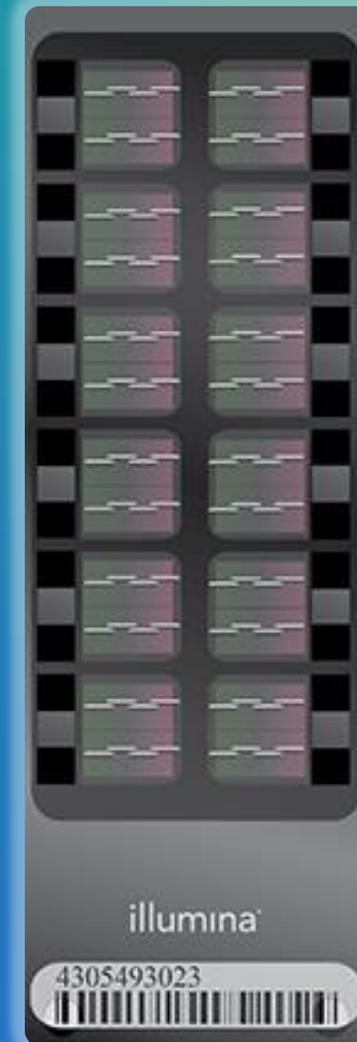


Mouse Methylation BeadChipのご紹介

イルミナ株式会社
プロダクトマーケティング

illumina®



内容

1. 製品概要
2. ワークフロー
3. パフォーマンスデータ
4. アプリケーション
5. ご注文に関する情報



SUBTITLE

製品概要

illumina®



Illumina Infinium™ Mouse Methylation BeadChip – 特長

マウスDNAメチロームの全ゲノムに渡るカバレッジ

- Infinium Mouse Methylation BeadChip(MMB)は多くの機能領域をカバーしており、多様なタイプの研究を実施可能

全てのラボマウスシステムに対応する設計

- 異なるマウスシステム間に渡るプローブ設計で、異なる研究テーマに合わせて特定のマウスシステムを用いる場合にも大きな柔軟性

DNAメチル化の精確な定量

- バイサルファイトシーケンスと異なり、Infiniumテクノロジーなら、リード深度に依存せず精確な定量的メチル化解析が可能

バイサルファイトシーケンスと比べて、バイオインフォマティクス解析がシンプル

- 基本的な解析にはイルミナのGenomeStudioを、さらに詳細な解析にはBioConductorパッケージを

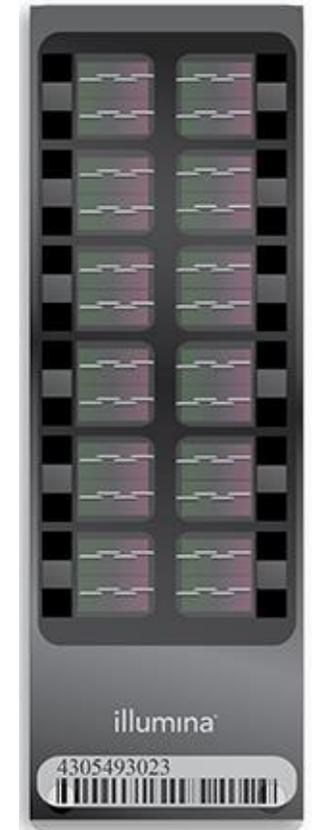
セミカスタムオプション

- バックボーンコンテンツに3~10kのプローブを追加する機能を提供、研究課題に特化したゲノム領域をターゲットに追加

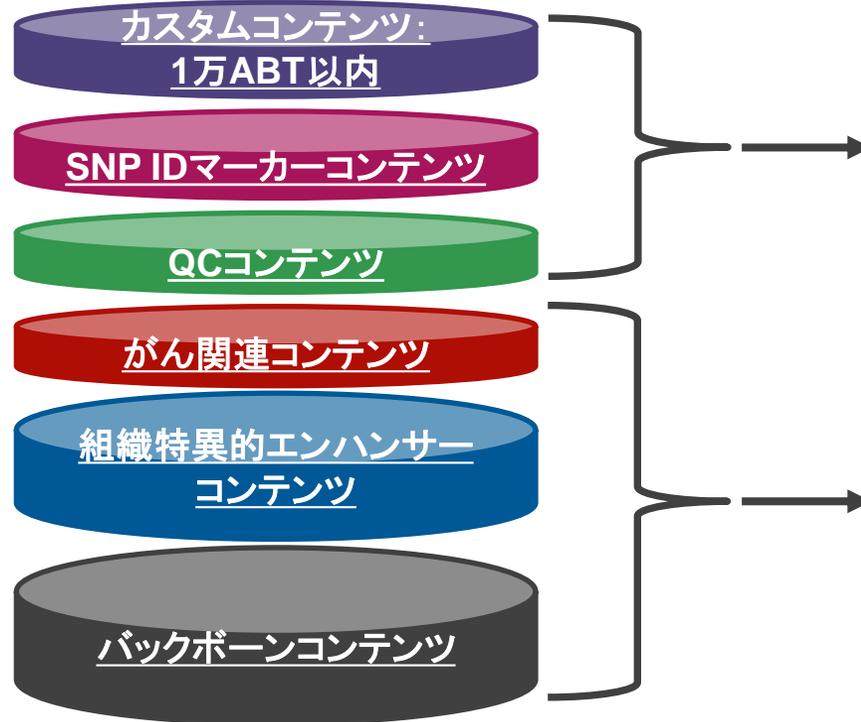
コスト効率的

- コスト効率が高いMMBを用いることで、研究予算内でより多くのサンプルを解析

Illumina Infinium
Mouse Methylation
BeadChip



Infinium Mouse Methylation BeadChip – コンテンツ



- 研究用途に合わせて最適化可能な**Add-Onカスタム**対応
- 18のメジャーなマウス系統からの**SNP IDマーカー**
- サンプルが適切に処理されたことをトラックする**QCコンテンツ**
(Genome StudioソフトウェアやBioconductorで使われるコントロール)
- **がん特異的**に高メチル化されるエピゲノム変動をカバーするコンテンツ
- 疾患モデル(KO/KI/Transgenic)研究に最適な**組織特異的エンハンサー**コンテンツ(脳、心臓、肺、腎臓、膵臓、胃、腸、胚性幹細胞、造血幹細胞、成熟白血球他)
- 一般的な探索研究や組織特異的プロファイル研究に最適な**バックボーン**
(TSS, CGI, Gene Body CTCF Binding Sites, Lamin Attachment Domains, Repetitive Regions, Imprinted Loci, & more)

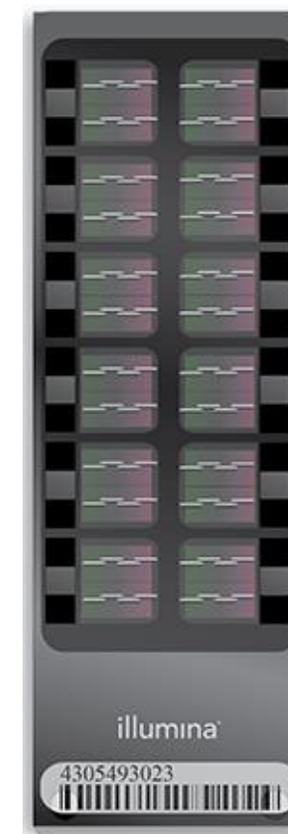
285,000以上のCpGサイトをカバー



Infinium Mouse Methylation BeadChip –製品仕様

高密度カバレッジ、12サンプル/チップの高スループット、少量DNAスタート、セミカスタムオプション

Illumina Infinium
Mouse Methylation
BeadChip



項目	既製品	セミカスタム
対応するABT*数	約316,000	3,000-10,000
CpG数	285,000以上	285,000 + カスタム追加 CpG
BeadChipフォーマット	12サンプル	12サンプル
Min. DNA Input Amount	250 ng	250 ng
Conversion Rate**	N/A	80%
再現性(テクニカルレプリケート)	$r^2 \geq 98\%$	$r^2 \geq 98\%$
ご購入いただける最少サンプル数	24サンプル	5,000サンプル
ご注文後の納期 (新規ご注文)***	N/A	約20週
ご注文後の納期 (同一デザインの再注文)***	N/A	約7週

*ABT – Attempted Bead Types harbor the exact CpG probes. Depending on the genomic context either one or two bead types are required to query an individual CpG

**Manufacturing Conversion Rate – Refers to the minimum guaranteed percent of designed probes that are successfully detected on the final semi-custom array

***Manufacturing Lead Time – Refers to the time needed to synthesize the semi-custom array and perform quality control testing.



Illumina Infinium Mouse Methylation BeadChip – アプリケーション

エピゲノムワイド関連解析(EWAS)

- マウスを用いたエピゲノムワイド関連研究は、**近親交配マウスモデル**により**遺伝的差異がメチロームに与える影響を最小限に抑えることができる**ため、ヒトにおける同様の研究と比べて**結果の解釈がシンプル**に

疾患患者由来ゼノグラフト(異種移植)モデルの解剖検体の解析

- がんのゼノグラフト(異種移植)モデル**において、免疫不全マウス内にヒト腫瘍を移植したことによる**マウスの寄与を理解**するために、移植ヒト腫瘍だけでなく、**ホストマウスのメチローム解析が有用な可能性**

発生生物学研究

- マウス発生モデルをInfinium MMBで解析し、**胚発生間のメチル化マークの時空間的配置を理解**

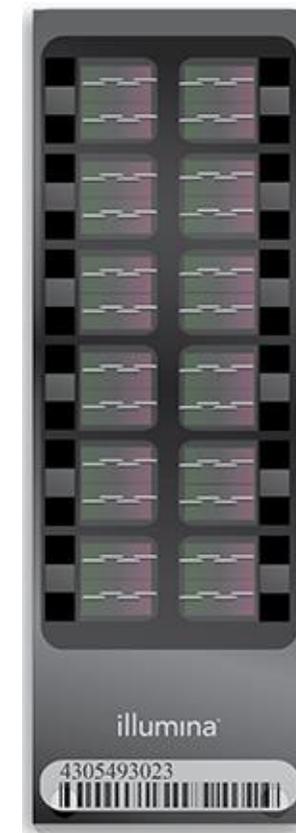
疾患モデルマウスの解析

- がん、糖尿病、肥満、失明、ルーゲーリック病、ハンチントン病、依存症など、様々なヒト疾患を対象とした変異マウス**や**トランスジェニックマウスのモデル**が開発されており、Infinium MMBを用いて**エピジェネティックな寄与や影響を容易に解析可能**

前臨床バリデーション試験

- 医薬品研究**において、マウスで有望な結果を示した**薬剤候補**が、ヒトで一貫した挙動を示すかどうかを判断

Illumina Infinium
Mouse Methylation
BeadChip



ワークフロー

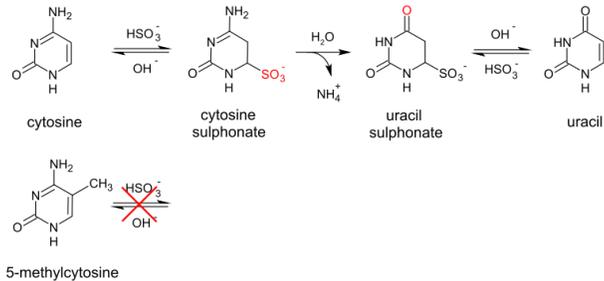
illumina®

2



Mouse Methylation BeadChip(MMB)のワークフロー

DNAからスキャンファイル取得まで:約3-4日

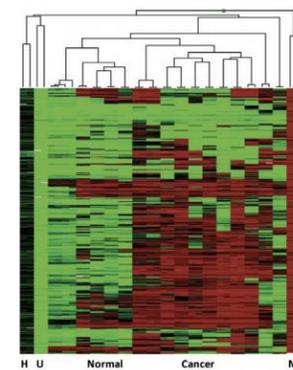


バイサルファイト変換

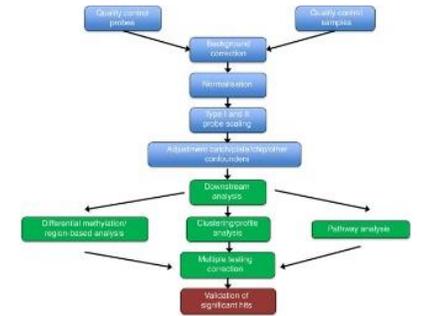
MMB



Infiniumアッセイ
(MMB + iScan)



Idatファイルを
GenomeStudioで解析



サードパーティー
ソフトウェアでさらなる解析

ご注意ください

- NextSeq550システムのスキャニング機能は現在MMBに対応していません
- FFPE Restoreキットは現在MMBで検証されていません。FFPE QCキットはマウスには対応していません。

Downstream Analysis Picture Taken From: Wilhelm-Bernartzi, C.S., et al., (2013). Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *British Journal of Cancer* 109 1394-1402. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.496>.

Bisulfite Conversion Picture Taken From: https://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing

Author: Jujubix

License Information: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>



パフォーマンス データのご紹介



インプットDNA量の比較

- **Context** –DNAインプット量は、仕様上「サンプルあたり250 ng以上」
- **Expectation** –DNA量が増えると有意に検出できるプローブ数が増えることが期待される
- **Findings** –DNAを50 ngから1,000 ngまでの異なるDNAインプット量でアレイ解析に供した結果、probe success rate(有意なシグナルで検出できたプローブの割合)は0.85から0.97にまで上昇した。CpGサイトの平均beta値(メチル化率)はほぼ変わらなかったが、CGIとPMDサイトのbeta値は250 ng以上で安定する傾向が見られた

TABLE 2: Quantity_6

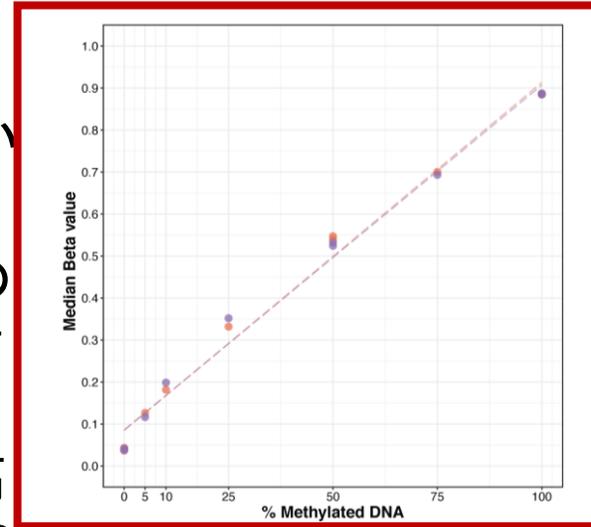
Laird_ID	Cell_Type	Description	SuccessRate	Median beta values			Lane
				All_CpGs	CGI_CpGs	PMDsolo_CpGs	
21021	NIH3T3	50ng	0.85	0.83	0.64	0.48	1
21021	NIH3T3	100ng	0.89	0.84	0.69	0.43	2
21021	NIH3T3	250ng	0.94	0.86	0.72	0.33	3
21021	NIH3T3	500ng	0.96	0.86	0.73	0.35	4
21021	NIH3T3	500ng	0.96	0.86	0.73	0.35	5
21021	NIH3T3	1000ng	0.97	0.86	0.72	0.35	6



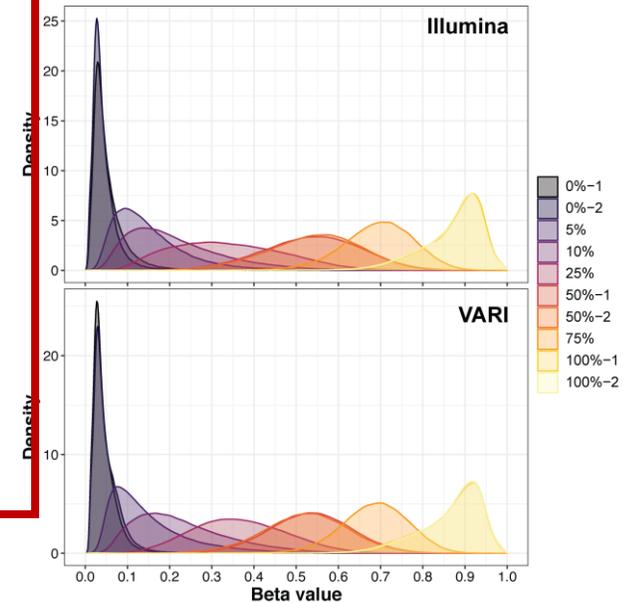
DNA メチル化タイトレーション実験

- **Expectation #1** – メチル化DNA100%のサンプルとメチル化DNA0%のサンプルを任意の割合で混合しMouse Methylation BeadChipで解析すると、メチル化DNAの割合が高くなるほど高いβ値を示すことが期待される
- **Expectation #2** – 同一サンプルを異なる2つのラボで実験した結果は、よく一致することが期待される
- **Findings** – メチル化DNAが多いサンプルほど高いβ値が得られ、Mouse Methylation BeadChipを用いることでサンプルのメチル化状態を正確に測定できることが示された。2か所の異なるラボでの測定結果はよく一致し、高い再現性が確認された。

メチル化DNAタイトレーションと実測Median beta値の関係



Beta値の分布

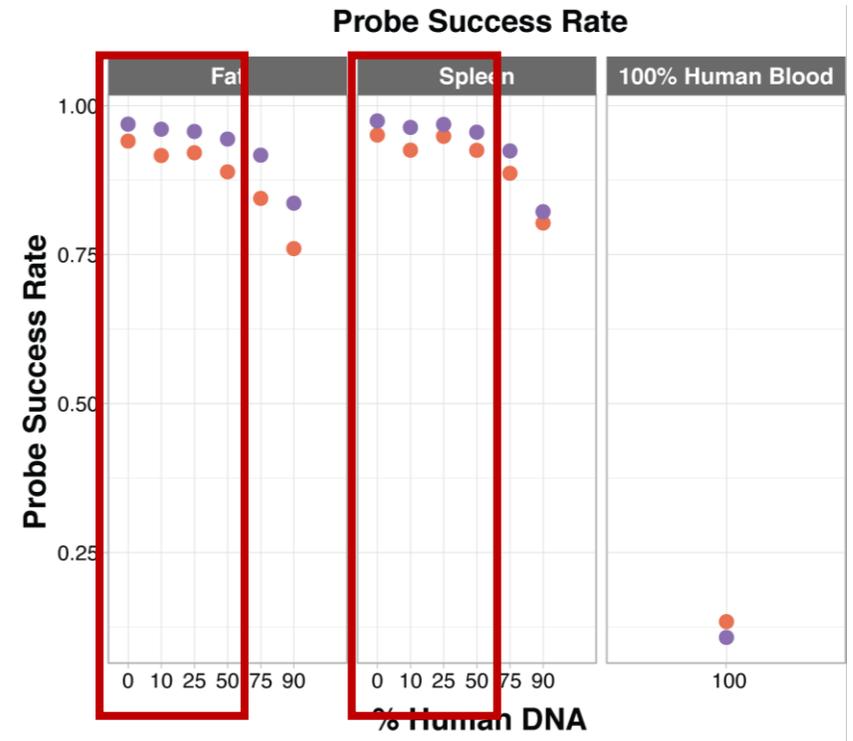


- Van Andel Research Institute (VARI)でのデータ
- イルミナラボでのデータ



ヒト・マウスDNAタイトレーション実験

- **Context** – 患者由来ゼノグラフト(PDX)モデルでは、ヒトとマウスの混合DNAをサンプルとして分析する必要がある
- **Expectation** – ヒトとマウスの混合DNAをMouse Methylation BeadChip(MMB)で分析する場合、混合物中のヒトDNAの割合が上がるほど有意に(p-values < 0.05)シグナルが検出されるプローブの数が減少することが予期される
- **Findings** – ヒトDNAの割合が増えるほどProbe success rate(ノイズと有意に区別できるシグナルを持つプローブの割合)が下がった。PDXモデルでは**50%以上マウスDNAを含むサンプル**を用いることで、バックグラウンドノイズ以上のシグナルを得らえるプローブが十分数確保できた



● Van Andel Research Institute (VARI)でのデータ
● イルミナラボでのデータ



SUBTITLE

アプリケーション

illumina®

4

EWAS = Epigenome Wide Association Study

メチル化解析アレイを用いてある形質や表現型に関連する差別的メチル化を同定

メチル化バリエーションと、特定の個人が特定の疾患に罹患するリスクとの関連を解析

EWASは、ある処置やある疾患と関連する、エピジェネティックなバイオマーカー同定に活用されてきた

現状、ほぼすべてのEWASはヒトの研究にのみ実施されているが、ヒトでの実験はマウスより制限が多く、出来ることが限られる

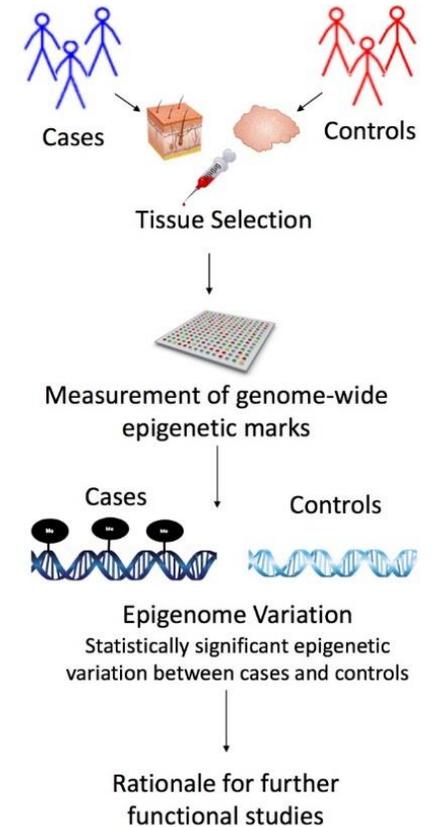


Figure From: https://en.wikipedia.org/wiki/Epigenome-wide_association_study

Author: cmRamirez

License Information: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>

マウスのEWASは、ヒトのEWASが抱える課題を最小限に抑える

- **ヒトEWAS**で見いだされたDNAメチル化シグネチャーは、多くの要因によって**交絡(因果の判断を惑わすこと)**される**可能性がある**:
 - ヒトの**環境曝露**は実験で完全に制御できない
 - ヒトの場合、ケース/コントロールの間で、メチル化に影響を与える可能性のある**異なる遺伝学的背景**がある
 - **縦断的コホート**は常に利用できるわけではない
 - サンプルとして**末梢血等しかアクセスできない**場合が多く、**組織特異的疾患への曝露**を関連付けることが難しい
- **マウスEWAS研究**は、以下の**実験的課題を取り除くことができる**:
 - **環境曝露のレベルをコントロール**できる
 - Genetic confounding(遺伝的交絡)をコントロールできる
 - 遺伝を研究するために**デザインされたマウス系統を繁殖**させることができる
 - 比較的迅速に**縦断的コホート**を確立することができる
 - ヒトでアクセス不可能な**標的組織も解剖で入手**し、メチル化変化を解析できる

	Key advantage	Key disadvantage
Case versus control (singletons) 	Many cohorts exist	Cannot easily control for environmental and genetic confounders
Families 	Can study potential inheritance	Few large cohorts of this type exist
Disease-discordant monozygotic twins 	Can control for genetics	Few large cohorts of this type exist
Prospectively sampled, longitudinal 	Can establish causality	Slow and difficult to establish

Nature Reviews | Genetics

Figure from: Sirota, M., et al., (2011). Discovery and Preclinical Validation of Drug Indications Using Compendia of Public Gene Expression Data. *Science Translational Medicine* 3(96):96ra77. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001318.

エピジェネティックエイジング –MMBで加速が期待される研究分野

老化研究者Steve Horvathが提唱したDNAメチル化にもとづく4つの“老化時計“

- All Tissue Clock (Horvath's Clock)
- Skin and Blood Clock
- PhenoAge
- GrimAge

“老化時計”は生涯にわたり予測性が高い

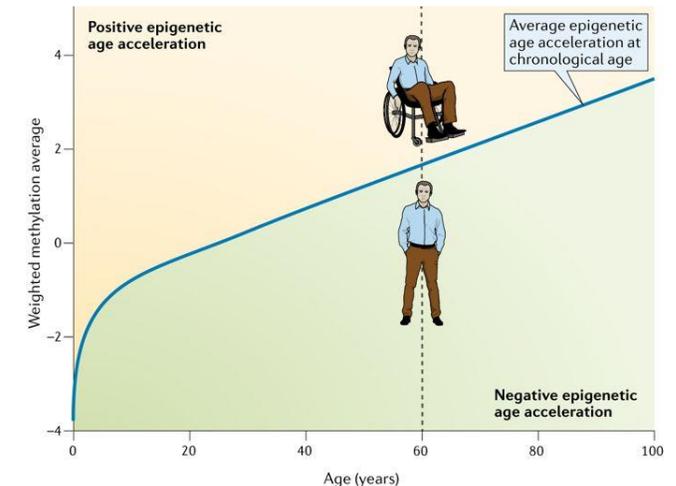
- 実年齢よりも早く進むエピジェネティックな老化は、死亡率の増加と関連している

マウスと用いたメチル化研究でこの分野は加速される

- マウスはヒトより老化が早い
- 環境刺激の影響を、マウスモデルを用いて様々な組織で評価することができる
- 薬理的介入をヒトに適用する前に、マウスを用いて、マウスの老化に影響を与えるかを確認するために、試験を行うことができる



Dr. Horvath's Picture Taken From: https://en.wikipedia.org/wiki/Steve_Horvath
 Author: Joe Bio
 License Information: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>

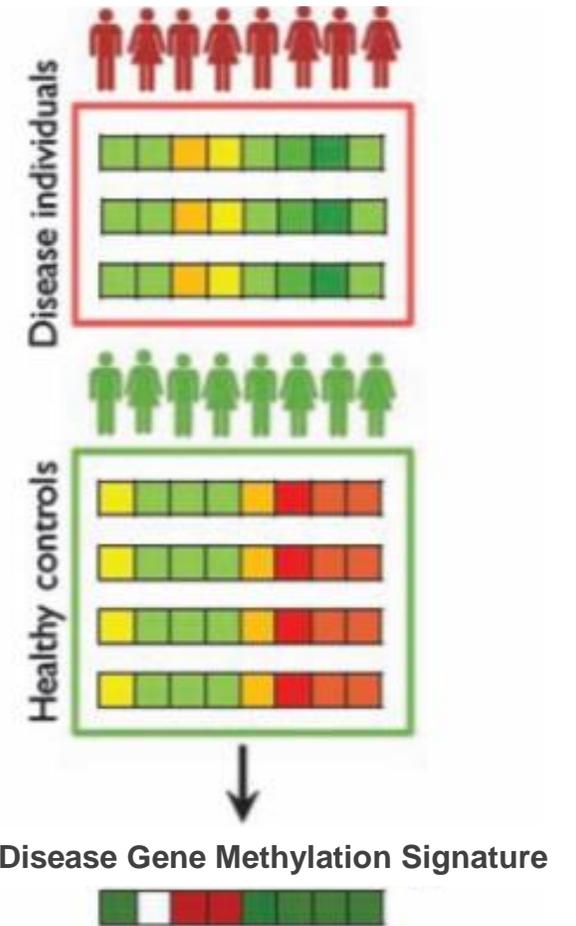


Methylation vs Age Picture Taken From: Horvath, S., and Raj, K., (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing *Nature Reviews Genetics*. 19 371-384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0094-3>

マウスモデルにおける化合物の挙動を予測

- ノックアウト/ノックインマウスは、突然変異によって引き起こされるヒト疾患をシミュレートする
- マウスの疾患モデルがヒトの疾患を正確にモデル化しているかを理解
 - 遺伝子組換えマウスは、標的組織においてヒト患者と同じDNAメチル化シグネチャーを示すのか？
 - 同じシグネチャーを示す場合、その疾患のモデルとして有用である可能性が高い
- 治療薬候補をマウス疾患モデルでスクリーニングし、MMBでプロファイル解析
- 健常人のメチロームを回復させる治療法の能力を分析
 - マウスで得られたプロファイルが、ヒトでも「病気」から「健康」へと同様の移行かを確認するために、Infinium MethylationEPIC(ヒト用)でフォローアップ
 - マウスとヒトの一致を確認することで、特定の治療法の機能についての確証を高める

DNA Methylation Biomarkers of Disease And Therapeutic Response



Adapted from: Sirota, M., et al., (2011). Discovery and Preclinical Validation of Drug Indications Using Compendia of Public Gene Expression Data. *Science Translational Medicine* 3(96):96ra77. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001318.

SUBTITLE

ご注文に関する情報

illumina®

5



カタログ番号と希望販売価格

カタログ番号	製品名		希望販売価格(円)
20041558	Infinium Mouse Methylation BeadChip Kit (24 samples)	キット価格	803,400
		サンプル単価	33,475
20041559	Infinium Mouse Methylation BeadChip Kit (48 samples)	キット価格	1,457,300
		サンプル単価	30,361
20041560	Infinium Mouse Methylation BeadChip Kit (96 samples)	キット価格	2,914,500
		サンプル単価	30,360

ヒトメチル化解析用、Infinium Methylation EPICも合わせてご検討ください

カタログ番号	製品名		希望販売価格(円)
20042130	Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (8 samples)	キット価格	372,400
		サンプル単価	46,550
WG-317-1001	Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (16 Samples)	キット価格	712,400
		サンプル単価	44,525
WG-317-1002	Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (32 Samples)	キット価格	1,295,300
		サンプル単価	40,479
WG-317-1003	Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (96 Samples)	キット価格	3,886,000
		サンプル単価	40,480

2021年8月時点の価格です
価格は税抜きです

SUBTITLE

Questions?

illumina®

