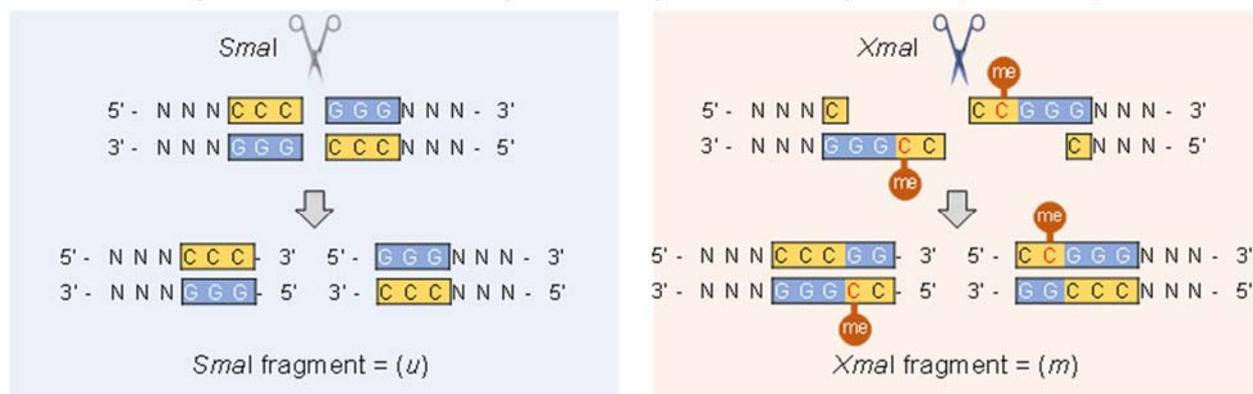


Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM)



$$\text{Methylation ratio} = (m) / (m + u)$$

若年性骨髄単球性白血病患者のリスク層別化のための シンプルで堅牢なメチル化検査法の開発

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科小児科学の高橋義行（たかはし よしゆき）教授、村松秀城（むらまつひでき）講師、名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学の奥野友介（おくの ゆうすけ）教授、日本赤十字社愛知医療センター名古屋第一病院小児科の北澤宏展（きたざわ ひろのぶ）医長、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校小児科 Elliot Stieglitz らの研究グループは、若年性骨髄単球性白血病（JMML）患者のリスク層別化のためのシンプルで堅牢なメチル化検査法の開発を行い、その成果を報告しました。

若年性骨髄単球性白血病（JMML）は、乳児期から幼児期に発症するまれな骨髄異形成／骨髄増殖性疾患です。JMML 患者は、DNA メチル化^{*1}の状態により、予後の異なる高メチル化（HM）、中間メチル化（IM）、低メチル化（LM）の3つのグループに分類されます。2021年に我々を含む3か国の国際共同研究により、メチル化アレイ^{*2}を用いたDNAメチル化の国際分類法が発表されましたが、メチル化アレイによる解析は高価であり、実際に臨床試験に利用するには困難を伴います。そこで、シンプルで堅牢なメチル化検査法を開発するために、137名のJMML患者を対象に、次世代シーケンサー^{*3}を用いたメチル化解析法である Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM)を用いて解析を行いました。

DREAM データを用いた発見コホート（n=99）の教師なしコンセンサス・クラスタリングにより、HMとLMのサブグループが特定されました（HM_DREAM, n=35; LM_DREAM; n=64）。国際分類法との比較が可能な98例のうち、HM（n=30）とLM（n=60）の90例は、DREAMのクラスタリング結果^{*4}と100%一致しました。国際分類法でIM群に分類されていた残りの8例については、4例がHM_DREAM群に、4例がLM_DREAM群に分類されました。また、サポートベクターマシン（SVM）を用いた機械学習による分類器を構築し、検証コホート（n=38）を、5年全生存率が有意に異なるHM群（HM_SVM; n=18）とLM群（LM_SVM; n=20）に分類することができました。

本研究で確立したDREAM法によるメチル化検査法は、解析手技はシンプルでありながら堅牢な解析結果が得られるため、メチル化によるJMML患者の重症度分類の臨床活用において広く利用されることが期待されます。

本研究は、「Blood Advances」に（2021年9月27日）に掲載されました。

ポイント

○合計 137 名の JMML 患者検体を用いて、Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM) 法による DNA メチル化解析を行いました。

○DREAM 法による DNA メチル化分類は、メチル化アレイ法による JMML メチル化国際分類と高い整合性を示しました。

○DREAM 法は、JMML に対する堅牢な DNA メチル化臨床検査法として利用可能であると考えられます。

1. 背景

エピゲノム^{*5}の乱れは、がん細胞に共通して見られる現象です。代表的なエピゲノムの乱れの一つである DNA メチル化パターンの変化は、DNA メチル化アレイ分析を用いて正確に評価することができます。異常な DNA メチル化パターンの中には、腫瘍化を促進する特定の遺伝子変異と関連するものがあり、疾患の進行を示すバイオマーカーとして利用できる可能性があります。

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は、乳児期および幼児期に発症するまれな白血病であり、骨髄単球の過剰な増殖と顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子に対する過敏性が特徴です。JMML 患者は、DNA メチル化の状態により、予後の異なる高メチル化 (HM)、中間メチル化 (IM)、低メチル化 (LM) の 3 つのグループに分類されます。2021 年に我々を含む 3 か国の国際共同研究により、代表的なメチル化アレイである Infinium Human Methylation 450K BeadChip (450K; Illumina, San Diego, CA) を用いた DNA メチル化の国際分類法 (Clin Cancer Res. 2021;27(1):158-168) が発表されましたが、メチル化アレイによる解析は高価であり、実際に臨床試験に利用するには困難を伴います。そのため、メチル化プロファイリングを臨床的な意思決定プロセスや今後の臨床試験に取り入れるためには、検査費用が安価で、かつ検体処理が簡便でありながら堅牢な結果が得られる DNA メチル化解析法が必要です。

Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM) 法は、次世代シーケンサーを用いて、ゲノム上の数万の CpG サイトにおける DNA メチル化を定量的にマッピングする手法です。同じ CCCGGG 配列を認識しますが、CpG メチル化に対する感度や切断パターンが異なる制限酵素 *Sma*I と *Xma*I を用いてゲノム DNA を順次消化して得られた、非メチル化 CpG サイトとメチル化 CpG サイトに特異的なシグネチャーを持つ DNA 断片を次世代シーケンサーで解析することで、対象となる各 CpG サイトのメチル化レベルを算出します (図 1)。

本研究では、137 名の患者 [若年性骨髄単球性白血病 (JMML)、n=124、ヌーナン症候群関連骨髄増殖性障害 (NS/MPD)、n=13] の末梢血または骨髄単核細胞から採取したゲノム DNA を用いて DREAM 法を用いた DNA メチル化解析を実施しました。

2. 研究成果

クラスタリング解析

7,360 個のプロモーター^{*6}関連 CpG サイトの DREAM メチル化データを用いて、発見コホートの教師なし階層型クラスタリングを行ったところ、既報の 450K クラスタリング結果と 95% の一致率 (99 サンプル中 94 サンプル) で、高メチル化 (HM_DREAM, n = 35) および低メチル化サブグループ (LM_DREAM, n = 64) が特定されました。国際分類との比較が可能な 98 例のうち、

HM (n=30) と LM (n=60) の 90 例は DREAM のクラスタリング結果と 100%の一致を示しました。国際分類で IM 群に分類された 8 例については、4 例が HM_DREAM 群に、4 例が LM_DREAM 群に分類されました (図 2)。

また、検証コホート (n = 38) に対しても同様に、前述の 7,360 のプロモーター関連 CpG サイトから得られた DREAM データを用いて、教師なしのクラスタリングを行いました。検証コホートの患者もまた、HM_DREAM (n = 18) と LM_DREAM (n = 20 ; 図 2) のサブグループに分類されました。

DREAM クラスタリングのためのサポートベクターマシン分類器構築

サポートベクターマシン (SVM) ^{※7} を用いた機械学習の分類器モデルを構築するために、JMML 関連の HM_DREAM と LM_DREAM のプロファイル間で平均メチル化レベルに明確な差 (>0.3) を示した CpG サイト 84 個を選択しました。発見コホートのサンプルをトレーニングデータセット (n = 59) とテストデータセット (n = 40) に無作為に割り当て、R の e1071 パッケージを使用して最適な分類器が作成されました。SVM を用いて、検証コホートに割り当てられた患者を、高メチル化 (HM_SVM; n=18) または低メチル化 (LM_SVM; n=20) のいずれかに分類したところ、クラスタリング分析の結果と不一致であった症例は、検証コホートの 38 例中 2 例 (5%) のみでした。

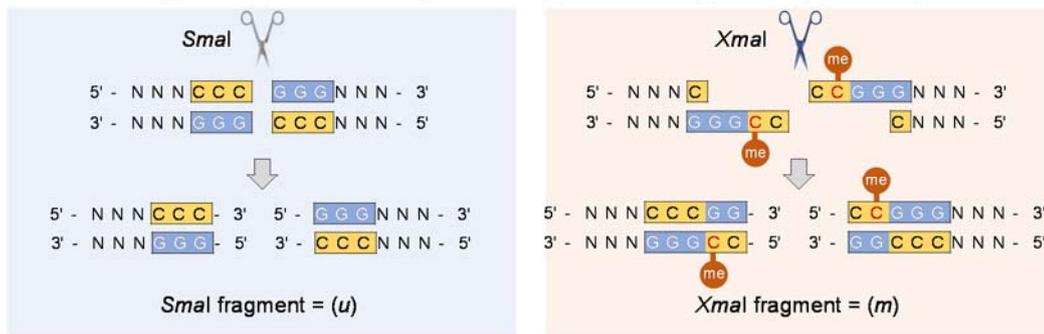
生存解析

全生存率 (overall survival; OS) を Kaplan-Meier 法で推計しました。発見コホートにおいて、5 年 OS は HM_DREAM 群 [41.9% (95%CI : 25.3-57.6%)] が LM_DREAM 群 [71.4% (95%CI : 56.2-82.1%)] よりも有意に不良でした ($P = 3.45 \times 10^{-3}$)。さらに、検証コホートにおいても、HM_SVM 群の 5 年 OS [26.3% (95% CI: 1.9%-64.0%)] が LM_SVM 群 [80.5% (95% CI: 49.1-93.6%)] に比べて有意に不良であることが確認できました ($P = 0.024$) (図 3)。

図 1. Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM)法による DNA メチル化分析の原理の模式図

同じ遺伝子配列 (CCCGGG) を認識するけれども、メチル化されていない DNA のみを切断する「*Sma*I」とメチル化されている DNA をも切断する「*Xma*I」という 2 種類の制限酵素を用いて DNA を順次切断します。*Sma*I で切断された DNA は平滑末端であるのに対し、*Xma*I で切断された DNA は突出末端を形成します。この違いを次世代シーケンサーで判別すると、ゲノム上に理論上約 30 万か所認められる CCCGGG 配列部位の DNA メチル化を網羅的かつ簡単に計測することが可能です。

Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM)



$$\text{Methylation ratio} = (m) / (m + u)$$

図 2. DREAM 法による遺伝子メチル化情報を用いた階層的クラスタリング解析

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) およびヌーナン症候群関連の骨髄増殖性障害 (NS/MPD) 患者 (発見コホート n = 99、検証コホート n = 38) を対象に、Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM) データを用いて、教師なしの階層的クラスタリングを行いました。ヒートマップは、高メチル化 (HM_DREAM) サブグループと低メチル化 (LM_DREAM) サブグループの間で平均メチル化レベルの差が大きい 1,000 個の CpG サイトのメチル化比を表示しています。メチル化率は、青 (メチル化率 0%) から赤 (メチル化率 100%) へと徐々に変化するように色分けされています。各患者について、既知の臨床的および生物学的特徴を示します。

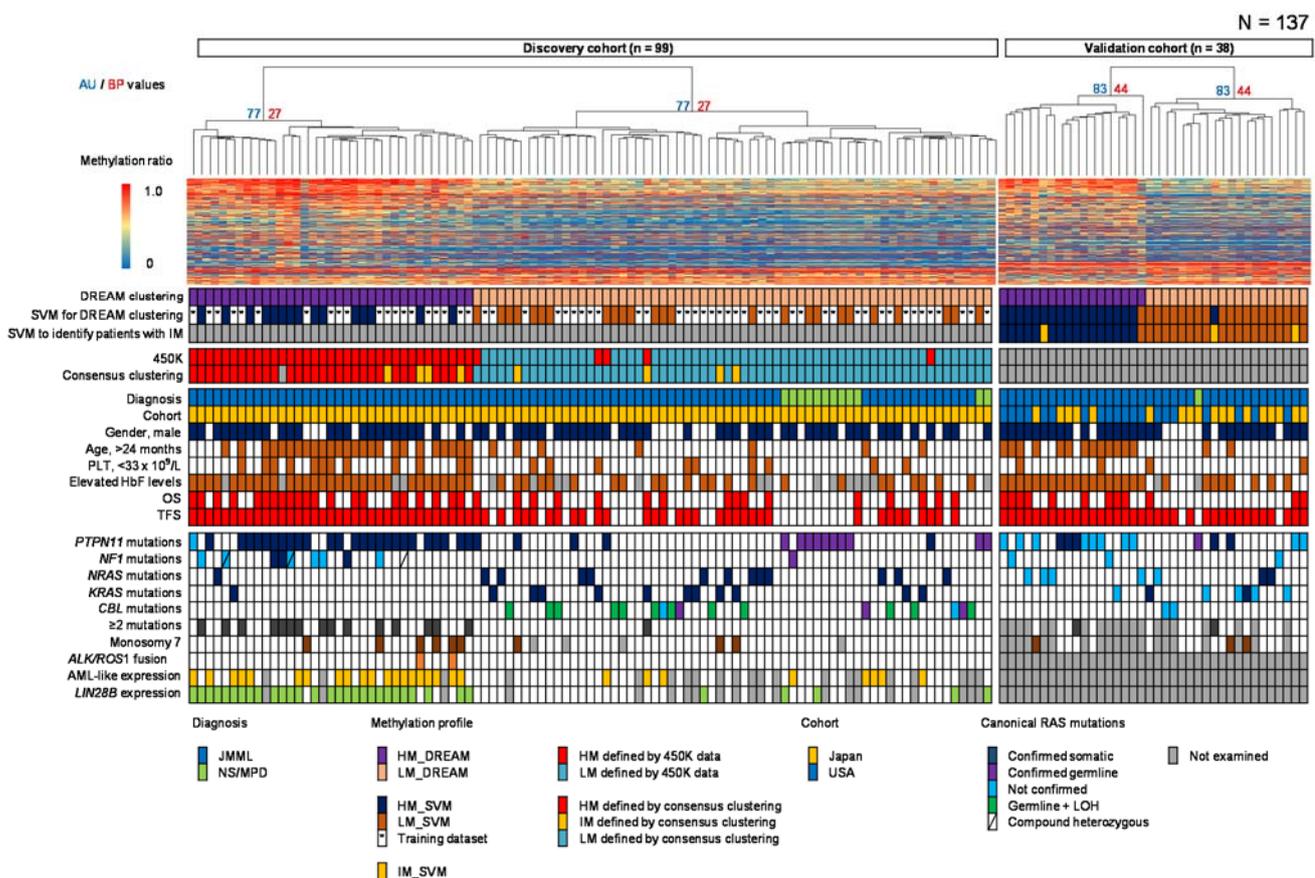
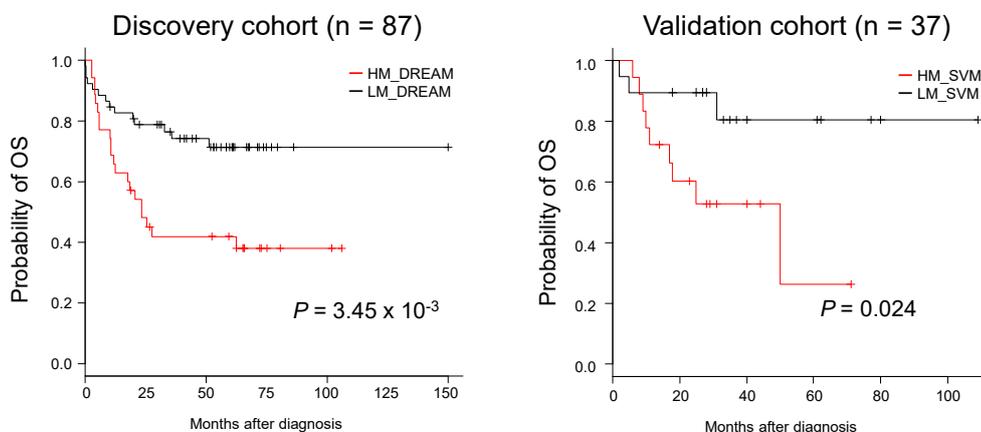


図 3. DREAM データを用いたクラスタリングによる、発見コホートと検証コホートの JMML 患者の全生存期間 (OS)



3. 今後の展開

DREAM 解析を用いて JMML 患者を HM_DREAM と LM_DREAM のサブグループに分類することで、JMML 患者の予後を予測することに成功しました。また、450K プラットフォームを用いた国際分類との明確な再現性が確認されました。この結果は独立した検証コホートでも再現に成功しています。さらに、臨床検査としての利活用を念頭に、サポートベクターマシン (SVM) を用いた機械学習による分類器を構築しました。これにより、1 サンプルごとに安定した判定結果を得ることが可能となりました。

DREAM 解析は定量的で再現性が高く、サンプルごとに検査を行い、タイムリーに結果を得ることが可能です。DREAM 解析を用いたメチル化検査は、前向きな臨床試験における JMML 患者の層別化に利用可能であり、将来的には臨床的な意思決定プロセスに組み込まれることが期待されます。

4. 用語説明

1. DNA メチル化 : DNA 中の塩基の炭素原子にメチル基修飾が付加される化学反応。エピゲノムに関わり複雑な生物の体を正確に形づくるために必須の仕組みであると考えられています。
2. メチル化アレイ : 重要なメチル化領域を網羅的にカバーしたアレイ上の DNA にサンプル DNA を相補させ、配列特異的に定量的に DNA メチル化を評価する方法。
3. 次世代シーケンサー : DNA などの塩基配列を読み取る装置をシーケンサーといいます。「次世代シーケンサー」は従来の「第 1 世代シーケンサー」と対比させて使われる用語。次世代シーケンサーでは従来のものと比べて大量の塩基配列を低コストで迅速に解析することが可能です。
4. クラスタリング解析 : ある集団を似たもの同士にグループ分けする解析方法。
5. エピゲノム : DNA の塩基配列情報をゲノムと呼ぶのに対し、そのゲノムに施された塩基配列以外の情報をエピゲノムと呼びます。遺伝子のはたらきを決める仕組みをエピジェネティクスと呼び、その情報の集まりをエピゲノムと呼びます。
6. プロモーター : 転写 (DNA から RNA を合成する段階) の開始に関与する遺伝子の上流領域。

7. サポートベクターマシン分類器：機械学習モデルの一種で、主に分類のタスクに用いられる方法。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Blood Advances

論文タイトル：A simple and robust methylation test for risk stratification of patients with juvenile myelomonocytic leukemia

著者：Hironobu Kitazawa^{1,2*}, Yusuke Okuno^{3,4*}, Hideki Muramatsu^{1†}, Kosuke Aoki⁵, Norihiro Murakami¹, Manabu Wakamatsu¹, Kyogo Suzuki¹, Kotaro Narita¹, Shinsuke Kataoka¹, Daisuke Ichikawa¹, Motoharu Hamada¹, Rieko Taniguchi¹, Nozomu Kawashima¹, Eri Nishikawa¹, Atsushi Narita¹, Nobuhiro Nishio¹, Asahito Hama², Mignon L. Loh⁶, Elliot Stieglitz⁶, Seiji Kojima¹, and Yoshiyuki Takahashi¹

所属：¹Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

²Department of Hematology and Oncology, Children's Medical Center, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan.

³Medical Genomics Center, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.

⁴Department of Virology, Nagoya City University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

⁵Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

⁶Department of Pediatrics, Benioff Children's Hospital and the Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, USA

DOI : <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005080>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Blo_Adv_210927en.pdf