

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) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 先天性インプリント異常症におけるメチル化体外診断薬の実用化と生殖補助医療の関与
(英語) The clinical approach for examination of DNA methylation on the imprinting disorders and associated with ART
- 研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科・教授・有馬隆博
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University School of Medicine・Professor・Takahiro Arima
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究では、遺伝子解析を実施する企業 (G&Gサイエンス、福島) との共同研究を実施し、簡便かつ迅速な世界初ハイスループット DNA メチル化解析診断薬を開発することを目的とする。
平成28年度は下記の事項を行った。

成果：

Luminex 法の品質のバリデーション

①Luminex システムを用いた対象遺伝子のメチル化解析

測定対象における各条件を最適化した Primer、Probe 及び増幅、検出を確認するため、人工的に合成した遺伝子 (メチル化配列対応プラスミド、非メチル化対応プラスミド) を用い、メチル化率を 100、80、60、50、40、20、0% に調整したモデルサンプルにて増幅を行った。その結果、各比率のモデルサンプルが、メチル化対応、非メチル化対応 Probe にて適切に検出されることが確認された。

②バイサルファイト済みの DNA を用いた測定

評価検体 21 例について、①で構築、確認したメチル化測定システムにて評価を行った。解析により、

全例について、メチル化、非メチル化に対応したプローブの両方で蛍光値が確認され、良好に測定されることが示された。

今後：

医薬品医療機器総合機構（PMDA）での対面助言相談の助言に基づき、臨床性能試験を実施する。

英文

The PCR-Luminex method can identify a single base substitution by specific hybridization. Therefore, we investigated whether a combination of these techniques might provide a novel way to analyze DNA methylation.

Results:

(1) Development of PCR-Luminex Methylation Method

- We first evaluated the PCR-Luminex technique by comparing an in vitro methylated plasmid containing the two DMRs versus an unmethylated version. By mixing the plasmid at ratios of 100%, 80%, 60%, 50%, 40%, 20%, and 0, methylated to unmethylated, we calculated a standard curve for the methylation ratio using a regression curve.
- We assessed the methylation status of normal human leukocyte DNA and normal sperm DNA. A “no DNA” sample was used as a control to eliminate background noise, and PCR-Luminex values were then used to calculate the methylation ratio. *H19* and *LIT1* imprinted DMRs by PCR-Luminex were approximately 50% methylated in the somatic cell and fully methylated or unmethylated pattern, as appropriate, in the germ cell.

(2) Validation of PCR-Luminex Method

We compared the values obtained from the PCR-Luminex method to those obtained from the COBRA, and performed a statistical analysis with a Spearman's and Pearson's rank correlation. We found that *H19* and *LIT1* showed a good correlation. Three samples showed under 90% methylation at the DMR in sperm. Similarly, the number of samples showing over 10% methylation at *LIT1* DMRs. We determined the cutoff value of the PCR-Luminex technique. When the value of the PCR-Luminex methylation assay.

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 4 件、国際誌 4 件）

1. 有馬隆博, 宮内尚子, 北村茜, 樋浦仁, 岡江寛明, 千葉初音. 生殖補助医療とインプリンティング異常の予防. *Pharma Medica*. メディカルレビュー社. 2016, 34(4).
2. 有馬隆博, インプリンティング疾患の解析と診断. 産科と婦人科. 診断と治療社. 2016, 84(1).
3. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 千葉初音. ART とエピジェネシス. 生殖補助医療 (ART) - 胚培養の理論と実際. 近代出版. 2017, 293-97.

4. 濱田裕貴, 高橋聡太, 服部裕充, 有馬隆博. 臨床医のための最新産科婦人科. 先端医療シリーズ 48. 先端医療技術研究所. 2017.
5. Okae H, Arima T. DNA methylation dynamics during early human development. Journal of Mammalian Ova Research. 2016, 33:2.
6. Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M, Yaegashi N, Sasaki H, Arima T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. The American Journal of Human Genetics. 2016, 99; 1-11.
7. Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. PLoS One. 2016, 23, 11.
8. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. Scientific Reports. 2017, 7:42336.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Incomplete reprogramming of germline DNA methylation in the human placenta. 口頭. Arima T. IHEC Science Days & Annual Meeting. 2016/9/6. 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 有馬隆博, ヒトから知るエピジェネティクスと進化. 生命誌ジャーナル. JT 生命誌研究館. 2016, 87.

(4) 特許出願

なし