
Oxford Nanopore 社の技術を用いて ヒトゲノムのメチル化を調査

入門

はじめに

エピジェネティクスは、塩基配列を変化させることなく表現型を変化させる化学的修飾を検討するもので、ますます盛んになっている研究分野です。ヒトのエピジェネティック修飾の研究（DNA、RNA、ヒストンタンパク質の修飾を含む）は、発生生物学¹から、がん²や神経障害³などの疾患の臨床リサーチに至る多様な分野で重要な役割を果たしています。

哺乳類ゲノム、なかでもヒトを対象に最も広く検討され、最もよく性状が把握されているエピジェネティック修飾が5-メチルシトシン（5mC）のDNAメチル化（シトシンヌクレオチドへのメチル基の付加）です。メチル化は遺伝子発現の調節に重要な役割を担っており、遺伝子プロモーターのメチル化異常は疾患と関連することが分かっています。

ヒトゲノムのメチル化解析には多くの方法があります。ただし、従来の検出技術にはいくつか制約が存在します。例えば、ショートリードシーケンシング技術ではPCRを必要としますが、その際にエピジェネティック修飾が失われます。PCR産物からはメチル化をシーケンシングすることができないため、シーケンシングの前にDNAサンプルを化学的に処理することによりメチル化の存在を推測することになります。

ナノポアシーケンシングを用いれば、nativeのDNAやRNAをPCRフリーで、直接シーケンシングすることも可能です。そのため、メチル化情報を損なわず塩基配列と共に直接検出でき、化学的変換や追加のライブラリ調製は必要ありません。ターゲット領域またはヒトゲノム全体でメチル化をかつてないほどの精度で検出できるエンドツーエンドのナノポアワークフローでは、ライブラリ調製が簡易であるだけでなく、実験の目標に合わせた柔軟なシーケンシングオプションを用意しています。

このガイドでは、ヒトゲノムにおけるDNAメチル化のダイレクトシーケンシングを紹介しています。また、ナノポアシーケンシングは、native RNAのエピジェネティック修飾のダイレクトシーケンシングと解析が可能な唯一の技術です。詳細は nanoporetech.com/applications/transcriptome-sequencing をご覧ください



1. Greenberg, M.V.C. and Bourc' his, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Cell Bio.* 20: 590-607 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>
2. Simpson, J.T. et al. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat. Methods* 14: 407-410 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4184>
3. Weng, Y.L., et al. DNA modifications and neurological disorders. *Neurotherapeutics* 10(4): 556-567 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0223-4>

Oxford Nanopore 社の技術を用いたゴールドスタンダードのメチル化コール：性能比較評価

ナノポアによるメチル化コールの性能を比較評価するため、PromethION™ を用いて、サンプル当たりのカバレッジを 20 倍として、性状が十分に把握されたヒトゲノム HG002 の 2 つの複製 native DNA ライブラリをシークエンスしました (ONT_1 と ONT_2)。また、この 2 つのデータセットを統合し、40 倍のカバレッジでもう 1 つのデータセットを作成しました (ONT_3)。Remora (Oxford Nanopore 社が開発したアルゴリズムで、標準的なベースコールと共にゴールドスタンダードのメチル化コールが可能) を用いて、ベースコールと修飾コールを実施しました。こうして得られたメチル化コールのデータを、2 件のショートリードのバイサルファイトシークエンスデータセット (BS-Seq_1⁴ と BS-Seq_2^{5,6}) と比較しました。

- Publicly available BS-Seq open dataset. Available at: <https://labs.epi2me.io/category/data-releases/> [Accessed: 9 Mar 2023].
- NCBI. Sample GSM5649436. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM5649436> [Accessed: 9 Mar 2023].
- NCBI. Sample GSM5649437. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM5649437> [Accessed: 9 Mar 2023].
- Ebbert, M.T.W. et al. Systematic analysis of dark and camouflaged genes reveals disease-relevant genes hiding in plain sight. *Genome Biol.* 20,97 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1707-2>

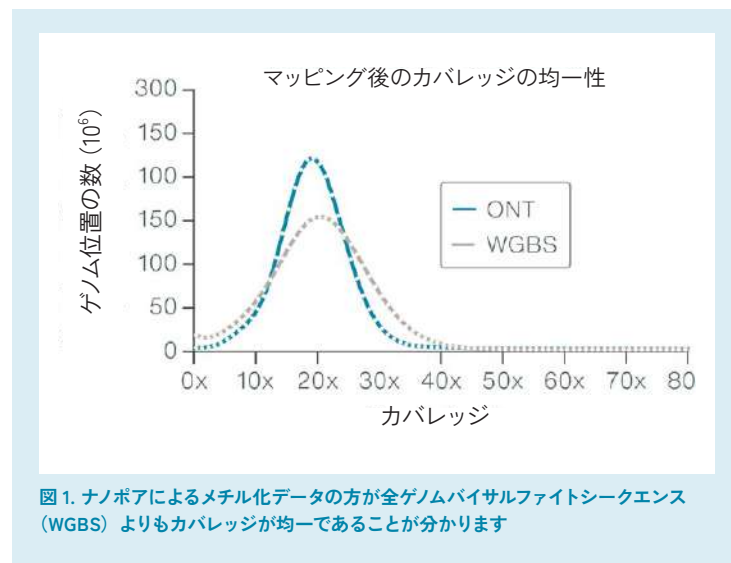


図 1. ナノポアによるメチル化データの方が全ゲノムバイサルファイトシークエンス (WGBS) よりもカバレッジが均一であることが分かります

メチル化の検出には、バイサルファイト変換の後にショートリードシークエンスを実施する方法が広く使用されています。バイサルファイトはメチル化を受けていないシトシンをウラシルに変換しますが、シークエンス時にはウラシルがチミンとして読み取られます。5mC は変換されませんが、PCR の際に修飾が失われます。その後、未処理のリファレンス (理想的にはベアの) データセットと比較し、シトシンとしてある 5mC の有無を推測します。しかし、バイサルファイト処理は時間のかかるプロセスで、有害化学物質を使用する必要があり、DNA サンプルがかなりの程度まで断片化されます。また、化学的変換は不完全な結果に終わることがあり、サンプルごとにばらつきが生じるため、結果の妥当性にも影響が及びます。さらに、バイサルファイト処理では 5mC と 5- ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) を識別できません。

5mC 比較評価試験では、ナノポアシークエンスのデータの方がバイサルファイトデータよりもカバレッジの均一性が高いことが示されました (図 1)。DNA シークエンスが PCR に適しているわけではなく、GC リッチ領域など一部のゲノム領域は、ショートリードシークエンスのデータセットには十分に反映されなかったり、全体が欠けてしまったりすることがあります。PCR フリーのナノポアシークエンスでは、他のシークエンス法によってはアクセスできない領域を含め、ゲノム全体でカバレッジの均一性を高めることができます⁷。バイサルファイト変換を実施するとシークエンスの複雑度が低下し、ショートリードシークエンスと組み合わせた場合にはリファレンスゲノムへのマッピングが困難となります。それに対して、

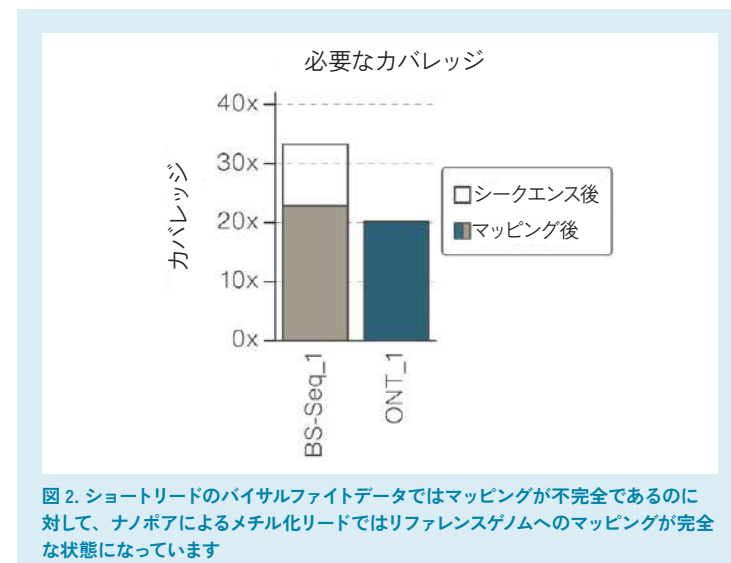


図 2. ショートリードのバイサルファイトデータではマッピングが不完全であるのに対して、ナノポアによるメチル化リードではリファレンスゲノムへのマッピングが完全な状態になっています

PCR フリーのナノポアのロングリードはリファレンスゲノム (hg38) に完全にマッピングされました (図 2)。

ナノポアデータセットでは、ベースコールと修飾塩基コールを合わせた解析速度がバイサルファイト修飾コールのみの場合の 2.5 倍超となりました。5mC のコールについては方法間で高い相関 (0.97) が認められ、ナノポアデータセットでは高い再現性が認められました (0.95)。また、ナノポアによってメチル化を検出する場合、メチル化の有無を明らかにするために別のベアサンプルをシークエンスする必要がありません (また、ほかに関心のある変異を解析するために別途ランを実施する必要がありません)。単一のデータセットから、構造変異 (SV)、一塩基変異 (SNVs)、コピー数変異 (CNV)、ショートタンデムリピート配列 (STR)、メチル化をすべてコールすることができるのです。

ナノポアのロングリードとウルトラロングリードでは、メチル化とゲノム変異に関するロングレンジの情報が保持されるほか、効率的なフェージングが可能です。Ultra-Long DNA Sequencing Kit を用いて HG002 ライブラリを調製したところ、シークエンスでは 100 kb の N50 リードを取得でき、マッピングカバレッジが 40 倍となりました。SNP に基づいてデータをフェージングすることで、メチル化コールの 90% のハプロタイプを検出することができました。これは、ヒトゲノム全体の CpG の 80% 超に相当します。

Oxford Nanopore 社の技術を用いたゴールドスタンダードのメチル化コール：性能比較評価

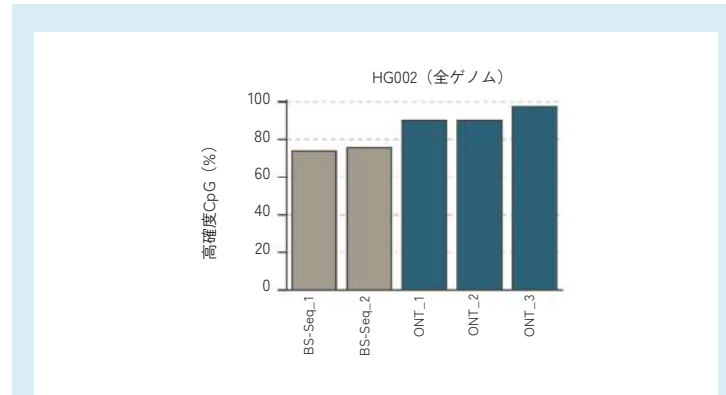


図 3. 20 倍のバイサルファイトデータセットと 20 倍および 40 倍のナノポアによるメチル化データセットでコールできた高精度 CpG の割合の比較

ナノポアデータではシーケンスカバレッジが均一であるため、ヒトゲノム全体でメチル化を検出することができます。5mC は CpG ジヌクレオチドに最もよく見られる修飾です。データセット間で CpG メチル化コールを比較したところ、20 倍のバイサルファイトデータではヒトゲノムの CpG の約 75% をコールできたのに対して、20 倍のナノポアデータでは約 90% をコールすることができました (図 3)。ナノポアシーケンスのカバレッジを 40 倍に高めた場合、CpG の 97% 超を検出できました。このデータセットは 5mC の検出に照準を合わせたものですが、Remora では 5hmC モデルも用意しています。様々な種類のサンプルを用いて、5hmC モデルの各種バリデーション指標について良好な比較結果が認められています。また、関心のあるエピジェネティック修飾を検出できるように自身の Remora モデルをトレーニングすることも可能です。

全ゲノムバイサルファイトシーケンスと比較して、ナノポアによるメチル化検出では以下の利点が示されています。

- ・相関が強い
- ・コールできる CpG 部位の数が多く
- ・必要なデータ量が少ない
- ・解析にかかる時間が少ない
- ・ワークフローが簡易で有害物質を使用しない
- ・再現性とラン間での整合性が高い
- ・均一性が高く、GC バイアスの影響が少ない
- ・メチル化のフェージングが可能

メチル化の比較評価結果の詳細を閲覧：

nanoporetech.com/methylation-benchmarking-poster

RRMS の詳細：

nanoporetech.com/rrms-poster

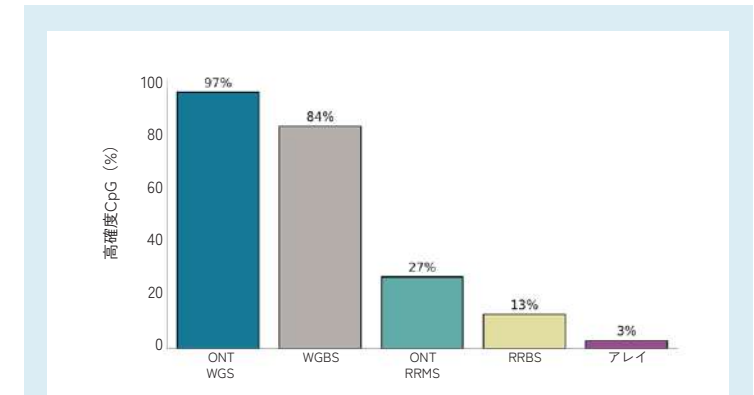
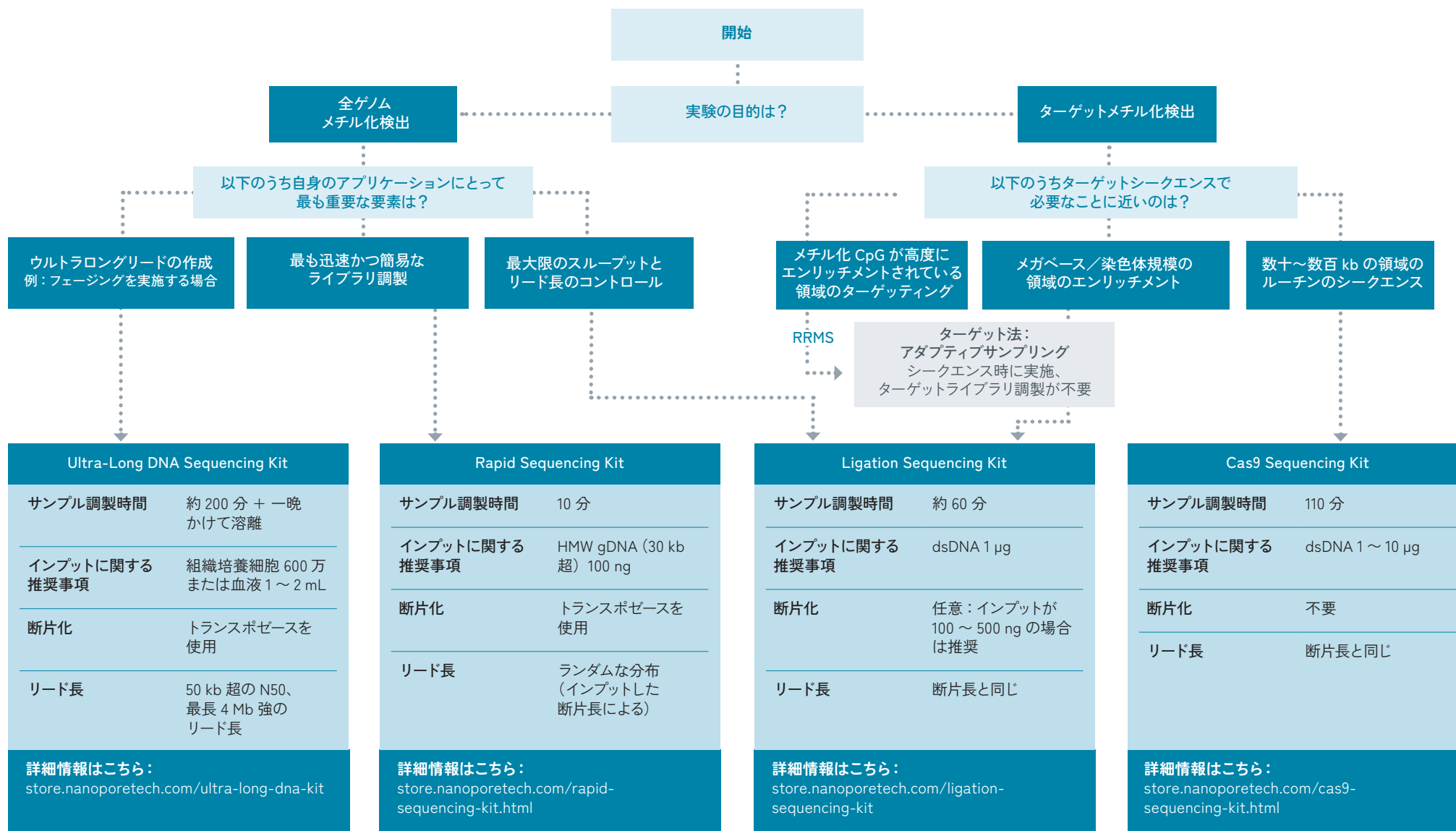


図 4. 様々なシーケンス法 (40 倍のカバレッジ) とメチル化マイクロアレイを用いてヒトゲノムに検出された CpG の割合

ターゲット法では、全ゲノムシーケンスを実施せず、効率的にメチル化解析を実施できます。メチル化 CpG のターゲティングにはメチル化マイクロアレイと Reduced-Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) がよく使用されますが、いずれもバイサルファイト変換に依拠する手法です。大規模な 5mC プロファイリング試験ではメチル化アレイが使用されていますが、その対象はわずか数千の CpG 部位、つまりヒトゲノムに存在する約 2800 万の CpG の約 3% に限られています (図 4)。RRBS はメチル化アレイよりも多くの CpG アイランドを対象としますが、コストも時間もかかります。

このような問題に対応するため、Oxford Nanopore 社は Reduced-Representation Methylation Sequencing (RRMS) を開発しました。この方法では、CpG アイランドなど、関心領域全体のメチル化パターンの特性を解析できます。RRMS はアダプティブサンプリングを使用した簡易なエンドツーエンドワークフローで (7 ページを参照)、特別なライブラリ調製を要せず、シーケンス時に柔軟かつリアルタイムに native DNA のエンリッチメントを行うことができます。塩基修飾の検出と共に標準的なベースコールを実施するため、1 回のシーケンス実験で塩基配列とエピジェネティックな変化 (5mC や 5hmC など) を同時に検出できます。RRMS は RRBS よりもカバレッジの均一性と再現性が高く、RRBS とメチル化アレイよりも大幅に高い割合の CpG (図 4) を把握することができます。方法間でほぼ完璧な相関 (0.94) が観察されています。

手法の選択



サンプルから答えまで

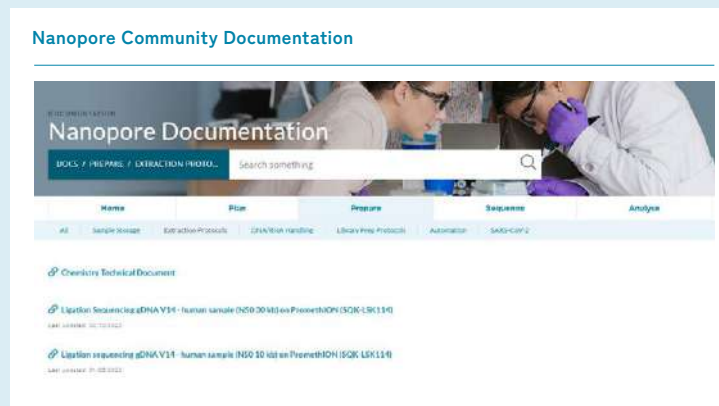
抽出

サンプルから高品質の DNA を採取するにはどうすればよいでしょうか？

Community の Nanopore Documentation セクションでは、細胞株、血液、唾液など、幅広い種類のサンプルについて推奨される DNA 抽出プロトコルを取り上げています。このセクションではほかにも、効率的なサンプル保管、DNA (と RNA) の取扱い、サイズセレクションなどを扱った情報シートを閲覧することができます。

抽出プロトコルを閲覧する：

community.nanoporetech.com/docs/prepare/extraction_protocols



ライブラリ調製

断片化またはサイズセレクションを実施する必要はありますか？

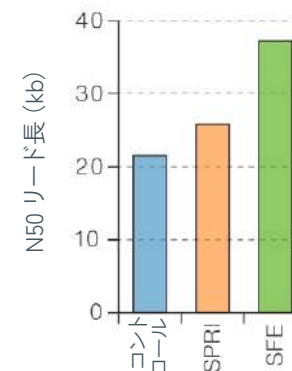
ナノポアシーケンスではリード長に制限がないため、DNA サンプルの断片化は任意です。データをフェージングする予定がない限り、メチル化検出では一般にリード長の最大化は不要です。軽く断片化するとシーケンスアウトプットが改善され、メチル化を受けた関心領域のカバレッジを最大化しやすくなることが分かっています。

フェージングを実施したい場合は、断片化を避けることによりロングリードに最適な状態にすることができますが、サイズセレクションを実施すれば不要な短い断片を最小限に抑えることができます。さらに長いリードの場合 (N50 が 50 kb を超え、リードがメガベース規模に達する場合)、Ultra-Long DNA Sequencing Kit を使用可能です (5 ページを参照)。断片化とサイズセレクションに関する指針を Community で公開しています。

任意の断片化とサイズセレクションの方法に関する詳細：

community.nanoporetech.com/docs/prepare

サイズセレクションを実施せずに調製 (コントロール)、SPRI によるサイズセレクションを用いて調製 (SPRI)、Oxford Nanopore Short Fragment Eliminator Expansion を用いて調製 (SFE) した 3 つのシーケンスライブラリの N50 リード長



サンプルから答えまで

ライブラリ調製

メチル化に関する情報を失うことなくターゲットシーケンスを実施するにはどうすればよいでしょうか？

特定の関心領域のメチル化を効率的に評価するには、ターゲット法を選択するのが理想です。ライブラリ調製の工程でメチル化塩基を保存してシーケンスで検出可能な状態にするため、ターゲットエンリッチメントには PCR フリーの方法を用いることが不可欠です。これには以下の2通りの方法があります。

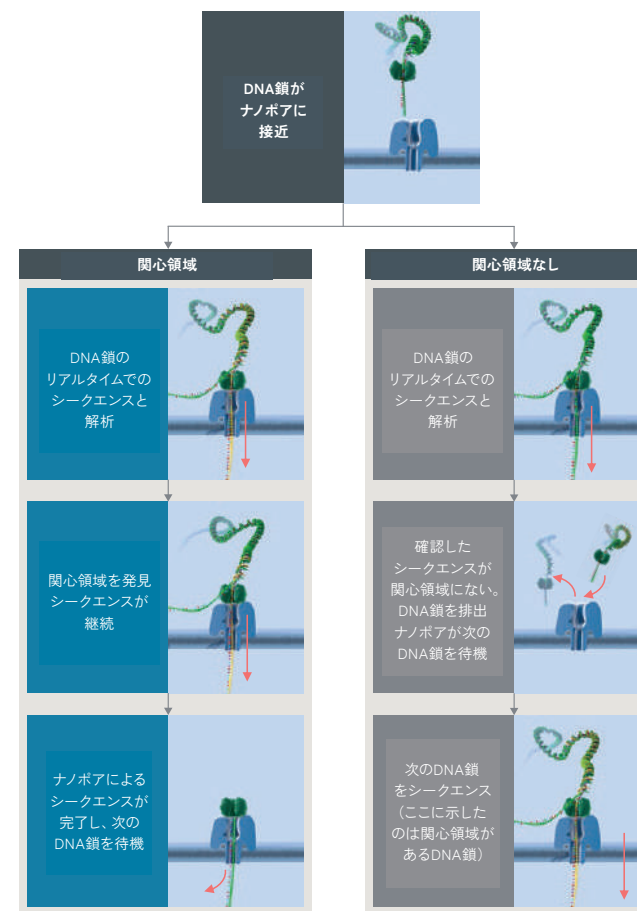
アダプティブサンプリングは、工程全体をナノポアシーケンスの際に実施する革新的なターゲットエンリッチメント法で、特別なライブラリ調製が不要です。また、Reduced-Representation Methylation Sequencing (RRMS) の基盤となる方法でもあります。エンリッチメントしたい(あるいは欠失させたい)シーケンスを BED files として MinKNOW™ (ナノポアシーケンス機器に搭載されているソフトウェア)に読み込ませます。DNA 分子が関心領域に該当する場合はナノポアを通過し、完全にシーケンスされます。オフターゲットシーケンスがナノポアを通過すると、リアルタイムで認識されてポアから弾き出されるため、その分の時間が関心領域のシーケンスに充てられます。アダプティブサンプリングは、ターゲット領域の長さに制限がないため、メガベース規模の SV や全染色体など、関心領域が非常に大きい場合のエンリッチメントに理想的です。

Cas9 ターゲットシーケンスでは、CRISPR/Cas9 システムを用いて関心領域の開始点と(分かっている場合には)終了点のターゲット切断を実施します。こうして新たに露出した末端にシーケンスアダプターをライゲーションし、この領域をエンリッチメントしてからシーケンスします。この方法は、チューブ1本を用いる簡易なプロセスで、所要時間は2時間未満であり、同じサンプルを用いて一度に複数の領域をエンリッチメントすることができます。数十キロベース以上にわたる領域(現在の記録は198 kb³)のロングレンジのエンリッチメントが可能のため、関心のある特定の遺伝子や SV などの一連のターゲットをエンリッチメントし、そのメチル化を評価するのに理想的です。

RRMS、アダプティブサンプリングによるターゲットメチル化検出について:
nanoporetech.com/methylation-rrms

ターゲットシーケンスの入門ガイドを閲覧する:
nanoporetech.com/targeted-sequencing-guide

アダプティブサンプリングのワークフロー



8. Iyer, S. Understanding genetic variation in cancer, using targeted nanopore sequencing. Presentation. Available at: nanoporetech.com/shrutiiyer [Accessed: 9 Mar 2023].

サンプルから答えまで

ライブラリ調製

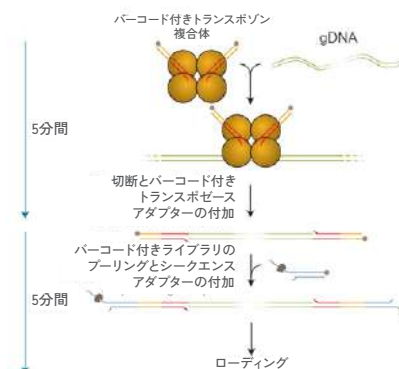
一度に複数のサンプルをシーケンスするにはどうすればよいでしょうか？

当社の **Native Barcoding Kit** では、PCR を用いることなくサンプルのバーコーディングを実施でき、最大 96 個の native DNA ライブラリのマルチプレックスシーケンスが可能です。この際、1 回のランで同時に、シーケンスする各サンプルにバーコードアダプターをライゲーションします。その後、各サンプルをプールのし、1つのサンプルとしてシーケンス用に準備します。

迅速なライブラリ調製が重要となる場面では、**Rapid Barcoding Kit** により最大 96 個のバーコード付きライブラリを 1 時間で、あるいは最大 12 個をわずか 10 分で調製できます。この場合、トランスポゼースを使用した方法により、一度に DNA を断片化してバーコード付きシーケンスアダプターを付加します。

ナノポアシーケンスキットと拡張パックを閲覧する：
store.nanoporetech.com/sample-prep.html

迅速なバーコーディングのワークフロー

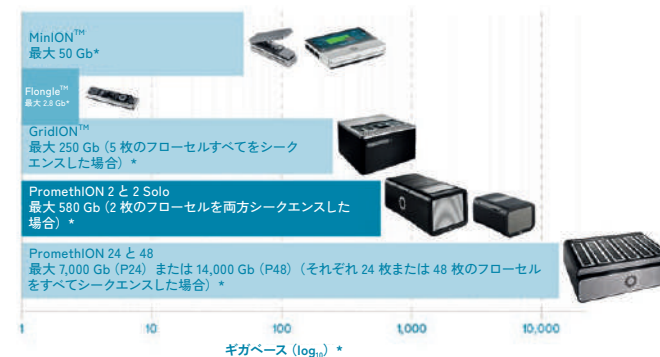


シーケンス

どの機器を選択したらよいでしょうか？

幅広いナノポアシーケンス機器を用意しており、それぞれ異なる実験要件に適う製品となっています。特定領域のメチル化のターゲット解析には、MinION™ (外部コンピュータから操作できるポータブル機器) または MinION Mk1C (タッチスクリーンと内蔵コンピューティングシステムを搭載したオールインワンのシーケンス) が理想的です。柔軟なスケールリングが可能な GridION™ では、最大 5 枚の MinION Flow Cell を一度にシーケンスできるため、ターゲットパネルや全ゲノムのオンデマンドシーケンスに適しています。Flongle™ があれば、MinION または GridION で小さな Flongle Flow Cell を使用することができるようになります。Flongle は少数の関心ターゲット領域をシーケンスできるだけのスループットを備えているほか、ハイスループット機器でのシーケンスの前にライブラリの品質管理も実施できます。ヒトゲノム全体でメチル化を解析するには、4 種類ある PromethION™ でのシーケンスをおすすめします。ウルトラハイスループットのベンチトップ型機器である PromethION 24 と PromethION 48 は、強力なオンボードコンピューティングシステムを搭載しており、それぞれ最大 24 枚または 48 枚の PromethION Flow Cell をシーケンスできます。内蔵コンピューティングシステムを搭載した PromethION 2、GridION または既存のコンピューティングインフラに接続する PromethION 2 Solo は、簡易なプラグアンドプレイによる設定が可能で、2 枚の独立した高出力の PromethION Flow Cell を搭載できる柔軟性もち、必要なサンプルスループットが少ない場合に適しています。

ナノポアシーケンス機器の最大出力 *



* 理論的な最大出力 (Theoretical Maximum Output: TMO)。システムを420塩基/秒で2時間ランさせた場合。実際の出力はライブラリの種類、ラン条件などにより変動します。ここに記載したTMOがすべてのアプリケーションまたはすべてのケミストリで実現できるわけではありません。

ナノポアシーケンスに関する詳細：
nanoporetech.com/products

サンプルから答えまで

シーケンス

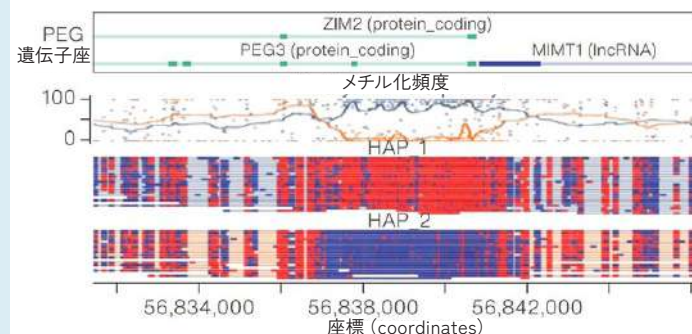
どの程度のデータが必要ですか？

ヒトゲノムワイドの 5mC および 5hmC メチル化コールを行う際の指標として、20 倍のカバレッジでのシーケンスをおすすめします。これは当社のナノポアによるメチル化コールの性能比較評価データセットで使用したカバレッジに相当します (3 ~ 4 ページを参照)。

データのフェージングには、カバレッジを約 30 倍に高めることが推奨されます。20 倍または 30 倍のカバレッジを得るには、1 枚の PromethION Flow Cell で 72 時間シーケンスします。ナノポアの増幅前のロングリードとウルトラロングリードであればデータのフェージングを容易かつ正確に行え、カバレッジが均一なため、大きな関心領域でメチル化コールのハプロタイプを検出することが可能です。

当社ウェブサイトの Workflows でエビジェネティクス、SNV コール、フェージングなどのベストプラクティスに関する指針を閲覧する：
nanoporetech.com/resource-centre/workflows

ナノポアによりメチル化のハプロタイプを検出したデータでは、ヒトゲノムにおいて差別的メチル化を受け、2 つのインプリント遺伝子が重複した領域が観察されました



データ解析

自分のデータでメチル化を検出するにはどうすればよいのでしょうか？

1 回のランで標準的なベースコールとメチル化コールを高精度で行うには、Remora の使用をおすすめします。これは、ナノポアシーケンス機器に搭載のソフトウェアである MinKNOW に統合されているツールです。Remora の各種モデルはベースコールと共に動き (標準的なベースコールの精度に影響はありません)、既存の修飾コールツールよりも性能が優れており、ナノポアによる実験手法ではメチル化コールの新たなゴールドスタンダードとなることが示されています。軽いアルゴリズムであるため、必要なオーバーヘッドが最小限に抑えられており、モデルの使用とトレーニングをより迅速かつ容易に行えます。また、ナノポアベースコールのモードを変更することもできます ('fast', 'high accuracy (HAC)', 'super accuracy' (SUP))。

ヒトゲノム内の変異をさらに詳細に解析するには、**wf-human-variation** のワークフローをおすすめします。このワークフローでは、メチル化アノテーションが作成できてハプロタイプのフェージングが可能であるほか、SNVs、CNV、SV、STR を解析することができます。EPI2ME ソリューションの 1 つであるこのワークフローは、簡易な point-and-click ワークフローで実施可能なほか、コマンドラインを使用して実施することもできます。



Knowledge Exchange で Remora の詳細を確認する：
nanoporetech.com/knowledge-exchange/remora

最新のデータ解析ツールを閲覧する：
nanoporetech.com/data-analysis

サンプルから答えまで

データ解析

5mC と 5hmC を識別することはできますか？

バイサルファイトシーケンスなどの既存のシーケンス技術では 5mC と 5hmC を識別することができませんが、ナノポア技術では 1つのデータセットで両修飾を正確に検出および識別することができます。

Remora には、5mC と 5hmC の検出にそれぞれ適したモデルがあります。関心のあるエピジェネティック修飾をより検出できるよう自身のモデルをトレーニングするなど、さらに発展的な使用方法については、GitHub の Remora レポジトリをご覧ください。



データ解析

一塩基レベルでメチル化を検出できますか？

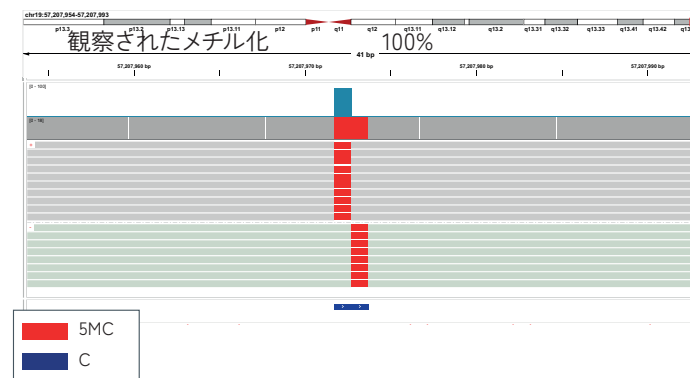
CpG メチル化の従来の解析では通常、関心部位の CpG メチル化の平均レベルを求めることになりますが、不均質性を解析することはできません。ナノポアシーケンスでは、一塩基レベルで高精度なメチル化コールを実施でき、高い確実性をもってエピジェネティックな不均質性を探索することが可能です。

単一分子 DNA メチル化パターンから以下のことが可能になります。

- ・不均質な細胞集団の調査
- ・エピアレルの同定
- ・サンプルの比較：がん研究における腫瘍 - 正常ペアシーケンスなど

ナノポアシーケンスを用いたエピジェネティクスとメチル化解析の詳細：
nanoporetech.com/applications/investigation/epigenetics

ナノポアシーケンスにより塩基修飾の一塩基レベルでの解析が高精度に実施可能に



ケーススタディ

ケーススタディ 1: ナノポアのウルトラロングリードによりヒトエピゲノムを探索

最近まで、ヒトゲノムのエピジェネティックな状態の研究は困難でした。完全なヒトリファレンスゲノムのアセンブリが存在しなかっただけでなく、メチル化検出にショートリードシーケンス法を用いるとマッピング精度が低くなるためです。Telomere-to-Telomere Consortium がヒトゲノムの初の完全なリファレンスシーケンス CHM13-T2T⁹ を公開したことを受け、Gershman らは、ナノポアのウルトラロングリードを用いてヒトエピゲノムを調査しました¹⁰。そのデータの恩恵を受け、同研究者たちは、以前には検出できなかったリピート配列が豊富な領域など、ヒトゲノムのなかで新たに完全な情報が得られた領域の CpG メチル化をコールすることができました。具体的には、CHM13 細胞株と HG002 から得た DNA をシーケンスすることにより、ヒトゲノム内の CpG のそれぞれ 99.7%、99.9% で 5mC の頻度を評価することに成功しました。また、同研究者たちは、このデータと nanoNOMe 実験（ナノポアシーケンスに基づくクロマチンアクセスシビリティ法）のデータを統合することにより、セントロメアの反復アレイ内の

エピジェネティックパターンを調査しています。同グループはほかにも、メチル化データのみを用いて、ゲノムのうちヘテロ接合性が消失した反復配列をフェージングし、セントロメア内のエピジェネティックな不均質性を探索することができました。その解析結果は、ゲノムのなかでも特に解析が困難な領域のエピジェネティックな状態を明らかにするものであり、「ヒトメチロームの状態をこれまでに最も詳細に把握した」ものとなっています¹⁰。

発表文献 (2022 年 4 月) を読む:

nanoporetech.com/resource-centre/epigenetic-patterns-complete-human-genome

ケーススタディ 2: アダプティブサンプリングを用いた迅速な CNS 腫瘍分類の可能性を示す

9. Nurk, S. et. al. The complete sequence of a human genome. *Science* 376(6588): 44-53 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abj6987>
10. Gershman, A. et. al. Epigenetic patterns in a complete human genome. *Science* 376(6588) (2022). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abj5089>
11. Rushing, E.J. WHO classification of tumors of the nervous system: preview of the upcoming 5th edition. *MEMO Magaz. Eur. Med. Oncol.* 14:188-191 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12254-021-00680-x>
12. Patel, A. et. al. Rapid-CNS² a rapid comprehensive adaptive nanopore sequencing of CNS tumors, a proof-of-concept study. *Acta Neuropathol.* 143(5):609-612 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02415-6>
13. Jaunmuktane, Z. et. al. Methylation array profiling of adult brain tumours: diagnostic outcomes in a large, single centre. *Acta Neuropathol. Commun.* 7:24 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0668-8>

SNVs、CNV、メチル化などのゲノム変異を同定できれば、より確度の高い情報に基づいた中枢神経系 (CNS) 腫瘍の分類が可能になるため、治療効果を予測するうえで重要性が高まっています¹¹。従来のショートリードシーケンス技術を用いる場合、完全な分子プロファイリングを実施するには多大な資本投資が必要であり、またサンプル数が少ないラボではサンプルをバッチ処理する必要性から所要時間が長くなることがあります。Patel ら¹² は、CNS 腫瘍のクリニカルリサーチサンプルにおける遺伝子のメチル化、SNVs、CNV に関する情報をナノポアシーケンスデータから取得するためのエンドツーエンドのバイオインフォマティクスパイプライン Rapid-CNS² を開発しています。このワークフローはサンプルの受領直後から開始できるもので、将来的に「少ない資本的支出」で分子バイオマーカーを検出する迅速かつ「高度な柔軟性を備えた戦略」となる可能性を秘めています。

Patel らはこの概念実証研究でアダプティブサンプリング（ナノポアシーケンス独自のソフトウェア制御によるエンリッチメント法）を使用し、神経病理に関する遺伝子パネルとメチル化分類に関連する CpG 部位の両方をカバーするターゲット領域を調査しました。全ケースにおいて、ナノポアシーケンスデータと従来のショートリードシーケンス技術およびメチル化マイクロアレイのデータで、DNA 修復に関連する O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT)

プロモーターのメチル化状態が一致していました。いずれのサンプルでもメチル化ファミリー¹³ が正確に予測されたうえ、神経膠腫サンプルの 80% 超でメチル化のサブクラスが正確に同定されました。

著者らは、時間のかからない簡易なライブラリ調製、リアルタイム解析、ナノポアシーケンス機器の携帯性に加えて、塩基配列と共に塩基修飾をコールできるという特徴が、既存の方法と比べてどれほど大きな利点となるかを記載しています。結論部分では、この手法が「スループットが少ない場合やそれほど高度なラボインフラを備えていない環境で高い費用対効果を示し」、速やかに CNS 腫瘍分類を実施する必要がある場合に「不可欠な」ものになるとして、その将来性が強調されています。

発表文献 (2022年3月) を読む:

nanoporetech.com/resource-centre/rapid-cns2

Oxford Nanopore Technologies

email : support@nanoporetech.com

Twitter : [@nanopore](https://twitter.com/nanopore)

www.nanoporetech.com

