研究で使用したプライマー

| Primer name | Sequence (5' to 3') | Application |
|-----------------|----------------------------|-------------|
| TBP_qPCR_fwd | GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC | qPCR |
| TBP_qPCR_rev | TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG | qPCR |
| TET1_qPCR_fwd | GATGACAGAGGTTCTTGCACAT | qPCR |
| TET1_qPCR_rev | AGGTTGCACGGTCTCAGTGT | qPCR |
| TET2_qPCR_fwd | AAAGATGAAGGTCCTTTTTTATACCC | qPCR |
| TET2_qPCR_rev | TTTACCCTTCTGTCCAAACCTT | qPCR |
| TET3_qPCR_fwd | CACTCCGGAGAAGATCAAGC | qPCR |
| TET3_qPCR_rev | GGACAATCCACCCTTCAGAG | qPCR |
| CHTOP_qPCR_fwd | CCCATAATCCAGAGAGGCTTG | qPCR |
| CHTOP_qPCR_rev | CCTCGGAGCAGGTTTTGA | qPCR |
| PRMT1_qPCR_fwd | AGGCGGAAAGCAGTGAGAAG | qPCR |
| PRMT1_qPCR_rev | TGGAGTTGCGGTAAGTGAGG | qPCR |
| PRMT5_qPCR_fwd | TCACCTTCAGCCATCCCAAC | qPCR |
| PRMT5_qPCR_rev | AAGCACAGTCTCAAAGTAGCC | qPCR |
| EGFR_qPCR_fwd | CAGCCACCCATATGTACCATC | qPCR |
| EGFR_qPCR_rev | AACTTTGGGCGACTATCTGC | qPCR |
| AKT3_qPCR_fwd | TTGCTTTCAGGGCTCTTGAT | qPCR |
| AKT3_qPCR_rev | CATAATTTCTTTTGCATCATCTGG | qPCR |
| CDK6_qPCR_fwd | TGATCAACTAGGAAAAATCTTGGAC | qPCR |
| CDK6_qPCR_rev | GGCAACATCTCTAGGCCAGT | qPCR |
| CCND2_qPCR_fwd | GGACATCCAACCCTACATGC | qPCR |
| CCND2_qPCR_rev | CGCACTTCTGTTCCCTCACAG | qPCR |
| BRAF_qPCR_fwd | GAACACCACCCAATAACCAC | qPCR |
| BRAF_qPCR_rev | GGATTTTGAAGGAGACGGAC | qPCR |
| DLL3_qPCR_fwd | GCACTCAACAACCTAAGGAC | qPCR |
| DLL3_qPCR_rev | AGATGGAAGGAGCAGATATGAC | qPCR |
| NKX2-2_qPCR_fwd | CCCTGAAGAACCCCTTCTAC | qPCR |
| NKX2-2_qPCR_rev | GTCTCCTTGTCATTGTCCG | qPCR |
| SOX2_qPCR_fwd | GCAACCAGAAAAACAGCCC | qPCR |
| SOX2_qPCR_rev | CGTCTCCGACAAAAGTTTCC | qPCR |
| ERBB3_qPCR_fwd | TAACACCAACTCCAGCCAC | qPCR |
| ERBB3_qPCR_rev | CTTCACCACTATCTCAGCATC | qPCR |
| OLIG2_qPCR_fwd | TCAAGATCAACAGCCGCGAG | qPCR |
| OLIG2_qPCR_rev | AGCGAGTTGGTGAGCATGAG | qPCR |
| FBXO3_qPCR_fwd | TGTTGCCATTCCCCGATTCC | qPCR |
| FBXO3_qPCR_rev | TTCCTCCTCCTCCTTCTTCTCC | qPCR |
| GABRB2_qPCR_fwd | ACCACAATCAACACCCACC | qPCR |
| GABRB2_qPCR_rev | CCCCTCCCAAAGAAGATGTAG | qPCR |
| SNCG_qPCR_fwd | TGAGCAGCGTCAACACTGTG | qPCR |
| SNCG_qPCR_rev | TCCTCTGCCACTTCCTCTTTC | qPCR |
| MBP_qPCR_fwd | ACCCCGTAGTCCACTTCTTC | qPCR |
| MBP_qPCR_rev | TCTGCCTCCGTAGCCAAATC | qPCR |
| DNMT1_qPCR_fwd | AAGAAGCACAGAAGTCAACC | qPCR |
| DNMT1_qPCR_rev | TCTCTTCTCCTCCTTTTCATCC | qPCR |
| TOP1_qPCR_fwd | AAGTCCAAAGAGATGAAAGTCC | qPCR |
| TOP1_qPCR_rev | ACCACATATTCCTGACCATCC | qPCR |
| ABL1_qPCR_fwd | AAAGGAGCAGGGAAGAAGG | qPCR |
| ABL1_qPCR_rev | TGCAACGAAAAGGTTGGG | qPCR |
| BOP1_qPCR_fwd | GGACAAGATGGACGATCCTGAC | qPCR |
| BOP1_qPCR_rev | TGAAGCCACATCCCCAAC | qPCR |
| FGFR3_qPCR_fwd | TGGAGGTGAATGGCAGCAAG | qPCR |
| FGFR3_qPCR_rev | CGCAGAGTGATGAGAAAACCC | qPCR |

| | | |
|---------------------------|------------------------|----------------|
| PDGFA_qPCR_fwd | TCGGAGGAAGAGAAGCATCGAG | qPCR |
| PDGFA_qPCR_rev | AGATCAGGAAGTTGGCGGAC | qPCR |
| AKT2_qPCR_fwd | GCTACTACGCCATGAAGATCC | qPCR |
| AKT2_qPCR_rev | GCATACTCCATCACAAAGCAC | qPCR |
| NES_qPCR_fwd | CACCTCAAGATGTCCCTCAG | qPCR |
| NES_qPCR_rev | AGCAAAGATCCAAGACGCC | qPCR |
| CASP1_qPCR_fwd | TGTTGAATACCAAGAAGTCC | qPCR |
| CASP1_qPCR_rev | TCTTTAAACCACACCACACC | qPCR |
| CASP4_qPCR_fwd | TTTCTGCTCTTCAACGCC | qPCR |
| CASP4_qPCR_rev | TCAAATGATTGCTGTACCTTCC | qPCR |
| CASP5_qPCR_fwd | ACGAAAAGAATCTCACAGCC | qPCR |
| CASP5_qPCR_rev | TGTCATAAAGCAGCACATCC | qPCR |
| CASP8_qPCR_fwd | CCTGCTGAAGATAATCAACGAC | qPCR |
| CASP8_qPCR_rev | TTACCCACACAACCTCCTCC | qPCR |
| IL4R_qPCR_fwd | ATCAGATTCCCAACCCAGCC | qPCR |
| IL4R_qPCR_rev | TCCCTTTTCATGTTGTGCTCC | qPCR |
| CHI3L1_qPCR_fwd | CAACGATCACATCGACACC | qPCR |
| CHI3L1_qPCR_rev | TGAGACCCAAAGTTCATCC | qPCR |
| TRADD_qPCR_fwd | CCTGCCCAGACTTTTCTGTTCC | qPCR |
| TRADD_qPCR_rev | ACCTTGCGCCATTTGAGACC | qPCR |
| TLR2_qPCR_fwd | TGATGAGAACAATGATGCTGCC | qPCR |
| TLR2_qPCR_rev | AAAATCCTTCCCCTGAGCC | qPCR |
| TLR4_qPCR_fwd | ACAACCTCCCCTTCTCAACC | qPCR |
| TLR4_qPCR_rev | GCTCTGATATGCCCATCTTC | qPCR |
| RELB_qPCR_fwd | TTGCCTTTCACGTACCTGCC | qPCR |
| RELB_qPCR_rev | TTCTTCCGCGTGTGCTCTC | qPCR |
| HPRT1_(h)MeDIP_qPCR_fwd | TTGGCTGAGAGGAGTGAGGAG | ChIP, (h)MeDIP |
| HPRT1_(h)MeDIP_qPCR_rev | GGCAAAGGTGAGGGGAAAG | ChIP, (h)MeDIP |
| MGMT_(h)MeDIP_qPCR_fwd | GCAGAGTCCCATATTTCTTCC | ChIP, (h)MeDIP |
| MGMT_(h)MeDIP_qPCR_rev | GCAACTGAGAGCAAACACC | ChIP, (h)MeDIP |
| EGFR_(h)MeDIP_qPCR_fwd | TGGGGAAGTGAATGAGGAC | ChIP, (h)MeDIP |
| EGFR_(h)MeDIP_qPCR_rev | CAGAGAACCAGGCAAAGATG | ChIP, (h)MeDIP |
| AKT3_(h)MeDIP_qPCR_fwd | AAGCAAAAGCACCAAACAC | ChIP, (h)MeDIP |
| AKT3_(h)MeDIP_qPCR_rev | ATTCTCCACTCCAACCTCC | ChIP, (h)MeDIP |
| CDK6_(h)MeDIP_qPCR_fwd | ACAGCAACAGTGGTAGAGAG | ChIP, (h)MeDIP |
| CDK6_(h)MeDIP_qPCR_rev | AGAGGCAGAATAACAGAGTGG | ChIP, (h)MeDIP |
| CCND2_(h)MeDIP_qPCR_fwd | CCAAGTTCTCTTTCCACCATC | ChIP, (h)MeDIP |
| CCND2_(h)MeDIP_qPCR_rev | GTCTCCACCTAACCTTCTTCC | ChIP, (h)MeDIP |
| BRAF_(h)MeDIP_qPCR_fwd | AGCAATGCTGGATACTTACATC | ChIP, (h)MeDIP |
| BRAF_(h)MeDIP_qPCR_rev | ATTCTCACCAGTCCGTCTC | ChIP, (h)MeDIP |
| SLC19A1_(h)MeDIP_qPCR_fwd | CACGTAGTAGACCACCAGGTAG | ChIP, (h)MeDIP |
| SLC19A1_(h)MeDIP_qPCR_rev | TCTTCTCAACCGCGACGAC | ChIP, (h)MeDIP |
| ACSL3_(h)MeDIP_qPCR_fwd | AGATGTGAACCACCATGCC | ChIP, (h)MeDIP |
| ACSL3_(h)MeDIP_qPCR_rev | GTCAATAACAATTCTGCGAAG | ChIP, (h)MeDIP |
| BCL2_(h)MeDIP_qPCR_fwd | ACATTTCCAACCACACAC | ChIP, (h)MeDIP |
| BCL2_(h)MeDIP_qPCR_rev | GACTGGCTTGCTTGAAAATATC | ChIP, (h)MeDIP |
| RXRA_(h)MeDIP_qPCR_fwd | GAATGAGCTGAGCCAATCC | ChIP, (h)MeDIP |
| RXRA_(h)MeDIP_qPCR_rev | CCTTCTTCTCTCCTTTCC | ChIP, (h)MeDIP |

本表の内容からは、学術論文として出版予定の内容が削除されている。5年以内に出版予定。

謝辞

本研究におきましては、こちらにお示しする方々からの多大なご協力を賜りました。この場を借りて、御礼申し上げます。

次世代シーケンシング・データ解析

東京大学分子細胞生物学研究所 白髭研究室

白髭 克彦先生 加藤 由起先生 増田 晃士先生 藤木 克則先生

タンパク質生産、精製の指導と監督

東京大学分子細胞生物学研究所 豊島研究室

豊島 近先生 小川 治夫先生

タンパク質質量分析

東京大学医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー

尾山 大明先生 秦 裕子先生

核酸質量分析

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 鈴木研究室

鈴木 勉先生 鈴木 健夫先生 坂口 裕理子先生

ヒト検体の免疫染色

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 宮園研究室

森下 保幸先生

膠芽腫検体の提供

東京大学医学部附属病院 脳神経外科

藤堂 具紀先生 稲生 靖先生 武笠 晃丈先生 斉藤 延人先生 大谷 亮平先生

本研究を行う場を与えて下さった東京大学大学院教授、秋山徹先生に心より感謝致します。また、タンパク質の大量生産・精製にあたりまして、多くのご支援とご指導を賜りました、小川治夫先生に深い感謝を申し上げます。研究者としての姿勢や研究の進め方、実験方法をご教授頂き、的確なご指導を賜りました元東京大学大学院助教、西村教子先生、那須亮先生と、東京大学大学院助教、林寛敦先生に深く感謝致します。研究生活を通じて互いに切磋琢磨した同輩である杉政宏信君、平岡巧士君、宮本昌弥君と、分子情報分野脳腫瘍チームの後輩として、研究生活を豊かなものとして下さった里智博君、葉山侑理さんに感謝致します。最後に、私の研究生活を見守り、支え続けて下さった家族と、妻の菜美さんに、最大の感謝を申し上げます。

2014年 12月 高井 弘基