

Rhelixa

Decoding Life, Creating Future

Rhelixa オミクス解析ウェビナー

DNAメチル化アレイ解析サービスのご紹介

©2021 Rhelixa, Inc. All Rights Reserved.

株式会社レリクサのDNAメチル化解析サービスについてご紹介いたします。

Rhelixa

多様なバイオインフォマティクスニーズに応える

次世代シーケンス・
データ解析受託サービス低価格・高品質
シーケンススピーディな
図版付き
基本解析オーダーメイド
の高次比較解析

研究員による技術相談、カスタムメイド解析対応

研究員による実験デザイン提案も含めた事前の技術相談が可能
経験とノウハウを組織知として蓄積しアフターサポート体制も万全

シーケンシング費用は業界最安レベルで提供

実験（データ取得）部分はIllumina社認証済みかつ価格競争力のある
シーケンシングプロバイダー複数社と提携により低価格・高品質を実現

当社では次世代シーケンスの受託解析サービスを行っております。当社の受託サービスでは、シーケンスデータの取得だけでなく、専門の解析チームが生命科学研究のあらゆる場面を最適化するソリューションを提供します。研究プロジェクトの目的や予算、期間に応じて最適なプランをご提案し、お客様の研究開発を支援します。

今回は、レリクサが強みとしているエピゲノム分野、中でもDNAメチル化解析サービスについてご紹介いたします。

DNAメチル化解析の用途

Rhelixa

Decoding Life, Creating Future

用途	
バイオマーカー探索	制御機序の解明
✓ 薬剤応答性	✓ がんや慢性疾患の悪性化メカニズム
✓ 疾患の有無、またはその発症リスク	✓ 免疫状態の維持・変化
✓ エピジェネティック年齢	✓ 発生・細胞分化の制御メカニズム

メリット	
バイオマーカー探索	制御機序の解明
✓ 分子の安定性が高く、得られる結果の再現性、ロバストネスが高い。	✓ 抑制機序のメカニズムを解明する上で重要な要素となる。
✓ 抽出及び保管が容易である。	✓ 環境・時間依存的に変化を蓄積していく系の場合、状態の維持・変化を説明する上で主要な役割を果たす分子となる。

©2021 Rhelixa, Inc. All Rights Reserved.

3

DNAメチル化解析の目的は、大きく2つに分かれます。一つはバイオマーカー探索、そしてエピゲノム制御機構の解明です。

バイオマーカー探索では、薬剤応答性、がんや感染症その他疾患の有無またはその発症リスクの判別、エピジェネティック年齢など、応用的な活用がなされます。エピゲノム制御機構の解明は、具体的なメカニズムを解き明かしていく基礎的な研究に用いられます。がんや慢性疾患の悪性化のメカニズム、免疫状態の維持・変化機構、発生・細胞分化の制御機構の解明といった研究に活用されます。

様々なアプリケーションがある中で、DNAメチル化解析のメリットをご説明します。

バイオマーカー探索では、安定性が高く、得られる結果の再現性やロバストネスが高いことが挙げられます。また、必要なサンプルはDNAとなるので、生体サンプルからの抽出や保管が容易です。

制御機序の解明では、抑制のメカニズムを解明する上でDNAメチル化が重要な要素となることが広く知られていることがあります。また、環境・時間依存的に変化を蓄積していく系の場合、状態の維持・変化を説明する上で主要な役割を果たす分子となっていることもあげられます。

Rhelixa
Decoding Life, Creating Future



4

お客様の研究内容について研究員を交えた面談を行い、どのような内容で進めていくかを議論してからサービスを開始いたします。準備して頂いたサンプルをお預かりし、QC、バイサルファイト処理を行い、データを取得します。データ取得でどのアプリケーションを用いるか、シーケンサーなのかアレイなのかの決定は、研究員との議論の際に行います。

DNAメチル化解析においては様々な解析アルゴリズムが存在していますが、服部先生にご紹介いただいたマコンも、まさにそのようなシステムです。現在、国立がん研究センター牛島 俊和先生のグループで開発されたマコンは、現在レリクサが委託をうけて管理と機能改善を行っています。マコンを用いることで、解析対象とするメチル化領域のフィルタリングやアノテーションの付与を簡単に行うことができます。ただし、マコンで解析を行う前にデータのクオリティコントロール、標準化、補正、バッチイフェクトの除去を行う必要があります。これらの処理を行った後に、比較解析、機能解析につなげていきます。

■ サンプル受入要件

抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) キット
またはそれに準じるものの使用をおすすめします。
下記の要件を満たす状態に調製してください。
測定は必ずRNase処理を実施後に行ってください。

	WGBS	RRBS	DNAメチル化アレイ
総量	200ng以上	2μg以上	1.5μg以上
液量	20μL以上	30μL以上	15μL以上
濃度	10ng/μL以上	30ng/μL以上	20ng/μL以上
純度	OD260/280≥1.8 OD260/230≥1.0	OD260/280≥1.8 OD260/230≥1.0	OD260/280≥1.8-2.0
サイズ	—	—	10kbp以上

<重要:サンプル品質についての注意事項>

サンプル品質が十分でない場合、解析の中断・納期の遅延などの可能性があります。各項目をよくお読みいただき、十分に注意してサンプル調製を行っていただくようお願いいたします。

- 基準に満たない(DNA濃度が薄い)場合はエタノール沈殿などで濃縮してお送りください。
- RNAの残留があると解析に影響を及ぼす場合がありますので、**必ずRNase処理を行ってください。**
- DNAメチル化アレイ用の場合、1%アガロースゲルで泳動し、10kbp以上の大きな分子が見られること、2kbp以下のスメアが見られないことを確認してください。
- 比較するサンプルは必ず同じ方法で調製してください。
- タンパク質や有機溶媒等が混入しないようお願いいたします。
- サンプルは**Nuclease free water**または**Tris-HCl buffer**や**TE (0.1x TE) buffer**への溶解を推奨しております。
- 品質にばらつきのある可能性があるため、**ラボで調製されたDEPC水は推奨しておりません。**
- 電気泳動またはBioAnalyzer/Tapestationでの測定により、サンプルの分解がないことと、RNAの混入がないことをご確認いただくことを推奨いたします。
- QC後受入基準値に満たない場合は、サンプルの再送付や再精製、RNase処理(有償)をご提案する場合があります。
- QCが3回以上になる場合は追加料金が発生することがあります。
- 純度・分解度については、シーケンス前にクオリティチェックを行い、結果をご報告いたします。クオリティが要件を満たさない場合には、再度サンプルのご送付をお願いする場合があります。

シーケンス取得データ量

- ✓ WGBS、RRBSでは、データ量の指定が可能
- ✓ 生物種による

対応生物種

- ✓ WGBS：制限なし
- ✓ RRBS：限られている
- ✓ DNAメチル化アレイ：ヒト・マウスのみ

ご不明点は、面談時に承ります。

[ポイント]

目的の変化に関与するメチル化領域とその変動を同定する。

[データ間の差を生み出す要素]

1. テクニカルエラー（アウトライアー、不良データ等）
2. 実験者や測定機器の違いにより生じるテクニカルバイアス（batch effect）
3. 目的としていない生物学的な変化
4. 目的とする生物学的な変化

1を除き、2を軽減し、3と4を区別し、4を評価する。

データ解析におけるポイントは、研究目的の変化に関与するメチル化領域とその変動を発見することにあります。

新しい発見を導くためには、サンプル間の差を生み出す要素は何であるかを的確に判断することにあります。差を生み出す要素は、4種類あります。実験の不具合などによるテクニカルエラー、そして実験者や装置、解析バッチの違いによるテクニカルバイアスがあります。また、生物学的な差としては、研究の目的となる差だけではなく、サンプル固有の差異が存在している場合があります。

従って、解析のプロセスは、テクニカルエラーを取り除き、テクニカルバイアスを軽減し、生物学的な変化が目的としないものなのか目的とするものなのかを区別し、目的とする生物学的変化を評価するという流れになります。

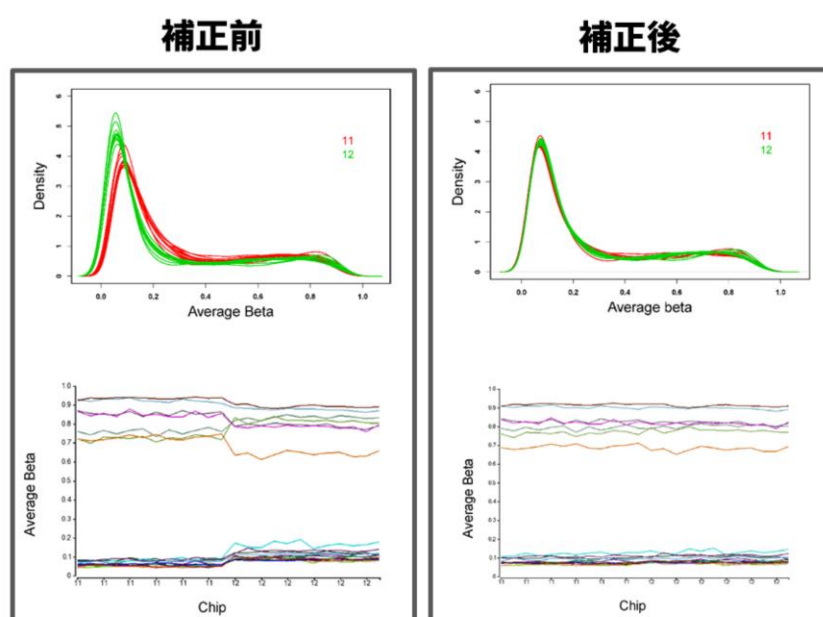


図) アレイの違いによるDNAメチル化分布の差異と補正による変化
上: 前CpGサイトのメチル化分布 下: 20領域のメチル化率
Sun et al., 2011

データQC（メチル化率の分布、メチル化パターンに基づくクラスタリング）により、テクニカルエラーを含むデータとエラーの程度を評価する。

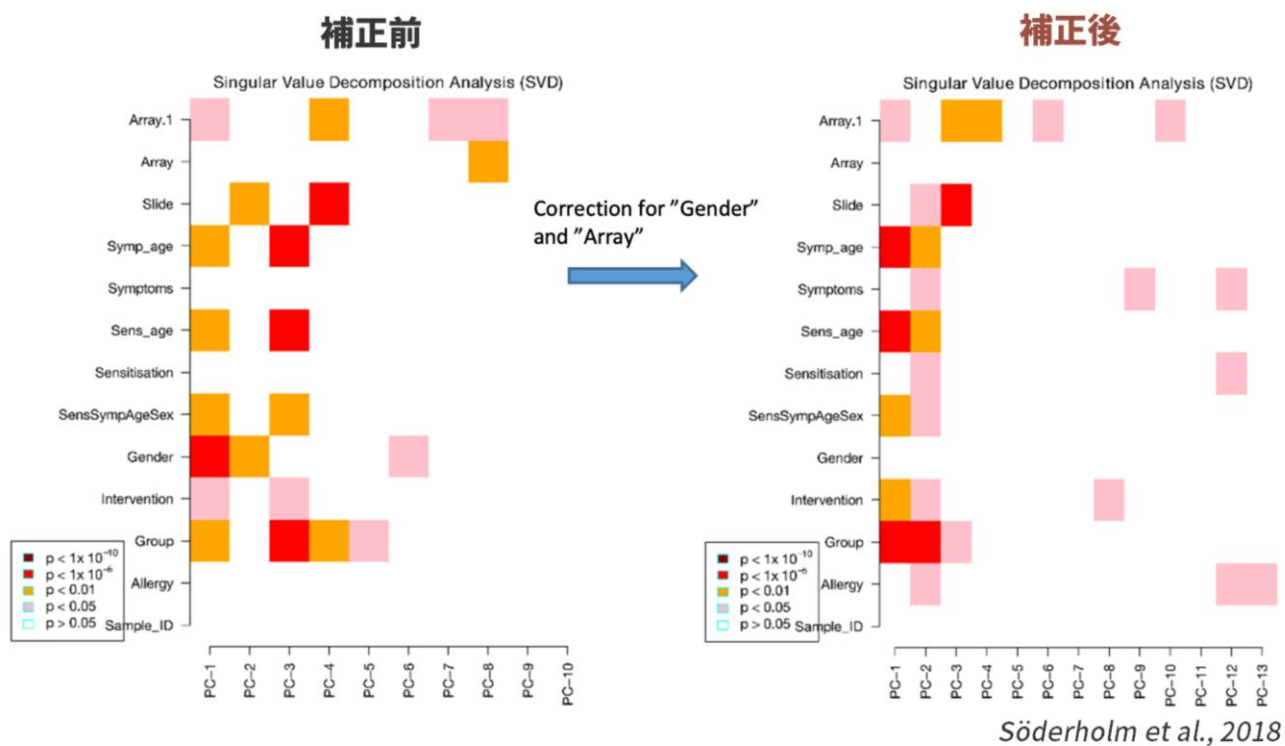
※解析の都合により除くことはNG。サンプル取得・調製の背景と合わせて処置を検討する。

次に、テクニカルバイアスを軽減する。

データのクオリティチェックは、重要な前処理です。サンプル間、群間、実験間で差が出てくることがあるため、調整が必要になります。メチル化率の分布やメチル化のパターンに基づくクラスタリングで、アウトライヤーや不良サンプルを含むテクニカルエラーを評価します。

その際、適切な理由なくデータを取り除かないように注意する必要があります。サンプル採取や調製の背景と合わせて考察し、解析から除くことに妥当性がある場合に解析から除きます。

次にテクニカルバイアスの軽減です。例えば、使用するチップの違いによりDNAメチル化の分布が異なる場合があります。アレイのロットの違いや、実験機器の違いなどによりデータの傾向が異なることを、バッチエフェクトといいます。バッチエフェクトの補正を行うことで、各サンプルを同等の比較できるようにします。図に、アレイの違いによるDNAメチル化分布の差異と補正による変化を示しました。バッチエフェクトを補正することで、同等の比較をしやすくなっています。



生物学的な差異の中にも、目的の現象とは関連性の低い要素も存在する。それらよ要素を軽減することで、より目的の現象に関連性のある要素に注目することができる。

テクニカルエラーを取り除き、バイアスを軽減したあとも、生物学的な差異の中に目的としている現象と関連性の低い要素が存在します。それらを取り除くことで、より目的の現象に関連性のあるDNAメチル化の変化を抽出することができます。

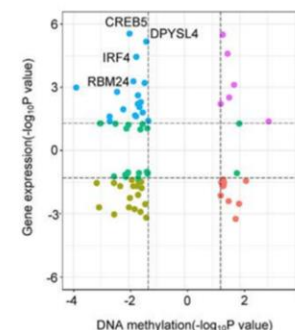
わかりやすい例で、性別の要素があります。男性と女性それぞれに固有のメチル化領域の変化があります。先程のバッチエフェクトの補正と同様な処理を行い、目的とする変化を注目することができるようになります。

1. データベースとの照合

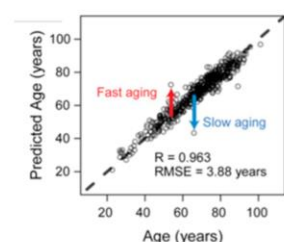
特定のゲノム領域のメチル化がどのようなフェノタイプと相関があるかの情報をまとめたデータベースや論文がある。それらと比較することでメチル化変動の生物学的な意義を予測する。



<https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/atlas>



Yu. et al., 2018



Hannum et al., 2013

3. 回帰分析

病気の程度、バイタル等のデータと回帰を行い、状態変化に相関するメチル化変化を予測する。近年、メチル化パターンに基づき、エピジェネティック年齢（生物学的年齢）を予測するエピジェネティッククロックという概念が注目されている。

データQC、標準化・補正・バッチイフェクト除去を適正に行ったあと、2群あるいは多群間で差異のあるメチル化領域を抽出します。その後の解析は目的に応じていくつかのパターンがあります。代表的なものとして3つの解析をご紹介します。

まず、データベースとの照合です。例えば、解析の結果、変化のあるメチル化領域を見出したときに、それはどのようなフェノタイプと相関があるか、また、既知の関連するフェノタイプがあるか推定したいという目的があったとします。そのようなフェノタイプとメチル化の変化の関連性をまとめたデータベースや論文との比較を行っていきます。

次に、トランスクリプトームデータとの統合解析です。全ゲノムでDNAメチル化の変動領域を抽出すると、非常に多くの領域が検出されることがあります。発現変動遺伝子とメチル化変動領域の比較を行うことにより、フェノタイプと関連する可能性のある遺伝子群から、その発現を制御する可能性あるメチル化変動領域を絞り込むことができます。

最後に、回帰分析も代表的な解析です。病気の程度やバイタルデータなどのメタデータと、メチル化データを組み合わせて回帰分析を行い、定量的にメタデータと関連性のあるメチル化変動領域を絞り込んでいきます。

DNAメチル化解析は、

- マーカーの予測
- エピゲノム制御機序の解明

を行うアプリケーションとして近年注目されている。

有用なマーカー、機序の解明に繋がる変化を導き出す上で、
複数の段階に分けて結果を検討する必要があり、また結果に
応じて必要が対応が異なる。

まとめです。

DNAメチル化の解析は、バイオマーカーの探索、エピゲノム制御機構の解明に用いられるアプリケーションとして注目されています。これらの研究において成果を導き出すためには複数の段階に分けて結果を考察することが重要で、結果に応じてその後どのような解析を行っていくか検討していく必要があります。レリクサのサービスでは、お客様とともに事前ヒアリング、方針の定義を実施し、データが得られる中で解釈のサポートや解析のフィードバックを行い、最終的に目的とされる結果の抽出、解釈を一貫して行っております。

ご視聴ありがとうございました。
ご質問、お問い合わせは、下記までお寄せください。
株式会社Rhelixa（レリクサ）
Tel : 03-6240-9330
Email : customer-service@rhelixa.com

ご視聴ありがとうございました。本ウェビナー、またはサービスに関するご質問、お問い合わせは、メール、電話にて承っております。

Rhelixa

Decoding Life, Creating Future