

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 新規デバイスによる膵臓がん血液中遊離 DNA の異常メチル化の検出を応用  
した高感度診断法の確立

(英語) Development of a device to diagnose pancreas cancer using aberrant  
DNA methylation in cfDNA

研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学 助教 新城恵子  
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya City University, Assistant Professor, Keiko Shinjo

実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 血液中遊離 DNA の異常 DNA メチル化を利用した膵臓がん診断法の確立  
開発課題名： (英語) Development of a novel method to diagnose pancreas cancer using  
aberrant DNA methylation in cfDNA

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学 助教 新城恵子  
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya City University, Assistant Professor, Keiko Shinjo

分担研究 (日本語) ICON プローブを用いた DNA メチル化解析法の確立  
開発課題名： (英語) Diagnose cancer using aberrant methylation by ICON probe.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 教授 岡本晃充  
所属 役職 氏名： (英語) Research Center for Advanced Science and Technology, The University  
of Tokyo

分担研究 (日本語) ナノデバイスを用いた革新的 DNA メチル化解析法の確立

開発課題名: (英語) DNA methylation analysis via nanodevices.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学大学院工学研究科 助教 安井隆雄

所属 役職 氏名: (英語) Nagoya University, Graduate School of Engineering,  
Assistant Professor, Takao Yasui

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、血液中の微量 DNA メチル化を検出するための新たな検出法の確立を目指す。

### (1) MBD1-デジタル PCR を用いた cfDNA の DNA メチル化解析法の確立

血液中の微量メチル化 DNA を濃縮するために、MBD1 タンパク質を利用し、得られた DNA を高感度なデジタル PCR で検出する方法を確立する。メチル化 DNA の濃縮・収集には我々が共同研究で開発した MBD1 タンパク質を利用して行った。

これまでに 1  $\mu$ g の DNA を用い安定したメチル化 DNA を回収できることは確認していたが、本研究期間内では人工的に作成した 100%メチル化 DNA と 0%メチル化 DNA を使用し、1~100ng の DNA を用いてメチル化 DNA の濃縮を行った。使用する DNA 量が少ない時はキャリアー DNA (サーモン DNA、イースト RNA など) を加えることで安定してメチル化 DNA を回収することが可能であった。現在までに 1ng DNA からのメチル化 DNA の濃縮が可能であることを確認している。濃縮したメチル化 DNA はリアルタイム PCR とデジタル PCR で確認した。膵臓がん検出用のデジタル PCR 用のプライマーセットの条件検討も終了した。

### (2) メチル化検出プローブとナノデバイスを用いた革新的 DNA メチル化解析法の確立

ICON プローブはメチル化シトシンに特異的に結合するプローブである。血液中の微量な異常 DNA メチル化を検出するために、ICON プローブを用いた DNA メチル化高感度解析法を開発することを目標として研究を進めた。

平成 28 年度は ICON プローブ反応用のナノデバイスを用いた基礎的実験を行なった。これまでに ICON プローブは 1 本鎖 DNA との反応効率は良いことを確認している。2 本鎖 DNA との反応効率を向上させるためのナノデバイスの作成を中心に今年度の実験を進めた。様々な直径、長さ、密度で作成されたナノデバイスを用い、DNA の結合をまず確認した。血液中の DNA は 150bp 前後と考えられるため、超音波破碎装置で DNA を切断して使用した。DNA をナノデバイスにアプライし、1~3 時間後に DNA 溶液を回収し、リアルタイム PCR で PCR のサイクル数の差を検出した。ナノデバイス反応後の回収液では PCR の Ct 値が 1-2 サイクル遅れており、ナノデバイスに DNA が結合していることが確認できた。

## 英語概要

In this project, we develop a sensitive method to analyze aberrant DNA methylation of cfDNA to diagnose pancreatic cancer.

### (1) DNA methylation analysis of cfDNA by MBD1-digital PCR

MBD1 protein bind to methylated DNA. We used MBD1 protein which is highly sensitive and specific to precipitate methylated DNA. Control DNA which showed 100 to 0% methylation were used for experiments. We previously found that 1ug of DNA is sufficient for MBD1-methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). Because

concentration of cfDNA is relatively low, we used less DNA from 1ng to 100ng. We could collect methylated DNA from 1ng of DNA although we needed to co-immunoprecipitate with some carrier nucleic acid. We also prepared PCR primers for digital PCR and found the best condition for further experiments.

(2) DNA methylation analysis by ICON probe using nanodevice.

ICON probe binds to methylated cytosine. Our previous data showed that ICON probes bound to single strand DNA efficiently, however, the binding efficiency to double strand DNA was low. In this study, we will develop nanodevice which capture double strand DNA. Then DNA will be denatured into single strand to react with ICON probes. Nanodevices were made with different length and density of nanowire and reacted with DNA aliquot. After incubation for 1 ~ 3 hours, we collected the liquid and performed real time PCR and compare the cycle of PCR before and after incubation. We found that the difference of cycles between these samples, a part of samples was captured by nanowire.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 核酸メチル化・脱メチル化を化学反応を用いて調べる, 口頭, 岡本 晃充, 日本薬学会第 137 年会、仙台、2017/3/25, 国内.
2. Chemical approach to nucleic acid diversity, 口頭, Akimitsu Okamoto, JSPS-NRCT 2017 and IAMPS 33, 2017/3/2, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし