

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05347

研究課題名(和文)簡易遺伝子変異検出法の開発とそれによる薬剤耐性ウイルス出現頻度の検証

研究課題名(英文)Development of a simple gene mutation detection method and verification of the frequency of drug-resistant viruses

研究代表者

桑原 正靖 (KUWAHARA, Masayasu)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：40334130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザの変異を感度は低いながらも30分程度で判別できる検出系を構築した。当該部位の変異型は抗ウイルス薬の効き難さに関わっているとされている。さらに、この検出系を改良し、新型コロナウイルスの簡便検出への応用を検討した。その結果、陽性・陰性の判定において、本法は、既存の逆転写リアルタイムPCR法(TaqManプローブ法)と高い一致率を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本法の開発により、変異などを含む核酸バイオマーカーの簡便検出システムが構築された。よって、感染性や薬剤耐性、重篤化等を引き起こすウイルス変異の仕組みの解明や抗ウイルス薬開発の効率化等が期待できる。また、パンデミック対策への利用に加え、究極的には、それに限らず、生活習慣病やその他の感染症等様々な疾患に対する簡易診断への応用も考えられる。

研究成果の概要(英文)：We constructed a detection system that can discriminate influenza mutations in about 30 minutes, although the sensitivity is low. Mutants at the site are known to be involved in the effectiveness of antiviral drugs. Furthermore, we improved this detection system, and then examined its application to simple detection of the new coronavirus. As a result, in the positive/negative judgment, this method showed a high concordance rate with the existing reverse transcription real-time PCR method (TaqMan probe method).

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：RNAウイルス 等温核酸増幅法 逆転写PCR法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス等の RNA ウイルスは、突然変異を引き起こしやすく頻りに連続抗原変異が生じる。それが迅速な診断や適切な予防を妨げ、流行が繰り返される主因となっている。さらに、小児では毎年 50~200 人のインフルエンザ脳症患者が報告 (本邦) されており、各種の集中治療が行われてもその約 7% が死亡している。また、死亡を免れても、知能障害やてんかん等の重大な神経症状を残すことがある。本研究では、研究代表者らが開発した簡便 RNA 検出法 (SATIC 法: 図 1) *Anal. Chem.* 2016, 88, 7137 を基本原理とする遺伝子変異オンサイト検査法を、研究分担者 (東京医大) と共同開発することを目指した。

従来法の逆転写 PCR 法には、サーマルサイクラーなど精密な温度制御装置が必須である。近年、それを必要としない等温遺伝子増幅法が、遺伝子変異オンサイト検査法の基本原理として注目されている。これまでに等温遺伝子増幅法を応用した長鎖 RNA の特異的検出法としては、RNase H 処理を要する PRRCA 法 *Anal. Biochem.* 2010, 401, 242 や、複雑な増幅機構を要する RT-LAMP 法 *Arch. Virol.* 2003, 148, 1713 などが考案されている。RT-LAMP 法は、反応温度が高温 (65°C) であることや、特殊なプライマー設計や逆転写の工程を要すること、複雑な増幅機構ゆえに偽陽性を生じやすいこと等の問題がある。

一方、SATIC 法は、検出感度や簡便性の向上を考える上で、原理が非常にシンプルである。しかも、シグナル増幅に用いる RCA の至適温度が体温 (約 37°C) であり、1 つの試験管中 1 段階 (one-tube-one-step) で反応が進行するため、オンサイト計測への応用に適すると期待される。実際に、SATIC 法では、測定サンプルと試薬とを混ぜ合わせ、37°C で暫く静置するだけで、目視による標的 mRNA の特異的検出が可能であるという特長がある。

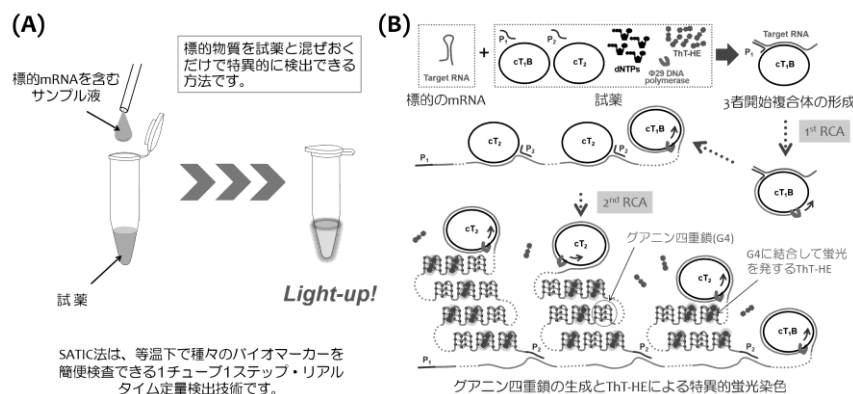


図1 SATIC法の特長 (A) としくみ (B)

2. 研究の目的

独自に考案した長鎖 RNA 検出法である SATIC 法をベースとして、新型ウイルスの出現やその年の流行型を正確かつ初期に察知・診断する方法論を確立する。パンデミック対策への利用に加え、究極的には、それに限らず、生活習慣病やその他の感染症等様々な疾患に対する簡易診断への応用に資する新しい方法論を確立することが研究の目的である。

3. 研究の方法

まず、反応に用いる緩衝液の組成の最適化を行う。本法では、ターゲットの存在によりグアニン四重鎖 (G4) が生成する。一般に、G4 構造の安定性は緩衝液中の塩の種類や濃度、pH 等に影響を受けるため、用いる緩衝液中の G4 の熱安定性と SATIC 法に用いられる蛍光プローブ (ThT-HE) による発光の相関を精査する。次いで、RCA で生成する G4 の配列や蛍光プローブ (ThT-HE) の化学構造の最適化を検討する。G4 配列には、多くの場合、27Myc を用いているが、配列中に変異を導入したり長さを改変したりしたヌクレオチド鎖を数十種類合成し、蛍光プローブが最も高い蛍光強度を与えるものを選択する。その他にも環状 DNA 鋳型鎖にコードされた G4 配列の個数の最適化や、G4 配列と G4 配列を繋ぐリンカー配列・長さの最適化、最近接塩基 (nearest-neighbor) 法による DNA プライマーと環状 DNA 鋳型鎖の二重鎖形成部位の配列の最適化も行う。さらに、磁気ビーズ等、固相上で、RCA を行うことで、検出感度の向上を図る。

In vitro ウイルス感染細胞等から採取したウイルスを、逆転写リアルタイム PCR 法や ELISA 法等により定量し検量線を得た上で、構築した当該簡便検出系が、従来法と同様に実用可能かどうかを検証する。さらに、咽頭ぬぐい液ならびに鼻汁吸引液等を中心に採取した臨床検体サンプルでも検証を行うこととした。

4. 研究成果

本法に用いる蛍光プローブについていくつかのチオフラビン誘導体を合成した (図 2)。その結果、N3 位にポリオキシエチレン (POE) 鎖を有するアナログがアンチパラレル型の 27Myc および 18RAS に対して高い特異性と蛍光発光を示すことが分かった。また、インフルエンザの変異体としては、823 番目に変異をもつものについて検出系を構築した。この部位において野生型はシトシン (C) であって、変異型はウラシル (U) であり、変異型は抗ウイルス薬の効き難いとされている。この部位を含む 40mer の合成 RNA 断片でも、ウイルス感染細胞から抽出した RNA でも、蛍光検出により 30 分程度で判別できることが分かった。しかしながら、検出限界が検査反応液あたり $10^9 \sim 10^{10}$ コピー程度であり、感度の向上が課題となった。

そこで、磁気ナノ粒子上で核酸増幅反応を行うことで反応効率を高めた系を開発し、さらに、粒子上で生じた G4 が結合した磁気ナノ粒子を含む凝集塊の形成でシグナル検出を行うシステムを構築した。用いる溶媒や凝集剤等を種々検討することにより、検査反応液あたり 10 コピー程度のウイルスゲノムを簡便に検出できるシステムを構築した。尚、凝集剤には、新たに設計・合成した G4 に親和性を示す ThT 誘導体等を系中に添加した。また、凝集塊の形成効率は、水溶性ポリマーの添加により顕著化することも見出した。

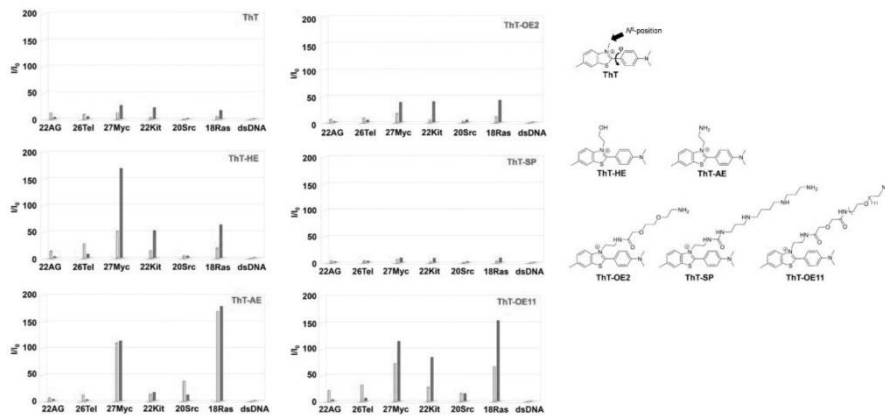


図 2 種々の G4 に対する蛍光プローブ (ThT 誘導体) の蛍光特性と化学構造

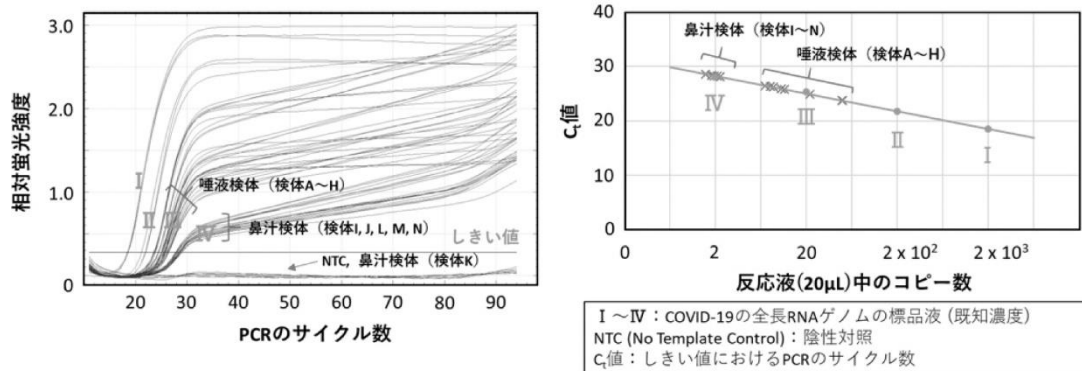


図 3 逆転写リアルタイム PCR 法による新型コロナウイルスの検出 (左) および検量線 (右)

また、今般の新型コロナによるパンデミックを受け、構築した当該検出系の応用に取り組んだ。新型コロナ感染者の検体 (唾液や鼻汁等) を用いたウイルス RNA の特異検出を検証した (図 3 および 4)。その結果、陽性・陰性の判定において、本法は、既存の逆転写リアルタイム PCR 法 (TaqMan プローブ法) と高い一致率を示した。

さらに、検出に関わるすべての試薬を階層構造の中に埋め込むことで、Ready-to-use の試薬キット (プロトタイプ) を開発した。この検出反応系では 37°C で 20 分ほどの振とうを要するが、磁気ビーズの特性を利用して、電磁コイル中で反応させることにより、機械的な振とうを要さないプロト型の装置も開発した。

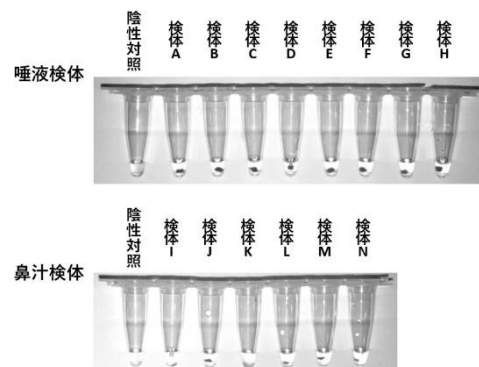


図 4 本法による新型コロナウイルスの検出

尚、『科研費による研究の中で、文部科学省・日本学術振興会において取りまとめた、新型コロナウイルス感染症対策に貢献が期待される研究成果の一部（科研費による成果で新型コロナウイルス感染症対策への活用が期待される例）』として本研究課題が取り上げられた。
(https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/06_jsps_info/g_200909/index.html)

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 1件）

1. 著者名 Kataoka Yuka, Fujita Hiroto, Afanaseva Arina, Nagao Chioko, Mizuguchi Kenji, Kasahara Yuuya, Obika Satoshi, Kuwahara Masayasu	4. 巻 58
2. 論文標題 High-Contrast Facile Imaging with Target-Directing Fluorescent Molecular Rotors, the N3-Modified Thioflavin T Derivatives	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 493 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b01181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka Yuka, Fujita Hiroto, Endoh Tamaki, Sugimoto Naoki, Kuwahara Masayasu	4. 巻 25
2. 論文標題 Effects of Modifying Thioflavin T at the N3-Position on Its G4 Binding and Fluorescence Emission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4936 ~ 4936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25214936	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12件（うち招待講演 11件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Kuwahara M
2. 発表標題 Ultra-high sensitive simple test methods for various biomarkers
3. 学会等名 Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuwahara M
2. 発表標題 Method for high sensitive detection of various biomarkers
3. 学会等名 Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawahara M
2. 発表標題 Development of unique nucleic acid materials for diagnosis and therapeutics
3. 学会等名 Poland-Japan RNA Meeting, Poznan 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Development of unique nucleic acid materials for diagnosis and therapeutics
3. 学会等名 NanoTech Poland 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Target-Directing Fluorescent Molecular Rotors
3. 学会等名 Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids (A3RONA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Thioflavin T derivatization: Creation of fluorescence indicators for various targets
3. 学会等名 Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2018 (ANNA2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Fluorescence Molecular Rotors Thioflavin T Derivatives for Various Targets
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Functional Nucleic Acids (FNA2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田博仁, 片岡由佳, 柏木保代, 河島尚志, 桑原正靖
2. 発表標題 ゲノム RNA 簡便検出法の開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会(2019)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayasu Kuwahara
2. 発表標題 Thioflavin T modification and the application to the detection of biomarkers and viruses
3. 学会等名 13thJKBT:Asian Workshop against Coronavirus Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原正靖
2. 発表標題 PCR法に代わる革新的核酸増幅法を用いた唾液からのCOVID-19の目視による迅速診断法の開発
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 (J B A 緊急特別講演) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原正靖
2. 発表標題 SATIC法の原理とCOVID-19簡易検査への応用
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原正靖
2. 発表標題 新規バイオマーカー検出法（SATIC 法）の開発と今後
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（特別講演2）（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉本直己，鳥越秀峰，片平正人，桑原正靖ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 総ページ数565（担当ページ数5）
3. 書名 核酸科学ハンドブック（23章を担当）	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 核酸配列等の簡易検出法	発明者 桑原正靖，藤田博仁	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019 - 217075	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 新型コロナウイルスSARS - CoV - 2の検出キットおよび検出方法	発明者 河島尚志，桑原正靖，藤田博仁	権利者 東京医科大学， 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-083024	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸増幅反应用多層化プレミクス試薬およびReady to use核酸増幅反応キット	発明者 桑原正靖，藤田博仁	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-102479	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 磁気ビーズ攪拌機構を備えた核酸増幅反応用装置	発明者 桑原正靖，藤田博仁	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-122057	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ等 http://kuwaharaken.org/
--

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	河島 尚志 (KAWASHIMA Hisashi) (70224772)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

	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
研究協力者	藤田 博仁 (FUJITA Hiroto)	日本大学・文理学部・助手 (32665)	

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
---------	---------