

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05819

研究課題名(和文) 核酸の自発的連鎖反応を利用した高感度腫瘍細胞検出法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer detection system using autonomous sequential reaction of nucleic acids

研究代表者

北村 裕介 (Kitamura, Yusuke)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教

研究者番号：80433019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面に特異的に高発現しているタンパクを標的し、これをきっかけとして、シグナルを増幅する機構を多点で開始することで、細胞の高感度検出を試みた。具体的には、標的膜タンパク質に対する核酸アプタマーに任意のタグ配列を付与し、これをシグナル増幅の開始点とした。このタグのと鎖交換反応により、シグナル増幅可能なDNAサーキットを回転させるトリガーを特異的に放出することに成功した。試験管内ではトリガーに応答し、サーキットが動作することが確認されたが、細胞上で実際に放出されたトリガーを用いてDNAサーキットの動作を試みたところ、シグナルの増加が十分ではなかったため、条件の最適化が必要だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までのところ、DNAサーキットによるシグナル増幅は不十分ではあるが、条件を最適化できた際には、標的細胞を現行法のように顕微鏡で直接検出する必要なく、標的細胞を含む溶液の発光にて検出することが可能となる。標的細胞に任意のタグを提示し、鎖交換反応を自在に起こすことができたため、これに伴って放出された任意の配列の核酸を開始剤とする様々な核酸の自発的連鎖反応を誘起可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We tried to construct the detection system of target cells with high sensitivity based on the signal amplification triggered by a protein highly expressed on the membrane of target cells. A nucleic acid aptamer with arbitrary tag sequence was used as an initiator of the amplification reaction. A single stranded DNA which can work as a trigger for DNA circuit of signal amplification reaction was successfully released from a duplex by the strand exchange with the tag tethered with aptamer bound on the target cell surface. Specific initiation of DNA circuit by the trigger was confirmed in vitro. Then, we tried to detect the target cell by the initiation of DNA circuit using the trigger specifically released by the tag on the target cell. However, signal amplification was not efficient. The optimization of condition of DNA circuit should be needed for obtaining enough signal to detect target cells.

研究分野：分析化学、核酸化学

キーワード：核酸プローブ 細胞検出

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

進行したがんでは、一部の腫瘍細胞が原発腫瘍細胞組織から剥離し、血液やリンパ液の流れに乗り、体内の別の臓器に移動することでがんの転移が起きている。このように血流に乗って体内を循環している腫瘍細胞は、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) と呼ばれており、単位血液量あたりの CTC の個数が、がんの予後や治療奏功に深く関与することが明らかとなってきている。しかしながら、CTC 数のカウントを原理とする予後診断手法として米国食品医薬品局 (FDA) が承認しているのは、米国ベリデックス社の CellSearch System のみであり、EpCAM 抗体によって染色された細胞数を計数するといった古典的な手法が用いられている。国内外を問わず、他の研究グループも追随し、直接細胞を観察する手法にて CTC の検出を試みている。本研究では、現行法のように細胞全体を 1 個の標的としてとらえるのではなく、細胞表面に特異的に高発現しているタンパクを標的とし、これをきっかけとしてその溶液中にシグナルを増幅することで高感度な検出を目指した。

2. 研究の目的

がん細胞検出における代表的な手法では、がん細胞膜上に過剰発現しているマーカータンパクに対する蛍光ラベル化抗体を細胞に特異的に結合させ、顕微鏡を用いて発光している細胞を検出するという原始的なプロトコルが一般的である。本研究では、視点を変え、細胞を直接観察するのではなく、標的細胞がきっかけとなり、その溶液中に自発的にシグナルが増幅される検出システムを構築したい。細胞全体を 1 個の標的としてとらえると、極微量の細胞を標的とした際、その検出は非常に困難となるが、細胞表面に特異的に高発現しているタンパクを標的とし、これをきっかけとして、シグナルを増幅する機構が多点で進行すれば、1 細胞からでも多くのシグナルを得ることができると考えた。

3. 研究の方法

設計した腫瘍細胞検出システムの概要は以下のとおりである。

- ① まず、EpCAM アプタマーを金-チオール結合にて金基板上に修飾した後、細胞の非特異的な吸着を抑制するために、残余面をアルカンチオール誘導体 SAM 膜にてマスキングする (図 1a)。
- ② サンプル溶液を修飾基板上に滴下し、腫瘍細胞を選択的に捕捉する (図 1b)。
- ③ 洗浄後、タグ付けしたアプタマーを、捕捉した細胞に結合させる。再度洗浄後、シグナル増幅のトリガーとなる一本鎖 (トリガー-DNA) とその相補鎖 (マスク DNA) から成る二本鎖 (ケージドトリガー。タグに応答して解離し、トリガー-DNA を放出する) を添加し、トリガー-DNA を放出させる (図 2)。
- ④ トリガー-DNA が放出された溶液を回収し、これを蛍光色素が修飾されたプローブと消光剤プローブを鋳型上に隣接結合させた二本鎖複合体と燃料 DNA の混合溶液に添加し、DNA サーキットを開始することでシグナルが増幅される (図 3)。

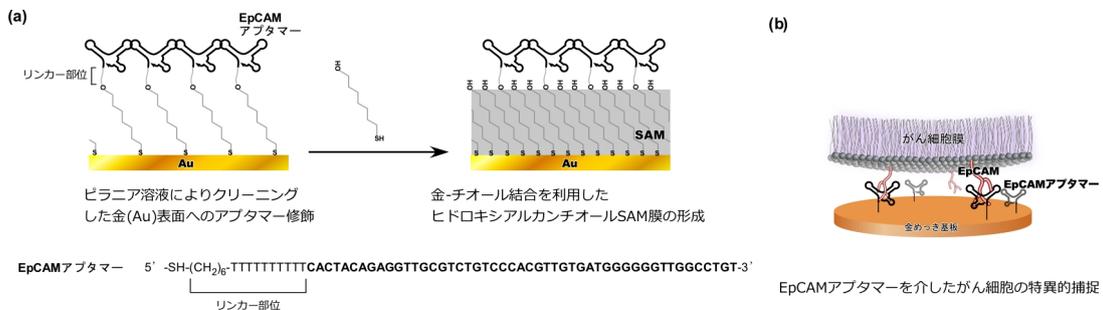


図 1 (a) がん細胞捕捉基板の作製法 (b) EpCAM アプタマー修飾基板を用いたがん細胞の捕捉

以下、それぞれの項目において実際に行った実験方法を示す。

①-1 細胞の非特異的な結合を抑制する金基板表面処理の検討

腫瘍細胞捕捉基板として金基板 (5 mm × 5 mm の金めっきを施した薄板) を用いる。金めっきを施せる素材全般を基板として利用可能なフレキシブルな作製法としたい。蛍光法や電気化学測定法、SPR、QCM などの分析手法が利用できるため、速度論的な解析を行うことが可能となる。

はじめに、細胞の非特異的な結合を抑制する金基板表面処理の検討を行った。細胞の非特異的な吸着が少ないと言われている 6-Hydroxy-1-hexanethiol (6-HHT)、Sulfobetain3-undecanethiol (SB3UT、双生イオン型)、Hydroxy-EG₃-hexadecanethiol (H-EG₃HDT)

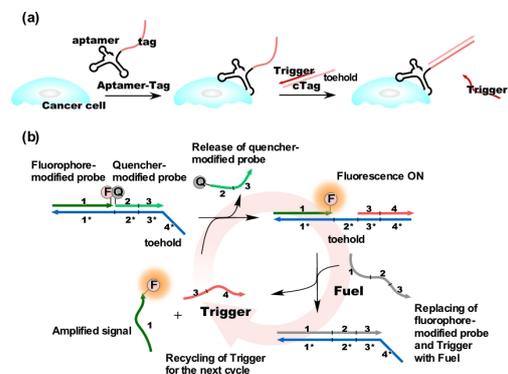


図 3 (a) タグを有するアプタマーによるがん細胞の認識とタグを介した鎖交換反応によるトリガー-DNA の選択的放出 (b) 放出されたトリガー-DNA をきっかけとする DNA サーキットを介したシグナル増幅

の3種類のアルカンチオール類(それぞれ末端までの距離が8原子分、17原子分、27原子分)に着目した。まず、ピラニア溶液で10分間処理することで、金基板表面をクリーニングした。水で洗浄後、それぞれ10 μ Mの溶液を調整し、金基板の上に添加し、25 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートすることでSAM膜を形成させた。核をHoechst33342にて染色したMDA-MB-453細胞(ヒト乳癌細胞)、ならびにHEK293T(ヒト胎児腎細胞)をD-PBS中にて懸濁させ(1×10^5 cells/mL)、これを調整した基板に添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間50 rpmで振とうした。その後、D-PBSにて基板を洗浄し、非特異的な吸着挙動を蛍光顕微鏡により観察した。

①-2 EpCAM アプタマーの修飾率の算出

金基板にピラニア溶液を添加し、10分間静置し、金基板をクリーニングした。ピラニア溶液を除去し、水で2回洗浄した。そこに10 mMリン酸緩衝液(1 M NaClを含む)に溶解した末端チオール化アプタマーを添加し、25 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。水で2回洗浄後、アルカンチオール誘導体を添加し、25 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、水で洗浄した。これを電気化学測定用セルにセットし、作用電極とした。セル内に50 μ M RuHexを溶解した10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6)を加えた。セルに対極(Pt)と参照電極(Ag/AgCl)を差し込み、クロノクーロメトリー測定を行った。

②-1 EpCAM アプタマー修飾基板による細胞捕捉実験

金基板にピラニア溶液を添加し、10分間静置し、金基板をクリーニングした。ピラニア溶液を除去し、水で2回洗浄した。そこに10 mMリン酸緩衝液(1 M NaClを含む)に溶解した末端チオール化アプタマーを添加し、25 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。水で2回洗浄後、アルカンチオール誘導体を添加し、25 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、D-PBSで2回洗浄した。そこに25 mMのグルコースを含むD-PBS中にて調整した細胞懸濁液(1×10^5 cells/mL)を加えた。25 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションした後、D-PBS溶液で基板を3回洗浄した後、25 mMのグルコースを含むD-PBSを加え、蛍光顕微鏡で基板を観察した。

③-1 タグ付きアプタマーの結合特異性評価とタグで標識化された細胞に対するマスクDNAの結合評価

核をHoechst33342で染色したMDA-MB-453細胞ならびにHEK-293T細胞をCell Dissociation Solutionにて剥離した後、洗浄し、D-PBS中に5.0 mM MgCl₂と4.5 mg/mLグルコースを含む溶液(Binding Buffer, BB)中で懸濁させた。1 μ M Cy5($\lambda_{em} = 667$ nm)修飾タグ付EpCAMアプタマー溶液(BB中にて調整)100 μ Lに上述の細胞懸濁液100 μ Lを添加し、氷浴中で30分間インキュベートした。その後、細胞を50 μ LのBBで2回洗浄した。一部の細胞を分取し、蛍光顕微鏡で観察した。残りの細胞懸濁液にBB中にて調整したFAM($\lambda_{em} = 520$ nm)修飾したマスクDNA溶液(1 μ M)を50 μ L添加した。氷浴中で30分間インキュベートした後、BBで細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

③-2 細胞上のタグとケージドトリガーとの鎖交換反応によるトリガー放出の確認

細胞上のタグをきっかけとしてケージドトリガーとの鎖交換反応が起こり、トリガーが放出されることをタグ上へのマスクDNAの結合から確認する。まず、核をHoechst33342で染色したMDA-MB-453細胞ならびにHEK-293T細胞をCell Dissociation Solutionにて剥離した後、洗浄し、BB中で懸濁させた。1 μ M Cy5($\lambda_{em} = 667$ nm)修飾タグ付EpCAMアプタマー溶液(BB中にて調整)100 μ Lに上述の細胞懸濁液100 μ Lを添加し、氷浴中で30分間インキュベートした。その後、細胞を50 μ LのBBで2回洗浄した。一部の細胞を分取し、蛍光顕微鏡で観察した。残りの細胞懸濁液にBB中にて調整したFAM($\lambda_{em} = 520$ nm)修飾したマスクDNAとトリガーDNAにより形成させたケージドトリガー溶液(1 μ M)を50 μ L添加した。氷浴中で30分間インキュベートした後、BBで細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

④-1 DNA サーキットの動作確認

まずはFAMプローブとBHQ1修飾プローブを鋳型上に隣接結合させた二本鎖複合体(以後、二本鎖基質)と燃料DNAの混合溶液にトリガーDNAを添加することでDNAサーキットが動作するかを確認した。20 nMの二本鎖複合体と燃料DNAを含む溶液中(250 mM NaClと1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)、以後、反応緩衝液)にトリガーを添加し、5 $^{\circ}$ CにてFAMの発光を蛍光分光光度計にて観察した。

④-2 細胞上のタグとの鎖交換反応によって放出されたトリガーDNAを利用したシグナル増幅

核をHoechst33342で染色したMDA-MB-453細胞ならびにHEK-293T細胞をCell Dissociation Solutionにて剥離した後、洗浄し、BB中で懸濁させた(8×10^5 cells/mL)。200 μ M EpCAMアプタマー溶液(BB中にて調整)100 μ Lに上述の細胞懸濁液100 μ Lを添加し、氷浴中で30分間インキュベートした。その後、細胞をBBで2回洗浄した。そこにBB中にて調整したマスクDNAとトリガーDNAにより形成させたケージドトリガー溶液(200 nM)を100 μ L添加した。氷浴中で30分間インキュベートした後、上澄を回収した。これを反応緩衝液中にて調整した20 nM二本鎖基質(100 μ L)と10 μ L燃料DNA(2 μ L)と反応緩衝液798 μ Lの混合溶液に添加し、5 $^{\circ}$ CにFAMの蛍光強度の変化をモニターした。

4. 研究成果

①-1 細胞の非特異的な結合を抑制する金基板表面処理の検討

細胞の非特異的な吸着挙動を蛍光顕微鏡により観察した。結果を図 4 に示す。SAM の長さが最も長く、エチレンジアミン構造を有する H-EG₃HDT が最も両細胞の非特異的な吸着が少なかったことがわかった。

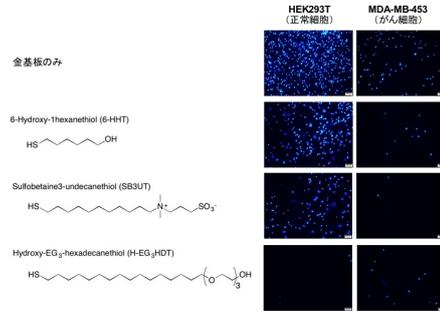


図 4 SAM 膜形成金基板上への細胞の非特異的な吸着

①-2 EpCAM アプタマーの修飾率の算出、

②-1 EpCAM アプタマー修飾基板による細胞捕捉実験

リンカーの構造や長さ、アプタマー修飾時の濃度を変化させ、修飾密度と細胞捕捉数の相関を確認した。アルカンチオールだけを修飾した基板と比較すると、アプタマーをさらに修飾した基板はいずれにおいても非特異的な細胞の吸着が少ないことがわかった。よって、①-1 にて最も非特異的な細胞の吸着が少なかった H-EG₃HDT だけではなく、6-HHT、SB3UT もマスキング材として再検討することにした。また、アプタマーとチオール末端までのリンカーとしてヘキサメチレン構造を有する SH-C6-aptamer、並びにさらにフレキシブルで長い構造を追加した SH-C6-SP18-aptamer をアプタマーとして用いた。図 5a-c に示すように、SH-C6-SP18-aptamer は、他と比較して固定化率が多少低かったが、これを修飾し、H-EG₃HDT でマスキングした基板には、多くの細胞が捕捉されることがわかった。10 μM の濃度で修飾した場合に最も高い細胞捕捉率が得られ、それ以上の濃度で修飾するとむしろ細胞捕捉率が低下することがわかった。しかしながら、いずれの濃度で修飾した場合でも、アプタマーの配列をランダムに入れ替えた scrambled DNA にも非特異的に多く結合した。一方、図 5d に示すように同じく SH-C6-SP18-aptamer を修飾した基板でも SB3UT にてマスキングした場合、アプタマーの修飾率は高いにも関わらず、全く細胞が捕捉されないことがわかった。SH-C6-aptamer においては、リンカーが短いため、マスキング材として 6-HHT を選択し、がん細胞の特異的捕捉を試みた。結果、図 5e-f に示すように、こちらも 10 μM の濃度で修飾した場合に最も高い細胞捕捉率が得られることがわかった。また、scrambled DNA を修飾した基板にもほとんど細胞が非特異的に結合しないこともあわせてわかった。

これらの結果より、SH-C6-aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板が最もがん細胞を選択的に捕捉可能であることがわかった。また、修飾時のアプタマー濃度が 50 μM では捕捉効率が低下していたため、基板上で高密度となり過ぎて立体障害を起こし、捕捉に不利にはたらいっていると考えられる。なお、基板修飾時、アプタマーは約 15% のバラツキで修飾できていることがわかった。

次に SH-C6-aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板で MDA-MB-453、もしくは KATOIII(ヒト胃癌細胞)と HEK-293T 細胞の混合懸濁液を用いて細胞捕捉実験を行ってみたところ、図 6 に示す通り、100 倍の HEK-293T 細胞が存在する溶液中からも目的とする MDA-MB-453 細胞が捕捉されることがわかった。なお、細胞を混合する際は、がん細胞の膜を DiO、正常細胞の膜を DiD で事前に染色し、それぞれの発光から細胞を検出した。

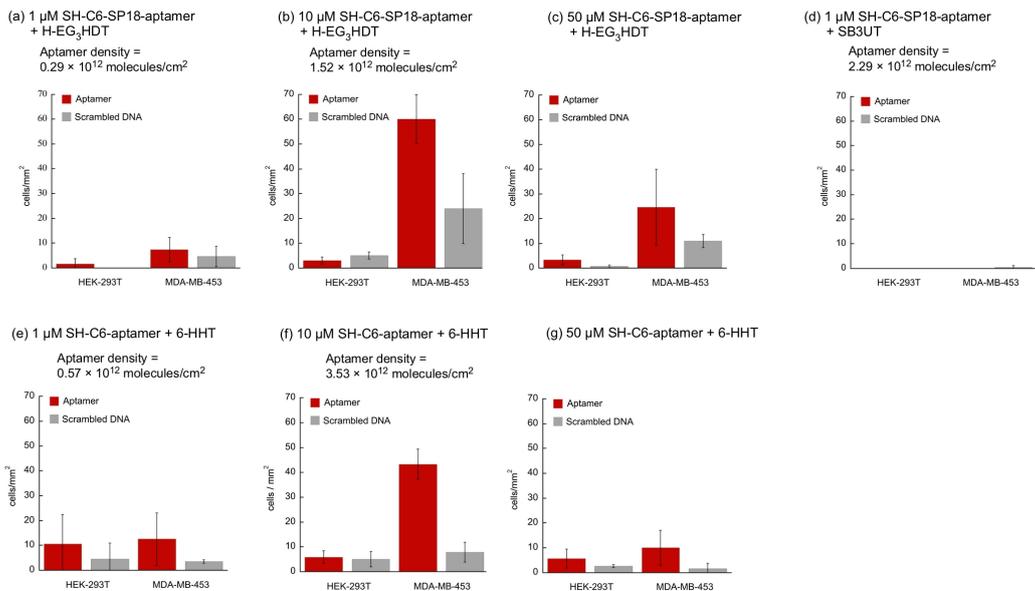


図 5 種々のアプタマー修飾基板に対する MDA-MB-453 細胞ならびに HEK-293T 細胞の捕捉結果

③-1 タグ付きアプタマーの結合特異性評価とタグで標識化された細胞に対するマスク DNA の結合評価、

③-2 細胞上のタグとケージドトリガーとの鎖交換反応によるトリガー放出の確認

ずは、EpCAM を介して標的がん細胞上に結合したタグ付きアプタマーにてマスク DNA がきちんと特異的に結合するかを確認した。アプタマー、またはマスク DNA の細胞に対する結合率は以下の式に基づき算出した。

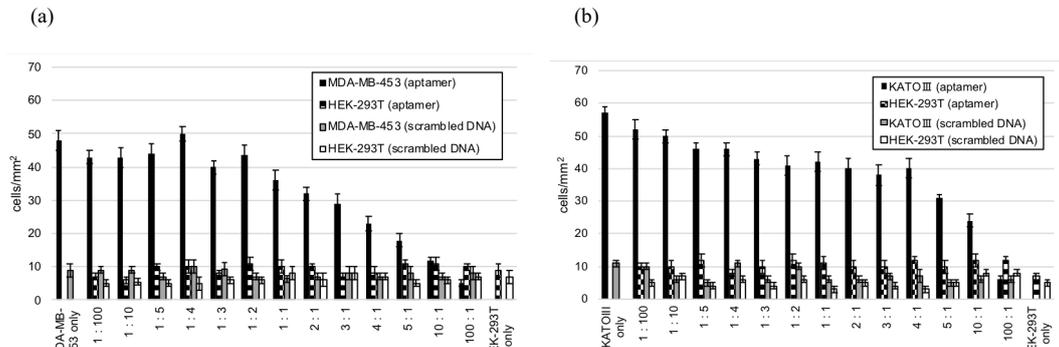


図 6 (a) MDA-MB-453 細胞と HEK-293T 細胞の混合懸濁液からの EpCAM アプタマー修飾金基板への細胞捕捉 (b) KATOIII 細胞と HEK-293T 細胞の混合懸濁液からの EpCAM アプタマー修飾金基板への細胞捕捉

アプタマーの結合率 = (Cy5 による染色細胞数 / Hoechst33342 の染色細胞数) × 100
 マスク DNA の結合率 = (FAM による染色細胞数 / Hoechst33342 の染色細胞数) × 100
 その結果、タグ付き EpCAM アプタマーは 70%以上の MDA-MB-453 細胞に十分に結合していることがわかった。一方、HEK-293T 細胞には 20%程度しか結合しなかった。ここにマスク DNA を加えたところ、約 70%程度の MDA-MB-453 細胞にマスク DNA が結合していることがわかった。HEK-293T 細胞に非特異的に結合したアプタマーに対するマスク DNA の結合も確認された(約 20%)。しかしながら、タグ付き EpCAM アプタマーを加えない場合、MDA-MB-453 細胞、HEK-293T 細胞ともにほとんどマスク DNA の結合は確認されなかった(約 10%)。次に、マスク DNA をトリガーと二本鎖形成させ(ケージドトリガー)、タグ付き EpCAM アプタマーを結合させた細胞に添加した。その結果を図 7a に示す。ケージドトリガーとして添加した場合でも、約 65%の MDA-MB-453 細胞にマスク DNA が結合していることがわかった。一方、HEK-293T に対しては約 15%程度しか結合していなかった。また、同様にタグ付き EpCAM アプタマーを添加していない場合には両細胞ともに 10%程度しか結合しなかった。図 7b に示す通り、アプタマーが結合している細胞とマスク DNA が結合している細胞は完全に一致したため、特異的にマスクがタグに結合していることがわかった。

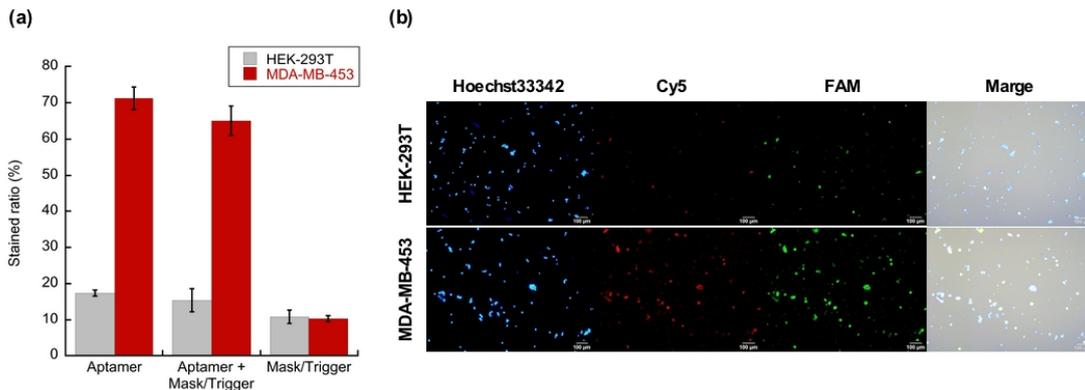


図 7 (a) HEK-293T 細胞、ならびに MDA-MB-453 細胞に対するアプタマー、マスク DNA の結合率 (b) HEK-293T 細胞、ならびに MDA-MB-453 細胞の蛍光イメージング像。

④-1 DNA サーキットの動作確認

トリガー添加後の発光強度変化を図 8 に示す。トリガー未添加の場合、わずかに反応のリークが確認されたが、トリガーを等量添加した場合は約 20 分で大きく発光強度が増加し、その後も少しずつ増加している様子が確認された。2 時間後に未添加の場合と比較すると約 10 倍の発光強度を示すことがわかった。添加するトリガーの濃度を下げていくと反応初速度が低下している様子が確認された。二本鎖基質の 100 分の 1 の量のトリガーを添加した場合であっても 2 時間後には DNA サーキットによるシグナル増幅により、未添加の場合の 2 倍の発光強度を示すことがわかった。

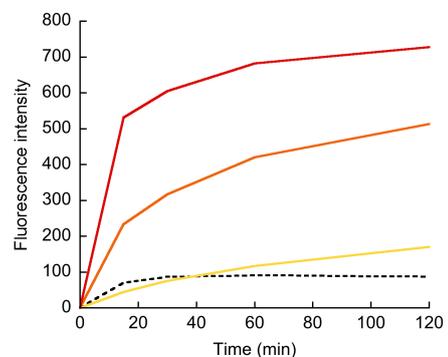


図 8 トリガー添加による蛍光強度の変化。トリガー添加量 2 nM(赤線)、0.2 nM(橙線)、0.02 nM(黄線)、未添加(黒破線)。二本鎖

④-2 細胞上のタグとの鎖交換反応によって放出されたトリガーDNA を利用したシグナル増幅

ケージドトリガー溶液を各種細胞懸濁液に添加し、氷浴中で 30 分間インキュベート後、回収した上澄に DNA サーキット溶液を添加した後、蛍光強度変化をモニターした結果、MDA-MB-453 細胞の上澄から HEK-293T の上澄よりもわずかではあるが高い発光強度を示すことがわかった。今後、サーキットの条件を最適化する必要はある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Hiroshi Shimada, Shiori Noguchi, Masahiro Yamamoto, Katsuhiko Nishiyama, Yusuke Kitamura, and Toshihiro Ihara, Electrochemical Sensing of Neurotoxic Agents Based on Their Electron Transfer Promotion Effect on an Au Electrode, *Anal. Chem.*, **89**, 5742-5747 (2017)
2. Ren Cai, Dan Yang, Keng-Te Lin, Yifan Lyu, Bowen Zhu, Zhen He, Lili Zhang, Yusuke Kitamura, Liping Qiu, Xigao Chen, Yuliang Zhao, Zhuo Chen and Weihong Tan, Generalized Preparation of Two-Dimensional Quasi-nanosheets via Self-assembly of Nanoparticle, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 1725-1734 (2019)

[学会発表](計 12 件)

1. 宮端孝明、北村裕介、立花暉子、佐々木昇司、近浦裕斗、安田敬一郎、中竹拳志、中島雄太、岩槻政晃、馬場秀夫、中西義孝、井原敏博、DNA サーキットによるシグナル増幅を利用したがん細胞の検出、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場
2. 立花暉子、北村裕介、宮端孝明、佐々木昇司、近浦裕斗、安田敬一郎、中竹拳志、中島雄太、岩槻政晃、馬場秀夫、中西義孝、井原敏博、DNA アプタマーを用いた癌細胞の捕捉に関する基礎的研究、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場
3. Yusuke Kitamura, Yukina Azuma, Shikinari Yamamoto, and Toshihiro Ihara, Cooperative formation of metal complexes on nucleic acids, ISBBN7(招待講演)、2016 年 5 月 27 日、Changsha, Hunan, China
4. 北村裕介、佐々木昇司、宮端孝明、立花暉子、安田敬一郎、中島雄太、岩槻政晃、馬場秀夫、中西義孝、井原敏博、DNA アプタマーを利用したがん細胞の捕捉に関する基礎的研究、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 8 日、石川県金沢市石川県立音楽堂
5. 後藤広志、中村美穂、北村裕介、中島雄太、安田敬一郎、岩槻政晃、馬場秀夫、中西義孝、井原敏博、EpCAM アプタマーを利用したがん細胞の捕捉に関する基礎的研究、54 回化学関連支部合同九州大会、2017 年 7 月 1 日、北九州国際会議場
6. 北村裕介、東幸奈、野崎晃広、勝田陽介、井原敏博、発光性希土類金属錯体形成を利用したシグナル増幅型核酸センサーの開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月 8 日、東京大学弥生キャンパス
7. 北村裕介、川口隼矢、船木遼、井原敏博、DNA を鋳型とするルテニウム-白金混合錯体の形成脱離と質量分析による核酸検出への応用、日本分析化学会第 66 年会、2017 年 9 月 9 日、東京理科大学葛飾キャンパス
8. Yusuke Kitamura, Ayase Tashima, Miho Nakamura, Yuta Nakashima, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Yousuke Katsuda, Hideo Baba, Yoshitaka Nakanishi, Toshihiro Ihara, Capture of cancer cells on a gold substrate modified with DNA aptamer, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2017)、2017 年 11 月 11 日、東京理科大学葛飾キャンパス
9. 北村裕介、後藤広志、勝田陽介、井原敏博、ハイブリッド SELEX 法を用いた抗 CD24 アプタマーの取得、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年 9 月 10 日、大阪大学吹田キャンパス
10. 北村裕介、倉本諒、勝田陽介、井原敏博、核酸の動的構造のプログラミングを利用した電気化学シグナル増幅型核酸検出法の開発、日本分析化学会第 67 年会、2018 年 9 月 14 日、東北大学川内北キャンパス
11. Yusuke Kitamura, Hiroshi Goto, Yousuke Katsuda, and Toshihiro Ihara, Generation of anti-CD24 aptamer by crossover SELEX, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2018)、2018 年 11 月 8 日、京都大学吉田キャンパス
12. 北村裕介、永井康樹、勝田陽介、井原敏博、反復配列への短鎖核酸の協同的結合、日本化学会第 99 春季年会 2019、2019 年 3 月 16 日、甲南大学岡本キャンパス

[図書](計 0 件)

[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:<http://www.analyticalchemistry-ihara.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 井原 敏博

ローマ字氏名: Toshihiro Ihara