

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic science and platform technology program for innovative biological medicine

研究開発課題名： (日本語) ゼノ核酸アプタマー創薬基盤技術の開発
(英語) Development of core technology for therapeutic xeno-nucleic acid aptamers

研究開発担当者 (日本語) 群馬大学 大学院理工学府 准教授 栗原正靖
所属 役職 氏名： (英語) Gunma University, Associate Professor, Masayasu Kuwahara

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

核酸ヌクレオシド部位への化学修飾は、一般に、核酸分解酵素への耐性を高め、修飾基の化学構造によっては相補配列の核酸鎖と非常に安定なハイブリッドを形成するため、核酸医薬・診断薬への応用が図られている。本研究では、独自開発した改変ポリメラーゼを用いることで、糖修飾核酸ライブラリ(ライブラリ A)および異種修飾キメラ型ライブラリ(ライブラリ B)を高収率・低エラー率で与える系を構築することにそれぞれ成功した。作製したライブラリを標的タンパク質および非標的タンパク質をそれぞれポジティブ・セレクションおよびネガティブ・セレクションに用いて、各人工核酸アプタマーの取得を検討した。アフィニティ・分離系やセルソーターによるスクリーニング系の設計および最適化を行い、それらの系を用いて活性種の濃縮を行った。濃縮ライブラリからクロニングによる単離精製を行い、アプタマー配列をシーケンシングによりそれぞれ得た。さらに、個々の配列を酵素法によって調製し、キャピラリー・ゾーン電気泳動法による結合特性を検討している。細胞を標的とするセレクションでは、標的とする変異遺伝子発現ベクターを調製し、さらにこれを導入した安定性細胞株を作製した。当該安定細胞株と浮遊系細胞をそれぞれ標的として、ライブラリ A およびライブラリ B を用いたアプタマー・セレクション系を構築し、活性種の濃縮を検討している。さらに、患者検体でのプライマリーカルチャー作製の実験系も確立することができた。

Generally, the chemical modifications of the sugar moiety in nucleic acids can enhance the resistance to nucleases. In addition, depending on the introduced chemical structure, modified oligonucleotides can bind to the target DNA/RNA with complimentary sequences to form hybrids with improved thermostability. Therefore, their therapeutic and diagnostic applications are being tested. In this study, using originally developed polymerase variants, we have successfully developed a library of sugar-modified oligonucleotides (library A) and that of chimeric oligonucleotides with heterogeneous modifications (library B), both of which could provide high yields and low error rates. Using the target and non-target proteins for the positive and negative selections, respectively, artificial nucleic acid aptamers were acquired from these libraries. Conditions for the affinity separation and screening with the cell sorter were optimized, thereby enriching the active species. Aptamer sequences were isolated from the enriched libraries via the cloning method and were identified via sequencing. Furthermore, we examined the enzymatic syntheses of individual sequences and analyses of their activities using capillary zone electrophoreses. For aptamer selections of cell targets, we prepared vectors that encoded the target mutated genes and stable cell lines to which those genes were introduced. We examined the enrichment of the selected aptamers from the libraries A and B via constructions of aptamer selection systems for the stable cell lines and floating cells. Furthermore, the experimental system that employed the primary culture derived from tissue specimens collected from patients with the target disease was established.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌4件）

1. Fujita H, Kuwahara M*. Selection of natural and base-modified DNA aptamers for a camptothecin derivative. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 65: 9.10.1–9 (2016).
2. Hagiwara K, Kasahara Y, Fujita H, Kuwahara M*. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures-based affinity separation and selective enrichment of a long-length DNA aptamer. *Aust. J. Chem.* 69: 1102–1107 (2016).
3. Fujita H, Kataoka Y, Tobita S, Kuwahara M*, Sugimoto N. Novel one-tube-one-step real-time methodology for rapid transcriptomic biomarker detection: Signal amplification by ternary initiation complexes. *Anal. Chem.* 88: 7137–7144 (2016).
4. Okamura T, Nakajima Y, Katano-Toki A, Horiguchi K, Matsumoto S, Yoshino S, Yamada E, Tomaru T, Ishii S, Saito T, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Nagaoka R, Takada D, Horiguchi J, Oyama T, Yamada M. Characteristics of Japanese aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations. *Endocr J.* 64: 39-47 (2017).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Kuwahara M, “Xenonucleic acid aptamers: Development towards in vitro selection of artificial biopolymer ligands/receptors”, The 32nd International Symposium on Microscale

- Separations and Bioanalysis (MSB 2016) (Niagara-on-the-Lake, Canada), The Organizing Committee of MSB 2016, April 2016, 口頭, 国際.
2. Kuwahara M, “Unnatural nucleic acids and non-canonical nucleic acid structures for drug discovery and bioanalysis”, FIBER International Summit for Nucleic Acids 2016 (FISNA 2016) (Hyogo, Japan), Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University, July 2016, 口頭, 国際.
 3. Kuwahara M, “Novel isothermal method for nucleic acid biomarker analyses”, The First Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (Fukuoka, Japan), JSPS, September 2016, 口頭, 国際.
 4. Kuwahara M, “Signal amplification by ternary initiation complexes (SATIC) method for nucleic acid biomarker analyses”, Japan-Spain Joint Workshop on Nanomedicine Research (Madrid, Spain), AMED–MINECO–CSIC – ISCIII, December 2016, 口頭, 国際.
 5. Kataoka Y, Fujita H, Kuwahara M, “Synthesis and application of N³-modified thioflavin T derivatives”, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016) (Kumamoto, Japan), September 2016, 口頭, 国際.
 6. Fujita H, Kataoka Y, Kuwahara M, “Detection of nucleic acid biomarkers using thioflavin T analogs”, XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Paris, France) July 2016, ポスター, 国際.
 7. Fujita H, Hasegawa T, Imaizumi Y, Inoue Y, Kuwahara M, “Enzymatic preparation of bifunctional modified DNA aptamer and its binding properties”, XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Paris, France) July 2016, ポスター, 国際.
 8. Fujita H, Kataoka Y, Kuwahara M, “Facile DNA/RNA detections using tandem repeats of a G-quadruplex as amplicons”, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016) (Kumamoto, Japan), September 2016, ポスター, 国際.
 9. Hagiwara K, Kasahara Y, Fujita H, Kuwahara M, “Optimized conditions for separation of long length DNA aptamer-target complex using NECEEM and its application to selection methods”, International Conference on Single Cell Reserch 2016 (Tokyo, Japan), ポスター, 国際.
 10. 中島康代, 岡村孝志, 堀口和彦, 松本俊一, 登丸琢哉, 石井角保, 小澤厚志, 渋澤信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 各種コルチゾール産生腫瘍における GNAS 遺伝子変異の検討, 第 89 回日本内分泌学会学術集会, 2016/04/22, 口頭, 国内.
 11. 栗原正靖, 生命分子創製：核酸バイオマーカー検出法開発編, 第 19 回生命化学研究会, 2016/08/01, 口頭, 国内.
 12. 藤田博仁, 片岡由佳, 栗原正靖, 核酸バイオマーカー簡便検出法のための最近接塩基対パラメータに基づくプライマー配列設計, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/09/07, 口頭, 国内.
 13. 藤田博仁, 片岡由佳, 栗原正靖, 三者開始複合体形成によるシグナル増幅を用いた生体分子検出法の開発, 日本化学会第 97 春季年会(2017), 2017/03/16, 口頭, 国内.
 14. 藤田博仁, 片岡由佳, 栗原正靖, 三者開始複合体形成によるシグナル増幅を用いた遺伝子変異

検出法の開発, 日本化学会第 97 春季年会(2017), 2017/03/16, 口頭, 国内.

15. 萩原健太, 長野滯美, 藤田博仁, 星野秀和, 笠原勇矢, 小比賀聡, 栞原正靖, 固定化酵素を用いた人工核酸の合成, 日本化学会第 97 春季年会(2017), 2017/03/19, 口頭, 国内.
16. Kataoka Y, Fujita H, Kuwahara M, Creation of N3-modified thioflavin T derivatives for expansions of binding specificities, 日本化学会第 97 春季年会(2017), 2017/03/19, 口頭, 国内.
17. 藤田博仁, 井上裕介, 栞原正靖, 修飾 DNA アプタマーを用いた機能性フィブリンゲルの作製と細胞増殖に及ぼす効果の検証, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/09/08, ポスター, 国内.
18. 笠原勇矢, 星野秀和, 田中敬介, 笠井達郎, 小野寺健太郎, 栞原正靖, 小比賀聡, 改変ポリメラーゼによる 2',4'-BNA/LNA-5mCTP の取り込み能評価, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/09/07, ポスター, 国内.
19. 星野秀和, 笠原勇矢, 藤田博仁, 栞原正靖, 小比賀聡, 塩基部に嵩高い修飾を有する人工核酸を伸長可能な改変ポリメラーゼの開発, 日本核酸医薬学会第 2 回年会, 2016/11/15, ポスター, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 栞原正靖「核酸化学に基づく医薬・診断薬の創製」若手研究者フォーラム 2016 次世代バイオ医薬・再生医療を支える基盤技術開発(東京), ダイアログ株式会社, 2016 年 7 月, 国内.

(4) 特許出願

公開希望なし