

Evaluation of clinical formalin-fixed paraffin-embedded tissue quality for targeted-bisulfite sequencing

ターゲットバイサルファイトシーケンシング法のための臨床ホルマリン固定パラフィン包埋組織の品質評価

Hideki Ohmomo¹, Shohei Komaki¹, Kanako Ono¹, Yoichi Sutoh¹, Tsuyoshi Hachiya¹, Eri Arai^{2,3}, Hiroyuki Fujimoto⁴, Teruhiko Yoshida⁵, Yae Kanai^{2,3}, Makoto Sasaki^{1,6}, Atsushi Shimizu^{1*}

大桃 秀樹¹、小巻 翔平¹、小野 加奈子¹、須藤 洋一¹、八谷 剛史¹、新井 恵吏²、藤元 博之³、吉田 輝彦⁴、金井 弥栄²、佐々木 真理^{1,5}、清水 厚志^{1*}

1. 岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構
2. 慶應義塾大学 医学部 病理学教室
3. 国立がん研究センター 中央病院 泌尿器・後腹膜腫瘍科
4. 国立がん研究センター 中央病院 遺伝子診療部門
5. 岩手医科大学 医歯薬総合研究所 超高磁場 MRI 診断・病態研究部門

* Corresponding author

【研究のポイント】

岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 生体情報解析部門の清水厚志教授を中心とした研究チームは、慶應義塾大学 医学部 病理学教室および国立がん研究センターとの共同研究において、4名の腎細胞がん患者から外科手術によっ

て採取されたがん部および非がん部のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を用いて、DNA メチル化解析の1つの手法であるターゲットバイサルファイトシーケンシング法による解析が実施可能であるか検証し、その研究成果について国際科学雑誌 *Pathology International* に、12月18日付（オンライン公開）で発表いたしました。

URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pin.13054>

【概要】

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織は、ホルマリンによる防腐効果およびタンパク質固定効果があるため、免疫組織化学法^{#1} や in situ ハイブリダイゼーション法^{#2} を含む病理学的・組織学的研究において、恒久的な標本保存法として長年使用されています。一方で、FFPE 由来の DNA は一般的に品質が低く、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析、そして今回我々が実施した DNA メチル化解析などのオミックス解析には不向きとされてきました。近年、FFPE 由来の DNA 抽出効率を向上させた試薬キットが市販されるようになり、FFPE サンプルからシーケンシングライブラリー^{#3} を作成することが可能になってきています。

いわて東北メディカル・メガバンク機構（IMM）生体情報解析部門では、生活習慣や食習慣など環境的要因によって遺伝子の発現を変化させる DNA メチル化^{#4} に注目して、環境的要因と疾患発症との関連を調べています。中でも、私たちの目指

す個別化予防実現のために重要な解析ツールの1つであるターゲットバイサルファイトシーケンシング法 (TB-seq) を用いた DNA メチル化の個人差が特に大きい部位 (CDMV, common DNA methylation variation) の解析に注力しています。しかしながら、FFPE 由来の DNA を TB-seq に応用するための基礎的な研究は、これまでほとんど行われていませんでした。

そこで、私たちは腎細胞がん患者の FFPE 由来 DNA と新鮮凍結 (FF) 組織由来 DNA を用いて TB-seq を行い、両者間で DNA やライブラリの品質、TB-seq の統計量を比較して、FFPE 由来 DNA の TB-seq への適性を評価しました (下図、表 1)。

その結果、FFPE 由来 DNA では顕著に断片化が起こっており、1) 作成されたシーケンシングライブラリーの品質が悪いこと、2) さらに、シーケンシングデータの品質も悪いこと、3) 一方で、別の DNA メチル化解析手法であるマイクロアレイ解析では品質の良いデータが得られること (表 2)、が明らかになりました。以上の結果から、現状の TB-seq の実験方法では、FFPE 由来 DNA から高品質なエピゲノム解析データを得ることは難しく、今後、TB-seq の技術的な改善が必要であることが示唆されました。

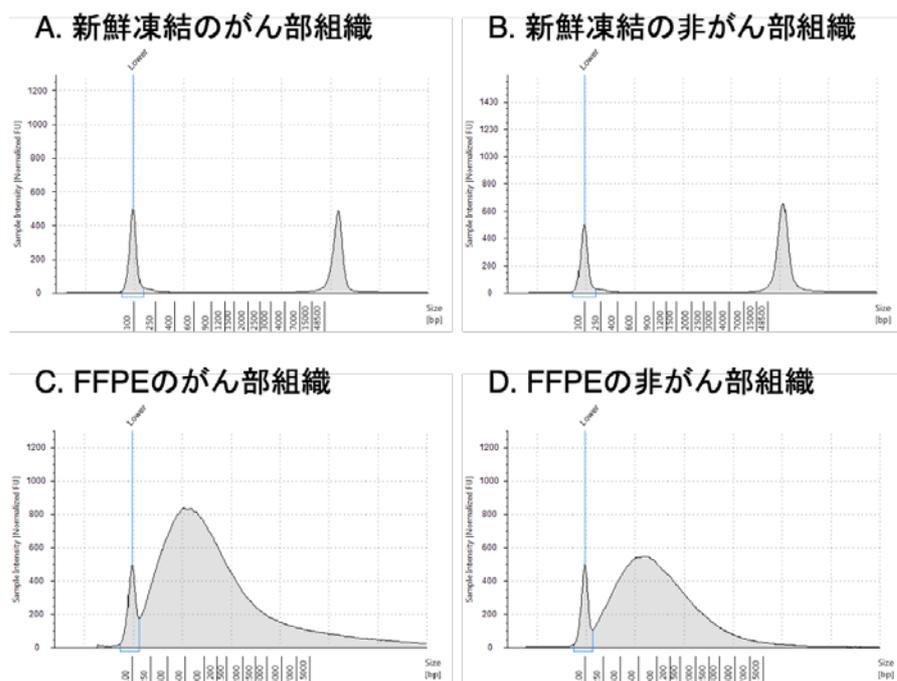


図 1. TapeStation 2200 を用いたゲノム DNA 品質の比較

横軸はゲノム DNA の断片サイズ (bp)、縦軸は蛍光強度により示された DNA 量を表す。

表 1. DNA やライブラリの品質測定値および TB-seq の統計量

品質カテゴリー	新鮮凍結のがん部組織	新鮮凍結の非がん部組織	FFPEのがん部組織	FFPEの非がん部組織
吸光度比・A260/280	1.92 ± 0.07	1.86 ± 0.04	1.87 ± 0.01	1.88 ± 0.01
吸光度比・A260/230	1.73 ± 0.14	2.10 ± 0.18	1.23 ± 0.09	1.05 ± 0.03
DNAのピーク断片長 (bp)	52,586 ± 12,841	60,000<	535 ± 90	554 ± 94
DIN値	9.8 ± 0.2	9.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3
ライブラリー濃度 (ng/μL)	26.9 ± 4.8	15.8 ± 5.9	11.2 ± 0.8	11.7 ± 1.1
ライブラリーのモル濃度 (nM)	71.7 ± 24.2	38.9 ± 21.1	4.4 ± 1.0	5.0 ± 2.2
重複リード数の割合	9.6 ± 2.1	21.0 ± 8.4	64.5 ± 4.4	61.5 ± 2.6
試薬に搭載されたCpGの数	370万ヶ所	370万ヶ所	370万ヶ所	370万ヶ所
1×以上の深度で検出されたCpG部位の数	3,682,842 ± 38,116	3,622,934 ± 51,977	3,040,326 ± 130,104	2,937,087 ± 127,111
6×以上の深度で検出されたCpG部位の数	2,884,711 ± 18,924	2,876,447 ± 26,253	1,611,751 ± 254,405	1,517,406 ± 356,333

表2. HM450 マイクロアレイによる FFPE 組織で検出された CpG 数とその割合

	FFPEの がん部組織	FFPEの 非がん部組織
HM450マイクロアレイに搭載されたCpG数	485,577	485,577
検出されたCpG数 ($p < 0.05$)	476,893 \pm 2,622	474,098 \pm 5,463
検出されたCpGの割合 ($p < 0.05$)	98.2 \pm 0.5	97.6 \pm 1.1
検出されたCpG数 ($p < 0.01$)	464,680 \pm 3,181	464,286 \pm 6,550
検出されたCpGの割合 ($p < 0.01$)	95.7 \pm 0.7	95.6 \pm 1.3

【まとめと展望】

本研究では、FFPE 由来 DNA を用いた TB-seq 解析で十分な品質のデータが得られるか適性を評価しました。その結果、現状の TB-seq プロトコルでは、高品質な DNA メチル化データを得ることは難しく、今後更なる TB-seq の技術的改良が必要であることがわかりました。今後この改良が進むと、FFPE 組織を用いたエピジェネティクス研究を促進することができ、様々な疾患や環境曝露に対する新規 DNA メチル化バイオマーカーの同定に役立つことが期待されます。

【用語解説】

*1. 免疫組織化学法

病理学的検査などで古くからよく用いられる方法。抗原抗体反応を利用して、対象とする抗原物質（タンパク質）の細胞内や組織内の局在を可視化することができる。

*2. in situ ハイブリダイゼーション法

細胞内や組織内における特定の DNA や RNA を検出する方法。がんや先天性異常における遺伝子の増減や、組織・細胞に特異的に発現する遺伝子の状態を明らかにすることができる。

*3. シークエンシングライブラリー

次世代シーケンサーで塩基配列を解読しやすい形に整形された DNA 断片のこと。

*4. DNA メチル化

生活習慣や食習慣など環境的要因によって遺伝子の発現を変化させるエピジェネティックなメカニズムの1つで、DNA 塩基配列を構成する A (アデニン) ・ T (チミン) ・ G (グアニン) ・ C (シトシン) の4つの塩基のうち、主に C 塩基にメチル基 (-CH₃) が結合した状態。近年、喫煙や飲酒などの生活習慣によって C 塩基のメチル化状態に異常を来し、がんや生活習慣病など様々な疾患の発症に関わることが知られている。