

博士論文

骨髄系腫瘍におけるDNAヒドロキシメチル化異常  
に関する研究

遠山 和博

## 目次

1. 要旨.....	3
2. 序文.....	4
3. 方法.....	13
3.1. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立 .....	13
3.1.1. 概要 .....	13
3.1.2. 次世代シーケンサーを使用した DNA ヒドロキシメチル化解析系 における処理反応効率の確認.....	15
3.1.3. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系における 処理反応効率の確認.....	18
3.1.4. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系のヒト胚 性幹細胞ゲノム DNA を使用した検出の検証.....	19
3.2. 急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析.....	20
3.2.1. 症例 .....	20
3.2.2. 遺伝子変異解析 .....	20
3.2.3. 急性骨髄性白血病に対する DNA ヒドロキシメチル化解析.....	22
4. 結果.....	24
4.1. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立 .....	24
4.1.1. 各酵素反応効率の評価.....	24
4.1.2. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系における 処理反応効率の確認.....	29
4.1.3. ヒト胚性幹細胞における DNA ヒドロキシメチル化検出の評価....	30
4.2. 急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析.....	33

4.2.1. 症例背景 .....	33
4.2.2. DNA ヒドロキシメチル化の変化.....	37
4.2.3. DNA メチル化と DNA ヒドロキシメチル化の関係.....	42
4.2.4. DNA ヒドロキシメチル化の分布の変化 .....	43
4.2.5. DNA ヒドロキシメチル化の変化が見られた遺伝子 .....	48
5. 考察.....	50
謝辞.....	55
引用文献.....	56
略語一覧.....	61
付録.....	63

## 1. 要旨

DNA 脱メチル化関連遺伝子変異が骨髄系腫瘍で集積していることが報告されているが、その腫瘍形成機構は明らかになっていない。我々はその解析のため、一塩基単位の解像度でDNAヒドロキシメチル化を網羅的に解析する技術を、ビーズアレイを用いたDNAメチル化解析法に応用し、多数の患者検体のDNAヒドロキシメチル化を網羅的に解析可能な新しい系を確立した。

DNA 脱メチル化関連遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病患者におけるDNAヒドロキシメチル化解析の結果、エンハンサー部位のDNA脱メチル化異常が多く起こっていることが明らかになり、DNA脱メチル化異常による腫瘍形成機構において重要な経路であることが示唆された。

## 2. 序文

エピジェネティック修飾とはゲノム上におこる DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造の変化、ノンコーディング RNA などに代表される蛋白をコードする塩基配列以外の遺伝情報であり、これらにより遺伝子発現調節が行われていることが知られている。その中でも DNA メチル化は組織特異的な遺伝子発現制御の重要な役割を果たし、細胞分化や発生に強く関わっている<sup>1,2</sup>。

DNA メチル化は DNA メチルトランスフェラーゼ (DNA methyltransferase:以下、DNMT) がシトシン-リン酸-グアニン (以下、CpG) ジヌクレオチドのシトシン 5 位の炭素にメチル基を付加し、5-メチルシトシン (5mC) に変換することによって起こる。DNA 複製の際には、親鎖の CpG メチル化を認識した維持メチル化酵素 DNMT1 が娘鎖にメチル基を付加することで、CpG メチル化情報が細胞分裂の後も忠実に引き継がれる。また、de novo メチル化酵素である DNMT3A・DNMT3B は、非メチル化 CpG に対して新たにメチル基を付加する酵素である<sup>3</sup>。

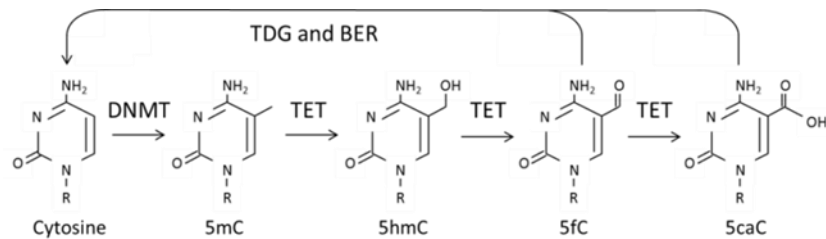
維持メチル化、新規メチル化によって調節される DNA メチル化がプロモーター部位で遺伝子発現制御と強く関わっている<sup>4</sup>。ヒトゲノムにおける CpG ジヌクレオチドの出現頻度は 1%以下と、シトシンとグアニンの構成比率から算出される割合より低く抑えられているが、CpG アイランド (CpG island) と呼ばれる CpG ジヌクレオチドの集中している領域が存在する。そしてその 60-70%程度がプロモーター部位に位置しているが、高発現遺伝子の CpG island にある CpG はメチル化されていないことから、プロモーター部位の CpG のメチル化は遺伝

子発現と負に相関していると考えられている<sup>5</sup>。

DNA メチル化異常は、それによる遺伝子発現制御の異常によって腫瘍発生と関連している可能性が示唆されている。DNA メチル化が腫瘍発生においてどのような機序で関与しているかについては全容は明らかではないが、癌腫特異的なプロモーター部位での CpG island の高メチル化による遺伝子発現の低下が数多く報告されている<sup>6</sup>。骨髄系腫瘍では、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndromes: MDS）でプロモーター部位の DNA メチル化が増加しており、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）への進展や予後不良との関係が報告されている<sup>7</sup>。さらに、MDS に対しては脱メチル化剤による臨床応用もされており、寛解率の上昇や白血病への進展の抑制および予後改善が報告されている<sup>8</sup>。

シトシンに対する直接修飾である DNA メチル化は、ヒストンテールのメチル化と比べて、メチル化の除去に要する活性化エネルギーが大きいと予測されていたことから、生体内ではメチル化情報の消去、すなわち脱メチル化反応はほとんど起こらないと考えられてきた。2009 年に TET タンパクファミリーが 2-オキソグルタル酸（2-oxoglutarate: 2-OG）や二価鉄（Fe(II)）依存的に 5mC のシトシン 5 位のメチル基を還元し、5-ヒドロキシメチルシトシン（5-hydroxymethylcytosine: 5hmC）に変換することで、脱メチル化過程に関与する酵素であることが報告された<sup>9</sup>。続く報告によって脱メチル化中間産物としての 5-フォルミルシトシン（5-formylcytosine: 5fC）, 5-カルボキシルシトシン（5-carboxylcytosine: 5caC）が発見され（図 1）<sup>10,11</sup>、さらにチミジン DNA グリ

コシラーゼ (Thymine DNA Glycosylase: TDG) を介した塩基除去修復 (Base Excision Repair: BER) の機能が脱メチル化に重要な役割を果たしていることが明らかになった<sup>11,12</sup>。



(Ito S et al. Science 2011, He YF et al. Science 2011 より引用<sup>10,11</sup>)

図 1. DNA メチル化および脱メチル化の推定されている機序

CpG のシトシンは DNMT によって 5mC へと変換される。5mC は TET によって 5hmC、5fC、5caC へと変換され、TDG を介して脱メチル化される。

アルギニンとリジンをアイソトープラベルした培地で培養を行うことで、特異性の高い結合タンパクを網羅的に同定できる SILAC 法を用いたプロテオミクス解析の結果では、マウス ES 細胞の核抽出物よりシトシンの修飾産物 (5mC, 5hmC, 5fC, 5caC) それぞれに異なる転写因子やクロマチン関連タンパクが結合することが報告されている<sup>13</sup>。これらの結果は DNA メチル化が遺伝子発現制御を行う際に、その脱メチル化の過程によって生じる中間産物そのものも発現制御に関与していることを示唆している。DNA メチル化が組織特異的な遺伝子を制御することで、細胞分化に強く関与していることが知られているが<sup>5</sup>、以上の知見からは中間産物自体が組織特異的な遺伝子制御に関与している可能性を示唆している。

DNA 脱メチル化酵素としての TET family の報告がされる中、骨髄系悪性腫瘍患者において TET タンパクファミリーの一つである TET2 の体細胞変異を高頻度に認めることが報告された (表 1)<sup>14</sup>。TET2 のエクソン変異は種間で保存された酵素活性部位のミスセンス変異が多いことから機能喪失型の変異であることが示唆された。造血細胞におけるコンディショナルノックアウトマウスでは、TET2 の片アリの機能的欠失により造血幹細胞・前駆細胞の増殖、骨髄単球系前駆細胞が起こり、さらには脾臓における骨髄単球系細胞の浸潤、末梢血白血球数増加、貧血や血小板減少の進行などの骨髄増殖性疾患と類似した表現型を取ることが示された<sup>15,16</sup>。これらの一連の報告は、骨髄系腫瘍患者の中でも骨髄増殖性疾患で最も高頻度に TET2 の変異が見つかることも合致しており、TET2 の機能喪失が骨髄系腫瘍に直接関与することを強く示唆する報告であった。

表 1. 骨髄系腫瘍における TET2 および IDH1 もしくは IDH2 変異の頻度

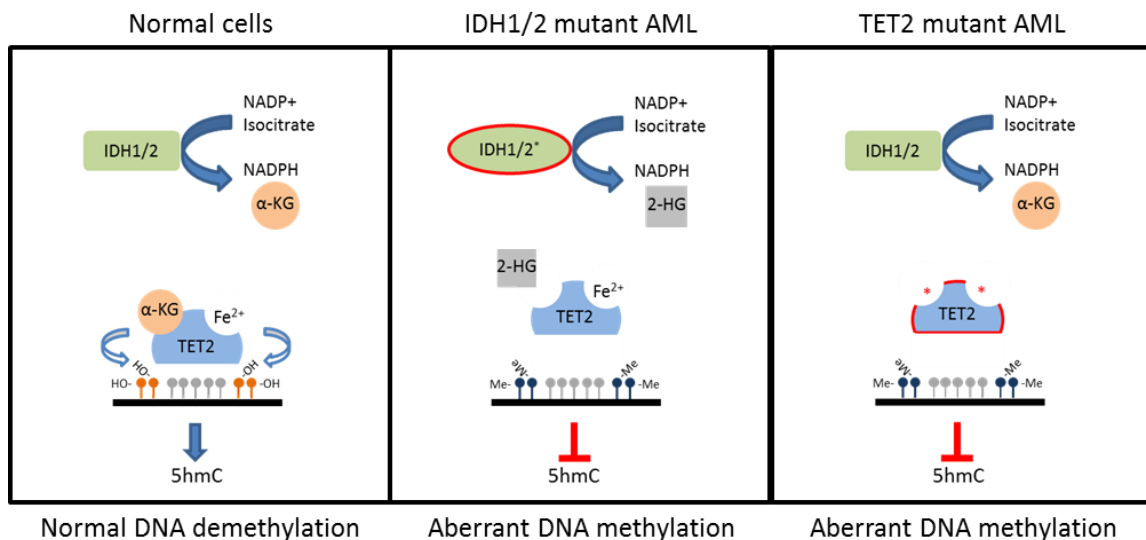
	TET2, (%)	IDH1/2, (%)
<b>AML</b>	7-23	15-33
<b>MDS</b>	20-25	3.5
<b>MPN</b>	4-13	2.5-5
<b>MDS/MPN</b>	36-58	5-10

(Shih AH et al. Nat Rev Cancer 2012 より引用<sup>17</sup>)

骨髄系腫瘍で広く TET2 および IDH1/2 の変異が見られる。中でも TET2 変異は MDS および MDS/MPN に比較的多く、IDH1/2 変異は AML に比較的多い。MPN (Myeloproliferative neoplasms、骨髄増殖性疾患)



骨髄系腫瘍においては IDH1 および IDH2 遺伝子（以下 IDH1/2 と表記）における体細胞変異の集積も報告されている（表 1）<sup>18</sup>。興味深いことに IDH1/2 の変異は TET2 の変異と相互排他的に認められるが、その後の報告で IDH1/2 のホットスポット変異で増加した 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-Hydroxyglutarate: 2-HG) が、TET2 の酵素活性に抑制的に働くことが報告されており（図 2）<sup>19</sup>、IDH 遺伝子の機能不全は TET2 酵素活性低下による脱メチル化異常を介して、骨髄系腫瘍発生のプロセスに重要な役割を果たすことを示唆している。



(Luisa Cimmino et al. Cell Stem Cell 2011 より引用<sup>20</sup>)

図 2. 変異 IDH1/2 による 2-HG 蓄積が TET2 の酵素活性を阻害する

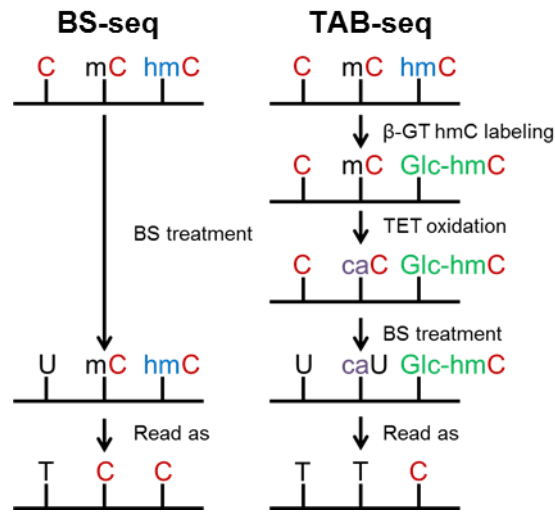
IDH1/2 のホットスポット変異による 2-HG の増加が、TET2 の酵素活性に抑制的に働く。

TET2 もしくは IDH1/2 変異を有する骨髄系腫瘍患者における DNA メチル化解析はこれまでにいくつか行われている。代表的な例を挙げると、398 人の AML 症例を対象に HELP 法 (CCGG 配列を切断する MspI とメチル化感受性のアイソシゾマーである HpaII でそれぞれ切断した DNA 断片の比率で DNA メチル化の程度を見積もる) で行われた網羅的メチル化解析では、IDH1/2 変異 AML では IDH1/2 の変異がない AML に比べてグローバルな CpG メチル化が増加していることが示されている。同様に TET2 変異 AML においても IDH1/2 変異の場合よりも程度は小さいものの CpG がよりメチル化されていた<sup>18</sup>。バイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析である HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社、以下 Infinium450K)を用いた AML 患者 200 例の報告では、メチル化プロファイルと遺伝子変異の関係性が統合的に解析されている<sup>21</sup>。この報告では遺伝子プロモーターとその周辺も含めてゲノムワイドに定量的なメチル化解析が行われているが、DNA メチル化レベルによる階層的クラスタリングで、IDH1/2 変異 AML において特に CpG 低密度のプロープで DNA 高メチル化が見られた。一方、TET2 変異の有無と関連する AML のサブグループと DNA 高メチル化は明確には示されていない。

5hmC に関しては、TET2 変異を有する骨髄系腫瘍で 5hmC のグローバルな低下が報告されている<sup>22</sup>。この報告では抗 5hmC 抗体を用いたドットブロット法によって TET2 変異腫瘍群でゲノム中の 5hmC の総量が減少していることを示しており、実際に TET2 の変異による機能喪失が腫瘍細胞で起こっていることを示している。

DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生の関係を解明するためには、能動的脱メチル化の起こっている指標になるゲノム上の 5hmC の局在を明らかにすることが必要であると考えられた。これまでのメチル化特異的制限酵素を使用した HELP アッセイやバイサルファイト法に基づいた Infinium450K を使用する方法では、5hmC と 5mC を原理的に区別することができない。また、5hmC 特異的な抗体を用いてヒドロキシメチルシトシンの免疫沈降を行う hMeDIP 法 (Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation) に次世代シーケンサーを組み合わせた hMeDIP-seq 法では、免疫沈降で使用する DNA 量が多く、バイサルファイトシーケンスによるメチル化解析で可能なように一塩基レベルでの解析をすることはできないという解像度の面での欠点があった。

このような各種プラットフォームの欠点を克服する方法として、2012 年に Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (TAB-Seq) と呼ばれる 5hmC ゲノムマッピングの方法が報告された。これは  $\beta$ -グルコシルトランスフェラーゼ ( $\beta$ -Glucosyltransferase:  $\beta$ -GT) によるグルコシル化で 5hmC を保護した後、TET 酵素処理を行うことで、5hmC のみがバイサルファイト法によりシトシンとして区別できるという系であった (図 3)。この報告では、H1 株ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) のゲノム DNA を使用した 5hmC の塩基レベルでのマッピングが示された<sup>23</sup>。TAB-seq 法においては TET タンパクによる還元反応とバイサルファイト処理によってヒドロキシメチル化という修飾情報を塩基情報の違いに置換して、これを次世代シーケンサーで全ゲノムシーケンスすることで、ヒドロキシメチルシトシンの局在と定量をゲノムワイドかつ一塩基の解像度で実現している。



(Yu M et al. Cell 2012 より引用<sup>23)</sup>)

図 3. TAB-seq 法とバイサルファイト法によるメチル化シトシン検出

バイサルファイト処理の前に  $\beta$ -GT による 5hmC のラベリングおよび TET 酵素反応を行うことで、5mC と 5hmC を区別できる。BS (Bisulfite、バイサルファイト)

このヒト ES 細胞での TAB-seq 法による 5hmC のゲノムマッピング解析では、5hmC が遺伝子活性化に関わるエンハンサーに多く局在していることが報告された<sup>23</sup>。エンハンサー部位における 5hmC が遺伝子発現制御にどのように関与しているかは、まだ詳細なメカニズムは明らかになっていないが、少なくともエンハンサー部位において TET タンパクが脱メチル化を行うことがエンハンサー機能の活性化につながっていることが推察される。前述の AML 症例に対する Infinium450K を用いた解析で CpG 密度が低い領域で特に遺伝子プロファイルと DNA メチル化の変化の関係がみられたことを考慮すると、CpG 密度の高いプロモーター領域や CpG island の解析のみでは十分に 5hmC を検出できない可能性も考えられた。このことから、DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生の関係を調べる

ためには、プロモーター部位や CpG island のみならず、その周辺や遠位部も含めた解析が必要になると考えられた。

Infinium450K は解析の対象となる CpG サイトが遺伝子全体の領域に広く設定され、CpG island のみならずその周辺領域にも (CpG shore、CpG island) 広くプローブが設計されている。ヒト RefSeq 遺伝子プロモーター領域の 99% にプローブが複数設計されていることから DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生のメカニズムを解析する手段としては最適なプラットフォームと考えられた。

そこで我々は、一塩基レベルの解像度で 5hmC のゲノムマッピングが可能になる TAB-seq の技術をマイクロアレイを用いたジェノタイピングに応用することで、遺伝子プロモーターおよび CpG island とその周辺領域を多数の検体で効率よく行うことが可能なのではないかと考えた。その解析系を用いて TET2、IDH1 および IDH2 遺伝子変異を有する白血病細胞の DNA ヒドロキシメチル化解析を行うことで、これまでに明らかになっていない DNA 脱メチル化によるエピジェネティック制御機構と骨髄系腫瘍形成の関係を解明することを目的に研究を行った。

### 3. 方法

#### 3.1. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立

##### 3.1.1. 概要

一塩基単位での 5hmC の定量が可能である TAB-seq の系を、同様にバイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析である HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社、Infinium450K)に応用することで、患者サンプルの解析を試みた。これまでに同様の系はなく、我々はこの系を" Tet-assisted bisulfite epigenotyping with BeadChip (TAB-chip)"と名付けた。

参考とした TAB-seq の系および、TAB-chip の系の解析フローチャートを図示する (図 4、図 5)。共通の処理としては、サンプル DNA の 5hmC を  $\beta$ -GT とウリジン二リン酸グルコース (Uridine diphosphate glucose : 以下、UDP-Glu) によってグリコシル化し、その後 TET 酵素を反応させ、5mC を 5caC まで酸化する点である。TAB-chip における TAB-seq からのプロトコル上の変更点は、Infinium450K で解析するため超音波切断機によるサンプルゲノム DNA の切断は行わない点、DNA サイズの変更に伴う精製方法の変更、次世代シーケンス解析用のアダプター付加およびバイサルファイト処理後の PCR 反応を必要としない点、処理後 DNA の解析方法の変更が挙げられる。

我々は新しい TAB-chip の系の確立のため、最初に TAB-seq で使用されている  $\beta$ -GT、TET 酵素、バイサルファイト処理の反応効率をポジティブコントロール

DNA およびネガティブコントロール DNA を使って TAB-seq の系に基づいて確認した。次に、同様のコントロール DNA を用いて TAB-chip の系に基づいて反応効率の確認をした。最後に、H1 株ヒト ES 細胞のゲノム DNA を抽出して TAB-chip の系で反応、解析を行った。H1 株ヒト ES 細胞は、最初の TAB-seq の報告<sup>23</sup> でデータが公開されているだけでなく、5hmC の免疫沈降による hMeDIP-seq の解析データとも比較可能であることから、TAB-chip 解析データの検証対象として採用した。

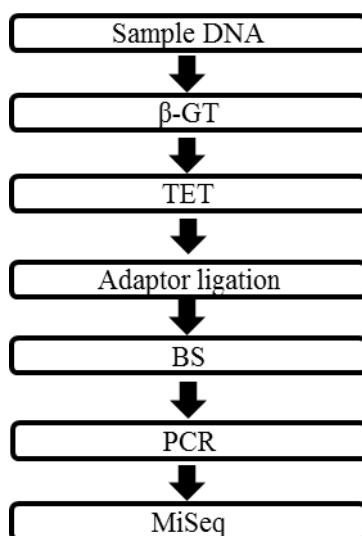


図 4. TAB-seq 法による解析フローチャート

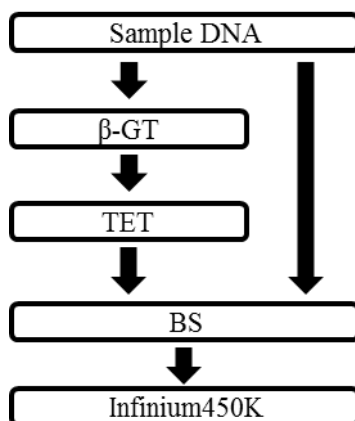


図 5. TAB-chip 法による解析フローチャート

### 3.1.2. 次世代シーケンサーを使用した DNA ヒドロキシメチル化解析系における処理反応効率の確認

#### DNA サンプル

5mC の変換効率を確認するためのポジティブコントロールとして、CpG メチル化酵素処理を行ったヒトゲノム DNA を用いた。正常血球細胞から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて genomic DNA を抽出し、illustra GenomiPhi V2 Kit (GE Healthcare Japan 社) を用いて数百倍の全ゲノム増幅を行った。これにより反応産物の DNA には 5mC および 5hmC はほとんど含まれていないサンプルと扱うことが可能である。次にその DNA を超音波切断機 (Covaris 社) で約 300bp 程度になるまで切断した後に、M.SssI CpG メチルトランスフェラーゼ (New England Biolabs 社) によって CpG 配列のメチル化反応を行い、これをヒトゲノム DNA の CpG メチル化ポジティブコントロールとした。

5hmC のポジティブコントロールとしてはラムダ DNA (タカラバイオ社) に対する PCR 反応産物を使用した。PCR 反応の際にはデオキシシチジン三リン酸 (dCTP) の代わりに 5-ヒドロキシメチル化 dCTP (dhmCTP) を使用することで、反応産物ほとんど全てのシトシンにヒドロキシメチル化修飾が入っているポジティブコントロールを作成した。PCR 反応には KOD plus NEO kit (東洋紡社) を使用した。使用したプライマーはラムダ DNA に対して反応産物が 288 bp の長さになるように設定した (表 S1)。

バイサルファイト反応の効率を確認するためにメチル化やヒドロキシメチル



化修飾のないシトシンで構成された DNA も必要であり、同様にラムダ DNA に対する PCR 反応を用いて作成した。PCR 反応には通常どおり dCTP を用いた。使用したプライマーはラムダ DNA に対して、5hmC のポジティブコントロールとは別の場所に反応産物が 299 bp の長さになるように設定した (表 S1)。

### TAB 反応および MiSeq による解析

反応条件は既報<sup>24</sup>を参考にして行った。作成した DNA サンプルを混合し、まず、 $\beta$ -GT (1  $\mu$ M)、UDP-Glu (500  $\mu$ M)の反応条件下で 37°C 60 分間  $\beta$ -GT 反応 (Wisegene 社) を行った。反応後 QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN 社)を用いて精製を行った。続く TET 反応は Wisegene 社のマウス Tet1-CD (mTet1) 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l、および Sysmex 社:Procube-E ヒト TET1-CD (hTET1) 1.2, 0.6, 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l を用いた。マウス Tet1-CD およびヒト TET1-CD はいずれも酵素活性ドメインを含む TET 合成タンパクであり、精製・濃縮されている状態から実験に供した。還元反応は 37°C で 80 分間行い、続いて終濃度 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l になるようプロテインキナーゼ K (Wisegene 社) を加えて 50°C で 60 分間反応を行った。その後 Micro Bio-Spin 30 Columns (Bio-Rad 社) および QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社)を用いて DNA 精製を行った。

次世代シーケンサーである MiSeq (Illumina 社) による解析のためにアダプター付加 (TruSeq DNA Sample Preparation kits, Illumina 社) を行った。AMPure XP beads (Beckman Coulter 社) 精製を行った後、添付プロトコルに従ってバイサルファイト反応 (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research 社)を行った。KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems 社) を使用した PCR 反応 6 サ

イクルによる増幅を行ったのち、MiSeq を用いたシーケンシングを行ってバイサルファイト変換効率の解析を行った。

### 3.1.3. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系における処理 反応効率の確認

#### DNA サンプル

5mC の変換効率を確認するためのポジティブコントロールとして、前述の方法に基づいて作成した CpG メチル化ヒトゲノム DNA を使用した。前述の方法と一部異なる点としては、Infinium450K での解析に供するため、超音波切断機による DNA の切断は行わなかった。

#### TAB-chip による解析

上記サンプルに対して、TET 反応 (Procube-E ヒト TET1: 1.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  および Wisegene 社マウス Tet1: 0.48  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を同様のプロトコルで行った後にバイサルファイト反応 (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research 社) を行った。ネガティブコントロールとして TET 反応を行わずにバイサルファイト反応のみを行ったサンプルを用意した。それぞれ、Infinium450K (Illumina HumanMethylation450 BeadChip, illumina 社) による解析に供してメチル化レベルを解析した。

### 3.1.4. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系のヒト胚性幹細胞ゲノム DNA を使用した検出の検証

#### DNA サンプル

京都大学再生医科学研究所中辻憲夫先生から提供を受けた H1 株ヒト ES 細胞のゲノム DNA を解析に用いた。

#### TAB-chip による解析

上記サンプルに対して、 $\beta$ -GT 反応 (Wisegene 社) を  $\beta$ -GT (1  $\mu$ M)、UDP-Glu (500  $\mu$ M)の反応条件下で 37°C60 分間行った。TET 反応はマウス Tet1 (0.48  $\mu$ g/ $\mu$ l、Wisegene 社)を上記と同様のプロトコルで行った。 $\beta$ -GT 反応および TET 反応を行わないサンプルと並行してバイサルファイト反応 (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research 社) を行った後に Infinium450K による解析に供して DNA メチル化レベルを解析した。公開されている H1 株ヒト ES 細胞に対する TAB-seq のデータ<sup>23</sup>と比較した。

#### hMeDIP-seq による解析

H1 ヒト ES 細胞のゲノム DNA を超音波切断機で DNA を切断したのち、抗 5hmC 抗体 (Active Motif 社) を用いて免疫沈降を行った。濃縮した DNA サンプルをライブラリ化し (ChIP-seq library preparation kit、Illumina 社)、GAIIx を用いてシーケンスをおこなった。得られたデータを上記 TAB-chip データと比較した。

## 3.2. 急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析

### 3.2.1. 症例

AML と診断された患者 27 例の骨髄細胞から抽出されたゲノム DNA をサンプルに用いた。

この研究で用いた臨床検体の解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行っている。また、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会、東京大学医学部附属病院遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認を得た上で実施している。

### 3.2.2. 遺伝子変異解析

AML 患者サンプル 27 例のうち 17 例は、既報<sup>25</sup>で行われている方法で東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクトにてターゲットシーケンスによる遺伝子変異解析が行われており、TET2・IDH1 および IDH2 遺伝子のエクソン変異情報の提供を受けた。

その他の AML 患者サンプル 10 例のうち、9 例については寛解期骨髄サンプルが入手可能であったため、寛解期骨髄サンプルを正常対照として、Haloplex 法 (Agilent 社) によるターゲットシーケンスによるペア解析を行った (図 S1)。

Haloplex 法はゲノムのターゲット領域に合わせて設計された 8 組の制限酵素による DNA の切断の後、プローブとのハイブリダイゼーション、ストレプトアビ

ジン磁気ビーズによる精製、PCR 増幅を得てターゲット領域のゲノム DNA を濃縮する系である。解析対象とした遺伝子のリストを付記する（表 S2）。

寛解期骨髄サンプルの入手できなかった 1 例については TET2 遺伝子のエクソン領域、および IDH1、IDH2 遺伝子については報告されているホットスポットの領域を挟むようにプライマー設計をして PCR を行ったのち、キャピラリーシーケンス法を用いて上記 3 遺伝子のエクソン変異解析を行った。PCR 用プライマーは TET2 に 16 か所、IDH1 および IDH2 にそれぞれ 1 か所ずつ作成（表 S3）し、キャピラリーシーケンスはそれぞれのプライマーを用いた両方向から行った。両方向からのシーケンシングによって変異が確認された塩基置換のみを採用した。

なお、TET2 の変異についてはこれまでミスセンス変異が保存された機能ドメインに集中していることが報告されており<sup>26</sup>、今回解析対象にした症例も保存された機能ドメインにアミノ酸変化の起こる症例のみとしている。IDH1 は R132 変異、IDH2 は R140 変異または R172 変異がこれまで報告されており<sup>27,28</sup>、それを有する症例を解析対象とした。

### 3.2.3. 急性骨髄性白血病に対する DNA ヒドロキシメチル化解析

遺伝子変異解析された患者サンプル 27 例を TAB 反応プロトコルに供した。TAB 反応は、 $\beta$ -GT 反応 (1  $\mu$ M、60 分間)、TET 反応 (Wisegene 社 mTET1: 0.48  $\mu$ g/ $\mu$ l、80 分間) および、BS 反応 (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit、Zymo Research 社) を行った。得られた DNA サンプルを用いて、Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (Illumina) によるヒドロキシメチル化解析を行った。

TET2 変異群、IDH1/2 変異群、WT 群各群における TAB-chip で検出された  $\beta$ -value をプローブ毎に算術平均し、それぞれの群のプローブにおける 5hmC 量とした。その際、平均値の差の検定をスチューデントの t 検定にて行い、有意水準 0.05 を用いて統計学的処理を行った。従来法に相当する、TET 処理を行わずにバイサルファイト処理のみ行った実験では 5mC と 5hmC の合計を 5mC として検出する。そのため、5mC のみを定量するため、バイサルファイト処理のみ行った Infinium450K 解析データから TAB 処理を行った後にバイサルファイト処理を行った Infinium450K 解析データの差分を算出して、5mC 量と定義した。解析は性染色体上に設定されたプローブ以外の CpG サイトを評価対象とした。それぞれの評価対象の CpG サイトにおいて、TET2 変異群および IDH1/2 変異群両群とも WT 群に比べて有意に 5hmC 量が 0.05 よりも減少していて、かつ、5mC も同様に両群とも 0.1 よりも増加している部位を Differentially hydroxymethylated region (DhMR) と定義した。DhMR に関連付けられた遺伝子を同様に Differentially hydroxymethylated gene (DhM gene) と定義した。ヒストン修飾との関係を調べるために、ENCODE データベースに登録されている CD14 陽性単球細胞における H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シー

クエンス (ChIP-seq) のデータを使用した (Cell Line: Monocytes CD14+ RO01746, UCSC Accession: wgEncodeEH003070, GEO Accession: GSM1003535 ) 。 Infinium450K のプローブ設定のある部位における、それぞれのヒストン修飾に対する ChIP-seq のシグナル値 (MACS スコア) が 10 以上の場合を陽性、それ以下を陰性と定義した。文献<sup>29</sup>に基づき H3K4me3 陽性の部位をプロモーター領域、H3K4me3 陰性, H3K27ac 陽性の部位をアクティブエンハンサー領域、H3K4me3 陰性, H3K27ac 陰性, H3K4me1 陽性の部位をポイズドエンハンサー領域と定義した。

遺伝子オントロジー解析は DAVID bioinformatics resources 6.7 を用いて行った。



## 4. 結果

### 4.1. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立

#### 4.1.1. 各酵素反応効率の評価

##### $\beta$ -GT による 5hmC 保護効率

$\beta$ -GT による 5hmC への UDP-Glu 付加効率は、シトシンが 5hmC のみで構成されるコントロール DNA における TAB 処理後のシトシン部位のメチル化レベルで推定できる。評価対象シトシンはコントロール DNA のプラス鎖において 150 塩基の位置までに存在するシトシンのうち、プライマー配列 (1~21 bp) 以外に位置するシトシン 16 個とした。それぞれの位置のシトシンのメチル化割合を使用 TET 酵素別に示した (図 6)。

全ての評価対象シトシン部位におけるメチル化割合の平均は、使用 TET 酵素別に 86.5~89.3%であった (図 7)。TET 酵素を使用していないサンプル (DW) のメチル化レベルを同様に算定すると 93.3%であった。シーケンス解析でシトシンではなくチミンと検出される残りの 6.7%に関しては、グリコシル化反応を免れた 5hmC およびグリコシル化はされたがバイサルファイト処理でチミンに変換されてしまった 5hmC が含まれる。また、3'側の評価対象シトシンほどメチル化率が低くなっている傾向が見られており、アダプター配列付加時の塩基除去修復酵素による 5hmC の dCTP による置換が起こっている可能性が考えられた。TET 酵素を使用していないサンプルで補正した  $\beta$ -GT による 5hmC への UDP-Glu 付加効率は 92.7~95.7%と計算され、5hmC 量を検出する上での感度としては十分

であると考えられた (図 7)。

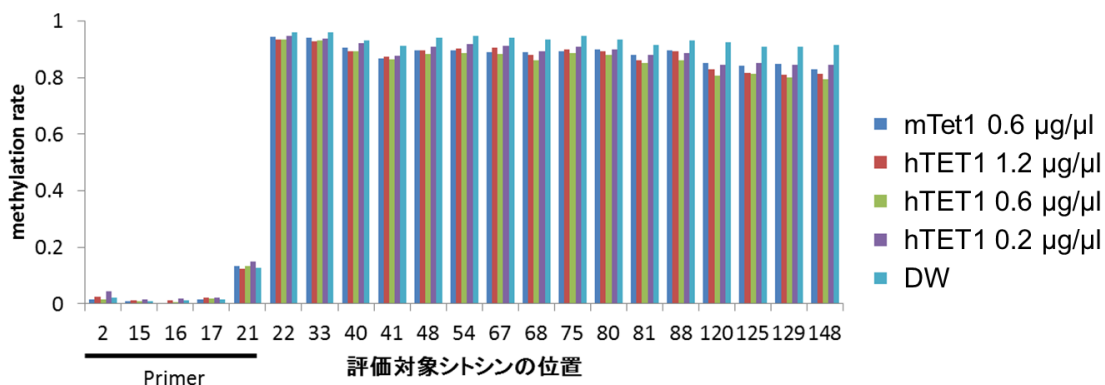


図 6. 5hmC コントロール DNA における TAB 処理後のメチル化割合

コントロール DNA 中のシトシンはプライマー部分を除いて全てヒドロキシメチル化されており、 $\beta$ -GT によるグリコシル化を受けて TET 酵素による還元反応から保護されるため、シーケンス解析ではシトシンとして検出される。Primer 上のシトシンはメチル化されていないため解析の対象外となる。

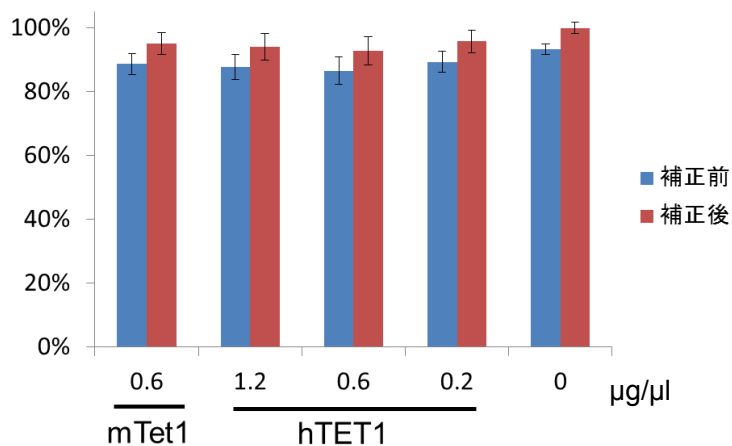


図 7.  $\beta$ -GT による 5hmC 保護効率

解析対象の全シトシン部位における 5hmC 保護効率の平均を、使用した TET 酵素別に示した。補正は TET 反応の無いサンプル (0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) が 100%となるように行った。

## TET 酵素による 5mC 変換効率

TET 酵素による 5mC から 5caC への変換効率は、Sss.I によって CpG 配列にメチル基が付加されたコントロール DNA における TAB 処理後の CpG 部位の非メチル化レベルで推定できる。評価の対象となった CpG は約 146 万~226 万個程度であり（表 2、図 8）、これで推計される TET 酵素による 5mC の変換効率は 94.2~97.2%であった。CpG メチルトランスフェラーゼによる変換効率が 100%ではないことや、ライブラリの末端ではアダプター配列の付加の際の dCTP による置換が起こりうる可能性が考えられることから、TET 酵素を使用していないサンプルで補正し、TET 酵素による 5mC の変換効率は 93.5~96.8%と推定された。マウス Tet1 およびヒト TET1 の 1.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度での使用が TAB 反応には最適であると考えられた。

表 2. CpG メチル化ゲノム DNA における TET 酵素別の 5mC 変換効率

TET enzyme conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	mTet1 0.6	hTET1 1.2	hTET1 0.6	hTET1 0.2	0
Total number of CpG's analysed:	1874424	2263027	2149234	1468989	1630655
Total methylated C's in CpG context:	52595	84570	110080	84906	1442590
Total C to T conversions in CpG context:	1821829	2178457	2039154	1384083	188065
C methylated in CpG context:	2.8%	3.7%	5.1%	5.8%	88.5%
C unmethylated in CpG context:	97.2%	96.3%	94.9%	94.2%	11.5%
Calculated 5mC conversion rate	96.8%	95.8%	94.2%	93.5%	0.0%

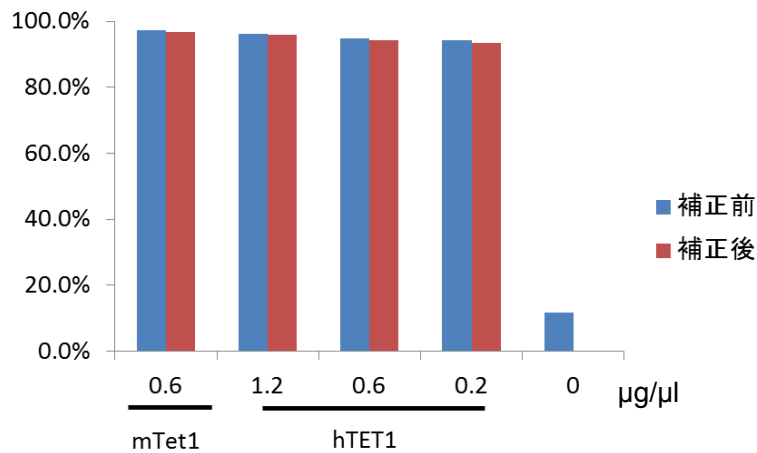


図 8. TET 酵素による 5mC 変換効率

メチル化 CpG コントロール DNA を使用した TET 変換効率の測定。TET 使用していないサンプルを 0% になるように補正した。

#### バイサルファイト反応効率

バイサルファイト反応によるシトシンからチミンへの変換効率の推定は dCTP のみの PCR 反応で作成されたコントロール DNA における TAB 処理後の CpG 部位のメチル化レベルで推定できる。5hmC の保護効率評価の際と同様に、評価対象シトシンはコントロール DNA のプラス鎖において 150 塩基の位置までに存在するシトシン 42 個とした。

バイサルファイト反応による変換率は、平均して 99.6% とほとんどのシトシンの変換が得られていた (図 9、図 10)。

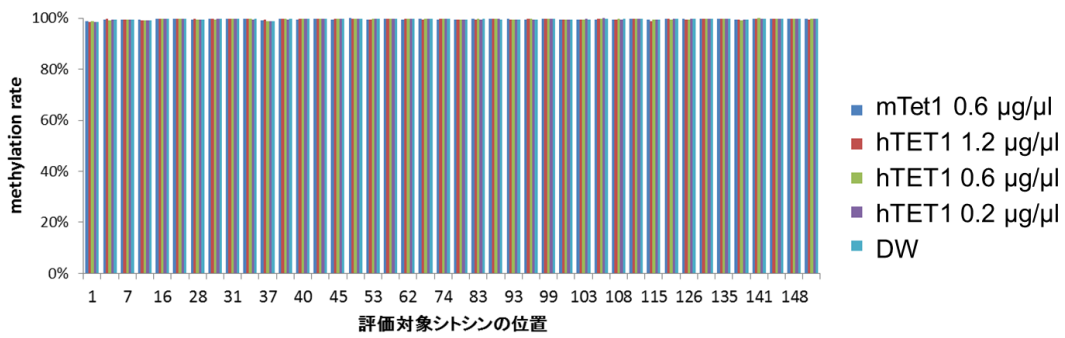


図 9. バイサルファイト変換後コントロール DNA におけるメチル化割合  
 バイサルファイト反応は、使用した TET による影響を受けず、非常に効率よくシトシンからチミンに変換できることが確認できた。

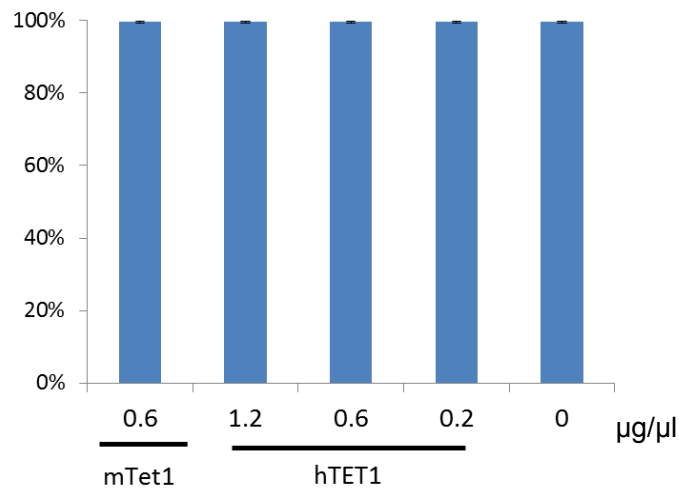


図 10. バイサルファイト変換効率  
 全解析対象シトシン部位におけるバイサルファイト変換効率を平均して示した。TET 酵素の種類に関わらず、99.6%と高い変換効率であることが確認された。

#### 4.1.2. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系における処理 反応効率の確認

CpG のみメチル化されたコントロール DNA に対する TAB 処理後の Infinium450K でのメチル化率の検出を行った。対照として CpG のみメチル化されたコントロール DNA を並行して検出を行った。ヒト TET1 およびマウス Tet1 で TAB 処理を行った。ヒト TET1 における変換効率は中央値で 77.4%となったが、マウス Tet1 における評価では中央値で 91.3%となった (図 11)。マウス Tet1 では十分な TET 酵素による変換効率が Infinium450K による検出においても確認された。

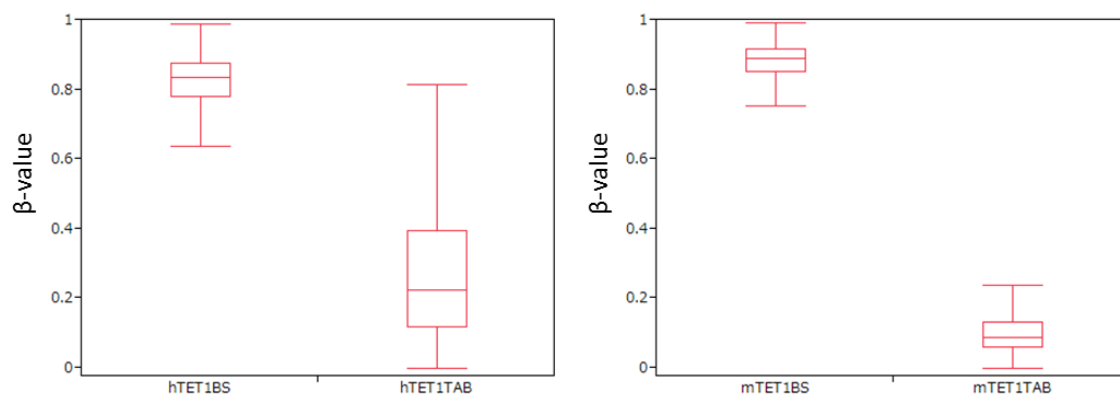


図 11. TAB-chip における TET 反応効率

hTET1 では残存したメチル化シトシンの検出が比較的多く残っている。逆に mTet1 を使用した解析ではメチル化シトシンは高率に変換されるため、残存は少ない。

### 4.1.3. ヒト胚性幹細胞における DNA ヒドロキシメチル化検出の評価

配列情報が公開されている H1 株ヒト ES 細胞の TAB-seq 法による 5hmC ゲノムマッピング結果と、我々が H1 株ヒト ES 細胞に対して TAB-chip 法で検出した 5hmC ゲノムマッピングデータを比較した。TAB-seq のデータのうち、Infinium450K で検出対象となっている（プローブの設定されている）CpG を対象に解析した。TAB-seq における 5hmC 比率を 0.1 毎に区切り、それぞれの同一ポジションに対応する TAB-chip の 5hmC 比率の分布を比較した(図 12)。TAB-seq の 5hmC 比率と TAB-chip による 5hmC 比率は良好な相関を示した。

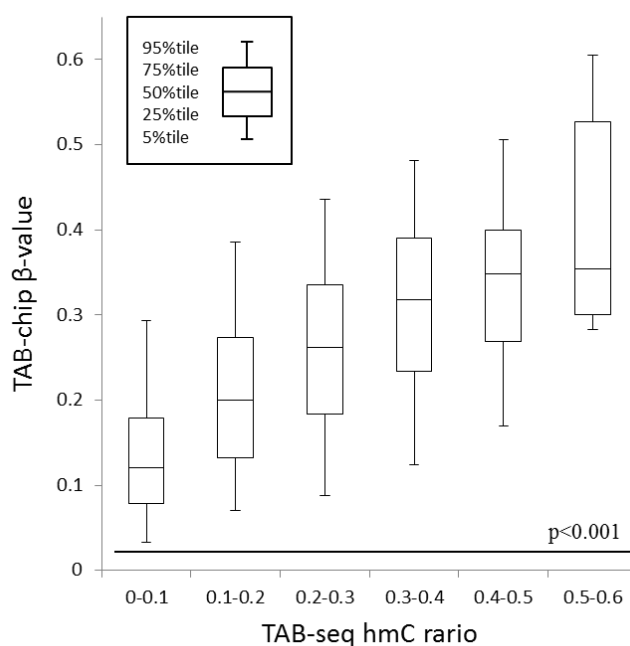


図 12. ヒト ES 細胞における TAB-chip と TAB-seq の相関

プローブ設定のある CpG における TAB-chip および TAB-seq で検出された DNA ヒドロキシメチル化率は相関が見られた ( $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis 検定)。

次に H1 株ヒト ES 細胞における 5hmC に対するヒドロキシメチルシトシン免疫沈降法 (hMeDIP-seq 法) における 5hmC のゲノムマッピングデータと TAB-chip で検出した 5hmC ゲノムマッピングデータを比較した。hMeDIP-seq のデータは 100~200bp の解像度であるため、それぞれの hMeDIP-seq で得られたピークからの距離と TAB-chip で得られた 5hmC 量 ( $\beta$ -value) を比較した。hMeDIP-seq におけるピークのポジションを中心に TAB-chip 法で定量した 5hmC 比率の増加がみられ、hMeDIP-seq と TAB-chip の間に十分な相関があることが確認できた (図 13)。

以上の検討から本研究で行った TAB 反応における酵素反応効率是十分であり、Infinium450K を使用した検出においてもコントロール DNA を用いた検証・既存の系との比較による検証で十分な解析能力があると考えられる結果であった。



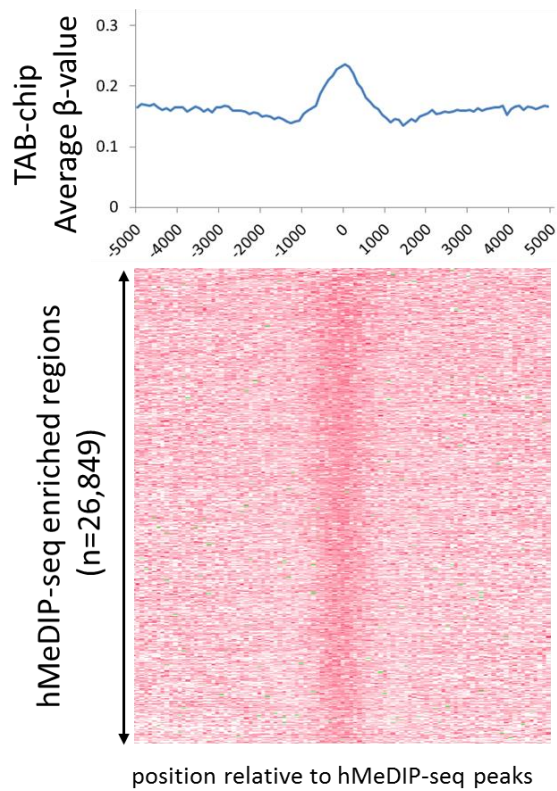


図 13. ヒト ES 細胞における TAB-chip と hMeDIP-seq の相関の確認

hMeDIP-seq で得られたピークからの距離と TAB-chip で得られた 5hmC 率の関係を調べた。hMeDIP-seq で得られたピークを中心に 5hmC 率が高く、TAB-chip と hMeDIP-seq の相関が確認された。

## 4.2. 急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析

### 4.2.1. 症例背景

TAB-chip 解析の対象とした AML 27 症例について症例背景を表記する (表 3)。年齢は平均値 59.5 歳 (標準偏差 $\pm$ 15.2 歳)、男性は 14 例 (51.9%)、芽球割合は平均値 69.7% (標準偏差 20.8%) であった。FAB 分類では M2 が 16 例と最も多く、M3 および M7 については解析対象には含まれなかった。

このうち 9 例の Haloplex 法による遺伝子変異プロファイルを表記する (表 S4)。9 例中 1 例に TET2 変異を認めた。IDH1/2 変異症例はこの 9 例中には認めなかった。キャピラリーシーケンス法による遺伝子変異を行った 1 例については TET2 および IDH1/2 の変異を認めなかった。

Haloplex 法によって判明した TET2, IDH1/2 の変異情報に加えて、東京大学がんゲノミクスプロジェクトから提供を受けた 17 症例の TET2、および IDH1/2 の変異情報について表に記載した (表 4)。

表 3. 症例背景

Patient	Diagnosis	FAB	Sex	Age	%Blasts
AML-01	AML	M2	M	57	75
AML-02	AML	M1	F	77	90
AML-03	AML	M0	F	56	90
AML-04	AML	M2	F	62	60
AML-05	AML	M1	F	76	80
AML-06	AML	M6	M	83	15
AML-07	AML	N/A	F	78	50
AML-08	AML	M2	F	75	100
AML-09	AML	M2	F	34	70
AML-10	AML	M5	M	38	100
AML-11	AML	M5	F	N/A	93
AML-12	AML	M2	F	43	76
AML-13	AML	M2	M	24	82
AML-14	AML	M2	F	66	68
AML-15	AML	M2	M	76	62
AML-16	AML	M6	M	57	58
AML-17	AML	M2	M	58	23
AML-18	AML	M2	M	48	66
AML-19	AML	M2	F	77	64
AML-20	AML	M4	M	69	50
AML-21	AML	M2	M	64	60
AML-22	AML	M2	F	50	69
AML-23	AML	M2	F	49	90
AML-24	AML	M5	M	72	50
AML-25	AML	M2	M	52	70
AML-26	AML	M4	M	53	80
AML-27	AML	M0	M	52	90

N/A: Not Available

表 4. 症例別 TET2 および IDH1/2 変異リスト

Patient	TET2	IDH1/2
AML-01	WT	WT
AML-02	NM_001127208:c.C3640T;p.R1214W	WT
AML-03	WT	WT
AML-04	WT	WT
AML-05	NM_001127208:c.2203_2204insGTTC;p.S735fs, NM_001127208:c.C2899T;p.Q967X	WT
AML-06	NM_001127208:c.C1259G;p.S420X	WT
AML-07	NM_001127208:c.3765delC;p.Y1255X, NM_001127208:c.4657_4660del;p.1553_1554del	WT
AML-08	NM_001127208:c.T3743C;p.L1248P	WT
AML-09	NM_001127208:c.650delC;p.S217fs	WT
AML-10	NM_001127208:c.4331delT;p.I1444fs	WT
AML-11	NM_001127208:c.T4824G;p.Y1608X, NM_001127208:c.5435delT;p.V1812fs	WT
AML-12	NM_001127208:c.1622_1623insGG;p.L541fs	WT
AML-13	WT	WT
AML-14	WT	WT
AML-15	NM_001127208:c.C1630T;p.R544X, NM_001127208:c.C3581G;p.P1194R	WT
AML-16	WT	WT
AML-17	WT	WT
AML-18	WT	WT
AML-19	WT	WT
AML-20	WT	IDH2(NM_002168):c.G419A;p.R140Q
AML-21	WT	IDH1(NM_005896):c.C394T;p.R132C
AML-22	WT	IDH2(NM_002168):c.G419A;p.R140Q
AML-23	WT	IDH1(NM_005896):c.C394T;p.R132C
AML-24	WT	IDH1(NM_005896):c.C394T;p.R132C
AML-25	WT	IDH1(NM_005896):c.C394A;p.R132S
AML-26	WT	IDH2(NM_002168):c.G419A;p.R140Q
AML-27	WT	IDH2(NM_002168):c.G515A;p.R172K

解析対象とした AML27 症例のうち、TET2 変異を認める症例は 10 例（TET2 変異群）、IDH1 もしくは IDH2 変異を認める症例は 8 例（IDH1/2 変異群）であった。TET2、IDH1 および IDH2 いずれも変異の無い 9 症例（WT 群）を同時に解析した。年齢、性別、FAB 分類、芽球割合の平均値ではそれぞれ TET2 変異群および IDH1/2 変異群と WT 群との間に有意差を認めなかった（表 5）。

表 5. 解析対象症例

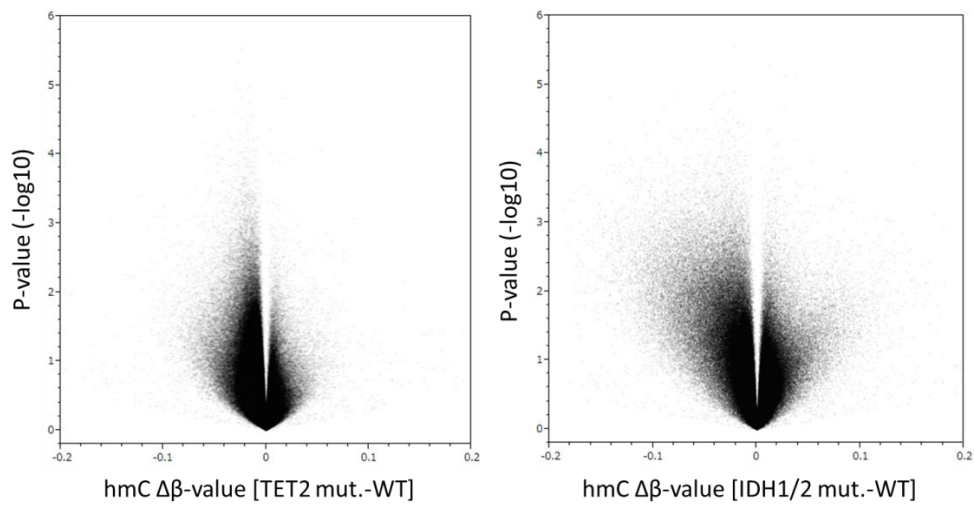
	All	TET2 mutation	P-value	IDH1/2 mutation	P-value	WT
N	27	10		8		9
Age	59.5 (±15.2)	64.4 (±19.8)	0.3943	57.6 (±9.2)	0.6495	56.1 (±14.5)
Male sex	14 (51.9%)	3 (30.0%)	0.3689	6 (75%)	0.6199	5 (55.6%)
Blasts	69.7 (±20.8)	73.6 (±26.3)	0.2611	69.9 (±16.0)	0.8409	65.1 (±18.9)
FAB			0.3413		0.4136	
M0	2	0		1		1
M1	2	2		0		0
M2	16	5		4		7
M4	2	0		2		0
M5	3	2		1		0
M6	2	1		0		1

年齢、芽球割合はそれぞれ変異群と WT 群間でスチューデントの t 検定を行った。性別、FAB 分類に関してはそれぞれ変異群と WT 群間でフィッシャーの正確検定を行った。

#### 4.2.2. DNA ヒドロキシメチル化の変化

TET2 及び IDH1 もしくは IDH2 の遺伝子変異がある群と TET2、IDH1 及び IDH2 の変異を有さない群を野生型 (WT) 群として、それぞれ変異群と WT 群を比較した。TET2 変異群および IDH1/2 変異群ではそれぞれ WT 群と比べて有意に 5hmC が低下している部位が多かった (図 14a,b)。

a.



b.

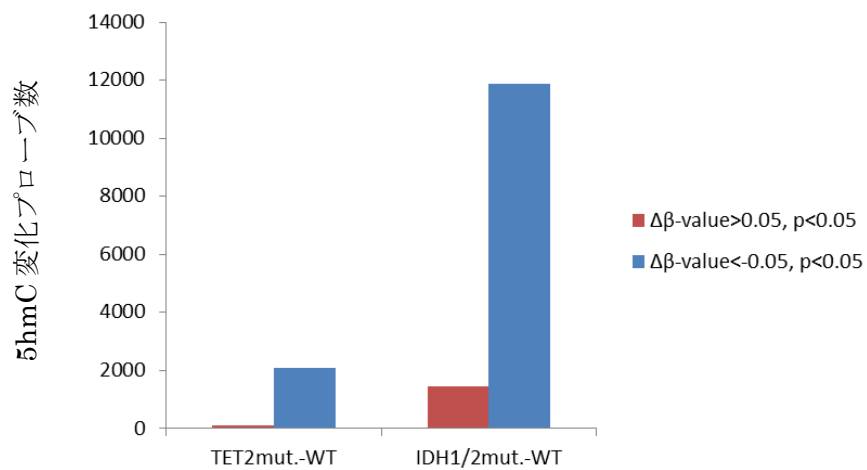


図 14. 各プローブにおける 5hmC 比率の変化

a. ボルケーノプロットにより TET2 および IDH1/2 変異群と WT 群の 5hmC 値を比較した。WT よりも各変異群で有意に 5hmC が低下しているプローブが多いことがわかる。

b. TET2 および IDH1/2 変異群と WT 群で有意に差があるプローブ数を WT 群に比べて高いものと低いものに分けてカウントした。

遺伝子変異群別の 5hmC および 5mC ヒートマップを作成した。5hmC において、TET2 変異および IDH1/2 変異いずれの遺伝子変異群においても WT 群との平均  $\beta$ -value の差が 0.05 以上、もしくは-0.05 以下であり、有意に ( $p < 0.05$ ) 平均値の差が認められた 991 プローブを抽出した (図 15)。5mC において、TET2 変異および IDH1/2 変異いずれの遺伝子変異群においても WT 群との平均  $\beta$ -value の差が 0.2 以上、もしくは-0.2 以下であり、有意に ( $p < 0.05$ ) 平均値の差が認められた 820 プローブを抽出した (図 16)。

各群内においても 5hmC および 5mC の量にばらつきがある程度あることが分かったが、傾向としては 5hmC においては WT 群 > TET2 変異群 > IDH1/2 変異群の順に高く、逆に 5mC においては IDH1/2 変異群 > TET2 変異群 > WT 変異群の順に高いプローブが抽出された。



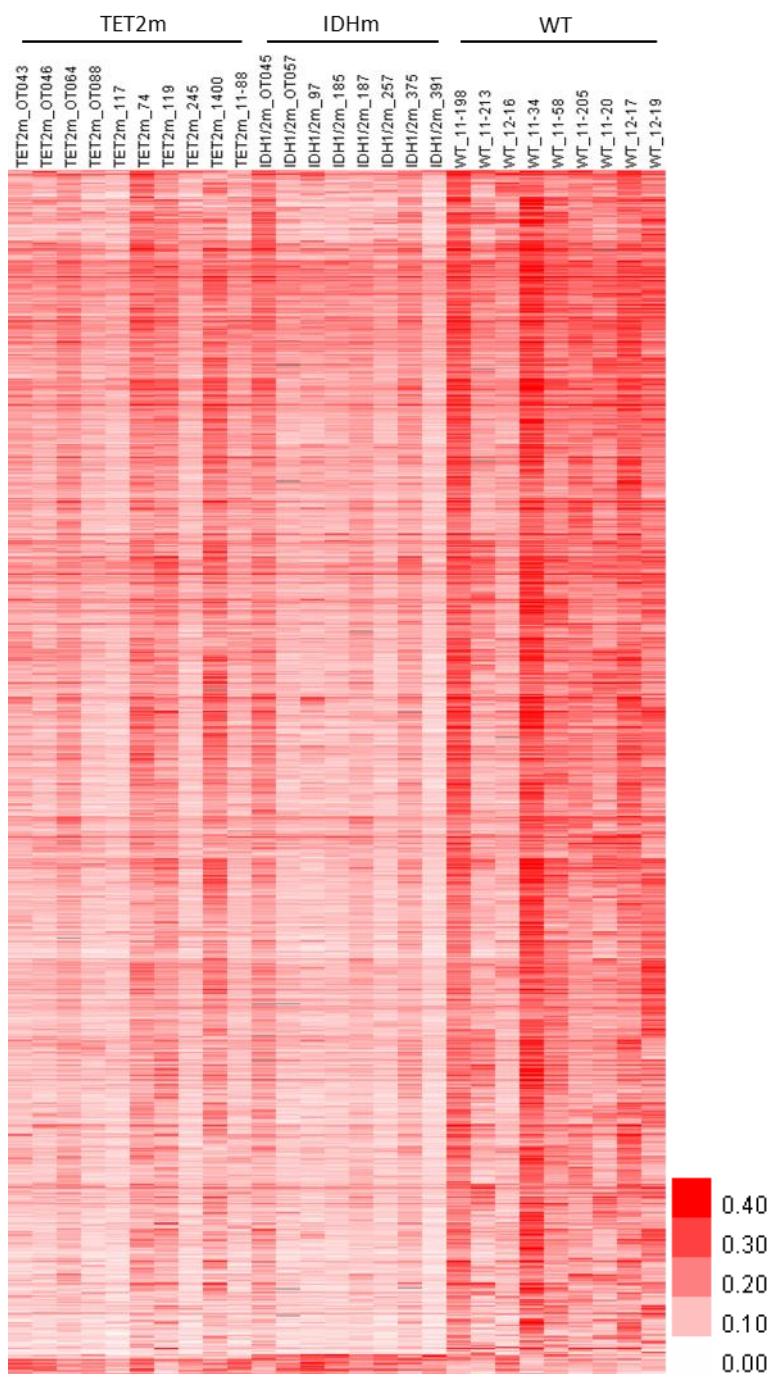


図 15. 変化のある部位における遺伝子変異群別 5hmC のヒートマップ

WT 群>TET2 変異群>IDH1/2 変異群の順に 5hmC が高い傾向があるプローブが多く抽出された。

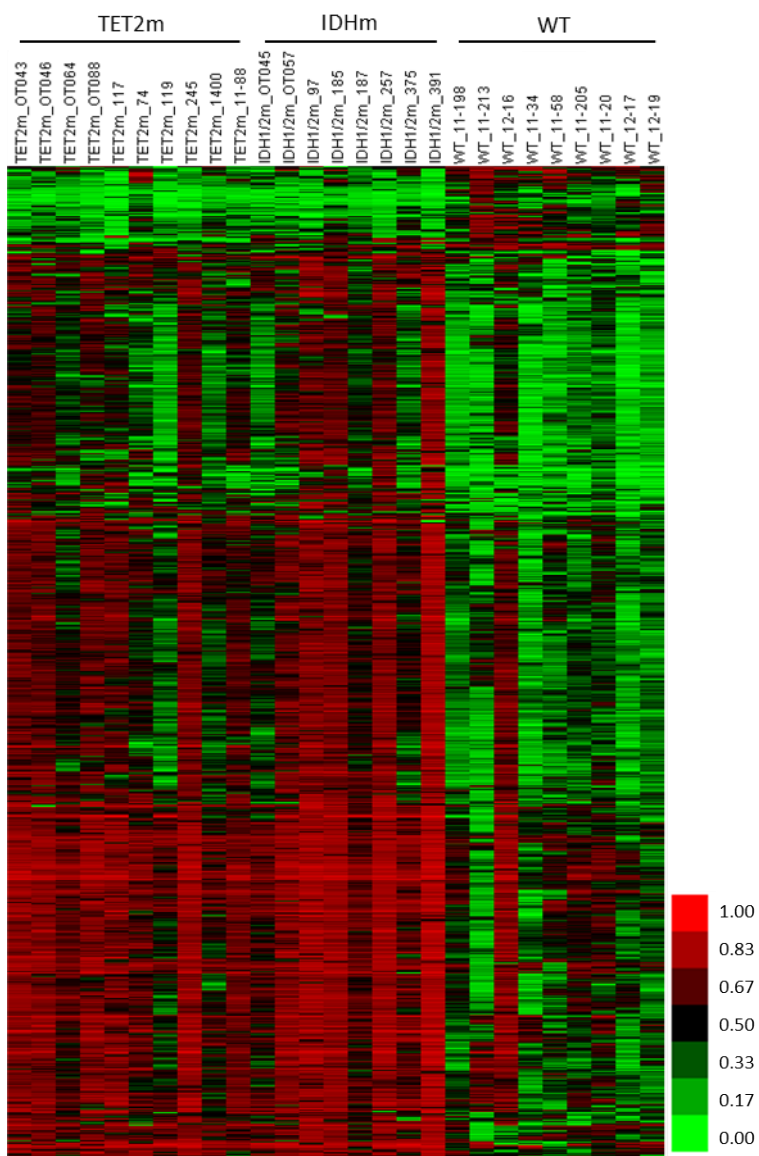


図 16. 変化のある部位における遺伝子変異群別 5mC のヒートマップ

IDH1/2 変異群 > TET2 変異群 > WT 変異群の順に 5mC が高い傾向があるプローブが多く抽出された。

### 4.2.3. DNA メチル化と DNA ヒドロキシメチル化の関係

TET2 変異群、および IDH1/2 変異群で、WT 群と比べて有意に 5mC および 5hmC が変化している部位を抽出して、それぞれの部位における変化量を比較した (図 17)。両群ともに 5hmC が低下している部位において逆に 5mC は増加している傾向があり、TET2 変異群、および IDH1/2 変異群における 5hmC の低下が起こる部位は脱メチル化異常が起こっていることが確認できた。

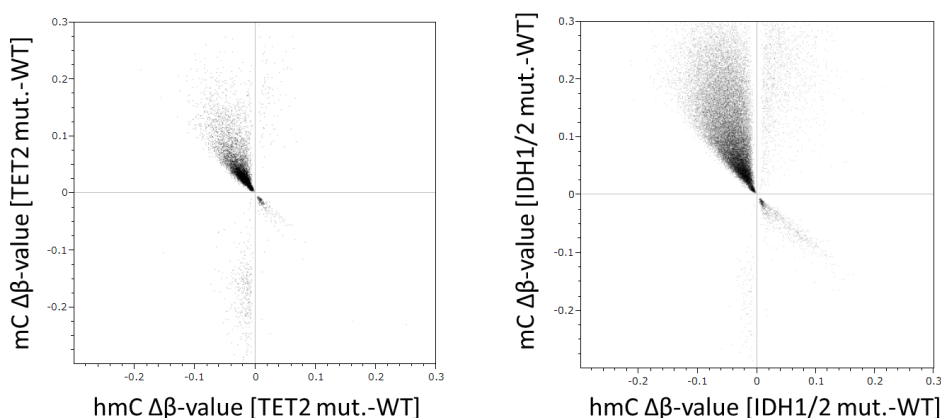


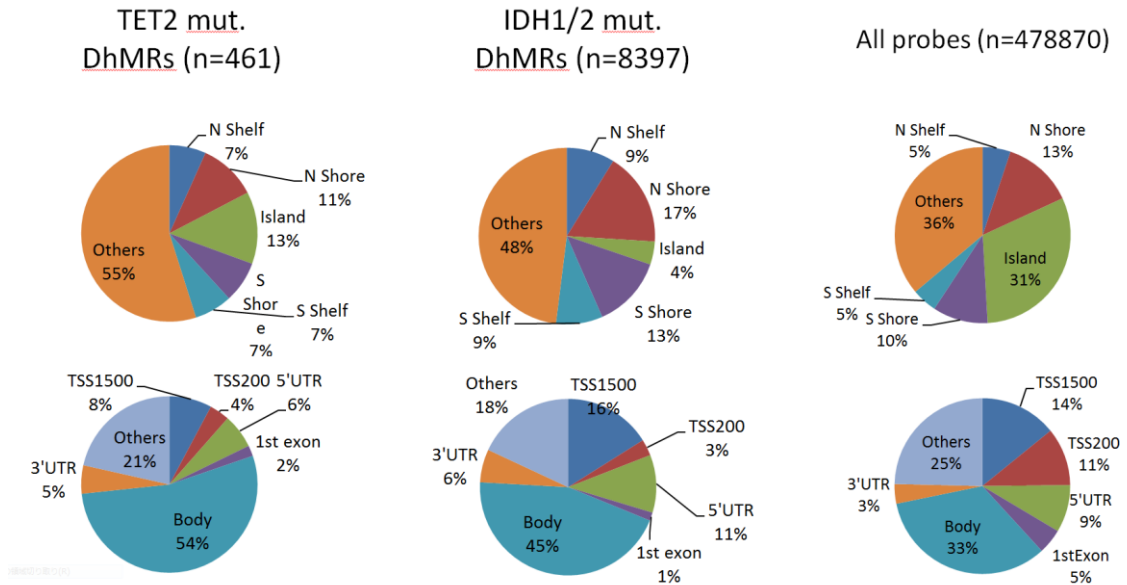
図 17. 5mC 及び 5hmC が有意に変化している部位における変化量の相関  
TET2 変異群、IDH1/2 変異群両群ともに WT 群と比べて 5hmC が低下している部位において逆に 5mC は増加している傾向がある。

#### 4.2.4. DNA ヒドロキシメチル化の分布の変化

TET2 変異群、IDH1/2 変異群においてそれぞれ WT 群と比べて有意に 5hmC が低下 ( $\beta$ -value 低下 0.05 以上、 $p < 0.05$ ) し、5mC が増加 ( $\beta$ -value 増加 0.1 以上、 $p < 0.05$ ) する部位を DhMR (Differentially hydroxymethylated region) と定義した。まず DhMR がみられた部位と CpG island との関係を相対的な出現割合を比較することで調べた (図 18a,b)。それぞれの全体の平均と比べて TET2 変異群においては CpG shelf、もしくは CpG island から離れた部位において DhMR がよく見られた。また、IDH1/2 変異群においては CpG island では DhMR はあまり見られず、その他の部分においては全体の平均より頻度は高かった。両群ともに CpG island から CpG shore、CpG shelf と離れるにつれて DhMR の出現が増加し、十分に離れた部位においても比較的多く見られるという共通の傾向があった。両群で差があった点としては特に IDH1/2 変異群のほうで CpG shore、CpG shelf における DhMR の出現頻度が高く、CpG から離れた部位の存在割合は相対的に低下していた。

次に DhMR と遺伝子領域の関係について調べた (図 18a,b)。TET2 変異群では DhMR が遺伝子領域内、もしくは 3'UTR (three prime untranslated region)上に比較的多く、IDH1/2 変異群においてはそれらに加えて転写開始点(TSS : Transcript Start Site )から 1500bp 以内の距離にある評価部位および 5'UTR (five prime untranslated region)にも平均と比べて相対的に多く DhMR が認められた。以上の結果から、TET2 や IDH1/2 変異により影響を受ける CpG の部位としては、共通して遺伝子上や 3'UTR などの転写開始点から離れた部位に多く、IDH1/2 変異群においてはそれに加えて CpG shore や CpG shelf での出現割合が多かった。IDH1/2 変異群においては転写開始点から 1500bp の範囲内の部位や 5'UTR における DhMR の出現確率の相対的増加は CpG shore や CpG shelf での出現割合の増加と相関していると考えられた。

a.



b.

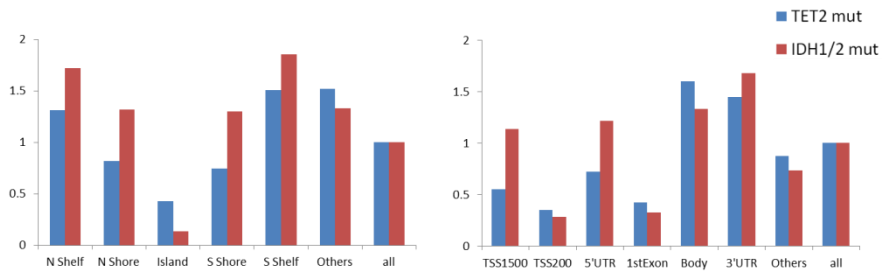
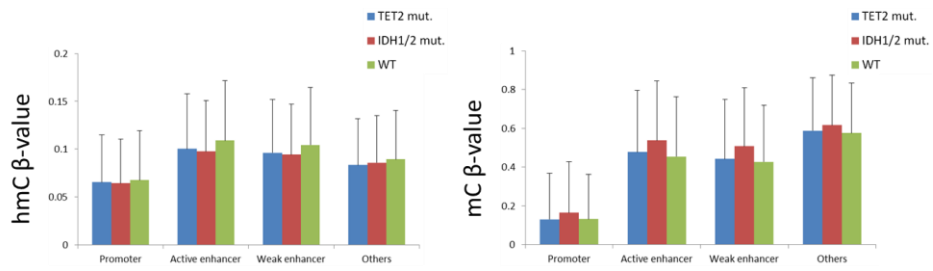


図 18. 5mC 及び 5hmC が有意に変化している部位と CpG island および遺伝子領域との関係

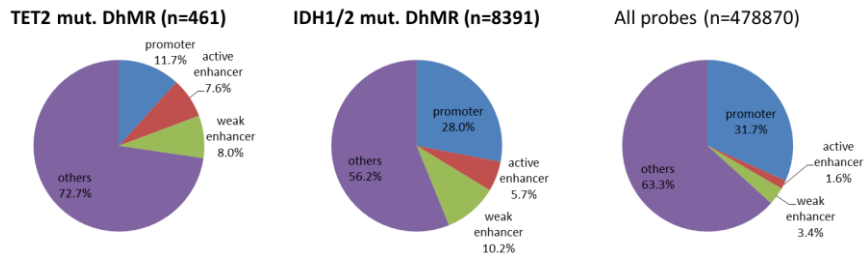
TET2 もしくは IDH1/2 の変異によって WT 群と比べて 5hmC が減り、5mC が増えている部位と CpG island や遺伝子の部位との関係を解析した。CpG island や TSS で低くその周辺で高い傾向があるが、IDH1/2 変異で特にその傾向が強い。

次に我々は ENCODE プロジェクトの公開データベースに登録された CD14 陽性単球細胞におけるヒストン修飾データと DhMR の関係を調べた (図 19a,b,c)。H3K4me3(-), H3K27ac(+) で定義されたアクティブエンハンサー部位、および H3K4me3(-), H3K27ac(-), H3K4me1(+) で定義されたポイズドエンハンサー部位において<sup>29</sup>、TET2 変異群、および IDH1/2 変異群における 5hmC の相対的な増加と、DhMR の相対的な増加を認めた。この結果により TET2 変異や IDH1/2 変異による脱メチル化異常がエンハンサー部位でより顕著にみられることが確認できた。

a



b



c

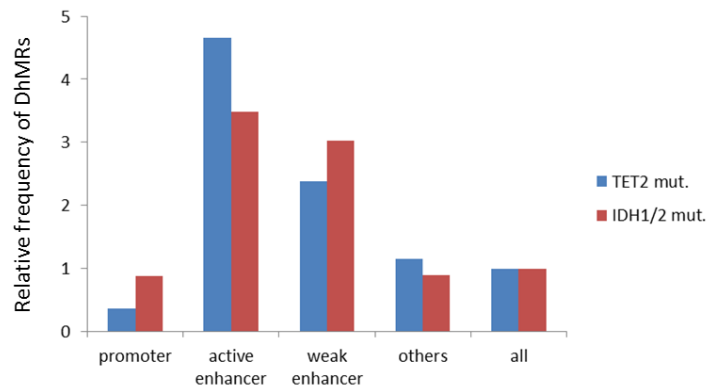


図 19. 5mC 及び 5hmC が有意に変化している部位とエンハンサーマークとの関係  
TET2 変異や IDH1/2 変異によって 5hmC の変化が起こる場所はエンハンサー部  
位で多いことが分かった。



#### 4.2.5. DNA ヒドロキシメチル化の変化が見られた遺伝子

DhMR と判定されたプローブに関連付けられた遺伝子の総数は、TET2 変異群で 301 個、IDH1//2 変異群で 4177 個であった。興味深いことに、TET2 変異群で抽出された遺伝子のうちそのほとんど(281 遺伝子/301 遺伝子、93.4%)が IDH1/2 変異群でも抽出されてきた遺伝子であった(図 20、表 S5)。このことから脱メチル化異常と骨髄系腫瘍を関係づける遺伝子異常がこの共通の遺伝子 281 個の中に含まれている可能性が高いと考えた。

この共通の遺伝子 281 個について遺伝子オンロジーで解析を行った結果を表にしめす(表 6、表 S6)。骨髄系腫瘍発症に関わる重要な機構として考えられるものとして、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達経路(チロシンキナーゼ、セリン/スレオニンキナーゼ、プロテインチロシンホスファターゼなど)関連遺伝子が濃縮していることがわかった。

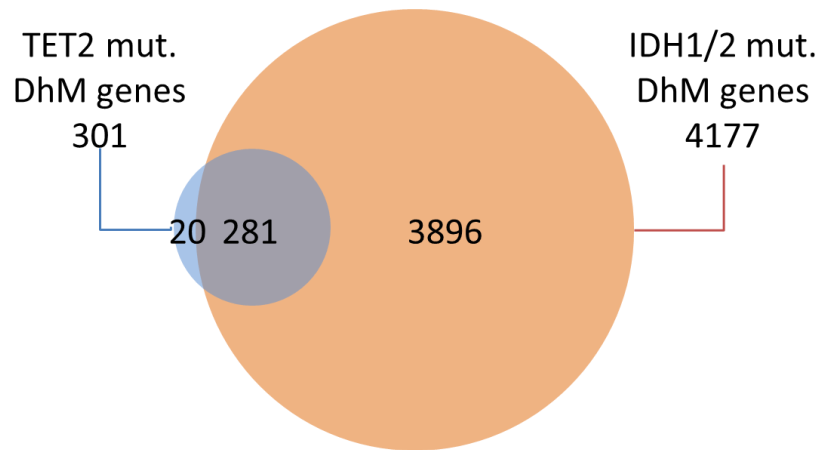


図 20. DNA ヒドロキシメチル化の変化が見られた遺伝子数

有意に 5hmC 低下と 5mC 増加が見られたプローブの存在する遺伝子を各変異群毎に抽出した。TET2 変異群で抽出された遺伝子のうちそのほとんど（281 遺伝子/301 遺伝子、93.4%）が IDH1/2 変異群でも抽出されてきた遺伝子であった。

表 6. DNA ヒドロキシメチル化の変化が見られた遺伝子の遺伝子オントロジー解析

Term	P-Value	Benjamini
vesicle-mediated transport	1.30E-04	1.50E-01
positive regulation of apoptosis	6.50E-03	9.80E-01
positive regulation of programmed cell death	6.90E-03	9.40E-01
positive regulation of cell death	7.20E-03	8.90E-01
phosphorus metabolic process	7.50E-03	8.50E-01
phosphate metabolic process	7.50E-03	8.50E-01
apoptosis	8.90E-03	8.40E-01
programmed cell death	1.00E-02	8.40E-01
phosphorylation	2.70E-02	9.90E-01
regulation of apoptosis	2.80E-02	9.80E-01
regulation of programmed cell death	3.10E-02	9.80E-01
regulation of cell death	3.20E-02	9.70E-01
induction of apoptosis	3.30E-02	9.70E-01
induction of programmed cell death	3.30E-02	9.60E-01
cell death	3.90E-02	9.70E-01
death	4.10E-02	9.70E-01
protein amino acid phosphorylation	4.20E-02	9.60E-01
positive regulation of lymphocyte activation	4.50E-02	9.60E-01
endosome transport	4.50E-02	9.60E-01

## 5. 考察

今回我々は、TAB-seq のプロトコルを応用して Infinium 450K に用いることで多数の患者検体の解析のための系の確立を行った。まず我々は、Miseq を用いて TAB の系に必要な各種酵素変換効率の評価をおこなった。既報<sup>24</sup>では TAB-seq の系において理想的な変換効率として、TET2 変換効率が 96%以上、 $\beta$ -GT 変換効率は 80%以上とされている。今回の評価で TAB における反応条件が十分な効率であることを確認できたと考えられた。

次に我々は Infinium 450K を用いた TET 酵素変換効率の評価を行い、TAB-chip における最適な酵素反応条件を決定した。そして、H1 株ヒト ES 細胞ゲノム DNA における TAB-chip による 5hmC ゲノムマッピングを行い、これと既報の TAB-seq のデータや hMeDIP-seq のデータと比較することで、TAB-chip で十分な 5hmC の検出ができることを示した。その結果、これまで報告の無い、TAB 反応と Infinium450K を組み合わせた方法で、ゲノムワイドに 5hmC のマッピングを可能にする系を確立できた。

この系を用いて我々は TET2 変異 AML および IDH1/2 変異 AML、そしてそれらに変異の無い AML のゲノム DNA の 5hmC マッピングを行った。これまでの報告では、TET2 変異骨髄系腫瘍における 5hmC の抗体を用いたドットプロット法で、変異のない腫瘍に比べて 5hmC の総量が低下していることが示されていた<sup>22</sup>。今回の我々の 5hmC マッピングの結果はそれと同様に TET2 変異群において 5hmC は低下している傾向にあった。さらに今回の結果から分かったことと

して TET2 変異群と IDH1/2 変異群では後者のほうが 5hmC が低下している傾向があった。この結果は、TET2 変異症例による機能喪失は片アレル変異であることから、TET2 の酵素活性は一部残存していること、野生型の IDH は 2-OG の産生を触媒するが、その変異体は 2-HG を産生し、2-HG が TET を含む  $\alpha$ -ケトグルタル酸に依存的な酵素活性を競合的に阻害するため、他の TET ファミリー蛋白の酵素活性も含めた脱メチル化反応を阻害することになるという機序の差からも説明ができる。また、既報<sup>18,21</sup>での DNA メチル化状態の差として、IDH 変異群のほうが TET2 変異群より DNA メチル化の上昇を来しているため、その結果においても DNA 脱メチル化の異常は TET2 に比べて IDH のほうが大きいことが予想される結果であったことと一致する。

これまで、DNA メチル化と遺伝子発現の関係については CpG island や転写開始点近傍の CpG island における調節の報告が多かった。最近では、ヒト ES 細胞やマウス ES 細胞において 5hmC は主にエンハンサー部位で多く見られるという報告<sup>23</sup>や、組織別のゲノム DNA メチル化解析でエンハンサー部位や CpG shore において CpG のメチル化割合が変化していると報告<sup>30</sup>されており、特にそれらの部位に注目した解析を進めていく必要があると示唆されていた。Infinium450K では CpG island に加えて CpG shore(CpG island から 2000 塩基の範囲) CpG shelf (CpG island から 2000~4000 塩基の範囲) にもプローブが設定されている。さらに、遺伝子領域においてもプロモーター周辺のみならず、5'UTR、第 1 エクソン、遺伝子内、3' UTR についてもプローブ設定されており、我々の確立した系でもエンハンサー部位における 5hmC の観察ができることが期待された。実際に患者検体を用いて確認してみると TET2 変異群、および IDH1/2 変異群で 5hmC 量

に変化のある部位が比較的エンハンサー部位に多く存在していることは、これまでの報告も踏まえるととても興味深い結果であった。

我々は今研究で有意に 5hmC 低下と 5mC 増加が見られたプローブと CpG island および遺伝子領域との関係を示したが、TET2 変異と IDH1/2 変異でその分布パターンが異なることがわかった。前述と同様に IDH 変異では TET2 変異と異なり、TET1 や TET3 の機能も抑制すると考えられるが、TET1 や TET3 は TET2 と異なり CXXC ドメインを持つことが知られている<sup>31</sup>。そのため、TET1 や TET3 が CpG island の近傍で DNA と結合しやすく、その機能を抑制する IDH1/2 変異では CpG island 周辺で WT 群と比較して 5hmC が相対的に高くなっている可能性が考えられる。逆に、TET2 は CXXC ドメインを持たないため、なんらかの転写因子と複合体を形成し、CpG island や転写開始点から離れたエンハンサー部位で主に働いている可能性が推察された。

エンハンサーにおける TET2 による DNA 脱メチル化制御が、具体的にどのような機序で遺伝子発現制御を行っているかについてはこれまで報告は無いものの、エンハンサーにおいて発現制御に関わる重要な転写因子の結合状態を変えている可能性が考えられる。例えば、ヒト単球から破骨細胞に分化する系における ChIP-seq、DNA メチル化の解析で、PU.1 と TET2 が共役して破骨細胞への分化に重要な遺伝子の発現制御に関わっているという報告がある<sup>32</sup>。PU.1 は骨髄単球系や B 細胞に多く発現し、また、造血幹細胞レベルからの発現も見られて血球系分化に重要な役割を果たしている転写因子であり<sup>33</sup>、TET2 機能不全による DNA 脱メチル化異常がこのような経路で腫瘍発生に寄与する可能性が考え

られる。

骨髄系腫瘍患者の DNA ヒドロキシメチル化解析を行った結果、抽出されてきた遺伝子群にはシグナル伝達系の機能を有するものが多かった。FLT3 変異などの変異が相互排他的に集積していることがわかっており、重要な経路であることが予想されるが<sup>21</sup>、このことに IDH1/2 変異や TET2 変異がかかわっている可能性が今回の我々の研究から示唆された。シグナル伝達系においてはその阻害薬が開発され、臨床応用が始まっている段階であるが、本研究の結果から白血病とシグナル伝達系との関与が DNA 脱メチル化異常からの観点から考察が進めばさらなる治療領域開発の可能性があると考えられた。

Infinium 450K はバイサルファイト反応を用いるため、それを用いた TAB-chip では一塩基レベルでの 5hmC の解析が可能である。一塩基レベルでの解析が可能になると、5hmC の変化と転写因子結合モチーフの解析や、ヒストン修飾との関係の解析を行っていく上で、より正確なデータを得られる利点があることが考えられる。今後はこれらの解析を進めることで、DNA 脱メチル化異常による骨髄系腫瘍形成の機序の解明につなげたい。

本研究では IDH1/2 変異や TET2 変異を有する症例の DNA ヒドロキシメチル化解析を行い、DNA 脱メチル化異常が起こっている可能性のある遺伝子の候補を挙げる事が出来た。今後は IDH1/2 変異や TET2 変異を有する症例の遺伝子発現データとの統合解析や、IDH1/2 変異マウスモデル<sup>34</sup>や TET2 コンディショナルノックアウトマウスモデル<sup>15,16</sup>などのマウスモデルを使用した DNA メチル

化/DNA ヒドロキシメチル解析と遺伝子発現解析の統合解析を行い、脱メチル化異常と遺伝子発現の変化の関係を明らかにすることが必要であると考えられる。

## 謝辞

本研究のご指導賜った黒川峰夫先生、油谷浩幸先生をはじめ、永江玄太先生、米沢理人先生、梅田高呂先生、後藤健吾先生、吉田健一先生、坂田(柳元)麻実子先生、小川誠司先生、千葉滋先生の諸先生方に心より感謝申し上げます。



## 引用文献

1. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–57 (1999).
2. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–73 (2002).
3. Ooi, S. K. T., O'Donnell, A. H. & Bestor, T. H. Mammalian cytosine methylation at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 2787–91 (2009).
4. Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M. & Taga, T. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* **1**, 749–58 (2001).
5. Williams, K., Christensen, J. & Helin, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* **13**, 28–35 (2012).
6. Kulis, M. & Esteller, M. DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* **70**, 27–56 (2010).
7. Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y. & Maciejewski, J. P. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113**, 1315–25 (2009).
8. Zeidan, A. M., Linhares, Y. & Gore, S. D. Current therapy of myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* **27**, 243–59 (2013).
9. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L. & Rao, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–5 (2009).
10. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. a., He, C. & Zhang, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300–3 (2011).
11. He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C.-X., Zhang, K., He, C. & Xu, G.-L. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–7 (2011).

12. Maiti, A. & Drohat, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.* **286**, 35334–8 (2011).
13. Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., Eberl, H. C., Mensinga, A., Brinkman, A. B., Lephikov, K., Müller, U., Walter, J., Boelens, R., van Ingen, H., Leonhardt, H., Carell, T. & Vermeulen, M. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **152**, 1146–59 (2013).
14. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguié, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. & Bernard, O. A. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–301 (2009).
15. Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S. D., Melnick, A., Godley, L. a, Aifantis, I. & Levine, R. L. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 (2011).
16. Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bastard, C., Mercher, T. & Bernard, O. a. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**, 25–38 (2011).
17. Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P. & Levine, R. L. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 599–612 (2012).
18. Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Löwenberg, B., Licht, J. D., Godley, L. a, Delwel, R., Valk, P. J. M., Thompson, C. B., Levine, R. L. & Melnick, A. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–67 (2010).
19. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., Liu, L., Jiang, W., Liu, J., Zhang, J., Wang, B., Frye, S.,

- Zhang, Y., Xu, Y., Lei, Q., Guan, K.-L., Zhao, S. & Xiong, Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17–30 (2011).
20. Cimmino, L., Abdel-Wahab, O., Levine, R. L. & Aifantis, I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell* **9**, 193–204 (2011).
  21. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–74 (2013).
  22. Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., Liu, X. S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J. P. & Rao, A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
  23. Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C.-X., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., Min, J.-H., Jin, P., Ren, B. & He, C. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* **149**, 1368–80 (2012).
  24. Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C.-X., Jin, P., Ren, B. & He, C. Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Protoc.* **7**, 2159–70 (2012).
  25. Kon, A., Shih, L.-Y., Minamino, M., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., Yoshida, K., Okuno, Y., Bando, M., Nakato, R., Ishikawa, S., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Nishimoto, A., Haferlach, C., Nowak, D., Sato, Y., Alpermann, T., Nagasaki, M., Shimamura, T., Tanaka, H., Chiba, K., Yamamoto, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Nolte, F., Hofmann, W.-K., Miyawaki, S., Chiba, S., Mori, H., Nakauchi, H., Koefler, H. P., Aburatani, H., Haferlach, T., Shirahige, K., Miyano, S. & Ogawa, S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat. Genet.* **45**, 1232–7 (2013).
  26. Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A. G., Raymakers, R. a P., Kamping, E. J., Verhoef, G. E., Verburch, E., Hagemeijer, A., Vandenbergh, P., de Witte, T., van der Reijden, B. a & Jansen, J. H. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **41**, 838–42 (2009).
  27. Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A.,

- Locke, D. P., Magrini, V. J., Abbott, R. M., Vickery, T. L., Reed, J. S., Robinson, J. S., Wylie, T., Smith, S. M., Carmichael, L., Eldred, J. M., Harris, C. C., Walker, J., Peck, J. B., Du, F., Dukes, A. F., Sanderson, G. E., Brummett, A. M., Clark, E., McMichael, J. F., Meyer, R. J., Schindler, J. K., Pohl, C. S., Wallis, J. W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y., Haipek, C., Wiechert, M. E., Ivy, J. V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R. E., Payton, J. E., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Watson, M. A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W. D., Nagarajan, R., Link, D. C., Walter, M. J., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Wilson, R. K. & Ley, T. J. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058–66 (2009).
28. Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., Collier, H. A., Cross, J. R., Fantin, V. R., Hedvat, C. V., Perl, A. E., Rabinowitz, J. D., Carroll, M., Su, S. M., Sharp, K. A., Levine, R. L. & Thompson, C. B. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17**, 225–34 (2010).
29. Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelson, T. S., Shores, N., Ward, L. D., Epstein, C. B., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M., Ku, M., Durham, T., Kellis, M. & Bernstein, B. E. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**, 43–9 (2011).
30. Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T.-Y., Kohlbacher, O., De Jager, P. L., Rosen, E. D., Bennett, D. A., Bernstein, B. E., Gnirke, A. & Meissner, A. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* **500**, 477–81 (2013).
31. Pastor, W. a., Aravind, L. & Rao, A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 341–356 (2013).
32. De la Rica, L., Rodríguez-Ubreva, J., García, M., Islam, A. B., Urquiza, J. M., Hernando, H., Christensen, J., Helin, K., Gómez-Vaquero, C. & Ballestar, E. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol.* **14**, R99 (2013).
33. Rosenbauer, F. & Tenen, D. G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 105–17 (2007).
34. Chaturvedi, A., Araujo Cruz, M. M., Jyotsana, N., Sharma, A., Yun, H., Görlich, K., Wichmann, M., Schwarzer, A., Preller, M., Thol, F., Meyer, J., Haemmerle, R., Struys, E. A., Jansen, E. E., Modlich, U., Li, Z., Sly, L. M., Geffers, R., Lindner, R., Manstein, D. J., Lehmann, U., Krauter, J., Ganser, A. & Heuser, M.

Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* **122**, 2877–87 (2013).

## 略語一覽

3'UTR	three prime untranslated region
5'UTR	five prime untranslated region
5caC	5-carboxylcytosine
5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
AML	acute myeloid leukemia
BS	Bisulfite
CpG	cytosine-phosphate-guanosine
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dhmCTP	5-hydroxymethyl deoxycytidine triphosphate
DhMR	Differentially hydroxymethylated region
DNMT	DNA methyltransferase
ENCODE	The Encyclopedia of DNA Elements
ES	Embryonic stem
hMeDIP-seq	Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation sequencing
IDH	isocitrate dehydrogenase
Infinium450K	Illumina HumanMethylation450 BeadChip assay
MDS	myelodysplastic syndrome
MPN	myeloproliferative neoplasms
TAB-chip	Tet-assisted bisulfite epigenotyping with BeadChip
TAB-seq	Tet-assisted bisulfite sequencing

TET	ten eleven translocation
UDP-Glu	Uridine diphosphate glucose
WT	wild type
$\beta$ -GT	$\beta$ -glucosyltransferase:

## 付録

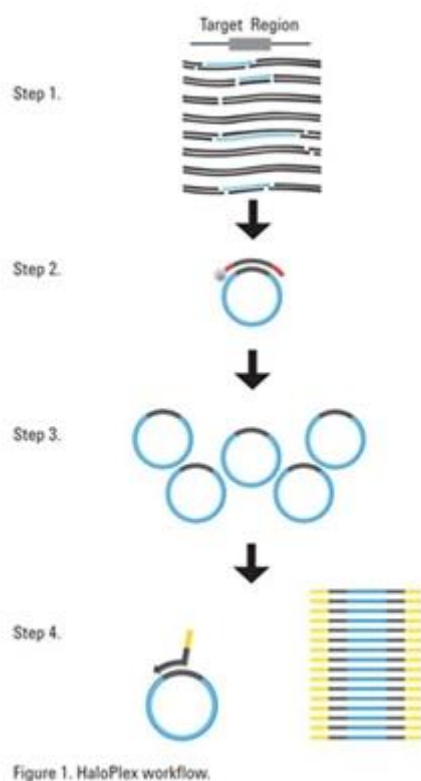


図 S1. Haloplex 法のワークフロー（Agilent 社ホームページより）

### I. サンプル DNA の切断

8組の制限酵素によりサンプル DNA を消化して断片化し、変性する。

### II. プロブのハイブリダイゼーション

HaloPlex プロブライブラリを加え、プロブをターゲット DNA 断片にハイブリダイズさせる。

### III. ターゲットの精製とライゲーション

ストレプトアビジン磁気ビーズにより精製し、環状 DNA のニックをライゲーション反応によって閉じる。

### IV. PCR によるターゲット断片の増幅

環状 DNA ターゲットだけが増幅される。



表 S1. ラムダ DNA を使用したコントロール DNA 作成用プライマー

対象	プライマー名	配列
C control DNA	Lambda-SI-C-L	CCTGGGCCATGTAAGCTGAC
C control DNA	Lambda-SI-C-R	CCACACCCTGCTTGCTGAG
5hmC Control DNA	Lambda-SI-hmC-L	GCGAGAATTTTTAGCCCAAGC
5hmC Control DNA	Lambda-SI-hmC-R	TCAGCATCTAGCATGCAACC

表 S2-1. Haloplex 法によるシーケンス対象遺伝子 その 1

ABCC2	BCL10	CCM3	CRBN	EPHA6	FLT3	HRAS	KEAP1
ABL1	BCL11A	CCND1	CREB1	EPHA7	FLT4	HSP90AA1	KIT
ABL2	BCL11B	CCND2	CREBBP	EPHB1	FN1	HSP90AB1	KLF6
ACTL6A	BCL2	CCND3	CRKL	EPHB4	FOXL2	HSPG2	KMO
ACTL6B	BCL2A1	CCNE1	CRLF2	EPHB6	FOXO1	ICK	KRAS
ACVR2A	BCL2L1	CD79A	CRTC1	ERBB2	FOXO3	IDH1	L3MBTL2
ADAMTS20	BCL2L2	CD79B	CSF1R	ERBB3	FOXP1	IDH2	LAMP1
AFF1	BCL3	CDC42BPA	CSMD3	ERBB4	FOXP4	IGF1R	LCK
AFF3	BCL6	CDC42BPB	CTNNA1	ERC1	FRK	IGF2	LIFR
AKAP9	BCL9	CDC73	CTNNB1	ERCC1	FUBP1	IGF2R	LPHN3
AKT1	BCLAF1	CDH1	CXXC1	ERCC2	FZR1	IGFBP3	LPP
AKT2	BCOR	CDH11	CYLD	ERCC3	G6PD	IKBKB	LRP1B
AKT3	BCR	CDH2	CYP2C19	ERCC4	GABRA6	IKBKE	LRP6
AKTIP	BIRC2	CDH20	CYP2D6	ERCC5	GATA1	IKZF1	LRRFIP1
ALK	BIRC3	CDH23	DAXX	ERG	GATA2	IL2	LSD1
ANTXR1	BIRC5	CDH5	DCC	ESR1	GATA3	IL21R	LTF
APC	BLM	CDK12	DDB2	ESR2	GDNF	IL6ST	LTK
APE	BLNK	CDK4	DDIT3	ETS1	GNA11	IL7R	MAF
AR	BMI1	CDK6	DDR2	ETV1	GNAQ	ING4	MAFB
ARAF	BMPR1A	CDK8	DEK	ETV4	GNAS	INHBA	MAGEA1
ARFRP1	BMX	CDKN2A	DICER1	EXT1	GPR124	INSR	MAGI1
ARID1A	BRAF	CDKN2B	DNAH8	EXT2	GRM8	IRAK2	MALT1
ARID1B	BRCA1	CDKN2C	DNMT1	EYA2	GUCY1A2	IRF4	MAML2
ARID2	BRCA2	CEBPa	DNMT3A	EZH1	H3F3A	IRS2	MAP2K1
ARID4A	BRD3	CHD1	DNMT3B	EZH2	HCAR1	ITGA10	MAP2K2
ARNT	BRD7	CHD2	DOT1L	FAM123B	HCC1	ITGA9	MAP2K4
ASH1L	BRIP1	CHD3	DPF1	FANCA	HDAC5	ITGB2	MAP3K7
ASH2L	BTK	CHD4	DPF2	FANCC	HIF1A	ITGB3	MAPK1
ASXL1	BUB1B	CHD5	DPF3	FANCD2	HIF2A	ITK	MAPK8
ASXL2	CARD11	CHD6	DPYD	FANCF	HIST1H3B	JAK1	MARK1
ASXL3	CASC5	CHD7	DST	FANCG	HLF	JAK2	MARK4
ATF1	CBL	CHD8	EED	FAS	HNF1A	JAK3	MAST1
ATM	CBX1	CHD9	EGFR	FAT3	HNF1B	JUN	MBD1
ATR	CBX2	CHEK1	ELAVL1	FBXW7	HNRPA1L3	KAT6A	MCL1
ATRX	CBX3	CHEK2	EML4	FGFR1	HNRPA3	KAT6B	MDM2
AURKA	CBX4	CIC	EP300	FGFR2	HNRPC	KDM1A	MDM4
AURKB	CBX5	CISD3	EP400	FGFR3	HNRPK	KDM5A	MECOM
AURKC	CBX6	CKS1B	EPC1	FGFR4	HNRPM	KDM5B	MED13L
AXL	CBX7	CMPK1	EPHA10	FH	HNRPU	KDM5C	MEN1
BAI3	CBX8	CNTN1	EPHA3	FLCN	HNRPX	KDM5D	MET
BAP1	CCM1	COL1A1	EPHA4	FLI1	HOOK3	KDM6A	MGA
BARD1	CCM2	CPEB1	EPHA5	FLT1	HOXA3	KDR	MITF

表 S2-2. Haloplex 法によるシーケンス対象遺伝子 その2

MLH1	NLRP1	PHF19	PTPRD	SDHA	SMARCE1	TLX1	XRCC1
MLH3	NLRP9	PHF2	PTPRT	SDHB	SMC3	TNFAIP3	XRCC2
MLL	NOTCH1	PHF6	RAD50	SDHC	SMO	TNFRSF14	YB1
MLL2	NOTCH2	PHKA2	RAD51C	SDHD	SMUG1	TNK2	ZC3H18
MLL3	NOTCH4	PHLPP2	RAD51L3	SEPT9	SOCS1	TNKS	ZNF101
MLL4	NPM1	PHOX2B	RAF1	SETD2	SOX10	TNKS2	ZNF384
MLLT10	NRAS	PIK3C2B	RALGDS	SETD7	SOX11	TOP1	ZNF521
MMP2	NSD1	PIK3CA	RANBP17	SF1	SOX2	TP53	ZRSR2
MN1	NTRK1	PIK3CB	RARA	SF3A1	SPEG	TPR	ZSWIM4
MPG	NTRK2	PIK3CD	RASAL1	SF3A2	SPI1	TRA2A	
MPL	NTRK3	PIK3CG	RB1	SF3A3	SPRED2	TRAF3	
MRE11A	NUMA1	PIK3R1	RBBP1	SF3B1	SRC	TRIM24	
MSH2	NUP214	PIK3R2	RBBP2	SF3B14	SREBP1	TRIM27	
MSH3	NUP98	PIM1	RBBP3	SF3B2	SRSF10	TRIM33	
MSH6	OBSCN	PKHD1	RBBP4	SF3B3	SRSF7	TRIP11	
MTOR	PAK3	PKHD1L1	RBBP5	SF3B4	SSX1	TRPS1	
MTR	PALB2	PLAG1	RBBP6	SF3B5	STAG2	TRRAP	
MTRR	PARP	PLCG1	RBBP7	SFPQ	STAT3	TSC1	
MUC1	PARP1	PLEKHG5	RBBP8	SFRS18	STK11	TSC2	
MUSK	PAX3	PML	RBBP9	SFRS2	STK36	TSHR	
MUTYH	PAX5	PMS1	RBMX	SFRS2IP	SUFU	TTLL5	
MYB	PAX7	PMS2	RECQL4	SFRS3	SUZ12	TYK2	
MYC	PAX8	POLE	REL	SFRS4	SYK	U2AF1	
MYCL1	PBRM1	POT1	RET	SFRS5	SYNE1	U2AF2	
MYCN	PBX1	POU5F1	RHOH	SFRS6	TAF1	UBR5	
MYD88	PCGF1	POU6F1	RICTOR	SFRS9	TAF1L	UGT1A1	
MYH11	PCGF2	PPARG	RING1	SGK1	TAL1	UMODL1	
MYH9	PCGF3	PPP1R13L	RNASEL	SH2D1A	TBX22	USP9X	
NBN	PCGF4	PPP2R1A	RNF2	SIN3B	TCF12	VEGFA	
NCBP1	PCGF5	PRDM1	RNF213	SMAD2	TCF3	VEGFR	
NCBP2	PCGF6	PRKAR1A	ROS1	SMAD3	TCF7L1	VHL	
NCOA1	PDE4DIP	PRKDC	RPS6KA2	SMAD4	TCF7L2	WAS	
NCOA2	PDGFB	PRPF39	RPS6KC1	SMARCA1	TCL1A	WDR5	
NCOA4	PDGFRA	PRPF40A	RPTOR	SMARCA2	TET1	WHSC1	
NF1	PDGFRB	PRPF40B	RRM1	SMARCA4	TET2	WNK2	
NF2	PER1	PRPF4B	RSF1	SMARCA5	TFE3	WNK3	
NF45	PGAP3	PSIP1	RUNX1	SMARCB1	TGFBR2	WNT11	
NFE2L2	PHC1	PTCH1	RUNX1T1	SMARCC1	TGM7	WRN	
NFKB1	PHC2	PTCH2	SAMD9	SMARCC2	THBS1	WT1	
NFKB2	PHC3	PTEN	SBDS	SMARCD1	TIE1	XPA	
NIN	PHF1	PTGS2	SCMH1	SMARCD2	TIMP3	XPC	
NKX2-1	PHF10	PTPN11	SCML2	SMARCD3	TLR4	XPO1	

表 S3. サンガーシーケンスによる変異検索に使用したプライマー

遺伝子	プライマー名	配列
TET2	hTET2-L-01A	TGAACTTCCCACATTAGCTGGT
TET2	hTET2-R-02A	GAAACTGTAGCACCATTAGGCATT
TET2	hTET2-L-03B	CAAAGGCTAATGGAGAAAGACGTA
TET2	hTET2-R-04B	GCAGAAAAGGAATCCTTAGTGAACA
TET2	hTET2-L-05C	GCCAGTAACTAGCTGCAATGCTAA
TET2	hTET2-R-06C	TGCCTCATTACGTTTTAGATGGG
TET2	hTET2-L-07D	GACCAATGTCAGAACACCTCAA
TET2	hTET2-R-08D	TTGATTTTGAATACTGATTTTCACCA
TET2	hTET2-L-09E	TTGCAACATAAGCCTCATAAACAG
TET2	hTET2-R-10E	ATTGGCCTGTGCATCTGACTAT
TET2	hTET2-L-11F	GCAACTTGCTCAGCAAAGGTACT
TET2	hTET2-R-12F	TGCTGCCAGACTCAAGATTTAAA
TET2	hTET2-L-13.2G	AAAATCCAAGTAATAGGTAGGCTTCCAG
TET2	hTET2-R-14.2G	GTGAAGGCTGGAAAAATTCTGACAT
TET2	hTET2-L-15H	CATTTCTCAGGATGTGGTCATAGAAT
TET2	hTET2-R-16H	CCCAATTCTCAGGGTCAGATTTA
TET2	hTET2-L-17.2I	CATCTAGCTCTGGTTTTAATGCAGGT
TET2	hTET2-R-18.2I	ACTTCTTATCGCATGACTGCCAAAC
TET2	hTET2-L-19J	ATGCCACAGCTTAATACAGAGTTAGAT
TET2	hTET2-R-20J	TGTCATATTGTTCACTTCATCTAAGCTAAT
TET2	hTET2-L-21.2K	TGCATGCAGTTAGAAAATCAATCTTATG
TET2	hTET2-R-22.2K	TGCAGTGGTTTTCAACAATTAAGAGG
TET2	hTET2-L-23L	TGTCATTCCATTTTGTCTTCTGGATA
TET2	hTET2-R-24L	AAATTACCCAGTCTTGCATATGTCTT
TET2	hTET2-L-25.2M	TGTCACTGATCTGGATCAACTAGGC
TET2	hTET2-R-26.2M	CTCTGGCACAGAACTAAGACCATGA
TET2	hTET2-L-27N	GCTCTTATCTTTGCTTAATGGGTGT
TET2	hTET2-R-28N	TGTACATTTGGTCTAATGGTACAACCTG
TET2	hTET2-L-29.2O	CTTCTAATCCCATGAACCCTTACCC
TET2	hTET2-R-30.2O	CAAGAGACTTGATGAAACGCAGGTA
TET2	hTET2-L-35R	CTGCTTGTGTCCAAGGAGGCTTACAC
TET2	hTET2-R-36R	ATCTGTGACCACTTGGGAGCCAGTG
IDH1	hIDH1-L-37S	ACGACCAAGTCACCAAGGATGC
IDH1	hIDH1-R-38S	TGTGTTGAGATGGACGCCTATTTG
IDH2	hIDH2-L-39T	AGACTCCAGAGCCCACACATTTG
IDH2	hIDH2-R-40T	CCTCACCTCGTCGGTGTGTAC

表 S4. Haloplex 法による遺伝子変異解析

Patient	Gene	ExonicFunc	AACChange
AML-01	MLL2	nonsynonymous SNV	NM_003482:c.G14581A:p.D4861N
	FLT3	nonsynonymous SNV	NM_004119:c.G2503T:p.D835Y
AML-03	CCND3	stopgain SNV	NM_001136125:c.C562T:p.Q188X
AML-13	RET	nonsynonymous SNV	NM_020630:c.G2200A:p.E734K
AML-14	IKZF1	nonsynonymous SNV	NM_001220766:c.A215G:p.N72S
	RUNX1	frameshift deletion	NM_001001890:c.211delC:p.L71fs
AML-15	TET2	stopgain SNV	NM_001127208:c.C1630T:p.R544X
	TET2	nonsynonymous SNV	NM_001127208:c.C3581G:p.P1194R
	MYH11	nonsynonymous SNV	NM_002474:c.T3296C:p.L1099P
AML-16	PTPN11	nonsynonymous SNV	NM_002834:c.A317C:p.D106A
	PTPN11	nonsynonymous SNV	NM_002834:c.A182T:p.D61V
AML-17	OBSCN	nonsynonymous SNV	NM_001098623:c.G22856A:p.G7619D
AML-18	DNMT3A	nonsynonymous SNV	NM_153759:c.G2078A:p.R693H
AML-19	No mutation was detected.		

表 S5. DNA ヒドロキシメチル化の変化が見られた全遺伝子

AATK	CAMKK1	FAM102A	KIAA0427	MSI2	RASA3	TNFSF13B
ABCC2	CAPS	FAM129A	KIAA0564	MSLN	RBM47	TNS3
ABI3	CARS2	FAM81B	KIAA1462	MUC2	RDH13	TOLLIP
ABR	CCDC57	FAM83E	KIAA1522	MYL9	RERE	TOP1MT
ACAP3	CD36	FAM83H	KIF13B	MYOM1	RGS12	TOP3B
ADAMTSL4	CDK10	FAT2	KIF26B	NAIF1	RNMTL1	TP53RK
ADCY7	CDYL	FBRSL1	KIF7	NCALD	RPA3	TPK1
AFF1	CLCN1	FGD3	KIFC1	NCRNA00171	RPS6KA2	TRAPPC9
AGAP3	CLCN7	FIZ1	KSR1	NCRNA00189	RPTOR	TRIM10
AGPAT3	CLEC4G	FLJ90757	LDLR	NEDD1	RSU1	TRIM40
AKAP10	CLEC7A	FRY	LGR6	NOTCH1	RTEL1	TRIM56
ANK1	CLPP	FXVD4	LHPP	NQO2	S100A11	TSNARE1
ANKS1A	CMC1	GGA2	LIG1	NSMCE2	SBNO2	TSSC1
ANTXR1	COL18A1	GGA3	LOC100129034	NUMBL	SERPINE3	TTC7B
APIM1	COL23A1	GLDN	LOC100130872	OTUB1	SFRS16	TTYH3
AP2A2	COL4A1	GMPR	LOC285740	P2RX5	SH3PXD2A	UST
AP3D1	COQ6	GNB3	LOC285954	P2RY2	SIGLEC10	UXS1
ARID3A	COTL1	GNG7	LOC401127	PBLD	SIPA1L1	VNN1
ARPP19	CPNE2	GP9	LOC652276	PC	SLC16A3	VPS4A
ATP6V1C1	CRTAC1	GPR152	LOC728264	PCNT	SLC38A10	VRK3
B4GALNT3	CTDSP1	HCCA2	LPCAT1	PDGFRB	SLC43A3	WDR1
BAHCC1	CYP19A1	HDAC4	LRCH1	PGD	SNORD1A	WDR77
BANP	CYTH3	HFE2	LRPAP1	PHF15	SNX8	WDR8
BASP1	DAP	HIATL2	LRRC33	PIK3AP1	SORCS2	WDR81
BCAS3	DENND1A	HIBADH	LRRC69	PILRB	SPATA21	YJEFN3
BCL11A	DENND3	HIBCH	LTB4R	PIWIL4	SPSB3	ZBTB4
BLCAP	DHRS9	HIP1	LYRM1	PKD1	SSH1	ZC3H12A
C10orf11	DHX30	HIPK2	MAD1L1	PLEC1	ST14	ZCCHC24
C11orf42	DLC1	HSPB11	MAML3	PLEKHO2	STK11	ZDHHC14
C11orf64	DNAH17	IAH1	MAMSTR	PLOD1	STK32C	ZFPM1
C14orf68	DPYSL2	IL34	MAST3	PLXNC1	STYXL1	ZMIZ1
C16orf38	EEF1D	INPP4B	MBP	PPAP2B	TBCD	ZNF311
C18orf1	EHD1	INPP5A	METRNL	PREP	TCF3	ZNF513
C1orf216	EIF4E3	INPP5D	MIR141	PRKCE	TDRD3	ZNF529
C22orf46	EIF4EBP1	IQCE	MIR145	PRKCH	TEX12	ZNF710
C2orf55	ELN	ITGB3BP	MIR202	PRMT3	TM4SF19	
C3orf26	EMILIN1	JARID2	MIRLET7A3	PRNP	TMEM217	
C6orf35	EP400	KANK2	MON2	PRR3	TMEM44	
C6orf97	ERC1	KCNK7	MOSC1	PTPRJ	TMEM79	
C7orf71	ERICH1	KCNN1	MPP7	PTPRN2	TNFAIP8	
CACNB4	EXOC2	KDM4B	MRVII	RANGAP1	TNFRSF1B	

表 S6-1. 遺伝子オントロジー解析で抽出された代表的な遺伝子群 その1

<b>vesicle-mediated transport</b>	
AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
DENND1A	DENN/MADD domain containing 1A
EHD1	EH-domain containing 1
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
MON2	MON2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
AP1M1	adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit
AP2A2	adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit
AP3D1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
ANK1	ankyrin 1, erythrocytic
CYTH3	cytohesin 3
EXOC2	exocyst complex component 2
GGA2	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2
GGA3	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3
HIP1	huntingtin interacting protein 1
LDLR	low density lipoprotein receptor
LRPAP1	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1
NCALD	neurocalcin delta
TSNARE1	t-SNARE domain containing 1
VPS4A	vacuolar protein sorting 4 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )

表 S6-2. 遺伝子オントロジー解析で抽出された代表的な遺伝子群 その2

<b>positive regulation of apoptosis</b>	
ADAMTSL4	ADAMTS-like 4
FGD3	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
ABR	active BCR-related gene
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1
DAP	death-associated protein
DLC1	deleted in liver cancer 1
HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2; similar to homeodomain interacting protein kinase 2
HIP1	huntingtin interacting protein 1
INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa
ITGB3BP	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)
MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
NAIF1	nuclear apoptosis inducing factor 1
PRKCE	protein kinase C, epsilon



表 S6-3. 遺伝子オンロジー解析で抽出された代表的な遺伝子群 その3

<b>phosphorus metabolic process</b>	
ABI3	ABI family, member 3
ATP6V1C1	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
MON2	MON2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
TP53RK	TP53 regulating kinase
AATK	apoptosis-associated tyrosine kinase
CAMKK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
CDK10	cyclin-dependent kinase 10
HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2; similar to homeodomain interacting protein kinase 2
INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa
KSR1	kinase suppressor of ras 1
MAST3	microtubule associated serine/threonine kinase 3
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PRKCE	protein kinase C, epsilon
PRKCH	protein kinase C, eta
PTPRJ	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
PTPRN2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2; hypothetical LOC100127984
STK11	serine/threonine kinase 11
STK32C	serine/threonine kinase 32C
STYXL1	serine/threonine/tyrosine interacting-like 1
SSH1	slingshot homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
TOLLIP	toll interacting protein
VRK3	vaccinia related kinase 3