

超高感度ヒトゲノム定量法の 開発とその応用

秋田大学 大学院医学系研究科 医学専攻 形態解析学·器官構造学講座 助教 明石 英雄

2022年3月3日



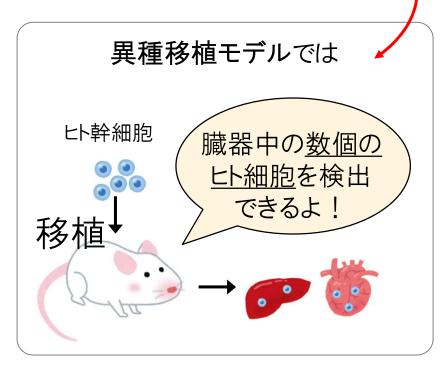
新技術の概要

概要: Alu-qPCR用の新規プライマー/プローブセットや、

それを用いた<u>高感度ヒトゲノムDNA検出方法</u>など

特徴: ①従来技術よりも感度が1,000倍以上高く、

②他生物ゲノムと交叉せず、③断片化DNAも増幅可能







従来技術とその問題点



幹細胞研究者の同僚

異種移植マウスの臓器中の

数個のヒト細胞を





検出したいが、

既存の方法ではうまくいかない・・・



法医学研究者のA先生

古い人骨や土壌中の

微量ヒトゲノムDNAを



定量できれば、

スクリーニングに使えるのに・・・

- ① 検出感度が低い(>数pg)
- ② 条件の悪い試料(他生物ゲノムが多量に混在、DNAが断片化している) での正確な定量ができない



新技術の背景

1. Alu配列

霊長類ゲノムに特異的な反復配列 ヒトゲノム中に100万コピー以上存在

2. Alu-qPCR

既に複数報告 (McBride et al., 2003など)

3. 市販品

既に複数のヒトゲノム検出用キットが市販(標的は不明)

4. 用途

微量のヒト細胞を特異的に検出する必要がある場面

例1)マウス等に異種移植したヒト幹細胞の生着確認

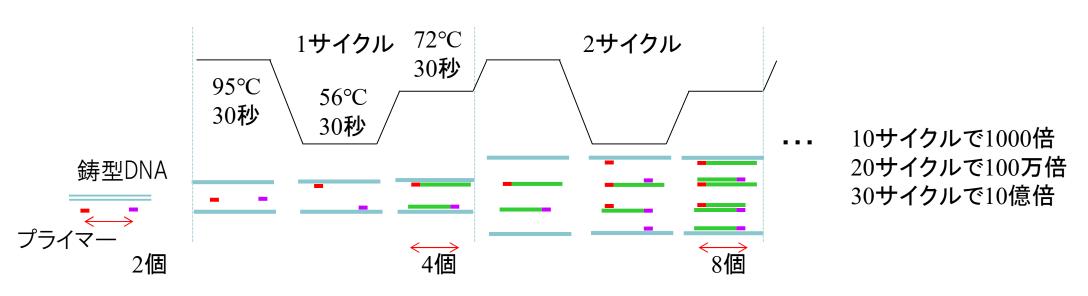
例2) 血液・尿中の循環cell free DNA定量による癌診断

例3) 法医学試料のヒトゲノムDNA定量



背景技術:PCR

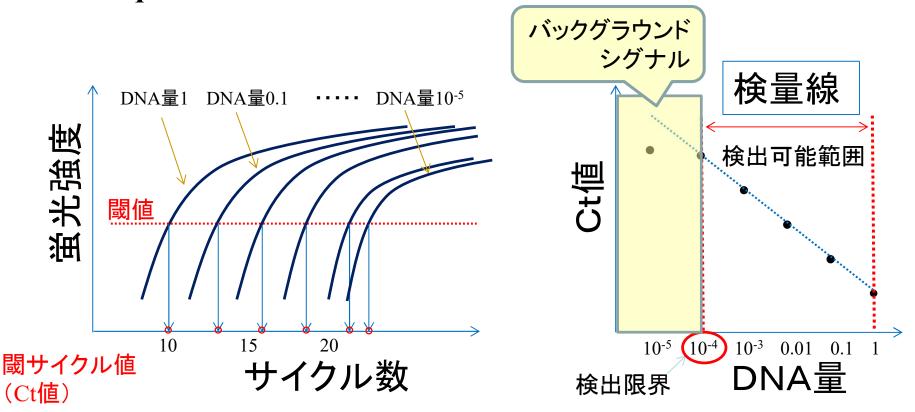
- ・ 遺伝子の特定の領域を増幅する技術
- ・ DNAが低温では2本鎖、高温では変性して1本鎖になる性質を利用
- 以下の物を混合し、温度を変化させてDNAを増幅
 鋳型となるDNA
 2種のプライマー(増幅する塩基配列の両端に相補的な短いDNA)
 DNA合成酵素
- 95°C(変性)、56°C(アニーリング)、72°C(伸長)で1サイクル





背景技術:リアルタイムPCR(qPCR)

- ・ qPCRは遺伝子の定量ができる解析方法
- ・ 増幅配列に結合する蛍光標識プローブにより検出
- 濃度既知のサンプルを用いて検量線を作成して定量
- · qPCRの検出限界=検量線が直線の範囲





Alu配列とは

Alu配列とは・・・

霊長類特異的

SINE(短い散在反復配列)

ヒトゲノム中に100万コピー以上

ヒトゲノム検出の理想的な標的

げつ歯類ゲノムには

Aluに類似した配列(7SL RNA)がある。

プライマー設計には注意が必要!

Left monomer A-rich Right monomer AAA···AAA
7SL RNA由来 AAAAATACAAAAA 7SL RNA由来 polyA



Alu-qPCRの理論的検出限界値

抽出後のゲノムDNA は断片化されている

断片の長さ: 2~5万塩基対

断片の個数: 12~30万

1断片の重量: 0.02~0.05 fg

1断片には1以上のAlu配列が含まれる

qPCRでは3コピー以上で検出が可能

理論的検出感度:0.06~0.15 fg

現状の検出感度:1 pg



新たなプライマー・プローブの 設計クライテリアが必要。



バックグラウンド

バックグラウンドとは 非特異的な蛍光シグナル

原因は

ミスプライミングPCR産物の増幅

プライマー・プローブ間のダイマー形成

標的DNAを含まないDNAサンプル

DNAが含まないサンプル (プライマー・プローブと試薬のみ) ネガコンでも 増幅曲線が 立ち上がる・・・





従来技術とその問題点

従来のプライマー

- ①他生物ゲノムと交叉する
- ②プライマー・プローブダイマーを形成する

独自のクライテリア

バックグラウンドを下げる

ことにより感度を上げる

新しいプライマー

- ①他生物ゲノムと交叉しない
- ②プライマー・プローブダイマーを形成しない

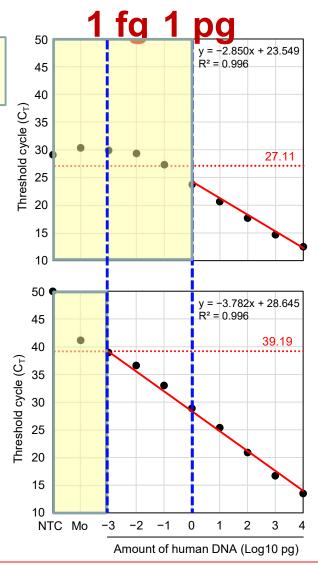


新技術の特徴・従来技術との比較

バックグラウンド シグナル

従来技術

新技術



検出限界 1 pg



検出限界 1 fg

Funakoshi et al. (2017)

従来技術では、分析できない他動物ゲノム混合サンプルや、 小さなDNA断片も定量可能



実用性: 異種移植マウスのヒト幹細胞検出

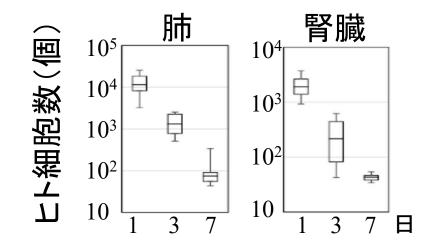


マウス: NOD SCID 7週齢, ♂

N = 6

ヒト間葉系幹細胞(MSC): 50 万細胞を尾静注





これまで検出されなかった移植1週間後で、ヒト細胞が検出された

✓証明した。

発表論文

Funakoshi, K., Bagheri, M., Zhou, M., Suzuki, R., Abe, H., Akashi, H*. (2017) Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. Sci. Rep. 7, 13202. (*: corresponding author)



これまでの異種移植実験の報告

	Lungs	Heart	Spleen	Liver	Nodes	Kidneys	Gut
	Lee et al. 2009 (Ref. 1		7				
1 h	83%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
24 h	42%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%
7 days	<0.01%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%
0 days	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%	~0%

Biju Parekkadan, and Jack M. Milwid. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2010. 12:87–117

既往の報告では、肺において移植1週間後までヒト細胞が 検出されたが、肺以外の臓器では24時間後にはヒト細胞 は検出されない。



古人骨の例

有珠モシリ遺跡で埋葬されていた 縄文時代の古人骨



(Adachi et al., 2006)

湯倉洞窟で発見された古人骨

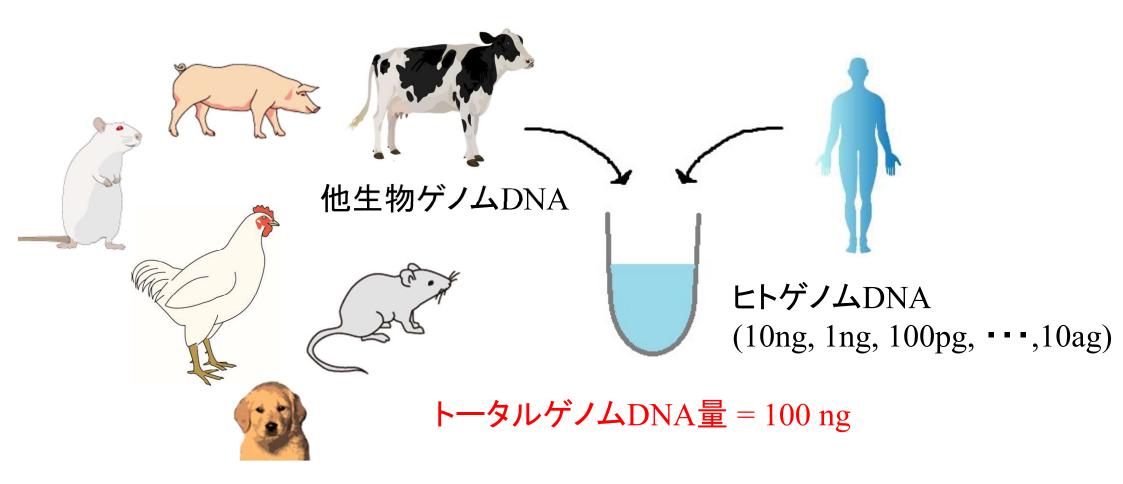


(Adachi et al., 2013)

古人骨中ヒトゲノムDNAは、①極めて微量であり、また②他生物のDNAが混在する可能性が高く、さらに③高度に断片化されている。



他生物DNA混在化でのAlu-qPCR

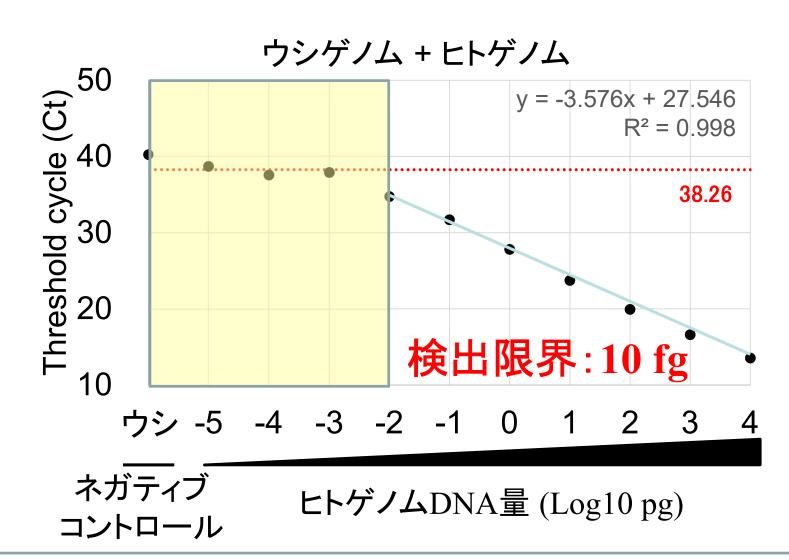


各動物のゲノムDNA溶液によるヒトゲノムDNAの10倍希釈系列を調製し、Alu-qPCRを行った。

^{© 2007} Emi Kosano



他生物DNA混在試料



- ウシ、ブタ、ニワトリ、イヌ、マウス、ラット、ギニアピッグで検出限界1~10fg
- 試料中0.00001%のヒトゲノムを定量的に検出可能



様々な生物ゲノムとの交叉性

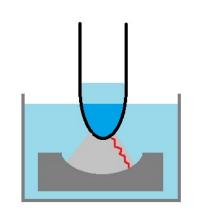
マウス						クマ							ニワトリ					
塩基数	20	19	18	17	16	塩基数	20	19	18	17	16		塩基数	20	19	18	17	16
101F	0	0	0	1	2	101F	0	0	2	0	5		101F	0	0	0	0	C
206R	0	0	1	1	2	206R	0	0	0	1	1		206R	0	0	0	0	C
144RH	0	0	1	2	8	144RH	0	0	0	0	0		144RH	0	0	0	0	C
ラット					ウシ						ブタ							
塩基数	20	19	18	17	16	塩基数	20	19	18	17	16		塩基数	20	19	18	17	16
101F	0	1	0	0	13	101F	0	0	0	0	1		101F	0	0	0	0	2
206R	0	0	0	2	2	206R	0	0	0	0	2		206R	0	0	0	1	1
144RH	0	0	0	2	0	144RH	0	0	0	0	0		144RH	0	0	0	0	C
ギニアピッグ					ウサギ						微生物(9699配列)							
塩基数	20	19	18	17	16	塩基数	20	19	18	17	16		塩基数	20	19	18	17	16
101F	0	0	0	1	1	101F	0	0	0	0	0		101F	0	0	1	2	C
206R	0	0	1	9	9	206R	0	0	0	0	0		206R	0	1	0	50	C
144RH	0	0	1	0	2	144RH	0	0	0	0	0		144RH	0	0	1	13	C

101F: フォワードプライマー 206R: リバースプライマー 144RH: 加水分解プローブ

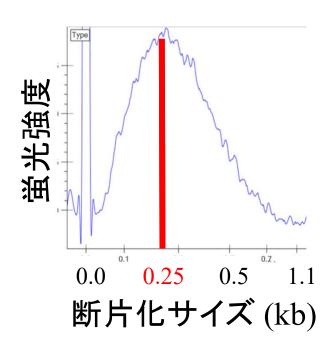
プライマー、プローブ配列と他生物(霊長類を除く)のゲノム配列とは交叉しない

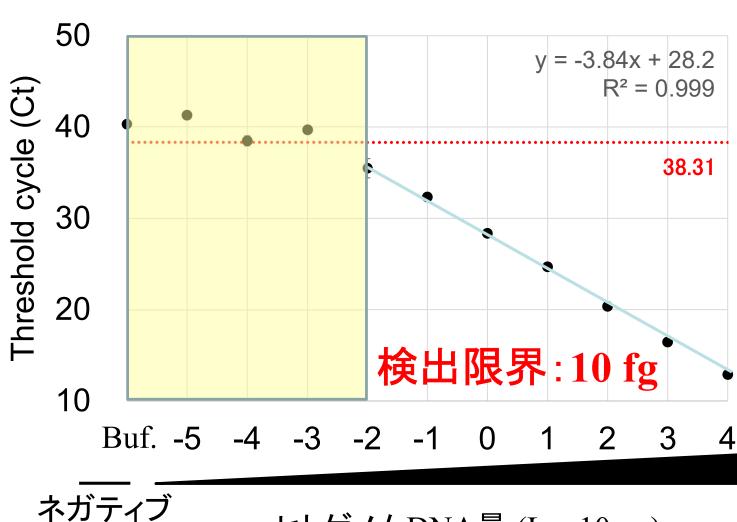


断片化ヒトゲノム(250bp)の検出限界



超音波で断片化



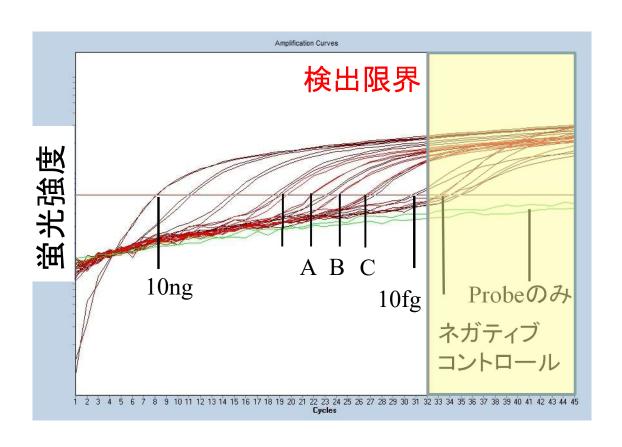


ネガティブ コントロール

ヒトゲノムDNA量 (Log10 pg)



実用性:古人骨



ヒトゲノムDNA濃度

	pg/μL
古人骨A	2.19
古人骨B	0.11
古人骨C	0.61



高度に断片化された微量 ヒトゲノムを定量できた

✓証明した。

学会発表

1. 〇明石英雄、船越広大、周明、鈴木良地、阿部寛、安達登。Alu配列を標的とした定量PCR法による古人骨由来ヒトゲノムDNAの高感度検出法の開発。第123回日本解剖学会総会・全国学術集会。2018年3月28~30日。口頭発表。2. 〇明石英雄、船越広大、鈴木良地、阿部寛、安達登。定量PCR法による陳旧試料中ヒトゲノム検出のためのプライマー・プローブ設計クライテリア。第122回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017年3月28~30日。ポスター発表。



実証データまとめ

試料	検出感度
異種移植マウス	1つの臓器(肝臓、腎臓)中の 数個のヒト細胞を検出
断片化DNA (250bp)	10 fgの感度で定量可能
古人骨	10 fgの感度で定量可能



想定される用途



循環cell free DNA (cfDNA) 定量による癌・敗血症の診断



人類学

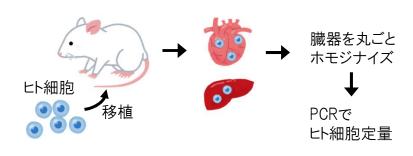
古人骨由来核DNAの解析による 現生人類の父系祖先の探求



基礎医学•生物学

微量の血液・尿

異種移植モデル動物の 初期のヒト癌or幹細胞の検出



法科学

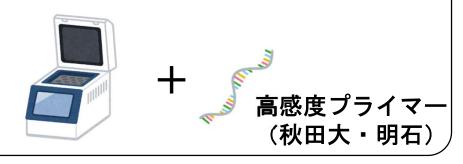
クマ等の獣害における 加害個体の追跡・特定





想定される用途

cfDNA抽出·PCR (N社/P社)



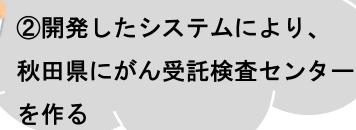


血中cfDNA自動検出 システムの確立



将来的には…

①装置/プライマーを製造し、がん検査装置として販売



自動検出システムを用いて、 がん患者vs健常者血中cfDNAを解析





血液サンプル (秋田大・腎泌尿器科)

血中cfDNAを指標とした 新規がん診断方法を開発



実用化に向けた課題

現在、ヒトゲノム検出技術は完成していると考えている。しかし、様々な想定される用途における有用性が未解決である。

・ 今後、癌診断について実験データを取得し、 体外診断用医薬品に適用していく場合の条件 設定を行っていく。



企業への期待

- 本技術の、ヒトゲノム検出用試薬としての製品 化を希望。
- 本技術のアプリケーションが有用である企業 との共同研究を希望。
- ・希少なヒトゲノムの、高価な解析(次世代シーケンスなど)の前のスクリーニング、ヒトゲノムフリー環境における品質管理等を行う企業に、本技術の導入が有効と思われる。



国際調査機関の見解書(平成30年2月27日)

1.	見解			
	新規性 (N)	請求項 請求項	1-23	
	進歩性(IS)	請求項 請求項	1-23	
	産業上の利用可能性(IA)	請求項請求項	1-23 	

何れの文献にも、本願請求項1のクライテリアを全て満たすヒトAlu 検出用 PCR プライマー対の設計方法や、ヒトAlu 検出用 PCR プライマー対、本願請求項17のヒトAlu 検出用 PCR プローブ等は、記載されていない。そして、ヒトゲノムとマウスゲノムが混合されたサンプルでのヒトゲノムの検出感度が1pg程度であるのに対し、本発明は、同サンプルでのヒトゲノムの検出感度が1fg程度という顕著な効果が認められる。

全ての請求項で、新規性、進歩性が認められた。審査官の意見も付されなかった。



本技術に関する知的財産権

・発明の名称:ヒトゲノムDNA検出法

• 特許番号 : 第6892695号

• 登録日 : 令和3年6月1日

• 出願番号:特願2018-554221

• 出願人 : 国立大学法人秋田大学

• 発明者 :明石英雄、船越広大



産学連携の経歴

- 2017年 JST イノベーション・ジャパン2017に採択
- 2017年 JST 知財活用支援事業 大学等知財基盤 強化支援(権利化支援)に採択
- 2018年-2019年 J社(海外企業)と共同研究実施
- 2020年-現在 N社/P社(国内企業)と共同研究実施
 2020年 秋田県 社会課題解決型研究支援事業に採択
 2021年 JST A-STEPトライアウトタイプに採択



お問い合わせ先

秋田大学 產学連携推進機構 特任助教 高橋 朗人

TEL 018-889-2712

FAX 018-837-5356

e-mail staff@crc.akita-u.ac.jp