シングルセルドロップレットデジタルPCR法（sc-ddPCR法）の確立と幹細胞遺伝子治療後の遺伝子導入細胞の生着率解析

Key words : シングルセル解析, 幹細胞遺伝子治療, lineage mapping

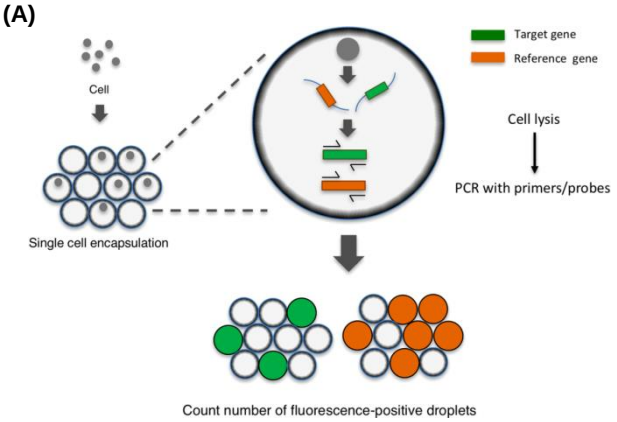
Research Background

アデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA欠損症）は、20番染色体q13.11にあるADA遺伝子の変異が原因で発症する原発性免疫不全症です。ADA欠損症は生後より重篤な免疫不全状態を招きます。この疾患ではアデノシンデアミナーゼの機能が失われているため、デオキシアデノシンをデオキシイノシンに変換することができません。この結果デオキシアデノシンのリン酸化産物であるデオキシアデノシン三リン酸(dATP)が細胞内に蓄積し未熟なリンパ球の障害を引き起こしてしまいます。治療は酵素補充療法（PEG-ADA）や造血幹細胞の移植が行われています。造血幹細胞を用いた遺伝子治療はこれらの代替法として研究されてきました。

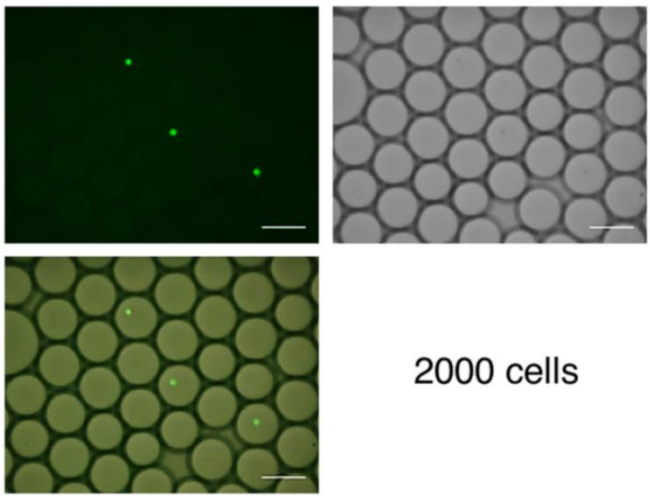
Content

今回、国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部 五十嵐友香先生、内山 徹先生、小野寺 雅史先生らのグループがMolecular Therapy Methods & Clinical Development誌でご報告されたアデノシン デアミナーゼ欠損による重症免疫不全症（ADA-SCID）患者の遺伝子導入造血幹細胞移植後におけるシングルセルドロップレットデジタルPCR法（sc-ddPCR法）の確立と幹細胞遺伝子治療後の遺伝子導入細胞の生着率解析についてご紹介します。

(A)



(B)



(C)

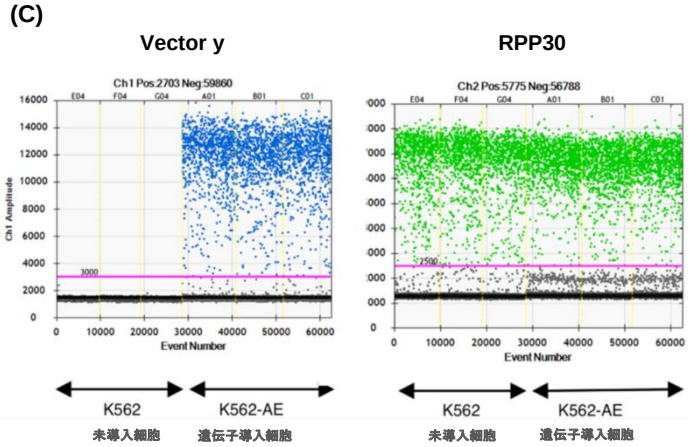


図1　直接ドロップレット包埋によるシングルセルddPCR（sc-ddPCR）法の原理

(A). ターゲット遺伝子が導入された細胞を含む細胞懸濁液をddPCR反応液に加えてドロップレット作製することで、シングルセルでの解析を行う。 (B). 1反応中に2,000細胞を加える事で1ドロップレット内に1細胞が含まれる状態になる事を確認。評価にはADA遺伝子とGFPを同時発現するK562-AE細胞を使用。 (C).sc-ddPCRの結果。アデノシンデアミナーゼが導入された細胞(K562-AE)ではベクターとリファレンス遺伝子両方の蛍光が得られている。

Application Advantages

- 遺伝子治療後の導入細胞及び導入細胞由来の子孫細胞の占有率、および導入細胞の特定細胞lineageへの分化・補充貢献率の測定にsc-ddPCR法が有用である
- 細胞のソーティングやゲノム抽出などの複雑な手順無しで1細胞毎に導入された遺伝子の有無を解析できる
- 遺伝子導入細胞 / ゲノム編集細胞などを用いたシングルセル解析への応用も期待できます

BIO-RAD

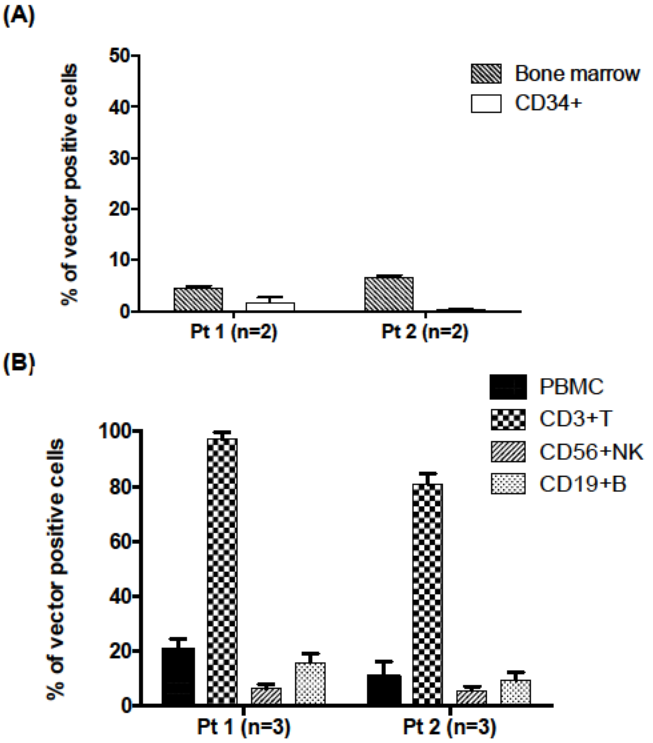


図2　骨髄細胞およびCD34 陽性細胞におけるベクター陽性細胞の比率(A)と末梢血球の各分画におけるベクター陽性細胞の比率(B)
(A).ADA遺伝子を導入したCD34陽性造血幹細胞（HSC）を用いた幹細胞移植治療を受けた患者（Pt1及びPt2）における赤血球溶解処理後の骨髄細胞中、及びCD34陽性造血幹細胞中におけるADA遺伝子導入細胞の残存率測定結果。（B）末梢血単核球（PBMC）中、及びPBMCから、CD3, CD56, CD19陽性を指標に精製したT細胞, NK細胞, B細胞画分中におけるADA遺伝子導入細胞の割合の測定結果

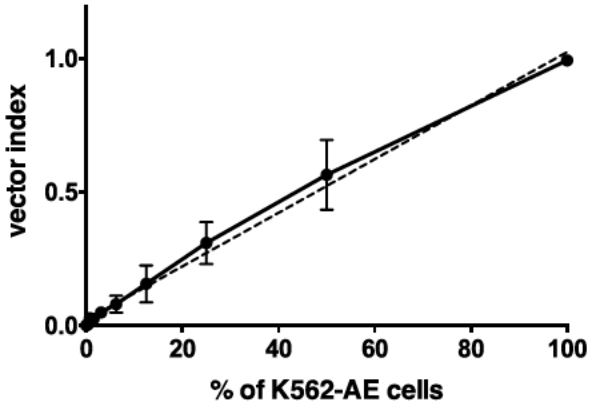


図3　K562-AE細胞と親株であるK562細胞を用いたsc-ddPCR法の評価
遺伝子未導入のK562細胞に、様々な濃度で遺伝子導入細胞K562-AEをスパイクして加え、ターゲット遺伝子としては、ウィルスパッケージングシグナル（ψ）、リファレンス遺伝子としてRPP-30を用いてsc-ddPCR法による測定を行いました。Vector index = (2*vector-positive signal) / (RPP30-positive signal) ゲノムDNAのddPCRによるK562-AE細胞の比率

Conclusion

sc-ddPCR法を確立したことでこれまで測定が煩雑であった遺伝子治療後の遺伝子導入細胞の生着率を簡便に検出するできるようになりました。遺伝子治療後の遺伝子導入細胞の分布を詳細に評価できるため治療方針の判断に有益な情報が得られると考えられます。

※ 本資料作成に当たり、国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部 五十嵐 友香先生，内山 徹先生、小野寺 雅史先生よりデータをご提供頂いております。

Publication

Single Cell-Based Vector Tracing in Patients with ADA-SCID Treated with Stem Cell Gene Therapy

Yuka Igarashi, Toru Uchiyama, Tomoko Minegishi, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Masafumi Onodera.

Mol Ther Methods Clin Dev. 2017 May 25;6:8-16.

Related Articles

- **Precise Quantitation of MicroRNA in a Single Cell with Droplet Digital PCR Based on Ligation Reaction.**
Tian H, Sun Y, Liu C, Duan X, Tang W, Li Z. ***Anal Chem.*** 2016 Dec 6;88(23):11384-11389.
- **Multiplexed Single Intact Cell Droplet Digital PCR (MuSIC ddPCR) Method for Specific Detection of Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) in Food Enrichment Cultures.**
McMahon TC, Blais BW, Wong A, Carrillo CD. ***Front Microbiol.*** 2017 Mar 2;8:332. doi: 10.3389/fmicb.2017.00332. eCollection 2017.

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。

C12126L 1907a