

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6297983号  
(P6297983)

(45) 発行日 平成30年3月20日(2018.3.20)

(24) 登録日 平成30年3月2日(2018.3.2)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 Q 1/68 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48 M
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M
<b>G O 1 N 37/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 37/00 I O 2
<b>C 1 2 N 5/0735 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0735

請求項の数 5 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-557547 (P2014-557547)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月16日(2014.1.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/051316  
 (87) 国際公開番号 W02014/112655  
 (87) 国際公開日 平成26年7月24日(2014.7.24)  
 審査請求日 平成28年8月30日(2016.8.30)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-5594 (P2013-5594)  
 (32) 優先日 平成25年1月16日(2013.1.16)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成24年度、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 502338292  
 ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社  
 千葉県松戸市上本郷88番地  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁  
 (72) 発明者 田島 秀二  
 千葉県松戸市上本郷88番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内  
 (72) 発明者 銀屋 治巳  
 千葉県松戸市上本郷88番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の識別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検幹細胞から抽出された染色体DNAについて、メチル化及び脱メチル化のパターンを解析し、解析されたパターンと前記被検幹細胞の性質とを関連づけることを特徴とする幹細胞の識別方法であって、

メチル化及び脱メチル化のパターンの解析は、免疫沈降、マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション処理、当該処理により得られたシグナルデータの確率値処理、及び当該確率値のマッピングにより行われ、

前記確率値のマッピングは、マイクロアレイ上の各プローブのメチル化確率値  $P_m$  及び脱メチル化確率値  $P_{h_m}$  を、プローブ番号に割り当てるとともに、以下の(1)~(4)の工程:

(1) 被検幹細胞のプローブ番号  $n$  ( $n$  は整数) と、該プローブ番号に対応する基準幹細胞のマイクロアレイプローブ番号  $n'$  ( $n'$  は整数) とを選定する工程、

(2) プローブ番号  $n$  に割り当てられた確率値  $P_{(n)}$  の、プローブ番号  $n'$  に割り当てられた確率値  $P_{(n')}$  に対する比率  $r = P_{(n)} / P_{(n')}$  を求める工程、

(3) 工程(1)を連続するプローブ番号  $n$  から  $n+i$  ( $i$  は整数) について繰り返し、 $0.5 \sim 1.5$  の範囲にある比率  $r$  の個数  $S_r$  をカウントする工程、並びに

(4) メチル化確率値及び脱メチル化確率値のそれぞれについて、相関率  $R(\%) = \{S_r / (i+1)\} \times 100$  を求める工程

を含むものであり、

解析されたパターンと被検幹細胞の性質との関連づけを、以下の ( a ) ~ ( d ) の判定基準、又は以下の ( a ' ) ~ ( d ' ) の判定基準に基づいて行う、前記方法。

( a ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 以上、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に類似の状態にあると決定される。

( b ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 未満、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、脱メチル化は類似の状態にあるが、メチル化は非類似の状態にあると決定される。

( c ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 以上、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化は類似の状態にあるが、脱メチル化は非類似の状態にあると決定される。

( d ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 未満、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に非類似の状態にあると決定される。

( a ' ) メチル化相関係数  $R'_m$  が 0.7 以上、かつ脱メチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が 0.7 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に類似の状態にあると決定される。

( b ' ) メチル化相関係数  $R'_m$  が 0.7 未満、かつ脱メチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が 0.7 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、脱メチル化は類似の状態にあるが、メチル化は非類似の状態にあると決定される。

( c ' ) メチル化相関係数  $R'_m$  が 0.7 以上、かつ脱メチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が 0.7 未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化は類似の状態にあるが、脱メチル化は非類似の状態にあると決定される。

( d ' ) メチル化相関係数  $R'_m$  が 0.7 未満、かつ脱メチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が 0.7 未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に非類似の状態にあると決定される。

#### 【請求項 2】

幹細胞の性質は継代又は分化のステージを特徴づけるものである、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

メチル化及び脱メチル化のパターンの解析が自動化装置により行われるものである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

#### 【請求項 4】

幹細胞が ES 細胞又は iPS 細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 5】

幹細胞が外胚葉、内胚葉又は中胚葉系幹細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、幹細胞から抽出された染色体 DNA についてエピジェネティックな変化を解析し、得られたデータをパターン化することにより幹細胞を識別する方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

従来幹細胞を識別する方法としては、( i ) 顕微鏡観察による形態的变化の識別、( i i ) SSEA - 3、SSEA - 4 などの細胞表面マーカーを抗体で細胞を蛍光染色する方法、( i i i ) アルカリファスファターゼ活性などの細胞の持つ酵素活性を利用して細胞を色素染色する方法などが知られている。

#### 【0003】

多能性幹細胞を継代培養すると、幹細胞の形態学的な性状に異変が検出されないまま細

10

20

30

40

50

胞の性質は変化することが頻繁に観察される。

性質の変化としては、例えば、(a)分化誘導操作による分化傾向の変化、(b)細胞増殖速度の変化、(c)癌化に対する耐性の変化などが挙げられる。

しかしながら、上に挙げた従来の識別方法では、細胞の性状変化(a)~(c)を識別することができない。

#### 【0004】

従来の識別方法の限界を示す例としては、例えば、The International Stem Cell Initiativeによる報告(非特許文献1)が挙げられる。The International Stem Cell Initiativeは、世界各国の17の研究施設より提供された59種類のヒトES細胞について幹細胞特有の抗原であるSSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM343, CD9, CD90, ALP, Class1 HLA等の発現、及び幹細胞特有の遺伝子であるNANOG, POU5F1(OCT4), TDGF1, DNMT3B, GDF3等の遺伝子発現につき検討を行った(非特許文献1)。この結果、すべての59種類のヒト幹細胞は、これらの抗原および関連遺伝子について、いくつかの例外はあるものの、すべて類似の発現を示したと報告されている。このことから、形態学的な観察では、幹細胞の株間の性状の違いを把握することができないことが分かる。

10

#### 【0005】

そこで、次のステージとして遺伝子レベルで細胞の変化をとらえる試みがなされた。

そのような試みとして、まず、各種幹細胞において、mRNAの発現解析と染色体DNAの一塩基多型(SNP)解析が行われた。多数の幹細胞株が解析されたが、遺伝子発現パターンおよびSNPにおいて株間に差異を見いだすことができず、細胞の性状変化(a)~(c)の原因となる遺伝子群を特定するまではいたらなかった。

20

#### 【0006】

次に、遺伝子発現の調節機構を根本から調べる手段としてエピジェネティクス解析に期待が寄せられた(非特許文献3)。

エピジェネティクス解析の対象としては、特に染色体DNAのメチル化修飾(5-メチルシトシン(5mC))とヒストンタンパク質の修飾が注目された。DNAのメチル化は、1980年代から遺伝子発現の制御と深く関係することが示唆されていた。長年、メチル化検出法の開発が試行錯誤され、2000年頃から5mC修飾の検出法として、バイサルファイト法が使用されるようになった。

30

#### 【0007】

バイサルファイト法は、染色体DNAと亜硫酸ナトリウム(バイサルファイト)とを反応させ、非修飾のシトシン残基をウラシルに変換(バイサルファイト変換)させる方法である。また、バイサルファイト変換とアレルト異的PCRや制限酵素処理を組み合わせた方法も開発され、個々の遺伝子に対する解析が進められた。

さらにその改良版として、バイサルファイト法とマイクロアレイとを組み合わせた解析方法(非特許文献2)や、バイサルファイト法と次世代シーケンス法とを組み合わせた解析方法(Bis-seq法)(非特許文献4)が開発され、これらの方法により網羅的に幹細胞の染色体DNAの状態を解析することが可能となった。

40

#### 【0008】

特に、Bis-seq法は一塩基ベースでメチル化パターンを解析することが可能である。ただし、Bis-seq法はメチル化修飾の有無を定性的に検出するが、メチル化の可能性を定量的に検出することができないという検出限界がある。さらに、Bis-seq法は同一サンプルを10回以上の繰り返しシーケンスする必要があるため、非常に手間がかかり、そのうえ費用も高額なものになるというデメリットがある。これらの理由からBis-seq法を行える研究室は限られたものであった。

#### 【0009】

ところで、近年、シトシンの修飾には5mCばかりでなく、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)も存在することが確認されている(非特許文献2)。また、5mCがバ

50

イサルファイト変換に耐性を有する（すなわち、バイサルファイト処理によってもウラシルに変換されない）のと同様に、5hmCもバイサルファイト変換に対して耐性であることが報告されている（非特許文献5および6）。

この報告からすると、バイサルファイト処理したDNAの配列解析を行った場合、非修飾シトシンはウラシル（すなわちチミン）として解読され、他方、5mCと5hmCはいずれもシトシンとして解読されることになる。つまり、従来のBis-seq解析では5mCと5hmCとは区別されておらず、得られたデータには両者が混在していることが分かってきた。

#### 【0010】

5hmCは染色体DNAの脱メチル化機構に重要な役割を果たすことが指摘され、メチルシトシンから非修飾シトシンへ移行する反応における中間体であると考えられている。

Bis-seq法は5mCと5hmCとを区別することができないため、細胞のエピジェネティックな変化をトレースするには十分な解析法であるとはいえない。

#### 【0011】

一方、5mCを認識するMBDタンパク質を利用して、メチル化DNA断片を濃縮し、得られた断片を次世代シーケンサーで解析するMBD-seq法が開発された（非特許文献7）。しかし、濃縮DNA断片を読み取る際に濃縮ピークが二峰性をとるため、予想修飾位置が毎回100-200bps程度ずれることが知られている。メチル化が検出されたDNA領域の近傍遺伝子領域を制御遺伝子と仮定することで、候補遺伝子を絞り込んでいるが、明確な遺伝子特定ができていないという限界点がある。

また、MBDタンパク質で濃縮した5mCのDNA断片をマイクロアレイで解析するMIRA法（非特許文献8）も開発された。この方法は、正確に5mC断片のみを濃縮でき、Bis-seq法より正確なデータが得られると思われる。しかし、MIRA法も（i）MBD-seq同様にメチル化領域の近傍遺伝子を候補遺伝子とするのみでメチル化によって制御を受ける遺伝子を特定することができず、さらにメチル化の可能性を定量的に検出することができない点、ならびに（ii）5mCのみを解析対象とし、5hmCの変化をとられていないという点で、幹細胞の微妙な性状を明確に識別することができない。

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

#### 【0012】

【非特許文献1】Nature Biotechnology, volume 25, No. 7, 803-816, 2007

【非特許文献2】James R. Tollervy and et al, Epigenetics 7, 823-840 (2012)

【非特許文献3】Koichiro Nishino, and et al, PLoS one 5, e13017 (2010)

【非特許文献4】Julia Arand and et al, PLoS one, 8, e1002750 (2012)

【非特許文献5】Colm Nestor and et al. BioTechnique 48, 317-319 (2010)

【非特許文献6】Yun Huang and et al., PLoS one 5, e8888 (2010)

【非特許文献7】Li N and et al., Methods, 52, 203-212 (2010)

【非特許文献8】Joshua D. Tompkins and et al. PNAS, 109, 12544-12549 (2012)

#### 【発明の開示】

#### 【0013】

上記の状況に鑑み、本発明は、幹細胞において、その品質・特性を正確に把握するための識別方法を提供することを課題とする。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

本発明者らはプレジジョン・システム・サイエンス社（以下、「PSS社」）が開発した装置 SX - 8 G Compact を用いて幹細胞のエピジェネティック解析を行い、継代数の異なる胚性幹細胞（ES細胞）および人工多能性幹細胞（iPS細胞）から抽出した染色体DNAサンプルに対し、オートメチル化DNA免疫沈降（Auto MeDIP）及びオートヒドロキシメチル化DNA免疫沈降（Auto h-MeDIP）を同時に行い、得られたサンプルに対しマイクロアレイ解析を行った（MeDIP/h-MeDIP on chip）。

得られたマイクロアレイデータにアルゴリズムによる数値処理を行ったのち、UCSC Genome Browser によるマッピングを行いそれぞれの遺伝子のメチル化パターンの解析を行った。

本発明者らはこの結果から、従来の方法では識別不可能であった継代初期と後期のES細胞を遺伝子のメチル化及びヒドロキシメチル化パターンにより明確に識別できることを見出し、本発明を完成させた。

## 【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は以下に関する。

[ 1 ] 被検幹細胞から抽出された染色体DNAについて、メチル化及び脱メチル化のパターンを解析し、解析されたパターンと前記被検幹細胞の性質とを関連づけることを特徴とする幹細胞の識別方法。

[ 2 ] メチル化及び脱メチル化のパターンの解析は、免疫沈降、マイクロアレイを用いたハイブダイゼーション処理、当該処理により得られたシグナルデータの確率値処理、及び当該確率値のマッピングにより行われるものである前記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 3 ] 確率値のマッピングは、マイクロアレイ上の各プローブのメチル化確率値  $P_m$  及び脱メチル化確率値  $P_{h_m}$  を、プローブ番号に割り当てることにより行われる、前記 [ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ] 前記確率値のマッピングは、

( 1 ) 被検幹細胞のプローブ番号  $n$  ( $n$  は整数) と、該プローブ番号に対応する基準幹細胞のマイクロアレイプローブ番号  $n'$  ( $n'$  は整数) とを選定する工程、

( 2 ) プローブ番号  $n$  に割り当てられた確率値  $P_{(n)}$  の、プローブ番号  $n'$  に割り当てられた確率値  $P_{(n')}$  に対する比率  $r = P_{(n)} / P_{(n')}$  を求める工程、

( 3 ) 工程 ( 1 ) を連続するプローブ番号  $n$  から  $n + i$  ( $i$  は整数) について繰り返し、 $0.5 \sim 1.5$  の範囲にある比率  $r$  の個数  $S_r$  をカウントする工程、並びに

( 4 ) メチル化確率値及び脱メチル化確率値のそれぞれについて、相関率

$$R(\%) = \{ S_r / (i + 1) \} \times 100$$

を求める工程、

をさらに含む、前記 [ 3 ] に記載の方法。

[ 5 ] 幹細胞の性質は継代又は分化のステージを特徴づけるものである、前記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 6 ] メチル化及び脱メチル化のパターンの解析が自動化装置により行われるものである、前記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 7 ] 幹細胞がES細胞又はiPS細胞である、前記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 8 ] 幹細胞が外胚葉、内胚葉又は中胚葉系幹細胞である、前記 [ 1 ] に記載の方法。

[ 9 ] 解析されたパターンと被検幹細胞の性質との関連づけは、以下の ( a ) ~ ( d ) の判定基準に基づいて行われるものである、前記 [ 4 ] に記載の方法。

( a ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 以上、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に類似の状態にあると決定される。

( b ) メチル化相関率  $R_m$  が 70 % 未満、かつ脱メチル化相関率  $R_{h_m}$  が 70 % 以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、脱メチル化は類似の状態にあるが、メチル化は

10

20

30

40

50

非類似の状態にあると決定される。

(c)メチル化相関率 $R_m$ が70%以上、かつ脱メチル化相関率 $R_{h_m}$ が70%未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化は類似の状態にあるが、脱メチル化は非類似の状態にあると決定される。

(d)メチル化相関率 $R_m$ が70%未満、かつ脱メチル化相関率 $R_{h_m}$ が70%未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及び脱メチル化が共に非類似の状態にあると決定される。

【0016】

本発明により、iPS細胞をはじめとする種々の幹細胞のメチル化およびヒドロキシメチル化を解析し、同幹細胞のエピジェネティック変化を把握又はトレースすることが可能である。

10

すなわち、本発明は、抗体染色、遺伝子発現では区別できない細胞の内的な性質および状態を、エピジェネティック解析により、明確に区別することを可能にする。未分化と分化の区別のみならず、同じ未分化状態の2種類の細胞グループを、抗体染色、遺伝子発現では区別できない程度の差であっても、本発明により識別することができる。

したがって、本発明の方法により株間のエピジェネティック状態の類似性又は非類似性を識別することにより、創薬研究又は医療行為に供する幹細胞を選定することが可能である。

加えて、本発明の方法は、幹細胞の品質評価、品質管理など、再生医療分野の産業化に大きく貢献することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の方法に係るMeDIP法を説明する模式図である。

【図2】メチル化確率 $P_m$ 値の仮想データを示す図である。

【図3】ヒドロキシメチル化確率 $P_{h_m}$ 値の仮想データを示す図である。

【図4】幹細胞から精製した染色体DNAの電気泳動図である。

【図5】MeDIP法で濃縮したDNA断片の電気泳動図である。

【図6】iPS細胞のメチル化 $P_m$ 値のマッピンググラフである。

【図7】iPS細胞のメチル化 $P_m$ 値のマッピンググラフである。

【図8】iPS細胞のメチル化 $P_m$ 値のマッピンググラフである。

30

【図9】iPS細胞のメチル化 $P_m$ 値のマッピンググラフである。

【図10】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値及びヒドロキシメチル化 $P_{h_m}$ 値のマッピンググラフである。

【図11】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値及びヒドロキシメチル化 $P_{h_m}$ 値のマッピンググラフである。

【図12】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値及びヒドロキシメチル化 $P_{h_m}$ 値のマッピンググラフである。

【図13】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値及びヒドロキシメチル化 $P_{h_m}$ 値のマッピンググラフである。

【図14】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値のマッピンググラフである。

40

【図15】ES細胞のメチル化 $P_m$ 値の数値データをまとめた表である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2013年1月16日に出版された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願(特願2013-005594号)の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

50

## 【 0 0 1 9 】

## 用語

本願では、メチル化又はヒドロキシメチル化の確率値  $P$ 、確率値  $P$  の比  $r$ 、相関率  $R$ 、相関係数  $R'$  等の記号について、これらの記号がメチル化又はヒドロキシメチル化のいずれに関するものであるのかを明確に区別するため、メチル化を表す「 $m$ 」及びヒドロキシメチル化を表す「 $hm$ 」の符号を右下付きで付け加える場合もある。あるいは文脈上、上記記号がメチル化又はヒドロキシメチル化のいずれに関するものであるのか明らかな場合は、上記符号を省略する場合もある。

## 【 0 0 2 0 】

## 1. 幹細胞の識別方法

本発明は、2種類以上の幹細胞株の染色体（ゲノム）DNAをエピジェネティック解析することにより、前記幹細胞の株間の性状の差を明確に区別することが可能な、幹細胞の識別方法を提供する。

具体的には、本発明は、被検幹細胞から抽出された染色体DNAについて、メチル化及び脱メチル化（「ヒドロキシメチル化」ともいう）のパターンを解析し、解析されたパターンと前記被検幹細胞の性質とを関連づけることを特徴とする幹細胞の識別方法を提供する。

## 【 0 0 2 1 】

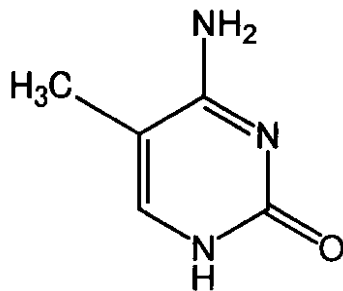
幹細胞における分化及び脱分化（リプログラミング）のプロセスは基本的に遺伝子配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化であり、特にこの中でもDNAのメチル化及び脱メチル化は分化及び脱分化の中核をなす変化である。

## 【 0 0 2 2 】

## メチル化

DNAのメチル化は、DNAを構成するアデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）及びシトシン（C）の4種類のヌクレオチドのうちシトシンに生じる。メチル化を受けたシトシン（メチルシトシン）は、以下の式に示すとおり、そのピリジン環の第5位炭素がメチル基（ $-CH_3$ ）で置換されている。

## 【化1】



## 【 0 0 2 3 】

## 脱メチル化

染色体DNAにおいて、5-メチルシトシンのメチル基は、常に存在するわけではなく、脱メチル化に伴って失われる。脱メチル化過程の中間体として、5-ヒドロキシメチルシトシンが生じる。5-ヒドロキシメチルシトシンでは、ピリジン環の第5位炭素がヒドロキシメチル基（ $-CH_2OH$ ）で置換されている（下記式参照）。

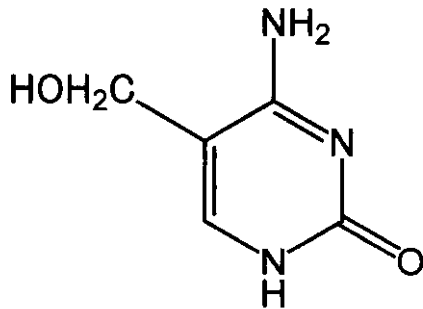
10

20

30

40

## 【化2】



10

## 【0024】

DNAのメチル化状態および脱メチル化状態は流動的に変化し、特に幹細胞において著しく変化することが知られている。

そこで、本発明の識別方法は幹細胞を対象とする。

## 【0025】

本発明の対象となる「幹細胞」は、成体幹細胞、胚性幹(ES)細胞及び人工多能性幹(iPS)細胞のいずれでもよい。

## 【0026】

また、前記幹細胞は、哺乳動物に由来するものであればよい。哺乳動物の例としては、ヒト、サル、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ラット、マウスなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

ある実施態様において前記幹細胞はヒト由来のものであり、別の実施態様では非ヒト哺乳動物、例えば、マウス由来のものである。

## 【0027】

成体幹細胞は、外胚葉、内胚葉又は中胚葉系幹細胞のいずれであってもよく、多分化能を有していても有していなくてもよい。成体幹細胞の例としては、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞等が挙げられる。

## 【0028】

ES細胞は、胚の内部細胞塊から採取された多分化能を有する幹細胞である(Strelnichenko Net al., (2004) Reprod Biomed Online. 9: 623-629.)。本発明において、ES細胞は内部細胞塊から採取された初代細胞株に限定されるものではなく、すでにセルライン化されたES細胞株であってもよい。セルライン化されたES細胞株の例としては、すでに樹立されたES細胞株を増殖させて得られた細胞集団から分与された細胞株、あるいは凍結保存された状態から溶解して培養されたES細胞株等が挙げられる。セルライン化されたES細胞株であれば、受精卵を崩壊させる工程を経ることなく入手することが可能である。

30

あるいはES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて、胚の発生能を損なうことなく樹立されたものであってもよい。このES細胞であれば受精卵を破壊せずに得られるからである(Klimanskaya I et al., (2006) Nature 444: 481-485; and Chung Y et al., (2008) Cell Stem Cell 2: 113-117)。

40

ヒト由来ES細胞の培養方法は、理研CDB・ヒト幹細胞研究支援室プロトコール(2008)、Takahashi, K. et al. (Cell (2007), Nov 30: 131, pp. 861-872)及びThomson, J. A. et al. (Science (1998) Nov 6: 282, pp. 1145-1147)に記載されている。

## 【0029】

iPS細胞とは、哺乳動物(ヒトを含む)の体細胞(線維芽細胞、上皮細胞等)に初期化遺伝子(Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、NANOG、LIN28等

50

の遺伝子)を導入することにより得られる未分化状態の多能性幹細胞をいう。i P S細胞は、初期化遺伝子の導入によって染色体DNAがリプログラミングされており、基本的にES細胞と同様の多分化能を有している(特開2009-165478; Takahashi K et al., (2006) Cell 126:663-676; and Takahashi K et al., (2007) Cell 131:861-872)。

i P S細胞はES細胞と同様の方法により培養することができる。

#### 【0030】

ES細胞及びi P S細胞等の未分化細胞は、特に染色体DNAのメチル化状態が不安定である。例えば、2株以上のi P S細胞が存在し、全ての株がOCT3/4、SSEA4及び/又はNANOG等の未分化マーカータンパク質若しくは遺伝子を発現していたとしても、その染色体DNAのメチル化状態は株間で異なる場合が多い。そして、メチル化状態の差により、株間で増殖能、分化能(特定の系統あるいは組織への分化能)に差が生じるものと考えられる。

本発明は、未分化マーカーの発現解析だけでは検出することのできない染色体DNAのメチル化状態の差異を検出可能にするものである。本発明の方法により、被検幹細胞のメチル化状態を解析し、その解析結果を、良好な未分化状態維持能、良好な増殖能または良好な分化能を有する基準幹細胞のメチル化状態と比較することにより、被検幹細胞の性質(未分化状態維持能、増殖能、分化能等)を判断することができる。

#### 【0031】

メチル化およびヒドロキシメチル化のパターン解析

まず、上記被検幹細胞から染色体DNAを抽出する。染色体DNAは、アルカリSDS法、プロテアーゼK消化法又はカオトロピックイオン溶解法等によって細胞を溶解した後に、当該溶解物からシリカビーズ法、シリカメンブレン法、陰イオン交換樹脂カラム法、DEAE練り込み型メンブレン法、シリカ磁気ビーズ法、-OH系磁気ビーズ法又はイオン交換性磁気ビーズ法等によって抽出することができる。抽出した染色体DNAはエタノール沈殿法等によってさらに精製してもよい。

#### 【0032】

次に、得られた染色体DNA上のどの領域がメチル化およびヒドロキシメチル化を受けているのかを解析する。DNAのメチル化およびヒドロキシメチル化の解析に関しては種々の方法が確立している。

メチル化の解析方法としては、例えば、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP: Methylated DNA immunoprecipitation)が挙げられ、他にもMIAMI法(Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)、Infinium Human Methylation 450 BeadChip(イルミナ)を用いた方法などが挙げられる。

#### 【0033】

また、ヒドロキシメチル化の解析方法としては、例えば、ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降(hMeDIP: hydroxymethylated DNA immunoprecipitation)が挙げられ、その他にもHydroxymethyl Collector又はEpimark™ 5-mC & 5-hmC Analysis Kit(New England Biolabs)を用いた方法や、oxBS-Sequence法、TAB-Sequence法などが挙げられる。

好ましくは、メチル化の解析方法はMeDIP法であり、ヒドロキシメチル化の解析方法はhMeDIP法である。

以下、MeDIP法およびhMeDIP法を例にとって、解析方法を具体的に説明する(図1を参照)。

#### 【0034】

MeDIP法

## (A) 断片化

得られた染色体DNAを、超音波破碎又は適切な制限酵素で処理することにより断片化する(図1:工程A)。これにより、様々な染色体DNA断片を含む混合物が得られる。この混合物の一部(混合物1)をインプットDNAサンプルとして取り、残りの混合物(混合物2)を抗メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降に供する。インプットDNAサンプルとは、MeDIP法で濃縮したメチル化DNA断片をマイクロアレイプローブにハイブリダイズさせる際に同メチル化DNA断片と競合的にマイクロアレイプローブにハイブリダイズさせるためのサンプルを意味する。

インプットDNAサンプルには、メチル化DNA断片および非メチル化DNA断片が混在している。

10

インプットDNAサンプルを用いることにより、MeDIP法で濃縮したメチル化DNA断片がマイクロアレイプローブに対して非特異的に結合し、偽陽性を生じるリスクを低下させることができる。

## 【0035】

## (B~D) 免疫沈降

混合物2のDNA断片を変性によって一本鎖化する(図1:工程B)。得られた一本鎖DNA断片を抗メチルシトシン抗体と反応させ、抗体とメチル化DNA断片とからなる複合体を遠心分離又は磁気分離によって濃縮し、抽出する(図1:工程C)。

抽出された抗体とメチル化DNA断片とからなる複合体をプロテアーゼ処理して抗体やDNA結合タンパク質を取り除き、メチル化DNA断片を精製する(図1:工程D)。

20

## 【0036】

## (E) メチル化DNA断片の蛍光標識

精製したメチル化DNA断片をPCR増幅する(図1:工程E)。PCR増幅にはランダムプローブを用いる。その際に、PCR産物を第1の蛍光標識(Cy5等)で標識する。これにより、蛍光標識されたメチル化DNA断片(以下、「MeDIP断片」)が得られる。図1の例ではメチル化DNA断片はCy5で標識されているが、他の適切な蛍光標識を用いてもよい。

## 【0037】

## (F) インプットDNAの蛍光標識

先の工程「(A)断片化」で取り分けたインプットDNAにプロテアーゼ処理等を施すことによりDNA断片を精製する。精製されたDNA断片には、メチル化DNA断片と非メチル化DNA断片の両方が含まれる。次に、生成されたインプットDNAをPCR増幅する。PCR増幅にはランダムプローブを用いる。その際にPCR産物を第2の蛍光標識(第1の蛍光標識とは異なる励起波長・放出波長を有する蛍光標識)で標識する(図1:工程F)。

30

これにより、第2の蛍光標識で標識されたメチル化DNA断片と非メチル化DNA断片の混合物(以下、「インプット断片」)が得られる。図1の例ではインプット断片はCy3で標識されているが、他の適切な蛍光標識を用いてもよい。

## 【0038】

## (G) マイクロアレイ解析

得られたMeDIP断片をマイクロアレイで解析する。マイクロアレイではプローブ位置が固定されているため、位置情報に関する誤差やアルゴリズムの差が出にくく、より正確に遺伝子を同定することができる。また、マイクロアレイは次世代シーケンズ法等の配列解析方法と比較してはるかに低コストである。さらに、マイクロアレイは、データ解析も短時間で容易に行うことができるため、幹細胞の識別法としてより優れていると考えられる。

40

さらに、マイクロアレイの場合、容易にプローブの設計および変更を行うことができるため、例えば、検出するDNAの領域が一部重複するようにプローブを設計することができ(例えば、タイリングアレイ等)、それによって、メチル化およびヒドロキシメチル化部位を詳細に特定することができる。

50

具体的な手順として、まず、蛍光標識されたMeDIP断片とインプット断片とを競合的にマイクロアレイプローブと反応させる(図1:工程G)。

好ましくは、マイクロアレイはStanford型のものが用いられる。

また、競合反応は、MeDIP断片:インプット断片の比が、1:2~1:50、好ましくは1:5~1:30、さらに好ましくは1:7~1:20、1:8~1:10または1:10で行われる。

#### 【0039】

すでに述べたとおり、インプット断片は、メチル化DNA断片と非メチル化DNA断片とを鋳型としたPCR増幅により得られる。これに対し、MeDIP断片は、濃縮されたメチル化DNA断片を鋳型としたPCR増幅により得られる。したがって、総DNA量(または総DNA濃度)を等しく調整した状態でインプット断片とMeDIP断片とを比較すると、メチル化DNA断片についてはMeDIP断片の方が高い濃度を示す。

そこで、インプット断片とMeDIP断片とを競合的に反応させると、(i)メチル化されていないDNA領域に対応するプローブにはインプット断片が結合し、(ii)メチル化されたDNA領域に対応するプローブにはMeDIP断片が優先的に結合する。

従って、インプット断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはメチル化されていない可能性が高く(つまりメチル化されている可能性が低く)、MeDIP断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはメチル化されている可能性が高い。

#### 【0040】

蛍光強度の解析は、ACME(RソフトのGSEA(Gen Set Enrichment Analysis))、MEDME(RソフトのGSEA(Gen Set Enrichment Analysis))又はBatmanなどのプログラムを用いて行うことができる。

#### 【0041】

##### hMeDIP法

抗メチルシトシン抗体の代わりに抗ヒドロキシメチルシトシン抗体を用いて、上記工程(A)~(G)を行うことによりhMeDIPを実施することができる。

この場合、インプット断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはヒドロキシメチル化されていない可能性が高く(つまりヒドロキシメチル化されている可能性が低く)、hMeDIP断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはヒドロキシメチル化されている可能性が高い。

#### 【0042】

##### シグナルデータの確率処理

上記通り、インプット断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはメチル化されている可能性が低く、MeDIP断片の蛍光強度が高いプローブ領域では染色体DNAはメチル化されている可能性が高い。

そこでプローブから放出されるインプット断片の蛍光強度とMeDIP断片の蛍光強度とを比較してその強度差を解析することにより、そのプローブに対応するDNA領域がメチル化されている確率 $P_m$ を求めることができる。

同様にして、プローブに対応するDNA領域がヒドロキシメチル化されている確率 $P_{hm}$ を求めることができる。

#### 【0043】

確率 $P_m$ および $P_{hm}$ は、種々の計算手法によって求めることができるが、好ましくは<sup>2</sup>検定またはベイズ検定により求められる。

<sup>2</sup>検定およびベイズ検定は、それぞれマイクロアレイ解析用のアルゴリズムであるACME(Algorithm for Capturing Microarray Enrichment)(Scacheri et al., Methods Enzymol. 2006; 411: 270-82.)およびBatman(Bayesian Tool for Methylation Analysis)(Rakyan VK et al. (2008) Genome Res 18: 1518-1529)を使用し

10

20

30

40

50

て行うことができる。

【0044】

上記MeDIP解析及びhMeDIP解析は、オートメーション化することができる。例えば、MeDIPおよびhMeDIPの解析が自動化装置の例としては、SX-8G Compact (PSS社)、SX-8G (PSS社)、6GC (PSS社)、12GC (PSS社)、12GC Plus (PCC)、EZ1 (Qiagen)、Target Angler (多摩川精機)等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

好ましい態様では、自動化装置はSX-8G Compact (PSS社)が用いられる。

【0045】

SX-8G Compactは、本発明者らが基本的自動化プロトコール、ソフトウェア、自動化試薬と共に開発した自動化装置であり、これを用いてエピジェネティクス免疫沈降 (MeDIP, hMeDIP, ChIP等)の実験操作をオートメーション化することが可能である。

実験操作をオートメーション化することにより、手作業により生じるデータのばらつきやノイズによる誤認識などを回避することができる。その結果、データに高い再現性と信頼性が与えられる。

【0046】

確率値のマッピング

得られたメチル化確率値 $P_m$ をマイクロアレイの各プローブ番号に割り当てることにより、確率値 $P_m$ のマッピングをおこなう(図2参照)。マッピングは、UCSC Genome Browser等の適切なブラウザを用いて行うことができるが、他にもIntegrated Genome Browser (IGB) (Nicol JW et al., Bioinformatics. 2009 Aug 4 [1]; Helt GA et al., BMC Bioinformatics. 2009 Aug 25; 10(1): 266. [2])、Signal Map (NimbleGen)、Genomic Workbench (Agilent)などを用いることができる。

図2は、縦軸を $P$ 値、横軸をプローブ番号としてマッピングを行ったときに示されるマッピンググラフの模式図である(グラフA:被検幹細胞の $P_m$ 値、グラフB:基準幹細胞の $P_m$ 値)。横軸のプローブ番号は染色体上の位置に対応する。図2に示すデータは仮想のものであるが、以下、この仮想データの例を参照しながら本発明のデータ処理工程を説明する。

【0047】

マッピングによってメチル化確率値 $P_m$ とプローブ番号が対応する。そこで、以下のように対応するプローブ番号について被検幹細胞の $P_m$ 値と基準幹細胞の $P_m$ 値との比を求め、メチル化のパターンについて被検幹細胞と基準幹細胞との相関率 $R$ を求めることができる。

【0048】

本発明において、被検幹細胞の解析に用いたマイクロアレイのプローブ番号 $n$ ( $n$ は自然数)と、基準幹細胞の解析に用いたマイクロアレイのプローブ番号 $n'$ ( $n'$ は自然数)とは対応(一致)しているものとする。

被検幹細胞のプローブ番号 $n$ のメチル化確率 $P_{m(n)}$ と、基準幹細胞の対応するプローブ番号 $n'$ のメチル化確率 $P_{m(n')}$ から、比率 $r(n) = P_{m(n)} / P_{m(n')}$ を求める。同様にプローブ番号 $n+1$ 、 $n+2$ 、 $\dots$ 、 $n+i$ ( $i$ は整数)について(基準幹細胞については $n'+1$ 、 $n'+2$ 、 $\dots$ 、 $n'+i$ について)、比率 $r(n+1)$ 、 $r(n+2)$ 、 $\dots$ 、 $r(n+i)$ を求める。

ここで、番号 $n \sim n+i$ (および $n' \sim n'+i$ )の各プローブは、染色体DNAの連続する領域(例えば1種類のプロモーター領域等)に対応するものである。

例として、グラフAにプローブ番号 $n \sim n+3$ のメチル化確率 $P_{m(n)} \sim P_{m(n+3)}$ を示す。同様に、グラフBにプローブ番号 $n' \sim n'+3$ のメチル化確率 $P_{m(n')}$

10

20

30

40

50

～  $P_m(n'+3)$  を示す。

図2の例の場合、被検幹細胞では  $P_m(n) = 1.0$ 、 $P_m(n+1) = 0.5$ 、 $P_m(n+2) = 0.8$ 、 $P_m(n+3) = 0.4$  であり、他方、基準幹細胞では  $P_m(n') = 0.9$ 、 $P_m(n'+1) = 0.25$ 、 $P_m(n'+2) = 0.6$ 、 $P_m(n'+3) = 1.0$  である。

この例では、比率  $r(n) = P_m(n) / P_m(n') = 1.0 / 0.9 = 1.11$  となり、同様に、 $r(n+1) = 0.5 / 0.25 = 2$ 、 $r(n+2) = 0.8 / 0.6 = 1.33$ 、 $r(n+3) = 0.4 / 1.0 = 0.4$  である。

#### 【0049】

得られた  $r(n)$ 、 $r(n+1)$ ・・・ $r(n+i)$  のうち、値が一定の範囲内にある比率  $r$  の個数  $S_r$  をカウントする。 $S_r$  カウントされる比率  $r$  の数値範囲は、ある態様では  $0.5 \leq r \leq 1.5$  であり、別の態様では、 $0.6 \leq r \leq 1.4$ 、 $0.7 \leq r \leq 1.3$ 、 $0.8 \leq r \leq 1.2$ 、 $0.9 \leq r \leq 1.1$  である。

得られた  $S_r$  から、相関率  $R(\%) = \{ S_r / (i+1) \} \times 100$  を求める。

図2の例の場合、比率  $r(n) = 1.11$ 、 $r(n+1) = 2$ 、 $r(n+2) = 1.33$ 、 $r(n+3) = 0.4$  である。 $0.5 \leq r \leq 1.5$  の範囲に含まれるのは  $r(n) = 1.11$  および  $r(n+2) = 1.33$  である。したがって、この場合、 $S_r = 2$  である。

そこで、相関率  $R(\%)$  を求めると、

$$R(\%) = \{ S_r / (i+1) \} \times 100 = \{ 2 / (3+1) \} \times 100 = 50\% \text{ となる}$$

#### 【0050】

同様にして、ヒドロキシメチル化についても、任意のプロープ番号における  $P_{hm}$  値に関し、比率  $r$ 、値が一定の範囲内にある比率  $r$  の個数  $S_r$ 、および相関率  $R(\%)$  を求めることができる。

図3にその例を示す(グラフC:被検幹細胞の  $P_{hm}$  値、グラフD:基準幹細胞の  $P_{hm}$  値)。

図3の例の場合、被検幹細胞では  $P_{hm}(n) = 0.8$ 、 $P_{hm}(n+1) = 0.5$ 、 $P_{hm}(n+2) = 0.4$ 、 $P_{hm}(n+3) = 0.9$  であり、他方、基準幹細胞では  $P_{hm}(n') = 0.9$ 、 $P_{hm}(n'+1) = 0.6$ 、 $P_{hm}(n'+2) = 0.3$ 、 $P_{hm}(n'+3) = 1.0$  である。

この例では、比率  $r(n) = P_{hm}(n) / P_{hm}(n') = 0.8 / 0.9 = 0.99$  となり、同様に、 $r(n+1) = 0.5 / 0.6 = 0.83$ 、 $r(n+2) = 0.4 / 0.3 = 1.33$ 、 $r(n+3) = 0.9 / 1.0 = 0.9$  である。

$0.5 \leq r \leq 1.5$  の範囲に含まれるのは  $r(n) = 0.99$ 、 $r(n+1) = 0.83$ 、 $r(n+2) = 1.33$ 、 $r(n+3) = 0.9$  である。したがって、この場合、 $S_r = 4$  である。

そこで、相関率  $R(\%)$  を求めると、

$$R(\%) = \{ S_r / (3+1) \} \times 100 = \{ 4 / (3+1) \} \times 100 = 100\% \text{ となる}$$

以下、メチル化およびヒドロキシメチル化の相関率をそれぞれ  $R_m$  および  $R_{hm}$  とする。

#### 【0051】

解析されたパターンと性質との関連付け

上記のようにして求められた相関率  $R(\%)$  の数値は、以下の基準に従って被検幹細胞の性質(特にエピジェネティックな状態)と関連付けることができる。

即ち、

(a)メチル化相関率  $R_m$  が基準値  $X$  以上、かつヒドロキシメチル化相関率  $R_{hm}$  が前記基準値  $X$  以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及びヒドロキシメチル化が共に類似の状態にあると決定される。

10

20

30

40

50

(b) メチル化相関率  $R_m$  が基準値  $X$  未満、かつヒドロキシメチル化相関率  $R_{(h_m)}$  が前記基準値  $X$  以上のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、ヒドロキシメチル化は類似の状態にあるが、メチル化は非類似の状態にあると決定される。

(c) メチル化相関率  $R_m$  が基準値  $X$  以上、かつヒドロキシメチル化相関率  $R_{h_m}$  が前記基準値  $X$  未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化は類似の状態にあるが、ヒドロキシメチル化は非類似の状態にあると決定される。

(d) メチル化相関率  $R_m$  が基準値  $X$  未満、かつヒドロキシメチル化相関率  $R_{h_m}$  が前記基準値  $X$  未満のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及びヒドロキシメチル化が共に非類似の状態にあると決定される。

#### 【0052】

上記基準 (a) ~ (d) において、「基準値  $X$ 」は、被検幹細胞と基準幹細胞の種類、分化ステージ及び継代ステージに応じて適宜選択することが可能であり、ある実施態様では基準値  $X$  は 60% に設定され、好ましくは 70%、より好ましくは 80%、90% または 95% に設定される。

#### 【0053】

図 2 及び図 3 に示す仮想データの例では、 $R_m = 50\%$ 、かつ  $R_{h_m} = 100\%$  である。

基準値  $X$  を 60% に設定した場合、図 2 及び図 3 の仮想データは、上記「(b) メチル化相関率  $R_m$  が 60% 未満、かつヒドロキシメチル化相関率  $R_{h_m}$  が 60% 以上」のケースに該当するので、被検幹細胞と基準幹細胞とは、ヒドロキシメチル化は類似の状態にあるが、メチル化は非類似の状態にあると決定される。

#### 【0054】

相関係数  $R'$  を用いた態様

第二の態様として、被検幹細胞と基準幹細胞との間で  $P$  値のマッピンググラフの波形を比較して相関係数  $R'$  を求めることもできる。相関係数  $R'$  は、 $R$  などのフリーソフトウェアや、SAS (SAS)、SPSS (SPSS)、Stat (インフォーマティク)、StatView (SAS)、STATISTICA (stattsoft)、SigmaStat (HULINKS)、SYSTAT (HULINKS)、MINITAB (インフォーマティク)、Prism (エムデーエフ)、JMP (SAS)、Excel (Microsoft) 等の市販のソフトウェア等を用いて求めることができる。

#### 【0055】

この場合、相関係数  $R'$  の数値は、以下の基準 (a') ~ (d') に従って被検幹細胞の性質と関連付けることができる。

即ち、

(a') メチル化相関係数  $R'_m$  が基準値  $X'$ 、 $R'_m = 1.0$  (基準値  $X'$  は  $0 < X' < 1$ ) であり、かつヒドロキシメチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が前記基準値  $X'$ 、 $R'_{h_m} = 1.0$  のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及びヒドロキシメチル化が共に類似の状態にあると決定される。

(b') メチル化相関係数  $R'_m$  が  $R'_m < \text{基準値 } X'$  であり、かつヒドロキシメチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が前記基準値  $X'$ 、 $R'_{h_m} = 1.0$  のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、ヒドロキシメチル化は類似の状態にあるが、メチル化は非類似の状態にあると決定される。

(c') メチル化相関係数  $R'_m$  が基準値  $X'$ 、 $R'_m = 1.0$  であり、かつヒドロキシメチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が  $R'_{h_m} < \text{前記基準値 } X'$  のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化は類似の状態にあるが、ヒドロキシメチル化は非類似の状態にあると決定される。

(d') メチル化相関係数  $R'_m$  が  $R'_m < \text{基準値 } X'$  であり、かつヒドロキシメチル化相関係数  $R'_{h_m}$  が  $R'_{h_m} < \text{前記基準値 } X'$  のとき、前記被検幹細胞と基準幹細胞とは、メチル化及びヒドロキシメチル化が共に非類似の状態にあると決定される。

#### 【0056】

10

20

30

40

50

上記基準 ( a ' ) ~ ( d ' ) において、「基準値 X ' 」は、被検幹細胞と基準幹細胞の種類、分化ステージ及び継代ステージに応じて適宜選択することが可能であり、ある実施態様では基準値 X ' は 0 . 7 に設定され、好ましくは 0 . 8 、より好ましくは 0 . 8 5 、 0 . 9 または 0 . 9 5 に設定される。

【 0 0 5 7 】

相関率 R ( % ) ( または相関係数 R ' ) は、任意の染色体 DNA の領域について求めることができる。例えば、1 個の遺伝子のプロモーター領域について相関率 R ( % ) ( または相関係数 R ' ) を求めてもよく、あるいは、複数の遺伝子を包含する遺伝子領域または遺伝子を含まない反復領域 ( マイクロサテライト領域等 ) について相関率 R ( % ) ( または相関係数 R ' ) を求めることができる。

10

【 0 0 5 8 】

本発明では、上記の通り、確率値を基にメチル化状態およびヒドロキシメチル化状態を決定する。したがって、メチル化およびヒドロキシメチル化の確率値は正確な値であることが好ましい。

そこで、本発明の方法では、好ましくはメチル化およびヒドロキシメチル化のパターン解析は、自動化装置によりオートメーションで行われる。

オートメーションでパターン解析を行えば、手作業で生じ得る実験誤差 ( 溶液量、反応時間、攪拌条件等における誤差 ) を回避することができる。

自動化装置についてはすでに述べたとおりである。

【 0 0 5 9 】

20

上記のようにして、被検幹細胞と基準幹細胞との間でメチル化およびヒドロキシメチル化の類似性または非類似性が決定されると、これを基に被検幹細胞の細胞学的特性を識別することができる。本発明の方法により識別できる細胞学的特性として継代ステージおよび分化ステージが挙げられる。

【 0 0 6 0 】

( 1 ) i P S 細胞の継代ステージの識別

基準幹細胞として良好な未分化状態および増殖能を維持した i P S 細胞株を用い、被検幹細胞 1 及び 2 は、上記基準幹細胞を培養・増殖させ、複数回の継代を得た i P S 細胞株 ( 未分化マーカー遺伝子の発現は陽性 ) であるものと仮定する。

また、被検幹細胞と基準幹細胞とで未分化マーカー遺伝子 ( O c t 3 / 4 、 S S E A 4 、 N a n o g 等 ) のプロモーター領域について解析し、被検幹細胞 1 は同プロモーター領域のヒドロキシメチル化状態は類似であり、メチル化状態が非類似と決定され、被検幹細胞 2 はメチル化状態およびヒドロキシメチル化状態の両者が類似であると決定されるものと仮定する。

30

この場合、被検幹細胞 1 と基準幹細胞とでメチル化確率値  $P_m$  を比較し、全体的に被検幹細胞 1 がより高い  $P_m$  値を示す場合、被検幹細胞 1 では一応未分化マーカー遺伝子が発現しているが、そのプロモーター領域は徐々にメチル化修飾を受けていると判断できる。したがって、被検幹細胞 1 は、今後、未分化マーカー遺伝子がオフ状態になり、未分化状態を維持できなくなる傾向にあると判断できる。

これに対し、被検幹細胞 2 は基準幹細胞とメチル化状態およびヒドロキシメチル化状態の両者が類似であり、今後も良好な未分化状態および増殖能を維持する傾向にあるものと判断できる。

40

【 0 0 6 1 】

( 2 ) 神経幹細胞への分化ステージの識別

基準幹細胞として良好な増殖能および神経細胞への分化能を有する神経幹細胞株を用い、被検幹細胞 1 及び 2 は、i P S 細胞から神経幹細胞へ分化誘導する過程にある細胞株であり、現時点では神経幹細胞マーカー遺伝子 ( N e s t i n 、 N C A M 等 ) の発現は検出されていないものと仮定する。

また、被検幹細胞と基準幹細胞とで神経幹細胞マーカー遺伝子 ( N e s t i n 、 N C A M 等 ) のプロモーター領域について解析したところ、被検幹細胞 1 は同プロモーター領域

50

のヒドロキシメチル化状態は類似であり、メチル化状態が非類似のものと決定され、被検幹細胞 2 は基準幹細胞とメチル化状態は同じであるが、ヒドロキシメチル化が非類似の状態にあると決定されるものと仮定する。

この場合、被検幹細胞 1 と基準幹細胞とでメチル化確率値  $P_m$  を比較し、全体的に被検幹細胞 1 がより高い  $P_m$  値を示す場合、被検幹細胞 1 では現在、神経幹細胞マーカー遺伝子の発現が抑制されていることが分かる。そして、ヒドロキシメチル化の状態は、基準幹細胞と同じであることから、被検幹細胞 1 が基準幹細胞と比べて脱メチル化の傾向が高いとはいえない。したがって、被検幹細胞 1 では同プロモーター領域のメチルシトシンが脱メチル化する徴候はないといえる。

よって、被検幹細胞 1 は、i P S 細胞から神経幹細胞への分化誘導において分化初期ステージにあるものと判断することができる。

10

一方、被検幹細胞 2 は基準幹細胞とメチル化状態は同じであるため、神経幹細胞マーカー遺伝子の発現は強い抑制は受けていないことが分かる。また、ヒドロキシメチル化の状態は異なっているので、被検幹細胞 2 と基準幹細胞とでヒドロキシメチル化確率値  $P_{hm}$  を比較し、全体的に被検幹細胞 2 がより高い  $P_{hm}$  値を示す場合、被検幹細胞 2 では現在、神経幹細胞マーカー遺伝子は発現のスイッチがオンに移行しつつあることが分かる。

したがって、被検幹細胞 2 は i P S 細胞から神経幹細胞への分化誘導において分化後期ステージにあるものと判断することができる。

【0062】

以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。

20

【実施例】

【0063】

[ 実験手順 ]

メチル化 DNA 免疫沈降 ( M e D I P ) 及びヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降 ( h - M e D I P ) の同時比較による幹細胞のメチル化 / ヒドロキシメチル化解析 ( M e D I P / h - M e D I P o n C h i p )

【0064】

1. 染色体 DNA の調製及び濃度・サイズ測定

摂氏 - 80 で保存されたヒト ES 細胞 k h E S - 1 及び k h E S - 3 の細胞ペレット ( 京都大学 ) 及びヒト i P S 細胞ペレット ( 株式会社リプロセルより入手 ) を解凍し、0.9% NaCl 溶液を 100 ~ 200  $\mu$ L に懸濁し、細胞濃度を  $1 \times 10^6$  細胞 / 100  $\mu$ L とした。

30

上記 100  $\mu$ L を 1.5 mL チューブに分注し、自動核酸精製装置 12 G C ( プレシジョン・システム・サイエンス株式会社製 ) にセットした。染色体 DNA 精製試薬の w e l l 110 に 10  $\mu$ g / mL の R n a s e 1  $\mu$ L を添加し、調製試薬とした。

また、染色体 DNA 調製プロトコールとしては、M a g D E A D N A 20012 G C v 3 w i t h R n a s e v e r 0.1 ( プレシジョン・システム・サイエンス株式会社製 ) を用いた。約 40 分後に、染色体 DNA 溶液 20 - 50  $\mu$ L を得た ( 溶出容量設定により、溶出量は異なる )。

40

小型分光光度計 N a n o d r o p に染色体 DNA 溶液を 2  $\mu$ L 重層し、濃度と A 260 / A 280 を測定した。結果、濃度 60 ~ 120  $\mu$ g /  $\mu$ L, 20 ~ 50  $\mu$ L, A 260 / A 280 1.8 ~ 1.9 程度の染色体 DNA を得た。

次に 1 x T A E 緩衝溶液系で 1% アガロース電気泳動を行った。マーカーとして、W i d e r a n g e m a r k e r ( T A K A R A 社製 ) と L a m d a / H i n d I I I ( T a k a r a B i o 社製 ) 2  $\mu$ L を用いた。染色体 DNA のサイズは、約 20 K b p s 程度の単一バンドであった ( 図 4 : レーン A )。

【0065】

2. 超音波による染色体 DNA の断片化

精製した DNA 溶液に適量の 2 x T E と D N a s e / R N a s e F r e e 水を添加し

50

、1 x TEに溶解した50 ng /  $\mu$  lの染色体DNA溶液を調製した。1.5 mLチューブに、上記50 ng /  $\mu$  l染色体DNA、200  $\mu$  Lを添加し、以下の条件で破碎した。超音波破碎装置BioRuptor UCD-250(東湘電気社製)を冷却し、4の冷却水中で出力medium、15 sec ON / 15 sec OFFの条件で破碎した。1%アガロース電気泳動で破碎された染色体DNAのサイズを確認した。結果、約200 ~ 800 bpsの破碎DNA断片を得た(図4: レーンB)。

【0066】

### 3A. メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)

自動エピジェネティクスシステム(プレジジョン・システム・サイエンス社製)を使用して自動免疫沈降を行った。試薬としてAuto MeDIP Kit試薬(Diagenode社製)を用いた。

WellにAuto MagDEA-IP kit(プレジジョン・システム・サイエンス社製)のLysis Buffer 100  $\mu$  Lを添加した。工程2で破碎した染色体DNA 1  $\mu$  gを、95、3分加熱後、氷水で急冷し、一本鎖DNAに変性させた。その後、変性したDNA溶液に抗5-メチルシトシン抗体 1  $\mu$  g(Diagenode社製)を添加し、SX-8Gシステムをもちいて自動免疫沈降を行った。ChIP Type Bプロトコルを用いて、抗5-メチルシトシン抗体、磁気ビーズと破碎した染色体DNAが共存した状態で攪拌した。夾雑物を除くため、磁気ビーズと抗体とDNAの免疫複合体を2種類の洗浄溶液で4回、自動的に洗浄を行った。

【0067】

### 3B. ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降(h-MeDIP)

工程3Aと同一の装置を使用し、試薬としてAuto h-MeDIP Kit(Diagenode社製)及びAuto MagDEA-IP kitのLysis Bufferを用いて自動免疫沈降を行った。工程2で破碎した染色体DNA 1  $\mu$  gを、95、10分加熱後、氷水で急冷し、一本鎖とした。その後、変性したDNA溶液に抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体 1  $\mu$  gを添加し、自動化システムにより自動免疫沈降を行った。ChIP Type Aプロトコル(間接型免疫沈降法)を用いて、抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体と染色体DNAの複合体を形成させた後、磁気ビーズで抗体とDNAの免疫複合体複合体を補足した。夾雑物を除くため、磁気ビーズと抗体とDNAの免疫複合体を2種類の洗浄溶液で4回、自動的に洗浄を行った。

【0068】

### 4. プロテアーゼK処理

免疫沈降が終了した磁気ビーズ懸濁溶液(免疫沈降濃縮サンプル)に、プロテアーゼK溶液(Diagenode社製) 1  $\mu$  Lを添加した。また、90  $\mu$  LのLysis Bufferに10  $\mu$  Lの免疫沈降前のサンプルを添加し、インプットサンプルとした。インプットサンプルにも、プロテアーゼK 1  $\mu$  Lを添加した。次に、免疫沈降濃縮サンプルとインプットサンプルに蓋をして、58で15分加熱し、上記免疫複合体のタンパク質を消化させた。そして、プロテアーゼKの酵素活性を失活させるために、各サンプルを95、15分加熱した。加熱後、遠心(1000 rpm、25、1分)し、蓋に付着した水滴を回収した。

【0069】

### 5. DNA断片の自動精製及び濃度測定

工程4で得た溶液を自動エピジェネティクス装置SX-8Gにセットし、DNA断片を精製した。試薬としては、Auto MagDEA-IP Kitを、精製プロトコルとしてはMagPurification 8\_v2.HDLまたはMagPurification 16\_v2-1.HDLを用いた。精製DNAとして、10 ~ 13  $\mu$  Lの溶液を回収した。

次に小型分光光度計Nanodropに染色体DNA溶液を2  $\mu$  L重層し、濃度とA260/A280を測定した。濃度は1 ~ 2 ng /  $\mu$  lであった。

【0070】

10

20

30

40

50

## 6. 濃縮DNA断片の増幅・精製

WGA 2キット(シグマ社製)を用いて、5 - 10 ngの濃縮DNA断片を増幅した。Fragmentation Bufferを添加後、熱変性させずにLibrary Preparation BufferとEnzymeを加え、ユニバーサルリンカーを付加した。

次にWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製)を用いて、WGA 2キットの残存するユニバーサル・プライマーを除去した。1xTAE緩衝溶液系で1%アガロース電気泳動を行った。マーカーとして、Wide range maker (TAKARA Bio社製)とLambda/HindIII (Takara Bio社製) 2 µLを用いた。DNAサンプル2 µLにWater 6 µL、5x Dye 2 µLを添加し、100 V, 25 min電気泳動した。WGA 2増幅断片は500 - 2000 bpsの領域で増幅されたことを確認した(図5)。

【0071】

## 7. マイクロアレイ解析

免疫沈降で濃縮したDNAサンプルとインプットサンプルを、それぞれ、蛍光色素Cy5とCy3でラベルした。ラベル化後、各社マイクロアレイ(Agilent社製及びNimblegen社製)上で、1:10濃度比の競合ハイブリダイゼーションを行った。16時間ハイブリダイゼーションの後、洗浄溶液で洗浄し、蛍光スキャナーでシグナルを検出した。色素間補正後、シグナル強度をテキストデータとして、保存した。

【0072】

## 8. シグナルデータの数値処理

メチル化領域のP値算出には、Batmanアルゴリズム(Thomas A. Down作成)とACMEアルゴリズム(Sean Davis作成)を利用した。Agilent社製マイクロアレイには、解析ソフトGenomomic Work Bench (Agilent社製)内のMethylation Module内のBatmanプログラムを用いた。また、Nimblegen社製マイクロアレイにはACMEプログラムを用いた。

【0073】

## 9. 各P値のUCSC Genome Browser上でのマッピング

UCSC Genome Browser上で各プローブ位置でのP値をマッピングした。継代の異なる各ステージの幹細胞(khES 1株)、すなわち、継代初期(E1)、継代後期(E2)、及びE1のレンチノイン酸による分化細胞(E3)に対して、MeDIPとhMeDIPによるP値を比較しながら、マッピングを行った。MeDIPの結果を5-メチルシトシンによるメチル化の指標として、hMeDIPによる結果を5-ヒドロキシシトシンによる脱メチル化の指標とした。

【0074】

## 10. メチル化/ヒドロキシメチル化パターン解析

以下の手順により、シトシン残基のメチル化およびヒドロキシメチル化のパターン解析を行った。

(1) 近傍の5プローブ(これを1つの「プローブ群」とする)に関して、P値の比 $r =$  株1/株2をとる。

(2) 値が1.3 - 0.7に含まれる比 $r$ を選択し、その個数 $S_r$ をカウントする。

(3) 相関率 $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$ を計算し、80 - 100%の領域を類似パターンと判断する。

【0075】

### [実施例1]

#### iPS細胞のメチル化/ヒドロキシメチル化パターン解析

ヒトiPS細胞(以下、「hiPS細胞」)に対して上記工程1~10の解析を行ったところ、図6~9のマッピンググラフが得られた。

図6~9のマッピンググラフにおいて、上向きのグラフはメチル化P値のパターンであ

10

20

30

40

50

り、下向きのグラフは非メチル化 P 値のパターンである。図 6 ~ 9 の各図において、上パネル及び下パネルのグラフは、それぞれ hiPS 細胞の株 1 及び株 2 の同一の DNA 領域におけるパターンを示す。また、図 6 ~ 9 はそれぞれ異なる DNA 領域におけるパターンを示す。

図 6 ~ 9 のマッピンググラフのメチル化 P 値のパターンの数値データをそれぞれ表 1 ~ 4 に示す。

表 1

表 1: hiPS細胞メチル化パターン数値データ

P値 (set1)	P値 (set5)	比率 r	S <sub>i</sub>	相関率 R (%)	相関係数 R'
1.072273016	0.925485611	0.863	2	40	0.920
1.032350421	0.363731474	0.352	2	40	
1.245631218	0.553581953	0.444	3	60	
0.904466987	0.340658307	0.377	4	<b>80</b>	
0.960355639	0.719685674	0.749	5	<b>100</b>	
0.826369703	0.736362278	0.891	4	<b>80</b>	
1.782044291	1.382513404	0.776	3	60	
1.467092395	1.214730024	0.828	2	40	
0.929525495	0.695897281	0.749	2	40	
0.077342309	0.159082144	2.057	-	-	
0.467960268	0.322441608	0.689	-	-	
1.953680634	1.34842515	0.690	-	-	
2.344535351	1.868728876	0.797	-	-	

10

20

表 2

表2: hiPS細胞メチル化パターン数値データ

P値 (set1)	P値 (set5)	比率 r	S <sub>i</sub>	相関率 R(%)	相関係数 R'
0.336295664	0.070129722	0.209	1	20	0.912
0.207465261	-0.075320043	-0.363	1	20	
0.754212618	0.26706332	0.354	2	40	
1.935695648	1.567573309	0.810	3	60	
0.425325066	-0.033495512	-0.079	2	40	
0.570759356	0.793000996	1.389	2	40	10
1.264191747	1.188448191	0.940	2	40	
1.42162478	1.573449016	1.107	1	20	
0.731782138	-0.024577551	-0.034	0	0	
-0.300696373	0.19048582	-0.633	1	20	
-0.167050198	-0.468576461	2.805	2	40	
0.403710335	0.706794977	1.751	3	60	
0.895414531	0.057170022	0.064	4	80	
1.645899773	1.776567101	1.079	5	100	
1.174440145	1.465094686	1.247	5	100	
1.029984474	0.858399868	0.833	5	100	20
0.666302264	0.596626282	0.895	5	100	
0.926390767	0.963873744	1.040	4	80	
2.532273054	2.620643616	1.035	3	60	
1.689413071	1.378983855	0.816	2	40	
1.521535754	1.477265954	0.971	1	20	
2.26559782	3.079804659	1.359	1	20	
0.439749688	0.150853932	0.343	1	20	
1.365247011	0.687813997	0.504	2	40	
-0.943828642	-0.552829921	0.586	3	60	
0.748033524	0.74979347	1.002	4	80	30
0.804844558	0.492513359	0.612	3	60	
0.478041112	0.435259551	0.911	3	60	
1.101124883	1.121453524	1.018	3	60	
1.380548954	1.383467197	1.002	2	40	
0.782859921	0.503360987	0.643	2	40	
-1.60187459	-2.330072403	1.455	2	40	
0.362611353	0.441885293	1.219	3	60	
-0.359005809	0.001898385	-0.005	-	-	
0.350418299	0.422477394	1.206	-	-	40
0.468025804	-0.557252824	-1.191	-	-	
1.057294488	0.831465304	0.786	-	-	

表 3

表3: hiPS細胞メチル化パターン数値データ

P値 (set1)	P値 (set5)	比率 r	S <sub>r</sub>	相関率 R(%)	相関係数 R'
1.018406153	0.783500135	0.769	1	20	0.701
0.535746872	0.335283369	0.626	0	0	
0.405411571	-1.617402077	-3.990	0	0	
-0.436292112	-1.768951416	4.055	0	0	
0.288967937	-0.801520824	-2.774	0	0	
0.759627938	0.482367456	0.635	0	0	10
1.510571957	1.056686163	0.700	0	0	
0.573392987	0.815347791	1.422	0	0	
0.039606806	-0.829012215	-20.931	0	0	
0.239608154	0.393559992	1.643	0	0	
-0.397005945	-1.279105663	3.222	0	0	
0.488900661	-0.182890102	-0.374	0	0	
0.068058334	-1.240397811	-18.226	0	0	
0.392202705	-0.042175036	-0.108	0	0	
1.622750163	0.92629534	0.571	0	0	20
-0.073593125	-1.438990235	19.553	-	-	
0.725741386	-0.991436958	-1.366	-	-	
-1.100721598	-0.751695931	0.683	-	-	
1.704742193	0.297694087	0.175	-	-	

表 4

表4: hiPS細胞メチル化パターン数値データ

P値 (set1)	P値 (set5)	比率 r	S <sub>r</sub>	相関率 R(%)	相関係数 R'
-0.09304028	0.15528363	-1.669	0	0	0.303
-0.497550488	0.171726614	-0.345	0	0	
0.447785765	-0.533675909	-1.192	0	0	
0.198727086	0.531805515	2.676	0	0	
-0.360826254	-0.098119058	0.272	1	20	
0.416845828	-0.587530494	-1.409	1	20	
-0.559108615	-0.994471312	1.779	1	20	
0.090189099	0.163971722	1.818	-	-	
0.475475103	0.395178437	0.831	-	-	40
0.578081548	0.390057415	0.675	-	-	
0.327318907	0.080186345	0.245	-	-	

表1のset1株およびset5株のメチル化P値について、P値の比 $r = \text{set1} / \text{set5}$ を求めた。

次に、連続する5つプローブ(プローブ群)の比rのうち、値が1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数 $S_r$ をカウントし、相関率 $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$ を求めた。

例えば、表1において、最初のプローブ群の比r(即ち、0.863、0.352、0.444、0.377及び0.749)のうち、値が1.3 - 0.7に含まれる比r(即

ち、0.863及び0.749)を選択し、その個数 $S_r (= 2)$ をカウントし、相関率 $R(\%) = (2/5) \times 100 = 40\%$ を算出した。同様に、他のプローブ群に関して相関率を算出した。

表1において、枠で囲った各プローブ群では、それぞれ相関率が80%以上となっており、メチル化のパターンが類似するといえる。

なお、表1の「set1」及び「set5」に示すメチル化P値のパターンについて相関係数 $R'$ を求めたところ、0.920という高い値が得られた。

【0076】

同様に、表2のset1株およびset5株のメチル化P値について、P値の比 $r = \text{set1} / \text{set5}$ を求めた。

次に、連続する5つプローブ(プローブ群)の比 $r$ のうち、値が1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数 $S_r$ をカウントし、相関率 $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$ を求めた。

表2において、枠で囲った各プローブ群では、それぞれ相関率が80%以上となっており、メチル化のパターンが類似する。

なお、表2の「set1」及び「set5」に示すメチル化P値のパターンについて相関係数 $R'$ を求めたところ、0.912という高い値が得られた。

【0077】

表3のset1株およびset5株のメチル化P値について、P値の比 $r = \text{set1} / \text{set5}$ を求めた。

次に、連続する5つプローブ(プローブ群)の比 $r$ のうち、値が1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数 $S_r$ をカウントし、相関率 $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$ を求めた。

表3では、相関率が80%以上となるプローブ群は存在しなかった。

表3の「set1」及び「set5」に示すメチル化P値のパターンについて相関係数 $R'$ を求めたところ、0.701という値が得られた。

【0078】

また、表4のset1株およびset5株のメチル化P値について、P値の比 $r = \text{set1} / \text{set5}$ を求めた。

次に、連続する5つプローブ(プローブ群)の比 $r$ のうち、値が1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数 $S_r$ をカウントし、相関率 $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$ を求めた。

表4では、相関率が80%以上となるプローブ群は存在しなかった。

表4の「set1」及び「set5」に示すメチル化P値のパターンについて相関係数 $R'$ を求めたところ、0.303という値が得られた。

【0079】

[実施例2]

ES細胞のメチル化/ヒドロキシメチル化パターン解析

ヒトES細胞に対して上記工程1~10の解析を行ったところ、図10~13のマッピンググラフが得られた。

図10~13のマッピンググラフにおいて、上パネルのグラフはメチル化 $P_m$ 値のパターンであり、下パネルのグラフはヒドロキシメチル化 $P_{hm}$ 値のパターンである。図10~13の各図に示すグラフは、それぞれヒトES細胞の株1及び株2の同一のDNA領域におけるパターンを示す。また、図10~13はそれぞれ異なるDNA領域におけるパターンを示す。

図10~13のマッピンググラフのメチル化P値のパターン(5mC)及びヒドロキシメチル化P値パターン(5hmC)の数値データをそれぞれ表5~8に示す。

表5

10

20

30

40

表5:ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン数値データ

5mC						5hmC					
A02株	A03株	比率 r	S.	相関率 R (%)	相関係数R'	A02株	A03株	比率 r	S.	相関率 R (%)	相関係数R'
0.01	0	0.000	0	0	0.953	0.19	0.03	0.16	0	0	0.921
0.01	0	0.000	0	0		0.24	0.09	0.38	0	0	
0.02	0	0.000	0	0		0.32	0.17	0.53	0	0	
0.02	0	0.000	1	20		0.32	0.17	0.53	0	0	
0.02	0	0.000	2	40		0.32	0.17	0.53	1	20	
0.02	0.16	8.000	3	60		0.48	0.19	0.40	2	40	
0.04	0.16	4.000	4	80		0.48	0.17	0.35	3	60	
0.41	0.47	1.146	5	100		1.17	0.69	0.59	4	80	
1.07	1.15	1.075	5	100		1.17	1.08	0.92	5	100	
1.07	1.15	1.075	5	100		1.17	1.08	0.92	5	100	
1.07	1.15	1.075	5	100		1.17	1.08	0.92	5	100	
1.93	2.05	1.062	4	80		1.17	1.08	0.92	4	80	
1.93	2.05	1.062	4	80		1.17	1.08	0.92	4	80	
1.93	2.05	1.062	3	60		1.17	1.08	0.92	3	60	
1.93	2.05	1.062	3	60		1.17	1.08	0.92	2	40	
1.87	1.2	0.642	3	60		1.27	1.08	0.85	2	40	
2.08	1.91	0.918	4	80		1.12	0.51	0.46	1	20	
1.87	1.1	0.588	4	80		1.12	0.51	0.46	1	20	
1.02	0.76	0.745	5	100		1.12	0.51	0.46	1	20	
1.02	0.76	0.745	4	80		0.52	0.42	0.81	1	20	
0.8	0.65	0.813	-	-		0.08	0.05	0.63	0	0	
0.58	0.54	0.931	-	-		0.01	0	0.00	-	-	
0.37	0.43	1.162	-	-		0	0	#DIV/0!	-	-	
0.17	0.32	1.882	-	-		0	0	#DIV/0!	-	-	

表 6

10

20

30

40

表6: ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン数値データ

5mC						5hmC					
A02株	A03株	比率 r	S.	相関率 R (%)	相関係数 R'	A02株	A03株	比率 r	S.	相関率 R (%)	相関係数 R'
1.38	1.21	0.877	2	40	0.973	0	1.82	#DIV/0!	0	0	0.588
1.38	1.21	0.877	1	20		0	1.82	#DIV/0!	0	0	
2.14	1.21	0.565	1	20		0	3.17	#DIV/0!	0	0	
2.14	1.21	0.565	2	40		0	3.17	#DIV/0!	0	0	
2.52	1.44	0.571	3	60		0.01	3.71	371.000	0	0	
3.23	2.2	0.681	4	80		0.92	4.24	4.609	0	0	
3.8	3.75	0.987	5	100		2.26	4.04	1.788	1	20	
5.46	5.4	0.989	5	100		2.54	3.51	1.382	2	40	
5.88	6.15	1.046	5	100		1.82	2.87	1.577	2	60	
4.99	5.26	1.054	4	80		1.48	2.37	1.601	2	60	
3.59	4.09	1.139	3	60		1.48	1.41	0.953	2	40	
2.41	2.83	1.174	3	60		0.77	0.66	0.857	1	20	
1.44	1.78	1.236	2	40		0.22	0.15	0.682	0	0	
0.68	0.94	1.382	1	20		0.05	0	0.000	0	0	
0.16	0.33	2.063	1	20		0	0	#DIV/0!	0	20	
0.01	0.01	1.000	1	20		0	0	#DIV/0!	0	20	
0.01	0	0.000	0	0		0	0	#DIV/0!	0	20	
0.01	0	0.000	0	0		0	0	#DIV/0!	0	0	
0.02	0	0.000	0	0		0.01	0	0.000	0	0	
0.02	0	0.000	0	0		0.01	0	0.000	0	0	
0.01	0	0.000	-	-		0.01	0	0.000	-	-	
0.01	0	0.000	-	-		0	0	#DIV/0!	-	-	
0	0	#DIV/0!	-	-		0	0	#DIV/0!	-	-	
0.16	0	0.000	-	-		0	0	#DIV/0!	-	-	

表 7

10

20

30

40

表7:ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン数値データ

5mC					5hmC				
A01株	A03株	比率 r	S	相関係数 R	A01株	A03株	比率 r	S	相関係数 R
0.01	0.76	76.000	0	0	0	0	#DIV/0!	0	0
0	0.95	#DIV/0!	1	20	0	0	#DIV/0!	1	20
0.03	1.14	38.000	1	20	0	0	#DIV/0!	2	40
0.2	1.33	6.650	1	20	0	0	#DIV/0!	3	60
0.08	0.74	9.250	1	20	0	0	#DIV/0!	4	80
0.53	0.58	1.094	1	20	0.08	0.09	1.13	5	100
1.23	0.23	0.187	0	0	0.13	0.13	1.00	5	100
0.69	0.23	0.333	0	0	0.13	0.13	1.00	4	80
0.69	0.23	0.333	0	0	0.13	0.13	1.00	4	80
0.17	0.23	1.353	0	0	0.13	0.13	1.00	4	80
0	0.23	#DIV/0!	0	0	0.13	0.13	1.00	3	60
0	0.08	#DIV/0!	0	0	0.53	0.34	0.64	2	40
0	0	#DIV/0!	0	0	1.23	0.96	0.78	2	40
0	0	#DIV/0!	0	0	1.42	1.8	1.27	2	40
0	0	#DIV/0!	0	0	1.82	2.86	1.57	2	40
0	0	#DIV/0!	0	0	2.88	4.12	1.43	3	60
0	0	#DIV/0!	0	0	4.16	5.61	1.35	4	80
0	0	#DIV/0!	0	0	4.47	4.99	1.12	4	80
0	0	#DIV/0!	0	0	4.47	4.99	1.12	3	60
0	0	#DIV/0!	0	0	4.47	4.99	1.12	2	40
0	0	#DIV/0!	0	0	4.47	5.05	1.13	1	20
0	0	#DIV/0!	0	0	3.69	4.96	1.34	0	0
0	0	#DIV/0!	0	0	3.22	4.34	1.35	1	20
0	0	#DIV/0!	0	0	2.76	3.73	1.35	1	20
0	0	#DIV/0!	0	0	2.29	3.11	1.36	1	20
0	0	#DIV/0!	0	0	2.76	3.73	1.35	1	20
0	0.04	#DIV/0!	0	0	1.42	1.31	0.92	1	20
0	0	#DIV/0!	0	0	0.54	0.03	0.06	0	0
0	0	#DIV/0!	0	0	0.1	0.01	0.10	0	0
0	0.06	#DIV/0!	0	0	0.03	0	0.00	0	0
0	0	#DIV/0!	-	-	0	0	#DIV/0!	-	-
0	0	#DIV/0!	-	-	0	0	#DIV/0!	-	-
0	0	#DIV/0!	-	-	0.01	0	0.00	-	-
0	0	#DIV/0!	-	-	0	0	#DIV/0!	-	-



ンについては相関係数  $R' = 0.921$  という値が得られた。

【0081】

表6の「5mC」及び「5hmC」の欄は、それぞれメチル化及びヒドロキシメチル化を表す。また、「5mC」及び「5hmC」の各欄において「A02株」及び「A03株」に示す数値は、それぞれメチル化P値及びヒドロキシメチル化P値を示す。

各プローブのメチル化P値について、P値の比  $r = A02株 / A03株$  を求めた。同様に、ヒドロキシメチル化P値について、P値の比  $r = A02株 / A03株$  を求めた。

次に、メチル化r値及びヒドロキシメチル化r値のそれぞれについて、1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数  $S_r$  をカウントし、相関率  $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$  を求めた。

表6のメチル化パターンにおいて、枠で囲った各プローブ群では、それぞれ相関率Rが80%以上であり、メチル化のパターンが類似するといえる。

他方、表6のヒドロキシメチル化パターンにおいて、相関率Rが80%以上のプローブ群は認められなかった。

なお、表6のメチル化P値のパターンについてA02株とA03株との間で相関係数  $R'$  を求めたところ、0.973という高い値が得られ、ヒドロキシメチル化P値のパターンについては相関係数  $R' = 0.588$  という値が得られた。

【0082】

表7の「5mC」及び「5hmC」の欄は、それぞれメチル化及びヒドロキシメチル化を表す。また、「5mC」及び「5hmC」の各欄において「A01株」及び「A03株」に示す数値は、それぞれメチル化P値及びヒドロキシメチル化P値を示す。

各プローブのメチル化P値について、P値の比  $r = A01株 / A03株$  を求めた。同様に、ヒドロキシメチル化P値について、P値の比  $r = A01株 / A03株$  を求めた。

次に、メチル化r値及びヒドロキシメチル化r値のそれぞれについて、1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数  $S_r$  をカウントし、相関率  $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$  を求めた。

表7のメチル化パターンにおいて、相関率Rが80%以上のプローブ群は認められなかった。

他方、表7のヒドロキシメチル化パターンにおいて、枠で囲った各プローブ群では、それぞれ相関率Rが80%以上となっており、ヒドロキシメチル化のパターンが類似するといえる。

なお、表7のメチル化P値のパターンについてA01株とA03株との間で相関係数  $R'$  を求めたところ、-0.282という値が得られ、ヒドロキシメチル化P値のパターンについては相関係数  $R' = 0.988$  という値が得られた。

【0083】

表8の「5mC」及び「5hmC」の欄は、それぞれメチル化及びヒドロキシメチル化を表す。また、「5mC」及び「5hmC」の各欄において「A01株」及び「A03株」に示す数値は、それぞれメチル化P値及びヒドロキシメチル化P値を示す。

各プローブのメチル化P値について、P値の比  $r = A01株 / A03株$  を求めた。同様に、ヒドロキシメチル化P値について、P値の比  $r = A01株 / A03株$  を求めた。

次に、メチル化r値及びヒドロキシメチル化r値のそれぞれについて、1.3 - 0.7に含まれるものを選択し、その個数  $S_r$  をカウントし、相関率  $R(\%) = (S_r / 5) \times 100$  を求めた。

表8のメチル化パターンにおいて、相関率が80%のプローブ群は認められなかった。同様に、ヒドロキシメチル化パターンにおいても、相関率Rが80%のプローブ群は認められなかった。

なお、表8のメチル化P値のパターンについてA01株とA03株との間で相関係数  $R'$  を求めたところ、0.796という値が得られ、ヒドロキシメチル化P値のパターンについては相関係数  $R' = -0.125$  という値が得られた。

【0084】

10

20

30

40

50

## 【実施例 3】

相関係数  $R'$  を用いた識別方法

3株のES細胞(A01~A03)に対し、上記実験手順に示す工程1~9を行い、メチル化  $P_m$  値のマッピンググラフを得た(図14)。図14の例(Case)1~3は、それぞれ異なるDNA領域のマッピンググラフである。メチル化シトシンの修飾のP値を、10~20個からなる各プローブセットを単位として、細胞群間での相関係数  $R'$  を求めた。相関係数  $R' = 0.8 \sim 1.0$  の群を類似すると判断した。

## 【0085】

図14の例1で判定法を説明する。10~20個の連続するプローブのセットごとに、システム1とシステム2、システム2とシステム3、システム3とシステム1のP値における相関係数を求めた。図15に示す3つの囲み部分はそれぞれ例1、2、3におけるP値の数値データである。

下記表9に示すように、それぞれの相関係数は0.29、0.94、0.17と計算された。システム2とシステム3はP値のヒストグラムの上昇傾向に類似性がみられた。システム2とシステム3において、P値の上昇パターンが類似していることが、相関係数で確認された。具体的な数値データを図15に示す。

例2の場合、相関係数は0.24、0.11、-0.34と計算され、P値のヒストグラムにも類似性がみられなかった。

同様に、例3ではシステム3とシステム1間で、相関係数が0.94と計算された。パターンも類似していることが確認できた。一方、システム1とシステム2、システム2とシステム3ではそれぞれ相関係数が-0.12、-0.14となり、P値の上昇パターンにも類似性が見いだされなかった。

表9

表9

	$r$ (A01 vs A02)	$r$ (A02 vs A03)	$r$ (A03 vs A01)
例1	0.29	0.94	0.17
例2	0.24	0.11	-0.34
例3	-0.12	-0.14	0.94

## 【産業上の利用可能性】

## 【0086】

本発明の方法に従ってメチル化及び脱メチル化P値パターンを比較することで幹細胞の性状をより簡便で明確に識別することが可能になった。また、本発明の方法を実施するに当たり、本発明者らが開発した自動化エピジェネティクスシステムを用いることで、さらに実験に要する操作を単純化し、再現性、信頼性の高いデータが得られることが証明された。

。

【 図 1 】

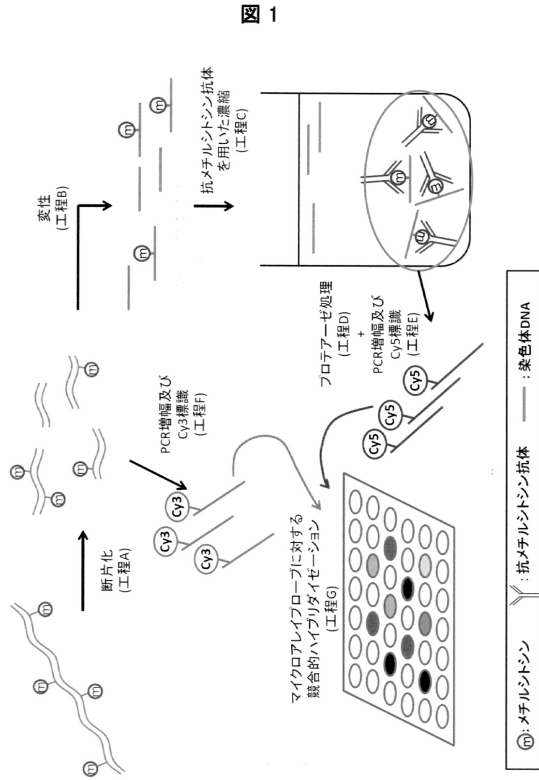


図 1

【 図 2 】

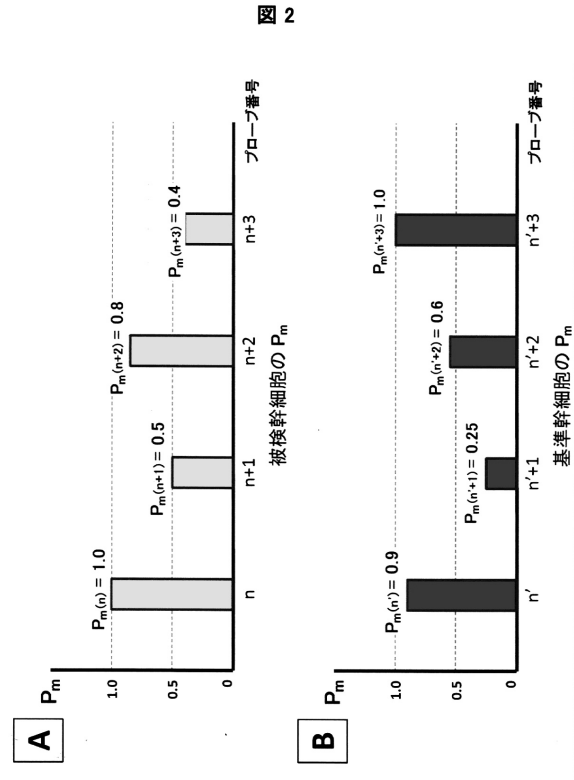


図 2

【 図 3 】

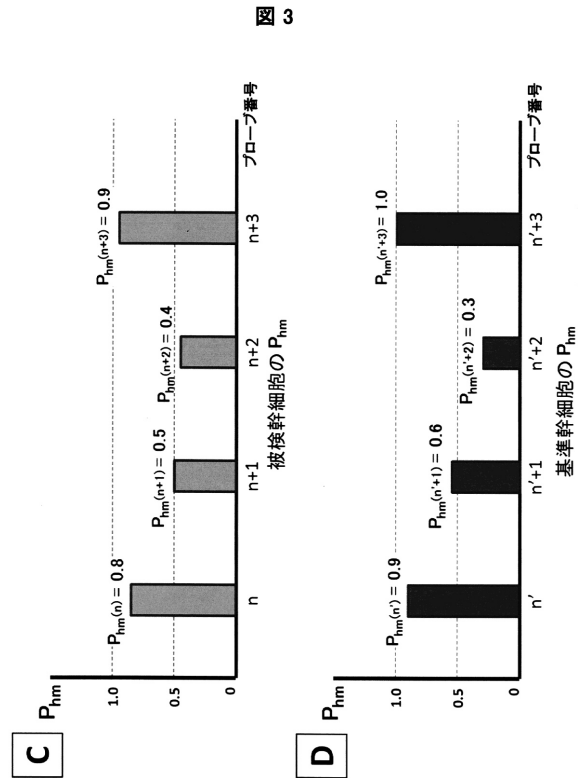


図 3

【 図 4 】

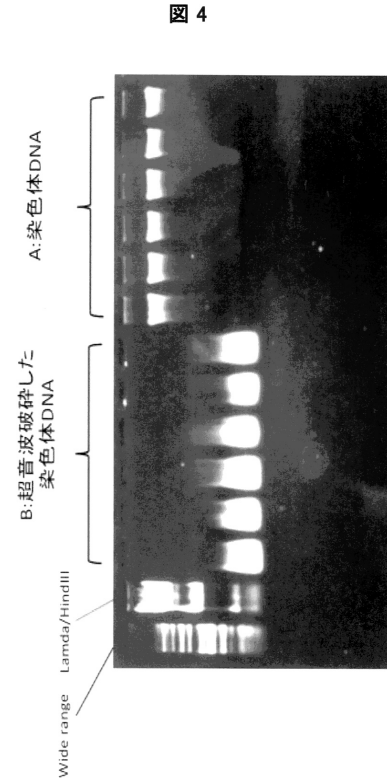
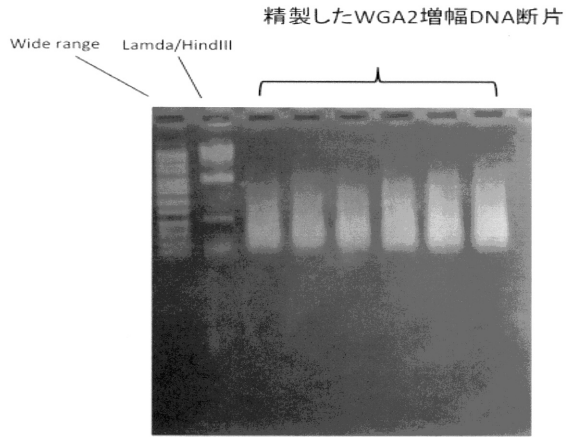


図 4

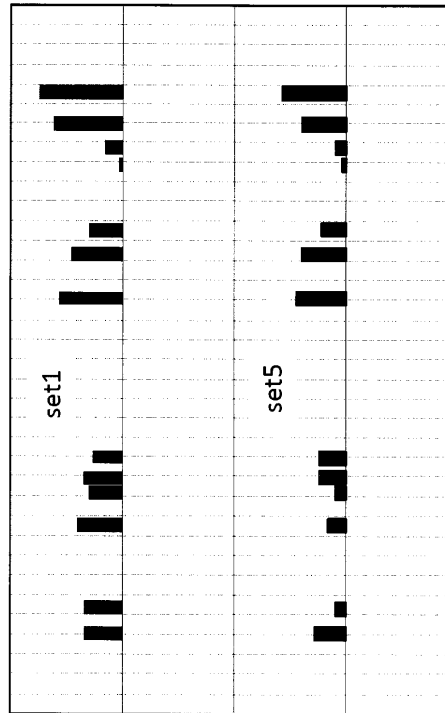
【 図 5 】

図 5



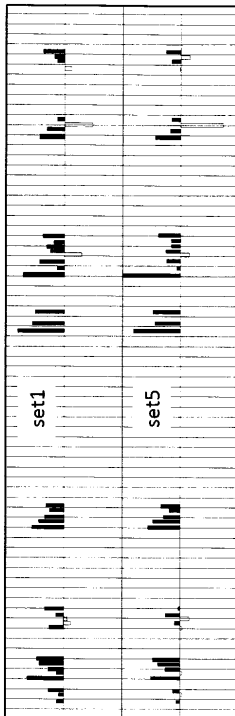
【 図 6 】

図 6



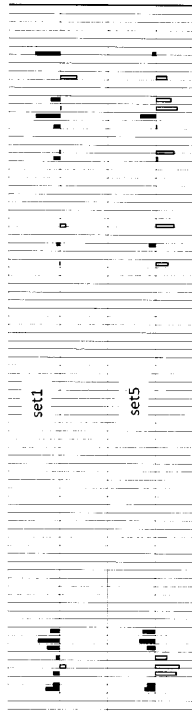
【 図 7 】

図 7



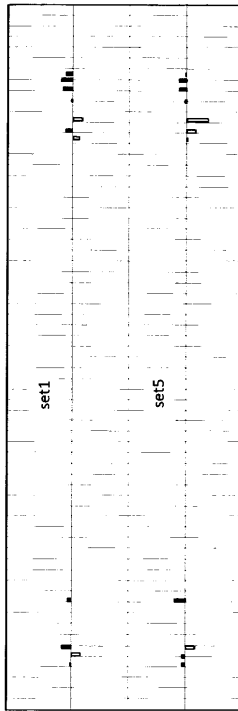
【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

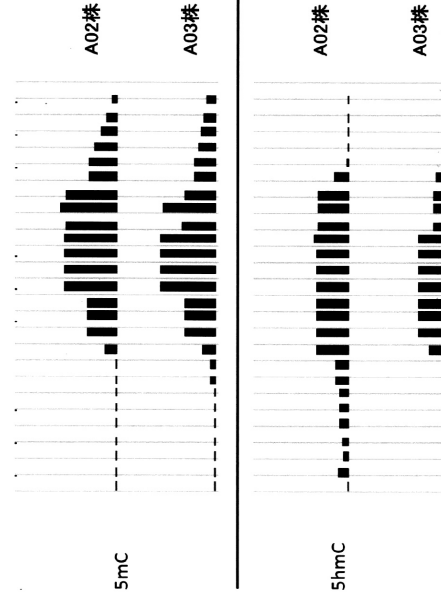
図 9



【 図 10 】

図 10

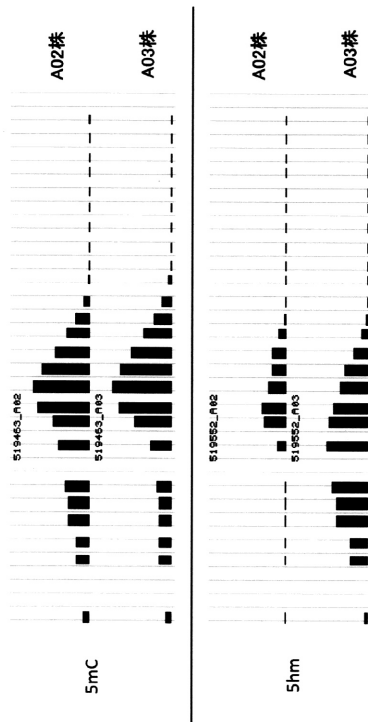
図 10: ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン



【 図 11 】

図 11

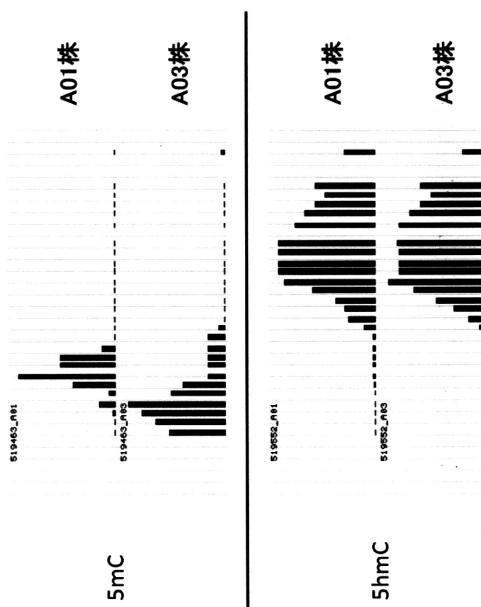
図 11: ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン



【 図 12 】

図 12

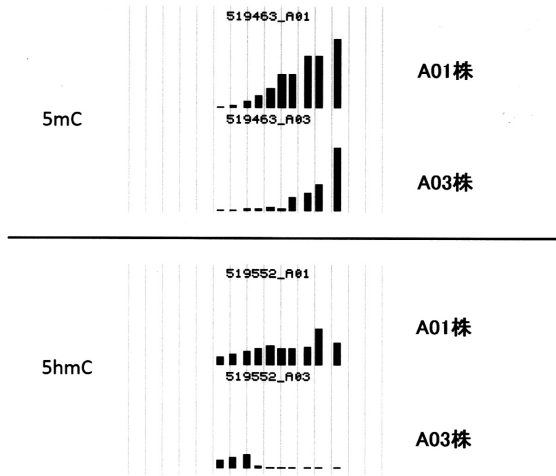
図 12: ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン



【 図 1 3 】

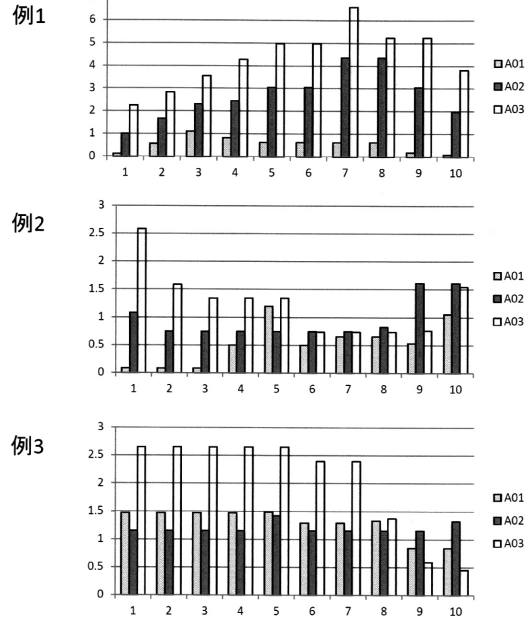
図 13

図13:ヒトES細胞のメチル化及びヒドロキシメチル化パターン



【 図 1 4 】

図 14



【 図 1 5 】

図 15

Distance	Probe Start	Probe End	A01	A02	A03
0	211209	211266	0.12	0.99	2.25
124	211333	211382	0.56	1.85	2.82
222	211431	211492	1.09	2.3	3.54
306	211515	211570	0.82	2.44	4.26
424	211633	211684	0.61	3.05	4.97
500	211709	211772	0.61	3.05	4.97
604	211813	211869	0.61	4.35	6.58
702	211911	211960	0.61	4.35	5.23
824	212033	212065	0.18	3.05	5.23
902	212111	212160	0.08	1.96	3.8
1024	212233	212293	0.08	1.08	2.58
1110	212319	212368	0.08	0.74	1.58
1224	212433	212495	0.08	0.74	1.34
1306	212515	212564	0.5	0.74	1.34
1400	212609	212665	1.19	0.74	1.34
1500	212709	212760	0.5	0.74	0.73
1625	212834	212895	0.65	0.74	0.73
1725	212934	212987	0.65	0.82	0.73
1801	213010	213072	0.53	1.61	0.76
1911	213120	213168	1.05	1.61	1.54
2025	213234	213283	1.05	1.61	1.63
2117	213326	213375	1.05	1.61	1.63
2201	213410	213459	0.71	1.61	1.63
2301	213510	213559	0.71	1.61	1.63
2403	213612	213661	1.47	1.15	2.65
2502	213711	213760	1.47	1.15	2.65
2600	213809	213858	1.47	1.15	2.65
2725	213934	213983	1.47	1.15	2.65
2817	214026	214075	1.49	1.42	2.65
2917	214126	214175	1.29	1.15	2.39
3011	214220	214269	1.29	1.15	2.39
3113	214322	214371	1.33	1.15	1.37
3215	214424	214473	0.84	1.15	0.59
3357	214566	214615	0.84	1.32	0.45
3451	214660	214709	0.84	1.32	0.45
3575	214784	214833	0.71	1.13	0.29
3697	214876	214925	0.58	0.94	0.15
3751	214960	215009	0.58	0.94	0.15
3857	215068	215115	0.44	0.75	0.04

← 例1の囲み

← 例2の囲み

← 例3の囲み

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 5/074 (2010.01) C 1 2 N 5/074  
C 1 2 N 5/0775 (2010.01) C 1 2 N 5/0775

(72)発明者 羽田野 智之  
千葉県松戸市上本郷 8 8 番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内  
(72)発明者 高橋 正明  
千葉県松戸市上本郷 8 8 番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内  
(72)発明者 狩長 亮二  
千葉県松戸市上本郷 8 8 番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 3 7 4 5 6 ( W O , A 1 )  
SZULWACH, Keith E. et al. , Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells , PLoS GENETICS , 2 0 1 1 年 6 月 , Vol.7, No.6 , e1002154

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 Q  
G 0 1 N  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	细胞识别方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6297983B2</a>	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	JP2014557547	申请日	2014-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	环球生物研究株式会社		
申请(专利权)人(译)	通用生物研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用生物研究有限公司		
[标]发明人	田島秀二 銀屋治巳 羽田野智之 高橋正明 狩長亮二		
发明人	田島 秀二 銀屋 治巳 羽田野 智之 高橋 正明 狩長 亮二		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N37/00 C12N5/0735 C12N5/074 C12N5/0775		
CPC分类号	C12Q1/6888 C12Q1/6809 C12Q2600/154 G16B25/00 C12Q2523/125 C12Q2537/165 C12Q2539/115 C12Q2565/501		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/0735 C12N5/074 C12N5/0775		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
审查员(译)	松冈彻		
优先权	2013005594 2013-01-16 JP		
其他公开文献	JPWO2014112655A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 本发明的目的是提供详细分析干细胞的表观遗传状态的方法。本发明提供了鉴定干细胞的方法，其包括分析从测试干细胞提取的染色体DNA的甲基化和去甲基化模式，并将分析的模式与测试干细胞的性质相关联。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6297983号 (P6297983)
(45) 発行日 平成30年3月20日(2018.3.20)	(24) 登録日 平成30年3月2日(2018.3.2)	
(51) Int. Cl.	F I	
C12Q 1/68 (2018.01)	C12Q 1/68 A	
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48 M	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 37/00 I O 2	
C12N 5/0735 (2010.01)	C12N 5/0735	
請求項の数 5 (全 33 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-557547 (P2014-557547)	(73) 特許権者 502338292 ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社	
(86) (22) 出願日 平成26年1月16日(2014.1.16)	千葉県松戸市上本郷8-8番地	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/051316	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩	
(87) 国際公開番号 W02014/112655	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄	
(87) 国際公開日 平成26年7月24日(2014.7.24)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁	
審査請求日 平成26年8月30日(2016.8.30)	(72) 発明者 田島 秀二 千葉県松戸市上本郷8-8番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内	
(31) 優先権主張番号 特願2013-5594 (P2013-5594)	(72) 発明者 銀屋 治巳 千葉県松戸市上本郷8-8番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内	
(32) 優先日 平成25年1月16日(2013.1.16)		
(33) 優先権主張国 日本国(JP)		
(出願人による申告)平成24年度、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」委託研究、産業技術力強化法第19条の運用を受ける特許出願		
(54)【発明の名称】細胞の識別方法		