

(3) 総括研究報告

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発 (26-16)

主任研究者 下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再生医学研究部 (室長)

研究要旨

超高齢者社会を迎えつつある日本ではアルツハイマー病が大きな社会問題となっており、発症機序解明と低侵襲性の早期発症診断法の開発が急務となっている。研究主任者は、これまでにゼブラフィッシュとマウスにおいてゲノムの特定領域の DNA メチル化レベルが、加齢に伴い変化していることを見出していた。そこで研究主任者は、仮にこの現象がアルツハイマー病発症に関与しているとするならば、患者と健常者の間には特有のメチル化差の存在するゲノム領域があり、それを早期診断のマーカーに利用できるのではないかと考えた。本年度は、きわめて低コストで、かつスループットの高いメチル化測定法を確立した。そして、このデータをもとに、メチル化解析可能な遺伝子数を算出したところ、1年で6遺伝子の解析が上限であると見積もられた。

主任研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再生医学研究部 (室長)

分担研究者

なし

A. 研究目的

アルツハイマー病患者とその家族の負担を軽減するには治療薬の早期服用が大切であり、希望に応じてアルツハイマー病の発症リスクを知り得る体制を整えることが望ましい。アルツハイマー病の最大のリスクファクターが加齢であることから、研究主任者は、発症前診断のためのマーカーとして、ヒトの加齢マーカーである DNA のメチル化に着目した。一方、検査のためのサンプルとしては、サンプリングの侵襲性が低い血液を採用することにした。本研究課題の目的は、それらを組み合わせ、血中 DNA のメチル化を利用したアルツハイマー病の低侵襲性早期診断法を将来的に開発することにある。

B. 研究方法

ゲノム特定領域におけるメチル化値の測定には、一般的に用いられているパイサルファイト PCR・クローニング法を採用した。この方法は、定量性ではベストとは言えないが、ありふれた機器で実施できるため、他の研究者による本研究成果の試行や、一般診療への

普及に有利であるという特徴がある。シーケンスするクローンの数は、測定値の正確性、コスト、スループットとのバランスを考え、一アンプリコン（ゲノム中の数百ベース程度の領域）あたり、32 クローンとした。プラスミド DNA は大腸菌 DH5 α コロニーから直接、テンプリファイ（Templiphi, GE）を用いて増幅し、その DNA をダイターミネーター法（BigDye v.3.1、アプライドバイオシステムズ）で反応させたあと、キャピラリー型シーケンサー Genetic Analyzer 3130xl（アプライドバイオシステムズ）により解読した。スループットを向上させるため、プラスミドの増幅を含むそれ以降の過程はすべて 96 穴のマイクロタイタープレートで行った。

（倫理面への配慮）

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれる。したがって本研究は国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会での承認を得たうえで実施した。組み換え DNA 実験についても同機関の承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

【コストの削減】

解析できるゲノム領域（アンプリコン数）は多いほど望ましいが、それはシーケンスにかかるコストにより大きく左右される。そこで以下の項目についてシーケンスに使用する反応液や反応量を、結果の質を保ちつつどの程度までコスト削減できるか検討した。

1. シーケンス反応試薬

まずシーケンス反応試薬をできる限り節約することを検討した結果、シーケンス反応試薬（BigDye v.3.1、アプライドバイオシステムズ）は使用する試薬をメーカー推奨の 8 μ l から 0.2 μ l まで 1/20 に減らし、さらにサイクルシーケンス反応を半量（10 μ l）で行っても、質の高い塩基配列データを得られることがわかった。したがって用いる反応試薬は、メーカー推奨のわずか 2.5% の量で済むことがわかった。また推奨の反応バッファー（有料）については、組成が未公開であったが、下記の組成のバッファーで代用できることがわかり、自作することでコストを削減した。

(10 \times) 400 mM Tris-HCl (pH9.0), 10 mM MgCl₂

2. プラスミド調整

プラスミド増幅試薬テンプリファイ（Templiphi, GE）は大腸菌コロニーから直接、シーケンスのテンプレートになる DNA を増幅できるため、労力と時間の削減が期待できたが、価格が高いという欠点があった。そこで、反応に用いる 2 種類の希釈用バッファーを自作

した上で、希釈倍率をあげてみたところ、メーカー推奨濃度の 10 倍希釈の条件でもテンプレートの増幅は十分であり、そこから質の高いシーケンス反応が行えることが確かめられた。

【スループットの向上】

仮に低コストで利用できるメチル化マーカを開発できても、スループットが低ければ、診断用マーカとして普及し得ない。そこで以下の項目に対してスループットの向上を図った。

3. シーケンス用テンプレートの準備

従来、大腸菌コロニーからシーケンステンプレートを準備する場合、大腸菌をクローン単位で個別の容器で培養し、そこから個別にプラスミドを調整するという手法がとられているが、多サンプルの場合、サンプルの移し替えを複数回、クローンごとに単独に行う必要があるため、スループットが低くなるという問題があった。そこで大腸菌を培養すること無しで、大腸菌コロニーから直接テンプレートの調整が可能という、テンプリファイ (Templiphi, GE) をマイクロタイタープレートベースで使用できるかテストした。その結果、コロニーをマイクロタイタープレートに分注した 50 μ l TE に懸濁後、そのごく一部(0.5 μ l)を べつのマイクロタイタープレートに準備したテンプリファイ試薬 (上記、10 倍希釈) に加え、反応を行えば、2 回のシーケンスに十分なテンプレートをマイクロタイタープレート上で調整できることがわかった。菌懸濁後の作業では、マルチチャンネルピペットを使用できるので、このマイクロタイタープレートベースのテンプレート調整法により、多サンプルのテンプレート調整に要する時間を、劇的に短縮することができた。

4. エタノール沈殿法

マイクロタイタープレートでシーケンス反応を行った後に、未反応の蛍光塩基を除くために、いくつかの方法がメーカーから推奨されているが、安価で、かつ高いスループットを実現できるのは、プレート単位でのエタノール沈殿法であると判断した。そこで、1) エタノール沈殿に必要な遠心力 (>4,000 \times g) を得られ、2) マイクロタイタープレートを保持できるローターを有し、3) 冷却機能のある遠心機として、SIGMA 社 (久保田取り扱い) の 3K18C 遠心機を選択した。さまざまな条件検討を行い、4,000 \times g、30 分の低温遠心 (4 $^{\circ}$ C) で、シーケンス反応産物を十分に沈殿させられることが明らかになった。次に、遠心後の反応液から未反応の蛍光塩基を除く必要があるが、100 μ l の 70% EtOH をプレートウェルに添加後、マイクロタイタープレートの大きさに合わせた吸収紙 (キムワイプ) をプレートに載せ、逆にした状態で低速 (300 rpm) で 8 秒間の遠心を行うことで、反応産物をほとんど失うことなく、残渣蛍光塩基のみを選択的に除けることがわかった。

コスト算出表

消耗品名	円	根拠	係数	円
テンプリファイ 500	190,080	4 マイクロリットル/100 マイクロリットル/6 人分	0.007	1267.2
コンピテントセル	19,444	10 マイクロリットル/100 マイクロリットル/10 本	0.010	194.4
POP7 7ml	70,956	50 マイクロリットル*2 ラン/7 ミリリットル	0.014	1013.7
BigDye v3.1	133,650	19.2 マイクロリットル/800 マイクロリットル/3 人分	0.008	1069.2
Star plate スカートつき 1 箱	6,480	2 枚(テンプリファイとシーケンス)/25 枚/3 人分	0.027	172.8
Star plate スカートなし 1 箱	4,428	1 枚/25 枚/3 人分	0.013	59.0
bisulfite kit (EZ Gold)	26,244	箱/サンプル数	0.020	524.9
Star tip 10ul 5 段ラック	10,206	2 箱(ピックアップとシーケンス)/5 段/10セット/3 人分	0.013	136.1
ABgene 8 連ドームキャップ1箱	5,929	4 本/250 本	0.016	94.9
Rainin 20ul tip 1 箱	6,220	1 ラック/10 ラック/3 人分	0.033	207.3
16 本キャピラリー	123,876	2 ラン/1000 ラン	0.002	247.8
計				4987.2

D. 考察と結論

アルツハイマー病に限らず、疾病の診断法が普及するには、診断精度とともにコストが最重要課題となると考えられる。さらに本研究課題に与えられた予算と時間において、解析できる遺伝子数を概算しておくことが、マーカーの探索を開始する時点で必要であった。そこで本年度は、メチル化値測定の過程でもっともコストがかかるキャピラリーシーケンス法について、徹底的に実験条件の検討を重ねた結果、DNAのバイサルファイト処理から、32クロンのシーケンス（1遺伝子座のメチル化解析）データを得るまでのコストを、5千円までに抑えられることがわかった（コスト算出表を参照）。ちなみにシーケンスのステップにかかるコストは、その半分以下、2千円程度であり、これは業者にシーケンスを依頼した場合の10%のコストであり（人件費は除く）、十分なコスト削減が達成できたと判断した。仮に2遺伝子のメチル化値をもとに診断がつくとすれば、実費としては、全行程がおよそ1万円ですむことになり、研究主任者は、この価格であれば、十分、普及型の診断法になりえるのではないかと考えている。

一方、メチル化値取得までに要する日数は、技術者が一人の場合、サンプルが6以下であれば5日となり、それが18となれば、バイサルファイトPCRと大腸菌のトランスフォームは同時に処理できるので、テンプリファイ増幅とシーケンスを段階的（6人単位×3）で行うとして、最短1週間でできるため、発症前診断であれば許容できる範囲内といえる。

本研究課題において仮に、1遺伝子（アンプリコン）あたり総数100人分の検体について、メチル化値の差を検証するとしたとき、5千円×100=50万円である。一方、必要な日数は余裕を持って見積もれば、およそ2ヶ月となる。これらの概算に基づくと、一年で6遺伝子が解析できる上限と見積もられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimoda, N., Hirose, K., Kaneto, R., Izawa, T., Yokoi, H., Hashimoto, N., Kikuchi, Y.
No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos.
PLoS ONE (2014) 9(12): e114816.
- 2) Shimoda, N., Izawa, T., Yoshizawa, A., Yokoi, H., Kikuchi, Y., Hashimoto, N.
Decrease in cytosine methylation at CpG island shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging. *AGE* (2014), vol. 36, p103-115.
- 3) Takayama, K., Shimoda, N., Takanaga, S., Hozumi, S., Kikuchi, Y.
Expression patterns of *dnmt3aa*, *dnmt3ab*, and *dnmt4* during development and fin regeneration in zebrafish. *Gene Expression Patterns* (2014), vol. 14, p105-110.

2. 学会発表

- 1) 下田修義、廣瀬健太郎、菊池裕、橋本有弘
ゼブラフィッシュ胚で AID と MBD4 がカップルした脱メチル化は起こるのか？
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、5 月 27 日、東京
- 2) 下田修義、廣瀬健太郎、井澤俊明、横井勇人、橋本有弘、菊池裕
加齢依存性 DNA 低メチル化における組織再生と 5 ヒドロキシメチルシトシンの関与の可能性
第 37 回日本基礎老化学会年会、6 月 26 日、愛知

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし