

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04062

研究課題名(和文) リキッドバイオプシーを用いた非侵襲的な遺伝子ドーピングの革新的な検出法開発

研究課題名(英文) In search of analytical method for genetic testing

研究代表者

竹越 一博 (TAKEKOSHI, KAZUHIRO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40261804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：現在、遺伝子ドーピングは、その検出は非常に困難であり、確立された検出方法が世界的にみても存在しないことは極めて問題である。今回、遺伝子ドーピングの非侵襲的な検出法として、リキッドバイオプシーの概念を応用を検討した。ヒトのエリスロポエチン遺伝子(hEPO)をアデノウイルス組み込みマウスに静脈注射し、実際に赤血球が増加するモデルを作成した。本モデルにおいても定量PCR(qPCR)により末梢血の血球分画から外因性hEPOを検出できた。さらに末梢血からのRNAを用いてRNA-seqを施行し、多数の高感度なRNAマーカーを同定できた。リキッドバイオプシーの有効性を証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子ドーピング」は、遺伝子編集技術の登場により実用化が非常に懸念されている。対策として、がんゲノムで利用されている「リキッドバイオプシー」を最適な検査法として研究を進めている。他方で「遺伝子ドーピングそのもの」と「その検出法の開発」は様々な倫理的問題を内包しており、検出法の実装に至る前にスポーツ倫理を初めとする学際的な議論が必要である。アスリートの遺伝子ドーピング獲得を目指したアンチ・ドーピング活動強化にもつなげたい。「遺伝子ドーピング」が研究されてすでに検出可能であるということを、学術的に世に知らしめるだけでも遺伝子ドーピングの抑止力になる。

研究成果の概要(英文)：An increase in research on gene therapy since the early 2000s led the World Anti-Doping Agency (WADA) to raise concerns about the abuse of gene therapy technology for doping. However, the development of methods to identify gene doping remains obscure. To address this question, the present study was performed with following two objectives:1) to develop a robust gene-doping mouse model with the human EPO gene (hEPO) transferred using recombinant adenovirus (rAdV), 2) to develop a detection method to identify gene doping by using this model. 1) rAdV including the hEPO gene was injected intravenously. After injection, the mice showed significantly increased RBC. 2) Gene doping were evaluated in whole-blood DNA and RNA by using a quantitative PCR assay and RNA sequencing, respectively. Confirmation of doping could be detected from these samples for a month; furthermore, the overall RNA expression profiles showed significant changes, allowed us detect hEPO gene doping.

研究分野：運動生理

キーワード：遺伝子ドーピング リキッドバイオプシー cf DNA

1. 研究開始当初の背景

初めに

アスリートが自己の競技能力を向上するために、薬物や方法を不正に使用することをドーピングという。ドーピングを禁止するためには、ドーピングを定義して禁止する国際的な統一ルールが必要である。国際的なアンチ・ドーピング活動は1960年代から国際オリンピック委員会 International Olympic Committee (IOC) や各国際競技連盟が中心になって行ってきた。他方、アンチ・ドーピング活動は独立した組織が中立の立場で一元的に行うべきであることから、1999年に世界アンチ・ドーピング機構 (World Anti-Doping Agency (WADA)) が設立され、それに伴い WADA の世界アンチ・ドーピング規程 (世界規程) が作成された。

同規程には、何がアンチ・ドーピング規則違反行為になるのか定められているが、最も典型的には、アスリートから採取した血液や尿検体を分析することで、禁止物質を特定することが挙げられている。禁止物質や禁止方法については「禁止表国際基準」(Prohibited List International Standard、以下、禁止表)に、具体的に記載されている。

他方、分析機器の感度向上、新規測定機器の開発など検査法の進歩を積極的に取り入れ、様々な禁止物質や禁止法の検出法が開発された現在においても、検査で検出困難な不正使用される新規薬物や、検査をすり抜ける方法が問題になっている。新規検査法が開発されると、検査をすり抜ける方法が用いられ、まさにイタチごっこである。特に検出法がないため、最近問題されているのは「遺伝子ドーピング」である。

「遺伝子ドーピング」についての概要:「遺伝子ドーピング」は、ゲノム編集技術の登場により不正利用が非常に懸念されている。遺伝子ドーピングは治療を目的としない競技力向上が目的(エンハンスメント)の人体における遺伝子改変である。従って、遺伝子操作を行った組織にのみ改変遺伝子が発現し、これまでは血液や尿からは検出が不可能とされていた。当然、アスリートから遺伝子検査目的で筋生検をはじめ各種の組織生検を行う事は、侵襲性が高く事実上不可能である。

現在、いくつかの遺伝子ドーピング検査法の研究が進められている。特に、がんゲノム研究で利用されている血中 cell free DNA (cfDNA)を用いる体細胞変異の非侵襲的検出技術「リキッドバイオプシー」の応用は極めて有用と思われる。

2. 研究の目的

アンチ・ドーピング活動の重要性、さらに喫緊な遺伝子ドーピング対応が必要な理由

21世紀を迎えヒトゲノムが解析されて以降、スポーツ界でも遺伝子操作を援用したドーピング、いわゆる「遺伝子ドーピング」に対して懸念が高まった。2003年には、そのような懸念を背景に世界アンチ・ドーピング機構(World Anti-Doping Agency, WADA) が策定している「禁止表」に、遺伝子ドーピングが「禁止されるべき方法: M (method)」として組み込まれた。2012年以降「CRISPR/Cas9」というゲノム編集技術が登場し、当技術がスポーツ界において遺伝子ドーピングとして悪用される懸念が年々高まっている。実際、2018年に WADA はこのゲノム編集技術を用いた遺伝子ドーピングを、禁止事項(M3)として追加・明記したことから明らかである。

現在、遺伝子ドーピングは、その検出は非常に困難であり、確立された検出方法が世界的にも存在しないことは極めて問題である。ゲノム編集技術の不正な使用を含めた遺伝子ドーピングの検出法を確立することは急務である。

「遺伝子ドーピング」とは さらにその検出の困難さについて

「遺伝子ドーピング」の1つに、治療を目的としない競技力向上が目的（エンハンスメント）の体細胞操作がある。この体細胞操作とは、遺伝子治療と同様に、ある組織に限定して人為的に変異を導入することで、後天的な変異つまり体細胞変異を作ることである。理論的には、体細胞変異を導入した組織にのみ「ベクター及び外因性遺伝子」が限局して発現しているため、血液や尿からは検出が不可能で遺伝子ドーピングの探知は困難である。他方、現役のアスリートから遺伝子検査目的で筋生検や組織生検を行う事は、侵襲性を考えると事実上不可能であることから、非侵襲的、あるいは侵襲度が低い検体（血液や尿）を用いた遺伝子ドーピングの検出法開発が是非必要である。

3. 研究の方法

検査能の優れた非侵襲的な遺伝子ドーピングの検出法開発 -リキッドバイオプシーのコンセプトの応用-

リキッドバイオプシーとは、ガン¹の遺伝子診断の方法で、従来の生検による腫瘍組織を用いることなく、血液・尿中の体液の情報を用いた診断法をさす。特に腫瘍由来の cfDNA (cell-free circulating DNA=cfDNA)を用いて、組織に特異的な後天的な遺伝子変異(体細胞変異)を確認する手法が最も有名である。(表,1)。腫瘍組織からは常に体細胞変異を起こした腫瘍細胞が産生されて、その一部は cfDNA として流血中に放出されていることから、それらを用いて ddPCR (デジタル PCR ; Droplet Digital PCR)や NGS (次世代シーケンシング)により解析して、腫瘍の診断や治療効果の判定に用いられる。例えば肺癌の診断では、以前は侵襲的な開胸手術や肺生検を行い肺癌腫瘍組織から DNA を得ていたが、最近は様々な遺伝子改変を、リキッドバイオプシーによる末梢血からの cfDNA を利用することで、侵襲的な手技なしで反復して得られることから既に実用化されている(図-1)。

以上から検査能力の優れた遺伝子ドーピングの非侵襲的な検出法としては、リキッドバイオプシーの概念を応用することが好ましいと思われる。そこで研究代表者らは、「遺伝子ドーピング」において、「血中 cfDNA や他の体液中核酸」の情報を用いる「リキッドバイオプシー」のコンセプトの応用が可能かどうか、動物モデルを用いて下記のように実証を進めた。

-1) アデノウイルスを用いた遺伝子ドーピングモデル動物作成し、末梢血の血球分画が最も最適な検体であることを証明した。

研究代表者らはマウスを用いて遺伝子ドーピングモデル動物を作成し、外因性遺伝子と使用したベクターの検出法を検討した。アデノウイルスに mCherry 遺伝子(珊瑚のタンパクで、それ自体の機能はないが翻訳されると赤色を発する)を外因性遺伝子として組み込み、静脈および筋肉の局注でそれぞれ導入し、半定量 PCR (sqPCR)、定量 PCR (qPCR)、デジタル PCR (ddPCR)法により検討した。静注のみならず筋肉への局注においても ddPCR 法が最も高感度に mCherry 遺伝子とアデノウイルスベクター断片を 14 日間検出することができた。特に末梢血の血球分画から最も高感度に、外因性遺伝子 mCherry 遺伝子とアデノウイルスベクターを検出できた。末梢血の血球分画は外因性 DNA およびベクター DNA を大量に含んでおり、遺伝子ドーピングの非侵襲的な検体として優れていることを初めて見出した。

-2) 遺伝子ドーピングへ使用されうるエリスロポエチン (Epo) 遺伝子 Naked plasmid の検出系を確立した。

-3) In vivo transfection 法を用いた遺伝子ドーピング動物モデルの構築: レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ発現プラスミドを、遺伝子治療研究に使われるカチオン性ポリマーと共にマウスの腹腔へ In vivo transfection 法として投与し、血中 cfDNA からルシフェラーゼ発現プラスミドの情報が検出可能であることを示した。

-4) アデノウイルスにヒトのエリスロポエチン遺伝子 (hEPO) を組み込み、「実際に生体で機能する遺伝子」として赤血球が増加するモデルを作成した。

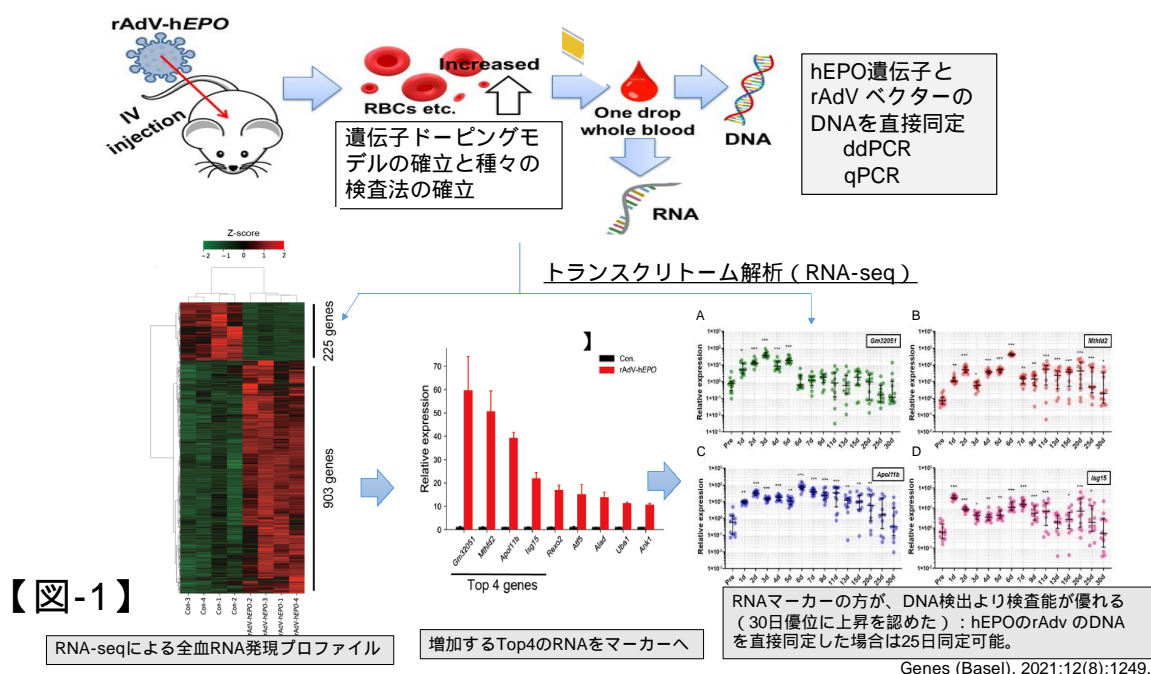
アデノウイルスに生体で機能する遺伝子、今回はヒトのエリスロポエチン遺伝子 (hEPO) を組み込みマウスに静脈注射した。アデノウイルスは肝臓に集まり、同所でヒトエリスロポエチンタンパクへの翻訳から血中への放出を経て、実際に赤血球が増加するモデルを作成した。本モデルにおいても「リキッドバイオプシー」により末梢血の血球分画から外因性 hEPO を検出できた。またさらにトランスクリプトーム解析である RNA-seq と呼ばれる解析法を用いて末梢血から複数の RNA を核酸マーカーとして同定に成功し、併せて高感度な検出法の確立に至った。

4. 研究成果

「遺伝子ドーピング」は、遺伝子編集技術の登場により実用化が非常に懸念されている。対策として、がんゲノムで利用されている「リキッドバイオプシー」を最適な検査法として研究を進め可能性を確認できた。

関連論文

1. 「Yanazawa K (省略)Takekoshi K. Development of a gene doping detection method to detect overexpressed human follistatin using an adenovirus vector in mice, PeerJ, 9:e12285, 2021, (IF: 2.38).
2. Sugasawa T(省略)Takekoshi K. Proof of Gene Doping in a Mouse Model with a Human Erythropoietin Gene Transferred Using an Adenoviral Vector. Genes (Basel). Vol. 12, 1249, 2021, (IF = 3.759).
3. Sugasawa T, Aoki K, Yanazawa K, Takekoshi K: Detection of Multiple Transgene Fragments in a Mouse Model of Gene Doping Based on Plasmid Vector Using TaqMan-qPCR Assay. Genes (Basel), Vol. 11, 750, 2020, (IF: 3.759).
4. Aoki K, Takekoshi K: The detection of trans gene fragments of hEPO in gene doping model mice by Taqman qPCR assay. PeerJ, 8:e8595, 2019, (IF: 2.38).
5. Sugasawa T, Takekoshi K. Detection of Transgenes in Gene Delivery Model Mice by Adenoviral Vector Using ddPCR. Genes (Basel), Vol. 10, 436, 2019, (IF: 3.759).
6. 「特集今知りたい；遺伝子ドーピングとその検査；リキッドバイオプシーの応用を主にその社会的側面を含めて；実験医学（羊土社）pp.1877-1882, 2020-7.」執筆者 竹越一博。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Nakano Takuro, Fujita Shin-ichiro, Matsumoto Yuki, Ishihara Genki, Aoki Kai, Yanazawa Koki, Ono Seiko, Tamai Shinsuke, Manevich Lev, Ueda Haruna, Ishibashi Noriyo, Tamai Kenshirou, Kanki Yasuharu, Yoshida Yasuko, Watanabe Koichi, Takemasa Tohru, Kawakami Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Proof of Gene Doping in a Mouse Model with a Human Erythropoietin Gene Transferred Using an Adenoviral Vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12081249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Aoki Kai, Yanazawa Kouki, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of Multiple Transgene Fragments in a Mouse Model of Gene Doping Based on Plasmid Vector Using TaqMan-qPCR Assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 750 ~ 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11070750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹越一博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 実験医学 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 特集今知りたい；遺伝子ドーピングとその検査；リキッドバイオプシーの応用を主にその社会的側面を含めて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 淳 (watababe atsushi) (10307952)	金沢大学・附属病院・特任教授 (13301)	
研究分担者	渡部 厚一 (watanabe kouichi) (30447247)	筑波大学・体育系・准教授 (12102)	
研究分担者	菅澤 威仁 (sugasawa takehito) (60821840)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	
研究分担者	竹村 瑞穂 (takemura mizuho) (70634351)	日本福祉大学・スポーツ科学部・准教授 (33918)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関