QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いた競走馬での遺伝子ドーピング検査系樹立に向けたマイクロミニブタ検査モデル系検討

Key words :遺伝子ドーピング, ドーピング検査, モニタリング, Liquid biopsy, 微量遺伝子分析

Research Background

近年、特にオリンピックやスポーツ競技などの分野では運動能力の向上、筋肉増強、神経興奮作用など様々な目的で、主に薬剤を用いたドーピングが大きな問題となっていますが、その歴史は非常に古く、既に古代ギリシャ時代の競技者での使用例が報告されています。また人への使用に留まらず、19世紀初頭のヨーロッパでは競走馬に対して麻薬や覚せい剤などの興奮剤を用いたドーピングが行われていたことが知られています。

ドーピングはスポーツ分野に於けるフェアプレイ精神やスポーツ価値の毀損、また競技者の心身に与える悪影響の観点より厳しく禁止されており、人のみならず競走馬への使用に関しても公営競技における公正性の維持や動物愛護の観点も含め、その使用が固く禁止されています。厳密なドーピング検査のため、検査方法の発展や高感度化の努力がなされてきましたが、一方で検出回避を目的とする利尿剤の併用や、検出が難しい遺伝子工学を応用した生体由来の遺伝子ドーピング、あるいは改変遺伝子を用いた遺伝子ドーピングといった新たなドーピングも出現しています。

従って、この様な新たなタイプの遺伝子ドーピングに対する検査方法の開発は、スポーツ分野をはじめ様々な分野で重要で喫緊の課題として浮かび上がっています。

Content

今回公益財団法人競走馬理化学研究所 遺伝子分析部の戸崎晃明 先生のグループがBMC Research Notes誌でご報告された ドロップレットデジタルPCRを用いたマイクロミニブタでの遺伝子ドーピング検出モデル系の確立についてご紹介します。

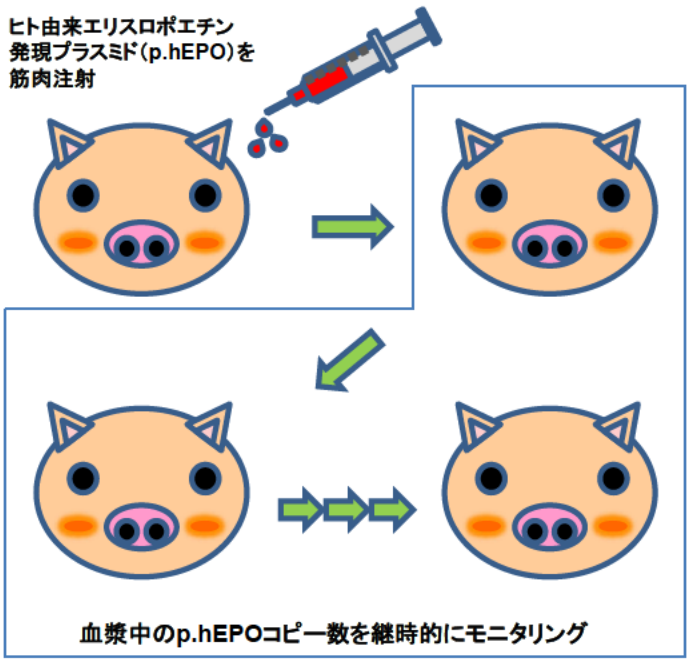


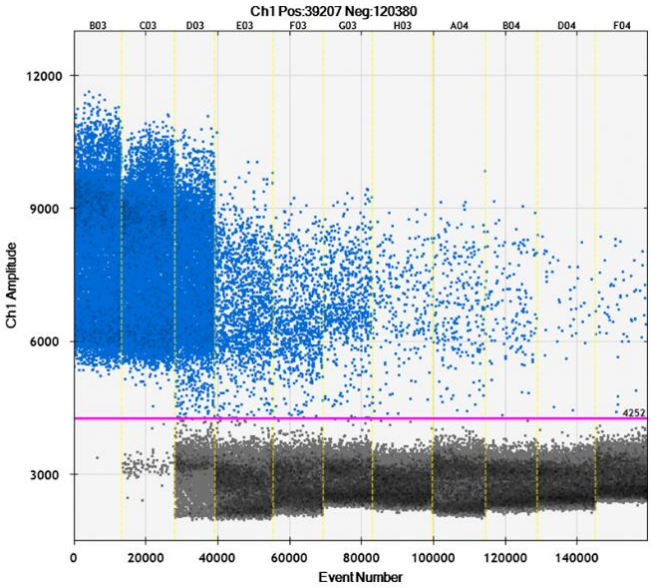
図1 マイクロミニブタを用いたQX200 ddPCRによるヒト エリスロポエチン発現プラスミド投与後の血中クリアランス測定系の模式図
エリスロポエチン(EPO)は、赤血球分化に関わる液性因子であり、通常は大部分が腎臓で作られていますが、エリスロポエチン発現プラスミドを遺伝子ドーピングすることで、末梢血中の赤血球数を増加させ、酸素供給量が増加することにより持久力が向上することが考えられています。このため、競走馬における遺伝子ドーピングの対象遺伝子として考えられています。そこで今回は、まずマイクロミニブタでのヒト由来エリスロポエチン発現プラスミド(p.hEPO)を用いたドーピングモデル系におけるddPCRを用いた検出系樹立と評価を行いました。

今回ご紹介する文献のデータよりQX200 Droplet Digital PCR (ddPCR)を用いた絶対定量による遺伝子コピー数検出は、大変有用であり、下記の利点もあげられます。

Application Advantages

- PCR反応阻害物質を含む生体由来サンプルの測定に於いても、安定して低コピー数領域での測定が可能
- 長期間にわたる分析プロジェクトにおいても、インターナルコントロール枯渇によるデータ比較の分断が起きない
- 遺伝子ドーピング検査系開発だけに留まらず、遺伝子治療時のモニタリング、臓器移植後の生着モニタリングや環境分析・モニタリングなどへの応用も可能

(A)



(B)

Collection time	Copies in 1 mL of plasma
15 min	2.52×10^6
6 h	1.34×10^6
1 day	2.89×10^5
2 days	2.48×10^4
3 days	1.55×10^4
4 days	1.32×10^4
5 days	3.80×10^3
6 days	4.25×10^3
7 days	2.52×10^3
2 weeks	698
3 weeks	1.06×10^3

図2　ddPCRによる血漿中のp.hEPOベクター濃度の検出
生後8週齢のマイクロミニブタ(♂)に250ugのヒトエリスロポエチン発現プラスミド(p.hEPO)を筋肉注射後、投与後15分、6時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、2週間、3週間後に血漿 約100ullに相当する血漿由来のセルフリーDNA(cfDNA)を用いて残存するp.hEPOベクターのコピー数をQX200 ddPCRにより絶対定量した。各タイムポイントでの生データ(A)。 各タイムポイントでの血漿1ml換算中に残存するp.hEPOベクターのコピー数(B)。3週間経過後も血漿1ml当り1000個程度のp.hEPOプラスミドの検出が観られました。

Conclusion

今回の論文により、マイクロミニブタを用いたエリスロポエチンの遺伝子ドーピング検出モデル系を確立するとともに、生体内中でのドーピングされた外来遺伝子の動態についての詳細な知見を長期にわたって得ることが出来ました。今回の知見を元に、競走馬とマイクロミニブタの体重比較による換算値を用いることで、更に競走馬でのエリスロポエチン遺伝子ドーピング検出系樹立ができる事が期待されます。

※ 本資料作成に当たり、公益財団法人競走馬理化学研究所 遺伝子分析部の戸崎 晃明 先生よりデータをご提供頂いております。

Publication

Digital PCR detection of plasmid DNA administered to the skeletal muscle of a microminipig: a model case study for gene doping detection

Teruaki Tozaki, Shiori Gamo, Masaki Takasu, Mio Kikuchi, Hironaga Kakoi, Kei-ichi Hirota, Kanichi Kusano and Shun-ichi Nagata

BMC Res Notes. 2018 Oct 10;11(1):708.

Related Articles

- **Transgene detection by digital droplet PCR.**
Moser DA, Braga L, Raso A, Zacchigna S, Giacca M, Simon P. ***PLoS One.*** 2014 Nov 6;9(11):e111781. ドーピング
- **Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury.** Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Schmitz J, Gaedcke J, Moerer O, Slotta JE, Walson P, Kollmar O, Oellerich M, Schütz E. ***Clin Chem.*** 2013 Dec;59(12):1732-41. 臓器移植、モニタリング
- **Both absolute and relative quantification of urinary mRNA are useful for non-invasive diagnosis of acute kidney allograft.**
Seo JW, Moon H, Kim SY, Moon JY, Jeong KH, Lee YH, Kim YG, Lee TW, Ihm CG, Kim CD, Chung BH, Kim YH, Lee SH. ***PLoS One.*** 2017 Jun 27;12(6):e0180045. 臓器移植、モニタリング
- **Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study.**
Schütz E, Fischer A, Beck J, Harden M, Koch M, Wuensch T, Stockmann M, Nashan B, Kollmar O, Matthaei J, Kanzow P, Walson PD, Brockmöller J, Oellerich M. ***PLoS Med.*** 2017 Apr 25;14(4):e1002286. 臓器移植、モニタリング
- **Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys.**
Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsuhashi S, Yamanaka H, Minamoto T. ***PLoS One.*** 2015 Mar 23;10(3):e0122763. 環境分析関連

論文検索サイト

ddPCRを用いた論文の検索サイトはこちら（**www.bio-rad.com/ddPCR/publications**）

BIO-RAD　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　取扱店

ライフサイエンス　www.bio-rad.com
本　社　〒140-0002　東京都品川区東品川 2-2-24　TEL：03-6361-7000
大阪営業所　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11　TEL：06-6308-6568
福岡営業所　〒812-0013　福岡市博多区博多駅東 2-5-28　TEL：092-475-4856
※学術的お問い合わせは　TEL：03-6404-0331

※価格(税抜き)、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2019年6月現在のもので、メーカー希望小売価格 (税別) です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C12105L 1907a