

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

平成30年 6月18日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名		所属施設				
		金蔵孝介 (講師)	施設名	東京医科大学	所在地	東京都新宿区 新宿6-1-1	電話
研究課題	MNAzymeを用いた外来で可能なhuman papilloma virus検出法の開発						
研究目的	本研究では子宮頸癌の原因となるhuman papilloma virus (HPV)の感染の有無をMNAzymeを用いて外来で簡易に検出する検査法を樹立することを目的とする。子宮頸癌はその99%がhuman papilloma virus (HPV)の感染によって発症することから、HPVの感染の有無、特に強毒性HPVの感染の検出は女性の健康維持に極めて重要である。しかし、外来でHPVのserotypeを同定することが困難であった。申請者らは新規に開発された短鎖核酸を基盤とするmulti-nucleic acid (MNAzyme)とカチオンポリマーを用いた検出技術を用いてHPV高毒性株の検出を行う。MNAzymeは特殊な機材を必要とせず、また反応時間も5~30分程度と迅速であることから外来でのスクリーニングとして有用であると考えられる。						
研究方法	我々は学生自主研究の一環として、強毒株HPV18のE6遺伝子とE7遺伝子を標的としたMNAzymeを作成し、in vitroでの合成DNA及びRNAを検出標的として10-9M以下でも検出できることを確認した。本システムを改良し、HPV感染細胞から実際にHPV遺伝子を増幅なしで検出する実験系の構築を行った。また、そのほかの疾患モデル、特に遺伝子変異疾患モデルにおける原因遺伝子の同定が可能か検討するために、マウスに疾患原因遺伝子をコードしたアデノ随伴ウイルスを投与したモデルマウスを作製し、これらのマウスから原因遺伝子を検出できるか検討を行った。						
研究成果	1) HPV感染HeLa細胞からのMNAzymeを用いたHPV原因遺伝子の検出 HPVによる発がんにはHPVがコードするE6およびE7遺伝子が大きく関与している。そこでこれらの遺伝子の検出を外来で行うために、これらを標的としたMNAzymeを設計合成した。次にMNAzymeの特異性を検討するために点突然変異を一つまたは複数個導入したsubstrateを合成した。これらに対し、MNAzymeを反応させると2塩基以上変異が挿入されると反応は起こらず、1塩基変異でも反応速度は顕著に低下したことからMNAzymeの特異性は極めて高いと考えられた。次に、子宮頸癌患者細胞モデルとして強毒株HPV18への感染が既知であるヒト子宮頸癌細胞株HeLa細胞を用いた検出を行った。対照群としては同じくヒト由来細胞であるHEK293細胞を用いた。これらの細胞からtotal RNAを回収し、MNAzymeと反応させたところ						

<p>研 究 成 果</p>	<p>どちらの細胞由来のRNAについても有意なシグナルを得ることができなかった。様々な条件検討を行った結果、シグナルが得られないのは反応促進のために添加しているカチオンポリマーがRNA-MNAzyme間の静電反発を抑制した結果、非特異的にtotal RNAとMNAzymeが結合し、正しい反応が阻害されていることが明らかとなった。そこで非特異的の反応を抑制するためにMNAzymeの長さを変更し、延長していくことで反応温度を上昇させた結果、HeLa細胞で有意に強いE7陽性シグナルを検出した。しかし、シグナルは非常に微弱であったことから、外来での使用は不可能と考えられた。そこでMNAzymeの反応を促進させるカチオンポリマーの種類をさらに検討し、カチオン性ポリペプチドによる反応の促進について検討を行った。カチオン性アミノ酸であるアルギニンによりRNA-MNAzyme間の結合は強まったが、カチオンポリマー同様シグナルは減弱したため、現在各種アミノ酸を挿入したポリペプチドを検討中である。</p> <p>2) 疾患原因遺伝子のMNAzymeによる検出</p> <p>上記の実験により、MNAzymeを用いて細胞から変異遺伝子を同定することが可能となったため、次にマウスからの疾患原因遺伝子の同定に挑んだ。疾患モデルとしては過剰にGGGGCCリピートを発現させる神経変性疾患モデルをアデノ随伴ウイルスにより作成しこれについてMNAzymeによる疾患遺伝子検出を検討したが、遺伝子発現量が低すぎて検出することが不可能であったため、今後の検討課題とする。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>HeLa細胞からのHPV遺伝子検出には成功したものの、シグナルは非常に微弱であり、このままでは外来では使用不可能と考えられる。そこで、MNAzymeの反応を促進させるカチオンポリマーの種類をさらに検討し、そのポリマーが適度に反応を促進するかについて検討する予定である。具体的にはポリエチレンイミンやカチオン性のペプチドなどを用いて検討を続けている。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

平成30年6 月18日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名

東京医科大学

氏 名

金蔵 孝介 ㊞

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額金		2,000,000 円	
費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額
支 出 内 訳	設備、備品費	0	0
	消耗品費	2,000,000	2,000,000
	計		2,000,000
過 △ 不足額		0	0
備 考			

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費		
消 耗 品 費	1,350,864	アデノ随伴ウイルス投与マウス作成
	265,297	カチオン性ペプチド作成
	378,863	蛋白および核酸用試薬
	4536	書籍
	440	文房具および切手