

# NEXT

ThermoFisher  
SCIENTIFIC

No. **63** 2022 / September  
Science, Products and Information  
サーモフィッシャーサイエンティフィック  
ライフサイエンス情報誌

NEXT Interview

## アデノ随伴ウイルスベクターによる 遺伝子治療法研究の最前線で

次世代医療モダリティの扉を開く

村松慎一 氏(自治医科大学神経遺伝子治療部門特命教授、遺伝子治療研究所取締役CRO)



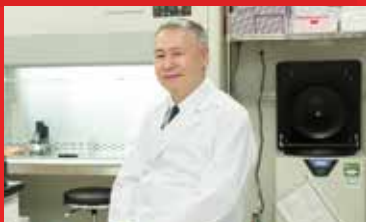
- P. 06 EVOS M7000 Imaging System
- P. 07 KingFisher Purification System シリーズ
- P. 09 ProQuantum イムノアッセイ
- P. 10 キャピラリー電気泳動ベースの遺伝子解析システムポートフォリオ
- P. 11 SeqStudio Flex ジェネティックアナライザ
- P. 13 Collibri Stranded RNA ライブラリ調製キット
- P. 14 Attune CytPix Flow Cytometer
- P. 15 MicroSEQ 微生物同定システム

## アデノ随伴ウイルスベクターによる 遺伝子治療法研究の最前線で

次世代医療モダリティの扉を開く

村松慎一氏

自治医科大学神経遺伝子治療部門特命教授、遺伝子治療研究所取締役CRO



村松慎一(むらまつ しんいち)

1983年自治医科大学、91年同大学院卒業後、91-93年群馬県長野原町へき地診療所長、95-97年米国NIH客員研究員を経て、2019年より現職。地域医療学センター東洋医学部門長兼任。専門は、神経内科一般、神経変性疾患(パーキンソン病、認知症、ALSなど)の先端治療(遺伝子治療・細胞移植)の開発、東洋医学。10年に台湾で行われた世界初のAADC欠損症の遺伝子治療用ベクターを開発。14年に株式会社遺伝子治療研究所を設立、取締役CROを務める。

これまで根治できないとされてきた疾患を克服する治療法として大きな注目を集める遺伝子治療。自治医科大学教授の村松慎一氏は、1996年、米国NIHでアデノ随伴ウイルス(AAV)3型のクローニングに成功し、その後も遺伝子治療用ベクターとしてのAAVの有用性に着目して研究開発を続けています。「非病原性のAAVは、臓器指向性が異なる多数の型が存在し、しかも血液脳関門を通過する型も発見されたことで幅広い応用が期待されています。私たちは単一遺伝子の欠損に起因する代謝異常症の治療法だけでなく、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病などへの治療法の開発研究を進めています」と村松氏は語ります。村松氏にAAVベクターの研究開発の道のりと今後の発展について伺いました。

## 神経変性疾患の治療法を求めて

「1983年に医学部を卒業後、医師として神経内科を担当しましたが、抜本的な治療法がない神経変性疾患の患者さんの診察にもどかしさを感じていました。1980年代は分子生物学が大きく発展し、その影響から遺伝子治療という概念が生まれましたが、理論的な議論に留まり実際の治療には届いていませんでした。それでも1990年、アメリカで遺伝子治療による重症複合免疫不全症(SCID)の治療が実施されました。結果は悪くありませんでしたが、稀な疾患のため、その後普及することはありませんでした。この治療は、体外に取り出したリンパ球にレトロウイルスでアデノシンデアミナーゼ(ADA)の遺伝子を導入する『*ex vivo*』法です。私は1995年に神経疾患に対する遺伝子治療法の開発を目指してアメリカに留学し、神経細胞に感染するAAVの研究に取り組みました。当時、ウイルス研究の花形はHIV。遺伝子治療への応用もアデノウイルスやレトロウイルスの研究が盛んで、AAVはあまり注目されず、ゲノム構造もAAV2型しかわかっていませんでした。私は1996年にAAV3型のクローニングを報告し、その後、他のグループからもAAV1,4,5,6型のクローニングが報告されていきました。しかし1999年、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターを使った遺伝子治療における死亡例や白血病の発症が報告され、遺伝子治療の限界と危険性が危惧され、冬の時代が到来します。私は、非病原性のAAVが遺伝子治療用ベクターとして安全性に優れ、しかも動物個体を使った実験からAAVが神経系を含む多くの組織に感染することを確認していました。ですからそんな時代でも、AAVの有用性を確信していました。AAVベクターは、体に直接投与して遺伝子を導入する『*in vivo*』法の遺伝子治療用ベクターとして適しているという考えは揺らぎませんでした」と村松氏は振り返ります。

## 安全性の高い AAVベクターの開発へ

「帰国後はAAVベクターによる神経変性疾患の病態解析と遺伝子治療への応用研究を継続しました。そしてパーキンソン病では、2002年にモデルサルの脳内にAAVベクターによってドパミン合成系の酵素遺伝子を導入すると運動障害の改善効果が得られることを世界に先駆けて報告、ALSでは、2005年にAAVベクターを使って筋肉に神経栄養因子

のGDNFを発現する方法を開発し、ALSのモデル動物のSOD1 transgenic miceにおいて、脊髄の運動神経細胞の変性脱落が抑制され、寿命が延長できることを報告しました。アルツハイマー病では、共同研究者と2013年にアミロイドタンパク質の分解酵素であるneprilysin 遺伝子を AAVベクターによってモデルマウスの脳の神経細胞に導入して老人斑の形成が抑制されることを明らかにして報告しました。またパーキンソン病と同じく、ドパミン合成不全で発症する、小児神経難病に対する遺伝子治療法の開発研究にも取り組みました。この疾患は、ドパミン合成に関わる芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)が欠損するという単一遺伝子に起因する代謝異常ですが、根本的な治療法がなく多くの方は一生寝たきりの生活を余儀なくされます。2010年、私たちが開発したAAVベクターに正常なAADC遺伝子を組み込んで脳の被殻に投与する遺伝子治療が台湾で開始され、現在までに26人が治療されています。最も低年齢の子供は正常児と同等に発達していると聞いて、とても嬉しく、研究者としてのやりがいを感じています。国内でも2015年から同じ方法でAADC欠損症の患者さんに対する遺伝子治療が開始され、症状の改善が報告されています」と村松氏は語ります。

## AAVベクターへの高まる期待

「一方、2000年代にはいと世界的にもAAVが遺伝子治療に使えるという機運が高まりました。様々な霊長類から100種類程度のAAVが分離され、その中の8型や9型がこれまでよりも格段に遺伝子導入の効率が高いことが分かってきました。私自身も、共同研究者が8型のAAVベクターをマウスの尾静脈から導入すると肝臓でほぼ100%の遺伝子導入を観察したので、そのマウスを調べて脳の神経細胞にベクターが導入されていることを報告しました。AAV8型が血液脳関門を通過することで、AAVベクターへの期待が高まり、多くの研究からAAV9型がさらに脳に入りやすいことがわかってきました。これらの型をベクターとして使えば静脈注射で脊髄や脳の神経細胞へ遺伝子を届けられる可能性があり、応用範囲が広がります。実際、最近大きな注目を集めた脊髄性筋萎縮症(SMA)の小児に対する遺伝子治療では、正常な遺伝子を組み込んだAAV9型ベクターを静脈注射で投与することで症状が改善し、国内でも薬剤として承認されています。この治療法は高額という点でも注目されましたが、AAVベクターで導

入された遺伝子の発現は長期間続くので治療は一生に1回で済むと想定されます。私たちのサルを使った実験では、AAVベクターで脳内に導入した遺伝子が15年以上も発現することを確認しています。もし1回の治療で済み、治療法の普及にしたい価格が抑えられれば、遺伝子治療は医療経済的にも優れていると考えられます」(村松氏)。

## AAVベクターを用いた 遺伝子治療の未来

「AAVベクターは、今や治療に使える技術として世界中で確認され、ベクターに組み込む遺伝子を変えれば、より多くの疾患に対する治療法を開発できます。さらに最新のゲノム編集技術と組み合わせることで、AAVベクターを造血幹細胞や肝細胞などの分裂細胞への遺伝子導入にも応用できます。また、私たちはAAVのゲノム構築とカプシドタンパク質の改変を行い、血管内あるいは髄腔内投与によって脳と脊髄の広範な領域の神経細胞に遺伝子導入可能なAAVベクターや、ヒトの肝細胞に効率よく遺伝子導入可能なAAVベクターの開発に成功しています」と村松氏。「私は現在も臨床を続けていますが、外来の患者さんや患者会等で研究の進行状況を積極的に伝えていきます。そしてその活動を通して患者さんから多くのことを学んでいます。患者さんとの交流を通して、ほとんど治療法がない難病のALSに対する遺伝子治療法の開発に特に力を入れて進めています」。村松氏は2014年に遺伝子治療研究所を立ち上げ、国内で遺伝子治療の臨床応用へ向けて数々の疾患治療に挑むロードマップを掲げています。

## 若い人へのメッセージ

「一つ言えることは、上司やボスからの言葉そのまま受け取るのではなく、自分のことは自分で考えることをお勧めします。上司やボスは会社組織や研究室を維持・運営する立場から若手研究者にいろいろなことを要求します。それはプロジェクトや研究がもっとも効率よく進むことを念頭に置いているからで、必ずしも若手研究者個人の能力を伸ばすためではありません。若いころの一定期間、効率的に成果を上げるビッグラボに在籍してボスの指示に従って経験を積むことは有用かもしれませんが、それでも結局は、将来を見据えて自分のことは自分で考えて研究や仕事に取り組むことが大事だと思います」と村松氏は最後に若い方へ語ります。

# QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムのマイクロ流体アレイプレート

## ハイライト

- 細胞治療や遺伝子治療の研究におけるアデノ随伴ウイルス (AAV) 生産では、幅広いダイナミックレンジの組換えAAV定量が不可欠
- Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ デジタルPCR システムはAAVを高感度で正確に定量し、バイオ医薬品のためのウイルスベクター生産を強力にサポート
- 総マイクロチャンバーの99±0.3%以上が解析に有効となるマイクロ流体アレイプレート (MAP) テクノロジーは、ドロップレットベースの技術よりも有効反復数が高い

## 導入

高い形質導入効率を有するAAVは、2つの逆方向末端反復配列間 (Inverted terminal repeats, ITRs) に長さ約4.8 kbまでの遺伝子断片をパッケージングでき、効率的な遺伝子導入ツールとして、細胞治療や遺伝子治療の分野で広く使用されています。組み換え AAV (rAAV) の大量生産は様々な低力価濃度からスタートし、用量漸増試験 (dose-escalation study) に必要となる最適濃度への濃度達成と定量化の両方が必要です。そのためには正確で再現性のある定量が、AAV製造プロセスの複数のステップで必要とされます。定量PCR (qPCR) 法はAAV定量のための強力なツールですが、相対定

量なので標準物質を使って検量線を作成する必要があります。最近、核酸の絶対定量技術としてデジタルPCR (dPCR) が注目されています。dPCRは参照サンプルや検量線を必要とせず、正確で高精度にAAVベクターを定量することが可能で、ワークフローも簡便で迅速です (図1)。ここではドロップレットベースのデジタルPCR システムとMAPベースのQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムを比較し、パーティション作成時の一貫性とAAVウイルス力価測定時の定量性を評価しました。



図1 MAPベースのQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムにおける迅速で簡単な実験ワークフロー

## 結果

QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムは、5桁のダイナミックレンジ全体でAAVの濃度を正確に測定したのに対し、ドロップレットベースのdPCRプラットフォームは、ダイナミックレンジが4桁と狭く (表、図2A)、最も高濃度のサンプルは「no call」と表示されました。95%信頼区間 (CI) での線形回帰分析において、

QuantStudio AbsoluteQ デジタルPCR システムは、すべての希釈系列で計算された濃度と予想される濃度の間に優れた相関関係が示されました。これに対してドロップレットベースのdPCRプラットフォームは、フルスケールで定量できず、最高濃度では測定できませんでした (表および図2B)。

| 10-fold serial dilutions | Expected concentration (cp/μL) | Reported concentration from software (cp/μL) |                    |
|--------------------------|--------------------------------|--|--------------------|
|                          |                                | QuantStudio Absolute Q デジタル PCR システム         | Droplet-based dPCR |
| Dilution 1               | 18,373                         | 20,133                                       | No call            |
| Dilution 2               | 1,837                          | 2,193  | 2,174              |
| Dilution 3               | 184                            | 217  | 218                |
| Dilution 4               | 18                             | 21   | 22                 |
| Dilution 5               | 2                              | 2  | 3                  |

表 5つの連続希釈系列サンプルの濃度をQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムおよびドロップレットベースのdPCRプラットフォームから算出して予想濃度と比較

# 技術は、遺伝子治療研究におけるウイルス力価定量の正確性と一貫性を改善

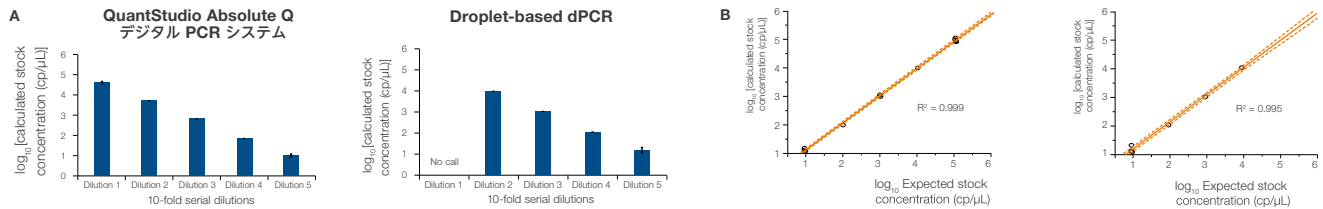


図2 QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムおよびドロップレットベースのdPCRにおけるAAV定量のダイナミックレンジ  
(A) QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムで算出したAAV濃度(左)とドロップレットベースのdPCRで計算された値(右)。  
(B) 予想される濃度とdPCRの値の間の相関値。ドロップレットdPCRの線形回帰の計算では、検出されたダイナミックレンジ内のデータのみが考慮されます。

図3は、QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムで実施された各希釈系列で解析可能と判断されたマイクロチャンバー数を示しています。合計15回の反応で、分析されたマイクロチャンバーの平均数は、20,480個のうち20,473個でした(20,470~20,476の範囲、利用可能なマイクロチャンバーの99.9%に相当、標準偏差は2.7)。一方、ドロップレットベースのdPCRはばらつきが多く、特に高濃度でより顕著でした。希釈系列1と2の場合、分析されたドロップレットの平均と標準偏差はそれぞれ、18,485±1,158(17,172~

19,358の範囲)および14,475±5,817(8,028~18,167の範囲)でした。さらにMAP テクノロジーは、ドロップレットベースのdPCRと比較して、すべての希釈系列においてサンプルのデッドボリュームを5%未満に最小化しました。一方、ドロップレットベースのdPCRでは予想されたドロップレット数は20,000でしたが、サンプルロスの変動の割合が大きく、特に希釈系列2では26.3±23.7%(範囲9.2~59.9%)を示しました。

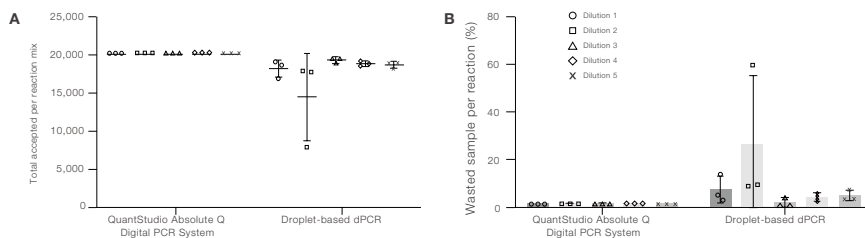


図3 MAPベースとドロップレットベースのdPCRプラットフォーム間でのパーティショニングの一貫性とデッドボリュームの割合の比較  
(A) dPCRごとに受け入れられたマイクロチャンバーまたはドロップレットの総数の分布。5つのAAV希釈液の反応は、MAPベースのQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムとドロップレットベースのdPCR プラットフォームにおいて並行して実施しました。(B) QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムおよびドロップレットベースのdPCR プラットフォームにおける反応あたりのデッドボリュームの割合。

- QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムの簡単なワークフローと迅速なターンアラウンドタイムは、細胞および遺伝子治療研究のためにrAAVを迅速かつ正確に定量化するニーズを適切に満たしました。
- QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムのMAPテクノロジーは、20,480個の固定マイクロチャンバーの99%以上を使用し、サンプルと試薬の無駄を最小限に抑えました。さらにMAPベースのQuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムは、AAVを広いダイナミックレンジで定量しました。
- Absolute Q Viral Titer Assays は、ITR配列での単独定量だけでなく、ターゲット遺伝子に対するカスタムアッセイを利用することでマルチプレックス定量も実施できます。QuantStudio Absolute Q デジタルPCR システムはウイルスクターを簡単かつ正確に定量し、細胞治療および遺伝子治療研究の品質を信頼性高く評価します。

## QuantStudio Absolute Q デジタル PCRシステムのユーザーボイス近日公開予定!

### 「がんの薬剤耐性に関するアレル特異的遺伝子増幅を正確に測定」

小林祥久 氏 (国立がん研究センター研究所分子病理分野 研究員)

EGFR変異のある肺がんの細胞株から、実験的に薬剤耐性株を樹立し、その耐性細胞におけるEGFR遺伝子のコピー数を変異型と野生型に分けてAbsolute Q デジタルPCRシステムで定量しました。その結果、薬剤耐性細胞において野生型EGFR遺伝子の増幅が顕著に起きていること、さらにその増幅数を正確に定量できました。今回の実験では、変異型をFAM、野生型をVIC、内在性コントロールのヒトRNasePをABYで検出し、1細胞あたりの各EGFR遺伝子コピー数をマルチプレックスの反応系で正確に定量できました。

| 製品名   | サイズ    | 製品番号               | 希望小売価格      |
|---|--------|--------------------|-------------|
| QuantStudio Absolute Q デジタルPCRシステム デスクトップPC付パッケージ | 1 式    | QS-ABSQ-D-S1(1年保証) | ¥9,680,000  |
|   | 1 式    | QS-ABSQ-D-S2(2年保証) | ¥10,450,000 |
| Absolute Q AAV dPCR assays                        | 700 反応 | A52740             | ¥174,800    |

杉山陽子 氏(沖縄科学技術大学院大学 臨界期の神経メカニズム研究ユニット 准教授)

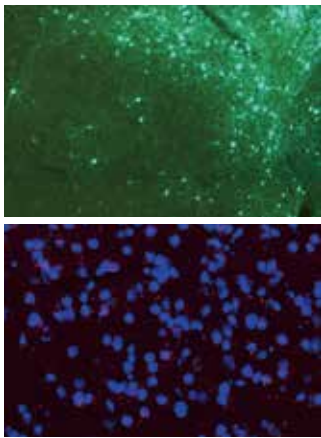
## キンカチョウの歌の記憶と学習に関わる神経メカニズムを研究 脳組織の画像解析にEVOS M7000 Cell Imaging Systemを活用



キンカチョウの幼鳥は、生後に父鳥の歌を聴き分けて記憶し、真似をすることで歌を学習します。彼らが歌を学習できるのは、生後数十日間の臨界期と呼ばれる期間のみです。「ヒトが幼児期に言語を発達するように、キンカチョウは臨界期に歌を学習します。一羽一羽異なる歌を唄うキンカチョウにとって、歌は親子やつがい相手の個体識別の基盤となり、群れとしての社会的活動に欠かせないものです。私たちは、キンカチョウの歌学習の神経メカニズムを解き明かす研究を進めています」と沖縄科学技術大学院大学の杉山陽子氏は語ります。

### 親鳥の歌が記憶として 形成されるしくみを解明

「キンカチョウの歌学習の研究は発声・学習の神経メカニズムや解剖学的な知見に関する蓄積があり、研究対象に適していま



キンカチョウの脳組織の神経細胞を  
EVOS M7000 Systemで撮影

す。私はポスドク時代にキンカチョウの歌学習の研究を始め、2016年にキンカチョウのオスの幼鳥が父の歌を学習する際に、歌の記憶に関わる神経細胞が脳の聴覚野に生まれてくることを電気生理学的手法で発見しました。この発見を基盤に研究室のメンバーと研究を進めています」と杉山氏は語ります。

### 多様な研究を展開

キンカチョウ研究や使用中のInvitrogen™ EVOS™ M7000 Imaging Systemについてメンバーの方に伺いました。Jelena Katic氏は「発達初期における社会的コミュニケーションとその学習の基盤となる脳回路への影響を調べています。ノルアドレナリン放出量を測定し、学習中の幼鳥の脳におけるノルアドレナリン受容体の発現レベルを可視化してノルアドレナリンの影響を確認中です。脳全体を調べるのでEVOS M7000 Systemのタイリングが素早くて便利」と語ります。タイリングではStitching補正を使って継ぎ目を自然に結合できます。Sarah Morson氏は「高次聴覚野で歌の記憶がどのように組織化され、連結するかを標識や画像化技術で研究中です。EVOS M7000 Systemは操作が簡単で使いやすい」と話します。Joanna Komorowska-Mueller氏は「成熟と歌の学習行動において、聴覚野と運動野の間の結合の変化を調べ、その時間経過と分子シグナルのトリガーに注目しています」と話します。



杉山氏と研究室の皆さん。右から杉山氏、Jelena Katic氏、Joanna Komorowska氏、Sarah Morson氏、諸橋雄一氏

### 研究の進展について

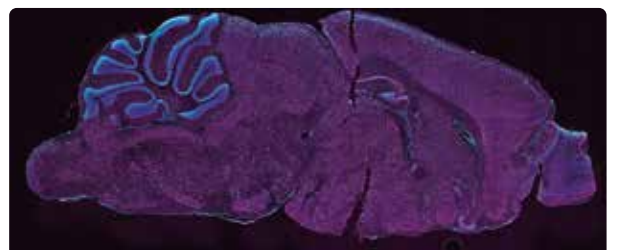
「キンカチョウの歌はオスからメスへの求愛歌なので、歌うのはオスだけです。しかし幼鳥の頃、メスも同じように父の歌を聴いているはず。メスは成長するとオスを選び、長いつがいの期間も個体を識別して寄り添いますが、この行動にも歌の記憶が関わっているかもしれません。これまでの研究はオスが中心でしたが、最近はメスの研究にも力を入れています。メスはオスをどうやって選ぶのか、メスの幼鳥もオスの脳と同じ領域に父鳥の歌を記憶する神経細胞が生まれてくるのか、いろいろと興味が尽きません。またキンカチョウはコロニーをつくり、その中で学習するという社会性が高い鳥です。群れの仲間の歌をどう聴き分けているのか、社会コミュニケーションの観点からさらに研究を発展させたい」と杉山氏。そして最後に「この大学は、科学として面白い研究を強力にサポートしてくれます。医療や実生活にすぐに役立つ研究だけでなく、科学として解明すべきことを多様なメンバーとこれからも追及していきたい」と語ります。

※沖縄科学技術大学院大学が、この製品やサービスを支援または推奨・推薦するものではありません。

## EVOS M7000 Imaging System

## 高度な自動イメージング機能を備えたオールインワン顕微鏡

Invitrogen™ EVOS™ M7000 Imaging Systemは、最適画像および比色分析画像用に2つの高解像度カメラ(モノクロとカラー)を内蔵し、マルチウェルプレートのスキャンや、画像ステッチおよびタイトル表示など高度な自動イメージングとデータ生成機能を搭載しています。



ラット脳組織のタイリング画像

4xApo対物レンズ、EVOS Light Cube DAPI, Cy®5 を使用し、144枚をStitching処理



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑えます。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁気ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。エクソソームを単離するキットを使用して、エクソソームの単離も可能です。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとチップコムの組み合わせで異なります。

|           | KingFisher Duo Prime | KingFisher Apex    | KingFisher Presto  |
|-----------|----------------------|--------------------|--------------------|
| サイズ       | ベンチトップ               | ベンチトップ             | 小型ベンチトップ           |
| スループット    | 低～中スループット            | 中～高スループット          | 高スループット            |
| 処理サンプル数   | 1回あたり 12 / 6 サンプル    | 1回あたり 96 / 24 サンプル | 1回あたり 96 / 24 サンプル |
| 処理容量      | 50～5,000 µL          | 15～5,000 µL        | 50～5,000 µL        |
| 加熱        | あり(プレートA列のみ)         | あり                 | あり                 |
| 冷却        | あり(エリュージョンストリップのみ)   | あり                 | なし                 |
| UVランプ     | あり                   | あり                 | なし                 |
| バーコードリーダー | オプション(外付け)           | あり(内蔵)             | なし                 |

### User's Voice

足立 淳 氏(医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬標的プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー)

## エクソソーム精製が多検体自動化により疾患バイオマーカーや創薬標的探索を加速 磁気ビーズによるサンプル調製をKingFisher Presto Purification Systemがサポート



「近年、疾患バイオマーカーの開発において、がんなどの細胞から血液中に分泌されるエクソソームが注目されています。私たちも2017年に血清のエクソソーム中に含まれるタンパク質を質量分析計で網羅的に解析し、大腸がんの新たな早期診断マーカーとなるタンパク質を発見しました。エクソソーム精製は一般的に超遠心法で行いますが、臨床に役立つバイオマーカーを開発しても、超遠心による精製法は複雑で多検体処理に向かず、臨床応用は難しいと思いました。そこで私たちは、2021年にエクソソームの多検体自動精製システムを開発し、疾患バイオマーカーの開発や創薬標的の同定などの研究開発に広く活用してもらうことにしました」と医薬基盤・健康・栄養研究所の足立淳氏は語ります。足立氏に、多検体自動化システム開発や質量分析計によるプロテオーム解析について伺いました。

### エクソソーム多検体精製システム開発のポイント

「大腸がんの早期診断マーカーの発見では、約160人分のサンプルから超遠心法でエクソソームを精製しました。しかしこの方法では1台あたり6サンプルを6時間かけて超遠心したので、もっと簡単に素早く純度が高い精製法の開発を目指しました。また質量分析計は技術革新のスピードが速く、細胞からのタンパク質の同定数は

年々増加しているのに、血液からの同定数はほとんど向上していません。その理由は、血液中にはアルブミンのように非常に量が多いタンパク質が存在し、低濃度のタンパク質の解析を妨げることも一因です。もし高純度のエクソソームを血液から回収できれば、解析対象ではない大量のタンパク質を除けるだけでなく、膜に囲まれてエクソソーム内で安定して存在するタンパク質は質量分析を用いたバイオマーカー開発の対象として適していると思いました。このような観点から、臨床応用に適したエクソソームの多検体自動精製法を開発することにしました」と足立氏は語ります。

### インタクトなエクソソームを磁気ビーズで精製

「エクソソーム精製にはTim4タンパク質をコンジュゲートさせた市販の磁気ビーズキットを使うことにしました。Tim4はエクソソーム膜の外側に露出するホスファチジルセリンとカルシウム依存的に結合するので、溶出時にはEDTAなどのキレート剤を使ってインタクトで高純度のエクソソームを回収できます。超遠心精製法は、密度が高い分子を沈降させて物理的に精製するので不純物も含まれますが、この方法は生物学的な親和性を利用しているので特異性が高く、高純度で精製できます。さらに磁気ビーズ用多検体自動化システムを比較検討した結果、96サンプル



同時処理可能なThermo Scientific™ Kingfisher™ Presto™ Purification Systemを選びました。この製品は他社の自動分注装置ともスムーズに連結でき、サンプルをセットすれば質量分析用の酵素処理までを最大96サンプル自動精製します。これまでに官民研究開発投資拡大プログラム(PRISM)の『新薬創出を加速する人工知能の開発』におけるエクソソームのプロテオーム解析の一環として1000検体以上を精製しましたが、超遠心法よりも高純度かつ再現性よく質量分析に適したサンプルが得られました」(足立氏)。

### 今後の発展について

「私たち創薬標的プロテオミクスプロジェクトの目的は、最先端のプロテオミクス技術を用いて、主に臨床検体を材料として新規創薬標的を発見することです。その一環としてエクソソームだけでなく、がんのシグナルを伝えるリン酸化タンパク質の解析技術の向上にも取り組むことで、疾患を深く理解し、創薬研究をサポートしていきたい」と足立氏は最後に語ります。

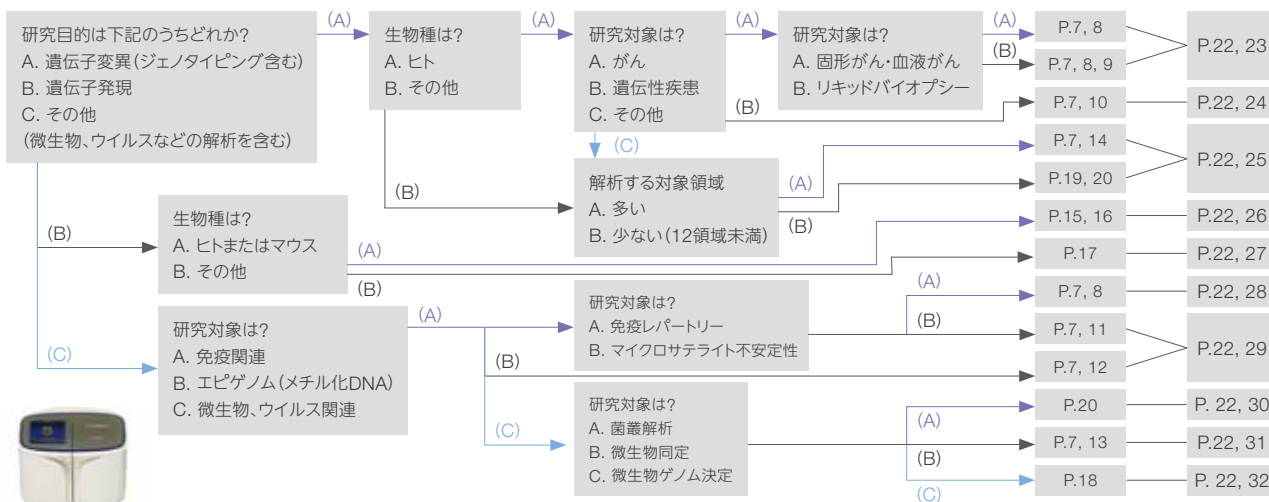


これから次世代シーケンス(NGS)を始めたいけど、自分に合うアプリケーションが分からない方に向けて、Ion Torrent Application Guideを作成しました。このガイドブックではIon Torrent 次世代シーケンサを用いたがん研究や感染症研究など、NGSの基本的な概念からそれぞれのアプリケーションの特徴や必要な試薬、データ解析の概要までを紹介しています。これからNGSを始める研究者必見の内容です。

**Point 1**

### フローチャートでアプリケーションを確認!

最初に自分に合ったアプリケーションの情報ページをフローチャートに従って確認します。



**Point 2**

### NGSアプリケーションとアプリケーション別データ解析の概要を30ページにわたって解説!

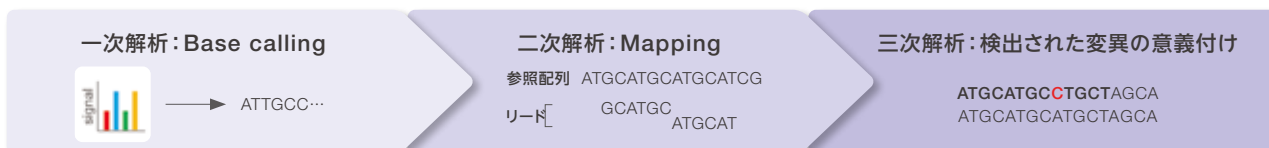
実験の流れに沿って、実際に行う作業を目的別に詳しく解説しています。

#### Ion Torrent NGSワークフロー



Ion Torrent NGSの基本的なワークフローのほか、苦手意識を持ちがちなデータ解析部分について基本原理から解析方法までをわかりやすく解説しています。

#### データ解析フロー概要



Ion Torrent Application Guide ダウンロードはこちらから → [thermofisher.com/jp-ngs-appguide](http://thermofisher.com/jp-ngs-appguide)

#### すでにNGSを実施中の方へ!

遺伝性疾患、感染症、細菌叢、がん研究などキットや論文情報を掲載した各種テクニカルハンドブックをご参照ください。テクニカルブックはこちらから → [thermofisher.com/jp-ngs-techbook](http://thermofisher.com/jp-ngs-techbook)



杉山大介 氏(名古屋大学医学系研究科・分子細胞免疫学 助教)

## がん患者の免疫反応をサイトカインや液性因子量によって評価するために ヒト血清中の微量なTGF-βタンパク質をリアルタイムPCR法で定量



がんの新たな治療法として期待される免疫療法。免疫チェックポイント分子を標的とした治療法の開発やがん細胞がつかさどる免疫抑制機構を選択的に解除する研究などが精力的に進められています。名古屋大学の杉山大介氏は、「がん免疫療法のさらなる発展には、治療効果を客観的に評価し、薬剤の層別化や複数の治療法の効果的な組み合わせにつなげることが必要です。その指標として免疫反応に関与する生体内のサイトカインや液性因子の量的変化を測定するアッセイ系を現在構築しています」と語ります。杉山氏にアッセイ系として新たに使い始めたリアルタイムPCR法を利用したInvitrogen™ ProQuantum™ イムノアッセイの評価を伺いました。

### 微量なTGF-βを簡便に定量するために

「現在、研究室のプロジェクトとして、数百症例のがん患者さんの血清中に存在する17種類ほどのサイトカインや液性因子を定量するアッセイ系の構築を担当しています。測定するサイトカインのほとんどはビーズベースのマルチプレックスアッセイで定量できますが、問題なのは微量なTGF-βの定量でした」と杉山氏は語り始めます。「多く

のメーカーのELISA用マニュアルを調べましたが、TGF-βは他の因子の定量法とは異なり、塩酸処理と中和反応などの煩雑な前処理が必要でした。しかし数百検体中の微量なTGF-βを定量するためには高感度はもちろんのこと、簡便なアッセイ系が適しています。調べていくうちにProQuantum イムノアッセイというキットに目が止まりました」と杉山氏。「最初はリアルタイムPCRを使って、本当にタンパク質のTGF-βを定量できるのか半信半疑でした」と続けます。

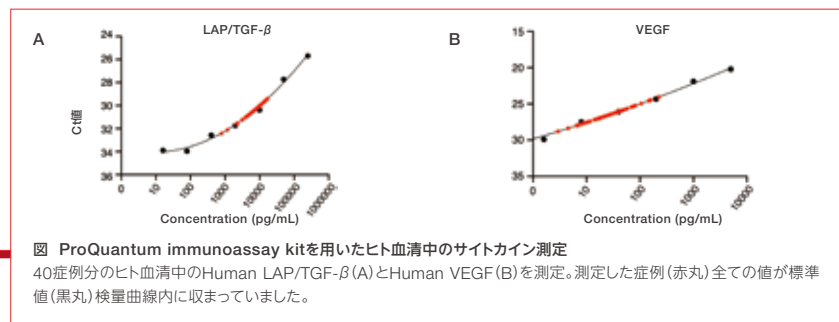
### リアルタイムPCR法で タンパク質を定量する利点

ProQuantum イムノアッセイは、異なるオリゴDNAをコンジュゲートした2種類の抗体ペアを標的タンパク質に結合させ、同じタンパク質に結合したオリゴDNA同士をリンカーでライゲーションしてつなぎ合わせ、そのDNA領域をリアルタイムPCR法で定量します。PCRで増幅するので感度が高く、ダイナミックレンジも一般的なELISA法が2 log程度なのに対して5-6 logと広いことが特徴です。「試しにTGF-βを定量したところ、確かに感度も高く、従来法のELISA法とも相関性が高いことを確認しました(図)。別の液性因子のVEGFでも同等の結果を得ています。とにかくこの方法で

は煩雑な前処理が必要なく、操作が簡便なのが助かります。ELISA法では抗体反応と洗浄作業を繰り返す必要があり、ステップごとに注意深く行うなど熟練が必要です。しかしProQuantum イムノアッセイは最初に1時間ほど抗体と反応させて、試薬をいくつか添加してライゲーションさせてリアルタイムPCRシステムにセットするだけ。初心者でも再現性が高い結果が得られますね」と杉山氏。「またELISA法と比較して、検体量が少ない点も重宝しています。ヒト検体を扱う場合に注意すべきことは、検体採取は一回限りという事。繰り返して行える動物実験とは異なります。アッセイに使う検体量を抑えることで、貴重な検体を有効利用できます」と(杉山氏)。

### 今後の研究に向けて

「がんの免疫療法の効果を高めるプロジェクトに取り組みながら、私自身は『がんの予防』にも興味を持っています。免疫反応を活性化させることでがんを予防できないかなど、さまざまなアプローチを思い描いています。その実現のためにも、がんの進行や抑制に関与する免疫反応をサイトカインや液性因子を指標に評価することは役立つと考えています」と杉山氏は最後に語ります。



## ProQuantum イムノアッセイ リアルタイムPCRを利用する高感度イムノアッセイシステム

Invitrogen™ ProQuantum™ イムノアッセイは革新的なProximity Ligation Assay(PLA®)技術を応用し、抗原-抗体結合の特異性とTaqMan® アッセイによるリアルタイムPCRの増幅能力を組み合わせました。タンパク質の高感度定量システムとして、簡単な操作で少ないサンプル中の低濃度タンパク質を定量します。

- 高感度:従来法よりも高感度で少量のタンパク質を検出
- 迅速、簡便で洗浄不要なワークフロー
- 広いダイナミックレンジ: ≥5 logの幅広いダイナミックレンジを実現。
- 専用機器の購入が不要:汎用的なリアルタイムPCR装置に対応
- 少ないサンプル量で検出可能:2-5 μLのサンプルで検出可能



| 製品名                                       | サイズ   | 製品番号   | 価格       |
|---|-------|--------|----------|
| Human LAP/TGFb ProQuantum Immunoassay Kit | 96 回分 | A45730 | ¥111,300 |

\*約60種類のラインナップを揃えています。最新情報はリンクからご確認ください。

# キャピラリー電気泳動ベースの遺伝子解析システムポートフォリオ 必要なスループットで高品質なデータを生成

## POINT

長年にわたる実績を有する当社遺伝子解析システムは、キャピラリー電気泳動によるサンガーシーケンスやフラグメント解析のための信頼のスタンダードシステムとして多くの研究に貢献してきました。

当社は常に技術革新に取り組み、多様な研究ニーズを満たすように設計されたポートフォリオを充実させています。

どの製品も通常のサンプルから解析困難なサンプルまで、簡便性、拡張性、スピードに優れたジェネティックアナライザシステムです。

## ▶ 豊富なラインアップ

用途やスループットなど、研究のニーズに合わせて選べます。

|                               | SeqStudio Flex シリーズ<br>ジェネティックアナライザ   | SeqStudio<br>ジェネティックアナライザ   | 3500 シリーズ<br>ジェネティックアナライザ  | 3730 シリーズ<br>ジェネティックアナライザ   |
|-------------------------------|---|---|--|---|
|                               |  |  |  |  |
| キャピラリー数(本)                    | 8または24  | 4   | 8または24   | 48または96   |
| キャピラリー長(cm)                   | 36、50   | 28  | 36、50  | 36、50   |
| サンプル容量                        | 4プレート搭載可<br>・96ウェルプレート<br>・384ウェルプレート<br><br>8連チューブ互換性有                           | 1プレート搭載可<br>・96ウェルプレート<br><br>8連チューブ互換性有  | 2プレート搭載可<br>・96ウェルプレート<br>・384ウェルプレート<br><br>8連チューブ互換性有                            | 16プレート搭載可<br>・96ウェルプレート<br>・384ウェルプレート  |
| 継続的プレートローディング                 | あり  | なし  | なし   | なし  |
| サンプルの優先順位付け                   | あり  | なし  | あり   | なし  |
| ポリマーの種類                       | POP-4 Polymer<br>POP-6 Polymer<br>POP-7 Polymer                                   | POP-1 Polymer   | POP-4 Polymer<br>POP-6 Polymer<br>POP-7 Polymer                                    | POP-6 Polymer<br>POP-7 Polymer  |
| RFIDタグでの消耗品管理                 | あり  | あり  | あり   | なし  |
| 制御方法                          | タッチスクリーン付き<br>内蔵コンピューター   | タッチスクリーン付き<br>内蔵コンピューター   | 外部デスクトップ<br>コンピューター  | 外部デスクトップ<br>コンピューター   |
| 接続性                           | USB、イーサネットポート、<br>Wi-Fi ドングル  | USB、イーサネットポート、<br>Wi-Fi   | イーサネットポート  | イーサネットポート   |
| 21 CFR Part 11に<br>準拠した SAE機能 | あり  | あり  | あり   | なし  |

## ▶ サンガーシーケンシングハンドブック(無料テクニカルガイドブック)

ワークフローからアプリケーションまで、サンガーシーケンスの基本原則が詰まった日本語ハンドブックを無料でダウンロードできます。

ダウンロードはこちらから → [thermofisher.com/cehandbook](https://thermofisher.com/cehandbook)



## お知らせ

Applied Biosystems™ 3130 ジェネティックアナライザの試薬消耗品は、  
2022年12月31日をもって販売終了いたします。



井内敦子 氏、阿相幸恵 氏、齊藤裕子 氏 (理化学研究所バイオリソース研究センター実験植物開発室)

## 植物バイオリソースの品質管理を遺伝子解析で確実に SeqStudio Flex システムの柔軟なサンプルセットを効率的に活用



理化学研究所バイオリソース研究センターは日本のバイオリソース事業の中核拠点としてバイオリソースの収集・保存・提供しています。実験植物開発室では、代表的な実験植物のシロイヌナズナとミナトカモジグサの種子のほか、多様な植物の培養細胞や遺伝子材料などをとり扱っています。「シロイヌナズナでは570系統の野生種の種子や25万個の完全長cDNAクローンを保持しており、リソース利用希望者への提供時や定期的な品質管理のために遺伝子型解析で系統を正確に確認しています」と井内氏は話します。植物のバイオリソースの品質管理担当者の方々に新しく導入したキャピラリーシーケンサのApplied Biosystems™ SeqStudio™ Flex ジェネティックアナライザの活用や従来機種とのApplied Biosystems™ 3130xl ジェネティックアナライザとの比較について伺いました。

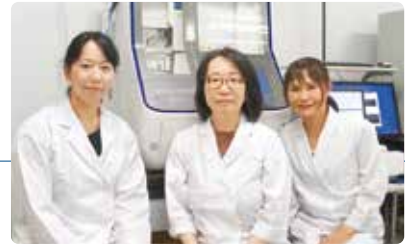
### 植物の系統を遺伝子型解析で確認

「これまで 2台の3130xl システムを使ってきましたが、2022年末でサポート終了となるため、新しくSeqStudio Flex システムを導入して植物のバイオリソースの品質管理に使用しています。シロイヌナズナの系統の遺伝子型解析では、16か所のSSR領域についてフラグメント解析を行います。SSRは個人識別で用いられるSTRと同じような

短い塩基のリピート配列です。十数年前の3100から3130xl システムへの機種変更時には、フラグメントの泳動パターンが異なり、とても苦労しました。そこで今回も事前に従来機種と比較しましたが、キャピラリーを36cmから50cmに長くしたにも関わらず、泳動パターンはほぼ同じでした。これまでのデータと一致したのでとても助かりました」と井内氏と齊藤氏は語ります。さらに「バイオリソース事業では多検体の品質管理を行っているので、ハイスループットなSeqStudio Flexシステムを導入できたことで作業効率が良くなりました。また、品質検査は一連の流れで4、6または8検体の単位で扱うことが多いので、24本というキャピラリーは作業の流れに沿って正確に品質検査の結果を得られます」と齊藤氏は続けます。

### シーケンシング解析も精度よく実施

「培養細胞は、年に1回、DNAバーコーディングで用いられるrbcL遺伝子等の特定領域をシーケンスして、継代している細胞に間違いがないか、前年と同じ結果になるかどうかを分担して確認しています。シロイヌナズナの完全長cDNAクローン等の遺伝子材料は、提供の際にシーケンスを確認してデータと共に提供しています」と阿相氏。「シーケンスに関しても従来機種と比較しましたが、まだ解析回数は少ないものの、C



左から阿相氏、齊藤氏、井内氏

が連続するpolyC配列や、polyC配列の後に更に連続配列が続くような特徴のある配列では、SeqStudio Flexシステムのベースコールが改善していました。従来機種ではピークが連なりうまく分離できずにミスコールになっていたのが目視での再確認が必要でしたが、新しい機種ではピーク分離が改善され、自動でベースコールができました。客観性が高いデータなので提供時も安心です」と続けます。

### 利点はフレキシブルなプレートセッティング

最後にSeqStudio Flexシステムで最も気に入っている点を伺いました。「以前はランをスタートさせる前に、他のスタッフと事前の打ち合わせを行い、すべてのサンプルがそろってからスタートしていましたが、このシステムでは誰かがランをスタートしていても、好きな時に自分のサンプルプレートを追加できます。フラグメント解析の後に続けてシーケンス解析を行ったり、急ぎの場合にはプレートを入れ替えたり、柔軟に使える点が便利ですね。定期検査とオンデマンドの提供前検査が切れ目なく進行することにより、業務効率の向上を期待しています」と3人は語ります。

## SeqStudio Flex ジェネティックアナライザ

# 最大4プレートをいつでもフレキシブルにランセット



Applied Biosystems™ SeqStudio™ Flex ジェネティックアナライザは、ミドルスループットのサンプル数に対応し、信頼性の高い結果を提供します。使いやすい柔軟性も備えた新しいキャピラリーシーケンサです。

- 消耗品を簡単にセットでき、RFIDタグで管理も簡単
- 最大4プレートを搭載し、ラン中のプレートロードに柔軟に対応
- 装置の起動はボタン1つ、タッチスクリーンで簡単操作

| シーケンスランモジュール    | キャピラリー長 (cm) | ポリマーの種類       | ラン時間 (分) | KB BasecallerCRL (bp) |
|-----------------|--------------|---------------|----------|-----------------------|
| 最短 ShortReadSeq | 50           | POP-7 Polymer | 30       | ≥ 300 (QV20)          |
| 最長 StdSeq       | 50           | POP-7 Polymer | 125      | ≥ 850 (QV20)          |

| 製品名  | 製品番号                | 価格          |
|--|---------------------|-------------|
| SeqStudio 8 Flex ジェネティックアナライザ シーケンシング解析 コンピュータ付システム (2年保証)         | SEQ8FLEX150-D-BA01  | ¥24,000,000 |
| SeqStudio 8 Flex ジェネティックアナライザ シーケンシング&フラグメント解析 コンピュータ付システム (2年保証)  | SEQ8FLEX250-D-BA01  | ¥25,220,000 |
| SeqStudio 24 Flex ジェネティックアナライザ シーケンシング解析 コンピュータ付システム (2年保証)        | SEQ24FLEX150-D-BA01 | ¥29,800,000 |
| SeqStudio 24 Flex ジェネティックアナライザ シーケンシング&フラグメント解析 コンピュータ付システム (2年保証) | SEQ24FLEX250-D-BA01 | ¥30,750,000 |

# 細胞培養の歴史とともに60年!

1962年、Gibco™ ブランドは米国ニューヨーク州グランドアイランドのファーガソン夫妻の農場から誕生しました。

現在、Gibco設立60周年を記念して、さまざまなイベントを実施中です。

Gibco 60周年のインタビュー動画や細胞培養に役立つハンドブックはこちらから → [thermofisher.com/jp-gibco-customervideo](https://thermofisher.com/jp-gibco-customervideo)

## Special Interview No.4

### 遺伝子・細胞製剤の製造管理の基盤となる細胞研究を推進

川真田 伸 氏

(神戸医療産業都市推進機構 細胞療法研究開発センター センター長)



#### ■ 研究人生におけるハイライトを3つ教えてください。

私たちは幹細胞とその分化を研究しています。1つ目は、iPS細胞やES細胞の未分化性を維持するキヌレニンという因子の発見、さらに幹細胞が分化を開始するときに分泌する2-アミノアジピン酸という分化マーカーの発見です。2つ目は、CHD7というクロマチンのリモデラーが幹細胞の分化におけるキーファクターであることを発見したこと。CHD7はヒトではチャージシンドロームの原因遺伝子です。3つ目は、臨床研究と基礎研究における考え方の違いに気づいたこと。臨床研究では失敗がゼロということはないので、リスクをどう管理するのか、リスクマネジメントが一番大事だと気づきました。

#### ■ 現在細胞を使った研究で最も力を入れていることを教えてください。

幹細胞の未分化性維持と分化開始という、2つの相反する現象を扱っています。どういったきっかけで分化が始まるのか、CHD7というマーカーを見つけたのですが、それだけではなくミトコンドリア活性が大きく関与していることが分かりました。ミトコンドリアの活性の度合いは老化にもつながっています。老化や分化という現象を、ミトコンドリアを軸にして、CHD7などの因子を絡めながら研究を進めたい。それを通して分化とは何か、ヒトはどうやって老化していくのかを理解できればと思っています。

#### ■ Gibco製品で印象に残っていることや思い出を教えてください。

多能性幹細胞の維持にGibco™ Essential 8™ 培地を主に使っています。またディッシュコーティングにはGibco™ Vitronectin N



を使っています。未分化な状態で培養していても、必ずどこか一部に分化細胞が出てきます。Vitronectin Nは接着が弱めなので、接着力が弱くなる分化細胞のセレクションに適しています。パッセージごとに未分化の細胞を選別でき、それが面白い特徴だと思います。Essential 8 培地は、主に砂糖(グルコース)からなるシンプルな組成で、こちらも私たちの研究にとっても適しています。未分化細胞やがん細胞はグリコリティックで解糖系が優位なので、なるべくミトコンドリアを活性化しない環境で細胞を解析することが多いからです。どんな因子が未分化維持に必要なか、あるいはどういう時に分化が始まるのか、明快に調べることができません。ですからこの2つの製品が、私にとって最強の組み合わせです。

#### ■ 細胞研究における今後10年の展望を聞かせてください。

再生医療への期待は大きく研究も進められていますが、実医療への展開にはまだ距離があ

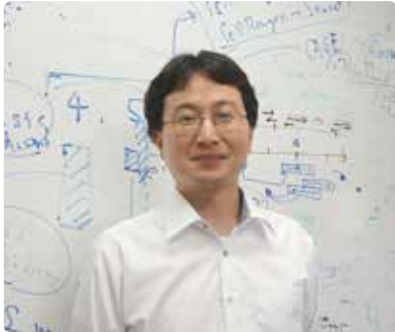
ります。一方、細胞を薬のように使う細胞製剤の実用化が進んでいます。例えばがん免疫治療の場合、従来のように細胞をそのまま使うのではなく、遺伝子編集やHLA遺伝子をノックアウトして他家にも使えるようにしています。今後、遺伝子編集、幹細胞、がん免疫という3領域が、1つの融合領域として大きな治療法になると想定されるので我々の研究もその領域に集中しています。

#### ■ 最後に一言お願いします。

細胞は培地がないと増えません。ということは培地が細胞を選んでいるとも言えます。ヘテロな細胞集団は培養していく間に、ある程度均一化していきます。ですから培地を変えることでいろんな細胞を作れる可能性があります。私は細胞治療用の細胞規格の統一化を目指していますが、培地開発によってより良い細胞が作れるという、逆転の発想が生まれてきました。そういう意味でGibco培地の今後の発展を大いに期待していますし、一緒に歩んでいきたいと思っています。

村川泰裕 氏 (京都大学ヒト生物学高等研究拠点 教授)

## 網羅的RNAシーケンスから新たなヒト遺伝子の発見へ CAGE法やCollibri Stranded RNAライブラリ調製キットで転写ユニットを特定



「2000年初頭のヒトゲノム解読プロジェクトを基にヒト遺伝子の数が約2万と想定されました。しかし単なるDNA配列情報だけでは、実際に細胞で機能する遺伝子やその制御機構までを把握できません。私たちは個々の細胞で環境に応じて発現している遺伝子を捉えるために、転写ユニットを見極めつつ網羅的にRNAシーケンスを実施しています。するとこのアプローチから新しい遺伝子が次々に見つかり、ヒト遺伝子数は当初の予測よりも大きく増加すると予想しています」と京都大学の村川泰裕氏は語ります。村川氏にRNAベースの遺伝子同定法とInvitrogen™ Collibri™ Stranded RNA ライブラリ調製キットの活用について伺いました。

### 細胞内で働いている遺伝子を捉える

「ヒトを構成する個々の細胞では、その種類や環境に応じて異なる遺伝子セットが発現しています。現在、私たちは500種のヒト細胞から約1000個のRNAライブラリを作製し、RNAシーケンスを進めてい

ます。RNAベースで遺伝子を探索すると、既知のデータベースには何もない領域から次々と遺伝子が見つかってきます。例えば遺伝子と遺伝子の間や、タンパク質をコードするDNA鎖の相補鎖から逆向きに別の遺伝子が見つかってきます。逆向き遺伝子の例としては、すでに腎細胞がん特有の遺伝子が報告されています。通常鎖はハウスキーピング遺伝子のコーディング領域ですが、腎細胞がんでのみ、相補鎖から逆向きのRNAが発現しており、早期発見が難しい腎臓がんのバイオマーカーとなる可能性があります。RNAベースで遺伝子を探索することで、疾患や細胞固有の機能と関連した遺伝子が見つかる可能性は高い」と村川氏は話します。

### 「頭からお尻まで」確認して遺伝子を特定

「実際にRNAベースで遺伝子を特定するためには、転写開始点の『頭』とその終点となる『お尻』を確認することが基本です。転写開始点は理化学研究所が独自に開発したCAGE法で確認しますが、問題は転写終末のpoly-A tailを見極めること。また逆向き遺伝子の探索には、鎖の向き(ストランド)情報が保持された状態でRNAライブラリを作製する必要があります。いくつかのストランド特異的なキットを試したところ、一方向にしか転写されない既知遺伝子に対して、0.1から数%の割合で逆向きの配列がノイズとして検出されました。逆向き遺伝子は希少なので、この程度のノイズは無視できません。さらに別キットで検証を進めるとCollibri Stranded RNA ライブラリ調製キットがノイズを極

限まで抑えることを確認しました。他社キットでは逆転写後にアダプターを付加することが多いですが、このキットは断片化したRNAの段階で両端を区別するアダプターを付加してライブラリを作製していくのでストランドが正しく保持され、しかもpoly-A tailの連結部までをシーケンスできました。このキットとCAGE法やロングリードシーケンス技術等を組み合わせることでデータの質を確保しています」と村川氏は語ります。

### 遺伝子の制御地図の作成、 そしてヒトゲノムの理解を目指して

「私の最終的な目標はヒトゲノムの全貌を理解すること。それにはDNA配列だけでは不十分で、ゲノム情報を基に細胞が遺伝子をどう使っているか、遺伝子スイッチの作動原理やヒト特有の複雑なネットワークを理解したい。これまでにプロモーターを網羅的に検出するCAGE法を改良して、エンハンサーを精度よく捉えるNET-CAGE法を開発し、7万か所のエンハンサーと5万か所のプロモーターを検出しました。すべての情報を統合して異なる細胞ごとに遺伝子制御のネットワークを遺伝子制御地図として描いていく予定です。ヒトゲノムは単なる一次元の配列ではなく、そこには細胞ごとに異なる遺伝子制御地図が有機的に分布しているはず。新たな視点からヒトゲノムを俯瞰することで、新しい科学的概念や革新的医療を生み出し、さらにはヒトになっていくための遺伝子の発見につなげたい」と村川氏は最後に語ります。

## Collibri Stranded RNA ライブラリ調製キット トランスクリプトームの多様性を維持

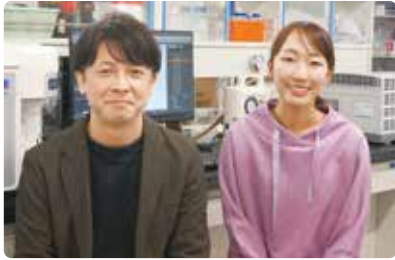
Invitrogen™ Collibri™ Stranded RNAライブラリ調製キットは、アダプターをRNAに直接付加する独自のプロトコルにより、ストランド情報を保持したままsmall RNA、コーディングRNA、ノンコーディングRNAを含む全トランスクリプトームのシーケンスに適しています。Illumina社製次世代シーケンシング(NGS)システム用のライブラリ調製キットとして全ゲノムシーケンシング、RNAシーケンシング、ライブラリ定量、増幅用の4種類のキットを提供し、試薬の色で各ステップを視覚的に確認できます。



| 製品名   | サイズ   | 製品番号      | 価格       |
|---|-------|-----------|----------|
| Collibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina Systems, with human/mouse/rat rRNA depletion kit and UD indexes | 24 反応 | A39005024 | ¥310,000 |

## ドラッグデリバリーシステム評価系の開発をAttune NxT Flow Cytometerで試行

板垣 舞 氏(神戸学院大学大学院薬学研究科薬物送達システム学研究室博士課程) / 亀井敬泰 氏(神戸学院大学薬学部薬物送達システム学研究室講師)



### 研究の概要を教えてください。

研究室全体のテーマはドラッグデリバリーシステム(DDS)であり、吸収されにくい薬物の腸管吸収を高めたり、薬物が届きにくい脳などへ薬物を届けたりするための技術開発などに取り組んでいます。例えば薬物をナノ粒子や膜透過性ペプチドなどのキャリアと複合体形成させて、目的の細胞や組織に効率的に取り込ませる研究を進めていますが、DDS技術開発の基盤として細胞や組織が薬物を取り込むメカニズムや取り込み効率を正しく評価する系の開発も行っています。

### 今回の実験の目的を教えてください。

細胞が薬物を取り込むメカニズムとして、複数のエンドサイトーシス経路が想定されており、取り込む物質の種類や大きさや分子機構の違いからクラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス等に分類されます。今回、私たちは効果的なキャリア開発や取り込み効率の向上を客

観的に評価するために、主に3種類の経路特異的な既知のマーカー分子を蛍光標識して、報告済みの約10種類のエンドサイトーシス阻害剤との関連をInvitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometerで調べました。その結果、論文通りにエンドサイトーシスの経路特異的に阻害する分子もありましたが、濃度や条件が論文とは異なる分子もあり、汎用性のある評価系を開発する必要性を感じました。

### Attune NxT Flow Cytometerの使用感はいかがでしたか？

これまで共同利用機器室に長年設置されている2レーザーのフローサイトメーターを単色で使っていました。Attune NxT Flow Cytometerでは3種類のマーカーを異なる蛍光で標識して同時に測定しましたが、従来機種による単色での個別測定と同じ結果が得られることを確認しました。Attune NxT Flow Cytometerでは3回の実験を1回にまとめることができ、しかも再現性が高いので実験の効率が向上します。具体的な実験フローは、24ウェルプレートに培養した細胞に蛍光標識したマーカーを添加して異なる条件で1時間ほど取り込ませた後に、細胞を剥がして測定します。順調にいけば、サンプル調製を含めて約20サンプルの解析が4-5時間、測定だけなら1-1.5時間程度で終了します。これまでより感度が高いので、ネガティブコントロールとの差ははっきりと検出でき

ました。またセットアップとシャットダウンに手間がかからず、終了時に60分間自動洗浄することでサンプル詰まりなどのトラブルがなく助かりました。特に薬物透過性研究に汎用されるヒト腸管上皮細胞のCaco-2細胞は粘稠性が高いので共通機器室のフローサイトメーターの使用を躊躇していました。今回試しにAttune NxT Flow Cytometerで測定したところ、詰まらずに測定できた点も評価しています。全体的な操作性では、システムの画面操作が直感的なので時間をかけずに使いこなせる点や自動コンペンセーション機能が役立ちました。経験が浅い学生でも使いやすいと思います。気軽に使えるので、10週間のプログラム期間中は週に2-3回程度使いました。

### 今後の予定を教えてください。

3種類の蛍光標識マーカーの取り込みに関しては問題なく測定できました。今後は同一サンプルでクラスリンを始め、エンドサイトーシス経路に関わるタンパク質の発現変化と取り込みの関係を追跡したいと思っています。そのためには細胞固定後に標的タンパク質を蛍光免疫染色する必要がありますが、今回、この系も数回試しました。まだ完全ではありませんが、いくつかの改善点を確認できています。さらに検証を進め、エンドサイトーシスを介する薬物の吸収メカニズムの解析や標準的な評価系を *in vitro* の系で確立したいと思っています。

## Attune CytPix Flow Cytometer

## 高速カメラ搭載の革新的なマルチカラーフローサイトメーター

ハイスループットで高精度の解析を実現するInvitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometerにハイスピードカメラを搭載した新しいモデルが登場しました。Invitrogen™ Attune™ CytPix™ Flow Cytometer は、蛍光シグナルと明視野画像を同時に取得できる優れたフローサイトメーターです。



- 最大 1,000 µL/min の高いサンプル処理能力
- 最大 6,000 images/secで明視野画像を取得可能
- ハイスループットでも一貫した画像品質

※1 他にblue/red、blue/violet、blue/violet 6 レーザーの組み合わせもあります。

※2 他にblue/red/violet、blue/red/violet 6 レーザーの組み合わせもあります。

※3 他にblue/red/violet 6/yellow レーザーの組み合わせもあります。

| 製品名  | サイズ | 製品番号      | 価格          |
|--|-----|-----------|-------------|
| Attune CytPix Flow Cytometer, blue/yellow(1年保証)*1            | 1 式 | A48661-S1 | ¥14,000,000 |
| Attune CytPix Flow Cytometer, blue/red/yellow(1年保証)*2        | 1 式 | A48655-S1 | ¥19,700,000 |
| Attune CytPix Flow Cytometer, blue/violet/yellow(1年保証)       | 1 式 | A48656-S1 | ¥18,700,000 |
| Attune CytPix Flow Cytometer, blue/red/violet/yellow(1年保証)*3 | 1 式 | A48652-S1 | ¥23,700,000 |

# 同定まで約5時間! 遺伝子解析による微生物同定・系統解析ツール

POINT

Applied Biosystems™ MicroSEQ™ 微生物同定システムは、遺伝子解析法を採用することにより、その日のうちに微生物を同定します。従来の培養法は時間がかかり、経験や熟練が必要でしたが、このシステムを使えば、手技者の主観や微生物の状態に依存せず、細菌および真菌を明確に同定します。本システムは、DNAシーケンサ、サーマルサイクラー、試薬キット、ソフトウェア、バリデート済みデータベースを含むトータルシステムです。

- 客観性: ソフトウェアによる自動解析・同定で客観的に解析
- 簡便性: シンプルなワークフロー
- 再現性: 分析者や日時が異なっても同じ結果を提供
- 迅速性: その日のうちに結果を確認



## 迅速かつシンプルなワークフロー

標準化された単一の手順を使用して、細菌および真菌両方の分離株を同定します。反応に必要な酵素、プライマーなどのコンポーネントが全て入っているReady-to-Useのプレミックス試薬を使用し、作業者による分注ミスを低減します。



推奨機器

- Applied Biosystems™ VeritiPro™ サーマルサイクラー

推奨機器

- Applied Biosystems™ 3500 | 3500xl ジェネティックアナライザ
- Applied Biosystems™ SeqStudio™ ジェネティックアナライザ

## 遺伝子解析法による信頼性の高いデータ

MicroSEQ微生物同定システムでは、rRNA遺伝子シーケンシングの後、その結果をバリデート済みのシーケンスデータベース(ライブラリ)と自動的に比較し、相同性の高い菌種リストを表示します(図)。

[ ライブラリ製品一覧 ]

- MicroSEQ ID 16S rDNA 500 Microbial Library, v2019(2,071菌種)
- MicroSEQ ID 16S rDNA Full Gene Library v2.0(1,262菌種)
- MicroSEQ ID Fungal Gene Library, v2018(1,737菌種)
- MicroSEQ ID 16S rDNA 500 Supplemental Library, v2019(7,645菌種)

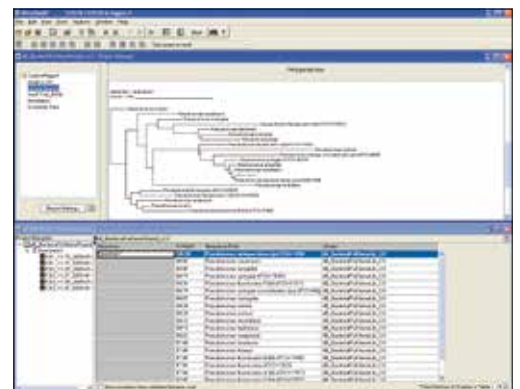


図 ソフトウェアの操作画面

| 製品名  | 製品番号   | 価格         |
|--|--------|------------|
| MicroSEQ ID Microbial Identification Software, version 3.1.3*1 | A47132 | ¥3,444,000 |
| MicroSEQ ID Software for SeqStudio Genetic Analyzer v1.0*2     | A50113 | ¥2,923,200 |
| MicroSEQ ID Microbial Identification Software v3.1.3, Lite*3   | A47263 | ¥1,148,000 |

上記製品は全て1ライセンス、ライブラリなし。 ※1 3500専用。21 CFR Part11に準拠し、プレート設定から結果解析までを一貫して実施可能  
 ※2 SeqStudio専用。21 CFR Part11に準拠し、プレート設定から結果解析までを一貫して実施可能 ※3 解析用ソフトウェア

2022年10月開設!

## 再生医療クリエイティブ・エクスペリエンス・ラボ: T-CEL

サーモフィッシャーサイエンティフィックジャパングループ本社(東京都港区芝浦)に、再生医療クリエイティブ・エクスペリエンス・ラボ(Thermo Fisher Scientific Creative Experience Lab for regenerative medicine: T-CEL)を開設いたします。T-CELは、再生・細胞医療・遺伝子治療に特化した最先端のトータルソリューションラボです。ぜひご利用ください。



### point

- ラボエリアで最新のトータルソリューションを体験
- ラウンジエリアでラボの立ち上げから受託製造までをエキスパートとディスカッション
- 最新技術、市場トレンド、実験や製造に関する技術セミナーとハンズオントレーニングの実施

詳細はこちらから → [thermofisher.com/jp-tcel](https://thermofisher.com/jp-tcel)

### NEXT 9月号はいかがでしたか?

特集インタビューは、自治医科大学教授の村松慎一氏に遺伝子治療用のアデノ随伴ウイルスベクター開発や今後の発展について伺いました。村松氏は、これまで根治的な治療法がないとされてきた遺伝子疾患だけでなく、パーキンソン病やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)等へ応用研究にも取り組んでいます。そして今回も多くの製品ユーザーの方を取材しています。新製品のデジタルPCRシステムのテクニカルレビューやシーケンサの製品情報等もぜひお役立てください。

読書アンケートでご感想やご意見をお寄せください。→ [thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT\\_reader](https://thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT_reader)



photographs: mitsuhiro koyama(p.02-03) / art direction & design: opportune design inc. / editing: yuko hashimoto

**NEXT** バックナンバーは、こちらから → [thermofisher.com/NEXT](https://thermofisher.com/NEXT)

研究用にも使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

記載の価格は2022年9月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。●実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

●価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。●標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc) LSG107-A2209HS

サーモフィッシャーサイエンティフィック  
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ [jptech@thermofisher.com](mailto:jptech@thermofisher.com)  
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584  
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://facebook.com/ThermoFisherJapan) [@thermofisherjp](https://twitter.com/thermofisherjp)  
[thermofisher.com](https://thermofisher.com)

販売店