

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360344

研究課題名(和文) 単一細胞内DNA分子数の新規デジタルカウンティング手法の開発

研究課題名(英文) Development of technique for digital counting of DNA copy number at the single-cell level

研究代表者

竹山 春子 (Takeyama, Haruko)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60262234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞中に含まれる低コピーのウイルスDNAをデジタル精密計測する技術を開発することを目的とした。このために、マイクロ流体デバイスで形成したピコリットル容量のマイクロドロプレットを用いてDNA分子を増幅・検出するシステムを開発した。本システム的应用として、HIV-1を模倣したレンチウイルス感染細胞をサンプルとし、感染後の細胞内でのウイルスDNAの動態を経時追跡した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a technique for digital counting of low copy viral DNA within infected cells. We developed a microfluidic device for generation of microdroplets for droplet-based digital PCR. In this method, the target genes were separately amplified within picoliter droplets and detected with fluorescent microscopy. The number of fluorescent droplets correlated with the copy numbers of target genes. In addition, we constructed lentivirus vector modeled after HIV. After optimization of the reaction conditions of droplet digital PCR, we demonstrated its highly sensitive detection of proviral DNA within a small number of infected cells during early infection process.

研究分野：プロセス工学

キーワード：DNA HIV デジタルカウント 一分子PCR 単一細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞中に含まれる遺伝子情報は、その多様性から発現性までさまざまである。さらに、個々の細胞活性によってその遺伝子発現も変化に富んでいる。細胞内で低コピーに存在する遺伝子情報の重要性は指摘されているが、従来までに一般的に用いられてきた qPCR 法では、サンプル中のターゲットが少ない場合での定量精度が非常に低いという問題点があった。また、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析においても、コピー数が非常に少ないターゲットの検出は困難である。

本研究では、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)を対象とした。HIV は CD4<sup>+</sup> T 細胞に侵入したのち、ウイルス RNA が逆転写され二本鎖 DNA が合成される。この HIV の細胞内侵入では主要受容体である CD4 分子の他に補助受容体として CXCR4 あるいは CCR5 分子を必要とする。補助受容体によって細胞指向性が決定され、CXCR4 を用いる X4 型と CCR5 を用いる R5 型 HIV が存在する。X4 型ウイルスは T 細胞株指向性で CD4 陽性の細胞株でよく増殖するのに対し、R5 型はマクロファージや初期培養 T 細胞でしか増殖しない。病態との関係でみると、感染初期の個体からは R5 型ウイルスが有意に分離され、病気の進行にともなって X4 型が優勢になる。しかしながら、X4 型が優勢な進行感染者から新たに感染した個体から初期に分離されてくるウイルスの多くはやはり R5 型であることが知られている。なぜ R5 型ウイルスが感染初期には優勢に増殖するのかはいまだによく分かっていないが、HIV 感染防御には R5 型の感染を阻止することが重要であると考えられる。

また、細胞内で合成されたウイルス DNA は宿主ゲノムに挿入され、プロウイルス DNA となる。HIV の細胞内への侵入から宿主ゲノムへのプロウイルスゲノム挿入に至る感染過程の量的動態を追跡するには、個々の細胞内に微量に存在するウイルス RNA、二本鎖 DNA およびプロウイルス DNA 量を個別に計測する技術が必要である。また、ウイルス感染は細胞活性状態に大きく左右されるため、細胞ごとにウイルス由来核酸量とその動態を計測することが望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞中に含まれる低コピーの DNA 分子をデジタル精密計測する手法を開発することを目的とした。また、開発する計測法を用いて、ウイルス感染過程における細胞内でのウイルス遺伝子のコピー数変動を追跡することを目標に定めた。本手法を用いれば、初期感染で導入されたウイルスの遺伝子情報や、感染後期過程において核から翻訳された低コピー数の HIV

由来 cDNA、mRNA も計測が可能であると考えられるため、HIV をはじめとしたウイルスの感染プロセス解明に大きく寄与すると考えられる。従来、核酸の定量には qPCR が主に用いられてきたが、低コピー量の核酸定量や単一細胞レベルでのウイルスゲノム検出は未だ困難である。そこで本研究では、HIV の初期感染過程におけるウイルス由来 DNA の量的動態の解析を目指して、単一核酸分子の検出を可能とするデジタルカウント法の開発に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) HIV-1 を模したレンチウイルス感染モデルの作製

はじめに蛍光タンパク質発現レンチウイルスを作製し、細胞感染モデルを構築することとした。HIV-1 由来のプロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するプラスミド(pCS-CD-EGFP-Nef-LTR)を構築した。このプラスミドを transfer vector としてレンチウイルスベクター(蛍光マーカーとして EGFP もしくは Ds Red 遺伝子を含む)を作成し、293T 細胞を用いてウイルスを作製した。このウイルスを T 細胞株(CEM 細胞)に感染させた。マーカータンパク質発現により生じた蛍光を指標に、フローサイトメトリーを用いて感染細胞を分取することを検討した。以後、本研究において行った遺伝子増幅反応の検討では、本項で作製したレンチウイルスベクター、もしくは分取したウイルス感染細胞を用いた。

### (2) DNA デジタルカウントシステムの開発

#### キャピラリープレートを用いた DNA デジタルカウントの検討

DNA 分子数をデジタルカウントするためのシステムとして、初年度はガラスプレートに無数の貫通孔が形成されたキャピラリープレートの利用を試みた。本方式では、DNA 分子をキャピラリープレートチャンバー(490 $\mu$ L/チャンバー)に一分子ずつ導入し、チャンバー内で PCR 増幅した後、増幅産物を可視化することで分子カウントを行う。なお蛍光検出には Taqman プローブを用いた。

#### マイクロドロップレットを用いた DNA デジタルカウントの検討

第2年度からはマイクロ流体技術を利用したマイクロドロップレットを用いてターゲット DNA のデジタルカウントを行う手法の開発に注力した。

本開発では、内部にクロスジャンクション構造を配したマイクロ流体デバイスを設計し、熱硬化性樹脂 poly(dimethylsiloxane) (PDMS)を用いてマイクロ流体デバイスを作製した。マイクロシリンジを介して PCR 反応液をデバイス内に導入し、界面活性剤

を含んだオイルを用いて溶液をせん断することによりドロップレットを連続形成した。形成したドロップレットをアウトレット部に接続したチューブを介して PCR チューブ内に回収し、サーマルサイクラーを用いて熱サイクルを印加した。PCR 後のドロップレットを顕微鏡下で観察し、Taqman プロブ由来の蛍光を示すドロップレットの割合を測定することにより、サンプル中に含まれる標的 DNA のコピー数をデジタルカウントした。

### (3) デジタルカウンティング法の精度評価

構築したデジタルカウンティング手法の検出感度を評価するため、レンチウイルスベクターを用いて様々な希釈段階の DNA サンプル溶液を調製し、定量を行った。PCR 反応後、蛍光を示したドロップレットの割合から遺伝子のコピー数を算出し、理論値との比較を行った。また、構築した二種のレンチウイルス (X4 型と R5 型) に対してそれぞれ異なる蛍光を示すプロブを設計することにより、2 種の遺伝子の同時定量を可能とするマルチプレックス PCR について検討した。

### (4) マイクロ流体デバイス上でのオンチップ PCR

DNA 分子の反応槽への分配、PCR、デジタルカウントまでの一連の工程を集約したシステムの構築を目指し、デバイス上で熱サイクルを印加することが可能なマイクロ流体デバイスを設計した。上記の定量精度評価に利用した反応系を利用し、システムの評価を行った。

### (5) レンチウイルス感染細胞を用いたウイルス DNA の定量

(1) で作製した HIV-1 を模したレンチウイルス (X4 型と R5 型) を同時感染させた細胞を調製し、フローサイトメトリーにて分取した。細胞内ウイルス DNA のコピー数をマルチプレックスデジタルカウンティング法により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) HIV-1 モデルレンチウイルスの感染性の確認およびフローサイトメトリーによる分取

X4 型と R5 型に対応した DsRed, EGFP をコードするレンチウイルスを CEM 細胞に感染させてフローサイトメーターで解析・分取した結果、ウイルスが感染性を有するものであることがわかった。このとき、ウイルスに感染した細胞は DsRed, EGFP を発現する感染細胞の割合はそれぞれ 23.9%、72.3% となった。この違いはウイルス作成時のロットの違いに起因するものと考えられた。また、単一細胞レベルでの解析を想定して、ヒト末梢血単核細胞から調製した

初期培養 CD4 陽性 T 細胞を分化・活性化マーカーと増殖レベルで様々な亜集団細胞に分画するため、多重染色フローサイトメーターのプロトコールを作成した。

### (2) キャピラリープレートを用いた DNA デジタルカウンティングの定量性評価

レンチウイルスに組み込んだ蛍光タンパク質の DNA をサンプルとして、PCR 溶液をキャピラリープレートに導入した。PCR にはフラットタイプのサーマルサイクラーを利用した。増幅産物量は理論値と同様の増加傾向を示すものの、理論値に比べて全体的に濃度が 10 から 100 倍程度小さいことが示された。またゲノム DNA の存在下ではさらに増幅産物量が減少することが確認された。TaqMan プロブを用いてポア内での増幅を可視化した結果、部位により蛍光強度が異なっていることからキャピラリープレートへのサンプル充填や増幅が均一に行えていないことが示唆された。

### (3) ドロップレットを用いた DNA デジタルカウンティングの定量精度評価

キャピラリープレートで生じた問題を回避するために、新たな方針としてマイクロドロップレットの利用を検討した。本研究では、均一なドロップレットを形成するために、PDMS 製のマイクロ流体デバイスを開発した。本デバイスにより、約 50 pL のドロップレットを自動連続生成することができ、1 分間で約  $2 \times 10^4$  個のドロップレットが得られる。本ドロップレットを用いて、Taqman プロブを用いた PCR 増幅及びターゲット DNA 分子の検出が可能であることを確認した (Fig. 1)。

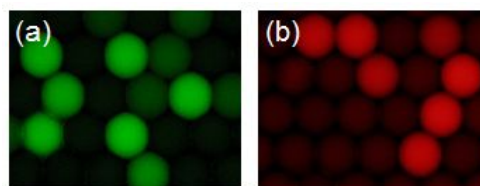


Fig. 1 マイクロドロップレット内での PCR による特異的遺伝子検出の検出

((a) X4 型 : 蛍光色素 FAM, (b) R5 型 : 蛍光色素 VIC)

ウイルスベクター中の EGFP, DsRed を対象としてモデル検出系を構築し、デジタルカウンティングの定量精度を評価した。この結果、マイクロドロップレットを用いた DNA デジタルカウンティングでは、当初の目的として掲げた 10 コピー以下の低コピー DNA 分子の検出・定量が可能であり、また希釈段階に応じて蛍光を示すドロップレットの割合が変化することを確認することができた ( Fig. 2 )。

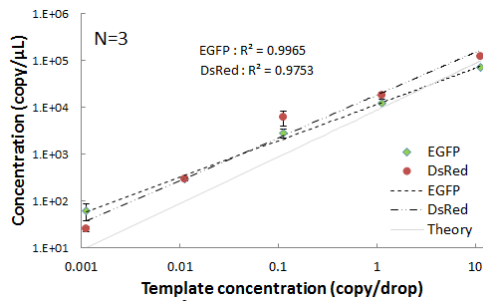


Fig. 2 ドロプレットを用いた DNA デジタルカウンティングによる DNA コピー数定量

また、ドロプレット内でのマルチプレックス PCR では、2 種の遺伝子の同時検出を行い、標的 DNA の希釈段階に応じて蛍光を示すドロプレットの割合が変化することを確認した(Fig. 3)。これにより、複数の低コピー遺伝子の同時検出が可能となった。

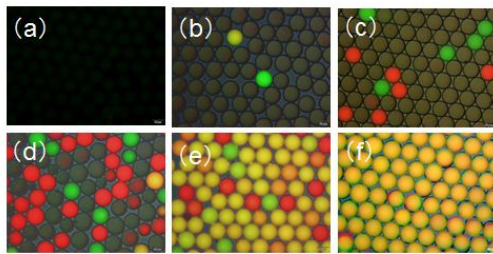


Fig. 3 2 種の遺伝子のドロプレット-マルチプレックス PCR による検出 (X4 型 : FAM, R5 型 : VIC) ((a): no template, (b): $1.0 \times 10^{-2}$  fg/ $\mu$ L, (c): $1.0 \times 10^{-1}$  fg/ $\mu$ L, (d): $1.0 \times 10^0$  fg/ $\mu$ L, (e): $1.0 \times 10^1$  fg/ $\mu$ L, (f): $1.0 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L)

#### (4) オンチップ PCR を利用したウイルス遺伝子の検出

マイクロ流体デバイスに遺伝子増幅反応用の蛇行流路を設計し、この直下に温度ヒーターを配した物を作製した。この構造により、流路を流れるドロプレットに対して熱サイクルを印加し、標的遺伝子の増幅を行うことを検討した。流路長・流量および流路コーティングの検討を進めることで、遺伝子増幅条件を最適化した。この結果、流路から回収したドロプレット内部で遺伝子増幅が生じていることを蛍光検出することができた。これにより、ドロプレット作製から PCR 反応までの工程を一つのデバイス上に統合したオンチップ PCR が可能となった一方で、デバイス作製の歩留まりや反応時間の改善が課題として残った。

#### (5) デジタルカウンティング法を用いたレンチウイルスの感染動態追跡

感染細胞を利用した評価では、界面活性剤を含まない細胞溶解液では核内で形成される 2-LTR DNA は検出されないことが示唆され、本研究において開発した系で細胞内のプロウイルスのみを定量可能であると

判断された。また、細胞内のウイルス DNA 数は想定より少なく、細胞ごとにバラつく事が示唆された。そこで、少数細胞からのウイルス DNA 量の追跡として、1000 個の感染細胞をフローサイトメトリーにより分取し感染後の経過時間に従ったウイルス DNA 量の変動を追跡した。この結果、CEM 細胞に対するモデルレンチウイルスの感染進行過程をモニターすることができた。本実験により、細胞内におけるウイルス DNA のコピー数の経時的な増加を確認することができた(Fig. 4)。

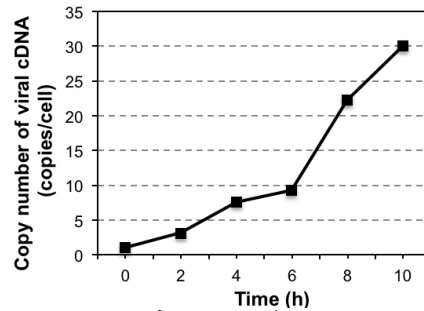


Fig. 4 ドロプレット-デジタル DNA カウントによって計測した CEM 細胞内のウイルス cDNA 量の時間変動 (VSV/EGFP レンチウイルス感染細胞:1000 個から計測)

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[ 雑誌論文 ] (計 5 件)

Terahara K., Ishige M., Ikeno S., Okada S., Kobayashi-Ishihara M., Ato M., Tsunetsugu-Yokota Y.; Humanized mice dually challenged with R and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5+CD4+ T cells. *Microb. Infect.*, 2015, 378-386 DOI : 10.1016/j.micinf.2015.02.002 (査読有)

Hosokokawa M., Hoshino Y., Nishikawa Y., Hirose T., Yoon DH., Sekiguchi T., Shoji S., Takeyama H., Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomics library for isolation of microbial enzymes., *Biosens.and Bioelectron.*, 2014, 379-385 DOI : 10.1016/j.bios.2014.08.059 (査読有)

Ikeno S., Suzuki M., Muhsen M., Ishige M., Kobayashi-Ishihara M., Ohno S., Takeda M., Nakayama T., Morikawa Y., Takehara K., Okada S., Takeyama H., Tsunetsugu-Yokota Y., Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR, *Frontiers in microbiology*, 2013, DOI :

10.3389/fmicb.2013.00298 (査読有)  
Terahara K., Ishige M., Ikeno S., Mitsuki Y-y, Okada S., Kobayashi K. Tsunetsugu-Yokota Y., Expansion of activated memory CD4+ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3null mice., Plos One, 2013, 8(1):e53495, DOI: 10.1371/journal.pone.0053495 (査読有)  
Mitsuki Y-Y., Terahara K., Shibusawa K., Yamamoto T., Tsuchiya T., Ishige M., Kobayashi K., Morikawa Y., Nakayama T., Takeda M., Yanagi Y., Tsunetsugu-Yokota Y., HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells, J.Virol. 2012, 7227-7234 DOI : 10.1128/JVI.06681-11 (査読有)

〔学会発表〕(計 20件)

和田倭、小林(石原)美栄、寺原和幸、池野翔太、徳永研三、立川(川名)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子、恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

池野翔太、寺原和幸、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、竹山春子、横田恭子、ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用(3)、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

寺原和幸、石毛真行、池野翔太、小林(石原)美栄、岡田誠治、横田(恒次)恭子、R5/X4 HIV-1 混在感染とヒト化マウスの感染早期にみられる R5 ウイルス優位性とその要因について、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

竹山春子、海洋無脊椎動物共生微生物の遺伝子情報の解析と利活用、2014 年生物工学フォーラム「先端技術による新たなバイオテクノロジー」、2014 年 7 月 25 日、理化学研究所大河内記念ホール(埼玉県)

竹山春子、海洋遺伝子資源利用と解析ツール開発、「生合成マシナリー：生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」第 7 回公開シンポジウム、2014 年 6 月 21 日、東工大蔵前会館くらまえホール(東京都)

細川正人、西川洋平、川井聡子、横田(恒次)恭子、竹山春子、マイクロドロップレットを反応場とした 1 分子 DNA 増幅法の応用、電気化学学会第

82 回大会、2014 年 3 月 15 日、横浜国立大学(神奈川県)  
他 14 件

〔図書〕(計 1 件)  
竹山春子、「遺伝子工学」近藤昭彦・芝崎誠司編著(分担執筆:第 11 章 バイオ計測)、化学同人、p.156-169、2012

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹山春子(TAKEYAMA, Haruko)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 60262234

(2)研究分担者

横田恭子(YOKOTA, Yasuko)  
国立感染症研究所・免疫部・室長  
研究者番号: 20182701

(3)研究分担者

細川正人(HOSOKAWA, Masahito)  
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・  
次席研究員(研究院助教)  
研究者番号: 60722981