

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-535017
(P2019-535017A)

(43) 公表日 令和1年12月5日(2019.12.5)

| | | |
|--------------------------------------|--------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 Z NAM | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 (2018.01) | C 1 2 Q 1/68 | |
| C 1 2 Q 1/6869 (2018.01) | C 1 2 Q 1/6869 Z | |
| C 1 2 Q 1/6886 (2018.01) | C 1 2 Q 1/6886 Z | |
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N 15/113 Z | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2019-518463 (P2019-518463)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月5日 (2017.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月3日 (2019.6.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/055376
 (87) 国際公開番号 W02018/067840
 (87) 国際公開日 平成30年4月12日 (2018.4.12)
 (31) 優先権主張番号 62/405,155
 (32) 優先日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 501335771
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ
 テイ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2
 1 8 バルティモアーノース・チャールズ
 ・ストリート 3 4 0 0
 (71) 出願人 500213834
 メモリアル スローン ケタリング キヤ
 ンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6
 5, ニューヨーク, ヨーク アベニ
 ー 1 2 7 5

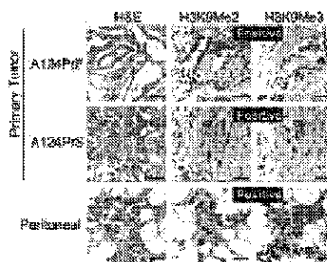
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラージスケールエピゲノムのリプログラミングは、肺癌進行の進展中の同化グルコース代謝を遠位転移に結びつける

(57) 【要約】

本発明は、癌、例えばPDACを有する対象由来のDNAを含有する試料中の大型組織化ヘテロクロマチンリジン(K)-9修飾ドメイン(LOCK)および大型DNA低メチル化ブロックを検出することを含む、エピジェネティックリプログラミングのための標的の同定方法に関する。本発明はまた、原発腫瘍における転移傾向を同定するための差次的に発現される遺伝子の使用を提供し、遺伝子は、本明細書の表中の遺伝子、酸化ストレス遺伝子、EMT遺伝子、免疫学的応答遺伝子、DNA修復遺伝子、グルコース代謝遺伝子、oxPPP遺伝子、およびPGD遺伝子から選択される。さらに、本発明は、作用物質または化合物と接触する前後に対象からの試料を分析すること、およびエピゲノム変化に対する作用物質または化合物の効果を測定することを含む、oxPPPの阻害を含むエピゲノム変化に影響を及ぼすための作用物質または化合物を同定するための方法を提供する。

FIGURES 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エピジェネティックリプログラミングのための標的の同定方法であって、
癌を有する対象由来のDNAを含有する試料中の大型組織化ヘテロクロマチンリジン（K）-9修飾ドメイン（LOCK）および大型DNA低メチル化ブロックを検出することを
含む、方法。

【請求項 2】

前記試料は固形腫瘍由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象は、PDACを有する、または、PDACおよび/もしくはその転移を有する
危険性がある、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記検出は、H3K9Me2/3および/またはH4K20Me3の分析を含む、請求
項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出は、H3K27Acおよび/またはH3K9Acの分析を含む、請求項 1 に記
載の方法。

【請求項 6】

前記検出は、ウエスタンブロッティングによる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出は、H3K9Me2/3および/またはH4K20Me3に対する抗体につい
てのChIPによるものであり、任意にその後に配列決定が続く、請求項 1 に記載の方法
。

20

【請求項 8】

前記検出は、H3K27Acおよび/またはH3K9Acに対する抗体についてのCh
IPによるものであり、任意にその後に配列決定が続く、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出は、全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定によるものである、請求項 1 に記載の方法
。

【請求項 10】

遺伝子発現分析をさらに含む、請求項 2 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 11】

転移についてのドライバー変異が存在しない、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の
方法。

【請求項 12】

ユークロマチンアイランドおよび/またはユークロマチンLOCKの分析をさらに含む
、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 13】

DNA試料中のユークロマチンドメイン（ECD）ECDの変化を同定する方法であっ
て、

治療計画の前後でのECDの分析を含み、治療計画に対する応答性の予後または分析を
提供する、方法。

40

【請求項 14】

DNA試料中のLOCKの変化を同定する方法であって、

治療計画の前後でのLOCKの分析を含み、治療計画に対する応答性の予後または分析
を提供する、方法。

【請求項 15】

前記分析がコンピナトリアル法によるものである、請求項 13 または 14 に記載の方法
。

【請求項 16】

50

原発腫瘍における転移傾向を同定するための、差次的に発現される遺伝子の使用であって、

該遺伝子は、本明細書の表中の遺伝子、酸化ストレス遺伝子、EMT遺伝子、免疫学的応答遺伝子、DNA修復遺伝子、グルコース代謝遺伝子、oxPPP遺伝子、およびPGD遺伝子から選択される、使用。

【請求項17】

oxPPP阻害を含むエピゲノム変化を逆転させるかまたはそれに影響を及ぼすための方法。

【請求項18】

PGDRNAiを含むエピゲノム変化を逆転させるかまたはそれに影響を及ぼすための方法。

10

【請求項19】

6ANを含むエピゲノム変化を逆転させるかまたはそれに影響を及ぼすための方法。

【請求項20】

エピゲノム変化に影響を与える作用物質または化合物を同定するための方法であって、作用物質または化合物と接触させる前後に、請求項1に記載の対象由来の試料を分析し、oxPPPの阻害を含むエピゲノム変化に対する作用物質または化合物の効果を測定することを含む、方法。

【請求項21】

前記方法が、腫瘍球アッセイ、マトリゲルアッセイ、器官型間質への細胞の注入からなる群から選択される方法を含む、請求項17～19のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項22】

それを必要とする対象を治療するのに使用するための、請求項20に記載の方法によって同定された作用物質または化合物。

【請求項23】

前記対象が癌を患っている、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

前記対象がPDACを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項25】

前記使用が転移治療および/または予防のためのものである、請求項20に記載の方法。

30

【請求項26】

前記作用物質または化合物が、化学療法または放射線療法または他の治療計画による治療の前に、それと同時に、またはその後、投与される、請求項20に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国の35U.S.C. § 119(e)の下で、2016年10月6日に出願された米国第62/405,155号の優先権の利益を主張し、その全体内容が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

配列表の組み込み

添付の配列表の材料は、参照により本出願に組み込まれる。付随する配列表のテキストファイル、ファイル名JHU4080_1WO_1WO_Sequence_Listingは、2017年10月4日に作成され、9kbである。ファイルは、Windows OSを使用しているコンピュータでMicrosoft Wordを使用して評価できる。

【0003】

政府サポートの記述

本研究は、NIH助成金CA38548(APF)、国立衛生研究所助成金CA140

50

599、CA179991(CID)、AACR膵臓癌アクションネットワーク指導者助成金助成金(OGM)、VanderbiltGISPORE(OGM)、アメリカ癌協会からバンダービルト-イングラム癌センター(OGM)およびCA180682(AMM)からの助成金によって支援された。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

発明の分野

本発明は、概して遺伝子分析に関し、より具体的には癌および癌の進行および転移に対する後成的影響に関する。

【0005】

背景情報

膵管腺癌(PDAC)の進行の進展中に、原発性腫瘍の増殖、領域の広がり、遠位転移、および患者の死亡を促進する不均一なサブクローン集団が出現する。しかしながら、転移の遺伝学は未治療の患者における原発腫瘍のそれを大部分反映しており、そしてPDACドライバー突然変異は全てのサブクローンによって共有されている。このことは、エピジェネティックな過程が転移の間に機能的であるかもしれないという可能性を高める。ここで我々は、遠位転移の自然な進化の歴史の間に全体的なクロマチン修飾の著しいエピジェネティックなリプログラミングを検出した。ゲノムワイドマッピングは、これらの全体的な変化が、ユークロマチンおよび大型組織化クロマチンK9修飾(LOCK)ヘテロクロマチンを含む悪性形質を集合的に特定する、ゲノム全体にわたる何千もの大クロマチンドメインを標的とすることを明らかにした。これらの変化と並行して、遠位転移はペントースリン酸経路(oxPPP)の酸化的分岐への依存を共進化させ、oxPPP阻害は再プログラムされたクロマチンを選択的に逆転させ、腫瘍形成能を遮断した。このように、多様な代謝、エピジェネティック、および腫瘍形成プログラムが膵臓癌進行の進展の間に出現した。

【0006】

ほとんどのヒトの癌の生存率の著しい進歩にもかかわらず、PDACは8%の生存率でほぼ普遍的に致死的なままである。事実、PDACは2020年までに西欧諸国における癌による死亡の第2位の原因となると予測されている。原発性PDACは、異なるサブクローン集団を含むことが示されている。しかしながら、これらのサブクローンは同一のドライバー突然変異を共有し、そして転移の遺伝的性質は原発腫瘍のそれを大部分反映する。さらに、サブクローンは、そのユニークなプログレッサー変異によって遺伝的に定義されているが、そのすべてがパッセンジャー事象であるとは限らないにしても大多数である。このことは、疾患の進展の自然なヒストリーにおいて、どのメカニズムが進行および転移を促進するのかについて疑問を投げかける。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

一つの前転移候補はエピゲノム制御である。特に、本発明者らは、特に大型組織化ヘテロクロマチンリジン(K)-9修飾ドメイン(LOCK)および大型DNA低メチル化ブロックを含むヘテロクロマチンドメイン内の、PDACサブクローン進展および遠位転移中の大規模エピゲノム変化の役割を調査したかった。これらの領域は、ゲノムの半分以上を占め、互いに部分的に重複し、そしてPDACを含む多くのヒトの癌においてみられるため、大規模エピジェネティックリプログラミングのための選択可能な標的を表し得る。したがって、これらの領域内のエピゲノム異常調節が腫瘍進行の主要な選択的な力となり得ることが仮定され、一貫した転移特異的ドライバー変異の欠如を付与した。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、癌を有する対象からのDNAを含有する試料中の大型組織化ヘテロクロマチンリジン(K)-9修飾ドメイン(LOCK)および大型DNA低メチル化ブロックを検

10

20

30

40

50

出することを含む、エピジェネティックリプログラミングのための標的の同定方法に関する。例えば、この方法は、P D A Cおよび/またはその転移を有するかまたは有する危険性がある対象に適用される。一態様では、検出は、H 3 K 9 M e 2 / 3および/またはH 4 K 2 0 M e 3の分析を含む。他の態様では、検出は、H 3 K 2 7 A cおよび/またはH 3 K 9 A cの分析を含む。

【 0 0 0 9 】

別の実施形態において、本発明は、原発腫瘍における転移傾向を同定するための差次的に発現される遺伝子の使用を提供し、ここで遺伝子は本明細書の表中の遺伝子、酸化ストレス遺伝子、E M T 遺伝子、免疫学的応答遺伝子、D N A 修復遺伝子、グルコース代謝遺伝子、o x P P P 遺伝子、およびP G D 遺伝子から選択される。別の実施形態では、本発明は、o x P P P の阻害を含むエピゲノム変化に影響を与える作用物質（薬剤）または化合物を同定する方法であって、作用物質または化合物と接触する前後に対象からの試料を分析し、エピゲノム変化に対する作用物質または化合物の効果を測定することを含む方法を提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 図 1 a ~ e は、遠位転移の進展中の全体的なエピジェネティックリプログラミングに関する。図 1 a は一連の免疫組織化学的染色である。図 1 b は一連の免疫組織化学的染色である。図 1 c は一連の免疫組織化学的染色である。図 1 d は一連の免疫組織化学的染色である。図 1 e は一連の免疫組織化学的染色である。図 1 f は一連のウエスタンブロット画像である。図 1 g は一連のグラフ表示データである。

【 図 2 】 図 2 a ~ 2 d は、P D A C サブクローン進化の間のクロマチドメインのエピゲノムリプログラミングに関する。図 2 a はデータのグラフ表示である。図 2 b はデータのグラフ表示である。図 2 c はデータのグラフ表示である。図 2 d はデータのグラフ表示である。図 2 e はデータのグラフ表示である。

【 図 3 】 図 3 a ~ g は、多様な悪性特性をコードする再プログラムされたクロマチドメインに関する。図 3 a はデータのグラフ表示である。図 3 b は一連のウエスタンブロット画像である。図 3 c はデータのグラフ表示である。図 3 d は一連のウエスタンブロット画像である。図 3 e は一連のウエスタンブロット画像である。図 3 f はデータのグラフ表示である。図 3 g は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。

【 図 4 】 図 4 a ~ 4 f は、遠位転移性サブクローンにおける高活性グルコース代謝および6 P G 枯渇に関する。図 4 a はデータのグラフ表示である。図 4 b はデータのグラフ表示である。図 4 c はデータのグラフ表示である。図 4 d は概略図である。図 4 e は一連のデータのグラフ表示である。図 4 f はデータのグラフ表示である。

【 図 5 】 図 5 a ~ 5 d は、遠位転移性サブクローンにおけるP G D 依存性に関する。図 5 a は一連のウエスタンブロット画像である。図 5 b は一連のウエスタンブロット画像である。図 5 c は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。

【 図 6 】 図 6 a ~ 6 f は、再プログラムされたクロマチン、腫瘍形成能、および悪性遺伝子発現プログラムの6 A N による逆転に関する。図 6 a はデータの一連のグラフ表示である。図 6 b はデータの一連のグラフ表示である。図 6 c は、腫瘍形成アッセイおよび関連のグラフプロットの一連の画像である。図 6 d は一連の画像および関連するグラフプロットである。図 6 e は一連のグラフプロットである。図 6 f は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。

【 図 7 】 図 7 a ~ 7 b は、遠位転移サブクローンにわたる再プログラムされたクロマチンに関する。図 7 a は一連のウエスタンブロット画像である。図 7 b は一連のウエスタンブロット画像である。

【 図 8 】 図 8 a ~ 8 e は、再プログラムされたヒストン修飾の特異性に関する。図 8 a は一連の免疫組織化学的染色である。図 8 b はデータのグラフ表示である。図 8 c は表である。図 8 d は一連のウエスタンブロット画像である。図 8 e は一連のウエスタンブロット

10

20

30

40

50

画像である。

【図 9】図 9 は、LOCK 内のヘテロクロマチン修飾の濃縮に関する一連のグラフプロットである。

【図 10】図 10 a ~ 10 b は、PDAC サブクローン進展の間の LOCK 中の H3K9Me3 のリプログラミングに関する。図 10 a はデータのグラフ表示である。図 10 b はデータのグラフ表示である。

【図 11】図 11 a ~ 11 b は、LOCK 内の DE 遺伝子座の局所的リプログラミングに関する。図 11 a はデータの一連のグラフ表示である。図 11 b はデータの一連のグラフ表示である。

【図 12】図 12 は、ECD 内のユークロマチン修飾の濃縮に関する一連のグラフプロットである。

【図 13】図 13 a ~ 13 e は、PDAC 進展中の大型 LOCK のリプログラミングに関する。図 13 a はデータのグラフ表示である。図 13 b はデータのグラフ表示である。図 13 c はデータのグラフ表示である。図 13 d はデータのグラフ表示である。図 13 e はデータのグラフ表示である。

【図 14】図 14 a ~ 14 f は、A38 サブクローン間の悪性異質性に関する。図 14 a はデータのグラフ表示である。図 14 b は一連のデータのグラフ表示である。図 14 c は一連の免疫組織化学的染色である。図 14 d は一連の免疫組織化学的染色である。図 14 e は一連のウエスタンプロット画像である。図 14 f は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。

【図 15】図 15 a ~ 15 c は、大型ロックおよび ECD を標的とした再編成に関する。図 15 a はデータの一連のグラフ表示である。図 15 b はデータの一連のグラフ表示である。図 15 c はデータの一連のグラフ表示である。

【図 16】図 16 a ~ 16 b は、遠位転移にわたる 6PG レベルの枯渇によるグルコース代謝の増強に関する。図 16 a はデータの一連のグラフ表示である。図 16 b はデータの一連のグラフ表示である。

【図 17】図 17 a ~ 17 c は、グルコース代謝の 6AN 標的化および PPP の PGD 工程に関する。図 17 a はデータの一連のグラフ表示である。図 17 b はデータの一連のグラフ表示である。図 17 c はデータの一連のグラフ表示である。

【図 18】図 18 a ~ 18 c は、遠位転移サブクローンの再プログラムされたクロマチン状態の 6AN 選択的調節に関する。図 18 a は一連のウエスタンプロット画像である。図 18 b は一連のウエスタンプロット画像である。図 18 c は一連のウエスタンプロット画像である。

【図 19】図 19 a ~ 19 d は、LOCK - EI 領域における 6AN 調節遺伝子発現に関する。図 19 a はデータの一連のグラフ表示である。図 19 b はデータの一連のグラフ表示である。図 19 c はデータの一連のグラフ表示である。図 19 d はデータの一連のグラフ表示である。

【図 20】図 20 a ~ 20 c は、遠位転移サブクローンにおける 6AN 選択的遮断腫瘍形成に関する。図 20 a は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。図 20 b は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。図 20 c は、腫瘍形成アッセイおよび関連するグラフプロットの一連の画像である。

【図 21】図 21 a ~ 21 c は、6AN に応答した TOP2B 遺伝子座のリプログラミングに関する。図 21 a はデータの一連のグラフ表示である。図 21 b はデータの一連のグラフ表示である。図 21 c はデータの一連のグラフ表示である。

【図 22】図 22 は、表現型可塑性の増加を可能にする、本明細書に記載の大規模ヘテロクロマチン領域の喪失と遺伝子発現の変動性の増加とを直接結び付けるデータを示すスクリーンショットである。一例は、ERK シグナル伝達ならびに腫瘍浸潤および転移に關する遺伝子 SHC4 である。単細胞 RNA 実験によって測定されたその発現変動統計的指数は、本稿では A38 - 5 (エピジェネティックに (epigenetically) 改変された、遠位転移) 系では +1.12 であり、対応する A38 - 41 (エピジェネティックに安定、局

10

20

30

40

50

所侵襲)系では - 2 . 6 8 であり、F D R p 値は 0 . 0 0 である。図 2 2 は、3 8 - 5 における遺伝子に対する L O C K の喪失を示すデータを表す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、前転移性候補がエピゲノム調節であるという重大な発見に基づいている。本発明は、特に大型の組織化ヘテロクロマチンリジン(K) - 9 修飾ドメイン(L O C K) および大型DNA低メチル化ブロックを含むヘテロクロマチンドメイン内での、P D A C サブクロン進展および遠位転移中のラージスケール(大規模)エピゲノム変化の役割の発見に基づく。これらの領域は、ゲノムの半分以上を占め、互いに部分的に重複し、そして P D A C を含む多くのヒトの癌において見出されるので、大規模なエピジェネティックなリプログラミングのための選択可能な標的を表す。したがって、本発明者らは、これらの領域内のエピゲノム調節異常が腫瘍進行に対する主要な選択的力となり得ることを仮定し、一貫した転移特異的ドライバー変異の欠如を付与した。

10

【0012】

本システムおよび方法を説明する前に、本発明は説明した特定のシステム、方法、および実験条件に限定されず、そのようなシステム、方法、および条件は変動し得ることを理解されたい。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲でのみ限定されるため、本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定を意図するものではないことも理解されたい。

【0013】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「本方法」への言及は、本開示などを読めば当業者には明らかとなる、本明細書に記載の1つ以上の方法および/またはタイプのステップを含む。

20

【0014】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または同等の任意の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をここに記載する。

【0015】

本発明は、癌を有する対象からのDNAを含有する試料中の大型組織化ヘテロクロマチンリジン(K) - 9 修飾ドメイン(L O C K) および大型DNA低メチル化ブロックを検出することを含む、エピジェネティックリプログラミングのための標的の同定方法を提供する。例えば、この方法は、P D A C および/またはその転移を有するかまたは有する危険性がある対象に適用される。一態様では、検出は、H 3 K 9 M e 2 / 3 および/または H 4 K 2 0 M e 3 の分析を含む。

30

【0016】

本明細書で使用されているように、リプログラミング(初期化)は、部分的または最終的に分化した体細胞の分化状態を変化または逆転させるプロセスを指すことを意図している。体細胞のリプログラミングは、体細胞の分化状態の部分的または完全な逆転であり得る。例示的な態様において、リプログラミングは完了し、体細胞はi P S 細胞にリプログラミングされる。ただし、リプログラミングは、それほど分化されていない状態への逆戻りなどのように、部分的な場合がある。例えば、最終分化細胞を多分化能細胞などのより低い分化状態の細胞に戻す。

40

【0017】

本明細書中で使用される場合、多能性細胞は、インビトロで長期間(1年以上)分裂する潜在能力を有し、そして3つすべての胚性胚葉、すなわち内胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する細胞に分化する独特の能力を有する細胞を含む。

【0018】

本発明と共に使用するための体細胞は、初代細胞または不死化細胞であり得る。このよ

50

うな細胞は、動物から新たに単離されたものなどの初代細胞（非不死化細胞）であり得るか、または細胞株（不死化細胞）に由来し得る。例示的な態様では、体細胞は哺乳動物細胞、例えばヒト細胞またはマウス細胞などである。それらは、皮膚、脳、肺、膵臓、肝臓、脾臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、尿道、および他の尿中臓器、あるいは概して生きている体細胞を含む臓器または組織からのもの、あるいは血球からのもののような、しかしこれらに限定されない、様々な器官から周知の方法によって得ることができる。本発明において有用な哺乳動物体細胞は、例として、成体幹細胞、セルトリ細胞、内皮細胞、顆粒膜上皮細胞、ニューロン、膵島細胞、表皮細胞、上皮細胞、肝細胞、毛包細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球（BおよびTリンパ球）、赤血球、マクロファージ、単球、単核球、線維芽細胞、心筋細胞、他の既知の筋肉細胞、および概して任意の生きた体細胞を含む。特定の実施形態では、線維芽細胞が使用される。本明細書中で使用される場合、体細胞という用語はまた、成体幹細胞を含むことを意図する。成体幹細胞は、特定の組織の全ての細胞型を生じさせることができる細胞である。例示的な成体幹細胞には、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉系幹細胞が含まれる。

10

【0019】

本明細書で論じるように、メチル化パターンの変化は、分化の様々な段階で「オン」または「オフ」になる重要な因子の遺伝子発現を調節するように働く細胞の分化または脱分化の間に起こる。そのように、当業者は、多くの種類の作用物質が体細胞の1つ以上の核酸配列のメチル化状態を変化させて本発明での使用に適し得る多能性を誘導することができることを理解するであろう。

20

【0020】

本明細書で使用される作用物質は、体細胞の1つまたは複数の核酸配列のメチル化状態を変化させることができる任意の作用物質を含むことを意図している。例えば、本発明の方法のいずれにも有用な作用物質は、任意の種類の分子、例えば、ポリヌクレオチド、ペプチド、ペプチドミメティック、ビニル性ペプチドのようなペプチド、有機分子または有機小分子のような化学化合物であり得る。様々な態様において、作用物質は、DNA分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNA分子、例えばマイクロRNA、dsRNA、siRNA、stRNA、およびshRNAなどのポリヌクレオチドであり得る。

30

【0021】

マイクロRNA (miRNA) は、一本鎖RNA分子であり、その発現はメチル化によって調節されて、細胞の分化および脱分化中の遺伝子発現の調節において重要な役割を果たすことが知られている。したがって、作用物質は、miRNAの発現を阻害または誘導するものであり得るか、または模倣miRNAであり得る。本明細書中で使用される場合、それらの内因性対応物と同じまたは実質的に同じ機能を有する、細胞に外因的に導入されたマイクロRNAを意味することが意図される「模倣」マイクロRNA。

【0022】

本発明の様々な態様では、1つまたは複数の核酸配列のメチル化状態を変える作用物質は核リプログラミング（初期化）因子である。核リプログラミング因子は、多能性を誘導する遺伝子であり得、そして多能性幹細胞の表現型のような、初期細胞のものより原始的である表現型に分化または半分化細胞を再プログラムするために利用される。当業者は、そのような遺伝子および作用物質が、体細胞のゲノムに組み込まれている1つまたは複数のそのような遺伝子の発現時、または体細胞と遺伝子の作用物質または発現産物との接触時に、体細胞から多能性幹細胞を生成することができることを理解するであろう。本明細書中で使用される場合、多能性を誘導する遺伝子は、多能性と関連し、そして遺伝子の組み込みおよび発現の際に体細胞から多能性幹細胞のような低分化細胞を生成し得る遺伝子を指すことを意図する。多能性遺伝子の発現は、典型的には多能性幹細胞に限定されており、多能性幹細胞の機能的同一性にとって極めて重要である。

40

【0023】

50

いくつかの遺伝子が多能性と関連し、そしてリプログラミング因子として本発明と共に使用するのに適していることが見出された。そのような遺伝子は当技術分野において公知であり、例として、SOXファミリー遺伝子(SOX1、SOX2、SOX3、SOX15、SOX18)、KLFファミリー遺伝子(KLF1、KLF2、KLF4、KLF5)、MYCファミリー遺伝子(C-MYC、L-MYC、N-MYC)、SALL4、OCT4、NANOG、LIN28、STELLA、NOBOX、POU5F1またはSTATファミリー遺伝子が挙げられる。STATファミリーメンバーは、例えば、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5(STAT5AおよびSTAT5B)、およびSTAT6を含み得る。場合によっては、多能性を誘導するために1つの遺伝子のみを使用することが可能であり得るが、概して、多能性を誘導するためには1つより多い遺伝子の発現が必要とされる。例えば、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の遺伝子が、ポリシストロニック構築物として体細胞ゲノムに同時に組み込まれて、そのような遺伝子の同時発現を可能にし得る。例示的な局面において、多能性を誘導するために、OCT4、POU5F1、SOX2、KLF4およびC-MYCを含む4つの遺伝子が利用される。本発明での使用に適したリプログラミング因子として知られるさらなる遺伝子は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第10/997,146号および米国特許出願第12/289,873号に開示されている。

10

【0024】

これらの遺伝子の全ては、ヒトを含む哺乳動物に一般的に存在し、したがって、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ、およびサルを含むがこれらに限定されない哺乳動物由来の遺伝子などの任意の哺乳動物由来の相同体が本発明において使用され得る。さらに、野生型遺伝子産物に加えて、いくつか(例:1から10、1から6、1から4、1から3、および1または2)のアミノ酸の置換、挿入、および/または欠失を含み、野生型遺伝子産物と同様の機能を有する変異型遺伝子産物もまた使用され得る。さらに、因子の組み合わせは野生型遺伝子または遺伝子産物の使用に限定されない。例えば、Mycキメラまたは他のMyc変異体を野生型Mycの代わりに使用することができる。

20

【0025】

本発明は、核リプログラミング因子の特定の組み合わせに限定されない。本明細書中で考察されるように、核リプログラミング因子は1つ以上の遺伝子産物を含み得る。核リプログラミング因子はまた、本明細書中で考察されるような遺伝子産物の組み合わせを含み得る。各核リプログラミング因子は、単独でまたは本明細書に開示されるような他の核リプログラミング因子と組み合わせて使用され得る。さらに、本発明の核リプログラミング因子は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第10/997,146号に論じられているように、スクリーニング方法により同定することができる。さらに、本発明の核リプログラミング因子は、分化、発生、増殖などに関する1以上の因子および他の生理活性を有する因子、ならびに核リプログラミング因子として機能し得る他の遺伝子産物を含み得る。

30

【0026】

核リプログラミング因子はタンパク質またはペプチドを含み得る。タンパク質は、本明細書で論じられるように遺伝子から、またはそのタンパク質と他のタンパク質、ペプチドなどとの融合遺伝子産物の形態で産生され得る。タンパク質またはペプチドは、蛍光タンパク質および/または融合タンパク質であり得る。例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質またはヒスチジンタグなどのペプチドとの融合遺伝子産物もまた使用され得る。さらに、ウイルスHIV由来のTATペプチドとの融合タンパク質を調製して使用することにより、細胞膜を介した核リプログラミング因子の細胞内取り込みを促進することができ、それによって、融合タンパク質を培地に添加することによってのみリプログラミングの誘導を可能にし、したがって遺伝子導入などの複雑な操作を回避する。そのような融合遺伝子産物の調製方法は当業者に周知であるので、当業者は目的に応じて適切な融合遺伝子産物を容易に設計し調製することができる。

40

【0027】

50

特定の実施形態では、作用物質は、本明細書に記載の表に列挙されている任意の遺伝子などの1つまたは複数の核酸配列のメチル化状態を変化させる。

【0028】

それらの多能性の特徴を評価するためのリプログラミングされた体細胞の発現プロファイリングもまた行われ得る。多能性に関連する個々の遺伝子の発現もまた試験され得る。さらに、胚性幹細胞表面マーカーの発現を分析することができる。本明細書で使用される時、「発現」は、材料または物質の生産、ならびに材料または物質の生産のレベルまたは量を指す。したがって、特定のマーカーの発現を測定することは、発現されているマーカーの相対量または絶対量のいずれかを検出すること、または単にマーカーの有無を検出することを指す。本明細書中で使用される場合、「マーカー」とは、観察または検出され得る任意の分子をいう。例えば、マーカーは、これに限定されないが、核酸、例えば、特定の遺伝子の転写産物、遺伝子のポリペプチド産物、非遺伝子産物ポリペプチド、糖タンパク質、炭水化物、糖脂質、脂質、リポタンパク質、または小分子などを含み得る。

10

【0029】

多能性幹細胞と関連することが当該分野で公知である種々の遺伝子の検出および分析は、OCT4、NANOG、SALL4、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、またはそれらの組み合わせなどの遺伝子の分析を含み得るがこれらに限定されない。iPS細胞は、アルカリホスファターゼ(AP); ABCG2; ステージ特異的胚抗原-1(SSEA-1); SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; TRA-1-81、Tra-2-49/6E; Eras/EcAt5、E-カドヘリン、-III-チューブリン、平滑筋アクチン(-SMA); 線維芽細胞増殖因子4(Fgf4); クリプト(Crypto)、Dax1; ジンクフィンガータンパク質296(Zfp296); N-アセチルトランスフェラーゼ-1(Nat1); ES細胞関連転写物1(EcAt1); ESG1/DPPA5/EcAt2; EcAt3; EcAt6; EcAt7; EcAt8; EcAt9; EcAt10; EcAt15-1; EcAt15-2; Fthl17; Sall4; 未分化胚細胞転写因子(Utf1); Rex1; p53; G3PDH; TERTを含むテロメラーゼ; サイレントX染色体遺伝子; Dnmt3a; Dnmt3b; TRIM28; タンパク質15含有Fボックス(Fbx15); Nanog/EcAt4; Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc; Esrrb; TDGF1; GABRB3; Zfp42、FoxD3; GDF3; CYP25A1; 発達多能性関連2(DPPA2); T細胞リンパ腫ブレークポイント1(Tcl1); DPPA3/Stella; DPPA4; 並びに、多能性についての他の一般的なマーカー、例えば細胞を再プログラムするために誘導の間に使用される任意の遺伝子を含む多能性細胞マーカーをいくつでも発現することができる。iPS細胞はまた、iPS細胞が誘導される分化細胞に特徴的なマーカーの下方制御によっても特徴付けられ得る。

20

30

【0030】

本明細書中で使用される場合、「分化」とは、それらの細胞に特定の特殊機能を引き受けさせ、特定の他の特殊機能単位に変化する能力を喪失させるように細胞内で起こる変化を指す。分化可能な細胞は、全能性、多能性または多分化能性細胞のいずれであってもよい。分化は成熟した成体細胞に関して部分的または完全であり得る。

40

【0031】

「分化細胞」とは、特定の分化した、すなわち非胚性の状態を有する非胚性、非単為生殖性または非多能性細胞を指す。3つの最も初期の分化細胞型は内胚葉、中胚葉、および外胚葉である。

【0032】

多能性はまた、細胞を適切な動物、例えばSCIDマウスに注射し、分化した細胞および組織の産生を観察することによって確認することもできる。多能性を確認するさらに別の方法は、本発明の多能性細胞を用いてキメラ動物を作製し、そして導入された細胞の異なる細胞型への寄与を観察することである。キメラ動物を作製するための方法は当技術分野において周知であり、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,642,4

50

33号に記載される。

【0033】

多能性を確認するためのさらに別の方法は、分化を促進する条件下（例えば、線維芽細胞支持細胞層の除去）で培養したときに、胚様体および他の分化細胞型への細胞分化を観察することである。

【0034】

本発明の様々な態様では、メチル化状態はM値に変換される。本明細書中で使用される場合、M値は、全(Cy3)およびMc r B C分画DNA(Cy5)からの強度の対数比であり得る：正および負のM値は、それぞれメチル化および非メチル化部位と定量的に関連する。

【0035】

本発明の様々な態様において、大型低メチル化ブロックが同定される。メチル化の測定可能な減少があるとき、低メチル化が存在する。いくつかの実施形態において、分析されたメチル化部位の50%未満がメチル化されていない場合、DNAブロックは低メチル化されている。DNAブロック。メチル化状態を測定するための方法は、本明細書に提供されており、そして当該分野において公知である。いくつかの実施形態では、メチル化状態はM値に変換される。本明細書中で使用される場合、M値は、トータル(Cy3)およびMc r B C分画DNA(Cy5)からの強度の対数比であり得る：正および負のM値は、それぞれメチル化および非メチル化部位と定量的に関連する。M値は実施例に記載のように計算される。いくつかの実施形態では、-0.5~0.5の範囲のM値は、対照プローブによって定義されるように非メチル化部位を表し、0.5~1.5の値はメチル化のベースラインレベルを表す。

【0036】

遺伝子のメチル化状態を分析するための多数の方法が当該分野で公知であり、本発明の方法において使用されて、1つ以上のDMRの低メチル化または高メチル化のいずれかを同定し得る。様々な実施形態において、本発明の方法におけるメチル化状態の決定は、核酸増幅、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、メチル化特異的PCR、バイサルファイトパイロシーケンシング、一本鎖高次構造多型(SSCP)分析、制限分析、マイクロアレイ技術、およびプロテオミクスからなる群から選択される1つ以上の技術によって行われる。本明細書の実施例に例示されるように、メチル化の分析は重亜硫酸塩ゲノム配列決定によって実施することができる。亜硫酸水素塩処理は、非メチル化であるが、メチル化されていないシトシンをウラシルに変換するDNAを修飾する。亜硫酸水素塩処理は、METHYLEASY亜硫酸水素塩修飾キット(Human Genetic Signatures)を使用して実施することができる。

【0037】

いくつかの実施形態では、重亜硫酸塩パイロシーケンシング(これは、複数の連続したCpG部位を個々に高精度および再現性で定量的に測定する、DNAメチル化の配列決定に基づく分析)が使用され得る。

【0038】

プライマーによって結合された部位およびプライマーからの伸長方向に応じて、上記のプライマーを異なる対で使用することができることが認識されるであろう。さらに、追加のプライマー、特に本明細書に開示されるプライマーに対応するプライマーを用いて分析されたものと同じメチル化部位の分析を可能にするプライマーを低メチル化ブロック内で同定できることが認識されよう。

【0039】

変化したメチル化は、メチル化における検出可能な差異を同定することによって同定することができる。例えば、低メチル化は、亜硫酸水素塩処理後にウラシルまたはシトシンが特定の位置に存在するかどうかを同定することによって決定することができる。亜硫酸水素塩処理後にウラシルが存在する場合、その場合、残渣はメチル化されていない。メチル化の測定可能な減少があるとき、低メチル化が存在する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

代替の実施形態では、低メチル化ブロックのメチル化を分析する方法は、D M R内のメチル化残基に特異的なプライマー対を用いた増幅を含み得る。これらの実施形態において、少なくとも1つのプライマーの選択的ハイブリダイゼーションまたは結合は、標的DNA配列のメチル化状態に依存する(Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:98 21 (1996))。例えば、増幅反応は重亜硫酸塩処理に先行することができ、そしてプライマーは重亜硫酸塩処理に依存する様式で標的配列に選択的にハイブリダイズすることができる。例えば、1つのプライマーは、標的配列の1つ以上の塩基が亜硫酸水素塩処理によって改変され、それによってメチル化された標的配列に特異的である場合にのみ、標的配列に選択的に結合することができる。

10

【 0 0 4 1 】

低メチル化ブロックのメチル化状態を決定するための他の方法が当該分野で公知であり、これにはアレイベースのメチル化分析およびサザンプロット分析が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 4 2 】

増幅反応を使用する方法、例えば1つ以上の低メチル化ブロックの低メチル化または高メチル化を検出するための上記の方法は、リアルタイム検出増幅手順を利用することができる。例えば、この方法は分子ビーコン技術(Tyagi et al., Nature Biotechnology, 14: 303 (1996))またはTaqman(商標)技術(Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276 (1991))を利用することができる。

20

【 0 0 4 3 】

また、メチル鎖(その全体が参照により本明細書に組み込まれるTrinh et al., Methods 25(4):456 62 (2001))、メチル重鎖(Epigenomics, Berlin, Germany)、またはS N u P E(一塩基プライマー伸長)(例えば、Watson et al., Genet Res. 75(3):269 74 (2000)を参照されたい。)も、D M Rの変化したメチル化を同定することに関する本発明の方法において使用することができる。

【 0 0 4 4 】

本明細書中で使用される場合、用語「選択的ハイブリダイゼーション」または「選択的にハイブリダイズする」とは、関連するヌクレオチド配列を無関係のヌクレオチド配列から区別し得る、中程度にストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな生理学的条件下でのハイブリダイゼーションをいう。

30

【 0 0 4 5 】

当技術分野において公知のように、核酸ハイブリダイゼーション反応において、特定のレベルのストリンジェンシーを達成するために使用される条件は、ハイブリダイズされる核酸の性質に依存して変化するのである。例えば、長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列組成(たとえば、相対GC:A Tコンテンツ)、および核酸の種類、例えばオリゴヌクレオチドまたは標的核酸配列がDNAまたはRNAであるかどうかは、ハイブリダイゼーション条件を選択する際に考慮することができる。追加の考慮事項は、核酸の1つが、例えばフィルター上に固定化されているかどうかである。適切なストリンジェントな条件を選択するための方法は、経験的に決定され得るか、または種々の式を使用して推定され得、そして当該分野において周知である(例えば、Sambrook et al., 上記参照,1989)。

40

【 0 0 4 6 】

漸進的により高いストリンジェントな条件の例は以下の通りである: ほぼ室温で $2 \times S S C / 0.1\% S D S$ (ハイブリダイゼーション条件); ほぼ室温で $0.2 \times S S C / 0.1\% S D S$ (低ストリンジェントな条件); 約 $42^\circ C$ で $0.2 \times S S C / 0.1\% S D S$ (中程度のストリンジェントな条件); 約 $68^\circ C$ で $0.1 \times S S C$ (高ストリンジェントな条件)。洗浄は、これらの条件のうちの一つのみ、例えば高ストリンジェントな条件を使用して実施することができ、または各条件を例えば10~15分間、上に列挙した順序で使用することができ、記載されているステップのいずれかまたはすべてを繰り返す。

【 0 0 4 7 】

50

評価されているDMRに関連するDNAのメチル化の程度は、評価されているDMRと関連しており、異なる程度のDNAメチル化を示しているゲノムDNAを同定し識別するためのプローブによる蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)によって測定することができる。FISHは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、de C apoa et al. (Cytometry. 31:85 92, 1998)に記載されている。この場合、生物学的試料は、典型的には、短期間の培養を行うのに十分な全細胞または核を含むものである。通常、試料は、10⁶~10⁷個、または例えば10⁵~10⁶個の全細胞を含む試料であろう。

【0048】

さらに、上記のように、メチルライト(methyl light)、メチルヘビー(methyl heavy)、およびアレイベースのメチル化分析は、次に非メチル化およびメチル化DNAに対応する様々な形態のオリゴヌクレオチド標的配列のマイクロアレイに対して、PCR増幅される亜硫酸水素塩処理DNAを用いることによって実施できる。

【0049】

用語「核酸分子」は、ホスホジエステル結合によって一緒に連結されているデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの配列を意味するために本明細書で広く使用されている。そのように、用語「核酸分子」は、一本鎖または二本鎖であり得るDNAおよびRNA、ならびにDNA/RNAハイブリッドを含むことを意味する。さらに、本明細書で使用される「核酸分子」という用語は、細胞から単離することができる天然に存在する核酸分子、ならびに、例えば、化学合成の方法により、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるような酵素的方法により調製することができる合成分子を含み、種々の実施形態において、ホスホジエステル結合以外のヌクレオチド類似体または骨格結合を含み得る。

【0050】

用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」もまた、核酸分子を指すために本明細書中で使用される。これらの用語の使用によって互いからのまたは「核酸分子」からの特定の区別は意図されていないが、用語「ポリヌクレオチド」は、概して、ポリペプチドまたはそのペプチド部分をコードする核酸分子に関して使用され、一方、用語「オリゴヌクレオチド」は、概して、プローブ、PCRプライマー、アンチセンス分子などとして有用なヌクレオチド配列に関して用いられる。もちろん、「オリゴヌクレオチド」もまたペプチドをコードし得ることが認識されるだろう。そのため、さまざまな用語は主に説明の便宜上使用されている。

【0051】

天然に存在するヌクレオチドおよびホスホジエステル結合を含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは化学的に合成することができ、または鋳型として適切なポリヌクレオチドを用いて組換えDNA法を用いて製造することができる。対照的に、ホスホジエステル結合以外のヌクレオチド類似体または共有結合を含むポリヌクレオチドは一般に化学合成されるが、T7ポリメラーゼのような酵素は、特定の種類のヌクレオチド類似体をポリヌクレオチドに組み込むことができ、したがって適切な鋳型からそのようなポリヌクレオチドを組み換え的に生成するために使用することができる。

【0052】

別の態様では、本発明は本発明の方法を実施するのに有用なキットを含む。キットに含まれる成分は、メチル化を検出するため、またはメチル化の程度もしくはメチル化の変化を測定するために使用される特定の分析技術、およびアッセイされる1つ以上の低メチル化ブロックを含む多数の要因に依存する。

【0053】

したがって、本発明は、本発明の1つ以上の低メチル化ブロックのメチル化状態を決定するためのキットを提供する。

【0054】

ゲノム規模でDNAを調べるために、遺伝子およびCpG含有量に対する位置を含む

10

20

30

40

50

DNAmについての先入観にとらわれないマイクロアレイに基づく方法である、包括的なハイスループットアレイベース相対メチル化 (CHARM) 分析を行った。Mで示される、得られたDNAmの定量的測定値は、トータル (Cy3) およびMcrBC分画DNA (Cy5) からの強度の対数比である：正および負のM値は、それぞれメチル化および非メチル化部位と定量的に関連する。各試料について、iPS細胞、親の体細胞、およびES細胞のゲノム全体で約460万のCpG部位を、古典的に定義された全てのCpGアイランド、ならびにゲノムの全ての非反復低CpG密度ゲノム領域を含む、カスタムデザインのNimbleGen HD2マイクロアレイを用いて分析した。メチル化されていない領域が平均して0の値と関連するように、これらのM値を標準化するために4,500の対照プローブを含めた。CHARMは、他の方法 (例えば、プロモーター中) によって同定された既知のメチル化マークに対して90%の感度で100%特異的であり、従来の領域事前選択によって同定されなかったゲノムの約半分を含む。CHARMの結果はまた、定量的パイサルファイトパイロシーケンス分析によっても広く裏付けられている。

【0055】

本発明の一態様では、メチル化密度は核酸領域について測定される。密度は、例えば、DNAの低メチル化ブロック領域の指標として使用され得る。約0.2~0.7、約0.3~0.7、0.3~0.6、または0.3~0.4、または0.3の密度は、低メチル化ブロックを示し得る (計算されたDNAメチル化密度は、各試料について配列決定されたCpGの総数で割ったメチル化CpGの数である)。メチル化密度を決定するための方法は当技術分野において周知である。例えば、標的CpGアイランドのメチル化密度を決定するための方法は、Luo et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 387:2 2009, pp. 143

149により確立されている。この方法では、パイサルファイト変換サンプルDNAから増幅されたPCR産物のセットをスポットすることによってDNAマイクロアレイを調製した。この方法は、一連の所与の遺伝子の領域メチル化密度の定量分析を可能にするだけでなく、大量の臨床試料についてのメチル化密度の情報、ならびにiPS細胞の生成および検出に関する本発明の方法における使用も提供し得る。他の方法は当技術分野において周知である (例えば、Holemon et al., *BioTechniques*, 43:5, 2007, pp. 683 693)。

【0056】

本発明は、機能的構成要素および様々な処理ステップに関して部分的に説明されている。そのような機能構成要素および処理ステップは、指定された機能を実行し、さまざまな結果を達成するように構成された任意の数の構成要素、動作、および技法によって実現され得る。例えば、本発明は、様々な生物学的試料、バイオマーカー、要素、材料、コンピュータ、データソース、記憶システムおよび媒体、さまざまな機能を実行できる、情報収集技術およびプロセス、データ処理基準、統計分析、回帰分析などを使用することができる。さらに、本発明は医療診断の文脈で説明されているが、本発明は任意の数の用途、環境およびデータ分析と併せて実施することができ、本明細書に記載のシステムは、本発明の単なる例示的用途である。

【0057】

本発明の様々な態様による分析方法は、例えばコンピュータシステム上で動作するコンピュータプログラムを使用して、任意の適切な方法で実施することができる。本発明の様々な態様による例示的な分析システムは、コンピュータシステム、例えばプロセッサとランダムアクセスメモリ、例えば、リモートアクセス可能なアプリケーションサーバー、ネットワークサーバー、パーソナルコンピューター、ワークステーションなどを備える従来のコンピュータシステムと併せて実施することができる。コンピュータシステムはまた、大容量記憶システムおよびユーザインターフェースなどの追加の記憶装置または情報記憶システム、例えば従来のモニタ、キーボードおよび追跡装置を適切に含む。しかしながら、コンピュータシステムは、任意の適切なコンピュータシステムおよび関連機器を含み得、そして任意の適切な方法で構成され得る。一実施形態では、コンピュータシステムはスタンドアロンシステムを含む。別の実施形態では、コンピュータシステムはサーバとデータベースを含むコンピュータのネットワークの一部である。

【 0 0 5 8 】

バイオマーカー情報を受信し、処理し、そして分析するために必要とされるソフトウェアは、単一の装置において実施されてもよく、または複数の装置において実施されてもよい。ソフトウェアは、情報の記憶および処理がユーザに対して遠隔的に行われるようにネットワークを介してアクセス可能であり得る。本発明の様々な態様による分析システムおよびその様々な要素は、データ収集、処理、分析、報告および/または診断などのバイオマーカー分析を容易にするための機能および動作を提供する。本分析システムは、メチル化および試料に関する情報を維持し、分析および/または診断を容易にする。例えば、本実施形態では、コンピュータシステムは、エピゲノムに関する情報を受信、格納、検索、分析、および報告することができるコンピュータプログラムを実行する。コンピュータプログラムは、生データを処理して補助データを生成するための処理モジュール、ならびに生データおよび補助データを分析して疾患状態モデルおよび/または診断情報を生成するための分析モジュールなど、様々な機能または動作を実行する複数のモジュールを含み得る。

10

【 0 0 5 9 】

分析システムによって実行される手順は、分析および/または疾患診断を容易にするための任意の適切なプロセスを含み得る。一実施形態では、分析システムは、疾患状態モデルを確立し、かつ/または患者の疾患状態を判定するように構成される。疾患状態を決定または同定することは、診断を実行することなど、疾患に対する患者の状態に関する任意の有用な情報を生成し、診断に役立つ情報を提供し、病気の病期や進行を評価し、疾患に対する感受性を示す可能性がある状態を特定し、さらなる検査が推奨される可能性があるかどうかを特定し、1つ以上の治療プログラムの有効性を予測および/または評価すること、あるいはそうでなければ患者の病状、疾患の可能性、または他の健康面を評価することを含み得る。

20

【 0 0 6 0 】

分析システムはまた、様々な追加のモジュールおよび/または個々の機能を提供し得る。例えば、分析システムはまた、例えば処理および分析機能に関する情報を提供するための報告機能も含み得る。分析システムはまた、アクセス制御や他の管理機能の実行など、さまざまな管理機能および管理機能を提供することができる。

【 0 0 6 1 】

分析システムは、生のバイオマーカーデータおよび/または対象に関するさらなる対象データに基づいて、疾患状態モデルを適切に生成し、および/または患者に診断を提供する。データは任意の適切な生物学的サンプルから取得され得る。

30

【 0 0 6 2 】

以下の実施例は、本発明の利点および特徴をさらに説明するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図しない。それらは使用され得るものの典型的なものであるが、他の手順、方法論、または当業者に知られている技術が代わりに使用されてもよい。

実施例 1

ラージスケールエピゲノムのリプログラミングは、膵癌進行の進展中の同化グルコース代謝を遠位転移に結びつける

40

【 0 0 6 3 】

背景と仮説

先に論じたように、1つの前転移候補はエピゲノム調節である。特に、大型組織化ヘテロクロマチンリジン(K)-9修飾ドメイン(LOCK)および大型DNA低メチル化ブロックを含む、特にヘテロクロマチンドメイン内での、PDACサブクロンの進展および遠位転移中のラージスケールエピゲノム変化の役割を調査したいと考えた。これらの領域は、ゲノムの半分以上を占め、互いに部分的に重複し、そしてPDACを含む多くのヒトの癌において見出されるので、ラージスケールエピジェネティックリプログラミングのための選択可能な標的を表し得る。したがって、本発明者らは、一貫した転移特異的ドライバー変異がないことを考えると、これらの領域内のエピゲノム異常調節が腫瘍進行の主

50

要な選択的力となり得ると仮定した。

結果

遠位転移の進展の間の全体的なエピジェネティック状態のリプログラミング

【0064】

この仮説を検証するために、我々は最初にエピジェネティックな修飾の大規模な（ラー
ジスケール）変化が *in vivo* で患者試料の PDAC 進展中に検出できるかどうかを
測定した。我々は以前に迅速な剖検によって個々の患者から一致した原発性（プライマ
ー）および転移性 PDAC 病変を収集し、そしてこれらの試料のサブセットにおいて突然
変異についての全エキソームとサンガー配列、再編成のためのペアエンド配列、および全
ゲノム配列によるサブクローン進展の遺伝的進行を報告した。これらの試料は、腫瘍の進
展を研究するのに特に適したユニークなリソースを表し、それらは同じ患者からの一致し
た原発性および転移性腫瘍から集められたので、それぞれが深く順序付けられ、個々のサ
ブクローンが識別されており、転移特異的なドライバー変異は存在しない。これらの患者
から、サブクローン進展の間の全体的なエピゲノムのリプログラミングを試験するために
、多様な PDAC 試料の大きなパネルを選択した。表 1 にまとめたように、これらの試料
は、PDAC 進展の多様性（原発腫瘍の異なる領域が腹膜および遠位転移と対になっている）
を表しているために選択され、各試料は、配列確認された（サブ）クローン集団を表
し、患者は治療されたものと治療されていないものの両方であり、転移特異的なドライ
バーが存在しない各患者におけるすべてのサブクローンによってドライバー変異が共有され
、ホルマリン固定組織はイムノアッセイに利用可能であり、凍結組織は全ゲノム亜硫酸水
素塩配列決定に利用可能であり、細胞株は他の全ての実験に利用可能であった。

10

20

【0065】

表 1：LOCK エピジェネティック変化を伴う PDAC 試料の特徴

【表 1 - 1】

| 試料 (クローン の関係 ^{a)}) | 疾病の 存在 | ソース | ドライバー 遺伝子 (原発性お よびmetlに おいて) | ケモ | アッセイ ^b IHC, ウェス タンブロット, ChIP- seq, WGBS | 結果 ^b LOCK メチル化 変化 |
|------------------------------------|-----------|-------------|---|-----|--|---------------------------------|
| A124PrF (ファウン ダーククローン) | 局所領域 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>SMAD4</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A124PrS (サブクロ ーン) | 局所領域 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>SMAD4</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | びまん性の陽性 高い(75%, 対照) |
| A124Per (転移) | 局所領域 | 組織: 腹膜 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>SMAD4</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | びまん性の陽性 高い(74%) |
| A141PrF (ファウン ダーククローン) | 局所領域 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>MLL3</i> <i>ARID1B</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A141PrS (サブクロ ーン) | 局所領域 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>MLL3</i> <i>ARID1B</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A141Per (転移) | 局所領域 | 組織: 腹膜 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>MLL3</i> <i>ARID1B</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A125PrF (ファウン ダーククローン) | 遠位 転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ARID1A</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | びまん性の陽性 高い(74%) |
| A125PrS (サブクロ ーン) | 遠位 転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ARID1A</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | 陽性+陰性 低減 (51%) |
| A125Lv1 (転移) | 遠位 転移 | 組織: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ARID1A</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | びまん性の陰性 低減 (57%) |
| A125Lv2 (転移) | 遠位 転移 | 組織: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ARID1A</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: WGBS: | びまん性の陰性 低減 (59%) |
| A132PrF (ファウン ダーククローン) | 遠位 転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A132PrS (サブクロ ーン) | 遠位 転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | 陽性+陰性 |

【表 1 - 2】

| | | | | | | |
|---|----------------------|------------------|---|-------------------|---|--|
| A132Lv (転移) | 遠位 転移 | 組織: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>ATM</i> | 未処理 | K9Me2/3 IHC: | 陽性+陰性 |
| A38PrF (ファウン ダークローン) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A38PrS1 (腹膜 前駆体 サブクローン) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陽性 |
| A38PrS2 (肝臓/肺 前駆体 サブクローン) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 組織: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> <i>SMARCA2</i> ^o | Gem. Bev. | K9Me2/3 IHC: | 陽性+陰性 |
| A38Lg1 (転移) | 局所領 域 + 遠 位 転移 | 組織: 肺 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2/3 IHC: | びまん性の陰性 |
| A38Per (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 腹膜 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2 ウエス タンブロット: K9Me2 ChIP-seq: WGBS: | 高い(100%, cont.) 高い(100%, cont.) 高い(79%, cont.) |
| AsPC1 ^d (N/A) | 局所領域 | 細胞 株: 腹水 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 高い(102%) |
| HPAF11 ^d (N/A) ^o | 局所領域 | 細胞 株: 腹水 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> | Gem. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 高い(94%) |
| Capan2 ^d (N/A) | 局所領域 | 細胞 株: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i> | Gem. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 高い(93%) |
| A2Lg (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 肺 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> | Taxoprex. Gem. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 低減 (40%) |
| A2Lv (転移) | 局所領 域 + 遠 位 転移 | 細胞 株: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> | Taxoprex. Gem. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 低減 (50%) |
| A6Lv (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>MLL3</i> | Gem. Trox. | K9Me2 ウエス タンブロット: | 低減 (47%) |

【表 1 - 3】

| | | | | | | |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|---|--------------|--|----------------------------------|
| A10Lv (転移) | 遠位 転移 | 細胞 株: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>MLL3</i> | 未処理 | K9Me2 ウエス タンブロット: | 低減 (61%) |
| A13Pr1 (サブクローン) | 遠位 転移 | 細胞 株: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>MYC</i> <i>TP53</i> | 未処理 | K9Me2 ウエスタンブ ロット:K9Me2 ChIP-seq: WGBS: | 低減 (64%) 低減 (25%) 低減 (72%) |
| A13Pr2 (サブクローン) | 遠位 転移 | 細胞 株: 原発腫瘍 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>MYC</i> <i>TP53</i> | 未処理 | K9Me2 ウエスタンブ ロット:K9Me2 ChIP-seq: WGBS: | 低減 (51%) 低減 (81%) 低減 (73%) |
| A13Lg (転移) | 遠位 転移 | 細胞 株: 肺 | <i>KRAS</i> <i>CDKN2A</i> <i>MYC</i> <i>TP53</i> | 未処理 | K9Me2/3 ウエスタンブ ロット:K9Me2 ChIP-seq: WGBS: | 低減 (53%) 低減 (86%) 低減 (71%) |
| A320 (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 大網 ^a | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> | 5-FU | K9Me2 ウエス タンブロット: | 低減 (58%) |
| A38Lv (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 肝臓 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2 ウエスタンブ ロット: WGBS: | 低減 (47%) 低減 (67%) |
| A38Lg (転移) | 局所領 域 + 遠 位転移 | 細胞 株: 肺 | <i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>SMAD4</i> | Gem. Bev. | K9Me2 ウエスタン ブロット:K9Me2 ChIP-seq: WGBS: | 低減 (58%) 低減 (48%) 低減 (72%) |

【 0 0 6 6 】

表 1 : 組織および細胞株試料にわたる H 3 K 9 および DNA メチル化変化の概要。局所領域的の広がり (腹膜 / 腹水) を有する患者からの試料は、複数のアッセイによって示されるように、比較的高い全体的 H 3 K 9 / DNA メチル化を示し (右 2 列)、一方、遠位転移を有する患者からの試料は全てのアッセイにわたってメチル化の減少を示し、これは示されるように原発腫瘍において開始された。

【 0 0 6 7 】

略語: Gem. (ゲムシタピン)、Bev. (ベバシズマブ)、Taxoprex. (タキソプレキシン)、Trox. (トロキサシタピン)。

【 0 0 6 8 】

上付きの注釈

^a クローン由来は、以前に公表された (参考文献 1) および他の未公表の (本文脚注 1) 全ゲノム配列決定データからの系統学的推定値を表す。

^b ウエスタンブロットデータは、A 3 8 P e r 対照 (cont.) と比較した H 3 K 9 M e 2 シグナルのデンストメトリー (濃度測定) パーセンテージを反映している。ウエスタンブロットを補足図 1 に示し、絶対濃度測定値を図の凡例に含まれる p 値と共に図 1 g に示す。補足データファイル 2 の M b および R P K M 値で詳述されているように、ChIP-seq データは、A 3 8 P e r 対照 (cont.) と比較して H 3 K 9 M e 2 が減少した L O C K M b の割合を反映している。補足図 1 および 2 に詳述されるように、WGBS データは、A 1 2 4 P r 対照 (組織) および A 3 8 P e r 対照 (細胞株) に対する L O C K 内

のDNAメチル化の割合を反映する。

^c 化学療法治療を受けた患者からのこの転移は、S M A R C A 2において、不明瞭な意義のミスセンス変異を有していた。

^d これらの細胞株は、迅速剖検コホートからのものではなく、ドライバーの突然変異を過小評価している可能性がある、以前に公表された遺伝子型決定データに依存している。

^e A 3 2 O細胞株は、広範囲の肺転移を含む非常に侵襲性のある疾患を有する患者の大網腫瘍病変から単離され、他の遠位（肺/肝臓）転移性サブクローンと同様の所見を示した。

【0069】

我々は、ホルマリン固定組織試料（合計16のユニークにマッチした、配列確認された腫瘍切片、表1）から分析を始めた。我々は、サブクローン進展の間の選択可能な標的であるかもしれない、ヘテロクロマチンドメイン（Wen et al. (Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. Nat Genet 41, 246 50 (2009)) および McDonald et al. (Genome scale epigenetic reprogramming during epithelial to mesenchymal transition. Nat Struct Mol Biol 18, 867 74 (2011)) で定義されているLOCKを含む）からの全体的な変化を検出するために、ヘテロクロマチン修飾（例えば、H3K9Me2/3）に対する免疫染色を行った。免疫染色は、腹膜癌腫症を呈した患者からの原発腫瘍および腹膜転移サブクローンの両方にわたって、PDAC細胞核のびまん性陽性（>80%）のH3K9Me2/3染色を明らかにした（図1a, bおよび表1）。対照的に、遠位転移性疾患を呈した患者からの試料は、サブクローン進展中にH3K9Me2/3の進行性の喪失を示した。これは、原発腫瘍における不均一（陽性+陰性PDAC核の混合物）染色、続いて対をなす転移におけるびまん性陰性（<20%）染色または不均一染色の保持のいずれかとして現れた（図1c, dおよび表1）。我々はまた、腹膜転移と遠位転移の両方を播種した配列検証された原発腫瘍サブクローンが利用可能であった患者からのサブクローン進展中に同様の結果を観察した。腹膜前駆体は、新生物を創設したクローンに見られるように、ヘテロクロマチン修飾のびまん性に強い染色を保持していた（図1e、上の2つのパネル）。対照的に、遠位転移を播種した原発性腫瘍サブクローンにおいて染色パターンの細胞間異質性が出現し、続いて遠位転移部位における染色のびまん性喪失が続いた（図1e、下の2つのパネル）。このように、遠位転移性疾患を有する患者からの試料にわたる集団的発見は、リプログラミングが原発腫瘍のサブクローン進展の間に開始され、そしてこれらの変化が遠位転移部位自体に腫瘍を形成するサブクローンにおいて受け継がれるかさらには強調されることを示唆する。

【0070】

我々の分析をより多くの患者サンプルに拡張しそして我々の発見の普遍性を試験するために、我々は上記の患者組織に対応するサブセットを含む8人の患者から集めた12の低継代細胞株を用いた（表1）。細胞株は、9つの遠位転移サブクローン、図1eに提示された患者に対応する対の肝臓および肺転移を伴う腹膜転移、および同じ患者から収集された肺転移と一致する2つの（未創始者）原発性腫瘍サブクローンから単離された。重要なことに、9つの遠位転移細胞株のうち6つが以前に全エキソーム配列決定され、細胞株に存在する突然変異はサンガー配列決定によって検出されるように対応する患者組織にも存在した。急速剖検細胞株は遠位転移を呈した患者から大部分が分離されていたため、他の局所疾患の発生源からの追加のPDACサンプルも含まれた：腹膜癌腫症患者2人からの悪性腹水（AsPC1、HPAFII）、および遠位転移のない長期生存者からの原発腫瘍（Capan2）。

【0071】

次に、患者組織に見られるようなクロマチンの全体的な変化が細胞株で維持されているかどうかを調べた。これはゲノムワイドなリプログラミング事象を反映している可能性がある。我々は、よく理解されている機能を有する8つのヒストン修飾についてウェスタンブロットを行うことから始めた。ウェスタンブロットによる局所領域PDACサンプル（

A 3 8 P e r、A s P C 1、H P A F I I、C a p a n 2)の比較は、患者の組織で観察された腹膜癌腫症の進展と同様に、試験したすべてのヒストン修飾にわたって最小または非反復的な全体的変化を示した(図7 a)。対照的に、遠位転移は、図1 eに提示された患者に対応する対の腹膜(A 3 8 P e r)および遠位転移(A 3 8 L v、A 3 8 L g)サブクローンの間を含む、特定のヒストン残基(図7 b)を標的とするメチル化およびアセチル化の著しいリプログラミングを示した(図1 f)。これは、遠位転移におけるH 3 K 9 A cおよびH 3 K 2 7 A cの高アセチル化と共役したH 3 K 9 M e 2 / 3およびH 4 K 2 0 M e 3の再発性の減少として現れた(図1 gおよび表1に要約され、図7 bに示される)。H 3 K 9メチル化は、L O C Kを含む広いゲノム領域にわたってヘテロクロマチックエピジェネティック状態をコードするために重要であり、H 3 K 2 7 A cは遺伝子調節エレメントをコードする。我々は、サンプル間でH 3 K 2 7 M e 3またはH 3 K 3 6 M e 3において一貫した/反復する変化が観察されず(図1 g、図7)、そして再プログラムされた修飾自体は増殖速度に依存せず、P D A C化学療法によって誘発され得ないので(図8)、リプログラミングは特異的に見えた。最終的に、局所(腹膜)拡散のない状態で広範囲の遠位転移を示した患者から採取した、合致した原発腫瘍(A 1 3 P r 1、A 1 3 P r 2)および遠位転移(A 1 3 L g)サブクローンから単離した細胞株のウエスタンブロットも、遠位転移において保持されていた原発腫瘍サブクローン間のH 3 K 9 M e 3およびH 4 K 2 0 M e 3において減少を示し(図7 c)、遠位転移の進展中にリプログラミングが原発腫瘍において開始したことをさらに示唆している。したがって、集団的な30人の患者サンプルにわたるインビボ組織およびインビトロ細胞培養の所見は、全体的なエ

10

20

【0072】

P D A Cサブクローン進展のエピゲノムのランドスケープ

我々は次に、P D A Cゲノム全体にわたって再プログラムされたクロマチン修飾の位置をマッピングすることを望んだ。この目的のために、我々は、P D A C進展のエピジェネティックなランドスケープをクロマチン免疫沈降とそれに続くハイスループットシーケンシング(C h I P - s e q)を用いてよく理解された機能を有するヒストン修飾について包括的にマッピングした(ヘテロクロマチン: H 3 K 9 M e 2、H 3 K 9 M e 3、H 3 K 2 7 M e 3; ユークロマチン: H 3 K 2 7 A c、H 3 K 3 6 M e 3)。サブクローン進展と悪性進行の多様性をとらえるために、同じ患者からの肺転移(A 3 8 L g)合致した腹膜転移(A 3 8 P e r)、および同じ患者からの肺転移(A 1 3 L g)にも合致した2つの原発性腫瘍サブクローン(A 1 3 P r 1、A 1 3 P r 2)を含む、合致したサブクローンから単離された配列検証細胞株に対してC h I P - s e qを行った。各患者について、全てのサブクローンは、新しい転移特異的ドライバーを獲得することなく同一のドライバー遺伝子突然変異を共有した(表1)。合致する遺伝子発現の変化を同定するために、R N A - s e qも並行して行った。最終的に、本発明者らは、図1に示すホルマリン固定腫瘍切片のサブセットに対応した、これらの細胞株および凍結腫瘍組織にわたる全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定(W G B S)を用いてこれらのデータセットを補完した。E N C O D Eガイドライン(補足データ1)で推奨されているように、各C h I P実験について $> 15 \cdot 0 \times 10^6$ (中央値: $32 \cdot 3 \times 10^6$)のユニークアラインメントリードを含め、 $19 \cdot 3 \times 10^9$ のユニークアラインメントシーケンスリードで183データセットを生成した。実験は生物学的複製として実施し、複製間では良好な相関を示した(中央相関係数: $0 \cdot 956$; 範囲: $0 \cdot 746 \sim 0 \cdot 997$ 、補足データ1)。我々の知る限りでは、これはヒトの癌の進展的進行の間のエピジェネティックなリプログラミングの最初の包括的なゲノムワイド解析を表している。

30

40

【0073】

全体的なクロマチン修飾は腹膜癌腫症の進展の間に安定して受け継がれたが、遠位転移の間にリプログラミングが出現したので、我々は腹膜サブクローンを遠位転移サブクローンおよびそれらの合致する原発腫瘍サブクローンと比較することから始めた。この分析は、P D A Cゲノムの $> 95\%$ をカバーする何千ものクロマチンドメインを標的とした、驚

50

くほどかつ予想外の程度のゲノムワイドなエピジェネティックリプログラミングを明らかにした。これらには、ゲノムの約半分を占める大組織化クロマチンリジン（K）修飾ドメイン（LOCK）に対応するヘテロクロマチン領域、遺伝子が豊富なユークロマチンドメイン（ECD）、および他のヘテロクロマチン領域と比較して、独自に再プログラムされた非常に大型のLOCKドメインの小さなサブセットが含まれる。集団ドメインの特徴は補足データ2に詳述されており、実験にわたる包括的な統計分析は補足データ3に示されている。

【0074】

我々は最初に、ユークロマチン修飾の枯渇を伴うH3K9Me2およびH3K27Me3の強力で広範な濃縮によって定義されるヘテロクロマチンドメインを分析した（図2a、図9、および補足的な方法）。何千ものヘテロクロマチンドメインが各試料で検出され（範囲：2,008~3,166）、各サブクロンのゲノムの半分以上を占める大きなブロック様セグメント（中央値長：232Kb~311Kb）に編成された（平均：ゲノムの61.7%、範囲：54.1~71.7%、補足データ2）。複数の閾値にわたる感度分析によって測定されるように、ドメインコール（ドメイン呼び出し）は頑強であり（補足データ3）、コールされたヘテロクロマチン領域自体は以前に報告されたLOCKヘテロクロマチンドメインと有意に重複し（平均：76.7±16.9%重複；置換試験により $p < 0.01$ ）、これは、ヘテロクロマチンが主にLOCKに対応していることを示唆している。免疫染色（図1a~d）およびウエスタンブロットデータ（図1e、f）と同様に、腹膜サブクロンにおいてLOCKを横切って強いH3K9Me2濃縮が検出されたが、これらの同じ領域は、遠位転移およびそれらの対応する原発性腫瘍サブクロンにおいて、H3K9Me2の全体的減少を示した（図2a、平均：591Mb/1,470Mb；範囲：204-1,110Mb/1,470Mb；カイ二乗により $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ；表1および補足データ3）。対照的に、ウエスタンブロットの結果（図1g）と同様に、グローバルレベルの高いH3K27Me3が全てのサブクロンにわたってこれらの領域から検出された（図2a）。我々はまた、LOCKにおけるグローバルH3K9Me3リプログラミングの患者特異的パターンを検出した（図10）。患者A38では、H3K9Me3は、A38Perと比較して、A38L9LOCKにほとんど存在しなかった（184/208MbからのH3K9Me3の損失、88.5%、 $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ）。LOCK幅の広いH3K9Me3の喪失も、患者A13のペアの原発性腫瘍サブクロン間で検出され（106Mb/118Mb、A13Pr2対A13Pr1では90.0%、 $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ）、ウエスタンブロットの結果と同様であり（補足図1c）、この変化は、遠位転移性サブクロンにおいて受け継がれた（152Mb/169Mb、A13Lg対A13Pr1において90.2%、 $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ）。最終的に、局在化したリプログラミングイベントは、LOCK内で差次的に発現される（DE）遺伝子をコードするクロマチン内でも特異的に検出された（図11、補足データ3）。これには、上方制御および下方制御されたLOCK遺伝子の遺伝子本体に対するH3K36Me3およびH3K27Me3における同様の相反的变化と相まって、プロモーターに対するH3K27AcおよびH3K9Me2における相反的变化が含まれた。これは、LOCK由来のDE遺伝子が、ハイブリッドLOCK-ユークロマチンアイランド（LOCK-EI）と一致して、遺伝子調節能を有する特定の小領域に位置することを示唆した。まとめると、これらの知見は、ヘテロクロマチンドメイン（LOCK）が遠位転移の進展の間に全体的および局所的クロマチンリプログラミング事象の両方の主要な標的を表すことを示した。

【0075】

LOCKは、膵臓癌および他のヒトの癌において低メチル化されたDNAであるブロック様領域のサブセットに対応するので、本発明者らはまた、DNAメチル化変化がPDACサブクロン進展中にLOCKを標的としたかどうかを尋ねた。この分析のために、本発明者らは上記のChIP-seqデータを用いて全ての細胞株に対してWGBSを実施した。細胞株に対応する凍結組織は以前の研究の間に使い果たされていたため、図1a（A124、局所領域拡散）および図1c（A125、遠位転移）に示されたIHCデータ

10

20

30

40

50

を用いて、同じホルマリン固定組織に独自にマッチしたインビボWGBS用の7つの他の凍結組織サンプルを選択した。正常脾臓を内部対照として凍結組織試料に含めた。対応するIHC、ウエスタンブロット、およびChIP-seqの知見を有するWGBSのすべての試料および結果を表1に要約し、統計分析を用いて定量化したWGBSの結果を表2および3に提示する。これらの実験は、腹膜癌腫症と比較して、遠位転移から単離された細胞株にわたるLOCK全体のDNAメチル化の有意な減少を明らかにした(図2b、c、表3)。これらの知見は、同じサンプルについてChIP-seqによって検出されたLOCK中のH3K9Me2の減少と合致し(図2a)、低メチル化ブロック領域におけるDNAメチル化のリプログラミングはリプログラムされたヒストンメチル化によるLOCKを標的とすることを明にした(表1)。凍結組織サンプルからの同じLOCK領域の分析はまた、患者A124からのLOCK(腹膜拡散)および患者A125からのファウンダークローン(founder clone)において比較的高いDNAメチル化を明らかにし、一方、原発腫瘍および遠位転移性サブクローンの子孫は、細胞株で見られるよりもさらに顕著なDNAメチル化の著しい喪失を示した(図2b、c、表1、および表2)。ハイブリッドLOCK-EIサブ領域において下方制御されたDE遺伝子から強い局在化DNA低メチル化も検出されたが、H3K9Me2と同様に、上方制御された遺伝子は遺伝子の5'末端に急峻な陥没を伴って高メチル化されたままであった(図11)。したがって、DNAメチル化は、ヒストン修飾と同様に、原発腫瘍および遠位転移サブクローン由来のLOCKにわたって全体的かつ局所的に再プログラムされた。集団免疫染色(図1a~e)、ウエスタンブロット(図1f、g)、ChIP-seq(図2a)、およびWGBS(図2b、c)のデータ(表1に要約)に基づき、遠位転移の進展の間、全体的なリプログラミングイベントのかなりの部分がヘテロクロマチンドメイン(LOCKs)を標的としたと結論づける。

10

20

【0076】

表2. WGBSによって凍結組織サンプル中に検出されたLOCKドメイン全体のCpGメチル化レベルの割合。腹膜癌腫症を呈した患者A124由来の原発腫瘍および転移性腫瘍の両方において、DNAメチル化レベルは比較的高かった。同様の高レベルのDNAメチル化が、患者A125由来のファウンダークローンにおいても検出され、これは、遠位転移を播種した原発腫瘍サブクローンおよび肝臓転移自体において有意に減少した。P値は、3%閾値を用いて対応のあるウィルコックス検定(paired wilcox test)で計算した。

30

【表 2】

| 試料 | グローバルLOCK メチル化 | 有意差 |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------|
| 試料名 試料ソース | WGBS による、LOCKIにおける CpG メチル化 % | p値 対 A124Pr |
| A124PrF 原発腫瘍 | 75.37% | N/A (最も高いメチル化) |
| A124Per 腹膜 Met | 74.17% | 1 |
| A125PrF 原発腫瘍 #1 (ファウンダークローン) | 73.65% | 1 |
| A125PrS 原発腫瘍 #2 (サブクローン) | 51.12% | 2.20E-16 |
| A125Lv1 肝臓 Met #1 | 56.95% | 2.20E-16 |
| A125Lv2 肝臓 Met #2 | 59.47% | 2.20E-16 |
| 正常 膵臓 | 67.75% | 2.20E-16 |

【 0 0 7 7 】

表 3 . WGBS によって細胞株で検出された LOCK ドメイン全体の CpG メチル化レベルの割合。DNA メチル化レベルは、細胞株にわたって腹膜サブクローン A38Per について最も高かった。メチル化は、同じ患者からの遠位転移 (A38Lv、A38Lg) および原発腫瘍前駆体 (A13Pr1/2)、ならびに患者 A13 からの合致する肺転移において有意に減少した。P 値は、3% 閾値を用いて対応のあるウィルコックス検定で計算した。

【表 3】

| 試料 | グローバルLOCK メチル化 | 有意差 |
|----------------------------|--------------------------------|----------------|
| 名称 ソース | WGBS によるLOCKIにお けるCpG メチル化% | p値 対 A38Per |
| A38Per 腹膜 Met | 78.58% | N/A (最も高いメチル化) |
| A38Lv 肝臓 Met | 67.39% | 2.20E-16 |
| A38Lg 肺 Met | 71.67% | 2.20E-16 |
| A13Pr1 原発腫瘍 1 サブクローン | 72.46% | 2.18E-07 |
| A13Pr2 原発腫瘍 2 サブクローン | 73.48% | 2.14E-06 |
| A13Lg 肺 Met | 71.30% | 2.20E-16 |

【 0 0 7 8 】

我々は次に、ヘテロクロマチン修飾の枯渇を伴うグローバルユークロマチン修飾 H 3 K 2 7 A c および H 3 K 3 6 M e 3 の濃縮によって定義された E C D 内の再プログラミングを分析した (図 1 2)。ヘテロクロマチンと同様に、何千ものこれらのドメイン (範囲 : 1 , 9 3 5 - 2 , 3 1 8) が、サブクローンにまたがって同程度の長さのゲノムを占めていた大きなブロック様セグメント (中央長 : 2 0 7 K b - 2 7 7 K b) に分割されていた (平均 : ゲノムの 2 9 % ; 範囲 : 2 3 . 5 % ~ 3 2 . 0 %、補足データ 2)。すべてのサブクローンは、活発に転写されるユークロマチンと一致して、H 3 K 2 7 A c の鋭いピークと遺伝子調節要素での DNA メチル化のディップに挟まれた、遺伝子体上の広範な H 3 K 3 6 M e 3 シグナルを含む E C D 内の類似のグローバルパターンの修飾を示した (図 2 d)。しかしながら、RNA 配列データから E D への D E 遺伝子のマッピング (補足データ 3) は、これらの遺伝子をコードするクロマチン内の局所リプログラミング事象の明確なパターンを同定した (図 2 e、補足データ 3)。E C D から上方制御された遺伝子は H 3 K 3 6 M e 3 および H 3 K 2 7 A c の両方のレベルの増加を獲得し、これは許容クロマチン状態または機能亢進転写を反映する可能性がある。対照的に、下方制御された遺伝子は、H 3 K 2 7 A c の比較的わずかな減少を伴って非常に減少した H 3 K 3 6 M e 3 を示し、これは、不活性であるが安定したクロマチン状態または直接の転写抑制を反映し得る。L O C K とは異なり、DNA メチル化は E C D 中の D E 遺伝子の周囲で安定したままであった (データは示さず)。したがって、E C D におけるリプログラミングは、大部分は局在化されており、クロマチンをコードする D E 遺伝子における H 3 K 2 7 A c および H 3 K 3 6 M e 3 を標的としていた。

10

20

【 0 0 7 9 】

最終的に、我々はまた非常に大きな L O C K ドメインのユニークなサブセットを標的とした患者固有のリプログラミングを検出した。これらの領域は他の L O C K と同様に DNA 低メチル化ブロック内に位置していたが、それらは他のいくつかの点で異なっていた。第 1 に、これらのドメインはかなり大きかった (メジアン長 : 他の L O C K についての 2 3 2 ~ 3 1 1 K b に対して 7 3 0 K b ~ 1 , 3 4 0 K b、補足データ 2)。第 2 に、それらは H 3 K 9 M e 2 / H 3 K 2 7 M e 3 をまだ枯渇させている H 3 K 9 M e 3 で強く濃縮されていた (図 1 3 および補足データ 2)。第 3 に、それらの存在量は患者特異的であり、患者 A 1 3 からのサブクローンは非常に少数のこれらのドメイン (範囲 : ゲノムの 1 . 4 ~ 3 . 5 % をカバーする 5 0 ~ 1 1 1 ドメイン) を保有したが、A 3 8 ゲノムのはるかに高い割合を占めた (範囲 : ゲノムの 1 4 . 5 ~ 2 0 . 6 % をカバーする 2 2 6 ~ 3 4 4 ドメイン、図 1 3 a および補足データ 2)。最後に、他の L O C K において検出されたりプログラミング変化 (H 3 K 9 M e 2 / 3 の喪失および DNA メチル化) とは異なり、これらの L O C K におけるリプログラミングは、H 3 K 9 M e 2 の増加および DNA メチル化と結び付いた H 3 K 9 M e 3 の喪失を特徴とした (図 1 3 b ~ e)。これらの知見の機能的意義は不明であるが、それらは、以下に概説するように、サブクローン進展の間に出現したゲノム不安定性のパターンに対して意味を持ちうる。

30

【 0 0 8 0 】

再プログラムされたクロマチンドメインは悪性異質性を特定する

40

サブクローン進展は、個々の患者内で著しい表現型の不均一性を生み出す可能性があり、我々はそのような多様性が上記で検出されたものと同様の大規模なエピジェネティック変化によってコードされ得ると仮定した。したがって、我々は再プログラムされたクロマチンドメインが同じ患者からの P D A C サブクローン間の不均一な悪性特性をコードしているかもしれないかどうかを徹底的に調査することを望んだ。この目的のために、本発明者らは、同じ患者 (A 3 8 P e r および A 3 8 L g) から適合腹膜および肺転移サブクローンを選択し、サブクローン間で差次的に発現された再プログラム化 L O C K および E C D 遺伝子に対して遺伝子オントロジー (G O) 分析を行い (表 4 ~ 7、図 2 e および図 1 1 に示されるように再プログラムされた遺伝子に由来する)、その後、G O の結果が実験的アッセイによって測定された実際の表現型の差異と一致するかどうかを試験した。この

50

分析は、再プログラムされたLOCKおよびECDが、以下に記載されるように、サブクローン進展の間に出現した実質的な表現型の違いをコードすることを明らかにした。

【0081】

表4：A38Perと比較して、A38Lgにおいて再プログラムされたLOCKから上方制御されたDE遺伝子のGO分析。酸化還元バランス（酸化・還元、NADP）およびEMT（細胞接着、遊走）に関与する遺伝子は、LOCKにおける再プログラムされたDE遺伝子から上方制御された（補足データ3に詳述）。

【表4】

| GO ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|------------|-------|-------|--------|
| 酸化-還元 | 64 | 6.0 | 3.9e-6 |
| オキシドレダクターゼ | 56 | 5.2 | 4.7e-6 |
| EGF-様ドメイン | 28 | 2.6 | 6.4e-5 |
| トランスフェラーゼ | 105 | 9.8 | 1.0e-4 |
| NADP | 21 | 2.0 | 1.7e-4 |
| 細胞接着 | 41 | 3.8 | 1.8e-4 |
| 細胞移動 | 31 | 2.9 | 2.7e-4 |
| 細胞形態形成 | 29 | 2.7 | 3.8e-4 |
| ミトコンドリア | 67 | 6.3 | 4.0e-4 |
| アセチル化 | 174 | 16.3 | 5.0e-4 |

【0082】

表5：A38Perと比較して、A38Lgにおいて再プログラムされたLOCKから下方制御されたDE遺伝子のGO分析。分化状態（細胞接着、発生、上皮遺伝子）、免疫調節（免疫応答、サイトカイン、炎症）、および環境要因に対する反応（膜貫通シグナル伝達、細胞外マトリックス、分泌、運動）に関与する遺伝子は、再プログラムされたLOCKから下方制御された（補足データ3に詳述）。

【表 5】

| GO ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|----------------------|-------|-------|---------|
| シグナル | 399 | 32.4 | 1.5e-31 |
| 糖タンパク質 | 488 | 40.0 | 1.0e-30 |
| ジスルフィド結合 | 352 | 28.5 | 1.0e-25 |
| 分泌 | 217 | 17.6 | 1.5e-18 |
| 膜 | 582 | 47.2 | 1.7e-15 |
| 多型 | 951 | 77.1 | 1.5e-13 |
| 免疫応答 | 106 | 8.6 | 1.6e-13 |
| 免疫グロブリンドメイン | 75 | 6.1 | 8.5e-11 |
| サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用 | 54 | 4.4 | 2.3e-10 |
| イオンチャネル | 55 | 4.5 | 2.1e-9 |
| 炎症反応 | 55 | 4.5 | 7.6e-9 |
| 細胞接着 | 93 | 7.5 | 1.4e-8 |
| 発生タンパク質 | 98 | 7.9 | 4.4e-8 |
| 細胞運動 | 69 | 5.6 | 4.7e-8 |
| トランス膜タンパク質 | 82 | 6.7 | 3.4e-7 |
| プロテアーゼインヒビター | 25 | 2.0 | 3.9e-7 |
| 傷への反応 | 71 | 5.8 | 7.0e-7 |
| 細胞外マトリックス | 40 | 3.2 | 1.2e-6 |
| 上皮細胞分化 | 28 | 2.3 | 1.6e-6 |

【0083】

表6：A38Pgと比較して、A38Lgにおいて再プログラムされたECDから上方制御されたDE遺伝子のGO分析。翻訳後修飾、細胞周期制御、DNA修復、ストレス応答、およびDNA/RNA/タンパク質生合成に参与する遺伝子は、再プログラムされたECDからアップレギュレートされた（補足データ3に詳述）。

【表 6】

| G0 ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|---------------|-------|-------|---------|
| アセチル化 | 622 | 21.7 | 1.1e-59 |
| リン酸化タンパク質 | 1290 | 45.0 | 5.1e-53 |
| 細胞周期 | 154 | 5.4 | 3.4e-30 |
| 有糸分裂細胞周期 | 137 | 4.8 | 4.9e-30 |
| 細胞小器官分裂 | 95 | 3.3 | 3.7e-25 |
| DNA代謝プロセス | 157 | 5.5 | 9.4e-25 |
| DNA修復 | 95 | 3.3 | 1.4e-17 |
| DNA損傷刺激に対する反応 | 113 | 3.9 | 3.8e-17 |
| DNA複製 | 68 | 2.4 | 2.7e-14 |
| ストレスに対する細胞反応 | 144 | 5.0 | 3.1e-14 |
| タンパク質合成 | 62 | 2.1 | 2.8e-12 |
| ATP結合 | 256 | 8.9 | 1.3e-11 |
| リボヌクレオタンパク質 | 78 | 2.7 | 4.1e-11 |
| ヌクレオチド結合 | 309 | 10.7 | 4.3e-11 |
| 翻訳 | 86 | 3.0 | 2.5e-9 |
| ncRNA代謝プロセス | 66 | 2.3 | 3.5e-9 |
| ミトコンドリア | 167 | 5.8 | 4.3e-9 |
| DNA組換え | 39 | 1.4 | 4.6e-9 |
| 微小管ベースのプロセス | 70 | 2.4 | 5.9e-9 |

【0084】

表7：A38Perと比較して、A38Lgにおいて再プログラムされたECDから下方制御されたDE遺伝子のGO分析。発癌性シグナル伝達カスケード（Sh3ドメイン、膜貫通タンパク質、キナーゼ、Rasシグナル伝達）、細胞運動（創傷、遊走、移動）、および細胞死制御（アポトーシス）に關与する遺伝子は、再プログラムされたECDから下方制御された（補足データ3に詳述）。

【表 7】

| GO ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|-----------------|-------|-------|---------|
| 選択的スプライシング | 1195 | 49.0 | 1.5e-16 |
| Sh3 ドメイン | 65 | 2.7 | 6.8e-10 |
| リン酸化タンパク質 | 1112 | 45.0 | 1.3e-9 |
| 膜 | 964 | 39.4 | 1.4e-9 |
| 傷への反応 | 117 | 4.8 | 9.0e-8 |
| プレックストリン相同性 | 71 | 2.9 | 2.8e-7 |
| 細胞移動 | 49 | 2.0 | 3.4e-7 |
| 低分子GTPアーゼシグナル伝達 | 65 | 2.7 | 3.9e-7 |
| 移動運動 | 52 | 2.1 | 1.4e-6 |
| 細胞内シグナル伝達カスケード | 227 | 9.3 | 3.5e-6 |
| チロシンタンパク質キナーゼ | 34 | 1.4 | 5.4e-6 |
| アポトーシスの調節 | 153 | 6.2 | 1.1e-5 |
| プロテインキナーゼカスケード | 81 | 3.3 | 1.4e-5 |
| タンパク質アミノ酸リン酸化 | 130 | 5.3 | 1.8e-5 |
| アンキリンリピート | 56 | 2.3 | 3.7e-5 |
| Rasタンパク質シグナル伝達 | 51 | 2.1 | 4.6e-5 |

【 0 0 8 5 】

第 1 に、酸化還元（酸化 - 還元）バランスに關与する多数の D E 遺伝子が、A 3 8 L g において再プログラムされた L O C K から上方制御された（表 4、補足データ 3）。従って、このサブクローンは H₂O₂ 媒介酸化ストレスに対して非常に耐性であり（図 3 a）、A 3 8 P e r よりも高いオキシドレダクターゼ活性および N A D P H レベルを有していた（図 1 4 a、b）。第 2 に、分化状態（上皮対 E M T）をコードする遺伝子が A 3 8 P e r および A 3 8 L g L O C K から相互に発現され（表 5、補足データ 3）、タンパク質レベルでのいくつかのよく知られている上皮および E M T 発現変化（例えば C D H 1 / E - カドヘリン、C D H 2 / N - カドヘリン）をウエスタンブロットにより確認した（図 3 b）。さらに G O の結果と一致して、A 3 8 P g は高分化（上皮）形態を維持したが、A 3 8 L g は複数のインビトロ培養条件にわたって低分化（E M T 様）であり（図 1 4 c）、免疫蛍光実験は、E M T がインビボで A 3 8 L g 転移を播種した原発性腫瘍サブクローンに出現したことを示した（図 1 4 d）。我々はまた、免疫関連遺伝子が再プログラムされた L O C K とは差次的に発現されていることに注目し（表 5）、これは P D A C 免疫療法にとって意味を持ちうる。第 3 に、D N A 修復および細胞ストレス応答に關与する遺伝子は、ゲノムの完全性の維持に重要な遺伝子を含む、A 3 8 L g 由来の E C D において有意に上方制御されていた（ファンコニ貧血症複合体、非相同末端結合、および T O P 2 B / O G G 1 / K D M 1 A 複合体、とりわけ表 6、補足データ 3）。従って、このサブクローンは、A 3 8 P e r と比較して P D A C 化学療法（ゲムシタピン）に対して非常に耐性であり（図 3 c）、ウエスタンブロットはヒストン H 2 A X S 1 3 9 の過剰リン酸化を示した（H 2 A X、活性化 D N A 修復経路のサイン、図 3 d）。第 4 に、発癌性シグナル伝達カスケードに關与する遺伝子、特に K R A S / E R K 関連遺伝子は、A 3 8 L g 由来の E C D において下方制御されていた（表 7、補足データ 3）。確かに、A 3 8 L g は、A 3 8 P e r と同一の K R A S ^{G12V} 変異を有するにもかかわらず、リン酸化 E R K の喪失（図 3 e）、E R K 阻害に対する抵抗性（図 3 f）、および 3 D 腫瘍形成アッセイにおいて発癌性 K R A S のノックダウンに対する最小限の応答（図 3 g、図 1 4 e、f）

30

40

を示した。最終的に、この患者からクロマチンドメインへの以前に報告された再配列のマッピングは、再配列が優先的に E C D および独特に再プログラムされた大型 L O C K ドメインの小さなサブセットを標的とし、一方、他の L O C K は強く枯渇したことを明らかにした (図 15)。

【 0 0 8 6 】

したがって、再プログラムされたクロマチンドメインは、悪性遺伝子発現プログラム、異なる表現型特性、および患者 A 3 8 のサブクローン進化中に出現したゲノム不安定性のパターンをまとめて特定した。この患者は組織採取前に化学療法を受けたことは珍しく、S M A R C A 2 には不明確なミスセンス変異 (C I D、未発表の観察) があり、したがってこの場合、後成的選択は遺伝的要因の下流で起こった可能性がある。そのような所見の性質と程度は確かに患者によって異なるが、彼らは P D A C が同じ患者からの同じ癌においてさえ、サブクローン進展の間にかかなりの後成的で悪性の多様性を獲得することができることを意味する。

10

【 0 0 8 7 】

同化グルコース代謝はエピジェネティック状態と腫瘍形成性を制御する

我々は次に、再発性の転移固有の経路が、全体的なエピジェネティック状態および腫瘍形成の可能性に対する上流制御を発揮するために、サブクローン進展中に選択されたのかどうかを尋ねた。最近のいくつかの研究では、栄養状態と代謝活性を世界レベルのヒストン修飾と結びつけた。急速剖検コホートにおける遠位転移は、グルコースの豊富な供給を提供する臓器 (肝臓、肺) から大部分隔離されていたので、我々はこれらのサブクローンにおける再プログラムされたクロマチンおよび腫瘍形成性がグルコース代謝の特定の側面への依存を進化させたかどうかを尋ねた。

20

【 0 0 8 8 】

グルコース代謝の変化 (すなわち、ワールブルグ効果) は、新生物細胞および高度に増殖性の細胞の周知の特性である。我々の転移性サブクローンの大部分は実際には培養物中 (例えば図 8) およびインビボで中程度の増殖速度を示したが、それでもなお我々は遠位転移がグルコース代謝においてさらなる適応を獲得したかどうかを尋ねた。驚くべきことに、増殖性 (不死化) 正常 H P D E 細胞および局所領域 P D A C 試料と比較して、グルコースは遠位転移サブクローンにわたって代謝 (オキシドレダクターゼ) 活性を強く刺激し (図 4 a)、したがって、グルコースはこれらのサブクローンが酸化ストレスに耐えるために必要であった (図 4 b、c)。我々は、遠位転移および腹膜癌腫症と比較したそれらの前駆体において上昇したグルコース取り込みおよび乳酸塩分泌を検出したので、遠位転移もグルコースを過剰に消費した (図 1 6 a)。過剰なグルコース取り込みが下流の代謝経路に特異的に取り込まれたかどうかを測定するために、同じ患者から対になった腹膜および遠位転移サブクローンを選択し、それらを ¹³C [1 - 2] 標識グルコースと共にインキュベートし、液体クロマトグラフィー、続いて高分解能質量分析 (L C - H R M S) により代謝産物へのグルコース取り込みを測定した。これらの実験は、解糖系およびペントースリン酸経路 (P P P) の両方へのグルコース侵入の増強と一致して、遠位転移における乳酸塩およびヌクレオチドへの C 1 および C 1, 2 標識グルコースの両方の取り込みの上昇を明らかにした (図 4 d、e)。

30

40

【 0 0 8 9 】

我々は次に、遠位転移がこれらのグルコース駆動経路のいずれかにおいて特定の酵素段階への依存を進化させたのではないかと尋ねた。これは、我々が仮定した過剰消費に続発する代謝産物基質の激しい枯渇として現れるだろう。これを試験するために、H P D E 細胞、腹膜癌腫症、遠位転移、および原発腫瘍前駆体サブクローンを含む多様なサンプル群にわたる解糖および P P P 代謝産物プロファイルを調査した。全ての検出された解糖代謝産物およびペントースリン酸代謝産物の分析 (図 1 6 b) は、遠位転移およびそれらの前駆体にわたる 6 - ホスホグルコン酸 (6 P G) の顕著な、反復的な枯渇を明らかにした (図 4 f)。6 P G は、P P P の酸化的分枝内で作用する同化グルコース代謝に關与する酵素である 6 - ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (P G D) の基質である。

50

【0090】

グルコースは、経路の酸化的 (oxPPP) または非酸化的 (noxPPP) 分岐を介して PPP に入る可能性があり、これらは分離されていると考えられている。他の癌におけるいくつかの研究は、PGD が重要な癌遺伝子であることを示唆しているが、PDAC のマウスモデルにおいて原発性腫瘍増殖を推進するのは KRAS 媒介 noxPPP 活性化である。KRAS および他のドライバー変異は PDAC 進行の初期に獲得され、その後進化するすべてのサブクローンによって共有されるので、我々は PGD 依存性が再プログラムされたクロマチンおよび腫瘍原性を維持するために遠位転移の進化の間に特に選択されたと仮定した。グルコース欠乏、PGD に対する RNAi、および 6-アミノニコチンアミド (6AN、PGD を優先的に阻害することが報告されているニコチンアミド代謝拮抗薬プロドラッグ) は、腹膜サブクローンにおける全体的なクロマチン修飾に影響を及ぼさず、一方、全ての治療は同じ患者からの対の肺転移の再プログラムされたクロマチン状態を逆転させた (図 5 a)。PGD ノックダウンは KRAS または他の PPP 成分の発現を変化させなかったため、PGD 機能喪失は特異的にみえた (図 5 b)。

10

【0091】

我々は次に、PGD ノックダウンがより大きなサブクローンのパネルにわたって内在性腫瘍形成能に影響を及ぼし得るかどうかを尋ねた。それらの患者における攻撃的な行動にもかかわらず、遠位転移性サブクローンは免疫不全マウスにおいて転移性腫瘍を効果的に形成することができず、そして PGD RNAi は日常的な 2-D 培養において増殖したいかなるサブクローンに対しても毒性ではなかった (データは示さず)。これらの制限を回避するために、本発明者らは細胞を RNAi で処理し、3-D マトリゲル腫瘍形成アッセイを用いて、内在性腫瘍形成能に対する PGD ノックダウンの効果を測定した。PGD RNAi は、これらのアッセイによって、HPDE 細胞が球体を形成する能力または局所領域 PDAC が腫瘍を形成する能力に最小限の影響しか及ぼさなかった (図 5 c)。注目すべきことに、PGD RNAi は、遠位転移性サブクローンが腫瘍を形成する能力を普遍的に妨害した (図 5 d)。これらの知見は、PGD が PDAC 遠位転移に対する選択性を有する治療標的となり得ることを示唆した。6AN は PGD 標的治療の将来の設計のための有力な化合物を表すことができるので、メタボロミクス、ウエスタンブロット、多重 3D 腫瘍形成アッセイ、RNA-seq、および ChIP 実験を用いた遠位移動に対する活性について厳密に試験した。

20

30

【0092】

6AN 処置は、遠位転移および前駆体サブクローンにおけるグルタミン消費またはグルタミン酸分泌に影響を与えずにグルコース消費および乳酸分泌の速度を遅くし (図 17 a)、6AN は以前に検出されたグルコースの乳酸およびヌクレオチドへの高取り込みを逆転させた (図 17 b)。さらに、PGD 反応のすぐ上流のグルコースおよび代謝産物の定常状態レベルは 6AN に応答して劇的に上昇し、対応する下流代謝産物が減少した (図 17 c)。これは他の研究者によって以前に報告された強い PGD 阻害と一致する。

【0093】

我々は次に、エピジェネティック状態に対する 6AN の効果を試験した。驚くべきことに、6AN 処理は、正常細胞または局所領域 PDAC に対する影響を最小限に抑えながら、いくつかの再プログラムされたクロマチン修飾を遠位転移サブクローンにわたって定量的に逆転させ (図 18 a、b; 図 6 a、b に概要が示される)、この効果は培地から 6AN を除去しても持続した (図 18 c)。これらの変化は LOCK リプログラミングの側面を反映していたので、RNA-seq によって同定されるように、6AN によって調節される LOCK DE 遺伝子のクロマチン状態を調べた (補足データ 3、4)。これは、DE 遺伝子が、強い H3K27Ac および H3K36Me3、低い H3K27Me3、ならびに H3K9Me2 の急激な 5' 枯渇 (ディップ) を有する再プログラムされたハイブリッド LOCK-EI 領域内に位置することを明らかにした (図 19 a、補足データ 3)。対照および 6AN 処理した A38Lg 細胞に対する ChIP-seq 実験はさらに、全体的な H3K9Me2 の定量的増加が A38Lg 対 A38Per において再プログラムされ

40

50

たLOCK領域を標的とすることを示し(図19b)、一方、低減されたH3K27Acは、LOCKから抑制された遺伝子の特異的に標的とし、他のLOCK遺伝子またはECD調節遺伝子には影響を及ぼさなかった(図19c)。ウエスタンプロットの所見と同様に、6ANにตอบสนองしてH3K27Me3のレベルは全ての領域にわたって安定したままであった(図19b、d)。まとめると、これらの実験は、6ANが、遠位転移の進展の間に出現したLOCK内のいくつかのクロマチン変化を選択的かつ定量的に標的とすることを実証した。

【0094】

6ANは全体的なエピジェネティックな状態を調節したため、PGDノックダウン実験と同様に、それが遠位転移サブクローンにおける腫瘍形成能を選択的にブロックするかもしれないという仮説を立てた。驚くべきことに、6ANは遠位転移性および原発性腫瘍前駆体サブクローンにおける腫瘍形成を選択的かつ強力にブロックしたが、懸濁腫瘍球アッセイ(補足図20)、マトリゲル腫瘍形成アッセイ(図6b)、およびインビボ患者腫瘍の態様を総括する器官型間質へのPDAC細胞の注入(図6c)を含む、複数の3D腫瘍形成実験プラットフォームにわたって局所領域PDACはブロックしなかった。したがって、PGDノックダウンと同様に、6ANによるPGDの化学的阻害は、遠位転移性サブクローンの腫瘍形成能を選択的にブロックした。

【0095】

次に、我々のRNA-seqデータセットを調べて、上記の知見が悪性遺伝子発現プログラムの調節に関連しているのかどうかを調べた。注目すべきことに、A38Lgからの6AN下方制御遺伝子の半分以上(952/1832、52%、補足データ4)は、このサブクローンで過剰発現された遺伝子に対応した(同じ患者からの腹膜サブクローンと比較して)。さらに、6AN上方制御遺伝子の大部分は抑制されたDE遺伝子とも合致した(914/2122、42%、補足データ4)。さらに顕著なことに、遠位転移サブクローンにまたがって再発的に過剰発現している遺伝子の3分の1近く(255/891、29%、補足データ4)は6ANによって下方制御されていた。これらの遺伝子サブセットに対する比較GO分析は、有糸分裂細胞周期制御、アセチル化、染色体安定性、DNA修復、細胞ストレス応答、および同化/生合成活性を含む癌関連機能について強く強化された重複する結果をもたらした(表8~10)。

【0096】

表8：遠位転移において再発的に過剰発現されかつ6ANによって下方制御され、RNA配列によって検出された遺伝子のGO分析(補足データ3に詳述)。

【表8】

| Go ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|--------------|-------|-------|---------|
| 核 | 112 | 40.0 | 1.4e-19 |
| リン酸化タンパク質 | 150 | 53.6 | 1.3e-18 |
| アセチル化 | 80 | 28.6 | 2.7e-16 |
| DNA代謝プロセス | 36 | 12.9 | 1.2e-15 |
| 細胞周期 | 39 | 13.9 | 3.4e-12 |
| M期 | 29 | 8.9 | 1.8e-11 |
| DNA修復 | 22 | 7.9 | 2.8e-10 |
| DNA複製 | 18 | 6.4 | 8.5e-10 |
| ストレスに対する細胞反応 | 27 | 9.6 | 5.0e-8 |
| リボヌクレオチド生合成 | 13 | 4.6 | 6.3e-6 |

【0097】

10

20

30

50

表 9 : 腹膜癌腫症と比較した、遠位転移サブクローンおよび原発性腫瘍前駆体において RNA - seq によって検出された再発過剰発現遺伝子の GO 分析 (補足データ 3 に詳述)。

【表 9】

| GO ターム | 遺伝子の # | 遺伝子の % | P 値 |
|----------------|--------|--------|---------|
| アセチル化 | 217 | 20.7 | 8.0e-28 |
| リン酸化タンパク質 | 428 | 40.0 | 5.3e-24 |
| タンパク質生合成 | 36 | 3.4 | 1.4e-14 |
| 核 | 256 | 24.4 | 1.8e-13 |
| リボヌクレオタンパク質 | 41 | 3.9 | 1.4e-12 |
| 翻訳 | 47 | 4.5 | 1.5e-12 |
| DNA 代謝プロセス | 53 | 5.1 | 4.5e-9 |
| 細胞周期 | 65 | 6.2 | 3.4e-7 |
| ミトコンドリア | 64 | 6.1 | 5.4e-7 |
| DNA 修復 | 31 | 3.0 | 5.2e-6 |
| 窒素化合物の生合成 | 33 | 3.1 | 1.1e-5 |
| ヌクレオチド結合 | 102 | 9.7 | 1.4e-6 |
| M 期 | 33 | 3.1 | 1.4e-5 |
| ストレスに対する細胞反応 | 47 | 4.5 | 2.5e-5 |
| 輸送ペプチド | 39 | 3.7 | 3.3e-5 |
| ヌクレオチド 生合成プロセス | 22 | 2.1 | 5.1e-5 |
| ATP 結合 | 82 | 7.8 | 5.3e-5 |
| DNA 複製 | 22 | 2.1 | 7.0e-5 |
| WD40 リピート | 24 | 2.3 | 1.4e-4 |

【 0 0 9 8 】

表 1 0 : DMSO 対照細胞と比較して、6 AN に応答して下方制御された RNA - seq によって検出された DE 遺伝子の GO 分析 (補足データ 3 に詳述される A 3 8 L g サブクローン)。

【表 10】

| GO ターム | 遺伝子の# | 遺伝子の% | P値 |
|--------------|-------|-------|---------|
| 細胞周期 | 226 | 12.2 | 2.5e-57 |
| アセチル化 | 465 | 25.2 | 5.6e-57 |
| リン酸化タンパク質 | 935 | 50.6 | 2.5e-55 |
| M期 | 135 | 7.3 | 1.2e-52 |
| DNA代謝プロセス | 153 | 13.2 | 2.6e-40 |
| 核 | 582 | 31.5 | 1.4e-34 |
| DNA複製 | 82 | 4.4 | 1.0e-33 |
| 染色体分離 | 45 | 2.4 | 3.1e-24 |
| DNA修復 | 88 | 4.5 | 5.6e-24 |
| 細胞質 | 444 | 24.0 | 3.5e-23 |
| ATP結合 | 221 | 12.0 | 4.1e-22 |
| ストレスに対する細胞反応 | 125 | 6.8 | 1.6e-19 |
| 染色体構成 | 107 | 5.8 | 9.3e-17 |
| 微小管ベースのプロセス | 70 | 3.8 | 3.6e-16 |
| ヌクレオチド結合 | 244 | 13.2 | 4.2e-16 |
| 細胞骨格 | 113 | 6.1 | 3.2e-15 |
| Ubl共役 | 103 | 5.6 | 9.5e-12 |
| DNA組換え | 36 | 1.9 | 1.6e-11 |
| 高分子複合体アセンブリ | 115 | 6.2 | 3.0e-10 |

【0099】

上記の知見は、遠位転移サブクローンにおける腫瘍形成性の6AN除去が、腫瘍形成能を維持するのに重要な癌関連遺伝子のエピジェネティック制御を介して媒介されるかもしれないという仮説を導いた。これを検証するために、詳細な実験のために2つの候補遺伝子を選択した：N-カドヘリン(CDH2)およびトポイソメラーゼ2(TOP2B)。CDH2およびTOP2Bは両方とも癌の進行に重要であると考えられ、PDACにおいて突然変異することは知られておらず、治療的に標的とされ得、RNA-seqにより遠位転移および原発腫瘍前駆体サブクローンにわたって繰り返し過剰発現され(補足データ3)、RT-PCRで確認した6ANによって選択的に抑制された(図6e上のパネル)。さらに、CDH2は6ANが標的とする再プログラムされたLOCK内に位置し、TOP2BはLOCK境界のすぐ隣に位置していた。対照および6AN処理細胞で実施したChIP-qPCRアッセイは、腹膜サブクローン中のこれらの遺伝子座にわたってH3K9Me2およびH3K27Acについてほぼ同一の濃縮を示した(図6e左パネルおよび図21a)。対照的に、同じ患者からの適合肺転移に対する6AN治療は、CDH2遺伝子領域にわたるH3K27Acの一致した減少を伴う両方の遺伝子座にわたるH3K9Me2の濃縮をもたらした(図6e右パネル、図21a)。これは、6AN治療の主要な下流効果が過剰発現した癌遺伝子のエピジェネティックな抑制であることを強く示唆していた。したがって、これらの遺伝子のノックダウンが腫瘍形成性を選択的に維持するのに重要であるかどうかを試験するためにRNAi実験を行った。確かに、RNAiはCDH2およびTOP2Bを過剰発現する遠位転移および前駆体サブクローンにおける3D腫瘍形成を選択的に遮断し、HPDE細胞または腹膜癌腫症には影響を及ぼさなかった(図6f)。まとめると、これらの標的検証研究は、6AN選択的標的遺伝子発現、エピジェネティック状態、および過剰発現癌遺伝子(CDH2/TOP2B)の下流の腫瘍形成機能によるPGD/oxPPPの阻害というシーケンスデータから推論される結論を強く支持

30

40

した。

図の説明

【0100】

図1：遠位転移の進展の間の全体的なエピジェネティックなリプログラミング。a、広範囲の腹膜癌腫症を呈した2人の患者から収集した6個のサブクローンからの腫瘍切片に対して行ったH3K9Me2/3に対する免疫組織化学(IHC)染色(a：患者A124、b：患者A141)は、全ての原発性腫瘍および腹膜サブクローンにわたって同様の強い核染色を示した。b、広範囲の遠位転移を呈した2人の患者(c：患者A125、d：患者A132)からの6個のサブクローン上の類似の染色は、転移を播種した原発性腫瘍サブクローンにおいて開始し(中央パネル)、さらに失われた(c)、または肝転移で安定的に遺伝された(d)核染色の進行性の喪失を示した。スケールバー=IHCの場合100μm、IFの場合20μm。c、腹膜癌腫症および遠位転移の両方を呈する患者(患者A38)からの4対のサブクローンを表す腫瘍切片に対して行われた示された修飾に対するIHCは、新生物を創設した親クローンに見られるように、癌腫症を播種した原発性腫瘍における腹膜前駆体サブクローンがヘテロクロマチン修飾の強い核染色を受け継いだことを示す。対照的に、遠位転移を播種した原発性腫瘍前駆体サブクローンは、対をなす肺転移において染色の完全な喪失と共に、染色における細胞間変動を示した。ユークロマチン修飾H3K36Me3についての染色は、すべてのサブクローンにわたって安定したままであった。f、組織上のIHCと同様に(e)、患者A38からの腹膜サブクローン(Per)、肝臓転移、および肺転移から収集した細胞株上のウエスタンブロットもまた、対応するアセチル化の増加と共に、遠位転移サブクローンにおけるヘテロクロマチン修飾の喪失を示した。H3K27Me3とH3K36Me3のレベルはサブクローン間で異ならなかった。g、腹膜癌腫症と比較した、遠位転移性サブクローン由来の細胞株にわたる示されたヒストン修飾についてのウエスタンブロット所見のデンストメトリー概要(補足図1b、c、n=8生物学的複製、エラーバー=標準誤差、*p<0.01)。

10

20

【0101】

図2：PDACサブクローン進展中のクロマチンドメインのエピゲノムリプログラミング。a、代表的(左パネル)および総計された(右パネル)ChIP-seq実験は、腹膜(A38Per)と遠位転移および原発性腫瘍前駆体サブクローン(他)との間のLOCKからのH3K9Me2の喪失を明らかにした。H3K27Me3はすべてのサブクローンで強力なままであった。b、細胞株(A38、A13、上のパネル)および凍結組織試料(A124、A125のパネル)の重亜硫酸塩配列データは、局所的な広域クローンおよび親クローン(A38Per、A124PrF、A124Per、A125PrF)からの試料が過剰メチル化LOCKを有することを示した。対照的に、遠位転移サブクローン(A125Lv1/2、A13Lg、A38Lv、A38Lg)およびそれらの原発性腫瘍サブクローン(A125PrS、A13Pr1、A13Pr2)は、同じLOCK領域にわたってDNAの低メチル化を示した。c、上記のように、サブクローンにわたって高メチル化対低メチル化を示す個々のLOCKの例。d、ECD内のH3K36Me3、H3K27Ac、およびDNAメチル化の全体的なレベルは、サブクローン間に明確な差を示さなかった。e、対照的に、遠位転移サブクローンおよび原発性腫瘍サブクローン(赤色の線)は、A38Per(黒色の線)からの同じDE遺伝子ECD領域と比較して、ECD内のDE遺伝子にわたって特異的にH3K36Me3およびH3K27Acの局所リプログラミングを示した。

30

40

【0102】

図3：再プログラムされたクロマチンドメインは異なる悪性特性をコードする。a、A38Lgは、A38Perと比較してH₂O₂処理に対して著しく耐性があった。MTTシグナルは未処理対照に対して正規化された細胞生存率を反映する。n=4の技術的反復、*p<0.03。b、LOCKからの再プログラムされたDE遺伝子のGO分析によって予測されるように、上皮およびEMTの分化に関するタンパク質についてのウエスタンブロットは、A38PerとA38Lgとの間で差次的に発現された。c、A38Lg

50

は、E C Dからの再プログラムされたD E 遺伝子のG O分析によって予測されるように、A 3 8 P e rと比較してゲムシタピンに対して完全に耐性であった。M T Tシグナルは未処理対照に対して正規化された細胞生存率を反映する $n = 4$ の技術的反復、 $* p < 0 . 0 1$ 。d、A 3 8 L gは、ウエスタンブロットにより、D N A修復経路の活性化と一致して、高レベルの γ H 2 A Xを有していた。e、ウエスタンブロットは、A 3 8 L gが高リン酸化E R Kを失うことを示し、f、A 3 8 P e rと比較してE R K標的治療に耐性であることを示した。M T Tシグナルは、未処理対照に対して正規化した細胞生存率を反映する。 $n = 4$ の技術的反復、 $* p < 0 . 0 3$ 。g、A 3 8 L gもまた、A 3 8 P e rと比較して、マトリゲル3 D腫瘍形成アッセイによるK R A Sノックダウンに対する感受性を失った。 $n = 4$ の技術的反復、 $* p < 0 . 0 1$ 。

10

【 0 1 0 3 】

図4：遠位転移サブクローンにおけるグルコース過剰代謝と6 P G枯渇。a、示されたサブクローン由来の同数(20K)の生育停止細胞に対して行われたM T Tアッセイは、H P D Eおよび局所領域P D A C試料と比較して、遠位転移サブクローンにわたって非常に高いシグナル(オキシドレダクターゼ活性)を示した($n = 4$ の技術的反復)。それぞれについて、エラーバー = $s . d . m$ 、 $* p < 1 0^{-5}$)。b、10 mMのグルコースあり(+)またはなし(-)でインキュベートし、24時間、1 mMの H_2O_2 で処理した(+、-)表示試料の正規化細胞数は、正常H P D E細胞がいずれのグルコース条件下でも H_2O_2 に対して感受性があることを示し、一方、局所領域のP D A C試料は、グルコースの利用可能性に関係なく H_2O_2 に耐性があった(それぞれ $n = 3$ の技術的複製、エラーバー = $s . d . m$)。c、対照的に、グルコースが培地中に存在しない場合、遠位転移サブクローンは H_2O_2 に対して感受性があった(それぞれについて $n = 3$ の技術的複製、エラーバー = $s . d . m$ 、 $* p < 0 . 0 0 1$)。d、解糖およびP P Pを通る $^{13}C - (1, 2) -$ 標識グルコースフローの略図。P P Pの酸化分枝に入るグルコースは、6 P GからR u 5 P ($m + 1$)への変換中に切断される1つの標識炭素を有するが、解糖または非酸化P P Pを通して移動するグルコースは両方の標識炭素($m + 2$)を保持する。クロストークは、いずれかの標識パターンを有するグルコースが他の経路に再侵入して取り込むことを可能にすることに留意されたい。e、ヌクレオチドおよび乳酸塩のL C - M Sは、これらの下流代謝産物が、対をなす腹腔サブクローン(A 3 8 P e r、 $n = 3$ の生物学的複製物)と比較して、患者A 3 8 (A 3 8 L g)からの肺転移におけるグルコースから非常に高い $^{13}C - 1, 2$ 標識を獲得したことを示した。エラーバー = $s . d . m$ 、 $* p < 0 . 0 1$)。f、6 P Gについての定常状態L C - H R M S測定は、腹膜癌腫症およびH P D E細胞と比較して、遠位転移およびそれらの前駆体にわたる代謝産物の完全な(N D : 検出されない)またはほぼ完全な喪失を示した(補足図10b)。

20

30

【 0 1 0 4 】

図5：遠位転移サブクローンにおけるP G D依存性。a、同じ患者からの対になった腹膜(A 3 8 P e r)および遠位転移(A 3 8 L g)サブクローンに対して行われた示されたヒストン修飾に対するウエスタンブロットは、培地からのグルコースの除去(左パネル)、P G D R N A i(中央パネル)、および6 A N処置(右パネル)によってH 3 K 9 M e 2 / 3の再プログラム化およびA 3 8 L gにおけるアセチル化の全体的レベルが逆転したことを示した。b、A 3 8 L g上のウエスタンブロットは、R N A iによるP G Dノックダウンが他のP P P成分またはK R A Sの発現を混乱させないことを示した。c、P G D R N A iは、3 Dマトリゲルアッセイにおいて腫瘍を形成する正常なH P D E細胞または局所領域P D A Cサンプルの能力に影響を及ぼさなかった(定量化された腫瘍数/ウェルで示される代表的顕微鏡写真、それぞれについて $n = 4$ の技術的複製、エラーバー = $s . d . m$)。d、対照的に、P G D R N A iは、迅速剖検コホートからの試験に利用可能であった全ての遠位転移サブクローンにわたって腫瘍形成を有意に減少させた(それぞれについて $n = 4$ の技術的反復、エラーバー = $s . d . m$ 、 $* p < 0 . 0 1$)。スケールバー：200 μ m。

40

【 0 1 0 5 】

50

図6：6ANによる再プログラムされたクロマチン、腫瘍形成性、および悪性遺伝子発現プログラムの逆転。a、補足図12aに示されるウエスタンブロットのデンストメトリー概要（ $n = 8$ の生物学的複製、エラーバー = $s.e.m.$ 、 $*p = 0.01$ ）。6ANは、 $H3K27Me3$ または $H4K20Me3$ に対する最小のまたは非再発性の効果で、最も遠い転移性サブクローンにわたって再プログラミングされた $H3K9Me2$ およびアセチル化を選択的に逆転させた。b、補足図12bに示すウエスタンブロットのデンストメトリー要約（ $n = 6$ の生物学的複製、エラーバー = $s.e.m.$ ）。6ANは、正常（HPDE、線維芽細胞）または局所領域のPDACサンプルにわたってヒストン修飾に対して最小限の影響しか及ぼさなかった。c、6ANは、遠位の転移サブクローンにまたがる3Dマトリゲルアッセイ（それぞれについて $n = 4$ の技術的反復、エラーバー = $s.d.m.$ 、 $*p < 0.01$ 、スケールバー： $200\mu m$ ）および3D腫瘍球アッセイ（補足図14c）における腫瘍形成を除去した。6ANは、いずれのアッセイによっても局所領域PDAC試料に最小限の影響しか及ぼさなかった（補足図14a、b）。d、6ANはまた、3D器官型間質培養物に注射した場合に、遠位転移サブクローンが腫瘍を形成する能力を遮断した（それぞれについて $n = 3$ の技術的複製、エラーバー = $s.d.m.$ 、 $*p < 0.05$ 、スケールバー： $200\mu m$ ）。e、リアルタイムRT-PCR（上のパネル）は、同じ患者からの腹膜サブクローン（A38Per）と比較して、遠位転移サブクローン（A38Lg）がCDH2を過剰発現し、その発現が6ANまで抑制されたことを示した。（2つの生物学的複製実験からの $n = 4$ のテクニカルPCR複製、エラーバー： $s.d.m.$ 、 $*p = 0.002$ ）。1.4Mbクロマチンドメインを横切って間隔を空けてPCRプライマー（番号で示す位置）を用いた $H3K9Me2$ および $H3K27Ac$ のChIPアッセイは、A38Lgにおいて対応する $H3K27Ac$ の喪失を伴う、A38Perに対する影響なしに、遺伝子座を横切る $H3K9Me2$ の拡散を6ANが誘発することを示した。（ $n = 2$ 生物学的複製、エラーバー = $s.e.m.$ ）。f、CDH2およびTOP2Bの両方に対するRNAiは、A38PerまたはHPDE細胞に影響を及ぼさずに、RNA-seqによってこれらの遺伝子を過剰発現した遠位転移および前駆体サブクローンにおける腫瘍形成を選択的に遮断した（それぞれ $n = 4$ の技術的反復、エラーバー = $s.d.m.$ 、 $*p < 0.01$ 、スケールバー： $200\mu m$ ）。遺伝子発現の特異的RNAiノックダウンを補足図15c、dに示す。

10

20

【0106】

30

図7：遠位転移サブクローンにわたって再プログラムされたクロマチン。a、ウエスタンブロットは、A38Per（Per）を含む局所領域PDACサンプル間の示されたヒストン修飾について最小のまたは矛盾する変化を示した。b、対照的に、A38Perと比較して、一群の遠位転移性サブクローンは、特定の修飾において反復性の変化を示した。c、原発性腫瘍サブクローン（Pr1、Pr2）と肺metとの間でも同じ患者から再プログラミングが観察された。

【0107】

図8：再プログラムされたヒストン修飾の特異性。a、Ki67染色は、腹膜および血清中で増殖させた適合肺metについて同様の細胞周期速度を示し、無血清培地（SFM）は成長を阻止した。b、示された時間についての一連の細胞数は、SFMにおける等しい増殖速度および増殖停止を確認した。c、血清対SFMで培養した細胞からのRNA配列データに対するGO分析は、SFMにおける増殖停止をさらに確認した（肺データ、腹膜は同一の結果を与えた）。d、ウエスタンブロットは、血清/増殖性（-）およびSFM/増殖停止（+）細胞において再プログラムされたクロマチン修飾の持続性を示した。e、PDAC化学療法（Gem：ゲムシタピン、G+FU：ゲムシタピン+5-フルオロウラシル）による腹膜サブクローンの処置は、腹膜転移と遠位転移との間に見られるようにメチル化の喪失またはアセチル化の獲得を誘発せず、リプログラミングが治療効果と無関係であることを確認した。

40

【0108】

図9：LOCK内のヘテロクロマチン修飾の濃縮。ヒストン修飾についてインプットす

50

るために正規化したChIP-seq読み取り密度のプロット(左のラベル)は、各サブクローンについて、ヘテロクロマチン修飾(H3K9Me2/3、H3K27Me3)がLOCK(0%~100%、下パネルラベル)と呼ばれる領域に富んでいることを示した(上のグラフに表示)。対照的に、ユークロマチン修飾(H3K36Me3、H3K27Ac)はLOCKから枯渇した。

【0109】

図10: PDACサブクローン進展の間のLOCK中のH3K9Me3のリプログラミング。a、対になった腹膜(A38Per)および肺(A38Lg)転移性サブクローンからのChIP-seqデータは、(LOCKドメインをマークする)H3K9Me2と重なる、A38Lg中のH3K9Me3の劇的な減少を検出した。b、A13Pr1原発性腫瘍サブクローンと比較した、A13Pr2/A13LgサブクローンにおけるLOCK領域からのH3K9Me3の喪失も示す、患者A13に関する同様のデータ。

10

【0110】

図11: LOCK内のDE遺伝子座の局所的リプログラミング。a、RNA配列(遠位metと前駆体対A38Per)からLOCKへのDE遺伝子のマッピングは、LOCKで下方制御された遺伝子の周囲のH3K27Me3およびH3K27Ac/H3K36Me3/DNAメチル化における相互変化を明らかにした。b、H3K27Me3およびH3K27Ac/H3K36Me3における反対の変化は、LOCKにおいて上方制御された遺伝子から検出された。DNAメチル化はこれらの領域で高いままであった。各比較のP値は補足データ3に記載されている。

20

【0111】

図12: ECD内のユークロマチン修飾の濃縮。ヒストン修飾の入力に対して正規化したChIP-seq読み取り密度のプロット(左のラベル)は、ユークロマチン修飾(H3K36Me3、H3K4Me3、H3K27Ac)が各サブクローンのECDと呼ばれる領域(0%~100%、下パネルラベル)に富むことを示した(グラフの上に表示)。対照的に、ヘテロクロマチン修飾(H3K9Me2/3、H3K27Me3)はECDから枯渇した。

【0112】

図13: PDAC進展中の大型LOCKのリプログラミング。a、H3K9Me3が濃縮され、そして大きなLOCKドメインにおいてDNAが低メチル化された。b~c、H3K9Me3/2の顕著なリプログラミングおよびDNAメチル化が、A38大型LOCKのサブセットにおいて検出された。d、H3K9Me3も大きなHPDE LOCKで強化された。e、サンプル間で再プログラムされたドメインの例。

30

【0113】

図14: A38サブクローン間の悪性異質性。a、オキシドレダクターゼ性能は、血清の不在下で同数の増殖停止細胞に対して行われたMTTアッセイで測定され、MTTシグナルはウェル当たりの全細胞数に対して正規化された。GOの結果と一致して、A38Lgはより高いオキシドレダクターゼ活性を有していた。n=4の技術的反復。b、NADPH/NADPレベルを同数の増殖停止細胞に対して酵素サイクリングアッセイで測定した。より多くのNADPH/100万細胞がA38Lgにおいて検出された。n=2の生物学的複製。c、A38PerおよびA38Lgは、示されるように、患者組織において、および3つの別々のインビトロ培養条件にわたって、十分に/あまり分化していない形態を維持した。d、原発腫瘍由来の固定組織に対して行われたIFは、E38Lgを播種した前駆体サブクローンにおいてビメンチンの増加と共にE-カドヘリンの喪失を示し、EMTと一致した。e、KRASのRNAiノックダウンは、懸濁アッセイにおいて、A38LgよりもA38Perにおいてより効率的にf、3D腫瘍形成を遮断した。n=4の技術的反復。

40

【0114】

図15: 大型LOCKとECDを標的とした再編成(再配列)。a、トータルブレークポイントは、大型LOCKまたはECD内で大幅に強化されなかった。b、典型的なLO

50

C Kとは異なり、大型LOCK/ECDブレイクポイントは相同ドメインからのブレイクポイントに有意に結合して再編成を形成した。c、転座および増幅を生じた大型ロック再編成の例。

【0115】

図16：遠位転移に亘って6PGレベルが枯渇したことによるグルコース代謝の増強。a、細胞外グルコース消費および乳酸塩分泌は、perと比較して遠位metにおいて上昇した。(n=3)。b、各サンプルについてプロットされた細胞内代謝産物レベルを伴う解糖(外側)およびPPP(囲み)代謝産物の概略図。データは、タンパク質に対して正規化したLC-MSシグナルを表す(n=3~5)。

【0116】

図17：6ANはグルコース代謝およびPPPのPGD段階を標的とする。a、6ANは、グルタミン/グルタメートに影響を与えずに、転移性サブクローンにおける細胞外グルコース消費および乳酸分泌の速度を選択的に遅くした。b、6ANは、PPPの下流の代謝産物への細胞内013標識グルコースの取り込みを減少させた。c、6ANは、PGD基質(6PG)および上流の代謝産物(G1、5L)の代謝産物レベルを大幅に増加させ、それに対応して下流の産物が減少した。

【0117】

図18：6ANは、遠位転移サブクローンの再プログラムされたクロマチン状態を選択的に調節した。a、6AN処置は、概して、遠位の転移性サブクローンにおける対応するアセチル化の減少を伴って全体的なH3K9Me2を増加させた。b、正常細胞および局所領域PDACはそのような変化を示さなかった。c、6AN変化は3d処理後も持続し(+)、続いてメディアから6ANを取り除いた(+/-)。

【0118】

図19：6AN標的化再プログラム化LOCK領域。a、6ANを抑制したDE遺伝子をA38LgLOCKにマッピングすると、これらは再プログラムされたLOCK-E1領域に位置することが明らかになった。b、6AN処理A38Lg対DMSO上のChIP-seqは、(A38PerLOCKに合わせて)再プログラムされた領域からLOCK全体のH3K9Me2の定量的増加を検出した。c、ChIP-seqはまた、d、変化のないH3K27Me3を有するLOCKにおいて抑制された遺伝子から特異的に6AN減少したH3K27Acを検出した。

【0119】

図20：6ANは、遠位転移サブクローンにおいて腫瘍形成を選択的に遮断した。a、6ANは、局所領域PDACサンプルが3-Dマトリゲルアッセイにおいて、またはb、3-D懸濁腫瘍球アッセイにおいて腫瘍を形成する能力を妨害しなかった。n=2~4。c、対照的に、6ANは、3-D懸濁腫瘍球アッセイ(図示)および3-Dマトリゲルアッセイ(図5b)において、遠位転移サブクローンが腫瘍を形成する能力を強くブロックした。n=4、p<0.003。スケールバー：200μM。

【0120】

図21：6ANに応答したTOP2B遺伝子座のリプログラミング。a、RT-qPCR(上のパネル)は、6ANがTOP2B肺転移性サブクローンを選択的に抑制することを示した。同様に、ChIPアッセイは、6ANが肺転移における遺伝子座を横切るH3K9Me2の拡散を誘発し、対の腹膜サブクローンには影響を及ぼさないことを示した。b、c代表的なRT-qPCRは、ピメンチンに対して最小の効果でCDH2およびTOP2BのRNAiノックダウンを確認した(ERKに対して正規化し、これは全ての条件にわたって等しく発現された)。

ディスカッション

【0121】

この研究の最初の主な結果は、転移特異的ドライバー変異、すなわち原発腫瘍のファウンダークローンにはまだ存在していないものの非存在下での遠位転移の進展の間の広範なエピジェネティックなリプログラミングであった。これらは、ヒストンH3K9の大規模

10

20

30

40

50

なりプログラミングおよび大型ヘテロクロマチンドメイン内のDNAメチル化（LOCKおよび低メチル化ブロック）、並びに遺伝子調節修飾の局所的な変化（H3K27Ac、H3K36Me3）を含んでいた。第二に、これらの変化はサブクローン進展中に出現した不均一な悪性特性を特定した。特に、同じ患者からの進展的に分岐（逸脱、相違：divergence）したサブクローンは、オキシドレダクターゼ能力、分化状態、化学療法抵抗性、癌遺伝子依存症、およびゲノム不安定性のパターンを含むそれらの個々の悪性特性と一致する再プログラム領域からの遺伝子発現の変化を示した。第三に、メタボロミクス、PGDの遺伝的ノックダウン、PGDの化学的阻害、および下流の標的遺伝子のノックダウンによって示されるように、遠位メタクローンサブクローンにおけるリプログラミングされたクロマチンおよび腫瘍形成性の側面を制御したのはoxPPPのPGD工程であった。これは、この同化グルコース経路が悪性のエピジェネティック状態および腫瘍形成特性を維持するために遠位転移の進展の間に選択されたことを強く示唆する。

10

【0122】

これらの発見はまた私達が他の研究で追求しているいくつかの重要だが複雑な質問を提起する。おそらく最も複雑なのは、患者にわたるサブクローン間のエピジェネティックで悪性の異質性の程度に関するものである。一人の患者でこれに答えるためには、全ゲノムマッピング、RNA配列、バイオインフォマティクス、およびいくつかの下流実験アプローチの組み合わせが必要とされた。

我々は、そのような異質性は進展の時間の関数であると仮定する：後期の広範囲に転移性の疾患を呈する患者は、初期の疾患を呈する患者よりも腫瘍におけるサブクローン間のエピジェネティックかつ悪性の分岐を有する可能性がある。この可能性は、そのような悪性の異質性が生じる前に、癌を早期に発見することの差し迫った必要性を強調している。

20

【0123】

また、PGD/oxPPP活性が全体的なエピジェネティック状態を制御する正確なメカニズムも不明瞭であり、これは複雑である可能性が高い。これは、酸化還元バランス、脂肪酸生合成、および/またはリポース生合成を含む、細胞代謝における既知のoxPPP依存性変化のいずれかを介して媒介される可能性があり、それらはいずれも、クロマチン修飾酵素の全クラスを活性化または阻害する代謝産物補因子の制御を通じて全体的なエピジェネティック状態に影響を及ぼし得る。PGD活性自体もまた複雑であり、そして転写過剰発現、転写後抑制、翻訳後修飾、タンパク質間相互作用、基質利用可能性、フィードバック阻害、他の経路とのクロストーク、および高度に保存されているが特徴付けられていない核画分を含む細胞内局在性（C.Lysiotois、私信）を含むいくつかの調節モードを受ける。PGD依存性は、異なる患者における遠位転移の進展中にこれらの機構のいずれかによって選択され得る。

30

【0124】

最後の質問は、全体的なエピジェネティックな変化が、サブクローン進展中の遺伝子発現の変化をコードする特定のクロマチンドメインをどのように標的としているかということである。我々は、これらの領域に直接結合する転写因子とクロマチン修飾酵素がリプログラミングイベントの標的化において主要な役割を果たすと仮定し、そしていくつかの候補が我々のRNA配列データセットにおいて繰り返し過剰発現された。これはヒストンデメチラーゼKDM1A（LSD1）を含み、これは我々が以前にこの酵素がLOCKリプログラミングを制御することを示し、そして他の研究がそれが乳癌転移を調節することを示したので特に重要である。

40

【0125】

要約すると、ここで報告されている同じサンプルの多くについてのディーブシーケンシング研究と組み合わせた我々の発見は、PDAC腫瘍形成を開始するためにドライバー変異が早期に発生し、その後不均一な代謝、後成的、悪性特性を生み出すサブクローン進化の期間が続くモデルを示唆する。ドライバー変異と同様に、それらを獲得する細胞への適合性の増加を付与するそれらの特性は、浸潤性腫瘍増殖および転移性増殖の間に選択されクローン的に拡大され得る。遠位転移性サブクローンで我々が観察する強いoxPPP

50

- P G D 依存性は、そのような選択を反映するかもしれない：遠位転移部位は経路に燃料を供給するために十分なグルコースを提供し、経路生成物（グルコース依存性 N A D P H ）はその部位内で遭遇する酸素種を減少させ、そして経路それ自体は腫瘍形成を促進するエピジェネティックプログラムに結合される。そのため、o x P P P を標的とすることによる悪性エピジェネティックプログラムの逆転は、すべてのヒト悪性腫瘍の中で最も致命的なもの1つである転移性 P D A C のための効果的な治療戦略を表し得る。

データ保管

【 0 1 2 6 】

すべての C h I P - s e q、R N A - s e q、および重亜硫酸塩 - s e q シーケンスデータは、次の U R L : ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=sxyjkaqsvfalheh&acc=GSE63126

10

にオンラインで保管されている（ G E O 番号： G S E 6 3 1 2 6 ）。

方法概要

【 0 1 2 7 】

組織サンプルおよび細胞株は、以前に記載されたように、迅速剖検によって P D A C 患者から以前に収集され、配列確認され、そしてマイコプラズマについてモニターされた。低継代（ 2 ~ 1 7 ）急速剖検細胞株を、 1 0 % ウシ胎児血清（ F B S、 G i b c o ）を含む D M E M 中で 3 7 ° C で培養した。 M T T アッセイについては、 1 5 , 0 0 0 細胞 / ウェルを 9 6 ウェルプレートに 3 連で蒔き、 1 2 時間後に処理し、そして 2 4 時間後（グルコース応答）または 6 日後（化学療法）に C e l l T i t e r 9 6（ P r o m e g a ）を用いてアッセイした。グルコース応答アッセイについては、栄養素欠乏 D M E M（グルコース、グルタミン、ピルビン酸塩、または血清なし）を指示されたようにグルコースを添加して使用した。グルコース依存性酸化ストレス分析のために、細胞を三重に蒔き、そして 8 0 % コンフルエントまで増殖させ、続いて 1 0 m M グルコースおよび 1 m M H₂O₂ を含むまたは含まない 1 0 % 透析 F B S を含有する栄養欠乏 D M E M 中で 2 4 時間インキュベートした。次いで細胞を P B S で洗浄し、トリプシン処理し、そして生存細胞を血球計で計数した。補足方法に記載されているように、グルコース取り込みおよび乳酸分泌を Y S I 7 1 0 0 バイオアナライザーで測定した。¹³C - 1 , 2 グルコース追跡および定常状態代謝産物プロファイリングのために、液体クロマトグラフィー（ L C U l t i m a t e 3 0 0 0 U H P L C ）と組み合わせた Q E x a c t i v e M S（ Q E - M S ; T h e r m o S c i e n t i f i c ）を前述のように代謝産物の分離および検出に使用した。詳細な条件は補足方法に記載されている。

20

30

【 0 1 2 8 】

記載のようにヒストンを酸抽出し、そして 3 . 5 μ g のヒストンについてウエスタンブロットを行い、これを、等しい負荷を確実にするためにウエスタンブロットの前にボンソー染色によってチェックした。デンストメトリーは I m a g e J ソフトウェアを用いて行った。 R N A を T r i z o l 試薬（ L i f e T e c h n o l o g i e s ）で抽出し、イソプロパノールで沈殿させた。ゲノム D N A を M a s t e r P u r e D N A 抽出試薬（ E p i c e n t e r ）で精製した。ホルマリン固定、パラフィン包埋（ F F P E ）組織マイクロアレイ切片（ T M A ）上の免疫組織化学、 H & E 染色、および免疫蛍光を標準的な手順に従って実施した。ウエスタンブロット、 I H C、および C h I P に使用される抗体を表 1 1 に示す。

40

【 0 1 2 9 】

表 1 1 : ウエスタンブロット、免疫染色、および C h I P 実験に使用された抗体と条件

【表 1 1】

| 抗体 | ソース | カタログ # | ウエスタン希釈 | 免疫希釈 |
|----------|---------------------|------------------|----------|----------------|
| CDH1 | Cell Signaling | 4065 | 1/500 | 1/100, IF |
| ビメンチン | NeoMarkers | Ms-129-P | 1/500 | 1/100, IF |
| G6PD | Cell Signaling | 8866S | 1/500 | N/A |
| PGD | Cell Signaling | 13389S | 1/500 | N/A |
| TKT | Cell Signaling | 8616S | 1/500 | N/A |
| TALDO1 | Santa Cruz | Sc-134795 | 2 ug/ml | N/A |
| ERK1/2 | Cell Signaling | 4696S | 1/500 | N/A |
| p-ERK1/2 | Cell Signaling | 4370S | 1/500 | N/A |
| KRAS | Santa Cruz | Sc-30 | 2 ug/ml | N/A |
| RPE | Santa Cruz | Sc-162124 | 2 ug/ml | N/A |
| RPIA | Abcam | Ab181235 | 1/500 | N/A |
| CD44 | Cell Signaling | 5640S | 1/500 | N/A |
| Epcam | Millipore | CBL251 | 1/500 | N/A |
| CDH2 | Cell Signaling | 4061S | 1/250 | N/A |
| H3K9Me2 | Abcam | ab1220 | 1/10,000 | 1/5000 IHC, IF |
| H3K9Me3 | Abcam | ab8898 | 1/10,000 | 1/5000 IHC |
| H3K27Me3 | Millipore | 07-449 | 1/7500 | N/A |
| H3K9Ac | Millipore | 07-352 | 1/10,000 | N/A |
| H3K36Me3 | Abcam | ab9050 | 1/10,000 | 1/5000 IHC |
| H3K27Ac | Abcam | ab4729 | 1/5000 | N/A |
| H4K20Me3 | Millipore | 07-463 | 1/1000 | 1/5000 IHC |
| H4K16Ac | Millipore, Abcam | 07-329, ab109463 | 1/10,000 | N/A |
| トータル H3 | Abcam | ab1791 | 1/30,000 | N/A |
| トータル H4 | Abcam | ab10158 | 1/30,000 | N/A |
| γH2AX | Abcam | ab11174 | 1/5,000 | N/A |

【 0 1 3 0 】

RNAi実験は、陰性対照 siRNA (Sigma、SIC001) および並行して、示された遺伝子に対して予め設計された siRNA オリゴヌクレオチド (Sigma, PGD: SASI Hs02 00334150, CDH2: SASI Hs01 00153995, TOP2B: SASI Hs02 00311874) を用いて、siRNA トランスフェクション (Oligofectamine, Life Technologies) を用いて実施した。突然変異体 KRAS^{G12V} (CUACGCCAACAGCUCCAAC) (配列番号 1) に対する siRNA は特注設計された。トランスフェクション後、細胞を siRNA と 4 日間インキュベートし、回収した。2-D での薬物治療のために、細胞を 70 ~ 80% の密集度まで増殖させ、そして 250 μM の 6AN または DMSO 陰性対照で 3 日間処理した。

【 0 1 3 1 】

三次元マトリゲルアッセイは、Cheung et al. (Control of alveolar differentiation by the lineage transcription factors GATA6 and HOPX inhibits lung adenocarcinoma metastasis. Cancer Cell 23, 725-38 (2013)) から適合させた。簡単に説明すると、二次元培養物を単一細胞にトリプシン処理し、4,000 細胞/mL を懸濁し、5% マト

リゲル (BD システム) および 2 % FBS (必要に応じて + / - DMSO / 6 AN) を含有する氷冷 DMEM 中に混合し、500 μ l を 24 ウェルの超低接着プレートに 4 回重複して播種し、腫瘍増殖を可能にするために少なくとも 7 日間インキュベートした。その後、整形された腫瘍を数え、代表的な写真を EVOS 機器で撮影した。記載されているように、超低接着性 6 ウェルプレート中、20,000 開始細胞 / ウェルで三次元懸濁腫瘍球アッセイを行い、そして腫瘍増殖の少なくとも 7 日後に腫瘍を計数 / 写真撮影した。

【0132】

器官型腫瘍形成アッセイは、Ridky et al. (P.A. Invasive three dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. Nat Med 16, 1450 5 (2010)) および Andl et al. (Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. J Biol Chem 278, 1824 30 (2003)) から適合させた。簡単に説明すると、6 ウェル透過性トランスウェルプレート (Costar 3414) を、10 \times DMEM を含む 1 mL の 1 型コラーゲン (無細胞層) で覆った。ヒト皮膚線維芽細胞 (ATCC) を氷冷 10 \times DMEM、10 % FBS、52.5 % コラーゲン、および 17.5 % マトリゲル (細胞層) の混合物中に懸濁し (12 \times 10⁶ 細胞 / mL)、十分に混合し、無細胞層上に 2 mL / ウェルでプレATING した。混合物を 37 $^{\circ}$ C で約 15 分間部分的に固化させ、続いて 1 \times 10⁶ 個の PDAC (20 μ l の DMEM に懸濁) 細胞を細胞層に 3 回注入した。インサートの上下の線維芽細胞増殖培地中で細胞を 24 時間インキュベートしてディスクの収縮を開始させた。次いで、DMSO または 6 AN を含む新鮮な培地を添加し、さらに 6 日間 2 日ごとに補充し、続いてインサートの下に DMSO または 6 AN を含む DMEM をさらに 7 日間添加した (上部には培地なし)。ディスクを採取し、10 % ホルマリン中で一晚固定し、薄切し、パラフィン包埋し、そして H & E で染色した。腫瘍を撮影し、cellSens Standard ソフトウェアを使用して Olympus BX 53 顕微鏡で測定した。

【0133】

ウエスタンプロットデンシトメトリー、MTT アッセイ、および腫瘍測定に Excel ソフトウェアを使用して、図の説明文に示されているように、技術的複製 (同時に並行して実施) または生物学的複製 (異なる時期に実施) 実験から収集したデータについて統計的有意性 (両側スチューデント t 検定) の試験を行った。Hansen et al. (Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. Nat Genet 43, 768 75 (2011)) に記載されているように、全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定および RNA 配列決定を HiSeq 装置 (Illumina) で行った。超音波処理を用いて固定細胞について先に記載したように ChIP アッセイを実施した。ChIP - qPCR の場合、等量の対のインプット / IP DNA をリアルタイム PCR (Roche LightCycler 96) によって増幅し、増幅度を計算した。プライマー配列は補足表 12 に列挙されている。ChIP - seq については、免疫沈降し、インプットした DNA をさらに 200 ~ 300 bp フラグメントに剪断し、アガロースゲル上でサイズ選択し、そして HiSeq (Illumina) または SOLiD (Applied Biosystems) フォーマットのいずれかで同等の結果で配列決定した。IP 配列決定読み取りをそれらの対応するインプットに対して正規化した。配列決定手順、ドメインコールを含むバイオインフォマティクス方法、および統計分析は、補足的方法の節に詳細に記載されている。

【0134】

表 12 . ChIP - qPCR および RT - PCR 実験に使用されるリアルタイム PCR プライマー配列

【表 1 2】

| 遺伝子座/アッセイ | プライマー名: 配列 (5' - 3') | 配列番号: |
|-------------|---|-------|
| CDH2 ChIP | Chr18_24.258F: GCTCAGCCCTGTATCAGCCAGC | 2 |
| CDH2 ChIP | Chr18_24.258R: GGGTTACAGGTATGAGCCACTGC | 3 |
| CDH2 ChIP | Chr18_24.506F: AATGGAGAAGTCAGGAATGTAGTCC | 4 |
| CDH2 ChIP | Chr18_24.506R: GTATTTTCAATTTATCAAGTTGCAGCTCC | 5 |
| CDH2 ChIP | Chr18_24.834F: TTTGCTTCTCACTCCAAGTTCATCC | 6 |
| CDH2 ChIP | Chr18_24.834R: CAACCTCAGGAACAATGCATCAGC | 7 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.125.6F: CGAAACAGTCCAGCTGCTATGG | 8 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.125.6R: CTTGGCTATTGTGACTGGTACTGC | 9 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.428.000F: CCAATGCACTAATTTAATGTCATGC | 10 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.428.000R: CGTGCTAATTTCTATGGTACTACTGG | 11 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.632F: CCTAATCCAATATGCCTGGTGTCC | 12 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.632R: CTGGAAGTCTGAGATCAAGGTGC | 13 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.778F: AATAATCACGAAGCACTTCTGTATTGC | 14 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.778R: TCACCAGCAGACATAGTCATACTTCC | 15 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.808F: CCTTGGAGGTGGAGTCTACAGAGG | 16 |
| CDH2 ChIP | Chr18_25.808R: CTGCTAGCGTAGCCATCTGAGATCG | 17 |
| | | |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.398F: GCCCTGTCTTCCCAGAATCATTGC | 18 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.398R: CATGAAGCCTATGAAGATCATTATGG | 19 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.540F: TTTAGCCAGCAAGTATTCTAGCATGG | 20 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.540R: GTCAGTGTGATTTCAGTAACAATGATGG | 21 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.622F: CCTGCTCAAGGCTGACATGTCACC | 22 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.622R: GTCGGACTCGATGGTCAGCACTGG | 23 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.733F: AACCCGAAACTTTCAATGCACTTGG | 24 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.733R: CTCCTCTATAGTGAAGACCCTAGG | 25 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.812F: TATGGCCATTCTTGCAGCAGTAAGG | 26 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.812R: AAAGTTGGCTAAGGACATGAATAGGC | 27 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.973F: GGAGATTCCCTCAGGTGCCTATAACC | 28 |
| TOP2B ChIP | Chr3_25.973R: CTGGTGTTCAGGCACCACTGAGG | 29 |
| | | |
| CDH2 RT-PCR | CDH2F: TTATTACTCCTGGTGCGAGT | 30 |
| CDH2 RT-PCR | CDH2R: GAGCTGATGACAAATAGCGG | 31 |
| | | |
| TOP2B RT- | TOP2BF: GTTACAGGTGGTCGTAATGGTT | 32 |
| TOP2B RT- | TOP2BR: TTGGCTTCAGAAGTCTTCATCA | 33 |

【 0 1 3 5 】

補足方法

Y S I 代謝物の分析。代謝産物消費量（グルコースおよびグルタミン）および生産量（乳酸塩およびグルタミン酸塩）は、Y S I 7 1 0 0 Bio analyzer を使用して測定した。指示された細胞株を、- 1 日目に 6 ウェルプレートにプレーティングした。0 日目に、細胞をカウントするか（3 ウェル）、または通常の培地または指示された化合物を補充した培地のいずれかで培養した。細胞プレーティングの 7 2 時間後に、組織培養上

清 (1 mL、n = 3、各条件) を回収した。組織培養条件は、栄養素の利用可能性および指数関数的な細胞増殖を確実にするために最適化された。代謝産物消費 / 産生データは、以前に記載されているように (Lee et al., 2014 : PMID : 24998913)、曲線下の細胞数面積に対して正規化した。曲線下面積 (AUC) は、 $N(T)d / \ln 2 (1 - 2^{-T/d})$ として計算され、ここで、N(T) は最終細胞数、d は倍增時間、そして T は実験時間である。倍增時間は $d = (T) [\log(2) / \log(Q2 / Q1)]$ として計算され、ここで Q1 は血球計を用いた手動計数により決定されるように開始細胞数でありそして Q2 は最終細胞数である。

【0136】

LC-HRMS 代謝産物プロファイリング。LC-HRMS サンプルを Liu らに記載されているように調製し分析した (Development and quantitative evaluation of a high resolution metabolomics technology. Anal Chem 86, 2175-84 (2014))。グルコース追跡実験のために、細胞を 3 連で 6 ウェルプレートに播種し、70 ~ 80% コンフルエントになるまで 10% FBS を含む DMEM 中で増殖させ、栄養欠乏 DMEM で 2 回洗浄し、10 mM の $^{13}\text{C}-1, 2$ 標識グルコース (Cayman) および 10% 透析 FBS (Invitrogen) を含有する栄養欠乏 DMEM 中でさらに 36 時間インキュベートした。追加の複製も含まれ、正規化のために実験の終わりにカウントされた。急速に培地を除去し、1 mL の予め冷却された (-80) LC-MS グレードの 80% メタノール (Sigma) を添加することによって代謝をクエンチし、-80 で少なくとも 20 分間インキュベートし、続いてメタノール中に掻き取り、そして遠心分離により代謝産物をペレット化した。薬物処理のために、細胞を標準 DMEM + / - DMSO / 6 AN 中で 36 時間インキュベートし、続いて標識グルコース培地 + / - DMSO / 6 AN 中でさらに 36 時間インキュベートし、上記のようにクエンチしそしてペレット化した。ペレットを等容量の 1 : 1 LC-MS グレードのアセトニトリル : メタノールおよび水に再構成し、5 μL を分析のために LC-QE-MS に注入した。定常状態測定のために、細胞を増殖培地 (PDAC 用の 10% FBS を含む DMEM、HPDE 用のケラチノサイト無血清培地) 中でそれらが 80 ~ 90% コンフルエントに達するまでインキュベートし、続いて血清なしの DMEM 中で 48 時間インキュベートした (PDAC については、比較のための標準増殖培地 HPDE 細胞もまた血清を含まなかった)。次いで代謝をメタノールでクエンチし、代謝産物を上記のようにペレット化した。ペレットをタンパク質含有量 (タンパク質 1 mg あたり 15 μL の 1 : 1 アセトニトリル : メタノールおよび 15 μL の水を使用した) に対して正規化した容量に再構成し、LC-QE-MS によって分析した。LC-QE-MS から収集した生データを、分析に必要とされるように解糖 / PPP 代謝産物を含む標的フレームシードを使用して、Sieve 2.0 (Thermo Scientific) で処理した。異なる試料中の検出された m/z および相対強度を含む出力ファイルはデータ処理後に得られ、そして各試料からの選択された代謝産物の複製はグラフに示されるようにグラフ化されそして提示された。

【0137】

配列決定ライブラリーの調製。2 ~ 10 ng の IP-ChIP DNA と 100 ng のインプット DNA からライブラリーを調製し、Illumina HiSeq (APF Laboratory) でシーケンスした。簡単に説明すると、試料をバイオアナライザーで 150 ~ 250 bp の品質および濃度について調べた。58 μL の反応緩衝液中でクレノウ (Klenow) ポリメラーゼを用いて DNA を末端修復した。IP DNA については、クレノウを 1 : 5 に希釈した。試料を 20 で 30 分間インキュベートし、続いて QIAquick PCR 精製カラムで精製した。次いで、A 尾部 (A-tail) を、NEB 緩衝液 2 中の Klenow および dATP を用いて 37 で 30 分間 DNA に添加し、QIAGEN MiniElute PCR 精製カラムで洗浄した。次いで、シーケンシングアダプターを室温で 15 分間 DNA に連結し、続いて MiniElute カラムで洗浄した。次に試料を 2% アガロースゲル上に流し、216 bp - 366 bp からの DNA (DNA + アダプター) をゲルから切り出し、そして QIAGEN Gel 抽出キ

ットを用いて精製した。次いで濃度をバイオアナライザーでチェックし、8 ngをPhusionポリメラーゼ (Fisher) で15サイクル (10秒間98、30秒間65、30秒間72) PCR増幅し、続いて72で5分間増幅した。次に試料をAmplureキット (Illumina) で洗浄し、80%エタノールで洗浄した。クリーンアップの最後にDNAサンプルを17.5 µlの緩衝液EB (Qiagen) に再懸濁し、製造者の指示に従ってIllumina HiSeqプラットフォーム上で次世代配列決定に供した。SOLIDシーケンシングのために、CHIP DNAを調製し、ジョンズホプキンスCRBIIコアファシリティで製造元のプロトコルに従って試料を処理した。

【0138】

BS-Seqデータ処理。100 bp対末端HiSeq2000シーケンシングリードを、以前にHansen et al. (Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. Nat Genet 43, 768-75 (2011)) に記載されているように、BSmouseパイサルファイトアライメントパイプライン (バージョン0.7.1) によってアライメントした。簡潔に説明すると、ヒトゲノム (hg19) およびラムダファージゲノムに対してBowtie2 (バージョン2.0.1) によって読み取り (リード) を整列 (アライメント) させた。整列後、各CpGについてのメチル化測定値を整列したリードから抽出した。我々は、マッピング品質 < 20 またはシトシン位置 < 10 のヌクレオチド塩基品質で測定値を除外し、また、対の両方の5'の10個のヌクレオチドからの測定値を削除した。次に、BSmoothのbsseqパッケージを使用して、小および大の示差メチル化領域 (DMR) を同定した。我々の分析には、すべての試料のうち少なくとも3のカバレッジを持つCpGのみが含まれていた。小さいDMRについては、20 CpGまたは1 kbの滑らかなウィンドウを使用し、小さいDMRを同定するために -4.6、4.6のt-統計的カットオフおよび20%を超えるメチル化差を使用した。一方、大型DMRについては、200 CpGまたは10,000 bpsの滑らかなウィンドウを使用し、大型DMRを同定するために、-2, 2のt-統計的カットオフ、10%を超えるメチル化差および5 kb超のDMRを使用した。

【0139】

RNA-Seqデータ処理100 bp対末端HiSeq2000配列決定リードを、デフォルトパラメータを用いてOSA (バージョン2.0.1) によってヒトゲノム (hg19) に対して整列させた。整列後、一意に整列したリードのみをさらなる分析のために残した。遺伝子注釈情報はENSEMBL (ensembl.com、リリース66) からダウンロードした。全サンプルの各遺伝子についての読み取り数をHTSeq (huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html) を使用して推定し、次いでDESeqパッケージを使用して示差的に発現された (DE) 遺伝子を同定するために使用した。FDR < 0.01 および倍率変化 > 1.5 を有する遺伝子をDE遺伝子と見なした。

【0140】

チップシーケンスデータ処理。46 bpのペアエンドのイルミナHiSeq2000配列決定データについては、Li et al. (Fast and accurate short read alignment with Burrows Wheeler transform. Bioinformatics 25, 1754-60 (2009)) に記載されているようにデフォルトパラメータを用いてBWAを使用してリードをヒトゲノム (hg19) に対して整列させた。アライメントの後、重複した読み取りは取り除かれ、ユニークにアライメントされた読み取りのみがさらなる分析のために保持された。48 bpのシングルエンドソリッドシーケンシングデータでは、Bowtie⁷を使用してデフォルトのパラメータで読み取りをアライメントし、その後の分析のためにユニークにアライメントされた読み取りのみを保持した。狭いヒストン修飾ピーク (H3K4Me3とH3K27Ac) では、デフォルトパラメータ⁸でMACS2をピークコールに使用した。広域ヒストン修飾濃縮 (H3K36Me3、H3K27me3、およびH3K9Me2/3) については、隠れマルコフモデル (HMM) に基づき、広域ヒストンピークを同定するために特別に設計されたSEGを使用してピークコーリングを行った (Song et al. (Identifying d

10

20

30

40

50

ispersed epigenomic domains from ChIP Seq data. *Bioinformatics* 27, 870 1 (2011))
を参照されたい。)。

【 0 1 4 1 】

大型クロマチンドメインの同定。R S E Gのピークコーリング結果に基づいて、ヘテロクロマチン修飾 (H 3 K 9 M e 2 / H 3 K 2 7 M e 3) の L O C Kドメインを定義する。簡潔に説明すると、5 k bより短いピークを最初に除去して、近くに多数の短いピークがある領域をL O C Kと呼ぶことを防止した。次に、2 0 k b未満の距離を持つ隣接ピークを1つのドメインにマージした。両方の生物学的複製において同定された1 0 0 K bを超える併合領域はL O C Kと呼ばれた。我々は、5 0 0 k bよりも常に大きく、H 3 K 9 M e 2が強く濃縮され、H 3 K 9 M e 2およびH 3 K 2 7 M e 3が枯渇し、そして境界にH 3 K 2 7 M e 3の強いピークが隣接しているL O C Kの別の独特なサブセットに気付いた。このため、本発明者らは、これらのL O C Kを、5 0 0 k bより大きく、その長さの5 0 %未満がH 3 K 2 7 m e 3と重複するH 3 K 9 M e 3領域によって定義した。最後に、対応するユークロマチン性H 3 K 4 M e 3 / H 3 K 2 7 A c調節ピークを有する少なくとも1つの遺伝子を含むヘテロクロマチンドメイン間の広い領域 (> 5 0 k b) をE C Dと定義した。H 3 K 2 7 A cだけでこれらの呼び出しに十分であることがわかったため、H 3 K 4 M e 3はA 3 8 P e r / L gの初期テストデータセットにも使用されたが、後続のデータセットでは必要とされなかった (A 1 3 P r 1 / 2、A 1 3 L g)。ドメインコールに使用されるすべてのコードは要求に応じて利用可能である。

【 0 1 4 2 】

異なる遺伝子群を定義する。遺伝子は、ユークロマチン (E C Dに位置する遺伝子領域の > 5 0 %) またはヘテロクロマチン (L O C KおよびG - L O C Kを含むそれらのヘテロクロマチンドメインに位置する遺伝子領域の > 5 0 %) 内に属すると分類された。これらの基準に合わず、「その他」として分類された、一握りの他の遺伝子。ChIP - seqおよびRNA - seqの定量化および濃縮プロット。定義された大型クロマチンドメインおよびそれらのランキング領域上の各ヒストン修飾をプロットするために、本発明者らは、クロマチンドメインのランキング配列を固定長 (b p) のビン (b i n) およびドメイン自体を各ドメイン長の固定百分率のビンに分割した。Hawk et al. (Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage committed human cells. *Cell Stem Cell* 6, 479 91 (2010)) に記載されているように、ChIP濃縮を測定し正規化した。簡潔に説明すると、配列決定された1 0 0万回の読み取りあたりのビンのキロベースあたりの読み取りの数を、各ChIPおよびその入力制御 (R P K M_{ChIP}およびR P K M_{input}として示される) について計算した。ChIP濃縮は、 $R P K M = R P K M_{ChIP} - R P K M_{input}$ として測定され、ChIP濃縮領域は $R P K M > 0$ を有すべきである。次に、すべての R P K Mを0から1の間のスケールに正規化し、すべての大きなクロマチンドメインにわたる平均の正規化ChIP濃縮シグナルを各ヒストンマークについてプロットした。RNA - S e qデータもまた、配列決定されそして同様にプロットされた1 0 0万回の読み取りあたりのビンのキロベースあたりの読み取りの数によって正規化された。

【 0 1 4 3 】

補足データ

補足データ1 . これは、ChIP - seq、WGBS、およびRNA - seq実験のすべての複製サンプルのシーケンス読み取り数 (トータル読み取り数とユニークアラインメント読み取り数) を示し、複製サンプル間の相関係数を含む。

【 0 1 4 4 】

補足データ1 A : すべての複製サンプルについてのChIP - seq読み取りの概要

【表 1 3 - 1】

| 試料 (名称_複製 #_IP 抗体) | トータル 読み取り | 一意に整列さ れた読み取り | |
|-----------------------|--------------|------------------|---|
| 38Per_1_K27ac | 27,100,820 | 23,396,028 | |
| 38Per_2_K27ac | 20,750,076 | 17,913,278 | |
| 38Lg_1_K27ac | 22,821,996 | 19,946,514 | |
| 38Lg_2_K27ac | 25,996,970 | 22,475,058 | |
| 38Per_1_K9ac | 27,148,594 | 22,200,344 | |
| 38Per_2_K9ac | 25,585,898 | 18,706,456 | |
| 38Lg_1_K9ac | 26,607,612 | 21,750,232 | |
| 38Lg_2_K9ac | 28,316,524 | 23,222,230 | |
| 38Per_1_K4me3 | 28,059,734 | 23,718,542 | |
| 38Per_1_K4me3 | 43,068,697 | 20,704,383 | |
| 38Lg_2_K4me3 | 24,455,456 | 21,184,788 | |
| 38Lg_2_K4me3 | 44,715,633 | 17,458,603 | |
| 38Per_1_K36me3 | 44,738,783 | 23,961,134 | |
| 38Per_2_K36me3 | 25,140,434 | 19,239,814 | |
| 38Lg_1_K36me3 | 25,532,398 | 18,263,078 | |
| 38Lg_2_K36me3 | 48,929,336 | 24,747,992 | |
| 38Per_1_K27me3 | 26,546,612 | 21,523,318 | |
| 38Per_1_K27me3 | 47,076,156 | 21,613,912 | |
| 38Lg_2_K27me3 | 25,528,442 | 20,886,386 | |
| 38Lg_2_K27me3 | 44,444,667 | 16,568,247 | |
| 38Per_1_K9me2 | 69,629,048 | 55,830,176 | |
| 38Per_K9me2_2 | 64,949,506 | 51,281,848 | |
| 38Lg_K9me2_1 | 51,787,694 | 39,725,736 | |
| 38Lg_2_K9me2 | 71,421,136 | 55,643,850 | |
| 38Per_1_K9me3 | 28,530,078 | 18,843,038 | |
| 38Per_2_K9me3 | 30,869,994 | 19,860,544 | |
| 38Lg_1_K9me3 | 33,055,178 | 20,251,534 | |
| 38Lg_2_K9me3 | 36,205,418 | 22,568,940 | |
| 38Per_1_Input | 28,748,102 | 22,637,100 | 38Per_1 K16ac, K27ac, K9ac, K4me3, K27me3, K9me2およびK9me3について |
| 38Per_1_Input | 43,698,893 | 20,955,594 | 38Per_1 Solid K4me3, K36me3およ び K27me3について |
| 38Per_1_Input | 78,376,368 | 61,062,024 | 38Per_1 K9me2について |
| 38Per_2_Input | 26,162,800 | 20,358,392 | 38Per_2 K16ac, K9ac, K36me3, K9me2およびK9me3について |
| 38Per_2_Input | 22,795,752 | 17,717,432 | 38Per_2 K27acについて |
| 38Per_2_Input | 73,425,982 | 57,237,686 | 38Per_2 K9me2について |
| 38Lg_1_Input | 30,391,444 | 23,128,054 | 38Lg_1 K16ac, K27ac, K9acおよび K9me3について |
| 38Lg_1_Input | 26,527,468 | 20,878,592 | 38Lg_1 K36me3およびK9me2について |
| 38Lg_1_Input | 56,918,912 | 44,006,646 | 38Lg_1 K9me2について |
| 38Lg_2_Input | 24,372,670 | 21,204,480 | 38Lg_2 K16ac, K27ac, K9ac, K4me3, K27me3およびK9me3について |
| 38Lg_2_Input | 43,698,893 | 19,884,219 | 38Lg_2 Solid K4me3およびK27me3について |
| 38Lg_2_Input | 42,655,553 | 25,391,128 | 38Lg_2 Solid K36me3について |
| 38Lg_2_Input | 82,576,576 | 65,151,312 | 38Lg_2 K9me2について |

【表 13 - 2】

| | | | |
|----------------|------------|------------|----------------------------|
| 13Pr2_1_K27Me3 | 45,562,122 | 35,405,382 | |
| 13Pr2_2_K27Me3 | 48,647,198 | 37,601,820 | |
| 13Pr2_1_K36Me3 | 50,525,636 | 40,320,884 | |
| 13Pr2_2_K36Me3 | 43,172,826 | 34,777,556 | |
| 13Pr2_1_K9Me3 | 52,034,354 | 28,398,244 | |
| 13Pr2_2_K9Me3 | 47,846,284 | 27,025,984 | |
| 13Pr2_1_K27Ac | 39,057,664 | 32,754,504 | |
| 13Pr2_2_K27Ac | 45,988,666 | 38,419,042 | |
| 13Pr2_1_K9Me2 | 36,367,760 | 27,747,040 | |
| 13Pr2_2_K9Me2 | 49,421,058 | 36,685,524 | |
| 13Pr2_1_Input | 42,932,496 | 34,453,136 | 13Pr2_1 K27AcおよびK9Me2について |
| 13Pr2_2_input | 39,166,036 | 31,527,030 | 13Pr2_2 K27AcおよびK9Me2について |
| 13Pr2_1_Input | 43,812,050 | 33,019,642 | 13Pr2_1 K36Me3について |
| 13Pr2_2_Input | 42,483,790 | 32,000,834 | 13Pr2_2 K36Me3について |
| 13Pr2_1_Input | 36,646,218 | 27,841,600 | 13Pr2_1 K27Me3およびK9Me3について |
| 13Pr2_2_Input | 37,605,184 | 28,502,806 | 13Pr2_2 K27Me3およびK9Me3について |
| 13Pr1_1_K27Me3 | 42,464,788 | 32,291,936 | |
| 13Pr1_2_K27Me3 | 42,717,990 | 32,886,274 | |
| 13Pr1_1_K36Me3 | 45,628,144 | 34,403,256 | |
| 13Pr1_2_K36Me3 | 47,010,260 | 35,169,858 | |
| 13Pr1_1_K27Ac | 42,969,352 | 36,362,084 | |
| 13Pr1_2_K27Ac | 52,912,056 | 43,709,782 | |
| 13Pr1_1_K9Me3 | 43,261,454 | 27,946,136 | |
| 13Pr1_2_K9Me3 | 48,134,638 | 30,111,834 | |
| 13Pr1_1_K9Me2 | 51,237,440 | 37,126,410 | |
| 13Pr1_2_K9Me2 | 44,260,552 | 34,079,972 | |
| 13Pr1_1_K4Me3 | 47,817,718 | 40,460,332 | |
| 13Pr1_2_K4Me3 | 39,916,242 | 34,219,430 | |
| 13Pr1_1_Input | 27,015,968 | 21,991,728 | 13Pr1_1 K9Me3およびK9Me2について |
| 13Pr1_2_Input | 42,754,918 | 34,651,668 | 13Pr1_2 K9Me3およびK9Me2について |
| 13Pr1_1_Input | 37,703,540 | 30,589,064 | 13Pr1_1 K36Me3およびK27Acについて |
| 13Pr1_2_Input | 37,251,906 | 30,188,840 | 13Pr1_2 K36Me3およびK27Acについて |
| 13Pr1_1_Input | 45,330,014 | 36,495,018 | 13Pr1_1 K27Me3およびK4Me3について |
| 13Pr1_2_Input | 41,671,660 | 33,507,094 | 13Pr1_2 K27Me3およびK4Me3について |
| 13Lg_1_K27Me3 | 46,174,838 | 35,837,518 | |
| 13Lg_2_K27Me3 | 47,763,132 | 36,963,900 | |
| 13Lg_1_K36Me3 | 48,735,296 | 39,047,890 | |
| 13Lg_2_K36Me3 | 44,439,570 | 35,973,060 | |
| 13Lg_1_K27Ac | 52,682,716 | 44,187,348 | |
| 13Lg_2_K27Ac | 38,043,964 | 32,298,344 | |
| 13Lg_1_K9Me3 | 44,449,474 | 25,717,050 | |
| 13Lg_2_K9Me3 | 49,020,848 | 28,456,692 | |
| 13Lg_1_K9Me2 | 40,580,872 | 31,979,380 | |
| 13Lg_2_K9Me2 | 42,760,754 | 33,395,094 | |
| 13Lg_1_input | 53,086,242 | 42,631,966 | 13Lg_1 K27AcおよびK9Me2について |
| 13Lg_2_input | 41,676,088 | 33,503,572 | 13Lg_2 K27AcおよびK9Me2について |
| 13Lg_1_Input | 40,822,392 | 31,354,916 | 13Lg_1 K36Me3について |
| 13Lg_2_Input | 45,292,342 | 35,189,166 | 13Lg_2 K36Me3について |

【表 1 3 - 3】

| | | | |
|--------------------------|------------|---------------|---------------------------|
| 13Lg_1_Input | 49,243,126 | 37,741,490 | 13Lg_1 K27Me3およびK9Me3について |
| 13Lg_2_Input | 47,226,322 | 36,317,110 | 13Lg_2 K27Me3およびK9Me3について |
| HPDE_1_K27Me3 | 41,619,730 | 1,644,221,182 | |
| HPDE_2_K27Me3 | 45,844,562 | 1,870,133,582 | |
| HPDE_1_K36Me3 | 38,327,244 | 28,084,826 | |
| HPDE_2_K36Me3 | 35,519,752 | 27,012,400 | |
| HPDE_1_K27Ac | 52,294,724 | 43,428,888 | |
| HPDE_2_K27Ac | 35,271,886 | 30,001,598 | |
| HPDE_1_K9Me3 | 49,006,354 | 31,150,780 | |
| HPDE_2_K9Me3 | 49,995,186 | 31,313,578 | |
| HPDE_1_K9Me2 | 47,415,884 | 36,297,824 | |
| HPDE_2_K9Me2 | 47,621,364 | 36,772,334 | |
| HPDE_1_K4Me3 | 45,262,500 | 39,528,934 | |
| HPDE_2_K4Me3 | 34,511,978 | 30,181,046 | |
| HPDE_1_Input | 50,286,666 | 40,743,792 | HPDE_1 K9Me3およびK9Me2について |
| HPDE_2_Input | 45,780,736 | 37,154,676 | HPDE_2 K9Me3およびK9Me2について |
| HPDE_1_Input | 36,424,754 | 29,600,008 | HPDE_1 K36Me3およびK27Acについて |
| HPDE_2_Input | 48,330,362 | 39,054,926 | HPDE_2 K36Me3およびK27Acについて |
| HPDE_1_Input | 38,269,792 | 30,829,930 | HPDE_1 K27Me3およびK4Me3について |
| HPDE_2_Input | 37,635,368 | 30,421,766 | HPDE_2 K27Me3およびK4Me3について |
| 38Lg_DMSO_1_K27Me3 | 45,364,340 | 33,889,440 | |
| 38Lg_DMSO_2_K27Me3 | 37,628,254 | 29,077,804 | |
| 38-5 DMSO_1 K9Me2 | 57,024,354 | 42,891,924 | |
| 38Lg_DMSO_1_K27Ac | 44,665,878 | 37,664,038 | |
| 38-5_DMSO_1_Input_batch4 | 69,705,942 | 56,571,128 | 38-5_DMSO_1 K9Me2について |
| 38Lg_DMSO_1_Input | 37,296,752 | 30,470,440 | 38Lg_DMSO_1 K27Acについて |
| 38Lg_DMSO_1_Input | 49,727,864 | 40,284,668 | 38Lg_DMSO_1 K27Me3について |
| 38Lg_DMSO_2_Input | 40,505,458 | 32,886,902 | 38Lg_DMSO_2 K27Me3について |
| 38Lg_6AN_1_K27Me3 | 50,310,568 | 39,528,064 | |
| 38Lg_6AN_2_K27Me3 | 38,884,546 | 32,325,978 | |
| 38-5_6AN_1 K9Me2 | 33,324,396 | 24,956,330 | |
| 38Lg_6AN_1_K27Ac | 40,895,998 | 34,565,998 | |
| 38-5_6AN_1_Input_batch4 | 42,480,878 | 34,537,520 | 38-5_6AN_1 K9Me2について |
| 38Lg_6AN_1_Input_batch3 | 40,615,920 | 33,033,908 | 38Lg_6AN_1 K27Acについて |
| 38Lg_6AN_1_Input_batch5 | 45,637,332 | 37,039,730 | 38Lg_6AN_1 K27Me3について |
| 38Lg_6AN_2_Input_batch5 | 36,771,474 | 29,835,218 | 38Lg_6AN_2 K27Me3について |
| トータル | | 7,441,856,062 | |

【 0 1 4 5 】

補足データ 1 B : すべての複製サンプルについての W G B S 読み取りの概要

【 表 1 4 】

| 試料 | トータル 読み取り | 整列された 読み取り | トータル CpGs | 整列された CpGs | 複製ごとの カバレッジ |
|-------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|----------------|
| 38Per rep1 | 281,674,084 | 234,515,645 | 28,217,448 | 24,736,894 | 5.74 |
| 38Per rep2 | 279,677,926 | 233,819,498 | 28,217,448 | 24,668,800 | 5.65 |
| 38Lg rep1 | 246,354,388 | 242,041,867 | 28,217,448 | 24,079,382 | 4.96 |
| 38Lg rep2 | 293,066,340 | 203,060,037 | 28,217,448 | 24,568,234 | 5.87 |
| 38-Lv rep1 | 481,671,728 | 394,675,778 | 28,217,448 | 25,699,745 | 12.06 |
| 38-Lv rep2 | 550,721,820 | 443,244,002 | 28,217,448 | 25,797,654 | 13.57 |
| 13Pr2 rep1 | 470,251,572 | 378,466,223 | 28,217,448 | 25,763,514 | 11.83 |
| 13Pr2 rep2 | 515,334,056 | 421,725,378 | 28,217,448 | 25,287,251 | 12.01 |
| 13Pr1 rep1 | 421,949,244 | 340,966,300 | 28,217,448 | 25,733,843 | 10.58 |
| 13Pr1 rep2 | 383,229,986 | 308,746,570 | 28,217,448 | 25,613,462 | 9.58 |
| 13Lg rep1 | 489,959,480 | 400,936,046 | 28,217,448 | 25,342,333 | 11.59 |
| 13Lg rep2 | 505,568,682 | 415,435,288 | 28,217,448 | 25,358,384 | 11.74 |
| HPDE rep1 | 319,334,144 | 259,838,538 | 28,217,448 | 25,498,338 | 8.14 |
| HPDE rep2 | 409,472,974 | 329,823,993 | 28,217,448 | 25,755,008 | 10.07 |
| 38Lg DMSO rep1 | 381,562,458 | 313,237,618 | 28,217,448 | 25,509,209 | 9.67 |
| 38Lg DMSO rep2 | 462,809,566 | 378,726,614 | 28,217,448 | 25,716,790 | 11.67 |
| 38Lg 6AN rep1 | 668,822,798 | 546,162,307 | 28,217,448 | 25,987,966 | 16.62 |
| 38Lg 6AN rep2 | 408,683,276 | 329,596,955 | 28,217,448 | 25,586,266 | 10.20 |
| A124PerMet | 388,402,336 | 313,722,746 | 28,217,448 | 25,551,642 | 7.39 |
| A124Pr | 348,071,524 | 281,407,466 | 28,217,448 | 25,424,592 | 6.73 |
| 正常 | 335,262,856 | 264,003,665 | 28,217,448 | 25,423,437 | 6.37 |
| A125LvMet2 | 299,092,468 | 241,196,683 | 28,217,448 | 24,124,822 | 5.55 |
| A125LvMet1 | 256,878,816 | 210,595,185 | 28,217,448 | 24,190,459 | 5.09 |
| A125Pr2 | 274,964,060 | 226,288,821 | 28,217,448 | 24,326,375 | 5.39 |
| A125Pr1 | 338,097,576 | 277,039,476 | 28,217,448 | 25,344,423 | 6.55 |
| トータル | | 7,989,272,699 | | | |

【 0 1 4 6 】

補足データ 1 C : すべての複製サンプルについての R N A - s e q 読み取りの概要

【表 15】

| 試料 | トータル 読み取り | 一意に整列され た読み取り | 少なくとも1つの読 み取りを持つ遺伝子 |
|-----------------|--------------|------------------|------------------------|
| 38Per rep1 | 136,981,522 | 126,989,515 | 24,629 |
| 38Per rep2 | 209,196,426 | 194,285,575 | 25,767 |
| 38Per SFM rep1 | 131,806,836 | 120,661,977 | 23,750 |
| 38Per SFM rep2 | 170,418,406 | 157,947,694 | 25,204 |
| 38Lg rep1 | 157,009,238 | 146,313,205 | 22,347 |
| 38Lg rep2 | 126,740,896 | 118,431,884 | 21,849 |
| 38Lg SFM rep1 | 157,587,660 | 144,483,739 | 23,085 |
| 38Lg SFM rep2 | 136,421,728 | 124,124,770 | 22,387 |
| 38-Lv rep1 | 121,404,350 | 99,124,421 | 23,033 |
| 38-Lv rep2 | 201,919,638 | 160,412,909 | 24,203 |
| 13Pr2 rep1 | 189,720,644 | 163,161,693 | 25,011 |
| 13Pr2 rep2 | 154,397,366 | 132,746,732 | 24,122 |
| 13Pr1 rep1 | 194,020,194 | 152,395,660 | 25,013 |
| 13Pr1 rep2 | 159,731,916 | 124,045,393 | 24,300 |
| 13Lg rep1 | 258,937,646 | 222,764,245 | 25,530 |
| 13Lg rep2 | 104,375,982 | 89,301,099 | 24,908 |
| HPDE rep1 | 142,777,652 | 115,147,712 | 23,274 |
| HPDE rep2 | 148,752,028 | 119,731,612 | 23,348 |
| 38Per DMSO rep1 | 103,160,056 | 90,683,198 | 23,718 |
| 38Per DMSO rep2 | 205,086,938 | 175,208,405 | 25,285 |
| 38Per 6AN rep1 | 163,145,386 | 144,907,391 | 24,514 |
| 38Per 6AN rep2 | 163,346,616 | 145,684,561 | 24,049 |
| 38Lg DMSO rep1 | 183,580,116 | 158,065,524 | 23,609 |
| 38Lg DMSO rep2 | 177,808,970 | 156,924,338 | 23,334 |
| 38Lg 6AN rep1 | 231,471,388 | 201,726,950 | 24,544 |
| 38Lg 6AN rep2 | 181,401,400 | 157,469,565 | 23,376 |
| トータル | | 3,742,739,767 | |

【0147】

補足データ1D：各複製についての配列決定相関係数の概要

【表 1 6】

| 試料 | 修飾 | 複製間の相関係数 |
|---------------|--------|-----------|
| 38Per | K4Me3 | 0.8487501 |
| 38Per | K36Me3 | 0.7908561 |
| 38Per | K27Me3 | 0.8087827 |
| 38Per | K9Me2 | 0.9533903 |
| 38Per | K9Me3 | 0.973981 |
| 38Per | K9Ac | 0.8405352 |
| 38Per | K27Ac | 0.9662306 |
| 38Per | K16Ac | 0.8958976 |
| 38Lg | K4Me3 | 0.8977917 |
| 38Lg | K36Me3 | 0.7457856 |
| 38Lg | K27Me3 | 0.8283084 |
| 38Lg | K9Me2 | 0.9345982 |
| 38Lg | K9Me3 | 0.9870598 |
| 38Lg | K9Ac | 0.8557192 |
| 38Lg | K27Ac | 0.9749662 |
| 38Lg | K16Ac | 0.8634484 |
| 13Pr2 | K27Ac | 0.9795735 |
| 13Pr2 | K27Me3 | 0.957889 |
| 13Pr2 | K36Me3 | 0.970403 |
| 13Pr2 | K9Me2 | 0.9710885 |
| 13Pr2 | K9Me3 | 0.9918936 |
| 13Pr1 | K27Ac | 0.9797524 |
| 13Pr1 | K27Me3 | 0.9481441 |
| 13Pr1 | K36Me3 | 0.9697859 |
| 13Pr1 | K9Me2 | 0.9238059 |
| 13Pr1 | K9Me3 | 0.9841044 |
| 13Pr1 | K4Me3 | 0.9969566 |
| 13Lg | K27Ac | 0.9824737 |
| 13Lg | K27Me3 | 0.9518218 |
| 13Lg | K36Me3 | 0.9647369 |
| 13Lg | K9Me2 | 0.9505661 |
| 13Lg | K9Me3 | 0.9927826 |
| HPDE | K27Ac | 0.9969341 |
| HPDE | K27Me3 | 0.9694532 |
| HPDE | K36Me3 | 0.9582686 |
| HPDE | K9Me2 | 0.9820727 |
| HPDE | K9Me3 | 0.9655677 |
| HPDE | K4Me3 | 0.991134 |
| 38Lg_DMS O | K27Ac | 0.9523149 |
| 38Lg_DMS O | K27Me3 | 0.9190836 |
| 38Lg_DMS O | K36Me3 | 0.8830686 |
| 38Lg_6AN | K27Ac | 0.9515394 |
| 38Lg_6AN | K27Me3 | 0.9328865 |
| 38Lg_6AN | K36Me3 | 0.8750725 |
| | 平均 | 0.9331653 |
| | 中央値 | 0.9556397 |

【 0 1 4 8 】

補足データ 2 . これは、中央長さ (median length)、範囲、%ゲノム範囲、各ドメインタイプの個々のヒストン修飾レベルを含む、各サンプルの LOCK、大型 LOCK、および ECD のクロマチンドメイン呼び出しの概要を提供する。個々のヘテロクロマチン修飾のそれぞれについての中央長さ、範囲、および %ゲノム範囲 (ドメインの位置にかかわらず) も個々に含まれる。

【 0 1 4 9 】

補足データ 2 A : C h I P - s e q によって検出された大型クロマチンドメインの概要

【表 1 7】

10

| 試料 (名称, ソース) | ドメイン | Nos. | 範囲 (bp) | 中央値 長さ (bp) | トータル 長さ (bp) | ゲノム の% | K9Me2 濃縮 (Δ RPKM) | K9Me3 濃縮 (Δ RPKM) | K27Me3 濃縮 (Δ RPKM) |
|--------------------|-------------|-------|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| A38Per, 腹膜 | LOCKS | 2,648 | 100,001 ~ 24,067,001 | 311,251 | 1,547,508,645 | 54.11% | 0.082 | 0.003 | 0.102 |
| | ECDs | 2,021 | 50,499 ~ 8,760,499 | 271,999 | 895,772,411 | 31.32% | -0.116 | -0.225 | -0.139 |
| | 大型 LOCKS | 344 | 500,501 ~ 10,773,501 | 1,287,251 | 589,313,343 | 20.61% | 0.012 | 0.458 | -0.020 |
| A38Lg, 肺 Met | LOCKS | 3,166 | 100,001 ~ 14,074,501 | 298,251 | 1,627,719,164 | 56.91% | 0.069 | -0.101 | 0.118 |
| | ECDs | 2,318 | 50,499 ~ 12,388,255 | 241,499 | 838,469,352 | 29.32% | -0.112 | -0.243 | -0.159 |
| | 大型 LOCKS | 226 | 505,501 ~ 10,428,001 | 1,340,751 | 416,070,225 | 14.55% | 0.004 | 1.040 | -0.152 |
| A13Pr1, 原発1 | LOCKS | 2,446 | 100,001 ~ 30,694,501 | 279,501 | 1,745,065,095 | 61.02% | 0.038 | 0.063 | 0.124 |
| | ECDs | 2,008 | 50,499 ~ 5,944,499 | 255,167 | 914,964,363 | 31.99% | -0.062 | -0.176 | -0.221 |
| | 大型 LOCKS | 77 | 504,001 ~ 5,223,501 | 994,501 | 97,292,576 | 3.40% | -0.045 | 0.640 | 0.043 |
| A13Pr2, 原発2 | LOCKS | 2,862 | 100,001 ~ 24,749,001 | 298,251 | 1,845,941,860 | 64.54% | 0.065 | 0.051 | 0.107 |
| | ECDs | 1,968 | 50,499 ~ 10,621,499 | 277,249 | 914,565,095 | 31.98% | -0.122 | -0.141 | -0.199 |
| | GHDs | 50 | 501,501 ~ 1,742,001 | 711,001 | 40,355,550 | 1.41% | 0.015 | 0.990 | -0.112 |
| A13Lg, 肺 Met | LOCKS | 3,140 | 100,001 ~ 31,395,001 | 293,501 | 2,052,192,139 | 71.75% | 0.048 | 0.027 | 0.089 |
| | ECDs | 1,935 | 50,499 ~ 3,447,581 | 207,499 | 672,028,952 | 23.50% | -0.125 | -0.155 | -0.231 |
| | 大型 LOCKS | 111 | 500,501 ~ 2,878,501 | 735,501 | 100,336,111 | 3.51% | -0.034 | 0.558 | -0.180 |

【 0 1 5 0 】

補足データ 2 B : C h I P - s e q によって検出された広範なヘテロクロマチン修飾の概要

【表 18】

| 試料 (名称, ソース) | 大型ヒストン修飾 | 数 | 範囲 (bp) | 中央値長さ (bp) | トータル長さ (bp) | ゲノムの% |
|--------------|------------------|-------|----------------------|------------|---------------|--------|
| A38Per, 腹膜 | K9Me2 | 2,331 | 100,001 ~ 24,067,001 | 335,001 | 1,449,305,831 | 50.68% |
| | K9Me3 (大型 LOCKs) | 344 | 500,501 ~ 10,773,501 | 1,287,251 | 589,313,343 | 20.61% |
| | K9me3 (LOCKs) | 711 | 102,001 ~ 1,690,501 | 219,501 | 207,546,709 | 7.26% |
| | K27Me3 | 1,523 | 100,001 ~ 1,127,001 | 186,001 | 360,026,522 | 12.59% |
| A38Lg, 肺 Met | K9Me2 | 2,010 | 100,001 ~ 14,074,501 | 255,501 | 979,113,009 | 34.23% |
| | K9Me3 (大型 LOCKs) | 226 | 505,501 ~ 10,428,001 | 1,340,751 | 416,070,225 | 14.55% |
| | K9me3 (LOCKs) | 189 | 101,501 ~ 1,027,001 | 215,000 | 49,777,688 | 1.74% |
| | K27Me3 | 2,649 | 100,001 ~ 2,197,001 | 244,501 | 882,095,148 | 30.84% |
| A13Pr1, 原発1 | K9Me2 | 1,696 | 100,001 ~ 1,428,501 | 176,501 | 407,098,196 | 14.23% |
| | K9Me3 (大型 LOCKs) | 77 | 504,001 ~ 5,223,501 | 994,501 | 97,292,576 | 3.40% |
| | K9me3 (LOCKs) | 1,181 | 100,501 ~ 11,051,001 | 322,501 | 573,396,678 | 20.05% |
| | K27Me3 | 2,211 | 100,001 ~ 30,694,501 | 232,001 | 803,104,711 | 28.08% |
| A13Pr2, 原発2 | K9Me2 | 2,693 | 100,001 ~ 24,749,001 | 295,501 | 1,738,982,692 | 60.80% |
| | K9Me3 (大型 LOCKs) | 50 | 501,501 ~ 1,742,001 | 711,001 | 40,355,550 | 1.41% |
| | K9me3 (LOCKs) | 505 | 101,001 ~ 1,203,001 | 187,501 | 117,705,503 | 4.12% |
| | K27Me3 | 1,828 | 100,001 ~ 2,887,501 | 220,001 | 589,055,827 | 20.60% |
| A13Lg, 肺 Met | K9Me2 | 3,091 | 100,001 ~ 24,749,001 | 283,501 | 1,898,353,591 | 66.38% |
| | K9Me3 (大型 LOCKs) | 111 | 500,501 ~ 2,878,501 | 735,501 | 100,336,111 | 3.51% |
| | K9me3 (LOCKs) | 711 | 101,501 ~ 1,748,001 | 194,501 | 168,847,710 | 5.90% |
| | K27Me3 | 2,553 | 100,001 ~ 31,395,001 | 237,001 | 1,003,794,552 | 35.10% |

【0151】

補足データ3 . これは、図のラベルによって示されるように、配列決定実験について計算されたすべての p 値を提供する。LOCKドメインコールの感度分析も含まれる。

【0152】

補足ファイル3A : LOCKにわたるH3K9Me2再プログラミングのp値

【表 19】

| 図2a: LOCK間でのH3K9Me2の低減 (対 A38Per) | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 試料 | K9Me2濃縮 (Δ RPKM) | P値 (RPKM<A38Per ウィルコクソン検定) | Mb K9Me2低減 (対 A38Per) | P値 (低減 Mb 対 A38Per, カイニ乗検定) |
| A38Per, 腹膜 | 0.082 | NA (参照) | NA (参照) | N/A (参照) |
| A38Lg, 肺 転移 | 0.069 | $p < 2.2e-16$ | 763Mb (52.7%) | $p < 2.2e-16$ |
| A13Pr1, 原発腫瘍1 | 0.038 | $p < 2.2e-16$ | 1110Mb (76.6%) | $p < 2.2e-16$ |
| A13Pr2, 原発腫瘍2 | 0.065 | $p < 2.2e-16$ | 286Mb (19.7%) | $p < 2.2e-16$ |
| A13Lg, 肺 転移 | 0.048 | $p < 2.2e-16$ | 204 (14.1%) | $p < 2.2e-16$ |

【0153】

補足データ3B: DE遺伝子から再プログラムされたユークロマチン修飾のp値

【表 20】

| 図2e ユークロマチンからの遺伝子上方制御 (対 腹膜: A38Per) | | |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 試料 | p値 K27Ac (>A38Per Wilcox) | p値 K36Me3 (>A38Per Wilcox) |
| A38Lg, 肺 転移 | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |
| A13Pr1, 原発腫瘍 1 | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |
| A13Pr2, 原発腫瘍 2 | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |
| A13Lg, 肺 転移 | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |
| 図2e ユークロマチンからの遺伝子 下方制御 (対 腹膜: A38Per) | | |
| 試料 | p値 K27Ac (<A38Per Wilcox) | p値 K36Me3 (<A38Per Wilcox) |
| A38Lg, 肺 転移 | $p=0.0000007224$ | $p=6.411e-09$ |
| A13Pr1 | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |
| A13Pr2 | $p=0.0000001401$ | $p < 2.2e-16$ |
| A13Lg | $p < 2.2e-16$ | $p < 2.2e-16$ |

【0154】

補足データ3C: LOCKにわたるH3K9Me3の再プログラミングのp値

【表 2 1】

| 図10: LOCK にわたるH3K9Me3 濃縮 | | |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 比較 | H3K9Me2(ウィルコクソン検定) | H3K9Me3(ウィルコクソン検定) |
| A38Per 対 A38Lg | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 |
| A13Pr1 対 A13Pr2 | p=0.1086 | p< 2.2e-16 |
| A13Pr1 対 A13Lg | p=0.2364 | p< 2.2e-16 |

【 0 1 5 5 】

補足データ3D: LOCK DE 遺伝子からの修飾の再プログラミングの p 値

【表 2 2】

| 図11a: LOCK からのDE 遺伝子 下方制御 (対 A38Per) | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 試料 | K9Me2 (>A38Per Wilcox) | K27me3 (>A38Per Wilcox) | K27ac (<A38Per Wilcox) | K36me3 (<A38Per Wilcox) | DNA メチル化 (<A38Per Wilcox) |
| A38Lg | p= 0.99 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 |
| A13Pr2 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 |
| A13Pr1 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 |
| A13Lg | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 図11b: LOCK からのDE 遺伝子 上方制御 (対A38Per) | | | | | |
| 試料 | K9Me2 (<A38Per Wilcox) | K27me3 (<A38Per Wilcox) | K27ac (>A38Per Wilcox) | K36me3 (>A38PerWi lcox) | DNA メチル化 (>A38Per Wilcox) |
| A38Lg | p=0.99 | p< 2.2e-16 | p=1.163e-06 | p=0.0000000 07195 | p=0.01699 |
| A13Pr2 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p=3.312e-08 |
| A13Pr1 | p= 0.51 | p=2.738e- 06 | p=1.362e-06 | p=0.0004268 | p=0.99 |
| A13Lg | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p=2.362e-13 | p< 2.2e-16 | p<2.2e-16 |

【 0 1 5 6 】

補足データ3E: 大型ロックドメインにわたる再プログラミングの p 値

【表 2 3】

| 図13:大型LOCK ドメイン 間でのリプログラミング | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 図13b | H3K9Me2 (>A38Lg Wilcox) | H3K9Me3 (<A38Lg Wilcox) | DNA メチル化 (>A38Lg Wilcox) |
| A38Per 大型 LOCKs | p=0.0006861 | p< 2.2e-16 | p=0.000007037 |
| 図13c | H3K9Me2 (>A38Per Wilcox) | H3K9Me3 (<A38Per Wilcox) | DNA メチル化 (>A38Per Wilcox) |
| A38Lg 大型 LOCKs | p=0.00002502 | p< 2.2e-16 | p=3.52e-16 |

【 0 1 5 7】

補足データ 3 F : 6 A N RNA / ChIP - seq 実験の p 値

【表 2 4】

| 図19a: 既存の調節修飾を有するLOCKからのDE遺伝子の6AN下方制御 (6AN対他のLOCK遺伝子) | | | | |
|---|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | K27Ac (6AN> 他) | K36me3 (6AN> 他) | K27Me3 (6AN< 他) | K9Me2 (6AN< 他) |
| ウィルコクソン 検定p値 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p< 2.2e-16 | p=0.02238 |
| | | | | |
| | | | | |
| 図19b: 再プログラムされたLOCKにわたるH3K9Me2の6AN増加 (A38Lg対A38Perの間で再プログラムされたLOCKに対するDMSO対6AN) | | | | |
| | K9Me2 (6AN>DMSO) | K27Me3 (6AN>DMSO) | | |
| ウィルコクソン 検定p値 | p=2.291e-07 | p=0.6333 | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 図19c, d: LOCKから抑制されたDE遺伝子に対するH3K27Acの6AN減少 | | | | |
| | | | | |
| 図19c | K27Ac LOCK ダウン 遺伝子 (6AN<DMSO) | K27Ac 他の LOCK 遺伝子 (6AN<DMSO) | K27Ac ECD ダウン 遺伝子 (6AN<DMSO) | |
| ウィルコクソン 検定p値 | p=0.01549 | p=0.94462 | p=0.8944 | |
| | | | | |
| 図19d | K27Me3 LOCK ダウン 遺伝子 (6AN<DMSO) | K27Me3 他の LOCK 遺伝子 (6AN<DMSO) | K27Me3 ECD ダウン 遺伝子 (6AN<DMSO) | |
| ウィルコクソン 検定p値 | p=0.9417 | p=0.5139 | p=0.7957 | |

【 0 1 5 8 】

補足データ 3 G : L O C K 感度分析

【表 2 5】

| LOCKドメインコールの感度テスト | | | | | |
|-------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| | 元のパラメータ | テスト パラメータ1 | オーバー ラップ分析 | テスト パラメータ 2 | オーバー ラップ分析 |
| 削除された 小ピーク | 5kb | 2kb | 5Kb 対 2Kb | 10kb | 5Kb 対 10Kb |
| 試料 | <u>コールされた ドメイン長さ</u> | <u>コールされ たドメイン 長さ</u> | 重複割合 | <u>コールされ たドメイン 長さ</u> | 重複割合 |
| 38Per K9me2 | 1449305831 | 1475751351 | 98.02% | 1389543312 | 95.65% |
| 38Lg K9me2 | 979113009 | 1042797151 | 93.44% | 870263273 | 88.44% |
| 38Per K27me3 | 360026522 | 383258588 | 92.44% | 321712391 | 88.43% |
| 38Lg K27me3 | 882095148 | 886275657 | 99.53% | 863791604 | 97.89% |
| | | | | | |
| 最小マージ 距離 | 20Kb | 15Kb | 20Kb 対 15Kb | 25Kb | 20Kb 対 25Kb |
| 試料 | <u>コールされた ドメイン長さ</u> | <u>コールされ たドメイン 長さ</u> | 重複割合 | <u>コールされ たドメイン 長さ</u> | 重複割合 |
| 38Per K9me2 | 1449305831 | 1387108909 | 95.42% | 1504614743 | 96.11% |
| 38Lg K9me2 | 979113009 | 887961919 | 89.91% | 1053584044 | 91.69% |
| 38Per K27me3 | 360026522 | 314837912 | 86.64% | 396029094 | 89.89% |
| 38Lg K27me3 | 882095148 | 848539120 | 96.00% | 906322630 | 97.16% |

【 0 1 5 9】

補足データ 4 . このファイルには、発現レベル、p 値、方向の変化、および各 DE 遺伝子がマッピングしたクロマチンドメインを含む、RNA - seq によって各サンプルで検出されたすべての差次的に発現される (DE) 遺伝子が示される。遠位転移サンプルにわたって、および対照 (DMSO) 細胞と 6 AN 処理細胞との間で検出された再発性 DE 遺伝子の分析もまた報告されている。

30

【 0 1 6 0】

補足データ 4 A : RNA - seq によって検出され、クロマチンドメインにマッピングされた A 3 8 P e r と A 1 3 P r 1 の間の DE 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/ v49/n3/full/ ng.3753.html? fox trotcallback =true#supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能)。

【 0 1 6 1】

補足データ 4 B : RNA - seq により検出されクロマチンドメインにマッピングされた A 3 8 P e r と A 1 3 P r 2 の間の DE 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/ v49/n3/full /ng.3753.html? fox trot callback= true# supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能)。

40

【 0 1 6 2】

補足データ 4 C : RNA - seq により検出されクロマチンドメインにマッピングされた A 3 8 P e r と A 1 3 L g の間の DE 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワール

50

ドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/ v49/n3/full /ng.3753.html? foxtrotcallback= true# supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能）。

【 0 1 6 3 】

補足データ 4 D : R N A - s e q により検出されクロマチンドメインにマッピングされた A 3 8 P e r と A 3 8 L g の間の D E 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/ v49/n3/full/ ng.3753.html? foxtrotcallback =true#supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能) 。

【 0 1 6 4 】

補足データ 4 E : R N A - s e q により検出された A 3 8 P e r と A 3 8 L v の間の D E 遺伝子の概要 (C h I P - s e q はクロマチンドメインには実行されない) (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/ v49/n3/full/ ng.3753.html?foxtrotcallback =true# supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能) 。

【 0 1 6 5 】

補足データ 4 F : 原発腫瘍前駆体 (A 1 3 P r 1 / 2) および遠位転移サブクローン (A 1 3 L g 、 A 3 8 L g 、 A 3 8 L g) と A 3 8 P e r の間で反復的に上方 / 下方制御された D E 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com /ng/journal/ v49/n3/full/ng.3753.html? foxtrotcallback =true#supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能) 。

【 0 1 6 6 】

補足データ 4 G : R N A - s e q により検出されクロマチンドメインにマッピングされた対照 (D M S O) および 6 A N 処理 A 3 8 L g 細胞間の D E 遺伝子の概要 (データは示されていない - ワールドワイドウェブ上の「nature.com/ ng/journal/v49/n3/full/ ng.3753.html? foxtrotcallback= true# supplementary information」で「補足表 7」をクリックすることにより公的に利用可能) 。

【 0 1 6 7 】

補足データ 4 H : 適合した肺サブクローンと腹膜サブクローンとの間の D E 遺伝子 (A 3 8 L g 対 A 3 8 P e r) と、対照細胞と 6 A N 処理した A 3 8 L g 細胞との間の D E 遺伝子との間の重複の比較。

10

20

30

【表 2 6 - 1】

| 38Lg アップ/6AN ダウン | 遺伝子 | | 38Lg ダウン /6AN アップ | 遺伝子 | | 38Lg アップ/6AN アップ | 遺伝子 | | 38Lg ダウン /6AN ダウン | 遺伝子 |
|--|---------------------|--|--|-------------------|--|---|---------------------|--|---|-------------------------|
| 同時制御/ 6AN ダウン： 1032/19 68 (52%) | GDF5OS | | 同時制御/ 6AN アップ： 915/ 2192 (42%) | CCT6B | | 同時制御/ 6AN アップ： 379/2192 (17%) | WDR25 | | 同時制御/ 6AN ダウン： 277/1 968 (14%) | RP11- 400K9.4.1 |
| 同時制御/ 38Lg アップ： 1032/43 68 (24%) | EDN2 | | 同時制御/ 38Lg ダウン： 915/4 402 (21%) | JAK2 | | 同時制御/ 38Lg アップ 379/4368 (0.09%) | TOMM7 | | 同時制御/ 38Lg ダウン 277/4 402 (0.06%) | C14orf105 |
| | C1QTNF2 | | | TMEM63 A | | | IGFBP1 | | | CCK |
| | CLDN2 | | | FAM101A | | | SLC9A3R2 | | | RP11- 255B23.3. 1 |
| | FAT2 | | | KRCC1 | | | C7orf60 | | | CFTR |
| (同時制御： 38Lgと マッチした 6ANデータ セットの 両方に存在 する遺伝子 | RBM24 | | | ERRFI1 | | | ZFYVE28 | | | CD22 |
|) | KMO | | | LRRC6 | | | CTSD | | | RGS7 |
| | TPRG1-AS1 | | | TNFAIP2 | | | GATA6 | | | ERVMER 34-1 |
| | DOCK2 | | | MAST3 | | | RP11- 480A16.1.1 | | | CCNI2 |
| | FAM101 B | | | ABCC10 | | | GXYLT2 | | | ADAMTS 14 |
| | KRT7 | | | RP11- 65J3.1.1 | | | AC002472.8. 1 | | | ANO1 |
| | TCF7 | | | SLC12A7 | | | C3orf23 | | | PADI3 |
| | RP11- 845M18.3.1 | | | WASH7P | | | TMEM43 | | | CHST4 |
| | C4orf49 | | | ANKRD13D | | | FUT11 | | | FER1L6 |
| | SLC1A3 | | | ZBTB7A | | | IFFO1 | | | TNNT2 |
| | DMC1 | | | WASH6P | | | SLC1A4 | | | RP11- 597D13.9. 1 |
| | TMSB15 A | | | IL32 | | | DDT | | | RP11- 6F2.4.1 |
| | LHX4 | | | RNF217 | | | IDII | | | MYO5B |
| | KIAA132 4 | | | EFNB1 | | | SARM1 | | | KRT23 |
| | ITPRIPL1 | | | KHNYN | | | HOTAIR | | | MUC4 |

【表 26-2】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|----------------------|--|--|----------------|--|--|-----------------|
| | PPAPDC1A | | | TMEM59 | | | TSC22D1 | | | RP11-346D6.6.1 |
| | RGS5 | | | GAS8 | | | NBAS | | | ITGAM |
| | RP11-618G20.2.1 | | | ABC7-42389800N19.1.1 | | | ENG | | | PTPRZ1 |
| | RIPPLY1 | | | RASSF7 | | | SSTR5 | | | GPR116 |
| | UHRF1 | | | MRPS6 | | | CRIP2 | | | CYP24A1 |
| | SUSD5 | | | RP11-353B9.1.1 | | | NUDT18 | | | DHRS9 |
| | KRT80 | | | GRAMD4 | | | RPL31 | | | GRPR |
| | KRT32 | | | SERINC5 | | | KIAA1143 | | | AIFIL |
| | SLC26A7 | | | TMEM102 | | | DNAJC3-AS1 | | | CGN |
| | TFPI2 | | | TMPRSS5 | | | CIR | | | RP11-314P12.3.1 |
| | RP11-314P12.2.1 | | | TMEM63B | | | GAB2 | | | CYFIP2 |
| | MMP7 | | | FAM109A | | | FAM174B | | | ATP6V0A4 |
| | KLHL23 | | | TLR4 | | | SYT11 | | | MPP7 |
| | C1orf110 | | | C20orf96 | | | DET1 | | | KREMEN1 |
| | GRIN2A | | | SMAD6 | | | TBC1D8B | | | TTN |
| | PADI2 | | | VAMP4 | | | TAZ | | | LEF1 |
| | AL162759.1.1 | | | MYO1E | | | UCP2 | | | SP140 |
| | MYBL2 | | | DVL1 | | | RP4-647C14.2.1 | | | SP6 |
| | GLYATL2 | | | AC069513.3.1 | | | AARS | | | ANXA10 |
| | RRM2 | | | ITPKC | | | DALRD3 | | | NYAP2 |
| | E2F2 | | | USP18 | | | SEMA3C | | | MCOLN3 |
| | CPA4 | | | RAB33B | | | ATP2B1 | | | DENND2A |
| | HHIP | | | RP11-325F22.3.1 | | | THTPA | | | HSH2D |
| | MYPN | | | ADHFE1 | | | GPER | | | C1orf106 |
| | RP11-150I2.6.1 | | | LENG8 | | | ITPK1 | | | EVL |
| | CLSPN | | | RILPL2 | | | IL1RAP | | | C7orf58 |
| | WDR69 | | | TSNARE1 | | | RPL29 | | | RP1-95L4.4.1 |
| | RP11-150I2.1.1 | | | SPIRE2 | | | EFHC1 | | | IL11 |
| | AKAP12 | | | MMAA | | | CRTAP | | | DDN |
| | DOCK10 | | | SLC15A3 | | | B3GAT1 | | | snoU13 |
| | PSG5 | | | PLEKHM1 | | | SELIL | | | SLC27A2 |
| | SPC25 | | | RP11-403I13.8.1 | | | ME1 | | | DGAT2 |
| | TM4SF4 | | | STARD10 | | | TBC1D9B | | | SHANK2 |
| | FAM71D | | | SNPH | | | EEF1A1P5 | | | HNRPCP |
| | OLFML2A | | | EME2 | | | VKORC1 | | | AC005083.1.1 |
| | OXCT1 | | | DHRS3 | | | SNX21 | | | S1PR3 |
| | FAM111B | | | MX1 | | | KDELC1 | | | ARL14 |

【表 2 6 - 3】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|----------------|--|--|-----------------|--|--|-----------------|
| | snoU13 | | | RRN3P1 | | | AIP | | | SAMD5 |
| | AC073130.1.1 | | | FAM100A | | | RP1-34B21.6.1 | | | ARHGDI B |
| | CCNE2 | | | DDO | | | OSEPL6 | | | GNG4 |
| | CDC25A | | | TPRN | | | C4orf34 | | | CDC42BP G |
| | RP3-324O17.4.1 | | | CD58 | | | FAM18B2 | | | SMO |
| | MCM10 | | | PLCG2 | | | TXNDC15 | | | TIAM1 |
| | RP11-424C20.2.1 | | | RP11-220I1.1.1 | | | LIN7A | | | NMU |
| | MSRB3 | | | ZNF554 | | | CTD-2287O16.1.1 | | | SOX6 |
| | HEATR7 B1 | | | GLI4 | | | FLYWCH1 | | | PPFIBP2 |
| | TP73 | | | TRAF1 | | | C11orf2 | | | LY6D |
| | PRKDC | | | ANKRA2 | | | CHST12 | | | PLAC1 |
| | DLEU2 | | | SYNGR2 | | | FTX | | | SYTL5 |
| | CTB-164N12.1.1 | | | FAM113B | | | CCNO | | | SELL |
| | SDPR | | | CROCC | | | AL844908.5.1 | | | MYO5C |
| | POLE2 | | | HIVEP2 | | | RP11-996F15.2.1 | | | UNC5A |
| | MEST | | | RHBDD2 | | | CPEB2 | | | SPNS2 |
| | ASTN2 | | | GATS.1 | | | PDIA6 | | | BIK |
| | LAMP5 | | | RALGPS1 | | | STON1 | | | PPYR1 |
| | MKI67 | | | VWA1 | | | ARRDC3 | | | FAM46B |
| | TMEFF2 | | | HEATR7 A | | | C7orf23 | | | COL17A1 |
| | CPA5 | | | HLA-K | | | TESK1 | | | MACC1 |
| | ANKRD18D P | | | MAF1 | | | HEG1 | | | DNAH12 |
| | ESCO2 | | | TMEM8A | | | RP11-85K15.2.1 | | | CYP2J2 |
| | TUBA1B | | | DDX58 | | | MTHFD2 | | | LDLRAD 3 |
| | WNT7A | | | PYROXD 1 | | | RWDD2A | | | RAB6B |
| | MCM4 | | | CYP27C1 | | | RPL10 | | | BTBD11 |
| | AKAP5 | | | RNF145 | | | PHACTR1 | | | PLA2G7 |
| | TYMS | | | ZDHHC14 | | | NUDT22 | | | TBC1D30 |
| | CDCA2 | | | KLF7 | | | TRIM4 | | | SNX25P1 |
| | CAP2 | | | KYNU | | | RHOG | | | TESC |
| | RP11-527N22.2.1 | | | LDLR | | | EIF1B | | | COL1A1 |
| | RP11-297M9.2.1 | | | ZDHHC11 B | | | SSR4 | | | FERMT1 |
| | DEPDC1 B | | | AC007383.3.1 | | | ARG2 | | | MED12L |
| | DPF1 | | | SRCRB4D | | | TCEAL1 | | | RP11-582J16.5.1 |
| | RP11-554I8.2.1 | | | LRP5L | | | ZFPL1 | | | BRI3BP |
| | RP11-33N16.1.1 | | | FOXCI | | | RGS10 | | | LAD1 |
| | MAP3K1 4 | | | AACS | | | MEIS3 | | | C16orf74 |

【表 2 6 - 4】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|---------------|--|--|------------------|--|--|----------------|
| | EXO1 | | | SLC44A2 | | | LLGL1 | | | CD163L1 |
| | RP11-253E3.3.1 | | | SEPP1 | | | C9orf37 | | | ANXA8L1 |
| | FABP6 | | | ARHGAP25 | | | USE1 | | | AEN |
| | RP11-184I16.2.1 | | | STAT6 | | | YPEL1 | | | C8orf46 |
| | FOSL1 | | | RP11-27II.2.1 | | | PLA2G15 | | | CDH1 |
| | CCDC99 | | | VPS28 | | | RPS27 | | | XDH |
| | AC016831.7.1 | | | R3HDM2 | | | VEGFB | | | XK |
| | FJX1 | | | C11orf35 | | | CELSR3 | | | ANXA8L2 |
| | SCN5A | | | ARHGEF10L | | | EPHX1 | | | COL12A1 |
| | RP11-687M24.3.1 | | | PSMD9 | | | TINF2 | | | PPARGC1B |
| | ILDR2 | | | METTL7A | | | ZNF70 | | | C6orf132 |
| | MUC5AC | | | TMTC2 | | | C3orf18 | | | TTC3P1 |
| | AC092614.2.1 | | | NFE2L1 | | | PITPNC1 | | | GALNT6 |
| | APOBEC3B | | | C5orf13 | | | ISL1 | | | SEMA7A |
| | RP11-54A9.1.1 | | | ZNF768 | | | CORO6 | | | F2RL1 |
| | NCAPG | | | SIK1 | | | NEK3 | | | ALDH1A1 |
| | ATAD2 | | | OSCP1 | | | RP11-313D6.4.1 | | | CRABP2 |
| | SMC4 | | | ACADS | | | RPL27A | | | CA2 |
| | FUT9 | | | HERC6 | | | RP11-216F19.1.1 | | | FGFBP1 |
| | ZNF488 | | | CLDN9 | | | ABCA3 | | | SNAI2 |
| | TK1 | | | RHEBL1 | | | PITPNM2 | | | PLS1 |
| | CTD-2023N9.1.1 | | | CIIST6 | | | LGR5 | | | KLIIL13 |
| | HELLS | | | VMAC | | | AGA | | | RP5-862P8.2.1 |
| | MMP24 | | | AQP3 | | | FAM113A | | | RAB38 |
| | SLITRK3 | | | DNAL4 | | | GPR37 | | | SLC7A8 |
| | ELOVL2 | | | HBP1 | | | VASH1 | | | WNT3 |
| | SERINC2 | | | ZG16B | | | CAMKK1 | | | SARDH |
| | AC002066.1.1 | | | FAM100B | | | MAST1 | | | TPM1 |
| | DIAPH3 | | | EREG | | | RP11-574K11.20.1 | | | RASEF |
| | RP11-291L15.2.1 | | | ZNF862 | | | RPL12 | | | SKAP1 |
| | GINS1 | | | NARFL | | | NSUN5P2 | | | TRIM14 |
| | RP5-968P14.2.1 | | | SWSAP1 | | | RP11-477I4.3.1 | | | CTSL2 |
| | DHFR | | | YPEL5 | | | NSUN5P1 | | | GK |
| | ROR1 | | | SLFN5 | | | HAUS4 | | | VEPH1 |
| | MCM3 | | | CCNDBP1 | | | TMEM234 | | | RP11-800A3.4.1 |
| | RP1-140K8.5.1 | | | PAQR8 | | | MRC2 | | | FGFR3 |
| | GLYATL1 | | | SLC25A27 | | | PYCR1 | | | PADI1 |
| | CDCA7 | | | GOLGA8B | | | SLC26A6 | | | CDS1 |

【表 26-5】

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|--|--|--|---------------------|--|--|--|---------------------|--|--|-------------------------|
| | CSMD2 | | | | IKZF2 | | | | C3orf78 | | | JPH1 |
| | RBPMS2 | | | | HSD17B1 1 | | | | CD68 | | | FAM81A |
| | RBL1 | | | | LMBR1L | | | | AP003068.23. 1 | | | GALNT12 |
| | RP11- 677M14.3.1 | | | | KCNJ14 | | | | PAK3 | | | DPY19L2 |
| | CCBE1 | | | | DDR1 | | | | GMPPA | | | ITGBL1 |
| | CCND1 | | | | C7orf53 | | | | EEF1A1P6 | | | SYNPO2 |
| | E2F8 | | | | RELB | | | | AC093673.5. 1 | | | RP11- 157P1.4.1 |
| | CDC45 | | | | WASH3P | | | | CBS | | | ANKRD2 2 |
| | LMNB1 | | | | PDCD4 | | | | MIF4GD | | | GRHL1 |
| | C11orf41 | | | | NR1D1 | | | | CNPY4 | | | KRT15 |
| | BEST3 | | | | NCOA7 | | | | GGT7 | | | RP11- 93L9.1.1 |
| | CTPS | | | | GOLGA2 | | | | LRP1B | | | C15orf62 |
| | RASSF10 | | | | CEBPG | | | | FAIM2 | | | AADAC |
| | POLA1 | | | | C2orf15 | | | | ZNF333 | | | AC112229 .1.1 |
| | TUBB6 | | | | KLF13 | | | | AGXT2L2 | | | TRIM59 |
| | HOMER1 | | | | GEMIN8 | | | | B9D1 | | | DNAH10 |
| | CD200 | | | | ARRDC2 | | | | EEF1A1 | | | CTD- 2021J15.2. 1 |
| | CENPM | | | | SLC39A1 1 | | | | ATRNL1 | | | KRT19 |
| | ERCC6L | | | | SAT2 | | | | PAOX | | | KIAA1199 |
| | HMMR | | | | ZER1 | | | | CTSA | | | GPM6A |
| | CENPW | | | | KIAA1407 | | | | SLC45A1 | | | AKAP6 |
| | RP11- 298I3.4.1 | | | | OAS1 | | | | RAB3IL1 | | | GPR110 |
| | RP11- 259P6.1.1 | | | | AC004410.1 | | | | C6orf1 | | | QPCT |
| | THBS1 | | | | DGAT1 | | | | CTD- 2314G24.2.1 | | | RP11- 382A18.1. 1 |
| | GPR63 | | | | RNF103 | | | | CYP4X1 | | | METTL7B |
| | DTL | | | | EFHC2 | | | | HCFC1R1 | | | PHACTR2 |
| | RP11- 101K10.8.1 | | | | C17orf69 | | | | FAM70B | | | PLEKHA7 |
| | RP11- 204J18.3.1 | | | | LINC0049 3 | | | | SHMT2 | | | PLAU |
| | WDR4 | | | | ST6GALNAC 2 | | | | SEC14L5 | | | SLC4A3 |
| | BRIP1 | | | | KLHL31 | | | | CLK4 | | | KRT18 |
| | LMNB2 | | | | LGMN | | | | UGDH-AS1 | | | C3orf52 |
| | C14orf49 | | | | LLGL2 | | | | ITGA11 | | | SYTL2 |
| | EIF6 | | | | ENDOV | | | | CGREF1 | | | PKDCC |
| | ARHGEF 26 | | | | CST1 | | | | RPL22L1 | | | ASB9 |
| | ETNK2 | | | | RP13- 516M14.1.1 | | | | FKBP2 | | | SLC22A2 0 |
| | POLQ | | | | LIPA | | | | OXAIL | | | IGSF3 |
| | RP11- 573I11.2.1 | | | | FAM13A | | | | C10orf102 | | | CLDN10 |

【表 2 6 - 6】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|----------|--|--|-----------------|--|--|-----------------|
| | APLN | | | ST3GAL1 | | | DNASE1L1 | | | MBOAT1 |
| | RP11-304F15.3.1 | | | APOBEC3G | | | HIGD2A | | | TMEM169 |
| | NDC80 | | | PLAUR | | | MLLT3 | | | SYK |
| | MCM6 | | | ACYP2 | | | AP001496.1 | | | MAST4 |
| | CAV1 | | | RTN2 | | | FAM156B | | | SDC1 |
| | RP11-53M11.3.1 | | | HIF1A | | | TRPT1 | | | RP11-613M10.6.1 |
| | MARK1 | | | DNASE2 | | | RP11-571M6.6.1 | | | PPMIH |
| | CTA-445C9.15.1 | | | CA11 | | | RP11-243J18.3.1 | | | GCHFR |
| | USP13 | | | SLC7A7 | | | SGSH | | | RHOD |
| | RP5-1172A22.1.1 | | | ABCA10 | | | CTD-3074O7.5.1 | | | EZR |
| | UCN2 | | | PTK6 | | | CNTNAP1 | | | RP11-303E16.2.1 |
| | MCAM | | | RPS6KA2 | | | TNFRSF10C | | | RCC2 |
| | ZWINT | | | WHAMMP3 | | | B3GNT1 | | | KDR |
| | LINC00460 | | | ENGASE | | | LRP1 | | | RP11-416I2.1.1 |
| | BIRC5 | | | LPCAT4 | | | P2RX6 | | | GPR65 |
| | FLNC | | | EPS8L3 | | | SSBP2 | | | BCL7A |
| | SYNE2 | | | TMEM198B | | | ZC3H6 | | | PPCDC |
| | HMG2 | | | PRICKLE3 | | | CCNG1 | | | NBPF10 |
| | ADCY3 | | | PDE4DIP | | | TBC1D4 | | | AC108463.1 |
| | PDSS1 | | | GPR108 | | | MAGED2 | | | CADM4 |
| | CDCA3 | | | TMC4 | | | DNAJC1 | | | SPTBN5 |
| | AXL | | | PTP4A3 | | | PCK2 | | | CUEDC1 |
| | KIAA0101 | | | ITGAX | | | MANF | | | CMTM4 |
| | NAV3 | | | TSSC4 | | | ZCWPW2 | | | CDK5R1 |
| | KIF11 | | | ANO9 | | | C1orf213 | | | C19orf21 |
| | LPCAT2 | | | PPPIR3B | | | CACNG6 | | | C1orf116 |
| | KIF4A | | | ANTXR2 | | | AC004540.5.1 | | | UNC5C |
| | CTD-2334D19.1.1 | | | ARHGEF3 | | | TSLP | | | ALDH5A1 |
| | EML5 | | | C10orf32 | | | RP5-1103G7.4.1 | | | MB21D2 |
| | NME1 | | | PGM2L1 | | | C1S | | | RP11-7K24.3.1 |
| | ARHGAP11A | | | HLA-H | | | SPATA25 | | | DSG2 |
| | MCM2 | | | TUBG2 | | | PPAP2A | | | PLD6 |
| | SLC5A11 | | | SLC16A3 | | | RP11-390P2.4.1 | | | GALNT5 |
| | CHN1 | | | CCNL2 | | | RP11-539L10.3.1 | | | ZNF185 |
| | KIF23 | | | SGK1 | | | SH2B2 | | | P2RY2 |
| | ARHGAP19 | | | MEF2C | | | NEURL2 | | | PLCXD1 |
| | SLC8A1 | | | CAMTA2 | | | KLHDC2 | | | AIG1 |
| | FBN2 | | | HLA-F- | | | SHISA2 | | | PALM |

【表 2 6 - 7】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------|--|--|-----------------|--|--|--|------------------|--|-----------------|
| | | | | AS1 | | | | | | |
| | FKBP5 | | | PIWIL4 | | | | PXK | | PKP4 |
| | IGSF9B | | | LSS | | | | WBSCR27 | | ZNF462 |
| | KIF15 | | | PCMTD2 | | | | DSEL | | SAA1 |
| | NUP210 | | | CFI | | | | TRIM46 | | SPATA13 |
| | AS3MT | | | ARL4D | | | | CTSF | | LAMA3 |
| | TNFAIP8L3 | | | MVK | | | | KLHL35 | | NID1 |
| | PM20D2 | | | CDH17 | | | | PDIA5 | | PEAR1 |
| | OPN3 | | | MAFF | | | | PLK3 | | PYGL |
| | RRM1 | | | CACNB1 | | | | ZNF815 | | USP40 |
| | DNA2 | | | C2orf63 | | | | NICN1 | | DIS3L |
| | DEPDC1 | | | IL15 | | | | SCAND1 | | ID2 |
| | PDE1A | | | ST3GAL6 | | | | CALHM3 | | FUT1 |
| | ALYREF | | | C9orf7 | | | | RP5-827C21.4.1 | | PRSS3 |
| | MORC4 | | | ENDOU | | | | LETMD1 | | NMNAT2 |
| | FBXO5 | | | PIM3 | | | | JAKMIP3 | | DNAJA4 |
| | DPY19L2P1 | | | CLDN7 | | | | LZTFL1 | | DOCK9 |
| | CENPF | | | DAB2IP | | | | CTNS | | DDI2 |
| | GPR19 | | | TARSL2 | | | | RP11-280F2.2.1 | | PLAC8 |
| | SYCE2 | | | REC8 | | | | PDK1 | | FBP1 |
| | GINS4 | | | FAM160A2 | | | | MBL1P | | RAG1 |
| | XRCC2 | | | ZFP36 | | | | LHPP | | PRPF4 |
| | DARS2 | | | RP11-73K9.2.1 | | | | BLVRB | | RPS6KA1 |
| | HMGB3 | | | STARD4 | | | | CALHM2 | | DSP |
| | KIAA1524 | | | SGK2 | | | | RP11-277P12.20.1 | | SLC22A5 |
| | NUP188 | | | CIR1 | | | | PTCHD2 | | AADAT |
| | DPF3 | | | MAPK8IP3 | | | | UST | | FARP2 |
| | STMN1 | | | USP20 | | | | IRF2BPL | | MCC |
| | WDHD1 | | | RP11-149I23.3.1 | | | | PLK1S1 | | ZNF658 |
| | NCAPD3 | | | RP11-108M9.4.1 | | | | TTC39B | | B3GNT5 |
| | CCNE1 | | | HIP1R | | | | ABHD14B | | NT5DC3 |
| | TRPV2 | | | CYP4F3 | | | | DLG4 | | ABCC9 |
| | CDKN3 | | | SH3YL1 | | | | PCDHGA7 | | PNPLA4 |
| | PRR11 | | | TNFSF12 | | | | MAGED1 | | ZNF717 |
| | CSR2P | | | TMEM8B | | | | LEPREL2 | | RAVER2 |
| | COTL1 | | | IGSF8 | | | | LOXL2 | | MREG |
| | MSH2 | | | PTK2B | | | | SLC43A2 | | RBPI |
| | KIF18B | | | NR4A2 | | | | ZEB1-AS1 | | RAPGEF3 |
| | SKP2 | | | SPIRE1 | | | | LENG8-AS1 | | CNKSR3 |
| | ADORA2B | | | DLL1 | | | | C17orf72 | | RP11-757F18.5.1 |
| | GFRA3 | | | TMED1 | | | | C16orf93 | | PRSS12 |
| | ZNF724P | | | SQLE | | | | ARHGAP4 | | HOOK1 |

【表 26-8】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|-----------------|--|--|----------------|--|--|------------------|
| | RASGRF1 | | | ABCC6 | | | CNTD1 | | | COL16A1 |
| | FAM83D | | | VSIG10L | | | PCDHGA3 | | | MST4.1 |
| | BUB1 | | | FA2H | | | STK32A | | | CMIP |
| | MTHFD1 | | | OSBPL7 | | | SLC29A4 | | | SMC5 |
| | DHX9 | | | KCNIP3 | | | LEPRE1 | | | ANXA2P2 |
| | NRG1 | | | LYNX1 | | | HOMER3 | | | STEAP2 |
| | PCNA | | | ULK3 | | | MCEE | | | NUDT14 |
| | UTP20 | | | HINT3 | | | XBP1 | | | MMD |
| | MIR17HG | | | FDFT1 | | | ALDH1L2 | | | ANKRD56 |
| | ANLN | | | TRIB1 | | | MAP2 | | | SURF2 |
| | RUVBL1 | | | NPDC1 | | | NNMT | | | SH2D3A |
| | MYO1B | | | VEGFC | | | NUCB1 | | | MAP3K1 |
| | NCAPG2 | | | GPRC5C | | | KLRC2 | | | UACA |
| | FH | | | SIGIRR | | | TMEM158 | | | TAF2 |
| | GNG11 | | | TCEANC | | | SEPT7L | | | DCBLD2 |
| | GS1-465N13.1.1 | | | MKNK2 | | | RP11-161M6.4.1 | | | RP11-295M3.1.1 |
| | MTIL | | | N4BP2L1 | | | AC079922.3.1 | | | NAALADL2 |
| | TNS1 | | | KCNMB4 | | | PCDHB7 | | | CNTRL |
| | BARD1 | | | RP5-1182A14.3.1 | | | HSD17B7P2 | | | CD82 |
| | THOP1 | | | GET4 | | | NAT6 | | | FBXL19-AS1 |
| | SKA1 | | | FKBP10 | | | PTX3 | | | RHBDL2 |
| | CIQL1 | | | RDH10 | | | ZNF836 | | | RP11-448G15.3.1 |
| | C11orf82 | | | SLC22A15 | | | TMEM106A | | | RP11-357H14.19.1 |
| | CCNA2 | | | CCDC57 | | | TFF2 | | | TUBGCP5 |
| | SLC35F3 | | | SHB | | | CYP1A1 | | | INADL |
| | C10orf140 | | | TMPRSS3 | | | PPP1R3E | | | C9orf64 |
| | NEXN | | | NYNRIN | | | TMEM120A | | | ARAP2 |
| | ASF1B | | | TNFRSF9 | | | POLN | | | KRT16 |
| | PRTFDC1 | | | SESN3 | | | RAPGEF4 | | | ALS2CL |
| | FAT3 | | | A2LD1 | | | RABAC1 | | | |
| | H2AFX | | | RP11-475N22.4.1 | | | CACNA1G | | | |
| | PRIM1 | | | ZNF628 | | | LOX | | | |
| | SNX18P3 | | | JAG2 | | | FAM151B | | | |
| | RP11-973F15.1.1 | | | RP11-244H3.1.1 | | | PTPRM | | | |
| | ADRB2 | | | GOLGA8A | | | CLEC2B | | | |
| | FBXL13 | | | TP53INP2 | | | KDEL3 | | | |
| | CDC20 | | | WASH4P | | | ISYNA1 | | | |
| | CENPK | | | TNIP1 | | | RASL11A | | | |
| | CDCA4 | | | RP4-659J6.2.1 | | | CALR | | | |

【表 2 6 - 9】

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|----------------|--|--|-----------------|--|--|--|
| | ATAD5 | | | CCDC126 | | | RP11-108K14.4.1 | | | |
| | SMC1A | | | PTPRB | | | METTL12 | | | |
| | FAM196B | | | U6 | | | BNIP3 | | | |
| | UGT1A1 | | | SPRY3 | | | FAM175A | | | |
| | CTD-2574D22.2.1 | | | MMP15 | | | CRLF2 | | | |
| | MCM5 | | | SLC23A3 | | | TMEM231 | | | |
| | MELK | | | TBC1D3F | | | CRELD2 | | | |
| | LYPD1 | | | ABCA5 | | | PLXNA3 | | | |
| | DLGAP5 | | | RP4-798A10.2.1 | | | AC026202.3.1 | | | |
| | NUSAP1 | | | CLDN15 | | | ASNS | | | |
| | TUBBP1 | | | TMC7 | | | RASIP1 | | | |
| | MYH10 | | | TCTEX1D2 | | | SFRP5 | | | |
| | MIR155HG | | | NOS3 | | | RP11-66N24.3.1 | | | |
| | CCDC138 | | | ARHGEF16 | | | ABCC3 | | | |
| | ERCC2 | | | TPBG | | | RIBC1 | | | |
| | KIF20A | | | FAAH | | | HSP90B1 | | | |
| | TMEM14B | | | TMEM150A | | | HYOU1 | | | |
| | H2AFY2 | | | LRRC56 | | | BAMBI | | | |
| | OXTR | | | CEP85L | | | TPP1 | | | |
| | RDM1 | | | MIA | | | ZCCHC24 | | | |
| | PLEK2 | | | CDH6 | | | FAM161B | | | |
| | SHCBP1 | | | PON3 | | | AC004080.12.1 | | | |
| | GJC1 | | | CCDC92 | | | MAPT | | | |
| | SNRNP25 | | | PTPRH | | | AC018755.11.1 | | | |
| | KCNQ5 | | | FOXQ1 | | | PLOD2 | | | |
| | ODC1 | | | J01415.23 | | | MAN1A1 | | | |
| | EBNA1BP2 | | | PPFIA3 | | | NUCB2 | | | |
| | FABP3 | | | SMPDL3A | | | DERL3 | | | |
| | MCM7 | | | AC007283.5.1 | | | SCN1B | | | |
| | CHAC2 | | | ALPPL2 | | | FN1 | | | |
| | BORA | | | MTHFR | | | PLCD1 | | | |
| | ASRGL1 | | | WASH2P | | | CCDC85B | | | |
| | VIPR1 | | | RSAD2 | | | BTBD19 | | | |
| | PTTG1 | | | LIMA1 | | | AP000769.1 | | | |
| | ACTB | | | PPP1R16A | | | AC147651.3.1 | | | |
| | TOP2A | | | PIK3C2B | | | ATHL1 | | | |
| | NEIL3 | | | XAF1 | | | CYP2E1 | | | |
| | ALDH1B1 | | | KIAA0513 | | | FAM182B | | | |
| | CEP250 | | | GRAMD1C | | | PDIA4 | | | |

【表 26-10】

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|--|--|--------------------------|--|--|---------------------|--|--|--|--|
| | FAM131 B | | | GLDN | | | ZFP2 | | | | |
| | FAH | | | GPCPD1 | | | SLC25A29 | | | | |
| | CIT | | | CABP4 | | | RAB24 | | | | |
| | CDCA8 | | | NXNL2 | | | RP11- 755F10.1.1 | | | | |
| | CDK2 | | | SEMA4C | | | QPCTL | | | | |
| | EZH2 | | | PHYHIP | | | ALDOC | | | | |
| | PSMC3 | | | AC093734.11 .1 | | | AKR1C1 | | | | |
| | FGGY | | | IRF9 | | | LRRC29 | | | | |
| | NXPH4 | | | ZNF517 | | | RP11- 307O13.1.1 | | | | |
| | FRMD4A | | | RP5- 1187M17.10. 1 | | | SEMA3F | | | | |
| | CSPG4 | | | HIST1H1 C | | | RUSC1-AS1 | | | | |
| | CSE1L | | | ANKRD4 2 | | | EVI2B | | | | |
| | KIF20B | | | ZC3H12A | | | TIE1 | | | | |
| | C2CD3 | | | JUND | | | HSPA5 | | | | |
| | PPIAP29 | | | SEMA4B | | | TSPYL2 | | | | |
| | CTA- 221G9.10.1 | | | CTAGE5 | | | HERPUD1 | | | | |
| | TPX2 | | | NLRP1 | | | AQP2 | | | | |
| | DKK1 | | | GNE | | | RP4- 794H19.2.1 | | | | |
| | PFAS | | | LTB4R2 | | | C2orf16 | | | | |
| | PBK | | | BBS12 | | | AKR1C2 | | | | |
| | TRIP13 | | | DICER1- AS | | | ANGPTL4 | | | | |
| | CCDC18 | | | CMPK2 | | | HCN2 | | | | |
| | UBE2T | | | CALB2 | | | NOG | | | | |
| | AL357673.1 | | | DHRS2 | | | AKR1B1 | | | | |
| | PDE12 | | | LRFN3 | | | ST7-AS1 | | | | |
| | NUP155 | | | PROC | | | EVI2A | | | | |
| | ARNTL2 | | | PROS1 | | | AC022007.5. 1 | | | | |
| | POLD2 | | | TMEM80 | | | ZNF575 | | | | |
| | NCAPD2 | | | RALGDS | | | RCN3 | | | | |
| | VCL | | | SLC6A8 | | | PCDHB15 | | | | |
| | CCDC85 C | | | TMC6 | | | RP13- 895J2.7.1 | | | | |
| | FANCD2 | | | HMGCR | | | C9orf150 | | | | |
| | RP11- 117P22.1.1 | | | TBC1D17 | | | ANGPT1 | | | | |
| | MYLK | | | TBC1D3 | | | ARSA | | | | |
| | RP11- 394B2.4.1 | | | GRN | | | RP11- 49I11.1.1 | | | | |
| | PRLR | | | ROM1 | | | PRPH | | | | |
| | AP2B1 | | | MID1IP1 | | | AC004383.5. 1 | | | | |
| | RASSF2 | | | C15orf61 | | | P4HA1 | | | | |
| | PRKAG2 | | | SPATA20 | | | ANGPTL2 | | | | |

【表 2 6 - 1 1】

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|--|----------------|--|--|-----------------|--|--|--|--|
| | COL4A6 | | | FAM78A | | | AC002480.4.1 | | | | |
| | PSMC3IP | | | STAT2 | | | MTMR9LP | | | | |
| | ARRB2 | | | PYGM | | | CRELD1 | | | | |
| | CAMK4 | | | RHBDF1 | | | UPB1 | | | | |
| | TSPAN2 | | | LRCH4 | | | AC002480.3.1 | | | | |
| | RFC2 | | | PODN | | | RP11-554A11.9.1 | | | | |
| | PLK2 | | | SPRY4 | | | GALNT9 | | | | |
| | SRRT | | | CITED4 | | | AL137145.2 | | | | |
| | WNT7B | | | LIPG | | | VLDLR | | | | |
| | ADORA1 | | | CAPS | | | IFITM10 | | | | |
| | C22orf29 | | | EIF1 | | | LDHD | | | | |
| | HTR1B | | | CYP4F12 | | | ERO1LB | | | | |
| | ITGB8 | | | AKAP17A | | | NTNG2 | | | | |
| | ZNF660 | | | ACTR1B | | | NPY1R | | | | |
| | EPB41L2 | | | WDR66 | | | | | | | |
| | COQ3 | | | AP001468.1 | | | | | | | |
| | AASS | | | AP001372.2.1 | | | | | | | |
| | PAICS | | | FAM214A | | | | | | | |
| | CENPI | | | GSN | | | | | | | |
| | CASC5 | | | FAM193B | | | | | | | |
| | TUBA1C | | | TPRGIL | | | | | | | |
| | NUDCD1 | | | ARHGEF2 | | | | | | | |
| | L2HGDH | | | TNFAIP3 | | | | | | | |
| | CHML | | | CDA | | | | | | | |
| | CCNB1 | | | PLA2R1 | | | | | | | |
| | RP11-799O21.1.1 | | | ZSWIM4 | | | | | | | |
| | DNMT1 | | | IRAK2 | | | | | | | |
| | CDK1 | | | LYZ | | | | | | | |
| | RP11-673C5.1.1 | | | TJP3 | | | | | | | |
| | NUP37 | | | C8orf55 | | | | | | | |
| | TPMT | | | CTB-131B5.5.1 | | | | | | | |
| | AURKA | | | AC103810.1 | | | | | | | |
| | PEA15 | | | PCDHGB2 | | | | | | | |
| | NRGN | | | KLC4 | | | | | | | |
| | PLK1 | | | RP4-541C22.5.1 | | | | | | | |
| | ZNF124 | | | SIX5 | | | | | | | |
| | CGNL1 | | | SEL1L3 | | | | | | | |
| | SNRPD1 | | | MIR29C | | | | | | | |
| | PTPN14 | | | MZF1 | | | | | | | |
| | CDC7 | | | ADAM8 | | | | | | | |
| | DERA | | | WDR45 | | | | | | | |
| | PYGO1 | | | ZNFX1-AS1 | | | | | | | |
| | LRRCC1 | | | AC017099.3. | | | | | | | |

【表 2 6 - 2 3】

| | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------|--|--|-----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | PLCL2 | | | ACSS2 | | | | | | | | |
| | PRMT5 | | | SLC2A6 | | | | | | | | |
| | ACADSB | | | EGR1 | | | | | | | | |
| | INCENP | | | TSPEAR-AS1 | | | | | | | | |
| | LARS2 | | | MAPK15 | | | | | | | | |
| | ZNF714 | | | RP11-178D12.1.1 | | | | | | | | |
| | CCDC86 | | | FOS | | | | | | | | |
| | PSMD2 | | | ANGPTL1 | | | | | | | | |
| | LRRC20 | | | ZNF467 | | | | | | | | |
| | ROCK2 | | | RP11-712B9.2.1 | | | | | | | | |
| | C12orf48 | | | PRSS35 | | | | | | | | |
| | TNPO1 | | | NHLRC4 | | | | | | | | |
| | PPAP2B | | | SLC6A12 | | | | | | | | |
| | C14orf126 | | | ICAM1 | | | | | | | | |
| | CDC42BP A | | | C2CD4A | | | | | | | | |
| | BCCIP | | | GPR132 | | | | | | | | |
| | PSIP1 | | | STRC | | | | | | | | |
| | LSM3 | | | C6orf223 | | | | | | | | |
| | MALT1 | | | NFE2 | | | | | | | | |
| | AAK1 | | | CTD-2319I12.1.1 | | | | | | | | |
| | CABYR | | | FAM167B | | | | | | | | |
| | RBM12 | | | PNCK | | | | | | | | |
| | CYCS | | | TPPP3 | | | | | | | | |
| | SFMBT1 | | | ITGA10 | | | | | | | | |
| | MPHOSPH9 | | | ODF3B | | | | | | | | |
| | SEH1L | | | WFDC10 B | | | | | | | | |
| | DCAF13 | | | GRIP2 | | | | | | | | |
| | TIMM10 | | | TXNIP | | | | | | | | |
| | LYRM1 | | | NUPR1 | | | | | | | | |
| | FAM171A1 | | | ARRDC4 | | | | | | | | |
| | CENPH | | | SSPO | | | | | | | | |
| | RP11-117L6.1.1 | | | TBX4 | | | | | | | | |
| | BRIX1 | | | LAMP3 | | | | | | | | |
| | PEG10 | | | SLCO4C1 | | | | | | | | |
| | THOC7 | | | HPN | | | | | | | | |
| | CDCA7L | | | FAM132A | | | | | | | | |
| | HPRT1 | | | GAL3ST2 | | | | | | | | |
| | CEP170 | | | NGFR | | | | | | | | |
| | SF3A3 | | | C2CD4B | | | | | | | | |
| | PMVK | | | RANBP3L | | | | | | | | |
| | HSPD1 | | | C17orf28 | | | | | | | | |
| | TDPI | | | C21orf90 | | | | | | | | |
| | DNMT3B | | | MYO15A | | | | | | | | |

補足データ4 I : 全サンプル (対 A 3 8 P e r) および D M S O 対 6 A N 処理 A 3 8 L g 細胞にわたる再発性 D E 遺伝子間の重複の比較。

【表 27-1】

| 再発性 アップ/6AN ダウン | 遺伝子 | 再発性 ダウン/6AN アップ | 遺伝子 | | 再発性 アップ/6AN アップ | 遺伝子 | | 再発性 ダウン/6AN ダウン | 遺伝子 |
|--|-------------|---|--------------|--|--|--------------|--|---|--------------------|
| 同時制御 /6AN ダウン: 255/1968 (13%) | PPIA | 同時制御 /6AN アップ: 332/2192 (15%) | SAT1 | | 同時制御 /6AN アップ: 82/2192 (0.04%) | EEF1A1 | | 同時制御 /6AN ダウン: 111/1968 (0.06%) | KRT19+ M2:M52 |
| 同時制御/ 再発性 アップ: 255/891 (28.6%) | DYNC1H 1 | 同時制御/ 再発性 ダウン: 332/1842 (18%) | ATP1B1 | | 同時制御/ 再発性 アップ: 82/891 (9%) | AKR1C2 | | 同時制御/ 再発性 ダウン: 111/1842 (0.06%) | DCBLD2 |
| | CCT5 | | GRN | | | RPL12 | | | PLAU |
| | YBX1 | | JUP | | | RPL31 | | | EZR |
| | HNRNPA 3 | | LCN2 | | | RPL29 | | | GPR110 |
| | XRCC6 | | CST1 | | | ID1 | | | COL17A1 |
| | PRDX1 | | TXNIP | | | XBP1 | | | ANO1 |
| | SERBP1 | | LAMB3 | | | ATP2B1 | | | PADI1 |
| | DPYSL3 | | DDR1 | | | HERPUD1 | | | SDC1 |
| | ECT2 | | DUOX2 | | | MTHFD2 | | | CD82 |
| | CBX3 | | SLCO4A1 | | | MAN1A1 | | | CGN |
| | SLC25A3 | | GSN | | | SHMT2 | | | LY6D |
| | HMG2 | | LIMA1 | | | MAP2 | | | CRABP2 |
| | TMPO | | LYZ | | | ABCA3 | | | DOCK9 |
| | CYCS | | MUC1 | | | TOMM7 | | | SPNS2 |
| | PAICS | | GNE | | | ASNS | | | RAPGEF 3 |
| | MYL6 | | DAB2IP | | | PYCR1 | | | FGFBP1 |
| | NOP56 | | TNIP1 | | | TBC1D4 | | | RBPI |
| | HNRNPR | | LIPH | | | UCP2 | | | PRSS12 |
| | FKBP1A | | RHBDF2 | | | CELSR3 | | | C1orf106 |
| | THBS1 | | HS3ST1 | | | LETMD1 | | | QPCT |
| | DEK | | RDH10 | | | KLHDC2 | | | STEAP2 |
| | ASPM | | MUC20 | | | ARG2 | | | ARHGDI B |
| | NUP210 | | CLIP2 | | | LEPRE1 | | | ZNF185 |
| | PCNA | | KLK10 | | | SLC25A2 9 | | | DHRS9 |
| | HNRNPA B | | SLC44A2 | | | PCK2 | | | CDC42BP G |
| | ATIC | | EFNB1 | | | SLC26A6 | | | NBPF10 |
| | NCAPD2 | | NFKBIA | | | PTPRM | | | MUC4 |
| | RANGAP 1 | | EVPL | | | SYT11 | | | PLEKHA 7 |
| | MYO1B | | ENDOD1 | | | FAM113A | | | AIG1 |
| | MTHFD1 | | ICAM1 | | | GAB2 | | | RP11- 800A3.4.1 |
| | FAM208 B | | CDC42EP 2 | | | CRELD2 | | | MMD |
| | GPD2 | | CTSL1 | | | SLC1A4 | | | SAA1 |

【表 27-2】

| | | | | | | | | | | |
|--|----------|--|--|------------|--|--|-----------------|--|--|-----------------|
| | GTPBP4 | | | DRAM1 | | | ABHD14B | | | ARAP2 |
| | TUBA4A | | | TRIM2 | | | PDK1 | | | ANKRD22 |
| | SMCHD1 | | | NFKBIZ | | | C9orf150 | | | CDS1 |
| | FOXMI | | | ADAM8 | | | MLLT3 | | | ALS2CL |
| | SMARCC1 | | | TRIB2 | | | SSBP2 | | | GALNT6 |
| | TFDP1 | | | GSDMB | | | C3orf23 | | | KRT15 |
| | XPO6 | | | SGK1 | | | DDT | | | XDH |
| | TOP2B | | | ARHGEF16 | | | SARM1 | | | DGAT2 |
| | HEATR1 | | | LRCH4 | | | OSBPL6 | | | FBP1 |
| | ODC1 | | | HERC5 | | | LEPREL2 | | | CLDN10 |
| | ZWINT | | | PLEKHM1 | | | EEF1A1P5 | | | RHOD |
| | ATXN10 | | | ASAH1 | | | HCN2 | | | PRSS3 |
| | NUP155 | | | TMEM8A | | | VLDLR | | | CTSL2 |
| | CDCA7L | | | PRICKLE4 | | | BAMBI | | | SNAI2 |
| | SNRPB | | | NEU1 | | | USE1 | | | GALNT12 |
| | GNPNAT1 | | | TNFSF15 | | | CGREF1 | | | P2RY2 |
| | WDR3 | | | PLAUR | | | ATHL1 | | | RAG1 |
| | HJURP | | | AC103810.2 | | | GPR37 | | | PADI3 |
| | KNTC1 | | | RHBDF1 | | | DERL3 | | | TESC |
| | REV3L | | | HSD17B11 | | | PLK3 | | | SELL |
| | CDH2 | | | ROBO4 | | | SLC29A4 | | | GPR116 |
| | FARSB | | | EREG | | | TMEM234 | | | GCHFR |
| | CCDC88A | | | VWA1 | | | RP11-66N24.3.1 | | | RP11-314P12.3.1 |
| | NETO2 | | | TJP3 | | | CORO6 | | | CHST4 |
| | NUP153 | | | PDCD4 | | | C9orf37 | | | SHANK2 |
| | USP1 | | | PTPRE | | | EEF1A1P6 | | | DNAH10 |
| | MCM6 | | | C15orf48 | | | DNAJC3-AS1 | | | KRT23 |
| | POLD2 | | | TPBG | | | C3orf78 | | | COL1A1 |
| | SF3A3 | | | TNFAIP3 | | | MCEE | | | NMNAT2 |
| | TYMS | | | PROS1 | | | RP11-480A16.1.1 | | | AKAP6 |
| | KIAA1324 | | | GPR108 | | | ZNF70 | | | AADAC |
| | TMEM48 | | | AGFG2 | | | NAT6 | | | VEPH1 |
| | TCOF1 | | | RHBDD2 | | | SEMA3F | | | C7orf58 |
| | PHIP | | | DGAT1 | | | VKORC1 | | | DNAH12 |
| | BRX1 | | | HBPI | | | RP5-1103G7.4.1 | | | SLC22A20 |
| | UTP20 | | | RNF103 | | | P2RX6 | | | MCC |
| | CTPS | | | TSC22D3 | | | C10orf102 | | | RP11-7K24.3.1 |
| | RANBP1 | | | CAPS | | | THTPA | | | ANKRD56 |
| | SACS | | | SLC2A6 | | | FTX | | | CTD-2021J15.2 |

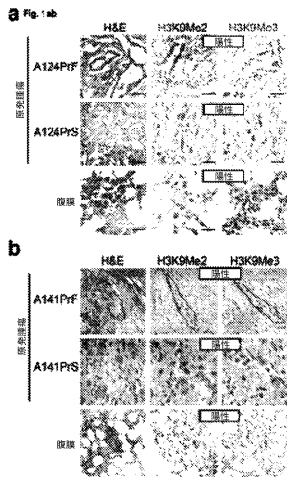
【表 27-3】

| | | | | | | | | | | |
|--|----------------|--|----------|--|--|--|--|------------------|--|------------------|
| | | | | | | | | | | .1 |
| | DTL | | ABCA7 | | | | | AC002472.8.1 | | ARL14 |
| | CDC20 | | TMC4 | | | | | RP11-243J18.3.1 | | C15orf62 |
| | APIB1 | | FAM193B | | | | | CTD-3074O7.5.1 | | METTL7B |
| | CDC6 | | VPS28 | | | | | RP11-574K11.20.1 | | SLC4A3 |
| | ABCD3 | | ARSD | | | | | CES4A | | KLHL13 |
| | EBNA1BP2 | | NCF2 | | | | | METTL12 | | RP11-357H14.19.1 |
| | PHTF2 | | MMP28 | | | | | RP11-390P2.4.1 | | FGFR3 |
| | TRIP13 | | PARP10 | | | | | RP11-216F19.1.1 | | PKDCC |
| | RUVBL1 | | LZTS2 | | | | | RP11-85K15.2.1 | | RP11-157P1.4.1 |
| | RCC1 | | ANKRD13D | | | | | SEPT7L | | SMO |
| | MYBL2 | | DNASE2 | | | | | | | CD22 |
| | CHML | | LYNX1 | | | | | | | SYTL5 |
| | CCDC165 | | APOBEC3G | | | | | | | TNNT2 |
| | SEH1L | | CDH3 | | | | | | | ADAMTS14 |
| | WDR12 | | AQP3 | | | | | | | ANXA10 |
| | TMEM56 | | NYNRIN | | | | | | | TTC3P1 |
| | ERC1 | | ABCG1 | | | | | | | NMU |
| | RFC3 | | SH3YL1 | | | | | | | RP11-597D13.9.1 |
| | DEPDC1 | | FBXO2 | | | | | | | UNC5C |
| | RP1-239B22.1.1 | | PPP1R16A | | | | | | | AADAT |
| | BMP2K | | SESN3 | | | | | | | GRHL1 |
| | NT5DC2 | | TMPRSS3 | | | | | | | TMEM169 |
| | MPHOSPH9 | | HEATR7A | | | | | | | CYP24A1 |
| | HDAC9 | | KYNU | | | | | | | RP11-448G15.3.1 |
| | STMN3 | | METTL7A | | | | | | | ASB9 |
| | MRT04 | | FA2H | | | | | | | NAALADL2 |
| | CDCA8 | | ZC3H12A | | | | | | | FAM46B |
| | S100A2 | | CFI | | | | | | | CFTR |
| | PI4K2B | | SLC15A3 | | | | | | | C16orf74 |
| | MCM8 | | SIGIRR | | | | | | | RP11-416I2.1.1 |
| | GTF2H3 | | FER1L4 | | | | | | | PLAC1 |
| | JUN | | SLC39A11 | | | | | | | ZNF658 |
| | TTF2 | | FOXQ1 | | | | | | | SP6 |
| | FAM171A1 | | RASSF5 | | | | | | | TTN |
| | FKBP5 | | DHRS3 | | | | | | | C8orf46 |

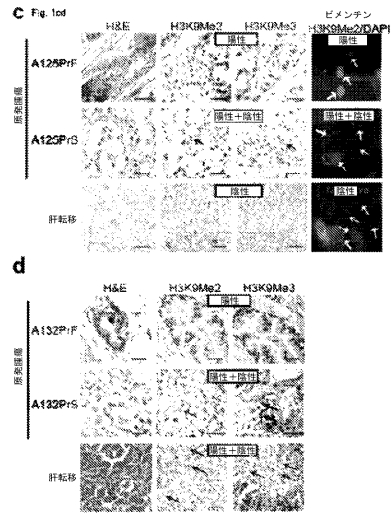
【表 27-4】

| | | | | | | | | | | | |
|--|--------------|--|----------------------|--|--|--|--|--|--|--|--------------|
| | ADSL | | ARHGEF3 | | | | | | | | GPR65 |
| | DIAPH3 | | S100P | | | | | | | | LEF1 |
| | KIAA0586 | | ZG16B | | | | | | | | RP11-6F2.4.1 |
| | POLQ | | PTK6 | | | | | | | | DENND2A |
| | EXO1 | | CDA | | | | | | | | |
| | EEF1E1 | | IL32 | | | | | | | | |
| | ODZ3 | | ZNF862 | | | | | | | | |
| | SSX2IP | | CD14 | | | | | | | | |
| | CEP97 | | TMED1 | | | | | | | | |
| | ABCC4 | | G0S2 | | | | | | | | |
| | RAD51A P1 | | ENDOV | | | | | | | | |
| | MRPL47 | | SMAD6 | | | | | | | | |
| | C9orf140 | | MIA | | | | | | | | |
| | GEMIN5 | | CACNB1 | | | | | | | | |
| | FANCD2 | | ARL4D | | | | | | | | |
| | CCNE2 | | JAK2 | | | | | | | | |
| | UMPS | | KCNMB4 | | | | | | | | |
| | BARD1 | | IRAK2 | | | | | | | | |
| | USP13 | | RELB | | | | | | | | |
| | CENPV | | CEBPB | | | | | | | | |
| | SMTN | | MAFF | | | | | | | | |
| | PRPS1 | | C9orf16 | | | | | | | | |
| | CCNF | | RALGPS1 | | | | | | | | |
| | RFC5 | | LTB4R | | | | | | | | |
| | ATP5G1 | | CSF2RA | | | | | | | | |
| | POLR3G | | C10orf32 | | | | | | | | |
| | CBX2 | | SAT2 | | | | | | | | |
| | NOP16 | | ALPPL2 | | | | | | | | |
| | MCM10 | | CCDC69 | | | | | | | | |
| | SLC16A7 | | NRIH3 | | | | | | | | |
| | POPI | | GRAMD1 C | | | | | | | | |
| | CLSPN | | FAM113B | | | | | | | | |
| | PFAS | | WASH7P | | | | | | | | |
| | KLF12 | | TGFBR3 | | | | | | | | |
| | GEMIN4 | | YPEL3 | | | | | | | | |
| | C3orf26 | | LRRN1 | | | | | | | | |
| | GMNN | | MAST3 | | | | | | | | |
| | CENPN | | ABC7-42389800N19.1.1 | | | | | | | | |
| | KIF15 | | ZNF467 | | | | | | | | |
| | GDAP1 | | XAF1 | | | | | | | | |
| | THOC7 | | C16orf7 | | | | | | | | |
| | OPN3 | | RP3-395M20.8.1 | | | | | | | | |
| | C22orf29 | | DNAH2 | | | | | | | | |
| | BAG2 | | ADCY4 | | | | | | | | |

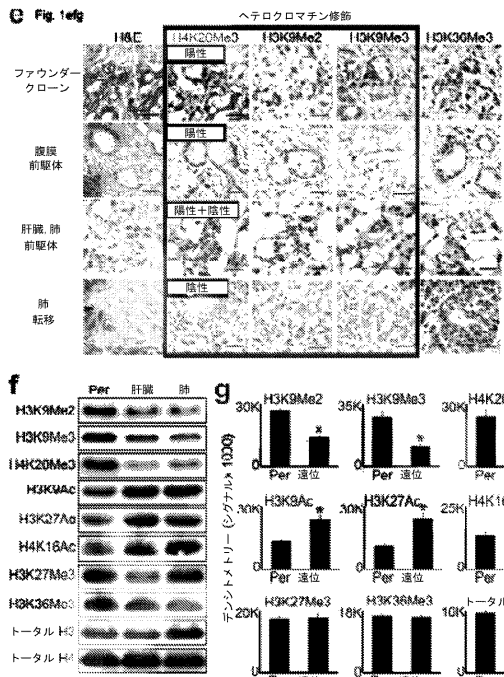
【 図 1 - 1 】



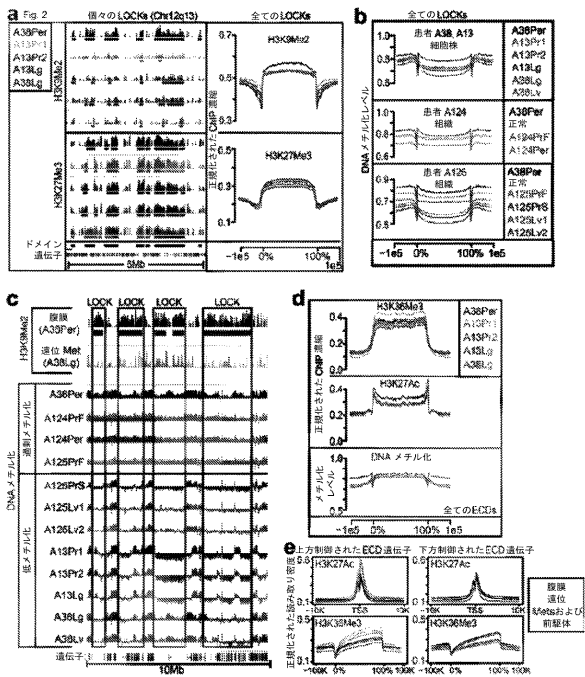
【 図 1 - 2 】



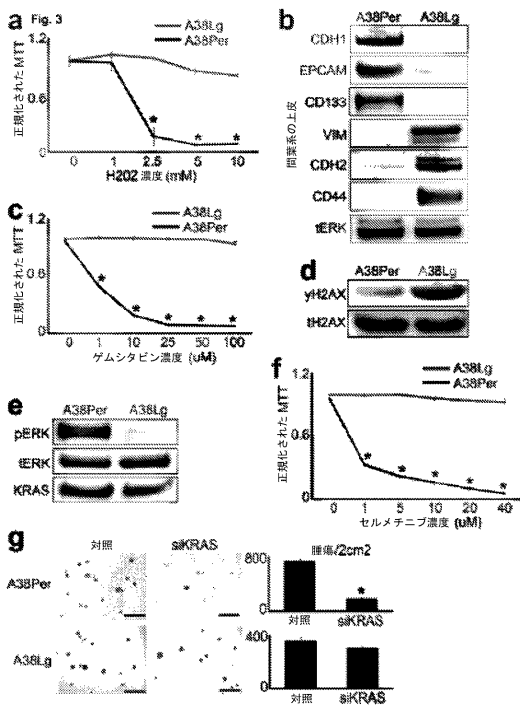
【 図 1 - 3 】



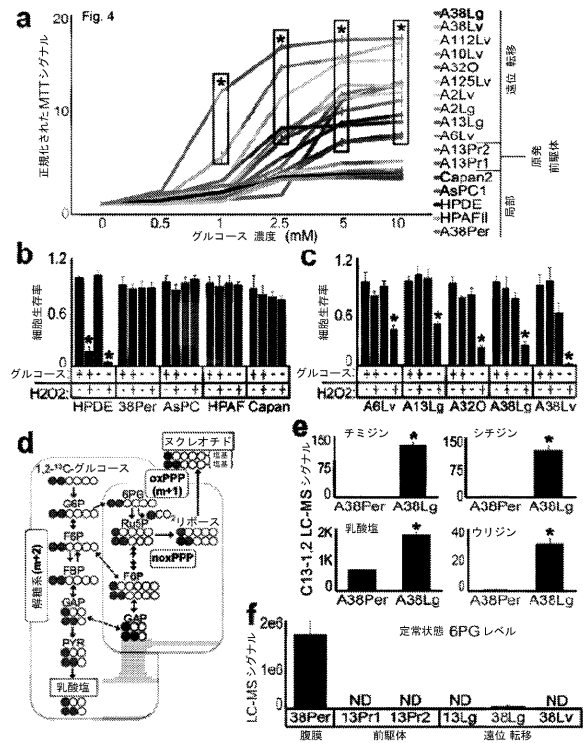
【 図 2 】



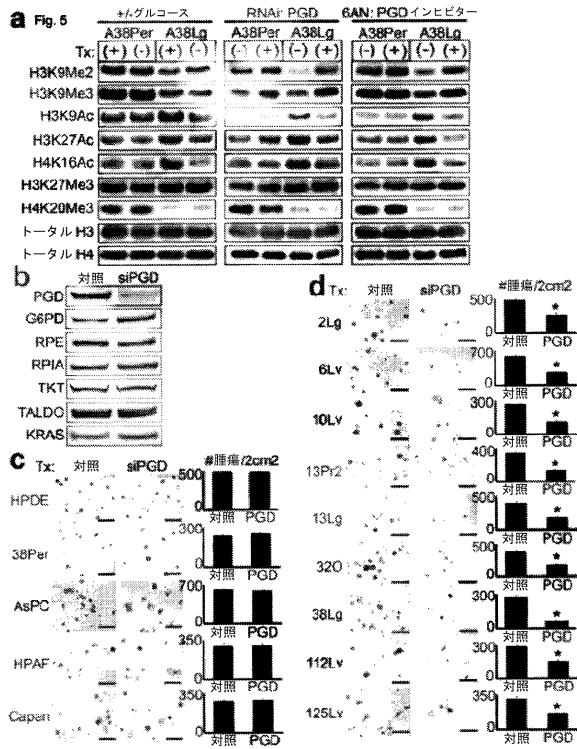
【 図 3 】



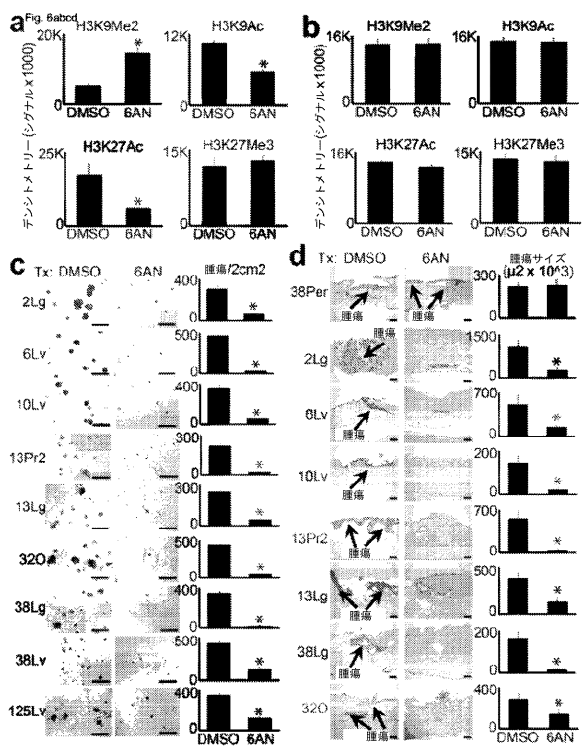
【 図 4 】



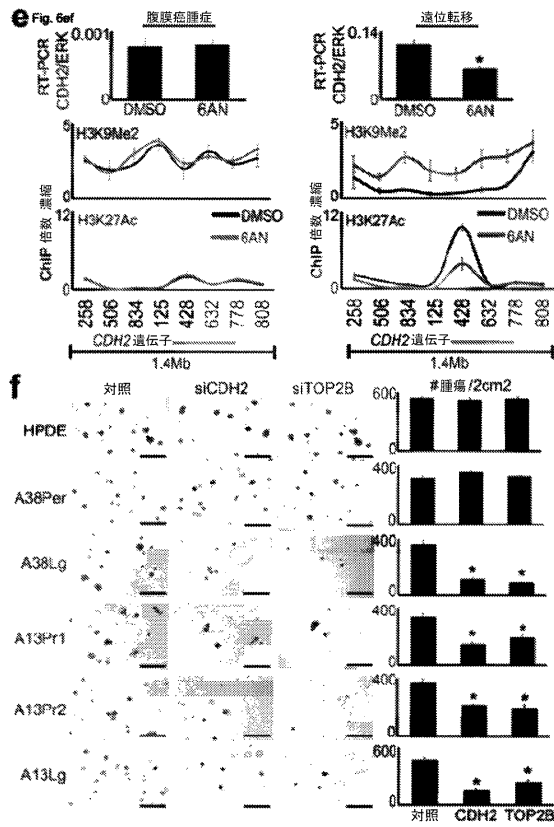
【 図 5 】



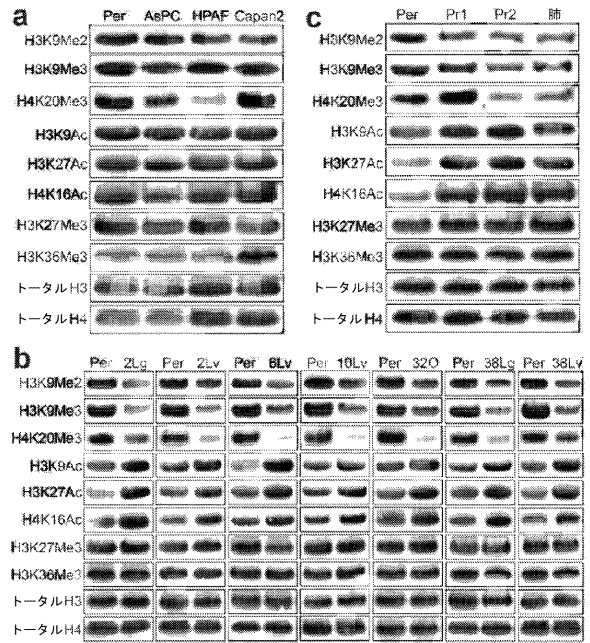
【 図 6 - 1 】



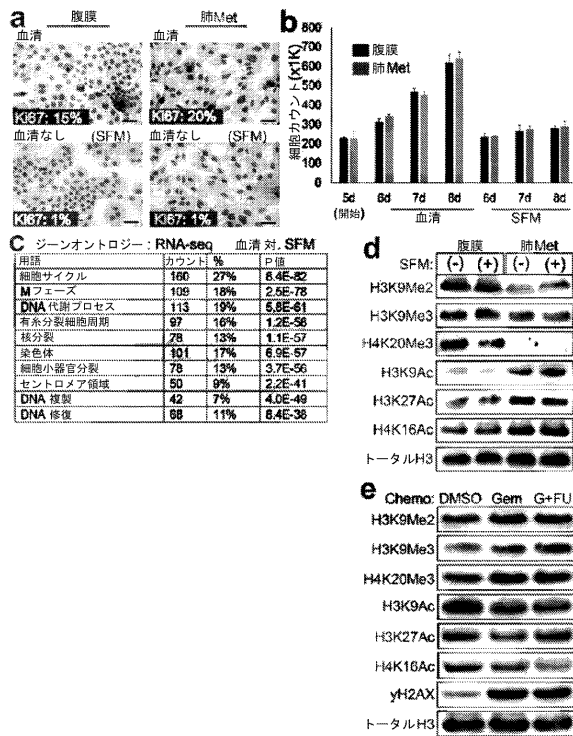
【 図 6 - 2 】



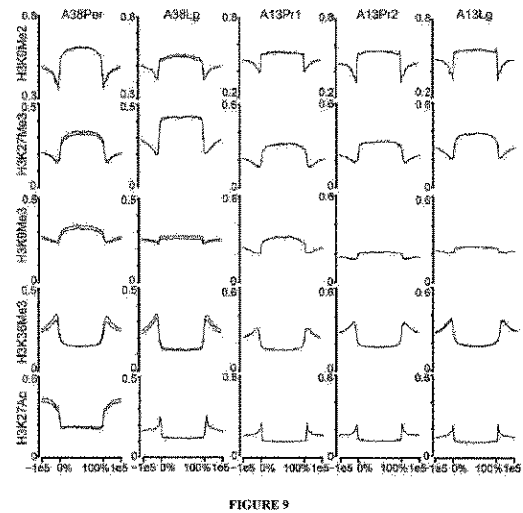
【 図 7 】



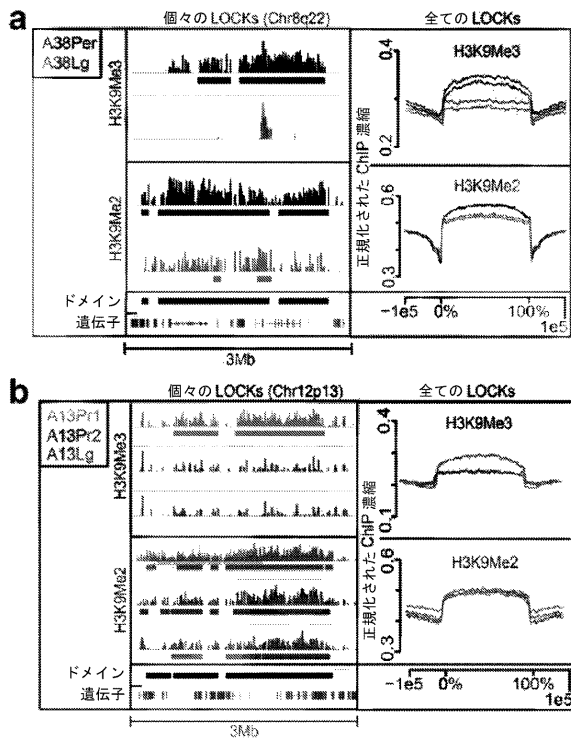
【 図 8 】



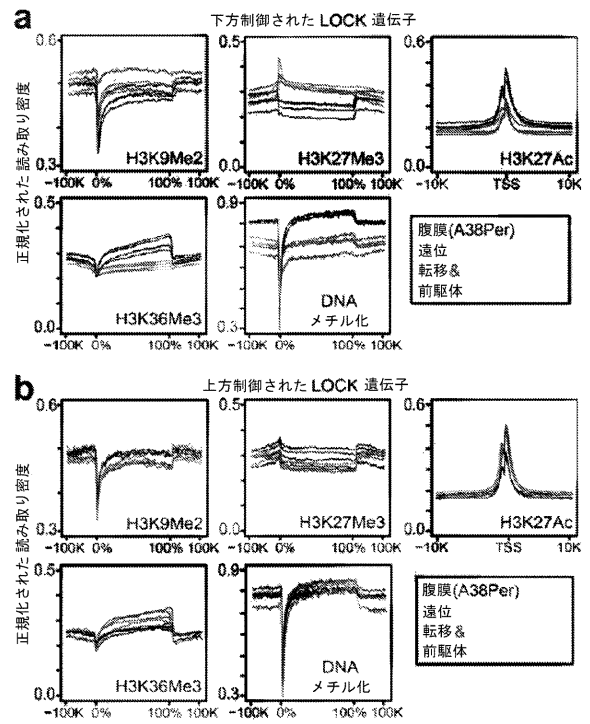
【 図 9 】



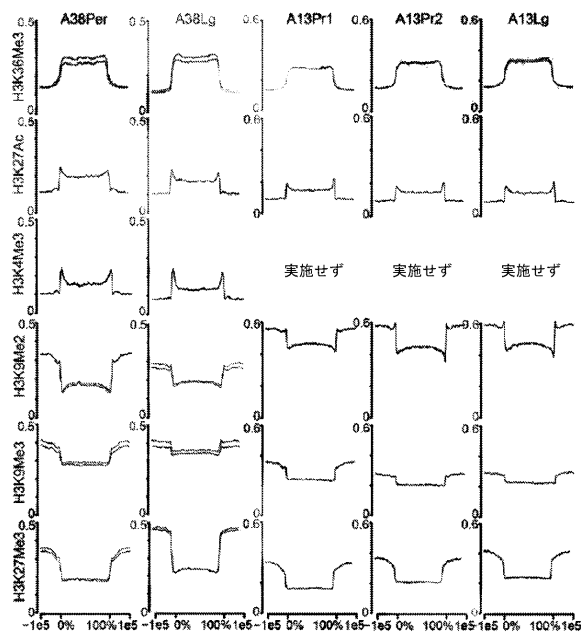
【 図 1 0 】



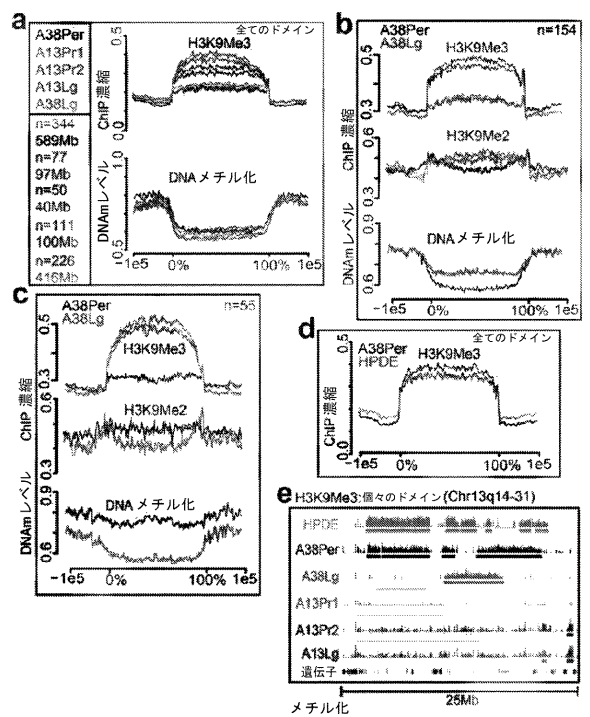
【 図 1 1 】



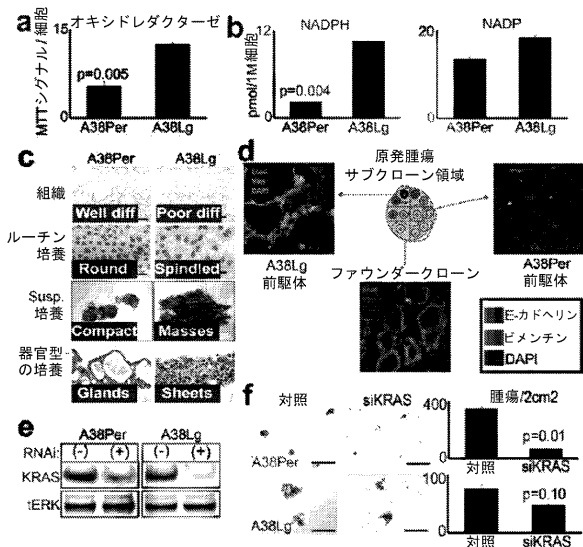
【 図 1 2 】



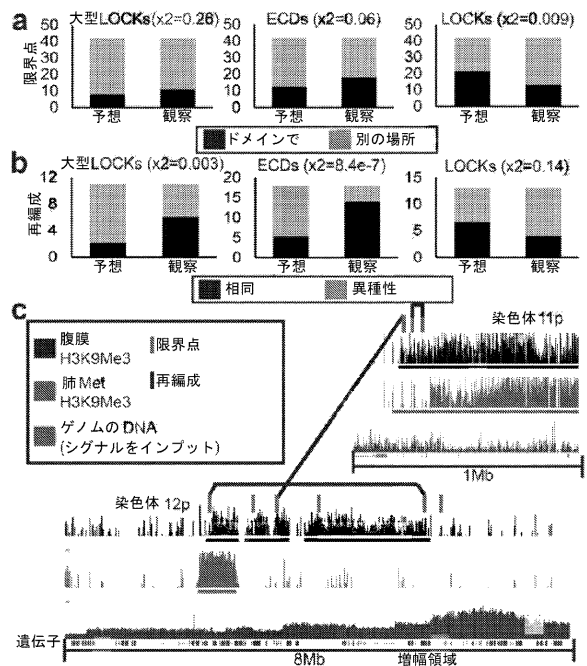
【 図 1 3 】



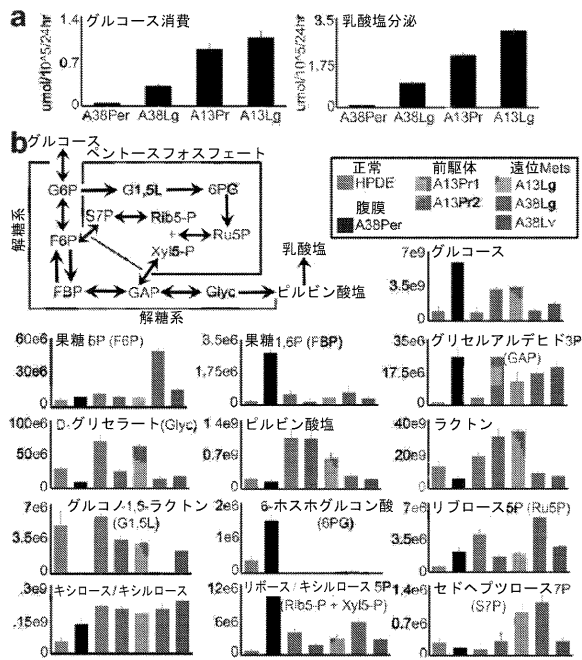
【図14】



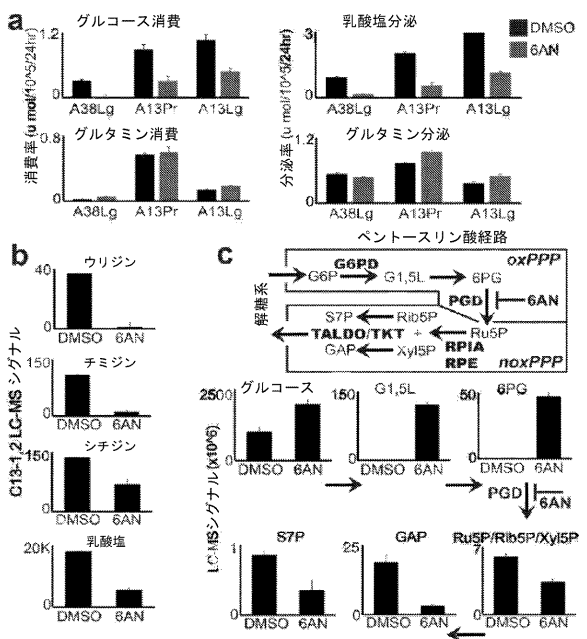
【図15】



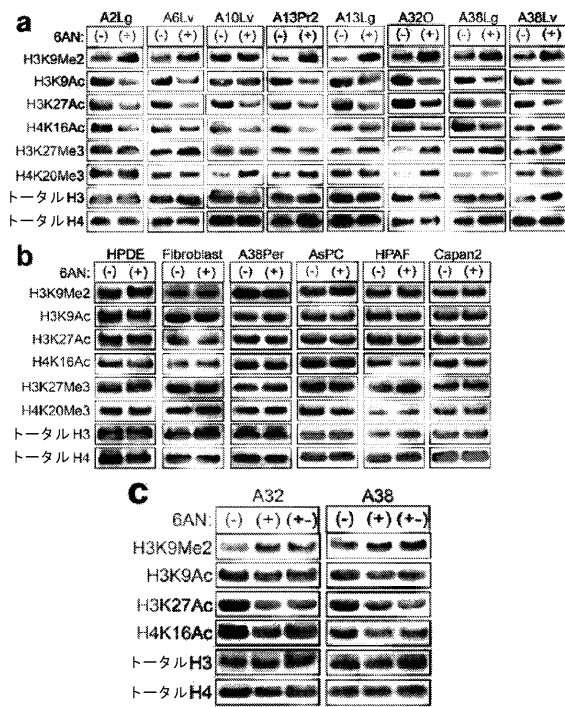
【図16】



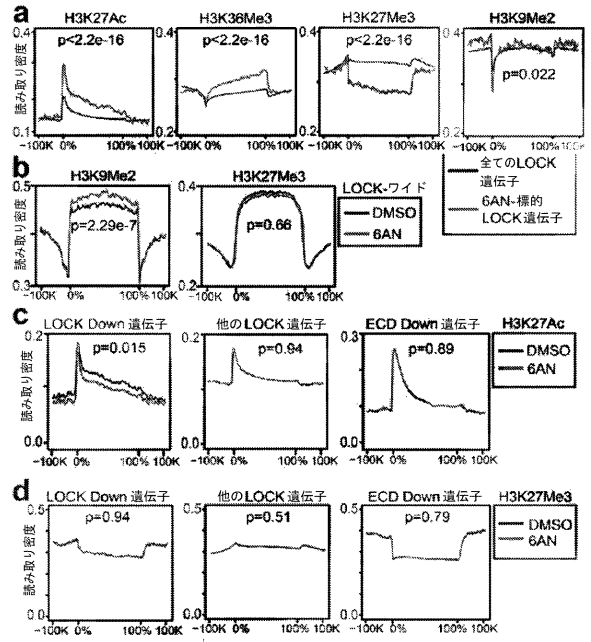
【図17】



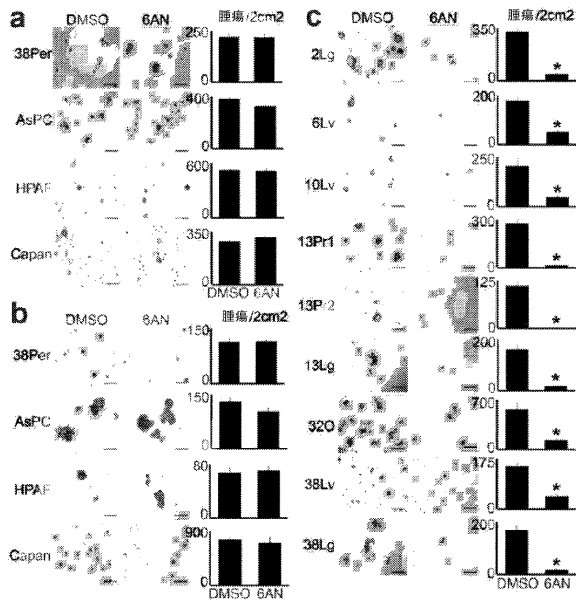
【 図 1 8 】



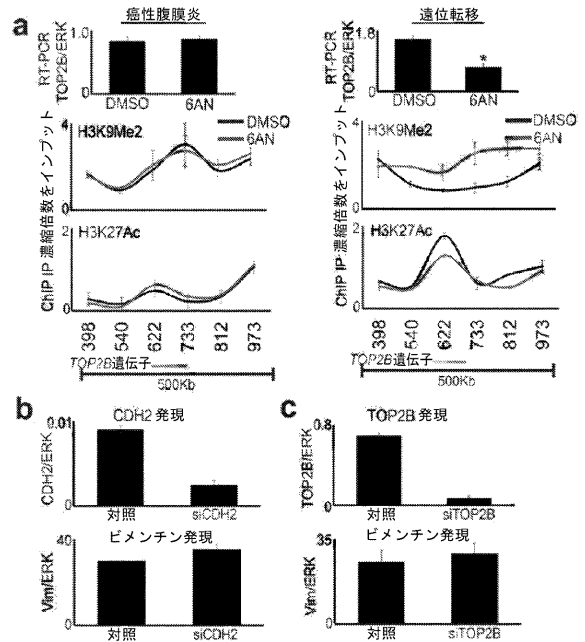
【 図 1 9 】



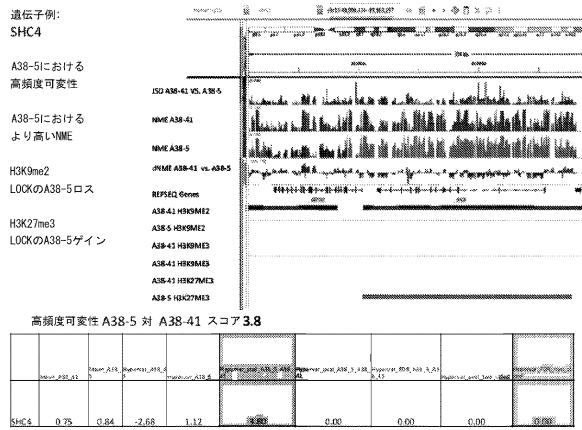
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 配列表 】

2019535017000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/055376

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; A61P 35/04; A61P 43/00; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/574 (2017.01) CPC - C12Q 1/6886; C12Q 2600/112; C12Q 2600/118; C12Q 2600/154; C12Q 2600/178; G01N 2800/52 (2017.08) | | |
|--|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/6; 435/375; 536/24.5 (keyword delimited) | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2014/0128283 A1 (FEINBERG et al) 08 May 2014 (08.05.2014) entire document | 1, 2, 4, 8, 14, 15 |
| --- | | --- |
| Y | | 3, 5-8, 20, 22-26 |
| X | US 7,153,891 B2 (FERGUSON) 26 December 2006 (26.12.2006) entire document | 13 |
| X | WO 2013/152186 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 10 October 2013 (10.10.2013) entire document | 16-18 |
| --- | | --- |
| Y | | 20, 22-26 |
| X | WO 2016/144371 A1 (MITCHELL WOODS PHARMACEUTICALS, INC.) 15 September 2016 (15.09.2016) entire document | 19 |
| Y | WO 2014/056627 A1 (HI-STEM GGMBH) 17 April 2014 (17.04.2014) entire document | 3, 24 |
| Y | US 2015/0174138 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.) 25 June 2015 (25.06.2015) entire document | 5-8 |
| P,A | WO 2016/172332 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 27 October 2016 (27.10.2016) entire document | 1-9, 13-20, 22-26 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 28 November 2017 | | Date of mailing of the international search report 28 DEC 2017 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | | Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/055376

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 10-12, 21
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(71)出願人 501271033
 バンダービルト・ユニバーシティ
 VANDERBILT UNIVERSITY
 アメリカ合衆国 3 7 2 4 0 テネシー州ナッシュビル、ウエスト・エンド・アベニュー 2 2 0 1 番、
 カークランド・ホール 3 0 5

(74)代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司

(74)代理人 230118913
 弁護士 杉村 光嗣

(74)代理人 100181847
 弁理士 大島 かおり

(72)発明者 オリバー マクドナルド
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート
 3 4 0 0

(72)発明者 シン リー
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート
 3 4 0 0

(72)発明者 クリスティーン エー イacobジオ - ドナヒュー
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート
 3 4 0 0

(72)発明者 アンドリュー ピー フェインバーグ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 8 バルティモア ノース チャールズ ストリート
 3 4 0 0

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR62 QS25 QS33
 QX02

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 大规模表观基因组重编程将同化葡萄糖代谢与胰腺癌进展过程中的远处转移联系起来 | | |
| 公开(公告)号 | JP2019535017A | 公开(公告)日 | 2019-12-05 |
| 申请号 | JP2019518463 | 申请日 | 2017-10-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 约翰霍普金斯大学 纪念斯隆-凯特琳癌症中心 凡德比特大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 约翰·霍普金斯大学 范德比尔特大学 | | |
| [标]发明人 | シンリー | | |
| 发明人 | オリバー マクドナルド シン リー クリスティーン エー イアコブジオ-ドナヒュー アンドリュー ピー フェインバーグ | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/6869 C12Q1/6886 C12N15/113 C12Q1/02 | | |
| CPC分类号 | A61P35/04 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57484 G01N33/57496 G01N2800/52 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.ZNA.M C12Q1/68 C12Q1/6869.Z C12Q1/6886.Z C12N15/113.Z C12Q1/02 | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QX02 | | |
| 代理人(译) | 杉村健二 | | |
| 优先权 | 62/405155 2016-10-06 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明包括在含有来自患有癌症的受试者例如PDAC的DNA的样品中检测大的有组织的异染色质赖氨酸 (K) -9修饰域 (LOCK) 和大的DNA低甲基化的嵌段。本发明涉及用于鉴定表观遗传重编程的靶标的方法。本发明还提供了差异表达的基因在原发性肿瘤中鉴定转移倾向的用途，其中所述基因包括本文表中的基因，氧化应激基因，EMT基因，免疫学。响应基因，DNA修复基因，葡萄糖代谢基因，oxPPP基因和PGD基因。另外，本发明提供影响表观基因组改变，包括抑制oxPPP，包括在与试剂或化合物接触之前和之后分析来自受试者的样品，以及测量试剂或化合物对表观基因组改变的影响。提供了鉴定试剂或发挥其作用的化合物的方法。

FIGURES 1A

