

201331003B

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による
病因解明とゲノム解析拠点整備

平成23年度~25年度 総合研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による
病因解明とゲノム解析拠点整備

平成23年度～25年度年度 総合研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成26(2014)年3月

目 次

I. 総合研究報告書	
小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による 病因解明とゲノム解析拠点整備	3
梅澤 明弘	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	25

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
総合研究報告書

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による病因解明とゲノム解析拠点整備
(H23-実用化(難病)-一般-003)

研究代表者 梅澤 明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所副所長

研究要旨：

成育疾患、特に、小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患に対し、次世代シーケンサー等の大量配列解析装置を用いた網羅的な遺伝子解析を行い、関連遺伝因子を解明する事を目的とする。一昨年度・昨年度に引き続き、本研究事業の遂行に不可欠な次世代シーケンサーによるデータの取得とバイオインフォマティクなデータ解析系を構築・改良と、臨床的診断を目的とした遺伝子解析支援を並行して進めた。リシーケンシング解析およびトランスクリプトーム解析については、自動化装置導入によるスループットの大幅向上を達成すると共に、データ解析のためのパイプラインを独自に構築し、データ解析の迅速化と柔軟な応用改変を可能とした。また疾患エピゲノム解析のためのライブラリー作製実験系を整備し、データ解析系の構築にも着手した。次世代シーケンサー・アレイを用いた迅速遺伝子診断システムにより、これまでに様々な遺伝性疾患を含む合計 2,200 症例の解析を行い、そのうち特に臨床診断を目的とした約 600 症例の解析では、23%程度が確定診断に至った。

研究分担者 氏名	村島 温子	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	
深見 真紀	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	中澤 温子	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長
服部 正平	東京大学・教授	新関 寛徳	独立行政法人国立成育医療研究センター・医長
松本 健治	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	堀川 玲子	独立行政法人国立成育医療研究センター・医長
小野寺 雅史	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	大矢 幸弘	独立行政法人国立成育医療研究センター・医長
奥山 虎之	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	連携研究者（成育医療研究センター）：	
秦 健一郎	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	周産期病態研究部	
東 範行	独立行政法人国立成育医療研究センター・医長	周産期ゲノミクス研究室長	
藤原 成悦	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	中林一彦	
中村 浩幸	独立行政法人国立成育医療研究センター・室長	（ライブラリー構築・シーケンシング）	
田上 昭人	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	システム発生再生医学研究部	
高田 修治	独立行政法人国立成育医療研究センター・部長	組織工学研究室長	
		岡村浩司	
		（インフォマティクス）	
		周産期病態研究部・胎児発育研究室長	
		前原佳代子	
		（SNP アレイ解析）	

A. 研究目的

次世代シーケンサー等の大規模配列解析装置を駆使し、小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患の関連遺伝因子を解明する事を目的とする。多くの小児先天性疾患、異常妊娠は、稀少性に加え、点変異や微細欠失、多因子、de novo 変異、エピゲノム変異の背景があると推測され、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術による網羅的配列解析が必須かつ極めて有効と期待される。

B. 研究方法

1. 対象疾患

新生児食物蛋白誘発胃腸炎、壊死性腸炎 (NEC)、炎症性腸疾患 (分担研究 野村、松本) :

キャンボメリックディスプラジア (分担 浅原、高田) :

慢性活動性 EB ウイルス感染症、EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患 (分担 藤原、中村) :

胆道閉鎖症 (分担 田上) :

反復胎状奇胎、異常妊娠、リファレンスデータ整備 (分担 秦) :

原発性免疫不全症 (分担 小野寺、奥山) :

造血幹細胞遺伝子治療後のプロウイルス挿入部位の網羅的解析 (分担 小野寺、奥山) :

小児眼疾患 (分担 東) :

先天性内分泌疾患 (分担 堀川) :

リンパ管腫 (分担 藤野) :

難治性発作性気道閉塞障害 (分担 大矢)

2. 次世代シーケンサー解析用ライブラリー作製技術系の構築 (効率化・微量化・新規技術導入)

①ライブラリー作製自動化・効率化

次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) ライブラリー作製自動化装置を導入し、エクソーム濃縮ライブラリーならびに RNA-Seq ライブラリー作製工程の効率化を行った。現在、一名の専任者がライブラリー作製と NGS 操作全般を行う体制で、年間最大 500 サンプル程度のエクソーム解析が可能である。

また、限られた数の標的遺伝子群を対象としたエクソーム解析を実施する場合に有効な方法である Haloplex 法を導入した。この方法では、従来のカスタムエクソーム濃縮法と比較して、より少ない量のゲノム DNA から、より短時間でライブラリーを構築できる。比較的少数

(数十から百程度) の遺伝子変異解析を、比較的少数の症例 (数百例程度) を行うのに有効である。また、エクソーム解析でカバーされないプロモーター領域等の任意の領域の解析もデザイン可能であるという利点がある。

②長鎖ゲノム DNA ライブラリーを簡便作製するプロトコールの確立

次世代シーケンサーによるゲノム構造解析においては、インサート鎖長が短い (300 bp 程度) 通常の NGS ライブラリーよりも、インサート平均鎖長が長いゲノムライブラリーからデータを取得する方が有利であるが、通常のアダプター付加法では長鎖ライブラリーの作製効率は高くない。そこでトランスポセーズ組換え法により微量ゲノム DNA からインサート平均鎖長 2-5kb 程度のゲノムライブラリーを作製した。

③メイトペアライブラリー作製プロトコールの検討

ゲノム構造解析やゲノム配列の新規アセンブリー (de novo assembly) を目的とする NGS 解析では、メイトペアライブラリー法がよく用いられる。この方法は通常の NGS ゲノムライブラリー作製法と比べて工程が長い。インサート長が長い (>10kb) ライブラリーの構築も原理的には可能であるが、各実験工程の条件を最適化することで初めて可能となる。本年度はそのための準備として、まずはインサート長 2-3kb のメイトペアライブラリーの作製を行った。

④FFPE 由来 gDNA および total RNA からの NGS ライブラリー作製条件の検討

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) 組織は、最も一般的にアーカイブされる組織標本の形態であり、FFPE 組織が入手可能な唯一の臨床検体である場合にも頻りに遭遇する。一方で、そこから得られる核酸試料 (ゲノム DNA・total RNA) は断片化や化学修飾を受けており、ライブラリー作製が困難な場合が多い。FFPE 由来 gDNA および total RNA からの NGS ライブラリー作製条件の検討を行う。

⑤エピゲノム解析用 NGS ライブラリー作製プロトコールの構築

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノム解析により疾患部位のエピゲノム動態を

解析することは、疾患の病態解明の基盤情報となる。疾患検体のエピゲノム解析 (DNA メチル化解析・ヒストン修飾解析) の実施に必要なプロトコールとして、1)クロマチン免疫沈降 DNA ライブラリー (ChIP-seq ライブラリー)、2) RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) ライブラリー、3) PBAT (post-bisulfite adaptor tagging) ライブラリーの作製系を構築した。

3. 次世代シーケンサーデータ解析系の構築：改良および新規解析系導入

生命科学のさまざまな分野に普及しつつある次世代シーケンサーは、単に DNA 塩基配列を決定するにとどまらず、遺伝子発現、DNA メチル化、クロマチン、ヌクレオソームの解析や、塩基から染色体構造にわたる変異検出、疾患原因遺伝子の検出など多岐にわたり、医学の分野においても研究手法を一変させつつある。本拠点においては昨年度に Illumina HiSeq 1000 および MiSeq を導入し、その後共通機器として HiSeq2500 を導入した。また、バイオインフォマティクスの面では、配列データの品質確認、トリミングから、リファレンス配列へのマッピング、ヴァリアント検出等までを自動で行うパイプラインを構築し、二次解析以降の効率化を図るとともに、頻度情報やアミノ酸置換によるタンパク質への影響予測など、病因変異解析に有用な情報を付加し、利便性を図った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて計画され、本センターおよび連携研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得て行っている。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、各医療機関で匿名化された。網羅的遺伝子解析については、説明書・同意書を用いて同意を取得した。

C. 研究結果

1. 疾患検体群を対象とした次世代シーケンサー解析・アレイ解析

本事業に参加している分担研究者から提供された検体と、全国 45 か所の研究協力機関から寄せられたヒト疾患検体を中心に、合計約 2,200 症例の解析を行った。そのうち特に臨床診断を目的とした 600 症例の解析では、約 23%

が確定診断に至った。

2. 次世代シーケンサー解析用ライブラリー作製技術系の構築 (効率化・微量化・新規技術導入)

①ライブラリー作製自動化・効率化

1) エクソーム濃縮ライブラリー (SureSelect) 作製自動化

使用するゲノム DNA 濃度は picogreen 定量キット (Invitrogen) により定量し、1-2 ug をゲノムライブラリー作製に供した。

SureSelectXT all exon 80Mb (もしくは 51Mb) キットを用いてライブラリーを作製した。ライブラリー作製工程を図 1 に示した。大部分の工程において自動化システムを使用した。DNA ライブラリーの評価 (サイズ確認・濃度推定) には Bioanalyzer (Agilent) もしくは LabChip GX (Caliper 社) を用いた。自動化装置を用いてこれまでに 481 検体のライブラリーを作製し、いずれも再現性良く安定して適切な平均インサート鎖長のライブラリーが作製できた。

2) TruSeq RNA ライブラリー作製の自動化

TruSeq RNA Sample Preparation v2 自動化対応プロトコール (図 3) を導入し、これまでに 272 検体のライブラリーを作製した。

3) HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステムは、任意のゲノム領域合計<500Kb を標的としてカバーできる。数百 ng のゲノム DNA を出発材料として安定して再現性良くライブラリー作製が可能であった。また、アジレント自動化システムを併用することで、さらに効率的にライブラリーを作製する体制が構築できた。

②長鎖ゲノム DNA ライブラリーを簡便作製プロトコールの確立

30ng のゲノム DNA を出発材料とし、Nextera DNA Sample Preparation Kit (イルミナ社) を用いてライブラリーを調整した。この試薬系においては、トランスポゾン活性酵素によるトランスポゾン転移反応を応用してゲノム DNA 断片化・アダプター配列付加をワンステップで行うことが可能であり、従来法に比べて所用時間が約四分の一、必要ゲノム DNA 量が約十分の一と僅かであることがこの方法の長所である。酵素量 10%量でインサート鎖長 1400~2200bp にピークを観察することを確認し、酵素量 10%

でライブラリーを作製した。

③メイトペアライブラリー作製プロトコールの確立

Mate-Paired Library Preparation 5500SOLiD System キットを用い、メイトペアライブラリーを作製した。5 ug のゲノム DNA を出発材料とし、最終的に平均鎖長 250 前後の bp のライブラリーを安定して 作製可能となった。

④FFPE 由来 gDNA および total RNA からの NGS ライブラリー作製条件の検討

ホルマリン固定後のパラフィン包埋試料 (FFPE) から、レーザーマイクロダイセクション等により、gDNA あるいは total RNA を出発材料として、ライブラリー作製を行った。一般的に gDNA の偏りの無い増幅とライブラリー作製が困難であったのに対し、RNA の増幅は容易であった。今後これらの NGS 解析を進め、品質を検証する。

⑤エピゲノム解析用 NGS ライブラリー作製プロトコールの構築

1) ChIP-seq ライブラリー作製

特定の転写因子に対する抗体を用いて実施したクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により得られた免疫沈降 DNA を出発材料として、NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina (New England Biolabs) を用いてライブラリーを作製した。大阪大学木村宏博士との共同研究により、高品質の特異的モノクローナル抗体を用い、現在 10^7 個弱の細胞から数種類の ChIP とライブラリー作製が可能である。

2) RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) ライブラリーの作製

全ゲノムメチル化パターンの解読 (WGBS 法あるいは PBAT 法) は、解析 (特に配列解読) に要する費用が膨大なのに対し、Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法は、より少ない費用で、ほぼゲノム全域にわたって DNA メチル化解析することを目的としている。制限酵素 MspI を利用してゲノム DNA を断片化することで DNA メチル化の標的となりうる領域を濃縮し、bisulfite 配列解読を行い、メチル化率を解析する。現在、いくつかの DNA メチル化異常症例を対象に、RRBS 法による DNA メチル化解析を行っている。

3) PBAT (post-bisulfite adaptor tagging) ライブ

ラリーの作製

バイサルファイト変換反応後にアダプターを付加するため、DNA の損失が少なく、少量のゲノム DNA で解析可能なのが PBAT 法の特徴である 100 ng (2 万個程度の細胞に相当) のゲノム DNA を用いれば、PCR 増幅無しで十分量のライブラリーを得ることが可能であった。

2. 次世代シーケンサーデータ解析系の構築：自動化・効率化および新規解析系導入

①リーシケンシング解析

本研究班独自に、次世代シーケンサーデータ解析のためのパイプラインを構築した。本パイプラインは Linux 等、UNIX ライクな環境の CUI で動作する。コマンド入力に馴染みのないユーザでも利用し易いように、特に設定変更の必要がなければコマンド 1 つで動作するように設計した。すでに当研究所内で得られた 150 検体以上の全エクソンエクソーム解析データに対しての解析実績がある。

2. 全ゲノム・リシーケンシング

本研究で頻用されるモデルマウスとその亜種系統を用い、両者の比較では全ゲノムに渡って平均 150 bp に 1 ヶ所程度の多型検出に成功した。

②トランスクリプトームデータ解析

i) 二次解析 (マッピング)

RNA-seq ライブラリーのシーケンスデータ (fastq ファイル) のマッピング工程をパイプライン化した。

ii) Avadis NGS を用いた三次解析

分担研究者らの利便性のために、商業的に入手できる Avadis NGS ソフトウェアによる解析環境を整備した。複数サンプル間での遺伝子発現量比較、スプライスアイソフォーム毎の発現量比較、新規アイソフォームの検出、SNP 情報を用いたアレル別発現解析、gene ontology 解析、パスウェイ解析などに利用していただいた。

③ChIP-Seq データ解析

特定の DNA 結合タンパクのゲノム標的部位の同定や、ヒストン修飾のゲノムワイド解析を目的に、ChIP-Seq データ解析系を構築した。

④DNA メチル化解析

バイサルファイト処理後にアダプター付加を行う PBAT 法で得られた配列データを解析

するための専用パイプラインを構築し、ヒトゲノムおよびマウスゲノムのリファレンスに含まれる全 CpG サイトの DNA メチル化率を算出できる体制を整備した。DNA メチル化異常を伴うサンプルの解析を進めている。

D. 考察

1. 次世代シーケンサー解析用ライブラリー作製技術系の構築

①自動化プロトコル評価

アジレント社 NGS ライブラリー作製自動化装置を導入し、SureSelect エクソーム濃縮ライブラリー、TruSeq RNA-Seq ライブラリー、Haloplex ライブラリーの作製工程を半自動化し、ライブラリー作製効率が大幅に向上した。現在は、一度の作業で 24-96 検体を処理することが可能である。また、LabChipGX (Caliper 社) の導入により、インサート長と濃度測定等の工程も効率化した。

自動化プロトコルでは、全エクソン配列解析に供するためのゲノム DNA 濃縮が主導と比較してやや劣る傾向が見られるが、濃縮後の PCR サイクル数を標準プロトコルより 2 サイクル増やして対応した。

②NGS ゲノムライブラリー作製における Nextera DNA Sample Preparation Kit の有効性確認

Nextera DNA Sample Preparation Kit (illumina) は必要 DNA 量が 50 ng と少なく、また、ライブラリー作製の所要時間も約 90 分と短いのが特徴である。今回、1000 bp 以上のインサート鎖長を有するライブラリーの作製を目指したが、gDNA サンプルによって tagmentation 効率に差が見られ、DNA 量、DNA 転移酵素量、反応時間を複数条件検討する必要があった。今のところ、他の条件を固定し、DNA 転移酵素量を複数条件試すのが最善と考えている。断片化 gDNA サイズを 4~5 kb に調節することは可能であったが、その後の PCR 反応における高分子領域 (2 kb 以上) の増幅が困難であった。本キットで作製できるライブラリーのインサート鎖長は 2-3 kb 程度が上限と思われる。

③FFPE 由来 gDNA/total RNA からの NGS ライブラリー作製

Nextera DNA Preparation kit による FFPE 由来 gDNA のライブラリー化に成功した。FFPE 組織切片から抽出したゲノム DNA 量は少量であ

る場合も多いことから、微量ゲノム DNA からのライブラリー作製が可能なこのキットは FFPE 検体の NGS 解析に極めて有効である。

FFPE 由来 total RNA のライブラリー化には、Ovation RNA-Seq FFPE System による cDNA 増幅が有効であった。このシステムでは増幅バイアスが少なく各転写産物の相対的な発現量が保持される酵素系が採用されており、100~200 ng の total RNA から ug オーダーの cDNA を得ることができる。本キットを用いて FFPE 由来 total RNA から cDNA を合成し、さらに TruSeq RNA Preparation kit にて平滑末端化以降の操作を行うことで、ライブラリー化に成功した。

⑤エピゲノム解析用 NGS ライブラリー作製プロトコルの構築

NEBNext ChIP-Seq Library Prep kit (NEB) のプロトコルでは、10 ng の免疫沈降 DNA を出発材料として、x18 サイクルの PCR 増幅を経てライブラリーを作成するよう推奨されているが、10 ng の免疫沈降 DNA を使用した場合は x6 PCR サイクルで十分であること、0.1 ng の免疫沈降 DNA を使用した場合でも x13 PCR サイクルで十分量のライブラリーが得られた。

二つの異なる DNA メチル化解析プロトコル (PBAT 法ならびに RRBS 法) を確立した。両者はそれぞれ異なる長所を有しており、取得したいデータ内容、検体数、入手可能なゲノム DNA 量などにより、使い分けが可能である。バイオインフォマティクスの観点からは、PBAT データからモデルを構築し、RRBS データ解析に転用することができた。

2. 次世代シーケンサーデータ解析系の構築 :

本研究事業の支援により、エクソーム解析、リシークエンシング、RNA-seq 等の独自の解析系 (パイプライン) を構築した。これにより、初年度は外部委託が必要だったバイオインフォマティクスを自前で実行することが可能となった。この結果、解析が早くなる (通常外部委託では、まとまった数の検体がそろそろまで発注をかけないため) のみならず、解析系の細かな調整や変更が可能となったため、RNA-seq によるアレル別発現解析や PBAT 法のデータ解析など、特殊な解析手法を独自に確立することができた。

このように、独自性の高い、使いやすいバイオインフォマティクス体制を構築するに伴い、これまで気づきにくかった問題点も表面化し

てきた。すなわち、高精度に変異・多型候補の検出が可能になると共に、標準配列にうまくマッピングできない変異・多型候補の検出がわかってきた。これは主に、標準配列が多数の日本人集団を基に得られたものでないことが原因と考えられる。当研究事業の最大の目標である、本邦の医療への貢献の為には、日本人の標準配列情報が必要である。しかも、当研究事業の場合は、小児科・産科領域に利用可能な標準配列が必要であるため、例えば妊娠分娩歴の明らかな日本人の標準配列情報が必要と考えられる。

【評価】

1) 達成度について

申請時、次世代シーケンサーを用いた解析症例数を合計 500 例としていたが、早い段階で解析体制の立ち上げに成功したことが功を奏し、2013 年 10 月時点で合計 1,207 例（全エクソン配列解析 481、ターゲットエンリッチメントシーケンス 206、全ゲノムシーケンス 9、RNA-seq272、ChIP-seq136、RRBS 法 34、SureSelect Methyl-seq 3、PBAT 法 10、その他 56）の解析を終了させることができた。成育疾患のゲノム解析拠点体制を整備するというもっとも主要な目的は、十分達成することができたと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究事業では、ゲノム異常（新規変異同定）のみならず、エピゲノム異常（DNA メチル化異常）等の解析を行った研究成果・論文に、学術的特徴があると考えられる。国際的意義としては、国際学術誌への投稿・国際共同研究・海外学会での発表に加え、本研究事業で培われた解析技術を基に発展的に国際ヒトエピゲノムコンソーシアムへの参加など、様々な国際貢献も行った。社会的意義としては、約 600 症例の遺伝子検査的解析を行い、その四分の一で確定診断に至ることができたことが挙げられる。

3) 今後の展望について

次世代シーケンサーの普及に伴い、臨床の現場からの遺伝子検査としての遺伝子解析の要望が高まると予想される。その一方で、今後も本邦で医療として持続可能な遺伝子検査体制を構築していくことは、喫緊の課題であると考えられる。具体的には、遺伝子検査の拠点集約化、厳密な適応基準の作成、結果返却に伴う学術的解釈あるいは倫理的対応に関する支援体

制、等の整備が挙げられる。

4) 研究内容の効率性について

申請書にも記載したように、本研究班は遺伝子検査としての配列解析も積極的に受けている。その結果、約半数の解析が確定診断を目的とした遺伝子検査的解析であり、その約四分の一で分子遺伝学的確定診断がついた。非常に効率の良い遺伝子診断が可能であった背景には、本研究事業では、分担研究者らのスクリーニングを経た検体のみを解析したことが挙げられる

E. 結論

本事業により、次世代シーケンサーを用いた様々な解析アプリケーションを実行可能とした。本事業の特徴として、ゲノム解析に加え、エピゲノム解析体制も構築した。エクソーム解析には半自動化装置を導入し、スループットの大幅向上を達成した。また、独自のパイプライン構築によりデータ解析迅速化すると共に、変異によるタンパク質への影響予測、1000 人ゲノムや独自の日本人標準配列情報に基づく多型頻度など、様々な情報を付加し、病因変異抽出のために使いやすい解析結果出力を可能とした。また、疾患エピゲノム解析のための準備を進め、網羅的 DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析を行った。次世代シーケンサー・アレイを用いた迅速遺伝子診断システムにより、これまでに様々な遺伝性疾患を含む合計約 2,100 症例の解析を行い、そのうち特に臨床診断を目的とした 679 症例の解析では、168 症例 24.7% が確定診断に至った。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A : DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. PLoS One. 2013;8(1):e54036.

Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Cirillo D, Court F, Guillaumet-Adkins A, Camprubi C, Bourc'his D, Hata K, Feil R, Tartaglia G, Arnaud P, Monk D : Characterization of novel paternal ncRNAs at the Plagl1 locus, including Hymai,

predicted to interact with regulators of active chromatin. PLoS One. 2012;7(6):e38907.

Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H : Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158A(7):1670-1675.

Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T : Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the Gpr1-Zdbf2 locus is linked to long cis-intergenic transcription. FEBS Lett. 2012 23;586(6):827-833.

Nakanishi MO, Hayakawa K, Nakabayashi K, Hata K, Shiota K, Tanaka S : Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophectoderm and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. Epigenetics. 2012 Feb;7(2):173-182.

Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T : Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. PLoS Genet. 2012 ;8(1):e1002440.

日本語総説

秦健一郎： 妊娠維持機構とその破綻-ジェネティクス・エピジェネティクスの視点から-。HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 2012;19:17-22

右田王介, 中林一彦： 次世代シーケンサー・アレイ技術を用いた遺伝子診断. 小児科診療 2013;76:395-399

2. 学会発表

(招待講演)

秦健一郎： 合併症妊娠におけるゲノム解析. 第28回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会, 東

京, 2012.11.17

秦健一郎： 次世代遺伝子解析技術を用いた生殖発生異常のゲノム研究. 第30回日本受精着床学会学術講演会, 大阪, 2012.8.31

秦健一郎： 最先端テクノロジーを駆使したヒト周産期疾患ゲノム解析への取り組み. 第19回遺伝子診断学会, 千葉, 2012.7.27

秦健一郎： ヒト発生異常のゲノム解析・エピゲノム解析. 東京大学大学院 農学部 応用動物科学セミナー, 東京, 2012.7.20

秦健一郎： ジェネティクスを越えてエピジェネティクスへ-周産期のエピジェネティクス-. 遺伝医学合同学術集会 (第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 第17回日本家族性腫瘍学会学術集会), 京都, 2011.6.18

秦健一郎： 異常妊娠のエピジェネティクス. 日本繁殖学会 国際シンポジウム, 盛岡, 2011.9.19

(一般演題)

Nakabayashi K, Trujillo A.M, Tayama C, Romanelli V, Lapunzina P, Kagami M, Soejima H, Ogata H, Court F, Monk D, Hata K: DNA methylation analysis of reciprocal genomewide UPDs to define imprinted differentially methylated regions in the human genome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, San Francisco, 2012.11.8

久須美真紀, 中林一彦, 前原佳代子, 田嶋敦, 副島英伸, 吉原一, 秦健一郎： 生殖補助医療技術が出生時のDNAメチル化状態に及ぼす影響の検討. 日本人類遺伝学会第57回大会, 東京, 2012.10.27

中林一彦, 田山千春, Trujillo Alex Martin, 岡村浩司, 緒方勤, 副島英伸, Monk David, 秦健一郎： 全ゲノム片親性ダイソミー症例のDNAメチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 日本人類遺伝学会第57回大会, 東京, 2012.10.26

鏡雅代, 古庄知己, 中林一彦, 松岡健太郎, 松原圭子, 福家智子, 深見真紀, 緒方勤： 1 4

番染色体インプリンティング領域メチル化制御機構の解明：MEG3-DMRエピ変異症例の解析から． 日本人類遺伝学会第57回大会， 東京， 2012.10.27

岩田圭子， 中林一彦， 松崎秀夫， 中村和彦， 秦健一郎， 森則夫： 自閉症死後脳縫線核メチル化状態の網羅的解析． 第39回日本脳科学会， 福岡， 2012.10.6

秦健一郎： 発生とエピジェネティクス． 第30回日本受精着床学会， 大阪， 2012.8.31

久須美真紀， 神通寛子， 秦健一郎， 千田将： 妊娠母獣の栄養状態に伴う新生仔レプチン受容体遺伝子領域のエピジェネティックな変化． 第64回日本産科婦人科学会， 兵庫， 2012.4.15

直井裕子， 鳥巢弘道， 久須美真紀， 諸隈誠一， 山田崇弘， 水上尚典， 和氣徳夫， 左合治彦， 秦健一郎： 異常妊娠のエピゲノム解析． 第64回日本産科婦人科学会高得点演題， 兵庫， 2012.4.13

由良洋文， 桜庭喜行， 森下和代， 関沢明彦， 秦健一郎， 北川道弘： 母体血から分離・濃縮された赤芽球の機器検出． 第15回胎児遺伝子診断研究会， 東京， 2012.2.4

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし


2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による病因説明とゲノム解析拠点整備

解析拠点:  国立成育医療研究センター

大規模配列解析
全エクソン配列解析
ターゲットリシーケンス
全ゲノム配列解析
SNP解析
CNV解析
トランスクリプトーム解析
エピゲノム解析
メタゲノム解析

バイオインフォマティクス
SNV検出 indel検出
トランスクリプトーム解析
エピゲノム解析、メタゲノム解析

成育疾患関連変異データベース
成果の集約化と公開
遺伝子診断の精度向上

成育バイオバンク
を含むナショナルセンターバイオバンクとの連携

遺伝子解析依頼

難病・希少疾患研究支援

総合的遺伝子検査支援

全国の難病研究拠点・関連学会と連携した遺伝子解析ネットワーク (約50医療機関からの依頼実績)

成育医療研究センター→東北大学拠点への解析依頼



成育解析拠点
①未知変異同定
②エピゲノム解析
③一塩基多型解析

③遺伝子検査支援

遺伝子検査支援窓口

・倫理手続き面での支援

遺伝子検査結果報告書返却

・遺伝カウンセリングの支援

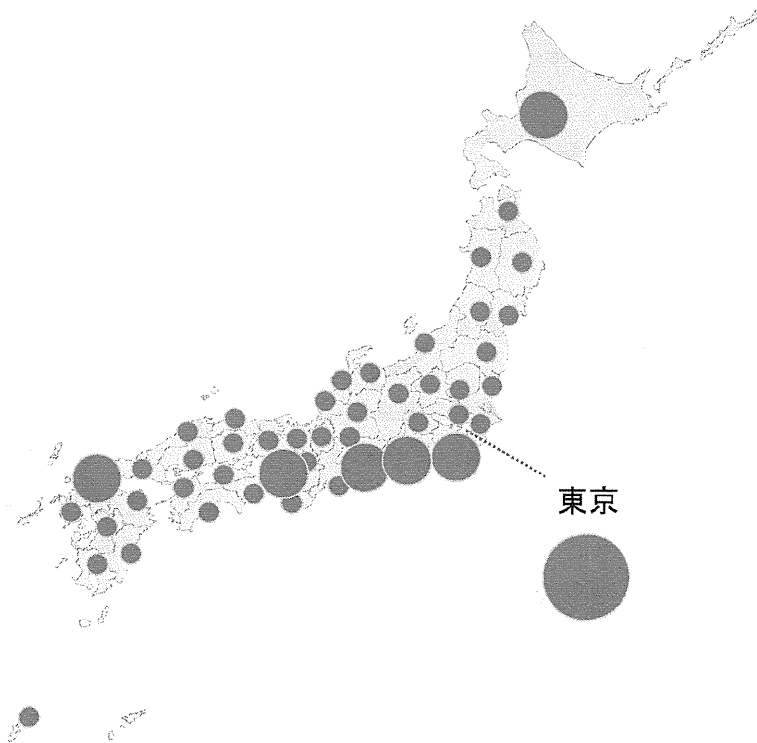
国立成育医療研究センターでの解析実績 (2011年11月～2014年1月の26か月)

これまでの主な解析のまとめ	解析数	陽性者数	同定された異常の詳細
次世代シーケンス			
カスタムアンプリコンシーケンス			
性分化疾患	98	5	1例で既知病的変異、4例で候補変異を同定
カスタムターゲットエンリッチメント (sureselect)			
性成熟疾患	77	8	5例で既知病的変異、3例で候補変異を同定
SRS・原因不明成長障害	104	25	4例で既知病的変異、21例で候補変異を同定
性分化疾患	45	21	6例で既知病的変異、15例で候補変異を同定
カスタムターゲットエンリッチメント (haloplex)			
性分化疾患	98		準備中
先天性甲状腺機能低下症	105		結果解析中
SRS・原因不明成長障害	16		結果解析中
性成熟疾患	32		結果解析中
upd(14)mat症候群	23		1例で既知病的変異を同定
ブラダーウィリー症候群	5		結果解析中
エクソーム			
性分化疾患	26		結果解析中
先天性甲状腺機能低下症	1家系		同定された未知変異の機能解析中
MODY	1家系		結果解析中
upd(14)pat/upd(14)mat症候群	36		結果解析中
腎機能異常	1家系		結果解析中
稀な合併症を伴う先天奇形症候群	6		結果解析中
MFB	119		結果解析中
KUH	53		結果解析中
免疫不全症候群	2家系		結果解析中
ベックウィズヴィーデマン症候群	19		結果解析中

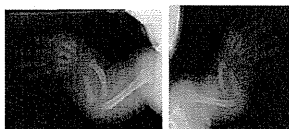
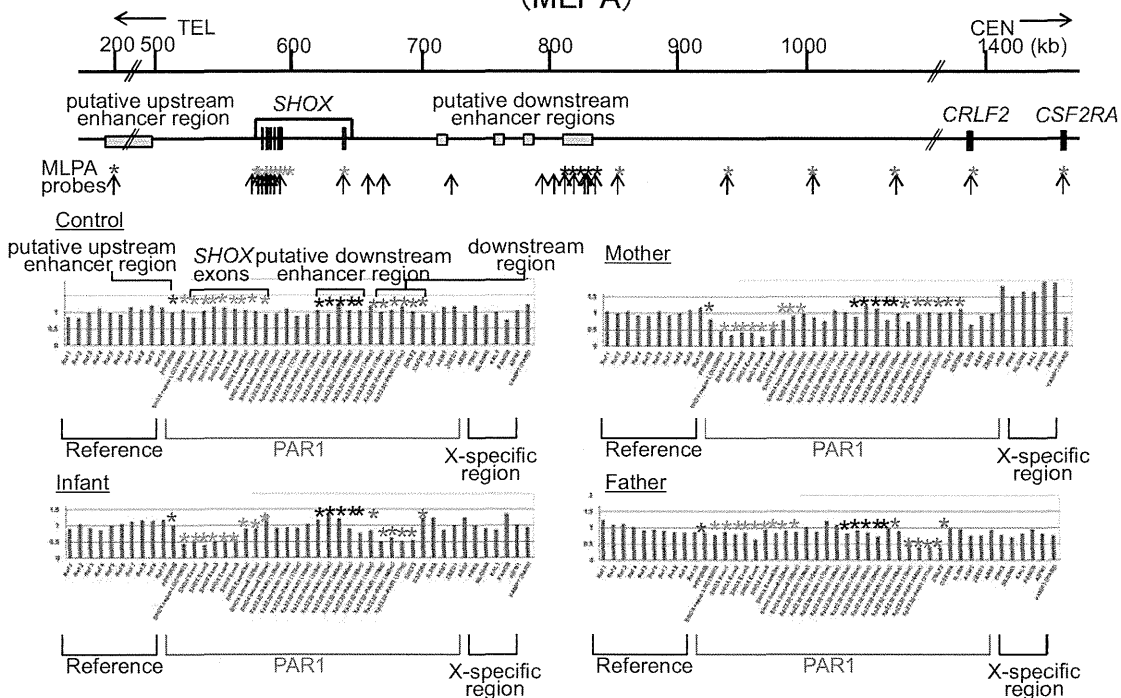
これまでの主な解析のまとめ	解析数	陽性者数	同定された異常の詳細
450K Methylation			
偽性副甲状腺機能低下症lb	3	2	疾患責任エピ変異
upd(14)pat/upd(14)mat症候群	9	7	疾患責任エピ変異
シルバーラッセル症候群	42	35	疾患責任エピ変異
ブラダーウィリー症候群	3	3	疾患責任エピ変異
ベックウィズヴィーデマン症候群	7	7	疾患責任エピ変異
インプリンティング疾患疑い症例	13	4	疾患責任エピ変異
先天奇形症候群・精神発達遅延	33		結果解析中
胎児発育遅延	46		結果解析中
妊娠高血圧症候群	21		結果解析中
日本人正常分岐集団	59		
SNP BeadChip			
日本人正常分岐集団	467		
インプリンティング疾患疑い症例	76		結果解析中
原因不明先天奇形・精神発達遅延	79		結果解析中
アレイCGH			
全ゲノムCGH			
性分化疾患	68	4	4例で病的欠失変異候補を同定
内分泌異常を伴う先天奇形症候群	23	4	3例で病的欠失変異を同定
偽性副甲状腺機能低下症lb	2	1	機能未知領域に3Mbの欠失を同定
upd(14)pat/upd(14)mat症候群	9	4	14番染色体微小欠失を同定
シルバーラッセル症候群	26	0	
アロマトーゼ過剰症	7	3	4例で病的変異候補を同定
染色体特定領域カスタムCGH			
upd(14)pat/upd(14)mat症候群	24	7	6例で染色体微小欠失、1例で微小重複を同定
ブラダーウィリー症候群	16	0	
シルバーラッセル症候群	94	1	1例で病的変異候補を同定
ベックウィズヴィーデマン症候群	1	0	
IMAGe症候群	6	0	
片側肥大	9	1	1例で病的変異候補を同定

総解析数 約2,200症例
臨床診断数 647症例
確定診断に至った数 147症例 (23%)

成育医療研究センター拠点班への解析依頼

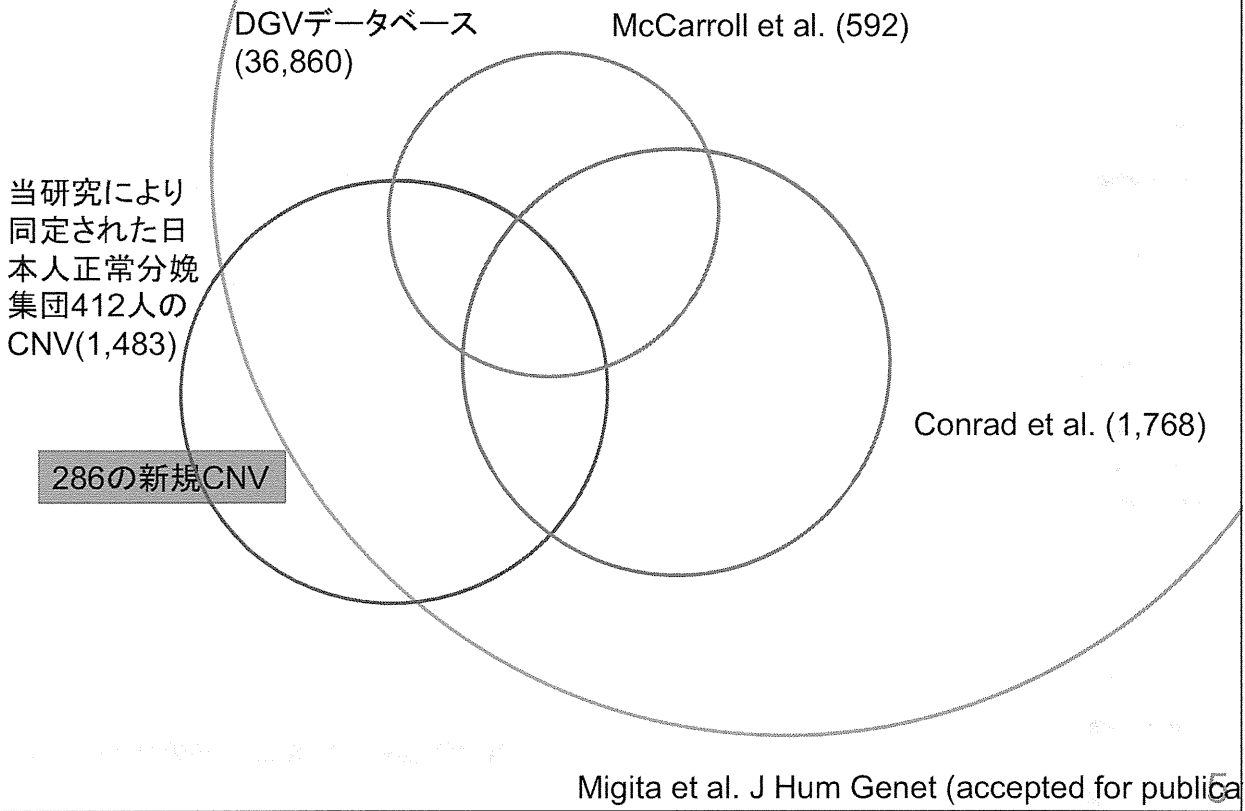


先天奇形症候群患者における性染色体微小欠失の同定 (MLPA)

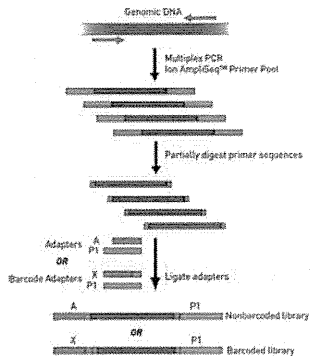


Tsuchiya et al. Am J Med Genet (in press)

ivi 日本人正常分娩集団の遺伝学的特徴



Ion-AmpliSeq (LifeTech 社)



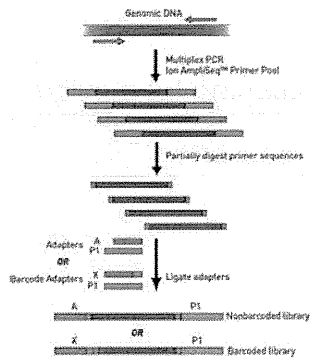
LifeTech社ホームページより複製引用

Ion AmpliSeq Custom Oligos価格

アンプリオン数	ターゲットサイズ	価格
12	2.4 Kb	9,000 円
24	4.8 Kb	18,000 円
48	9.6 Kb	36,000 円
96	19.2 Kb	72,000 円
192	38.4 Kb	144,000 円
384	76.8 Kb	288,000 円
768	153.6 Kb	576,000 円
1536	307.2 Kb	1,152,000 円

2250 or 9000反応分
750円 / アンプリオン

Ion-AmpliSeq (LifeTech 社)



SCID原因遺伝子

- | | |
|---------|--------|
| ADA | ORAI1 |
| AK2 | PNP |
| CD247 | PRKDC |
| CD3D | PTPRC |
| CD3E | RAG1 |
| CD3G | RAG2 |
| CIITA | RFX5 |
| DCLRE1C | RFXANK |
| IKZF1 | RFXAP |
| IL2RG | STIM1 |
| IL7R | TAP1 |
| JAK3 | TAP2 |
| LIG4 | TAPBP |
| NHEJ1 | ZAP70 |

(28 genes)

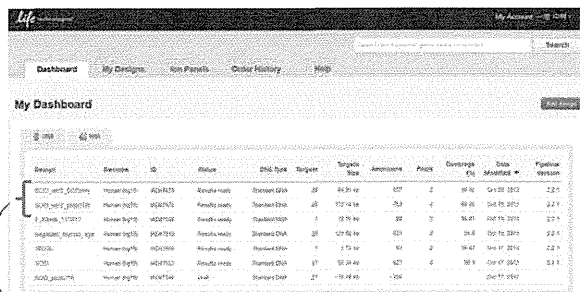
カスタムマルチプレックスプライマーのデザイン: Ion AmpliSeq Designer Website
https://www.ampliseq.com/browse.action

Gene symbolリストを入力すると2-48時間後に結果が出力される

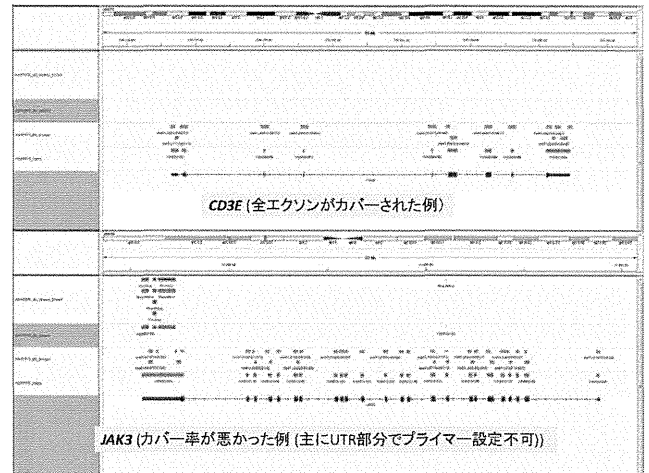


カスタムマルチプレックスプライマーのデザイン: Ion AmpliSeq Designer Website
https://www.ampliseq.com/login/login.action

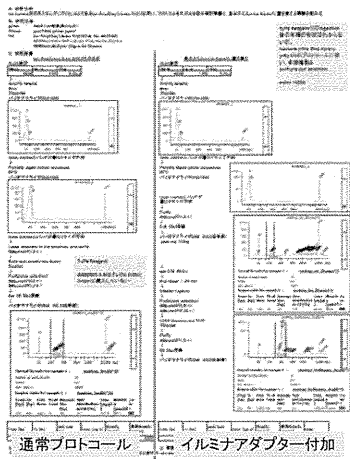
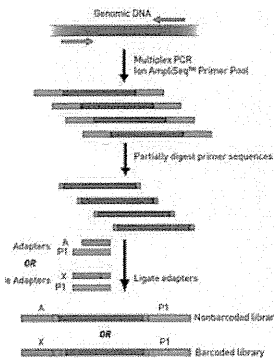
Gene symbolリストを入力すると2-48時間後に結果が出力される



SCID 28遺伝子 CDS target size 64.8 kb (537 amplicons) coverage 98.56%
SCID 28遺伝子 CDS & UTR target size 112.1 kb (753 amplicons) coverage 88.26%



Ion-Ampliseq



通常プロトコール イルミナアダプター付加

1検体について

- Pool 1 oligo (462 primer pairs, total 50kb) を用いて multiplex PCR
- ライブラリー化 (アダプター付加)
- HiSeq paired-end (100 bp x2) read で 400 Mb の配列を取得 (⇒ x8000)

標的領域50Kbについて on-target率を計算

% of reads within regions: 91.72
 % of reads within 100bp: 91.83
 % of reads within 200bp: 91.83
 % of reads within 500bp: 91.83
 % of reads within 1000bp: 91.83
 % of reads beyond 1000bp: 8.17
 Average coverage over all target regions: 5291.61
 Total number of reads in sample overlapping with targeted regions: 3781950
 Total number of reads in sample: 4123270

on-target率 91.72%
 coverage 5291.6

Coverage worst top 40

順位	Target	読取数	平均Coverage
1	5125814720-102844717	156	2.0
2	638592929-2658405	252	3.0
3	1186528732-8552894	282	4.0
4	7107350486-107352653	336	4.4
5	1545404084-45404170	432	5.0
6	672744510-72245356	435	6.0
7	178524850-8824980	795	8.7
8	1024444225-24454371	892	8.0
9	1095144185-21448807	774	9.1
10	6150774425-150724504	561	12.0
11	52826058-3826142	1207	14.2
12	1838286329-3058530	2359	21.1
13	0400615659-100815785	2761	22.0
14	7107352471-107352501	1544	24.0
15	6150770459-150719539	2342	21.0
16	1785245309-8826002	5651	11.0
17	621540757-31840830	3721	44.6
18	1545444159-45444250	4178	45.4
19	1073021889-78161867	3745	41.4
20	8185856210-152856303	4345	45.4
21	1439388330-30585305	4465	56.0
22	1651128639-11152115	5253	61.0
23	5178665218-172852852	12427	70.2
24	6272211001-72211882	6284	78.0
25	1451724018-4544262	6860	80.0
26	1545444129-45445221	7533	82.1
27	1785240277-6291116	7636	84.8
28	1481611544-81411434	8341	95.2
29	1545427806-45427581	16521	95.6
30	1545444159-45444250	10857	119.8
31	1838286329-3058530	14311	122.0
32	1785245309-8826002	13537	179.4
33	8185856210-152856303	12272	145.2
34	1651128639-11152115	13856	148.0
35	6272211001-72211882	15501	158.2
36	91874205-91674300	16557	165.0
37	165112881-51178058	16648	169.9
38	1545444159-45444250	15924	169.1

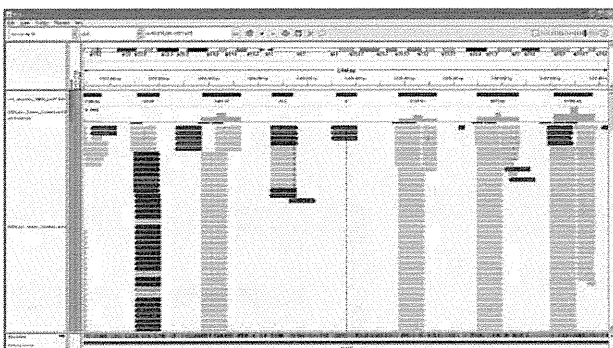
1検体について

- Pool 1 oligo (462 primer pairs, total 50kb) を用いて multiplex PCR
- ライブラリー化 (アダプター付加)
- HiSeq paired-end (100 bp x2) read で 400 Mb の配列を取得 (⇒ x8000)

標的領域50Kbについて on-target率を計算

% of reads within regions: 91.72
 % of reads within 100bp: 91.83
 % of reads within 200bp: 91.83
 % of reads within 500bp: 91.83
 % of reads beyond 1000bp: 8.17
 Average coverage over all target regions: 5291.61
 Total number of reads in sample overlapping with targeted regions: 3781950
 Total number of reads in sample: 4123270

on-target率 91.72%
 平均coverage 5291.6



1検体について

- Pool 1 oligo (462 primer pairs, total 50kb) を用いて multiplex PCR
- ライブラリー化 (アダプター付加)
- HiSeq paired-end (100 bp x2) read で 400 Mb の配列を取得 (⇒ x8000)

標的領域50Kbについて on-target率を計算

% of reads within regions: 91.72
 % of reads within 100bp: 91.83
 % of reads within 200bp: 91.83
 % of reads within 500bp: 91.83
 % of reads within 1000bp: 91.83
 % of reads beyond 1000bp: 8.17
 Average coverage over all target regions: 5291.61
 Total number of reads in sample overlapping with targeted regions: 3781950
 Total number of reads in sample: 4123270

on-target率 91.72%
 平均coverage 5291.6

平均Coverage >20を基準とした場合:
 406/426 (95.3%)のアンプリコン領域で
 十分なデータが取得できた。

Coverage worst top 40

順位	Target	読取数	平均Coverage
1	5125814720-102844717	156	2.0
2	638592929-2658405	252	3.0
3	1186528732-8552894	282	4.0
4	7107350486-107352653	336	4.4
5	1545404084-45404170	432	5.0
6	672744510-72245356	435	6.0
7	178524850-8824980	795	8.7
8	1024444225-24454371	892	8.0
9	1095144185-21448807	774	9.1
10	6150774425-150724504	561	12.0
11	52826058-3826142	1207	14.2
12	1838286329-3058530	2359	21.1
13	0400615659-100815785	2761	22.0
14	7107352471-107352501	1544	24.0
15	6150770459-150719539	2342	21.0
16	1785245309-8826002	5651	11.0
17	621540757-31840830	3721	44.6
18	1545444159-45444250	4178	45.4
19	1073021889-78161867	3745	41.4
20	8185856210-152856303	4345	45.4
21	1439388330-30585305	4465	56.0
22	1651128639-11152115	5253	61.0
23	5178665218-172852852	12427	70.2
24	6272211001-72211882	6284	78.0
25	1451724018-4544262	6860	80.0
26	1545444129-45445221	7533	82.1
27	1785240277-6291116	7636	84.8
28	1481611544-81411434	8341	95.2
29	1545427806-45427581	16521	95.6
30	1545444159-45444250	10857	119.8
31	1838286329-3058530	14311	122.0
32	1651128639-11152115	13856	148.0
33	6272211001-72211882	15501	158.2
34	8185856210-152856303	12272	145.2
35	1651128639-11152115	13856	148.0
36	91874205-91674300	16557	165.0
37	165112881-51178058	16648	169.9
38	1545444159-45444250	15924	169.1

1検体について

- Pool 1 oligo (462 primer pairs, total 50kb) を用いて multiplex PCR
- ライブラリー化 (アダプター付加)
- HiSeq paired-end (100 bp x2) read で 400 Mb の配列を取得 (⇒ x8000)

標的領域50Kbについて on-target率を計算

% of reads within regions: 91.72
 % of reads within 100bp: 91.83
 % of reads within 200bp: 91.83
 % of reads within 500bp: 91.83
 % of reads beyond 1000bp: 8.17
 Average coverage over all target regions: 5291.61
 Total number of reads in sample overlapping with targeted regions: 3781950
 Total number of reads in sample: 4123270

on-target率 91.72%
 平均coverage 5291.6

平均Coverage >20を基準とした場合:
 406/426 (95.3%)のアンプリコン領域で
 十分なデータが取得できた。

Coverage worst top 40

順位	Target	読取数	平均Coverage
1	5125814720-102844717	156	2.0
2	638592929-2658405	252	3.0
3	1186528732-8552894	282	4.0
4	7107350486-107352653	336	4.4
5	1545404084-45404170	432	5.0
6	672744510-72245356	435	6.0
7	178524850-8824980	795	8.7
8	1024444225-24454371	892	8.0
9	1095144185-21448807	774	9.1
10	6150774425-150724504	561	12.0
11	52826058-3826142	1207	14.2
12	1838286329-3058530	2359	21.1
13	0400615659-100815785	2761	22.0
14	7107352471-107352501	1544	24.0
15	6150770459-150719539	2342	21.0
16	1785245309-8826002	5651	11.0
17	621540757-31840830	3721	44.6
18	1545444159-45444250	4178	45.4
19	1073021889-78161867	3745	41.4
20	8185856210-152856303	4345	45.4
21	1439388330-30585305	4465	56.0
22	1651128639-11152115	5253	61.0
23	5178665218-172852852	12427	70.2
24	6272211001-72211882	6284	78.0
25	1451724018-4544262	6860	80.0
26	1545444129-45445221	7533	82.1
27	1785240277-6291116	7636	84.8
28	1481611544-81411434	8341	95.2
29	1545427806-45427581	16521	95.6
30	1545444159-45444250	10857	119.8
31	1838286329-3058530	14311	122.0
32	1651128639-11152115	13856	148.0
33	6272211001-72211882	15501	158.2
34	8185856210-152856303	12272	145.2
35	1651128639-11152115	13856	148.0
36	91874205-91674300	16557	165.0
37	165112881-51178058	16648	169.9
38	1545444159-45444250	15924	169.1

幾つかの小規模変異解析プロジェクトを
 試行し、評価予定

Exomeデータにおける variant call error のパターン

MZtwin KUH022・KUH023間における塩基置換部位の検査 (2013/9/21 KN)
Monozygotic twins
KUH022&KUH023
下記の絞り込みは、Noonan syndrome 表型型の責任変異絞り込みではなく、KUH022・KUH023間で異なる塩基置換位を探ることを目的としている。
KUH022=KUH110927C1
Noonan Syndrome
SS51Mb_v4
###ファイル:2_noonan_1_1_KN2_nd145.txt
RD_KUH022&RD_KUH023が両方とも21以上であるvariantsに絞り込み
145 variants
KUH023=KUH110927C2
正常表現型
SS80Mb_v4
###ファイル:3_noonan_1_1_KN2_nd145andMAF.xlsx
さらにminor allele frequencyを計算し、KUH022とKUH023との間でMAFに0.2以上の差があるものに絞り込むと17個のvariantが残る。
このうちの幾つかについてIGVでデータを眺めると、in-del周辺の再アライメントの不一致が原因で、KUH022とKUH023と異なるgenotypeがcallされていると思われる例が認められた。
Chr12:123334929 (hg19)
Chr14:55902698 (hg19)
周辺にin-delが無く、KUH022とKUH023のgenotypeが確かに異なる例もあった。
Chr12:123334929 (hg19)
このような例でも、偶然の偶りの可能性も考えられ、sanger-sequencingによるvalidationが必要と思われる。

Chr14:55902698 (hg19)
ref=T, alt=A
TBPL2 intronic
KUH022: T;A=39;1
KUH023: T;A=15;9

In-del周辺の Calibration/re-alignment エラー例

近傍の2bp insertionの影響

miss-alignment数が(おそらく偶然)偏っているためにgenotype call不一致

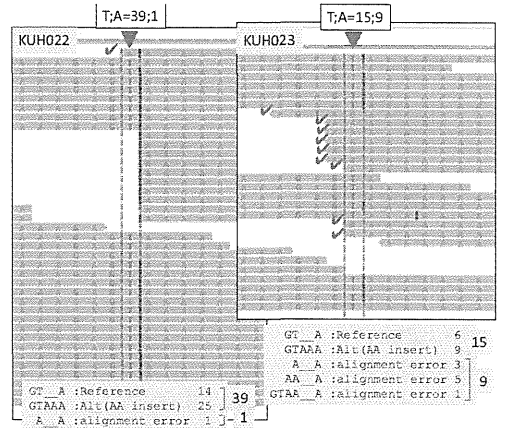


Table with 14 columns: Chr, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos. Row 1: 14 55902698 T A 39 1 14 55902698 T A 15 9 14 55902698 T A 39 1 14 55902698 T A 15 9 14 55902698 T A 39 1 14 55902698 T A 15 9 14 55902698 T A 39 1 14 55902698 T A 15 9

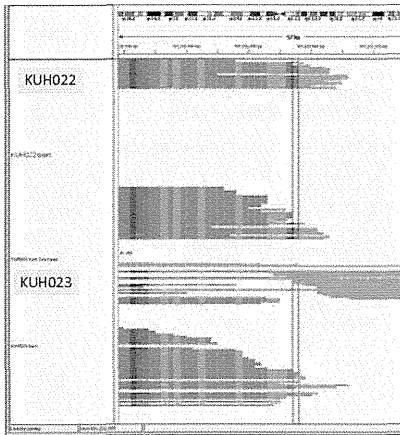
Chr3:101232057 (hg19)
ref=G, alt=A
SENP7 UTR5
AD_KUH022: G;A=23;11
AD_KUH023: G;A= 0;24
一見するとKUH022だけに1塩基欠失があるように見える
AAA AAA
AAAAAA
GAAA
AAA GAA
AAAG
AAA GAA
AAAAGAA
などが混在

In-del周辺の Calibration/re-alignment エラー例

実際は下記のパターンか?

KUH022 genotype
AAA AAA 10
AAAAGAAA 29
KUH023 genotype
AAA AAA 3
AAAAGAAA 21

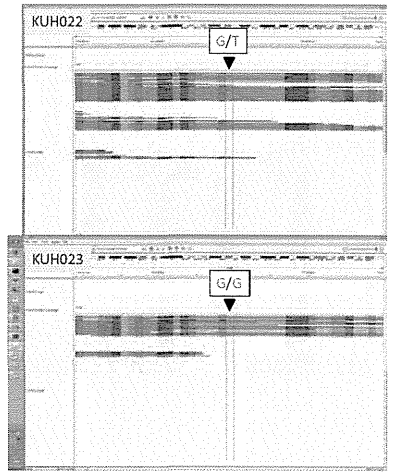
Table with 14 columns: Chr, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos, Ref, Alt, Pos. Row 1: 3 101232057 G A 23 11 3 101232057 G A 0 24 3 101232057 G A 23 11 3 101232057 G A 0 24 3 101232057 G A 23 11 3 101232057 G A 0 24 3 101232057 G A 23 11 3 101232057 G A 0 24



Chr12:123334929 (hg19)
ref=G, alt=T
HIP1R intronic
AD_KUH022: G;T=33;9
AD_KUH023: G;T=22;0

KUH022とKUH023のgenotypeが確かに異なる例
但し、KUH023でT allele readがたまたま入ってこなかった可能性も否定できない

Sanger-sequencingによる検証が必要

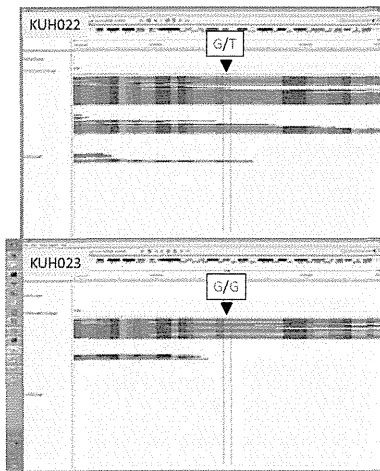


Chr12:123334929 (hg19)
ref=G, alt=T
HIP1R intronic
AD_KUH022: G;T=33;9
AD_KUH023: G;T=22;0

KUH022とKUH023のgenotypeが確かに異なる例
但し、KUH023でT allele readがたまたま入ってこなかった可能性も否定できない

Sanger-sequencingによる検証が必要

In-del周辺ではcall errorが起きやすいので注意

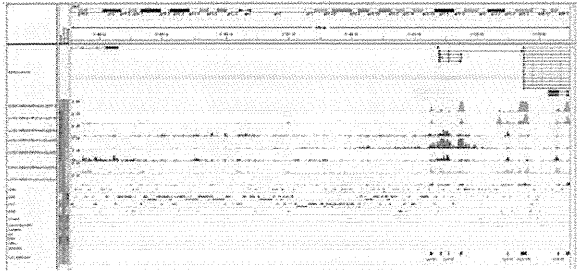


ChIP-qPCR / ChIP条件検討

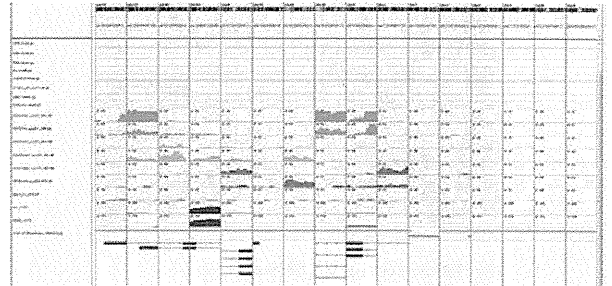
ChIP-qPCR (SYBR-green法・ABI7500 使用) 2013/08/27version 長谷川・中林

- 準備
↓準備0: 定量PCRの測定原理・標準的データ解析原理を理解する。
↓準備1: standard curve (株量線) 用断片化 gDNA の準備
↓準備2: プライマーのデザイン・条件検討
↓準備3: ChIP DNA・Input DNA 調製
↓準備4: サンプル (Std, NC, unknown) 配置の決定
↓準備5: ABI7500software上で Experiment 作成・保存
↓
PCR反応セットアップ => 7500 RUN
↓
測定終了後のデータ評価 (7500software) => Data Export => シェットダウン
↓
Excelでのデータ解析

ChIP-qPCR 用定量PCRプライマーの設定 (positive regions & negative regions)



ChIP-qPCR 用定量PCRプライマーの設定 (positive regions & negative regions)



ChIP-qPCR / ChIP条件検討

Check points

end-point PCR産物は単一サイズか？ (7500softwareでmelt-curve解析結果を目視確認)

各プライマーについてstandard curveの相関係数を確認 (AE-calc sheet使用)
各プライマーについてAE算出 (AE-calc sheet使用)

input-DNA, ChIP-DNAのCt値はstandard curve内に収まっているか？
(negative regionのCt値が外れるのは仕方なし)

inputのqualityは異なるプライマー間で同程度になるはず

$$\%input = AE^{(Ct \text{ of input} - Ct \text{ of ChIP})} \times Fd \times 100\%$$

AE: amplification efficiency (fold), ideal value = 2
Fd: cell number of input / cell number of ChIP

$$\%input \text{ of Positive Region} = AE^{(Ct \text{ PR of input} - Ct \text{ PR of ChIP})} \times Fd \times 100\%$$

$$\%input \text{ of Negative Region} = AE^{(Ct \text{ NR of input} - Ct \text{ NR of ChIP})} \times Fd \times 100\%$$

Relative occupancy

$$= \%input \text{ of Positive Region} / \%input \text{ of Negative Region}$$

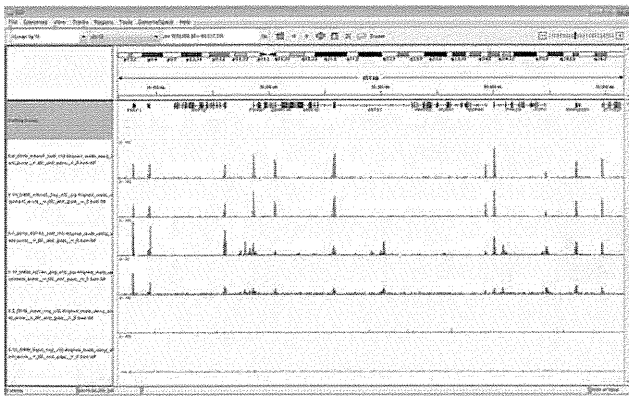
$$= (AE^{(Ct \text{ PR of input} - Ct \text{ PR of ChIP})} \times Fd \times 100\%) / (AE^{(Ct \text{ NR of input} - Ct \text{ NR of ChIP})} \times Fd \times 100\%)$$

$$= (AE^{(Ct \text{ PR of input} - Ct \text{ PR of ChIP})}) / (AE^{(Ct \text{ NR of input} - Ct \text{ NR of ChIP})})$$

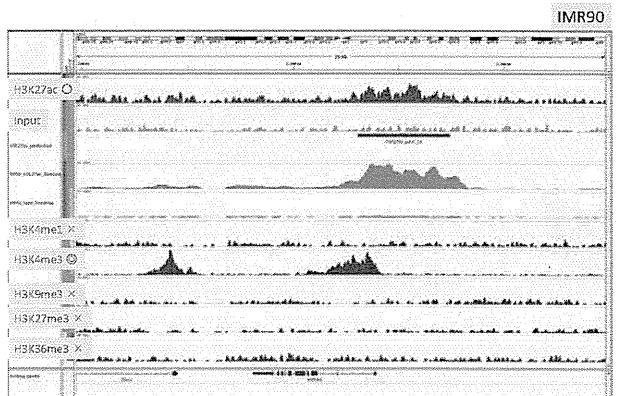
Block Sheet
ChIP: IMR90 GREEN
Excel D:\Applied Biosystems\7500\chemmer\exam\block\blockgreen\130801_Yk.xls
Expt: 2013.08.01 16:15:06 PM JET
notes: sub2000ml
Plate: R01C

Well	Sample Name	Target Name	Task Ct	Quantity	Input	Relative occupancy	Relative occupancy
A1	gDNA C1-C8 mix (positive)_20	GAPDH promoter	STAF	23.76	20.000		
B1	gDNA C1-C8 mix (positive)_5	GAPDH promoter	STAF	25.56	0.000		
C1	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/4	GAPDH promoter	STAF	26.86	1.250		
D1	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/15	GAPDH promoter	STAF	29.76	0.010		
E1	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/4	GAPDH promoter	STAF	28.52	0.070		
H1	EM219-2 input_400cells	GAPDH promoter	UNQ2	27.22	0.000		
A2	EM219-2 input_100cells	GAPDH promoter	UNQ2	28.82	1.150		
B2	EM219-2 input_20cells	GAPDH promoter	UNQ2	31.42	0.200		
F1	EM219-2-H3K27ac_10000cells	GAPDH promoter	UNQ2	26.26	0.000	0.000%	1.00
G1	EM219-2-H3K27ac_30000cells	GAPDH promoter	UNQ2	27.76	0.000	0.040%	2.63
E2	EM219 input_1000cells	GAPDH promoter	UNQ2	29.52	0.010		
F2	EM219 input_2000cells	GAPDH promoter	UNQ2	28.25	1.600		
G2	EM219 input_3000cells	GAPDH promoter	UNQ2	29.95	0.000		
C2	EM219-H3K4me3_50000cells	GAPDH promoter	UNQ2	28.58	0.000	0.208%	7.87
D2	EM219-H3K27ac_50000cells	GAPDH promoter	UNQ2	29.75	0.010	0.224%	13.94
H2	input	GAPDH promoter	NTC	19.000			
A3	gDNA C1-C8 mix (positive)_20	RPL10 promoter	STAF	23.27	20.000		
B3	gDNA C1-C8 mix (positive)_5	RPL10 promoter	STAF	25.86	0.000		
C3	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/4	RPL10 promoter	STAF	26.48	1.250		
D3	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/15	RPL10 promoter	STAF	29.56	0.010		
E3	gDNA C1-C8 mix (positive)_5/4	RPL10 promoter	STAF	28.22	0.070		
H3	EM219-2 input_400cells	RPL10 promoter	UNQ2	33.38	0.000	0.000%	5.33
A4	EM219-2 input_100cells	RPL10 promoter	UNQ2	29.83	0.000	0.000%	3.65
B4	EM219-2 input_20cells	RPL10 promoter	UNQ2	32.55	0.160		
F3	EM219-2-H3K27ac_10000cells	RPL10 promoter	UNQ2	33.38	0.010	0.000%	5.33
G3	EM219-2-H3K27ac_30000cells	RPL10 promoter	UNQ2	32.97	0.010	0.000%	3.65
E4	EM219 input_1000cells	RPL10 promoter	UNQ2	31.70	0.000		
F4	EM219 input_2000cells	RPL10 promoter	UNQ2	27.51	2.240		
G4	EM219 input_3000cells	RPL10 promoter	UNQ2	29.50	0.040		
C4	EM219-H3K4me3_50000cells	RPL10 promoter	UNQ2	30.12	0.010	0.356%	13.20
D4	EM219-H3K27ac_50000cells	RPL10 promoter	UNQ2	29.26	0.000	0.356%	20.76
H4	input	RPL10 promoter	NTC	19.000			

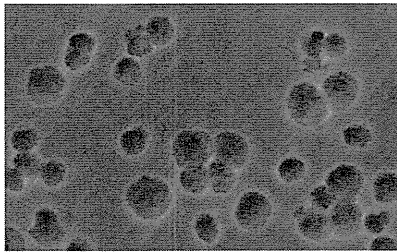
ヒストン修飾ChIP-seq例: H3K4me3 & H3K27ac (子宮内膜由来間質細胞)



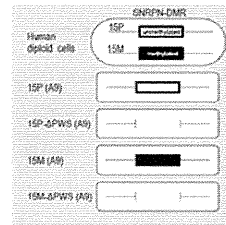
ChIPの最適条件は細胞・ヒストン修飾タイプ・抗体により異なる



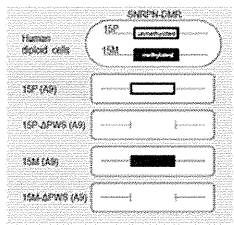
クロマチン調製時に核抽出が必要か？



固定細胞はlysis buffer懸濁後も細胞膜がintact
 このまま回収するとwhole-cell lysateを回収することになる
 細胞膜を何らかの方法で壊すことで、核のみが回収できる。



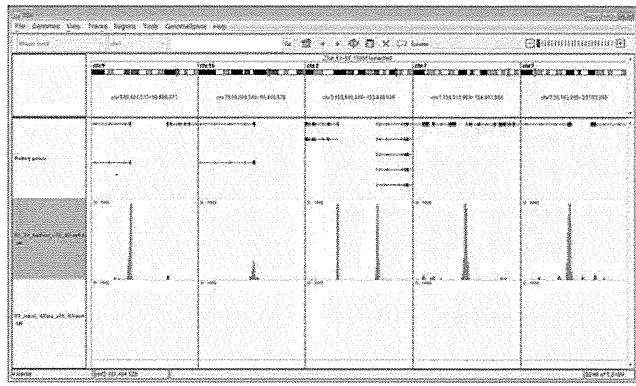
Genotype	K1104105_15M		K1104115_15M		K1104125_15M	
	Signal	Relative Abundance	Signal	Relative Abundance	Signal	Relative Abundance
15M_K19a3_10mm	0.17%	30.21	0.01%	1.83	0.01%	1.00
15M_K19a3_10mm	0.05%	0.90	0.02%	2.44	0.40%	7.04
15M_K27me3_10mm	0.03%	1.18	0.12%	5.68	0.13%	5.59
15M_mig2_10mm	0.01%	0.50	0.01%	1.30	0.01%	1.00
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.00%	0.00	0.00%	3.39	0.00%	2.52
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.13%	450.00	0.19%	6.96	0.20%	6.89
15M-ΔPWS_K27me3_10mm	0.00%	0.00	0.16%	4.83	0.14%	3.78
15M-ΔPWS_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00
15M_K19a3_10mm	0.01%	1.04	0.00%	0.40	0.00%	0.35
15M_K19a3_10mm	0.02%	4.29	0.25%	5.39	0.15%	3.34
15M_K27me3_10mm	0.20%	4.07	0.15%	2.99	0.12%	2.48
15M_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.00%	0.00	0.01%	0.50	0.00%	0.32
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.16%	116.00	0.31%	7.18	0.21%	4.87
15M-ΔPWS_K27me3_10mm	0.15%	71.60	0.24%	3.89	0.14%	2.30
15M-ΔPWS_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00



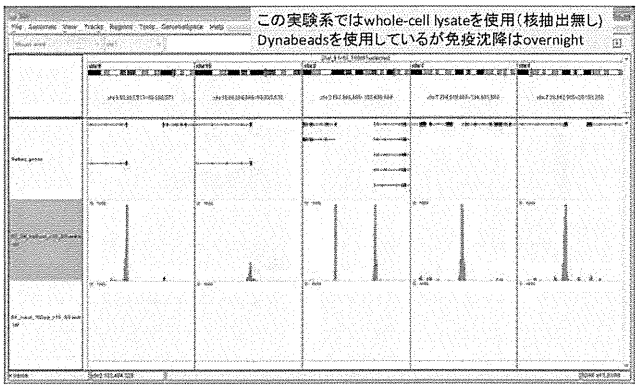
Genotype	K1104105_15M		K1104115_15M		K1104125_15M	
	Signal	Relative Abundance	Signal	Relative Abundance	Signal	Relative Abundance
15M_K19a3_10mm	0.17%	30.21	0.01%	1.83	0.01%	1.00
15M_K19a3_10mm	0.05%	0.90	0.02%	2.44	0.40%	7.04
15M_K27me3_10mm	0.03%	1.18	0.12%	5.68	0.13%	5.59
15M_mig2_10mm	0.01%	0.50	0.01%	1.30	0.01%	1.00
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.00%	0.00	0.00%	3.39	0.00%	2.52
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.13%	450.00	0.19%	6.96	0.20%	6.89
15M-ΔPWS_K27me3_10mm	0.00%	0.00	0.16%	4.83	0.14%	3.78
15M-ΔPWS_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00
15M_K19a3_10mm	0.01%	1.04	0.00%	0.40	0.00%	0.35
15M_K19a3_10mm	0.02%	4.29	0.25%	5.39	0.15%	3.34
15M_K27me3_10mm	0.20%	4.07	0.15%	2.99	0.12%	2.48
15M_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.00%	0.00	0.01%	0.50	0.00%	0.32
15M-ΔPWS_K19a3_10mm	0.16%	116.00	0.31%	7.18	0.21%	4.87
15M-ΔPWS_K27me3_10mm	0.15%	71.60	0.24%	3.89	0.14%	2.30
15M-ΔPWS_mig2_10mm	0.00%	0.00	0.00%	0.00	0.00%	0.00

この結果から核抽出は不活性化クロマチン修飾ChIPの特異性を向上させると判断

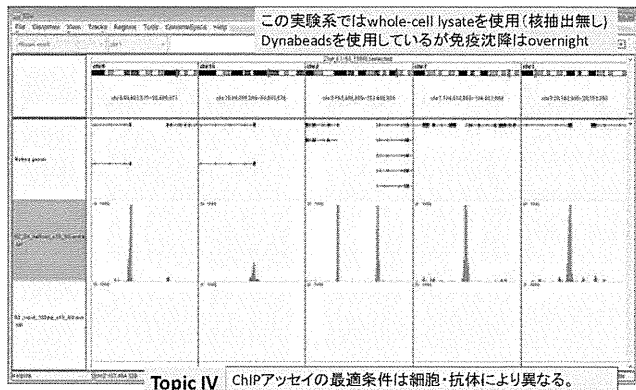
転写因子のChIP-seq例：免疫系zinc-finger protein (10.5dpc embryo)



転写因子のChIP-seq例：免疫系zinc-finger protein (10.5dpc embryo)



転写因子のChIP-seq例：免疫系zinc-finger protein (10.5dpc embryo)



Topic IV ChIPアッセイの最適条件は細胞・抗体により異なる。
 一連の実験条件についての実験者の細心の注意が重要