

非薬剤選択によるTALEN、CRISPR/Cas9を用いた点変異ゲノム編集 iPS細胞株樹立のQX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いた新スクリーニング法

Key words : iPS, CRISPR/Cas9, TALEN, ゲノム編集, 安定株(Stable Clone)

Research Background

近年登場したTALENやCRISPR/Cas9システムといったゲノム編集法とiPS細胞を組み合わせた疾患の原因究明や治療法開発が盛んに行われていますが、ゲノム編集iPS細胞とコントロール細胞(未編集iPS細胞)を比較することで、『コントロール細胞を何にするのか』、また『バイオロジカルレプリケートとしてN数を何例設定すれば良いか』といった難しい問題に、より理想的な解決策が提示できるようになってきました。一方で、TALENやCRISPR/Cas9システムといったゲノム編集法を用いても、正確な編集が得られる組み換えDNA修復が起きる頻度は低く、その結果得られるゲノム編集クローニング作製効率は非常に低くなるという問題点がありました。

この課題を克服するためには、一般的に薬剤を用いたセレクションが行われますが、薬剤自体がiPS細胞の多能性や造腫瘍性などに悪影響を及ぼす可能性や、ゲノムに挿入される薬剤耐性遺伝子やloxP配列などが遺伝子機能を阻害する可能性が考えられることから、薬剤の使用は極力控えたいところです。

Content

今回東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト 宮岡佑一郎先生がグラッドストーン研究所在籍時にNature Methods誌でご報告された QX droplet digital PCR (ddPCR)と酵母の遺伝学由来のSib-selection法を組み合わせた薬剤を用いない新たなスクリーニング方法についてご紹介します。

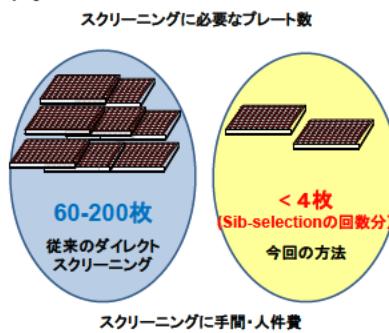


図1 従来のダイレクトセレクション法との比較

Application Advantages

- コスト(培地、プレート、培養スペース、手間・人件費)の大幅削減
- iPS細胞に悪影響のある薬剤選択が不要
- 1度に多種類のゲノム編集株スクリーニングが可能
- スクリーニング過程で正しいゲノム編集率の把握が可能(実験の成功失敗の途中経過を追跡可能)
- 一般的なタンパク発現安定株樹立時のスクリーニングにも応用可

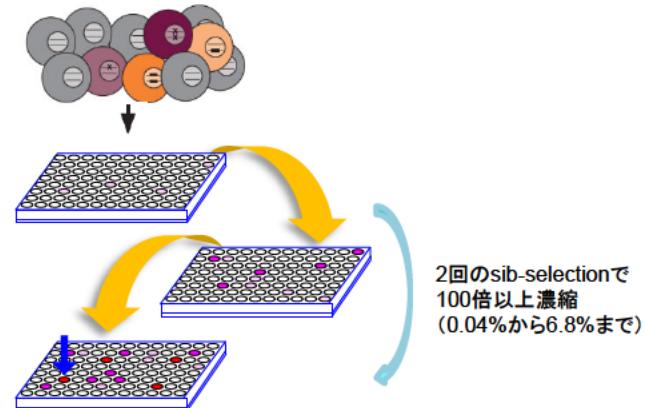


図2 新たなスクリーニング方法によるゲノム編集クローニングの濃縮
薬剤選択を用いることなく非常にアラクローンの存在をddPCRを用いて検出した。わずか2回のsib-selectionにより目的の細胞濃度を0.04%から6.8%まで高めることができた

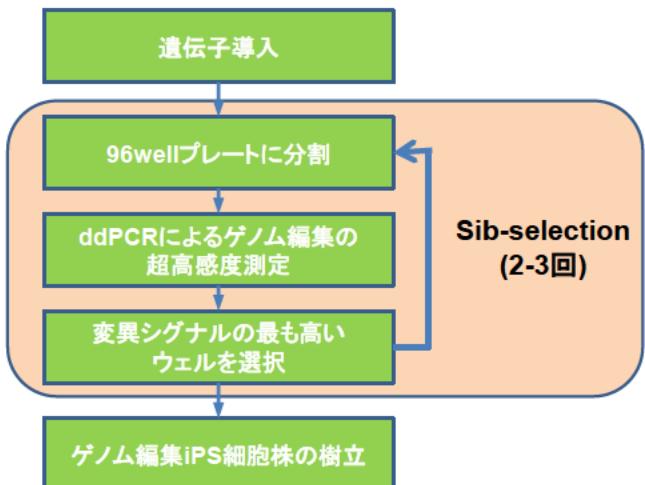
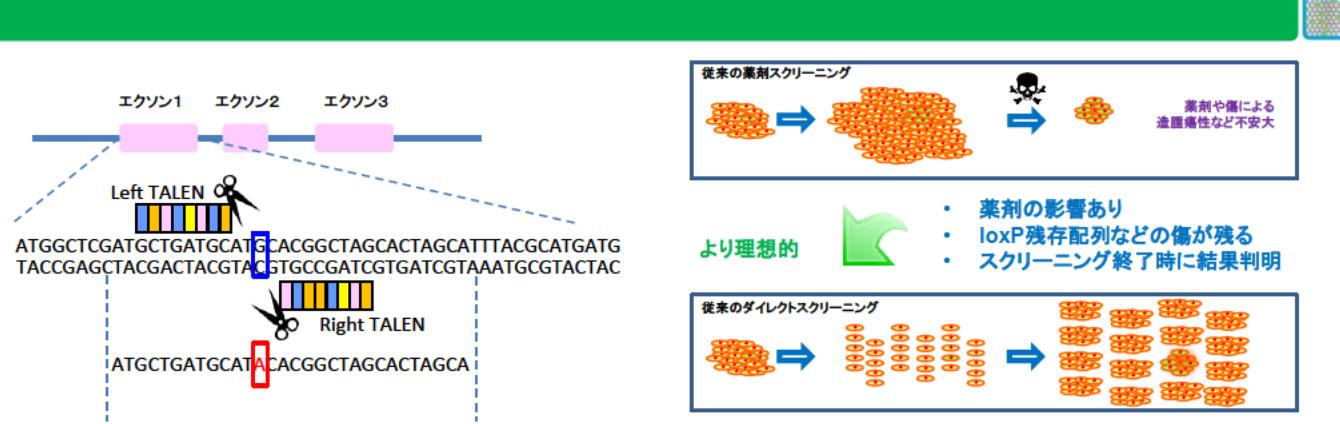


図3 今回のスクリーニング方法の概要
薬剤選択を行った場合はloxP配列などがゲノム上に残るため、遺伝子の機能を解析する実験などでは懸念材料となりえる。またダイレクトセレクションでは膨大な時間と手間を必要とする。本法は両者の懸念事項を回避する事が可能である。



Forward Primer WT probe
ATGGCTCGATGCTGATGCATGCAACGGCTAGCACTAGCATTACGCATGATG
TACCGAGCTACGACTACGTACGTGCCGATCGTACGTAAATGCGTACTAC

Reverse Primer

Forward Primer Mutant Probe
ATGGCTCGATGCTGATGCATGCAAGGGCTAGCACTAGCATTACGCATGATG
TACCGAGCTACGACTACGTACGTGCCGATCGTACGTAAATGCGTACTAC

Reverse Primer

図4 ゲノム編集を検出するためのプローブ設計

本法ではTALENを用いて点変異ゲノム編集を行っている。変異の確認には加水分解プローブを用いたddPCRアッセイにより、その存在比率を決定した。上記はその模式図である。他の手法では0.04%の存在比率からターゲットの遺伝子を検出することは困難である。

Conclusion

今回の論文により、多分化能低下や造腫瘍性の増大といった悪影響を与える可能性のある薬剤を使用せず、かつ目的ゲノム編集部位以外にゲノム上に全く傷を残すこと無くゲノム編集iPS細胞株を樹立する方法が確立されました。

本法の開発により、ゲノム編集技術とiPS細胞、またはMSCに代表される体性幹細胞を用いた再生医療技術を組み合わせた遺伝子治療の実現に向けてハードルとなるこれらの懸念点が払拭されると同時に、従来法であるダイレクトスクリーニング法を用いた場合に必要とされる手間や時間の大幅削減が可能となりました。その意味で、本法が再生医療・遺伝子治療の発展に与える影響は計り知れません。

また今回の新しいスクリーニング方法確立には、リアルタイムPCRなどでは検出が難しかった1%以下のレアミューテーション検出が安定的に、しかも96wellフォーマットで可能なQX Droplet Digital PCR (ddPCR)の存在が不可欠であったことは言うまでもありません。

※ 本資料作成に当たり、東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト 宮岡佑一郎先生より監修を頂いております。

Publication

[Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection](#)

Yuichiro Miyaoka, Amanda H Chan, Luke M Judge, Jennie Yoo, Miller Huang, Trieu D Nguyen, Paweena P Lizarraga, Po-Lin So & Bruce R Conklin

Nat Methods. 2014 Mar;11(3):291–3

Related Articles

- Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing
Yuichiro Miyaoka, Jennifer R. Berman, Samantha B. Cooper, Steven J. Mayerl, Amanda H. Chan, Bin Zhang, George A. Karlin-Neumann & Bruce R. Conklin *Scientific Reports* 6, Article number: 23549 (2016) doi:10.1038/srep23549

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)



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1-2-24 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

※学術のお問い合わせは 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7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。

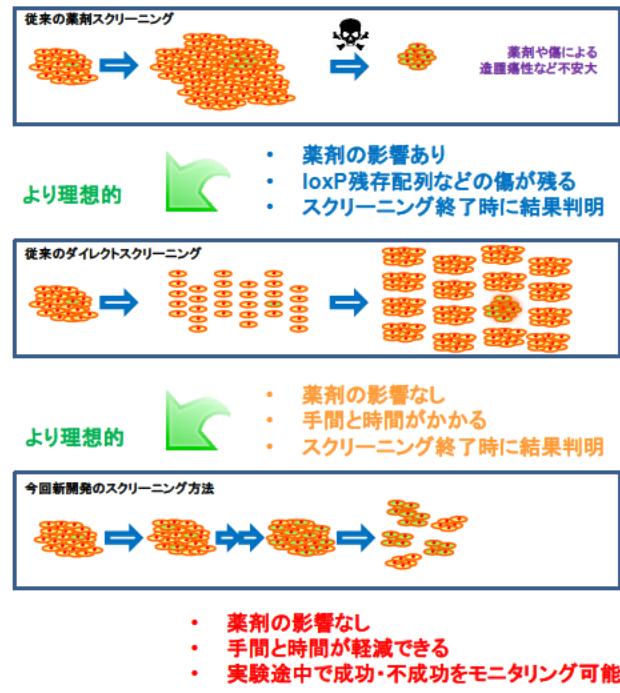


図5 従来法との詳細比較について

本法と薬剤スクリーニング法、ダイレクトスクリーニング法との違いの詳細を記載した。本法では薬剤の影響、loxP配列などの残存、最終的な判定が最後までわからない点、スクリーニングの手間と時間などの懸念点をすべて取り除くことができる。

- 薬剤の影響なし
- 手間と時間が軽減できる
- 実験途中で成功・不成功をモニタリング可能