

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2017年6月8日(08.06.2017)

(10) 国際公開番号

WO 2017/094878 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外 (OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/085879

(22) 国際出願日: 2016年12月2日(02.12.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-236040 2015年12月2日(02.12.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 川崎俊輔(KAWASAKI, Shunsuke); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

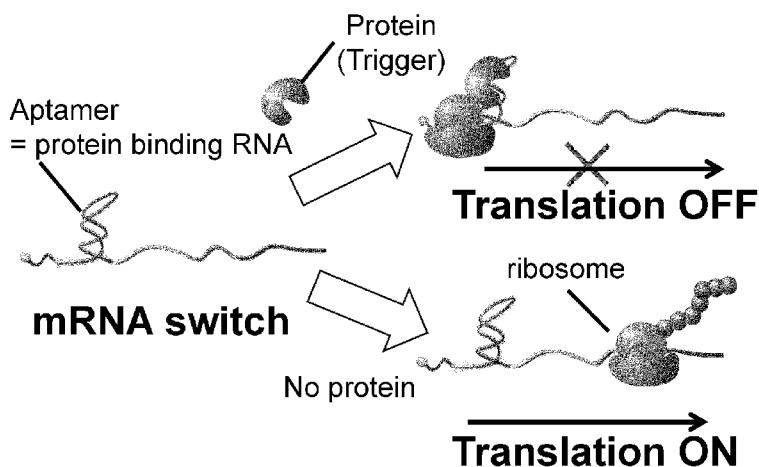
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING INTRACELLULAR ENDOGENOUS PROTEIN

(54) 発明の名称: 細胞内在性タンパク質の識別方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a method for detecting an intracellular endogenous protein using living cells. A method for identifying an intracellular endogenous protein, said method comprising the steps of: (1) a step for introducing, into a desired cell, intracellular endogenous protein-responsive mRNA that contains an aptamer sequence unique to an intracellular endogenous protein and also contains a marker gene sequence functionally bonded thereto, or a vector that codes said mRNA; and (2) a step for identifying the intracellular endogenous protein on the basis of the amount of translation of the marker gene.

(57) 要約: 細胞を生きたまま用いて、細胞内在性タンパク質を検出する方法を提供する。細胞内在性タンパク質の識別方法であって、以下の工程を含む方法:(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマ配列と機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性 mRNA もしくは当該 mRNA をコードするベクターを所望の細胞に導入する工程; 及び (2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する工程。



添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：細胞内在性タンパク質の識別方法

技術分野

- [0001] 本発明は、細胞内在性タンパク質の識別方法、これに用い得る安定化アプタマー、並びに細胞の分化及びリプログラミング状態の識別方法に関する。
- [0002] 標的細胞でのみ機能する人工遺伝子発現制御システムは、生命工学、医療応用において有用なツールとなりうる。細胞の種類、状態は、主にタンパク質によって決定されている。従って、ヒト細胞内のタンパク質を検知して、遺伝子発現を制御できる仕組みを開発することが重要である。
- [0003] mRNA スイッチは、mRNA の5' UTR に特定のタンパク質と結合するRNA（アプタマー）領域を持つ遺伝子スイッチである。このスイッチはmRNA 上のアプタマーにタンパク質が結合することで、自身の翻訳を抑制する。原理的には、任意のタンパク質と結合するアプタマーを組み込むことで、望んだタンパク質を検知して翻訳を抑制するmRNA スイッチが作製できる。また、mRNA を細胞に直接導入することは、従来のプラスミドによる遺伝子導入に比べ、導入効率が高く、ゲノム損傷のリスクも低い。従って、mRNA スイッチは、標的細胞でのみ機能する人工遺伝子発現制御システムとして理想的である。
- [0004] mRNA 中にアプタマーを組み込むことで作製された、ヒト細胞内で発現するタンパク質を標的とする遺伝子スイッチとして、以下の2例が知られている。一つは、3' UTR に組み込んだリボザイムの一部をヒトU1A タンパク質のアプタマーに変えたスイッチである（非特許文献1を参照）。しかし、この研究では、プラスミド導入によってU1A を過剰発現させており、ヒト細胞に内在するタンパク質への応答は実現されていない。もう一つは、イントロンにアプタマーを組み込むことで、標的タンパク質存在下でスプライシングを制御し、異なる成熟mRNA を作らせるスイッチである（非特許文献2を参照）。このスイッチは、NF-kB やCTNNB1 (β -catenin) に応答し、蛍光タンパク質やプロドラッグ活性化酵素の発現を制御できる。しかし、この研究では、アプタマーに結合するタンパク質が核内に存在する必要があるため、標的タン

パク質が核局在タンパク質に限定される。また、スプライシング制御を利用するため、プラスミドやウイルスベクターといったDNA以外でのシステム導入が困難である。

[0005] 以上から、標的タンパク質が限定されず、mRNA導入が可能で、内在のタンパク質発現を検知できるスイッチの開発が望まれる。mRNAは、翻訳制御によって遺伝子発現をコントロールするため、mRNAの直接導入によるスイッチの機能制御を実現でき、マイクロRNAを検知し、翻訳を制御するmRNAはすでに開発されている（非特許文献3）。しかし、ヒト内在性タンパク質を検知し、翻訳を制御できるmRNAスイッチの開発は、未だ実現できていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Auslander, S. et al., Nat. Methods 11, 1154-60 (2014)

非特許文献2：Culler, S. J. et al., Science. 330, 1251-5 (2010).

非特許文献3：Wroblewska, L. et al., Nat. Biotechnol. 1-5 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] これまでに作製されたmRNAスイッチでは、ヒト内在性タンパク質を検知できていない。細胞を破壊することなく、生きた状態の細胞で、ヒト細胞内在性タンパク質を検出する方法が求められている。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列を有するmRNAを細胞に導入することで、生細胞においてヒト細胞内在性タンパク質を特異的かつ定量的に検出できることを発見した。さらには、本発明者らは、人工多能性幹(iPS)細胞に特異的な内在性タンパク質に対するアプタマー配列及びこれを安定化したアプタマー配列を有するmRNAを設計し、これを細胞に導入することで、細胞の分化状態及びリプログラミング状態を検出することができることを発見し、本発明を完成するに至った。

[0009] したがって、本発明の課題は以下の手段により解決することができる。

[1] 細胞内在性タンパク質の識別方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを所望の細胞に導入する工程；及び

(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する工程。

[2] 細胞の識別方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを所望の細胞に導入する工程；

(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、前記タンパク質を発現する細胞を識別する工程。

[3] 配列番号1で表される天然型LIN28Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の1以上の改変を加えてなる構造安定化LIN28Aアプタマー：

(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；

(2) 2つのループ間に位置するステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；または

(3) 2つのループ間に位置するステムに、1～5の塩基対を付加する。

[4] 配列番号2～4のいずれかで表される構造安定化LIN28Aアプタマー。

[5] 配列番号6で表される天然型U1Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化U1Aアプタマー：

(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステム構造に1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する、あるいは2つのボックス間に存在す

るシステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する；または配列番号8で表されるU1Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化U1Aアプタマー：

(2) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。

[6] 配列番号83で表されるp50Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化p50Aアプタマー：

5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステム構造に1～20のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。

[7] 配列番号7、9、10、84のいずれかで表される構造安定化U1Aアプタマー。

[8] [3]～[7]のいずれかに記載の構造安定化アプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNA。

[9] 細胞の分化状態の識別方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) 多能性幹細胞を含みうる細胞群に、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNA、あるいは当該mRNAをコードするベクターを導入する工程；及び

(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて細胞の分化状態を識別する工程。

[10] 前記アプタマー配列が、天然型LIN28Aアプタマー配列、または[3]もしくは[4]に記載の構造安定化アプタマー配列である、[9]に記載の方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、これまで不可能だった、生細胞の内在性タンパク質を生きたまま、高感度かつ定量的に検出することができる。また、生細胞の内在性タンパク質を検出することで、人工多能性幹(iPS)細胞を識別し、かつその分化状態及びリプログラミング状態を検出し、分類、単離または選択的に排除することが可能となった。さらにはこれらの検出に特に有用な安定化ア

プタマーを得ることができた。これらの安定化アプタマーは、前述の方法に用いるmRNA内に設けるタンパク質特異的な配列として使用可能なほか、任意選択的に他の分子と結合させて細胞内でターゲットタンパク質に強く結合してその機能を阻害する、抗がん剤やアンタゴニストとして、もしくは細胞外ではセンサーとして有用となりうる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、タンパク質応答性mRNAスイッチの作用機構を説明する図である。タンパク質応答性スイッチは、mRNAの5' 非翻訳領域(5' -UTR)に特定のタンパク質と結合する配列(アフタマー)が存在し、ここにトリガーとなるタンハク質が結合することで、目的タンハク質の翻訳を抑制できる。すなわち、トリガータンパク質の存在下では、mRNAスイッチの翻訳が抑制され(図1右上)、非存在下では、正常な翻訳が行われる(図1右下)。この分子装置は、mRNAの5' -UTRにアフタマーを挿入することで人工的に作製できる。

[図2]図2は、実験で使用したプラスミドの概要を示した図である。スイッチプラスミド(上)およびトリガープラスミド(下)の空ベクターとして使用したプラスミドのマップ情報をApE(<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)を使って描写した。すべてのプラスミドはCMVプロモーターから転写される。スイッチプラスミドは、転写開始点から14塩基下流にある制限酵素サイトにアプタマー配列を挿入した。トリガープラスミドの転写産物は、トリガータンパク質の翻訳に伴って、バイシストロニックにtagRFPの翻訳も行われる。トリガータンパク質とtagRFPは、T2A部位で生じるリボソームスキッピングによって2つの独立したタンパク質として翻訳される。従って、トリガータンパク質の発現量とtagRFPの発現量は、同じであると考えられている。

[図3]図3は、実験で使用したLIN28Aアプタマーの2次構造予測図である。

[図4]図4は、各スイッチプラスミドがHEK293 FT細胞中でLIN28Aに応答し、翻訳抑制されることを示すグラフである。

[図5]図5は、stbCを挿入したスイッチプラスミドがHeLa細胞中でもLIN28Aに

応答し、翻訳抑制されることを示すグラフである。

[図6]図6は、stbCを挿入したスイッチプラスミドがLIN28Aと特異的に結合することで、翻訳が抑制されることを示すグラフである。

[図7A]図7は、作製したスイッチの翻訳効率が、細胞内のLIN28A量に従って変化することを示す一連の図である。図7Aは、ドキシサイクリンの濃度依存的に発現するLin28A量に応じて、スイッチの翻訳効率が低下することを示すグラフである。

[図7B]図7Bは、各ドキシサイクリン濃度でのLin28A及びGAPDHの発現量をウエスタンブロッティングによって確認された結果である。

[図7C]図7Cは、図7Bのバンド濃度からLIN28Aの相対発現量を定量し、ドキシサイクリン濃度との関係を表したグラフである。

[図7D]図7Dは、LIN28Aの相対発現量と各スイッチの蛍光比の関係を示したグラフである。

[図8A]図8は、作製したLIN28Aスイッチが、mRNAトランスフェクションでもLIN28Aに応答することを示す一連の図である。図8Aは、stbCを挿入したLIN28Aスイッチについて、各LIN28A mRNA導入量における細胞集団を表したドットプロットである。

[図8B]図8Bは、stbCを挿入したLIN28Aスイッチにおいて、LIN28A mRNAの導入量に従って、集団が分離されることを示すドットプロットである。stbCのドットプロットは、図8Aで示したドットプロットの重ね合わせである。

[図8C]図8Cは、stbCを挿入したLIN28AスイッチがLIN28A量依存的に翻訳抑制されることを示すグラフである。

[図9A]図9は、LIN28Aスイッチを用いてiPS細胞と分化細胞を分離する仕組みを説明する一連の図である。図9Aは、iPS細胞でLIN28Aスイッチの翻訳が抑制されることを模式的に説明する図である。

[図9B]図9Bは、LIN28Aスイッチを導入した細胞をフローサイトメトリーによって、iPS細胞と分化細胞に分けられることを説明する図である。

[図10A]図10は、stbCを挿入したLIN28AスイッチがiPS細胞中で翻訳抑制を受

けることを示す一連の図である。図10Aは、LIN28Aスイッチを用いてフローサイトメトリーのドットプロット平面上で、iPS細胞と分化細胞を区別できることを示す図である。

[図10B]図10Bは、stbC を挿入したLIN28Aスイッチが分化細胞中よりも、iPS細胞中で翻訳抑制を受けることを示すヒストグラムである。

[図10C]図10Cは、各アプタマーを挿入したmRNAが、分化細胞と比べてiPS細胞中でどの程度翻訳が抑制されたかを示すグラフである。

[図11A]図11は、分化誘導の経過に従って、LIN28Aスイッチの翻訳効率が変化することを示す一連の図である。図11Aは、iPS細胞と各分化誘導日数の細胞における翻訳効率比較したグラフである。

[図11B]図11Bは、各細胞のフローサイトメトリーの結果を示したドットプロットとその重ね合わせである。

[図12]図12は、実験で使用したU1Aアプタマーの2次構造予測図である。

[図13]図13は、各スイッチプラスミドがHEK293 FT細胞中でU1Aに応答し、翻訳抑制されることを示すグラフである。

[図14A]図14は、作製したU1Aスイッチが、ヒト細胞に内在するU1Aに応答し、翻訳抑制を受けることを示す一連の図である。図14Aは、U1Aスイッチとその変異体を細胞に導入した際の、蛍光写真である。

[図14B]図14Bは、U1Aスイッチとその変異体の蛍光量を示したヒストグラムである。

[図14C]図14Cは、各U1Aスイッチの蛍光比を示したグラフである。

[図15]図15は、U1AスイッチにおけるshRNA導入時の相対翻訳効率を示したグラフである。

[図16]図16は、LIN28Aスイッチ導入時の内在miRNAの発現レベルを表すグラフである。

[図17]図17は、実験で使用したp50アプタマーの2次構造予測図である。

[図18]図18は、各スイッチプラスミドがHEK293 FT細胞中でp50に応答し、翻訳抑制されることを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は本発明を限定するものではない。

[0013] [第1実施形態：細胞内在性タンパク質の検出方法]

本発明は、第1実施形態によれば、細胞内在性タンパク質の識別方法に関する。当該検出方法は、以下の工程を含む方法である。

(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを所望の細胞に導入する工程；及び

(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する工程。

[0014] ここで、所望の細胞とは、特に限定されるものではなく、細胞は任意であってよい。例えば、多細胞生物種から採取した細胞群に含まれる細胞であってもよく、単離された細胞を培養することによって得られる細胞群に含まれる細胞であってもよい。当該細胞は、特に、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）採取した細胞、若しくは哺乳動物より単離された細胞又は哺乳動物細胞株を培養することによって得られる細胞であってよい。体細胞としては、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髓質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ纖毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。

細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。また、細胞は、前期体細胞を採取後に人為的な操作を加えた細胞であってもよい。

[0015] また、本発明において、「細胞内在性タンパク質を識別する」とは、細胞を生きたまま用いて細胞内在性タンパク質を検出し、同定し、分類し、選別することをいうものとする。あるいは、本発明は、細胞を識別する方法ともいいうことができ、この場合、特定の細胞内在性タンパク質を指標として目的の細胞を識別する方法ということができる。そして、細胞の識別には、識別の後に、当該タンパク質を発現する細胞種を同定し、分類し、単離し、除去し、生死を判定し、当該細胞種の特定の生物学的な信号を検出あるいは定量し、当該細胞種の特定の物理的あるいは化学的な信号に基づいて分画することを含んでも良い。

[0016] 本実施形態の工程（1）においては、細胞内在性タンパク質応答性mRNAを用いる。本明細書において、細胞内在性タンパク質応答性mRNAを、タンパク質応答性mRNAあるいはmRNAスイッチと指称する場合もある。タンパク質応答性mRNAは、(i)細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列と(ii)それと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む。

[0017] (i)細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列

細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列は、所望の細胞における内在性タンパク質に特異的に結合する任意のRNAアプタマー配列であってよい。したがって、既に文献等で既知の天然のアプタマー配列および、それを改変した人工アプタマー配列であってもよく、そのほかの人工的に作製したアプタマー配列であってもよい。天然のアプタマー配列は、例えば、ウェブサ

イト上で利用できるデータベース：(Apta-Index (商標) : <http://www.aptagen.com/aptamer-index/aptamer-list.aspx>)から、適宜選択できる。人工アプタマー配列は、ランダム配列を含む RNA 集団から目的のタンパク質に結合するRNAを選別する手法(参考文献[3])によって取得可能である。この方法は、*in vitro selection*法またはSELEX法として知られている進化工学的手法として知られている。したがって、所望のタンパク質に結合するアプタマーが、人工の RNA配列から取得できる。そして、これらのアプタマーを mRNAに組み込むことで、所望のタンパク質に応答するmRNAスイッチを創出できる。本発明の方法に適した具体的なアプタマー及び安定化アプタマーについては、第2、3実施形態において詳述する。

[0018] (ii) それと機能的に連結したマーカー遺伝子配列

本発明において使用される (ii)の「マーカー遺伝子」とは、細胞内で翻訳されて、マーカーとして機能し、細胞の識別を可能にする任意のタンパク質をコードする遺伝子である。細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうるタンパク質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、若しくは蛍光、蛍光タンパク質などの蛍光、発光又は呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質をコードする遺伝子、膜タンパク質、または、アポトーシス誘導遺伝子、自殺遺伝子などの、発現することで細胞を死滅させるタンパク質をコードする遺伝子を含むが、これらに限定されない。アポトーシス誘導遺伝子と組み合わせて、アポトーシス抑制遺伝子をマーカー遺伝子として用いることもできる。本明細書において、当該マーカー遺伝子のコード領域に対応する核酸を含むmRNAより翻訳されたタンパク質を、マーカータンパク質と指称する。

[0019] 本発明において、蛍光タンパク質としては、Sirius、BFP、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPerなどの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、m

Bananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange（例えば、hmK02）、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberryなどの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらには限定されない。

[0020] 本発明において、発光タンパク質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β ラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発明において、蛍光、発光又は呈色を補助する物質をマーカー遺伝子として使用する場合、特定のタンパク質を内在する、あるいは内在しない細胞の選別において、対応する前駆物質と細胞を接触させること、又は細胞内に対応する前駆物質を導入することによって行われ得る。

[0021] 本発明において、アポトーシス誘導遺伝子とは、細胞に対してアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。例えば、IkB、Smac/DIABLO、ICE、HtrA2/OMI、AIF、endonuclease G、Bax、Bak、Noxa、Hrk (harakiri)、Mtd、Bim、Bad、Bid、PUMA、activated caspase-3、Fas、Tk等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、好ましくは、Bimがアポトーシス誘導遺伝子として用いられる。

[0022] 本発明において自殺遺伝子とは、細胞におけるその発現がその細胞にとって致死的である遺伝子を意味する。本発明において、自殺遺伝子は、それ自体で細胞死をもたらすもの（例えば、ジフテリアA毒素）であってもよく、またはこの遺伝子の発現が、特定の薬物に対して細胞を感受性にするもの（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子の発現により、抗ウィルス化合物に対して細胞を感受性にする）であってもよい。自殺遺伝子として、例えば、ジフテリアA毒素、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-TK）

、カルボキシペプチダーゼG2 (CPG2) 、カルボキシルエステラーゼ (CA) 、シトシンデアミナーゼ (CD) 、チトクロームP450 (cyt-450) 、デオキシシチジンキナーゼ (dCK) 、ニトロレダクターゼ (NR) 、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 、チミジンホスホリラーゼ (TP) 、水痘帶状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (VZV-TK) 、キサンチンーグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPRT) をコードする遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、好ましくは、HSV-TKが自殺遺伝子として用いられる。

[0023] 本発明において、上記マーカー遺伝子は、局在化シグナルをコードする遺伝子を備えていてもよい。局在化シグナルとしては、核局在化シグナル、細胞膜局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、タンパク質分泌シグナル等を挙げることができ、具体的には、古典的核移行配列 (NLS) 、M9配列、ミトコンドリア標的配列(MTS)、小胞体移行配列を挙げることができるが、これらには限定されない。このような局在化シグナルは、後述するイメージングサイトメトリー等で、特定のタンパク質を内在する、あるいは内在しない細胞を検出し、さらにそのような細胞を分離・選別する工程を画像上で行うときに特に有利である。

[0024] 本発明において、アプタマー配列とマーカー遺伝子配列が機能的に連結されるとは、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む）の5' UTR内、3' UTR内、及び／または当該オープンリーディングフレーム内に、アプタマー配列を備えることを意味する。タンパク質応答性mRNAは、好ましくは、5' 末端から、5' から3' の向きに、C a p構造（7メチルグアノシン5' リン酸）、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリAテイルを備え、5' UTR内、3' UTR内、及び／またはオープンリーディングフレーム内にアプタマー配列を備える。mRNAにおけるアプタマー配列の位置は、5' UTRであっても、3' UTRであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの3' 側）であってもよい。

- [0025] 好ましくは、タンパク質応答性mRNAは、(i)および(ii)の核酸配列が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。このとき、c a p構造とアプタマ一配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、c a p構造とアプタマー配列との間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、0～20塩基となるように設計することができる。また、アプタマー配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、アプタマー配列と開始コドンとの間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるような配置にて設計することができる。
- [0026] 本発明において、アプタマー配列内には、開始コドンとなるAUGが存在しないことが好ましい。例えば、アプタマー配列が5'UTRに存在し、かつ、当該アプタマー配列内にAUGを含む場合には、3'側に連結されるマーカー遺伝子との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、アプタマー配列内にAUGを含む場合、標的との結合に重要でなければ、AUGを別のトリプレット配列に変換可能である。AUGがステム構造内に存在し、当該塩基を置換する場合は、置換後も塩基対を形成するように、対応する塩基も置換する。また、アプタマー配列内のAUGの影響を最小限に留めるために、5'UTR内におけるアプタマー配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、c a p構造とアプタマー配列内のAUG配列との間の塩基数が、0～60塩基、例えば、0～15塩基、10～20塩基、20～30塩基、30～40塩基、40～50塩基、50～60塩基となるような配置にて設計され得る。但し、アプタマーの挿入位置は、cap構造に近いことが望ましい。
- [0027] このようなmRNAは、その核酸配列が設計されれば、遺伝子工学的に調製することができる。例えば、所定のプライマーと鑄型DNAに基づき、PCR法で調製することができるが、特定の調整方法には限定されない。また、このようなmRNAをコードするベクターについても、所定のmRNA配列が設計され、決定されれば、市販のDNAベクターシステムを用いて、適宜調製することができる。

- [0028] 次に、本発明の各工程について説明する。工程（1）は、所望の細胞に、タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを導入する工程である（以下、導入工程と指称することがある）。
- [0029] タンパク質応答性mRNAの導入工程は、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラノン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて実施することができる。任意選択的に、アプタマー配列及びマーカー遺伝子配列が異なる2種、3種あるいは4種以上のタンパク質応答性mRNAを共導入することができる。さらに、この時、場合により、コントロールmRNAを、対象細胞に共導入することができる。コントロールmRNAとは、アプタマー配列を有さず、タンパク質応答性mRNAがコードするマーカー遺伝子とは異なるマーカー遺伝子をコードするmRNAをいう。共導入した2以上のmRNAから発現するマーカータンパク質の活性比は、細胞集団内において一定である。また、この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。
- [0030] タンパク質応答性mRNAの導入は、当該mRNAをコードするベクターを導入することによっても実施することができる。より安定なDNAベクターでの導入は、導入した細胞を、その後に生体移植等して用いることがない場合、例えばスクリーニング用途や試験用とで用いる場合に、特に有用となる。ベクターの細胞への導入は、mRNAの導入と同様の手段で実施することができる。アプタマー配列及びマーカー遺伝子配列が異なる2種以上のタンパク質応答性mRNAをコードするベクターを導入する場合や、コントロールmRNAをコードするベクターを導入する場合も、同様の方法で実施することができる。
- [0031] タンパク質応答性mRNAが細胞に導入されると、細胞内にアプタマーに特異的なタンパク質が存在する場合、当該タンパク質がアプタマーに結合することにより、タンパク質応答性mRNAがコードするマーカー遺伝子の翻訳量が制

御、例えば翻訳量が抑制される。そして、翻訳量の制御は、細胞内のタンパク質の存在量に応じて定量的になされる。一方、細胞に当該タンパク質が存在しない場合、タンパク質応答性mRNAがコードするマーカー遺伝子の翻訳量が抑制されることはない。したがって、当該タンパク質が存在もしくは発現している細胞と、存在もしくは発現していない細胞との間で、マーカー遺伝子の翻訳量が異なる。一方、コントロールmRNAは、タンパク質の存在に関係なくマーカータンパク質を発現する。コントロールmRNAが細胞に導入されても、コントロールmRNAにはアプタマー配列が存在しないため、所定のタンパク質の存在及び／または量に応じて翻訳制御されることがないためである。

[0032] 続く工程（2）は、前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する工程である（以下、識別工程と指称することがある）。識別工程では、上記のようなマーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する。すなわち、タンパク質応答性mRNAが備えるアプタマー配列に特異的な細胞内在性タンパク質が細胞内に存在する場合には、マーカー遺伝子の翻訳量が抑制されるという現象に基づき、細胞内在性タンパク質を識別する。「識別する」態様には、マーカー遺伝子の翻訳の抑制の有無を検出し、所定の細胞内在性タンパク質の有無を判定すること、マーカー遺伝子の翻訳抑制効率を測定することにより細胞内在性タンパク質を定量する態様、さらには、マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子等の場合には、薬剤存在下での培養後の細胞の生死に基づいて、細胞内在性タンパク質の存在を確認することが挙げられるが、これらには限定されない。その他の、識別の態様としては、マーカー遺伝子がアポトーシス誘導遺伝子による標的細胞運命の制御、分化誘導遺伝子またはリプログラミング誘導遺伝子による細胞分化やリプログラミング細胞の検出が挙げられる。

[0033] 具体的には、識別工程は、所定の検出装置を用いて、マーカータンパク質からの信号を検出することにより実施することができる。検出装置としては、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、CCDカメラ等が挙げられるが、これらには限定されない。このような

検出装置は、マーカータンパク質及び検出の態様により、当業者が適したもの用いることができる。例えば、マーカータンパク質が、蛍光タンパク質又は発光タンパク質の場合には、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、CCDカメラといった検出装置を用いてマーカータンパク質の定量が可能であり、マーカータンパク質が、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質の場合には、発光顕微鏡、CCDカメラ、ルミノメーターといった検出装置を用いたマーカータンパク質の定量方法が可能であり、マーカータンパク質が、膜局在タンパク質の場合には、抗体などの細胞表面タンパク質特異的な検出試薬と、上記の検出装置を用いたマーカータンパク質の定量方法が可能である。その他、磁気細胞分離装置(MACS)といった、マーカータンパク質の定量過程を経ない識別方法であって、実質的には細胞を単離することによる識別方法も可能であり、マーカータンパク質が薬剤耐性遺伝子の場合、薬剤投与によりマーカー遺伝子の発現に基づいて生細胞を単離することによる識別方法が可能である。

- [0034] マーカータンパク質が蛍光タンパク質の場合の好ましい識別（検出）方法の一例として、フローサイトメトリーが挙げられる。フローサイトメトリーは、個々の細胞において翻訳されたマーカータンパク質である、蛍光タンパク質、発光酵素が発する光の強度を、識別の情報として提供することができ、特にはフローサイトメーターで測定した蛍光強度比の計測により、識別の情報を得ることができる。例えば、蛍光タンパク質を用いる場合、マーカー遺伝子の翻訳量の異なる細胞は、フローサイトメトリーのドットプロット上で、分離した帯状に観察される。すなわち、フローサイトメトリーのドットプロット上で、検出される内在性タンパク質の量に基づいて細胞が分離されるため、検出後にこれらの細胞を物理的に分離することも可能となり、これも識別の一態様であってよい。あるいは、イメージングサイトメーター等を用いた細胞画像解析による蛍光強度比の測定により、識別の情報を得ることも有効である。
- [0035] なお、タンパク質応答性mRNAの翻訳量の測定方法は、上記した特定の方法

のみには限定されず、他の任意の方法で実施することができる。例えば、ウエスタンプロットによるタンパク質発現量の定量といった方法での翻訳量の測定が可能であり、このような方法を用いて測定した場合も本発明を構成するものとする。

[0036] 翻訳量を測定した後の細胞は、例えば、アプタマーに特異的に結合するタンパク質の有無あるいは発現量の相違に基づいて、分離、分別、選別し、当該細胞へのさらなる人工的な処理や、移植用途に使用することができる。このような分離、分別、選別については、上記識別の一態様として説明している。特に、工程（1）において、タンパク質応答性mRNAを直接細胞に導入した場合には、mRNAは約10時間から1日程度の半減期で、細胞内で代謝されうるため、安全性の面から有利である。本実施形態による細胞内在性タンパク質の識別方法及び細胞の識別方法によれば、細胞内における特定のタンパク質の発現を、生きたままの細胞を用いて、生きたまま識別することができ、さらに、特定のタンパク質を発現する細胞を生きたままで選択的に分離することができる点で非常に有用である。

[0037] さらなる応用形態として、本実施形態によるタンパク質応答性mRNAと、マイクロRNA応答性mRNAとを併用することにより、特定のタンパク質と特定のマイクロRNAを発現している細胞を検出し、及び／または識別する方法が挙げられる。マイクロRNA応答性mRNAは、上記のアプタマーに代えて、マイクロRNA応答配列を備えるmRNAである。このようなマイクロRNA応答配列及びこれらを用いた生細胞の選別方法については、本発明者らによる国際公開公報W02015/105172に詳述されている。

[0038] 本実施形態に用いられるタンパク質応答性mRNA（mRNAスイッチとも指称する）およびその作製原理によって、将来以下のことが期待できる。mRNAスイッチの利点として、アウトプットとして発現するタンパク質が、別のmRNAスイッチのインプットとして機能しうる点がある。従って、複数のmRNAスイッチを組み合わせることで、翻訳制御を基盤とした、ゲノム損傷のリスクが低い人工遺伝子回路の構築が可能となる。また、このような人工遺伝子回路を

利用することで、安全で高効率な細胞のリプログラミング（初期化、分化を含む）が期待できる。さらに、特定の遺伝子発現パターンを取るような回路を設計することで、細胞状態の維持にも応用が期待でき、例えば培養しているiPS細胞が自然に分化してしまうのを防ぐ等の目的で用いることができる。

[0039] さらに、発明したスイッチの翻訳効率が、細胞内タンパク質発現量と相関することから、タンパク質応答性mRNAスイッチを利用して、生細胞内のタンパク質量を定量できると考えられる。この手法では、ウェスタンブロッティングのように、細胞を破碎する必要がなく、また、検出タグを付加した融合タンパク質の作製も不要であるため、より自然な状態の生細胞内タンパク質量の観察に利用できる。また、トランسفエクション効率を上げることで、一細胞レベルでのタンパク質発現量の定量が期待できる。さらに、FACSと組み合わせることで、特定量のタンパク質を発現する細胞を分離することも可能になる。

[0040] [第2実施形態：構造安定化されたLIN28Aアプタマー]

本発明は、第2実施形態によれば、構造安定化されたLIN28Aアプタマーである。当該LIN28アプタマーは、配列番号1で表される天然型LIN28Aアプタマ一配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の1以上の改変を加えてなる安定化LIN28Aアプタマーである。

- (1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；
- (2) 2つのループ間に位置するステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；または
- (3) 2つのループ間に位置するステムを構成する非ワトソン・クリック塩基対をGC塩基対に置換する。

[0041] 配列番号1で表される天然型LIN28Aアプタマーは、図3のOriginalで表される二次構造をとることが報告されている (Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I., Chou, J. J. & Sliz, P. Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. Cell 147, 1080-91 (2011))。これに対し、(1)の

改変を行うことで、5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステムをより安定化することができる。天然型LIN28Aアプタマーに存在する全てのAU塩基対をGC塩基対に置換する必要はなく、少なくとも1以上のAU塩基対をGC塩基対に置換すれば安定化を実現することができる。しかし、より安定化する観点からは、好ましくはより多くの、より好ましくは全てのAU塩基対をGC塩基対に置換する。

- [0042] 次に、図3のOriginalで表される二次構造に対し、あるいは(1)の改変を行った安定化LIN28Aアプタマーに対し、(2)の改変を行うことで、2つのループ間に位置するシステムをより安定化することができる。ここでも、全てのAU塩基対をGC塩基対に置換する必要はないが、好ましくはより多くの、より好ましくは全てのAU塩基対をGC塩基対に置換する。
- [0043] さらに、図3のOriginalで表される二次構造、(1)の改変を行った安定化LIN28Aアプタマー、あるいは(2)の改変を行った安定化LIN28Aアプタマーに対し、(3)の改変を行うことで、2つのループ間に位置するシステムをさらに安定化することができる。
- [0044] これらの改変を行うにあたって、LIN28Aとの結合に重要な塩基配列（システムの根本にある塩基であって、AU塩基対もしくはGC塩基対を形成している塩基は除く）を変更したり、ループの構造を変更したりすることは好ましくない。天然型のLIN28Aアプタマーにおいて、ループ構造が、LIN28Aタンパク質を特異的に認識する構造として知られているためである。一般的には、LIN28Aアプタマーにおいて、LIN28Aとの結合に重要な塩基配列は、GNGAY（Nは任意の塩基、YはCまたはU）とGGAGであり、以下に示す具体的なLIN28Aアプタマーにおいては、GGGAUとGGAG（表中、下線を付して示した）である。
- [0045] さらなる任意選択的な改変として、(4) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステムに、1～15の塩基対を付加することが挙げられる。
- [0046] 具体的な実施形態としては、上記(1)の改変を行った安定化LIN28AアプタマーであるstbA（配列番号2、図3のstbA）、上記(1)及び(2)の改変を行った安定化LIN28AアプタマーであるstbB（配列番号3、図3のstbB）

、stbC（配列番号4、図3のstbC）がある。以下の表1に天然型及び安定化された3種のアプタマーの配列を示す。originalのアプタマーから改変した塩基は小文字で示している。

[0047] [表1]

スイッチ標記名	配列	配列番号
original	AUAGUUUUAGGGCAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUACUAU	1
stbA	gggggUUUAGGGCAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAcdddcc	2
stbB	gggggUUUAGGGCgGGGAUUUcGCCACACAAGGAGGUAcdddcc	3
stbC	gggggcUUAGGGCgGGGAUUUcGCCACACAAGGAGGUgcccccc	4

[0048] 配列番号1～4で表されるアプタマーは、第1実施形態によるタンパク質応答性mRNAのアプタマー配列として用いることができる。アプタマー配列を備えるタンパク質応答性mRNAの設計及び製造については、第1実施形態に詳述している。そして、これらのアプタマー配列を備える用いたLIN28A応答性mRNAの翻訳抑制効率は、高い順に、stbC配列を有するLIN28A応答性mRNA、stbB配列を有するLIN28A応答性mRNA、stbA配列を有するLIN28A応答性mRNA、天然型LIN28Aアプタマー配列を有するLIN28A応答性mRNAである。

[0049] 第2実施形態による安定化LIN28Aアプタマーは、LIN28Aタンパク質の特異的な発現を検出するために有用であり、特にiPS細胞やES細胞といった多能性幹細胞の検出において有用である。また、LIN28A応答性mRNA（LIN28Aスイッチとも指称する）は、これら幹細胞選別技術としての利用が期待できる。LIN28Aは細胞質に存在するタンパク質であるため、細胞質にRNAが入りさえすれば、LIN28A応答性mRNAのようなmRNAスイッチで細胞内タンパク質を容易に検出することができるというメリットがある。スイッチが発現するタンパク質をレポータータンパク質からアポトーシス誘導タンパク質に変更することで、非幹細胞特異的に細胞死を誘導する。前述のように、タンパク質応答性mRNAスイッチの利用はゲノム損傷のリスクが低いため、安全な幹細胞、分化細胞の選別技術として再生医療分野への応用が期待できる。従って、副作用の

少ない新たな核酸医薬品の開発が期待できる。

[0050] [第3実施形態：改変されたU1Aアプタマー]

本発明は、第3実施形態によれば、構造安定化されたU1Aアプタマーである。当該U1Aアプタマーは、配列番号6で表される天然型U1Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化されたU1Aアプタマーである。

(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステム構造に1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。あるいは、2つのボックス間に存在するステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。以上の改変により、アプタマーが標的との結合に必要な2次構造を形成するよう設計する。

あるいは、配列番号8で表されるU1Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化されたU1Aアプタマーである。

(2) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。

[0051] 配列番号6で表される天然型U1Aアプタマーは、図12のU1utr下段で表される二次構造をとることが報告されている（参考文献[4]）。これに対し、(1)の改変を行うことで、Box1とBox2との間に存在するステムを安定化することができる。付加する1～15の塩基対は、AU塩基対であってもよく、GC塩基対であってもよく、それらの組み合わせであってもよいが、好ましくはより多くのGC塩基対を付加し、より好ましくは全ての付加される塩基対がGC塩基対である。

[0052] 具体的な実施形態としては、上記(1)の改変を行った安定化U1Aアプタマ一であるs_U1utr_stb（配列番号7、図12のU1utr_stb）がある。この配列及び天然型U1utrの配列を下記の表2に示す。

[0053] 配列番号8で表される文献既知のU1Aアプタマーは、図12のU1LSLで表される二次構造をとることが報告されている（参考文献[5]）。これに対し、(1)

2) の改変を行うことで、5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステムを安定化することができる。付加する1~15の塩基対は、AU塩基対であってもよく、GC塩基対であってもよく、それらの組み合わせであってもよいが、好ましくはより多くのGC塩基対を付加し、より好ましくは全ての付加される塩基対がGC塩基対である。

[0054] 具体的な実施形態としては、上記(2)の改変を行った安定化U1AアプタマーであるU1LSL+10bp(配列番号9、図12のU1LSL+10bp)、及びU1LSL+15bp(配列番号10、図12のU1LSL+15bp)がある。これらの配列及び天然型U1LSLの配列を下記の表2に示す。

[0055] [表2]

スイッチ 標記名	配列	配列 番号
W T	U1hp	cgAUCCAUUGCACUCCGGAUcg
	U1utr	ACAGCAUUGUACCCAGAGUCUGUCCCCAGACAUUGCACCUGGCGCU GU
	U1utr_st b	CACAGCAUUGUACCCcgagGAGUCUGgaaaCAGACAUUGCACCcUcgGC GCUGUG
	U1LSL	ggccaGAGUCCUUUCGGGACAUUGCACCUGGCC
	U1LSL+1 0bp	GUGAACUUCAgGCCAGAGUCCUUUCGGGACAUUGCACCUGGCcUGAA GUUCAC
	U1LSL+1 5bp	UCAAGGUGAACUUCAgGCCAGAGUCCUUUCGGGACAUUGCACCUGGC cUGAAGUUCACCUUGA

[0056] 配列番号5~10で表されるアプタマー及び安定化アプタマーは、第1実施形態によるタンパク質応答性mRNAのアプタマー配列として用いることができる。アプタマー配列を備えるタンパク質応答性mRNAの設計及び製造については、第1実施形態に詳述している。

[0057] 第3実施形態による安定化U1Aアプタマーは、U1Aタンパク質の特異的な発現を検出するために有用でありうる。U1Aタンパク質は、ある種のがん細胞において高発現することが報告されており、第1実施形態に基づく細胞内在性

タンパク質の検出方法を応用することにより、がん細胞の検出、分別に用いることが期待される。

[0058] [第4実施形態：改変されたp50アプタマー]

本発明は、第4実施形態によれば、構造安定化されたp50アプタマーである。当該p50アプタマーは、配列番号83で表される人工的に取得されたアプタマーであって、文献[6]により報告されている人工p50アプタマーが形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変：

(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステム構造に1～20のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する
を加えてなる構造安定化されたp50アプタマーである。

[0059] 配列番号83で表されるp50アプタマーは、図17の左図に示す二次構造をとることが報告されている（参考文献[6]）。これに対し、(1)の改変を行うことで、ステムを安定化することができる。付加する1～20の塩基対は、AU塩基対であってもよく、GC塩基対であってもよく、それらの組み合わせであってもよいが、好ましくはより多くのGC塩基対を付加し、より好ましくは全ての付加される塩基対がGC塩基対である。また、付加する塩基対は、5～20塩基対であることが好ましく、10～20塩基対であること
がさらに好ましい。

[0060] 具体的な実施形態としては、上記(1)の改変を行った安定化p50アプタマーであるp50A-stb（配列番号84、図17の右図p50A-stb）がある。この配列及び天然型U1utrの配列を下記の表3に示す。

[0061] [表3]

スイッチ標記名	配列	配列番号
p50A	GGCUUGAACUGUAAGGUUGGCGCCG	83
p50A-stb	UCAAGGUGAACUUCAGGCUUGAACUGUAAGGU UGGCGCCUGAAGUUCACCUUGA	84
p50A-stb _{mut}	UCAAGGUGAACUUCAGGCUUGAACG _g GUAAuG _g UGGCGCCUGAAGUUCACCUUGA	85

- [0062] 配列番号 84 で表されるアプタマー及び安定化アプタマーは、第 1 実施形態において説明したタンパク質応答性 mRNAにおいて、アプタマー配列として用いることができる。アプタマー配列を備えるタンパク質応答性 mRNA の設計及び製造については、第 1 実施形態に詳述している。
- [0063] 第 4 実施形態による安定化 p50 アプタマーは、がん関連タンパク質 p50 の特異的な発現を検出するために有用でありうる。p50 は、ある種のがん細胞において高発現することが報告されており、第 1 実施形態に基づく細胞内在性タンパク質の検出方法を応用することにより、がん細胞の検出、分別に用いることが期待される。
- [0064] [第 5 実施形態：細胞の分化（リプログラミング）状態の識別方法]
- 本発明は、第 5 実施形態によれば、細胞の分化状態の識別方法である。当該方法は、以下の工程を含む。
- (1) 多能性幹細胞を含みうる細胞群に、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む mRNA、あるいは当該 mRNA をコードするベクターを導入する工程；及び
 - (2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて細胞の分化状態を識別する工程。
- [0065] 本実施形態において、「細胞の分化状態の識別」とは、細胞が分化または未分化状態であることや、その変化、程度などを識別することをいう。例えば、ある実施態様 (a) においては、初期化因子と接触させた細胞が、所定の方法及び期間培養された後、リプログラミングされて、人工多能性幹(iPS)細胞の状態になっているか、あるいは、リプログラミングがうまくなされず、目的の iPS 細胞となっていないか、といった初期化に関する状態を検知し、検出し、認識し、識別することをいい、あるいは分離分別することをも含めるものとする。iPS 細胞が、LIN28A を発現していることは従来の研究から知られており (Tano, K. et al. A Novel In Vitro Method for Detecting Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells as Impurities in Cell Therap

y Products Using a Highly Efficient Culture System. PLoS One 9, e110496 (2014).)、初期化因子と接触させた細胞のうち、LIN28Aを十分量発現している細胞（内在性のLIN28Aを有する細胞）が、所望のリプログラミング状態を持つ目的のiPS細胞であるといえる。また、別の実施態様（b）においては、iPS細胞を含む多能性幹細胞に対して、所定の分化のための操作を行った細胞群において、分化することなく残存した多能性幹細胞を検知し、検出し、認識することをいい、あるいは選択的にそれらの細胞を分離分別することも含めるものとする。iPS細胞や他の多能性幹細胞を、所望の細胞に分化させ、臨床使用する場合に、最も障害となるのは、分化されることなく残存した、腫瘍形成能をもつ細胞である (PLoS One. 2012;7(5):e37342. doi: 10.1371/journal.pone.0037342. Epub 2012 May 17.)。このため、分化させた細胞群から、多能性を保持する細胞を選択的に除去する技術が強く望まれていた。本発明においては、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列、典型的にはLIN28Aを特異的に検出するLIN28A応答性mRNAを用いることにより、多能性を保持する細胞を検知し、検出し、認識することができ、好ましい実施形態においては、分離し、選択的に除去することができる。また、この際、LIN28Aスイッチは、顕著な副作用なく未分化細胞を識別できることが確認されている。しかし、細胞の分化状態の識別は、特定の態様に限定されるものではなく、分化状態が異なる細胞の混合物であり得る細胞群から未分化の細胞を検出し、同定し、分離し、除去することを可能とする。

[0066] 本実施形態の工程（1）において用いる、「多能性幹細胞を含みうる細胞群」とは、例えば、初期化因子と接触させた細胞であって、所定の方法及び期間培養された後、リプログラミングされて、人工多能性幹(iPS)細胞の状態になっていることが予測される細胞であってよい。あるいは、多能性幹細胞に対して、所定の分化のための操作を行った細胞群であって、未分化細胞が残存しうる細胞群をいうものとする。ただし、未分化細胞が含まれていない細胞群である場合もある。あるいは、その他の任意の多能性幹細胞を含みうる細胞群であってよく、検出の目的や、細胞群の由来は特には限定されある

ものではない。

[0067] 次に、実施態様（a）において好ましく用いられる多能性幹細胞を含みうる細胞群である、初期化因子と接触させた細胞について説明する。本実施形態において、初期化因子と接触させた細胞とは、典型的には、iPS細胞の調製を目的として、人工的に操作された細胞をいうものとする。iPS細胞は、特定の初期化因子を、DNA、RNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), *Cell*, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), *Science*, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, *Nat. Biotechnol.* 26:101-106 (2008) ; 国際公開WO 2007/069666）。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 2:

525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3 :475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al . (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:10 96-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

[0068] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) (Millipore)、HuSH 29mershRNA Constructs against HDAC1 (Origene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98 059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えれば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えれば、BIX-01294 等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えればBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えれば、LY364 947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えればp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えれば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えればsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグラニン類 (例えれば、プロスタグラニンE2およびプロスタグラニンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として

用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

- [0069] 初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。
- [0070] 一方、DNAの形態の場合、例えば、ウィルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リボソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウィルスベクターとしては、レトロウィルスベクター、レンチウィルスベクター（以上、Cell, 126, pp. 663-676, 2006; Cell, 131, pp. 861-872, 2007; Science, 318, pp. 1917-1920, 2007）、アデノウィルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウィルスベクター、センダイウィルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。
- [0071] また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクシ

ヨンなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5'-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

- [0072] iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDME M、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、靈長類ES細胞培養用培養液（靈長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地 (mTeSR、Stemcell Technology社、Essential 8、Life Technologies社、stemFit、Ajinomoto社)]などが含まれる。
- [0073] 培養法の例としては、たとえば、37°C、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DME M又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFG F含有靈長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。
- [0074] あるいは、37°C、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067 またはW02010/137746) 、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5 (W02009/123349) 、マトリゲル (BD社) およびiMatrix511 (Nippi社) ）を用いる方法が例示される。

[0075] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845)。

[0076] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ 100cm^2 あたり、約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、臍細胞（臍外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

[0077] 次に、実施態様（b）において好ましく用いられる多能性幹細胞を含みうる細胞群である、多能性幹細胞に対して、所定の分化のための操作を行った細胞群について説明する。本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在す

る多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、所望の分化細胞に誘導される任意の細胞が含まれる。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、製造工程において胚、卵子等の破壊をしないで入手可能であるという観点から、iPS細胞であり、より好ましくはヒトiPS細胞である。上記のiPS細胞のほかの多能性幹細胞について以下に説明する。

[0078] (A) 胚性幹細胞

胚性幹細胞（ES細胞）は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚（例えば胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

[0079] ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され (M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された (J. A. Thomson et al. (1998), *Science* 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

[0080] ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取り出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5, 843, 780; T

homson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848 ; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147 ; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932 ; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559 ; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585 ; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。

- [0081] ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37°C、5% CO₂、湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。
- [0082] ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができます(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。
- [0083] ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Research Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。
- [0084] (B) 精子幹細胞
精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69

:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDN F))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

[0085] (C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0086] (D) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

核移植により得られたクローン胚由来のES細胞(nt ES細胞)は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している(T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術(J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646)とES細胞作製技術との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0087] (E) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells

Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)は、W02011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時

間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

[0088] これらの多能性幹細胞を所定の分化細胞に分化誘導させる方法は、既知であり、当業者であれば、目的の細胞に応じて、特定の分化誘導方法を実施することができる。一例として、心筋細胞への分化誘導方法として、例えばLaflamme MAらにより報告された方法により、多能性幹細胞から心筋細胞を製造することができる (Laflamme MA & Murry CE, Nature 2011, Review)。この他にも特に特定されないが、例えば、人工多能性幹細胞を浮遊培養により細胞塊（胚様体）を形成させて心筋細胞を製造する方法、BMPシグナル伝達を抑制する物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02005/033298)、Activin AとBMPを順に添加させて心筋細胞を製造する方法 (W02007/002136)、カノニカルWntシグナル経路の活性化を促す物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02007/126077) および人工多能性幹細胞からFlk/KDR陽性細胞を単離し、シクロスボリンAの存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02009/118928) などが例示される。別の例として、内皮細胞、肝細胞またはインスリン産生細胞などの組織細胞への分化誘導方法として、例えば、Kajiwara M, et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 109:12538-12543, 2012、Kunisada Y, et al, Stem Cell Res. 8:274-284, 2012、Nakagawa, M, et al, Sci Rep 4, 3594, 2014等に報告された方法により、多能性幹細胞から組織細胞を製造することができる。さらに別の例として、神経細胞への分化誘導方法としては、例えば、W02011/019092、W02011/158960に開示された方法により、多能性幹細胞から神経細胞を製造することができる。

[0089] 工程（1）は、上記に例示した細胞群などの多能性幹細胞を含みうる細胞群に、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列を備えるmRNAをコードするベクターを導入する工程である。細胞へのmRNAもしくはベクターの導入工程については、第1実施形態の工程（1）において説明した方法と同様であって良い。この工程は、例えば、実施態様（a）や（b）に対しては、初期化の工程中の、あるいは分化の工程中の任意の時点で行って

よく、任意の時点における、リプログラミング状態あるいは分化状態を得ることができる。実施態様（a）については、特には、iPS様コロニーが形成され、iPS細胞が生成されたと予測される時点、すなわち、リプログラミングされたと予測される時点において、実施することができる。この時点において、iPS細胞の培養培地には、リプログラミングされたiPS細胞と、初期化されなかった細胞とが混在しており、リプログラミングされたiPS細胞を識別する利点があるためである。実施態様（b）については、所定の分化誘導された細胞、例えば心筋細胞や、神経細胞が得られたと予測される時点において、実施することができる。

[0090] 工程（2）は、前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて細胞の分化状態を識別する工程である。識別工程は、第1実施形態において説明したのと実質的に同様の方法で実施することができる。例えば、マーカー遺伝子の翻訳抑制効率を測定することにより、未分化細胞が発現するタンパク質、典型的には細胞内でのLIN28Aの発現量を定量化することができる。そして、これにより、当該細胞がリプログラミングされたiPS細胞であるか、あるいはそのほかの多能性幹細胞（未分化細胞）であるか否かについての情報を得ることができる。所望の状態にリプログラミングされたiPS細胞や、分化細胞中に残存した望ましくない未分化細胞は、識別後に、あるいは識別と同時に選択的に分離することもできる。これらの分離は、マーカー遺伝子としては、典型的には、蛍光タンパク質を用い、所定の翻訳状態にある細胞を、フローサイトメトリーにより、イメージングサイトメトリーにより分離することで実施することができる。あるいは、マーカータンパク質として薬剤耐性タンパク質や、致死遺伝子を用いる場合には、識別と同時に選択的な分離を実施することも可能である。

[0091] 従来、iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。このほかにも、体細胞が初期化された場合に発現する細胞表面タンパク質（例えば、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-2-54、TRA-1-60およびTRA-1-80）を指標として選択していた。本発明の第5実

施形態による細胞の分化状態及びリプログラミング状態の検出方法によれば、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列を備えるmRNA、特に、LIN28A応答性mRNAを用い、未分化細胞が発現するタンパク質、特にLIN28Aの発現を指標として、生きたまま細胞の分化状態及びリプログラミング状態を検出し、iPS細胞あるいは未分化細胞を選択的に分離・分別することが可能となる。従来の方法と比べて、特に細胞表面タンパク質ではなく、生きたまま細胞内の遺伝子発現状態を検知できる、生きたまま細胞内の情報を可視化できるといった利点がある。

実施例

[0092] 以下に、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は本発明を限定するものではない。

[0093] [プラスミド構築]

最初に、トリガープラスミドとスイッチプラスミドの空ベクターとして、pTAPmyc-T2A-tagRFPとpAptamerCassette-EGFPをそれぞれ作製した。

pTAPmyc-T2A-tagRFPの作製では、具体的には、まず、pIRES2-DsRed Express (Clontech)をBamHI、NheIで切断後、合成オリゴSKW003及びSKW004をアニールさせた二本鎖DNAを挿入し、pTAP-IRES2-DsRed Exを作製した。さらに、このプラスミドとpTAP-mycをBamHI、XbaIで切断し、pTAP-IRES2-DsRed Exに挿入することで、pTAPmyc-IRES2-DsRed Exを作製した。次に、pTAP-BS15-T2A-tagRFPを鋳型とし、合成オリゴKWC0093及びKWC0094をプライマーセットとして、目的部分をPCR増幅した。このPCR産物とpTAPmyc-IRES2-DsRed ExをBglII、NotIで切断し、消化済みPCR産物を挿入することでpTAPmyc-T2A-tagRFPを得た。

[0094] pAptamerCassette-EGFPは、pBoxCDGC-kMet-EGFP（参考文献[1]）をNheI、AgeIで切断後、合成オリゴSKC0041及びSKC0042をアニールさせた二本鎖DNAを挿入することで作製した。LIN28A発現プラスミド(pLIN28Amyc-T2A-tagRFP)の作製では、まず、pTrg5H-hLin28を鋳型として、合成オリゴSKC0052及びKWC0053をプライマーセットとして、目的部分を増幅した。このPCR産物とpTAPmyc-

T2A-tagRFPをSalI、BamHIで切断後、両者をライゲーションすることで、pLIN28Amyc-T2A-tagRFPを得た。

[0095] U1A発現プラスミド(pu1Amyc-T2A-tagRFP)の作製では、まず、pTrg5H-U1Aを鋳型として、合成オリゴSKC0052及びKWC0053をプライマーセットとして、目的部分を増幅した。このPCR産物とpTAPmyc-T2A-tagRFPをSalI、BamHIで切断後、両者をライゲーションすることで、pU1Amyc-T2A-tagRFPを得た。

ここまでに使用した合成オリゴDNAの配列は、以下の表4に示す。

[0096] [表4]

ID	配列	配列番号
KWC0041	CTAGCGGATCCTAATACGACTCACTATAA	1 1
KWC0042	CCGGTTATAGTGAGTCGTATTAGGATCCG	1 2
KWC0052	gagGTCGACCCCACCATGGGCTCCGTGTCCAACCAG	1 3
KWC0053	ctcGGATCCATTCTGTGCCTCCGGAGCAG	1 4
KWC0093	gagAGATCTGAAGGCAGAGGCTCCCTCC	1 5
KWC0094	ctcGCGGCCGCTAATTAGTTGTGCCAGTTGC	1 6
SKW003	CTAGGGCTCTGCAGGTCGACACCATGGGATCCGGAGATCTCATATGCA TCTCGAGTGATAGTCTAGAct	1 7
SKW004	gatcaGTCTAGACTATCACTCGAGATGCATATGAGATCTCCGGATCCAT GGTGTCGACCTGCAGAGCC	1 8
KWC0025	gagGTCGACACCAGGcgGCAGTCCCGAGACCC	1 9
KWC0034	ATAGACAAACGCACACCGGCCTTATTCC	2 0

[0097] 各スイッチプラスミドの作製では、まず、pAptamerCassette-EGFPをAgeI、BamHIで切断した。次に、下記表5の組み合わせで合成オリゴをアニールさせた二本鎖DNAを作製し、消化済みpAptamerCassette-EGFPに挿入することで、各LIN28Aスイッチプラスミドを得た。

[0098]

[表5]

スイッチ 標記名	ID	配列	配列 番号
original	KEC-80	GATCCATAGTTAGGGCAGGGATTTGCCACAAGGAGG TAACTATAGATCTA	2 1
	KEC-81	CCGGTAGATCTATAGTTACCTCCTGTGGGCAAAATCCCTG CCCTAAAATATG	2 2
stbA	KWC0095	GATCCgggggTTAGGGCAGGGATTTGCCACAAGGAGGT AcccccAGATCTA	2 3
	KWC0096	CCGGTAGATCTgggggTACCTCCTGTGGGCAAAATCCCTG CCCTAAAccccG	2 4
stbB	KWC0097	GATCCgggggTTAGGGCgGGGATTTCGCCACAAGGAGGT AcccccAGATCTA	2 5
	KWC0098	CCGGTAGATCTgggggTACCTCCTGTGGGCGAAATCCCCGC CCTAAAccccG	2 6
stbC	KWC0099	GATCCgggggcTTAGGGCgGGGATTTCGCCACAAGGAGGTg cccccAGATCTA	2 7
	KWC0100	CCGGTAGATCTgggggcACCTCCTGTGGGCGAAATCCCCGC CCTAAgccccG	2 8
mutant	KWC0159	GATCCgggggcTTAGGGCgaaagaTTcGCCACAAGGttGTgcc cccAGATCTA	2 9
	KWC0160	CCGGTAGATCTgggggcACaaCCTTGTGGGCGAAAtttcGCC TAAgccccG	3 0
deletion	KWC00165	GATCCgggggcTTAGGGCgGGTTcGCCACAAGTgccccAGA TCTA	3 1
	KWC00166	CCGGTAGATCTgggggcACTTGTGGGCGAACCCGCCCTAAgc ccccG	3 2

[0099] 各U1Aスイッチプラスミドは、表6の組み合わせでオリゴを用い、LIN28Aスイッチの作製と同様に作製した。

[0100]

[表6]

スイッヂ標 記名		ID	配列	配列 番号
W T	U1hp	KWC001	GATCCcgATCCATTGCACTCCGGATcgAGATCTA	3 3
		KWC002	CCGGTAGATCTcgATCCGGAGTGCAATGGATcgG	3 4
	U1utr	KWC003	GATCCACAGCATTGTACCCAGAGTCTGCCCCAGACATTGC ACCTGGCGCTGTAGATCTA	3 5
		KWC004	CCGGTAGATCTACAGCGCCAGGTGCAATGTCTGGGACAG ACTCTGGGTACAATGCTGTG	3 6
	U1utr_stb	KWC005	GATCCCACAGCATTGTACCCcgagGAGTCTGaaaaCAGACATT GCACCctcgGCGCTGTGAGATCTA	3 7
		KWC006	CCGGTAGATCTCACAGCGCcggGAGTGAATGTCTGttcCAG ACTCctcgGGTACAATGCTGTGG	3 8
	U1LSL	KWC007	GATCCggccaGAGTCCTTCGGGACATTGCACCTggccAGATCT A	3 9
		KWC008	CCGGTAGATCTTggccaGGTGCAATGTCCCGAAGGACTCtgccc G	4 0
	U1LSL +10bp	KWC009	GATCCGTGAACCTCAgGCCAGAGTCCTCGGGACATTGCAC CTGGCcTGAAGTTCACAGATCTA	4 1
		KWC0010	CCGGTAGATCTGTGAACCTCAgGCCAGGTGCAATGTCCCGA AGGACTCTGGCcTGAAGTTCACG	4 2
	U1LSL +15bp	KWC0011	GATCCTCAAGGTGAACCTCAgGCCAGAGTCCTCGGGACAT TGCACCTGGCcTGAAGTTCACCTTGAAGATCTA	4 3
		KWC0012	CCGGTAGATCTTCAAGGTGAACCTCAgGCCAGGTGCAATGT CCCGAAGGACTCTGGCcTGAAGTTCACCTTGAG	4 4
mu t	U1LSL	KWC0019	GATCCggccaGAGTCCTTCGGGACATTaCggCtgcccAGATCT A	4 5
		KWC0020	CCGGTAGATCTTggccaGccGtAATGTCCCGAAGGACTCtgccc G	4 6
	U1LSL +10bp	KWC0021	GATCCGTGAACCTCAggccaGAGTCCTCGGGACATTaCggC tggccTGAAGTTCACAGATCTA	4 7
		KWC0022	CCGGTAGATCTGTGAACCTCAggccaGccGtAATGTCCCGAA GGACTCtgcccTGAAGTTCACG	4 8
	U1LSL +15bp	KWC0023	GATCCTCAAGGTGAACCTCAggccaGAGTCCTTCGGGACATT aCggCtgcccTGAAGTTCACCTTGAAGATCTA	4 9
		KWC0024	CCGGTAGATCTTCAAGGTGAACCTCAggccaGccGtAATGTCC CGAAGGACTCtgcccTGAAGTTCACCTTGAG	5 0

培養細胞へのトランスフェクションのためのプラスミドは、すべてJETSTAR 2.0 (VERITAS)を用いて大量精製した。

[0101] [IVTテンプレートの構築]

タンパク質コード領域 (ORF)、トリガーmRNA及びレファレンスマRNA作製用の5' UTR及び3' UTR配列は、プラスミドあるいはオリゴDNAから適当なプライマーを用いて、PCR増幅した。鑄型としたプラスミドと使用したプライマー、及び鑄型としたオリゴDNAと使用したプライマーは、それぞれ下記表7、8、9の通りである。

[0102]

[表7]

ORF	鑄型 ブ ラ ス ミ ド	プライ マー	ID	配列	配列 番号
LIN28 A	pT OP	Lin_IVT fwd	KEC-116	CACCGGTCGCCACCATGGGCTCCGTGTCCAAC	5 1
	O h Lin 28	Lin_IVT rev	KEC-117	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAATTCTGTGCC TCCGGGAG	5 2
hmAG 1	S/G 2/M Gr een	hmAG1 _IVTfw d	KEC-330	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCAAGC CCG	5 3
		hmAG1 _IVTrev	KEC-331	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCACTTGGCCTGG CTGGGC	5 4
hmKO 2	G1 Ora nge	hmKO2 _IVTfw d	KEC-332	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGTGTGATTAAAC CAGAGATG	5 5
		hmKO2 _IVTrev	KEC-333	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAAGGAATGAGCT ACTGCATCTTCTACCTG	5 6
iRFP6 70	pS M-i REP	iRFP670 -TAPfw d	YF503	GACACCATGGGATCCgcgcgtaaaggcgatctcac	5 7
	670	iRFP670 -TAPRe v	YF504	TATGAGATCTgcgttgtggcgccggtg	5 8
EGFP	pCT p E GFP	TAP_EG FP_IVTf wd	KEC-67	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCGTGAGCAAGG GC	5 9
		TAP_IV Trev	KEC-23	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGAT GCATATGAGATC	6 0
tagRF P	pTA P-ta	tagRFP fwd	KIC-001	CACCGGTCGCCACCgtggatccgtgtctaag	6 1
	gRF P	TAP_IV Trev	KEC-23	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGAT GCATATGAGATC	6 2

[0103]

[表8]

	5'UTR	配列番号
鋳型	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAGAGAGAAAAGAAGA GTAAGAAGAAATATAAGACACCGGTGCCACCATG	6 3
プライマ ー配列 1	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC	6 4
プライマ ー配列 2	CATGGTGCGACCGGTGCTTATATTCTTACTC	6 5

[0104] [表9]

	3'UTR	配列番号
鋳型	TCTAGACCTTCTGCAGGGCTTGCCTCTGGCATGCCCTCTCTC CCTTGCACCTGTACCTCTGGTCTTGAATAAGCCTGAGTAGG	6 6
プライマ ー配列 1	TCTAGACCTTCTGCAGGGC	6 7
プライマ ー配列 2	TTTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTATTCAAAGACCAAG	6 8

[0105] トリガーmRNA及びレファレンスマRNA合成用IVTテンプレートを作製するため
に、5' UTR断片、3' UTR断片、及びORFを、表10のT7FwdA及びRev120Aのプラ
イマーセットを用いてPCR增幅して連結した。

[0106] [表10]

	ID	配列	配列番号
T7F wd A	SKC -11 1	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC	6 9
Rev 120 A	KEC -88 3	TT TT TTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTATTCA	7 0

[0107] スイッチ mRNA合成用IVTテンプレートを作製するために、3' UTR断片、スペーサー配列及びORFを、5' UTRプライマー及びRev120Aのプライマーセットを用いてPCR増幅して連結した。各スイッチmRNAの作製に使用した5' UTRプライマー及びスペーサー配列は表11の通りである。

[0108] [表11]

	配列	配列番号
s t b C	GAAATTAATACGACTCACTATAggggcTTAGGGCgGGGATTTCGCCAC AAGGAGGTgccccGGACACCCGCAGATCG	7 1
Original	GAAATTAATACGACTCACTATAgGACAATAGTTTAGGGCAGGGATT GCCACAAGGAGGTAACTATCCGCAGATCGAGAAGAAGGCG	7 2
stbC用スペーサー	ACACCCGCAGATCGAGAAGAAGGCGAATTAAAGAGAGAAAAGAAGAGTA AGAAGAAATATAAGACACCGGTCGCCACCATG	7 3
Original用スペーサー	AGATCGAGAAGAAGGCGAATTAAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAA TATAAGACACCGGTCGCCACCATG	7 4

[0109] PCR産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製した。精製前に、PCR産物がプラスミドから増幅された場合は、Dpn I (TOYOB0)を用いて、37° Cで30分消化した。

[0110] [mRNAの合成、精製]

mRNAの合成は参考文献[2]に従って、MegaScript T7 kit (Ambion)を用いて調整した。この反応において、スイッチ mRNA以外は、ウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、シードウリジン-5' -三リン酸及び5-メチルシチジン-5' -三リン酸 (TriLink BioTechnologies)をそれぞれ使用した。また、グアノシン三リン酸は、Anti- Reverse Cap Analog (New England Biolabs)で5倍希釈したものを使用した。反応混合液を37° Cで6時間反応させ、TURB0 DNase (Ambion)を添加した後、さらに37° Cで30分恒温処理した。得られたmRNAは、FavorPrep Blood / Cultured Cell total RNA extraction column (Favorgen Biotech)で精製し、Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)を用いて、37° Cで30分恒温処理した。その後、RNeasy MinElute Cleanup Ki

t (QIAGEN)により、さらに精製した。

[0111] [細胞培養]

HeLa細胞は、10% Fetal Bovine Serum (FBS)を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) -F12(Invitrogen)で培養した。HEK293FT細胞は10% FBS、2mM L-Glutamine (Invitrogen)、0.1 mM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen)、1 mM Sodium Pyruvate (Sigma)を添加したDMEM(ナカライトекс)で培養した。iPS細胞はラミニンコーティングした6ウェルプレート上で、StemFit (味の素)を用いてフィーダーフリー条件で培養した。

[0112] [プラスミドのトランスフェクション]

培養細胞は24ウェルプレートに播種し、翌日に精製したプラスミドを全量が500 ngになるよう導入した。変異体を用いた実験では、HEK293FT細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に精製したプラスミドを全量が125 ngになるよう導入した。導入には、2 μLのLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、製造者の指示に従って実施した。使用したプラスミドは、スイッチプラスミドとトリガープラスミドの量比が1対4になるようにOpti-MEM(Invitrogen)中で混合した。トランスフェクション後、4~6時間後に培地を交換した。

[0113] [mRNAトランスフェクション]

培養細胞は24ウェルプレートに播種し、翌日に合成したmRNAを導入した。導入には、1 μLのStmFect (Stemgent)を用いて、製造者の指示に従って実施した。HEK293FT細胞を用いた実験では、スイッチmRNA 100 ng、トリガーmRNA 0 ~300 ng、レファレンスマRNA 50 ngを共導入した。iPS細胞を用いた実験では、スイッチmRNA 100 ng、レファレンスマRNA 100 ngを共導入した。トランスフェクション後、4~6時間後に培地を交換した。iPS細胞へのトランスフェクションでは、さらに導入の1時間以上前に培地を交換した。

[0114] [フローサイトメトリー]

トランスフェクションの翌日に細胞をプレートから分離し、メッシュを通して、フローサイトメトリーにより分析した。24ウェルプレートを用いた実験では、Accuri C6 (BD Biosciences)を使用した。EGFPとhmAG1はFL1 (530/3

0 nm) filters フィターにより検出した。tagRFP、mKO2はFL2 (585/40 nm) filters フィターにより検出した。iRFP670はFL4 (675/12.5 nm) filters フィターにより検出した。96ウェルプレートを用いた実験ではBD LSRFORTessa (BD Bioscience)を使用した。EGFP、tagRFPは、FITC filter(530/30 nm)を備えたBlue laser、PE filter (585/42 nm)を備えたGreen laserにより、それぞれ分析した。死細胞及びデブリは、前方及び側方光散乱シグナルにより除外した。プラスミドを用いた翻訳効率の計算は、生細胞のうち、tagRFPの蛍光値が一定以上のものを解析対象とした。mRNAを用いた翻訳効率の計算は、生細胞のうち、iRFP670またはmKO2の蛍光値が一定以上のものを解析対象とした。

[0115] [ドキシサイクリンによるLIN28A発現誘導とトランスフェクション] ドキシサイクリン添加によって、LIN28Aの発現を誘導できる細胞株は、10% FBS、2 mM L-Glutamine (Invitrogen)、0.1 mM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen)、1 mM Sodium Pyruvate (Sigma)を添加したDMEM(ナカライトекс)で培養した。細胞は12ウェルプレートに播種し、トランスフェクション前にドキシサイクリンを含む培地(0 ng/mL ~ 10 ng/mL)に交換した。トランスフェクションは、播種の翌日に行い、精製したプラスミドを全量が400 ngになるよう導入した。導入には、4 μLのLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、製造者の指示に従って実施した。使用したプラスミドは、スイッチプラスミドとトリガープラスミドの量比が1対1になるようにOpti-MEM(Invitrogen)中で混合した。トランスフェクション後、4時間後に培地を交換した。

[0116] [ウエスタンブロッティング] フローサイトメトリー解析する細胞のうち、半分をマイクロチューブに回収し、300 g、5 min、4° Cで遠心した。上精を除き、PBS 200 uLを加えて再懸濁後、300 g、5 min、4° Cで遠心した。この行程を2度行い、-80° Cで保存した。回収した細胞にRIPA Buffer (25 mM Tris (pH7.6)、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS)を50 uL加え30 min氷上に置きタンパク質を抽出した。これを15000 gで20 min遠心し、上精を別のエッペンに回収後、-20° Cで保存した。各サンプルについて、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)を用いてタン

パク質濃度を測定した。その後、Extra PAGE One Precast Gel 10 - 20%(nac alai tesque)を用いてサンプルを泳動した。マーカーは、3 uL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE health care)に、0.5 uL MagicMark (商標) XP Western Protein Standard (invitrogen)を加えて調製した。各サンプルは総タンパク質濃度が5 μ g/15 μ LになるようライセートをMilliQで希釈した。調製したサンプルに6×SDS buffer 4 uLを添加後、95° C、3 minボイルした。全量をウェルにアプライし、20 mAにて120 min泳動した。泳動後、ゲルをiBlotドライブロッティングシステム(Invitrogen)によってメンブレンに転写し、Blocking One (nacalai tesque)を用いてブロッキングした。GAPDHは、GAPDH Antibody (FL-335) (Santa Cruz Biotechnology)、Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (bio-rad) を用いて検出した。LIN28Aは、Anti-human LIN28A (Goat) (R and D Systems)、Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate (Life Technologies)を用いて検出した。抗体処理後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GEヘルスケア)を用いて化学発光させ、LAS-4000 (FUJIFILM)で観察した。

[0117] (実施例1)

[天然アプタマーの改変]

実験で使用するアプタマーは、LIN28A結合モチーフとして知られているアプタマー(図3左; Original aptamer)を改変し、mRNA上で構造形成が起こりやすくなるように設計した。Originalの配列に存在するAU塩基対を、より強固なGC塩基対に徐々に変更していった(図3右; stbA、stbB、stbC)。改変に従って、塩基対形成確率が上昇し、構造の安定化が予想される。アプタマーの2次構造予測には、CentroidFold (<http://www.ncrna.org/centroidfold>) を利用した。図3に示したオリジナルを含むアプタマーを、図2のプラスミドに挿入し、スイッチプラスミドを得た。表1に示した安定化アプタマー配列以外の、アプタマー配列を下記表1 2に示す。originalのアプタマーから改変した塩基は小文字で示している。

[0118]

[表12]

スイッチ標記名	配列	配列番号
stbD	gggggcUUAGGGCgGGGAUuccGCCACAAAGGAGGUgcccc	7 5
mutant	gggggcUUAGGGCgaaagaUUcGCCACAAAGGUUGUgcccc	7 6
deletion	gggggcUUAGGGCgGGUucGCCACAAAGUgcccc	7 7

[0119] [発明したスイッチプラスミドの翻訳効率の確認]

作製したスイッチプラスミドは、LIN28Aを発現するトリガープラスミドとともに、HEK293FT細胞に共導入した。図4は、各スイッチプラスミドの翻訳効率の比較したグラフである。より良いスイッチであるほど、翻訳効率の低下が見られる。翻訳効率は、まずGFPの蛍光強度をtagRFPの蛍光強度で割り、次に、LIN28A導入時の値と非導入時の値を割って求めた。さらに、コントロールのスイッチプラスミド(図4; No aptamer)を基準として比較した。エラーバーは平均±標準偏差 ($n = 2$ 、各回に3つのサンプルから平均を求めた、独立した2回の実験)を示す。Originalを挿入したスイッチに比べ、より構造を安定化させたスイッチにおいてより強い翻訳抑制が観察された。しかし、最も構造が安定と考えられるstbDでは、強い翻訳抑制は見られなかった。この理由として、図3において明らかなように、stbDではターミナルループの構造が変化していることが挙げられる。従って、より強いスイッチの翻訳抑制には、適切な2次構造が安定に形成される必要があると考えられる。

[0120] 次に、特に強い翻訳抑制が観察されたstbCを挿入したスイッチが、他の細胞種でも機能しうるか確認した。実験、及び解析方法は上記HEK293FTの場合と同じである。図5は、HeLa細胞中でのLIN28Aスイッチの翻訳効率を示したグラフである。エラーバーは平均±標準偏差 ($n = 3$)を示す。stbCを挿入したスイッチが、HeLa細胞中でもLIN28Aに応答して、翻訳抑制を起こすことが示された。

[0121] 図6は、HEK293FT細胞に、LIN28Aスイッチあるいはその変異体を導入した場合の翻訳効率を示したグラフである。実験、及び解析方法は上記と同じであ

る。エラーバーは平均±標準偏差 ($n = 3$)を示す。*mutant*は、アプタマー配列中に存在するLIN28Aとの結合に関与する塩基を置換したものを意味する。また、*deletion*はアプタマー配列中からLIN28Aとの結合に関与する塩基を除去したものを意味する。従って、これら2つの変異体はLIN28Aとの結合が阻害されており、翻訳効率の回復が期待される。実際、これら2つの変異体では、stbCを挿入したスイッチのような、強い翻訳抑制は観察されなかった。

[0122] [LIN28Aスイッチの翻訳効率と細胞内LIN28A量の相関関係の確認]

ドキシサイクリン添加によって、LIN28Aの発現を誘導できる細胞株に、スイッチプラスミドを導入することで、スイッチの翻訳効率と細胞内LIN28A量の相関関係を検証した。この細胞株は、添加するドキシサイクリン濃度に依存して、LIN28Aの発現量を調節できる。すなわち、ドキシサイクリン濃度の増加に従って、スイッチの蛍光比が低下することが期待される。図7Aは、添加したドキシサイクリン濃度と各スイッチの翻訳効率を表したグラフである。stbCを挿入したスイッチが、ドキシサイクリン濃度に依存して、最も高濃度に翻訳抑制を受けることが確認された。図7Bは、ドキシサイクリン濃度依存的に、LIN28Aの発現量が上昇しているか、ウエスタンブロッティングによって確認した結果である。内部標準として、同時にGAPDHの発現も検出した。実際、ドキシサイクリン濃度に従って、LIN28Aの発現量が増大することが確認できた。図7Cは、図7Bで得たバンド濃度を定量し、ドキシサイクリン濃度との関係を示したグラフである。LIN28Aの相対発現量は、ドキシサイクリン濃度が、3 ~ 4 ng/mLの時点で上限に達していることが、確認された。この濃度は、図7Aにおいて、stbCを挿入したスイッチの蛍光比が下限に達した濃度と一致する。従って、LIN28Aスイッチは、細胞内LIN28A量依存的に翻訳抑制を受けることが確認された。図7Dは、LIN28Aの相対発現量が上限に達するまでの区画で、相対発現量と各スイッチの蛍光比の関係を表したグラフである。各LIN28Aスイッチの蛍光比とLIN28Aの相対発現量は、相関関係にあり、stbCを挿入したスイッチは、高濃度に細胞内で発現するLIN28A量を検出できることが示された。

[0123] [LIN28AスイッチのmRNAトランスフェクションにおける翻訳効率の確認]

タンパク質応答性mRNAを培養細胞へ直接導入しても、LIN28Aスイッチが機能するか検証した。スイッチmRNA、LIN28Aを発現するトリガーmRNA、及び一連のmRNAが細胞に導入されているか確認するためのレファレンスマRNA（iRFP mRNA）をHEK293FT細胞に共導入した。導入するトリガーmRNA量は0 ng（非導入）、50 ng、100 ng、150 ng、200 ng、300 ngの6段階に変化させた。理論的には、トリガーmRNAの導入量に伴って、スイッチmRNAからの翻訳効率の低下が起こる。図8Aは、各量のトリガーmRNA導入時におけるstbCを挿入したスイッチの蛍光を、フローサイトメトリーによってプロットしたものである。トリガーmRNAの導入量に従って、集団が下方に移動する（スイッチmRNAからの翻訳量が低下する）ことが確認された。

[0124] 図8Bは、他のアプタマーを挿入したスイッチ及び図8Aの測定結果を重ね合わせたドットプロットである。各アプタマーを挿入したスイッチのうち、stbCを挿入したスイッチにおいてのみ、トリガーmRNA導入量に伴った細胞集団の移動が観察された。従って、stbCを挿入したスイッチを細胞集団に導入することで、細胞内のLIN28Aの発現量依存的に細胞集団の分離が可能であることが示唆された。図8Cは、各トリガーmRNA導入量でのスイッチmRNAの翻訳効率を示したグラフである。翻訳効率は、まずhmAG1の蛍光強度をiRFP670の蛍光強度で割り、次に、トリガーmRNA導入時の値と非導入時の値を割って求めた。各アプタマーを挿入したスイッチのうち、stbCを挿入したスイッチにおいて、強い翻訳の抑制が観察された。さらに、トリガーmRNAの導入量の増加に伴って、翻訳効率の低下が確認できた。

[0125] (実施例2)

[LIN28AスイッチによるiPS細胞の識別]

LIN28Aは、iPS細胞やES細胞をはじめとする幹細胞中で高発現しているタンパク質である。従って、LIN28Aの発現量の差から、iPS細胞と分化細胞の区別が生きた細胞を用いて可能である。このことは、LIN28Aスイッチの各細胞における翻訳効率の違いから、iPS細胞と分化細胞の識別が可能であることを示

唆している。つまり、LIN28Aスイッチを細胞に導入した時、iPS細胞ではLIN28Aが高発現しているので、翻訳の抑制が観察され、分化細胞では翻訳抑制が観察されないはずである(図9A)。このとき、スイッチmRNAがトランスフェクションされていない細胞は、レファレンスマRNAの発現を測定することで除去できる。さらに、フローサイトメトリーを行うことで、レファレンスマRNAの蛍光値に対するスイッチmRNAの蛍光値の差から、iPS細胞の集団と分化細胞の集団を分離できる(図9B)。

[0126] 図10Aは、各LIN28AスイッチとレファレンスマRNA (mK02)を共導入した際の測定結果を示すドットプロットである。コントロールのスイッチでは、iPS細胞と分化細胞の集団が一致しているが、stbCを挿入したスイッチにおいて、明らかに細胞集団が分離していることが確認できた。また、図10Bは、図10Aのドットプロットにおける2つの蛍光シグナルの比率を表すヒストグラムである。図10Cは、iPS細胞と分化細胞でのLIN28Aスイッチの翻訳効率を比較したグラフである。翻訳効率は、まずhmAG1の蛍光強度をmK02の蛍光強度で割り、次に、そのiPS細胞における値と分化細胞における値を割って求めた。iPS細胞におけるLIN28Aスイッチの翻訳効率は、分化細胞に比べて50%以上低下していることが観察された。

[0127] 図11Aは、分化誘導14日目及び34日目のiPS細胞と未分化のiPS細胞におけるスイッチの翻訳効率の比較である。翻訳効率は、まずEGFPの蛍光強度をtagRFPの蛍光強度で割り、次に、そのiPS細胞における値と分化細胞における値を割った。さらに、その値をコントロール (No aptamer)の値で標準化したものをグラフに示した。分化細胞に対してiPS細胞の翻訳効率が低下していることが確認された。図11Bは、各細胞のフローサイトメトリーの結果を示すドットプロットとその重ね合わせである。分化誘導に伴って、細胞集団が上方に移動する(翻訳量が増大する)ことが観察された。

[0128] (実施例3)

[mRNAスイッチを用いたヒト内在性タンパク質検知の拡張性]

今回の発明では、mRNAに挿入するアプタマーの構造を安定化させることで

、高感度なmRNAスイッチの開発に成功した。この設計原理が、LIN28A以外のタンパク質検出にも応用可能か否か、U1Aに応答するmRNAスイッチを作製することで検証した。U1Aは、スプライシング関連タンパク質として、ヒト細胞内に存在する。図12は、実験に使用したU1Aに結合するアプタマーである。U1hp及びU1utrは、天然に存在するアプタマーである。下段の2次構造（図12中の（b））は、参考文献[4]から転載した。図12上段のU1utrは、報告されている配列をもとに、CentroidFoldを用いて2次構造を予測したものである。この結果、U1utrは安定でなく、報告された構造を形成しない可能性が生じた。そこで、複数ヶ所の塩基を改変することで、報告されたものに近い構造を形成するU1utr_stbを設計した。また、U1LSLは、参考文献[5]で使用されているアプタマーである。このアプタマーに、長いステム構造を付加することで、mRNA上で他の領域と相互作用を起こしにくくし、アプタマーの構造が保護されるようにした。表2に示した安定化アプタマー配列以外の、アプタマー配列を下記表13に示す。originalのアプタマーから改変した塩基は小文字で示している。

[0129] [表13]

スイッチ標記名		配列	配列番号
m ut	U1LSL	ggccaGAGUCCUUCGGGACAUUaCggCuggcc	7 8
	U1LSL+10bp	GUGAACUUCAggccaGAGUCCUUCGGGACAUUaCggCuggccUG AAGUUCAC	7 9
	U1LSL+15bp	UCAAGGUGAACUUCAggccaGAGUCCUUCGGGACAUUaCggCu ggccUGAAGUUUCACCUUGA	8 0

[0130] 図13は、各スイッチプラスミドの翻訳効率の比較したグラフである。作製したスイッチプラスミドは、U1Aを発現するトリガープラスミドとともに、HEK293FT細胞に共導入した。翻訳効率は、まずGFPの蛍光強度をtagRFPの蛍光強度で割り、次に、U1A導入時の値と非導入時の値を割って求めた。さらに、コントロールのスイッチプラスミド（図4； No aptamer）を基準として比較した

。エラーバーは平均± 標準偏差 ($n = 3$)を示す。その結果、U1utrよりも、より構造が安定であると考えられるU1utr_stbにおいてより強い翻訳抑制が観察された。さらに、U1LSLについても、より長いステム構造を付加し、構造安定化を図ったアプタマーにおいて、より強い翻訳抑制が観察された。

[0131] さらに、U1LSL及びそれにステム構造を付加したアプタマーについて、塩基置換を行い、変異体を作製した。これらの変異体は、野生型と同じ構造を形成するが、U1Aとの結合能は失われている。従って、変異体を挿入したmRNAでは、翻訳効率の回復が期待される。図14Aは、各スイッチプラスミドをコントロールのトリガープラスミドとともに、HEK293FT細胞に導入した際の蛍光顕微鏡写真である。変異体 (mut) アプタマーを挿入したスイッチよりも、野生型 (WT) アプタマーを挿入したスイッチにおいて、強い翻訳抑制が観察された。図14Bは、図14Aで観察した細胞をフローサイトメトリー解析して得られたヒストグラムである。また、図14Cは、野生型アプタマーを挿入したスイッチと変異体アプタマーを挿入したスイッチの蛍光比を示したグラフである。蛍光比は、まずGFPの蛍光強度をDsRed Exの蛍光強度で割り、次に、野生型と変異体を挿入したスイッチの値を割って求めた。エラーバーは平均± 標準誤差 ($n = 3$ 回の独立した実験)を示す。これらの結果から、作製したU1Aスイッチは、細胞内在のU1Aに応答できることが示唆された。すなわち、任意のタンパク質に結合するアプタマーについて、その2次構造を安定化させることで、所望のタンパク質を検知できるmRNAスイッチが作製できる。

[0132] (実施例4) [ノックダウン解析]

培養細胞は24ウェルプレートに播種し、翌日に全量500 ngのプラスミドと5 pmolのshRNAを共導入した。導入には、2 μLのLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、製造者の指示に従って実施した。使用したプラスミドは、スイッチプラスミドとレファレンスプラスミド(pTAPmyc -T2A-tagRFP)の量比が1対4になるようにOpti-MEM(Invitrogen)中で混合した。トランスフェクション後、4~6時間後に培地を交換した。トランスフェクションの翌日に細胞をプレートから分離し、メッシュを通して、フローサイトメトリーにより分析し

た。24ウェルプレートを用いた実験では、Accuri C6 (BD Biosciences)を使用した。EGFPはFL1 (530/30 nm) filtersフィターにより検出した。tagRFPはFL2 (585/40 nm) filtersフィターにより検出した。使用したshRNAは以下のとおり。

[0133] [表14]

スイッチ標記名	配列	配列番号
コントロールshRNA	5'- GCCUAAGGUUAAGUCGCCUCGCAGCAUAGGCGAGGGCGA CUUAACCUUAGGCAG -3'	81
U1A-sh RNA	5'- GAUCAAGAAGGAUGAGCUAAAAAGAGCAUAGCUUUUU AGCUCAUCCUUCUUGAUCAAG -3'	82

[0134] [定量RT-PCR]

mRNAトランスフェクションを行った翌日に、iPS細胞をプレートから分離し、細胞を回収した。分化細胞は、トランスフェクションを行っていないものを同様の手法で回収し使用した。トータルRNA回収、逆転写、定量PCRはmiRNA Cells-to-CT kit (Applied Biosystems)を用いて行った。成熟miRNAの発現レベルは、miRNA TaqMan probe (Applied Biosystems) を用いた。また、RNU6Bを用いて値を基準化した。発現レベルは $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて計算した。使用したTaqMan probeは以下のとおり。

[0135] [表15]

	Assay ID
RNU6B	001093
let7d	002283
let7g	002282
miR-98	000577

[0136] [U1Aスイッチが内在性U1Aに応答することの確認]

図15は、U1AスイッチにおけるshRNA導入時の相対翻訳効率を示したグラ

フである。作製したスイッチプラスミドは、tagRFPを発現するレファレンスプラスミド及びshRNAとともに、HEK293FT細胞に共導入した。相対翻訳効率は、まずGFPの蛍光強度をtagRFPの蛍光強度で割り、次に、shRNA未導入時の値と各サンプルの値を割って求めた。エラーバーは平均±標準誤差 (n = 3、各回に3つのサンプルから平均を求めた、独立した3回の実験)を示す。その結果、安定なアプタマーを挿入したスイッチにおいてshUA1導入時に、翻訳の増加が認められた。この結果は、より安定な構造を有するアプタマーを挿入したスイッチにおいてより高感度に内在U1Aを検出できることを意味している。従って、2次構造を安定化することで、内在性タンパク質を検出するのに十分な感度を持ったmRNAスイッチが作製できる。

[0137] [LIN28Aスイッチの導入が内在のmiRNA発現に与える影響]

LIN28Aは、自然界においては、let7ファミリーに属する一連のmiRNAの成熟に関わっている。具体的には、let7 miRNAの前駆体中のループ部位にLIN28A結合サイトが存在し、ここにLIN28Aが結合することで、成熟miRNAの発現を阻害する。そのため、LIN28Aと結合能を有するmRNAスイッチを導入することは、このmiRNA発現制御の過程に影響を及ぼす可能性がある。つまり、内在のLIN28AがmRNAスイッチに結合することで、miRNA成熟の抑制が不十分になり、let7ファミリーの発現量が増加するかもしれない。これを調べるため、定量RT-PCRにより、3種類の代表的な成熟let7ファミリーの発現量を測定した。

[0138] 図16は、LIN28Aスイッチ導入時の成熟let7 miRNAの発現レベルを表すグラフである。分化細胞における発現量を1として表した。エラーバーは平均±標準偏差 (n = 3)を示す。その結果、iPS細胞へのLIN28Aスイッチ導入において (no aptamer, stbC) 、顕著な成熟miRNAの発現変化は観察されなかった。従って、今回発明したLIN28Aスイッチは、miRNAの発現プロファイルに大きな影響を与えることなく、iPS細胞と分化細胞を識別できる。

[0139] [人工アプタマーを活用したmRNAスイッチの作製]

U1Aスイッチ、LIN28Aスイッチで利用したアプタマーは、天然に存在するものをそのまま利用するか、一部を抽出したモチーフを利用して作製した。原

理的には、人工的に取得されたアプタマーであっても、今回利用した手法を活用することで、高感度なmRNAスイッチが作製できる。これを検証するため、がん関連タンパク質の1つであるp50に結合するアプタマー(p50A：配列番号83)を用いてmRNAスイッチを作製した(図17、左図、参考文献[6])。このアプタマーに、長いステム構造を付加することで、mRNA上で他の領域と相互作用を起こしにくくし、アプタマーの構造が保護されるようにした(p50A-stb：配列番号84、図17、右図)。また、結合部位の塩基を置換することで、変異体を作製した(p50A-stb_{mut}：配列番号85)。図17は、実験に使用したp50に結合するアプタマーである。変異体を作製するにあたって、置換した塩基は、図17、右図に矢印で示している。

[0140] 図18は、各スイッチプラスミドの翻訳効率の比較したグラフである。作製したスイッチプラスミドは、p50を発現するトリガープラスミドとともに、HEK293FT細胞に共導入した。翻訳効率は、まずGFPの蛍光強度をtagRFPの蛍光強度で割り、次に、p50導入時の値と非導入時の値を割って求めた。さらに、コントロールのスイッチプラスミド(図4; No aptamer)を基準として比較した。エラーバーは平均±標準誤差(n=3、各回に3つのサンプルから平均を求めた、独立した3回の実験)を示す。その結果、p50Aよりも、より構造が安定であると考えられるp50A-stbにおいてより強い翻訳抑制が観察された。従って、人工的に取得されたアプタマーであっても、同様のアプローチによって、高感度なmRNAスイッチが作製可能である。

[0141] (参考文献) [1] Saito, H., Fujita, Y., Kashida, S., Hayashi, K. & Inoue, T. Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches. *Nat. Commun.* 2, 160 (2011).

[2] Warren, L. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–30 (2010).

[3] Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822 (1990).

- [4] Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J. & Evans, P. The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends Biochem. Sci.* 20, 235–240 (1995).
- [5] Kashida, S., Inoue, T. & Saito, H. Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 9369–78 (2012).
- [6] Huang, D.-B. et al. Crystal structure of NF- B (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9268–9273 (2003).

請求の範囲

- [請求項1] 細胞内在性タンパク質の識別方法であって、以下の工程を含む方法：
(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを所望の細胞に導入する工程；及び
(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、細胞内在性タンパク質を識別する工程。
- [請求項2] 細胞の識別方法であって、以下の工程を含む方法：
(1) 細胞内在性タンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含む細胞内在性タンパク質応答性mRNAもしくは当該mRNAをコードするベクターを所望の細胞に導入する工程；
(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて、前記タンパク質を発現する細胞を識別する工程。
- [請求項3] 配列番号1で表される天然型LIN28Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の1以上の改変を加えてなる構造安定化LIN28Aアプタマー：
(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；
(2) 2つのループ間に位置するステムを構成するAU塩基対をGC塩基対に置換する；または
(3) 2つのループ間に位置するステムに、1～5の塩基対を付加する。
- [請求項4] 配列番号2～4のいずれかで表される構造安定化LIN28Aアプタマー。
- [請求項5] 配列番号6で表される天然型U1Aアプタマー配列が形成するRNA二次

構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化U1Aアプタマー：

(1) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステム構造に1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する、あるいは2つのボックス間に存在するシステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する；または

配列番号8で表されるU1Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化U1Aアプタマー：

(2) 5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステムに、1～15のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。

[請求項6] 配列番号83で表されるp50Aアプタマー配列が形成するRNA二次構造に基づき、以下の改変を加えてなる構造安定化p50Aアプタマー：

5'末端塩基及び3'末端塩基を含むシステム構造に1～20のAU塩基対もしくはGC塩基対を付加する。

[請求項7] 配列番号7、9、10、84のいずれかで表される構造安定化U1Aアプタマー。

[請求項8] 請求項3～7のいずれか1項に記載の構造安定化アプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNA。

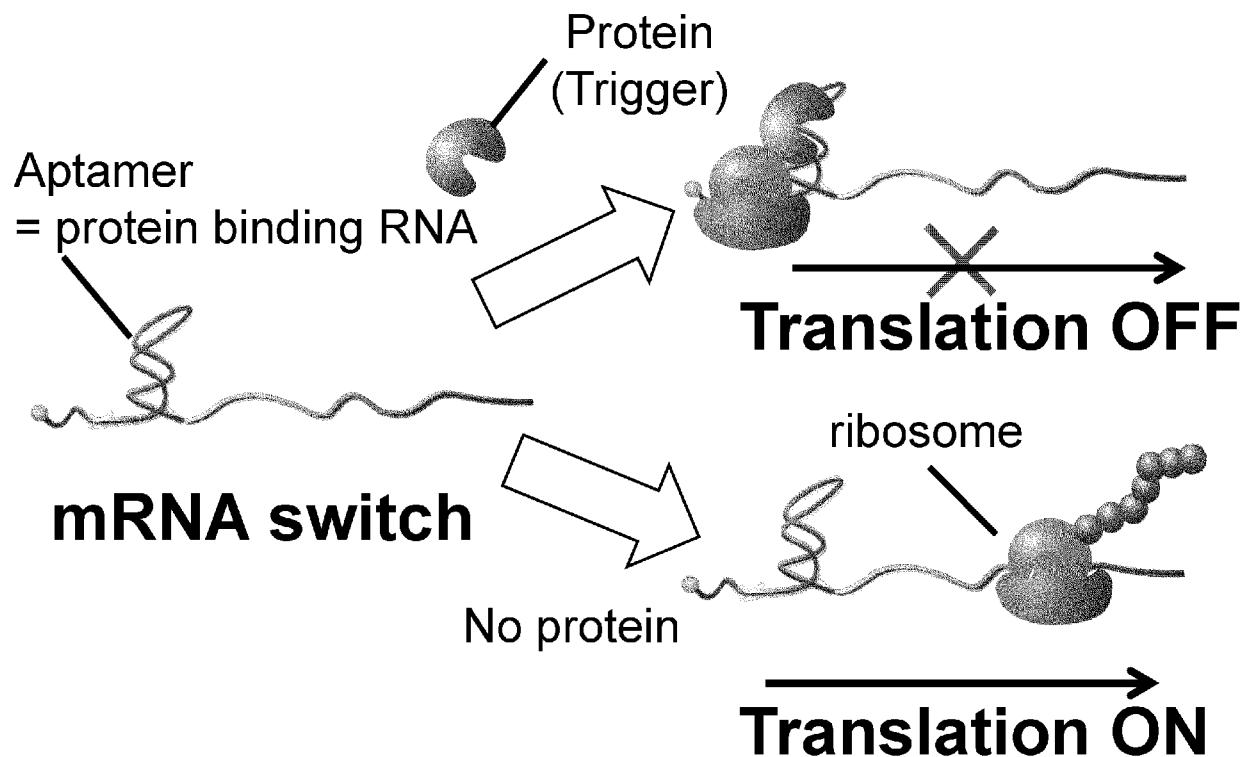
[請求項9] 細胞の分化状態の識別方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) 多能性幹細胞を含みうる細胞群に、未分化細胞が発現するタンパク質に特異的なアプタマー配列とそれと機能的に連結したマーカー遺伝子配列を含むmRNA、あるいは当該mRNAをコードするベクターを導入する工程；及び

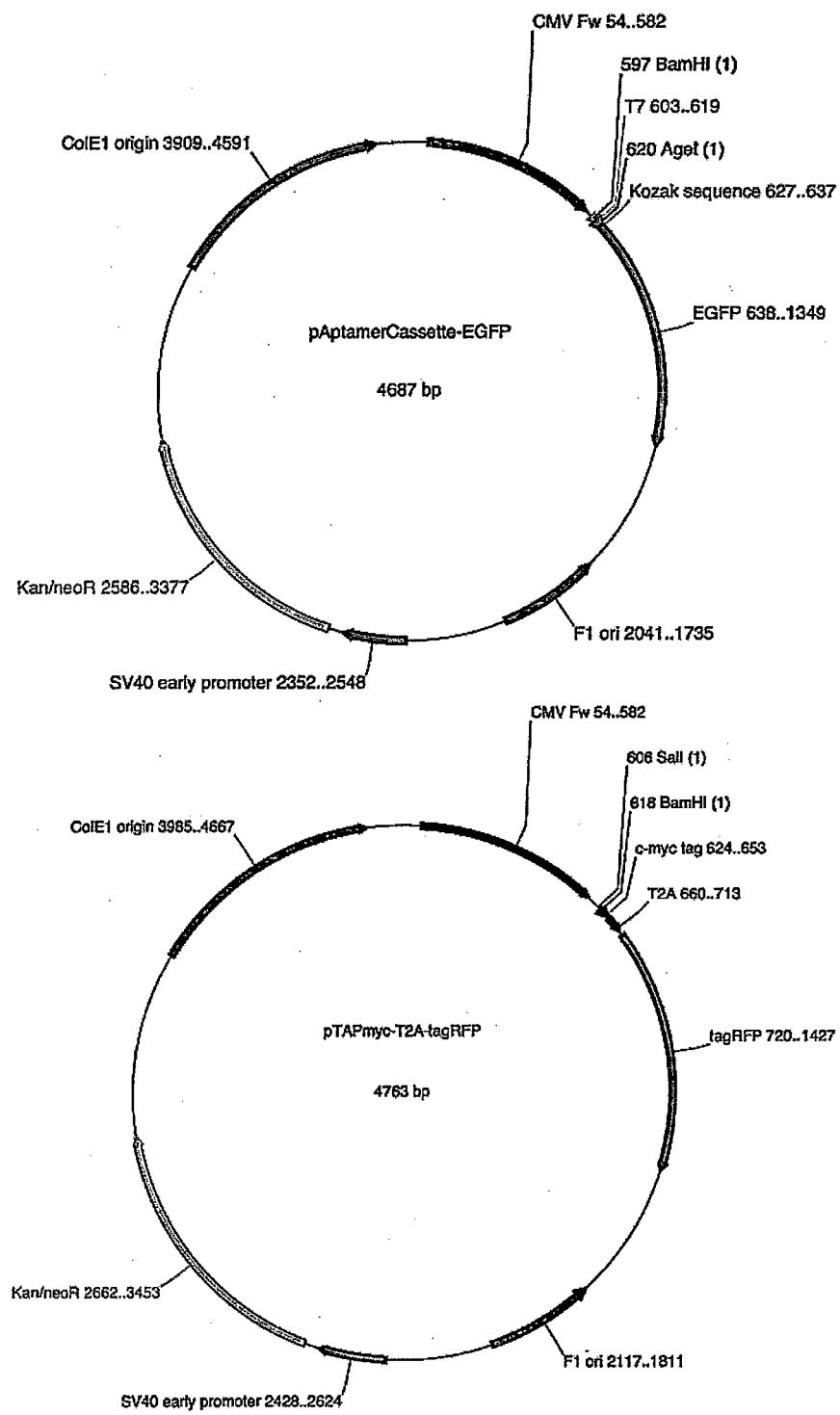
(2) 前記マーカー遺伝子の翻訳量に基づいて細胞の分化状態を識別する工程。

[請求項10] 前記アプタマー配列が、天然型LIN28Aアプタマー配列、または請求項3もしくは4に記載の構造安定化アプタマー配列である、請求項9に記載の方法。

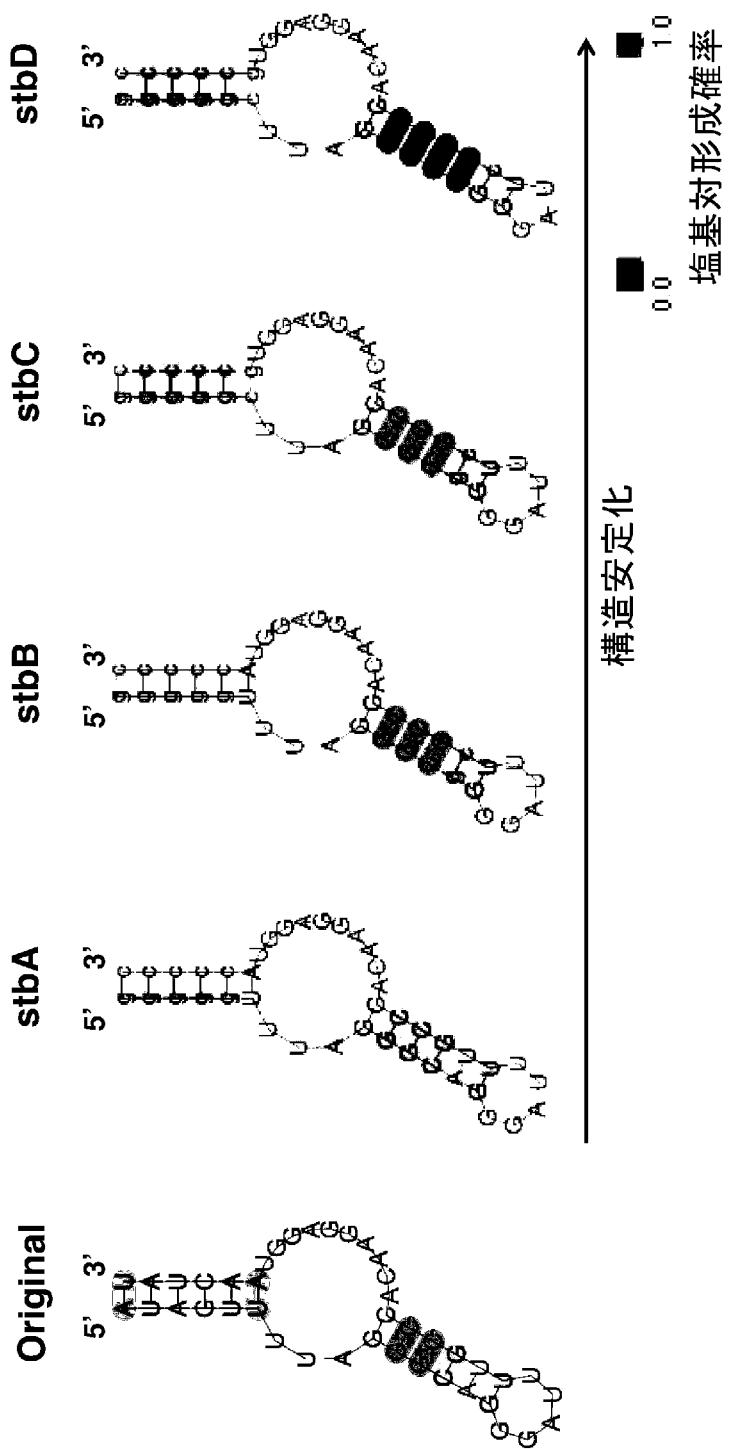
[図1]



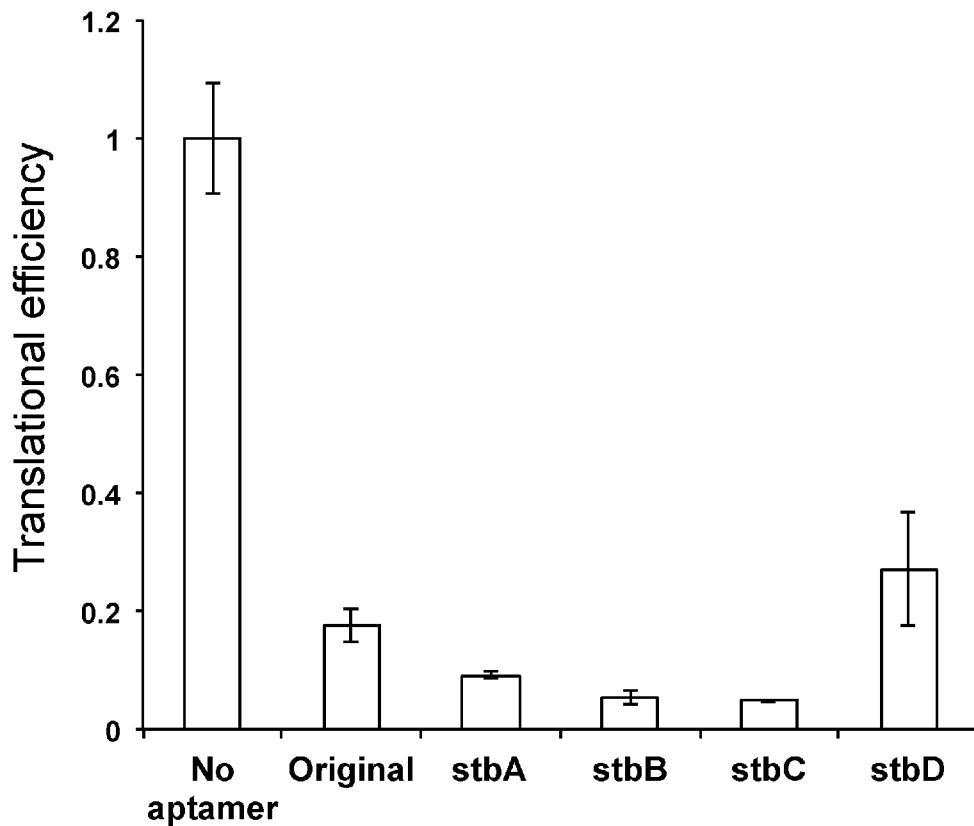
[図2]



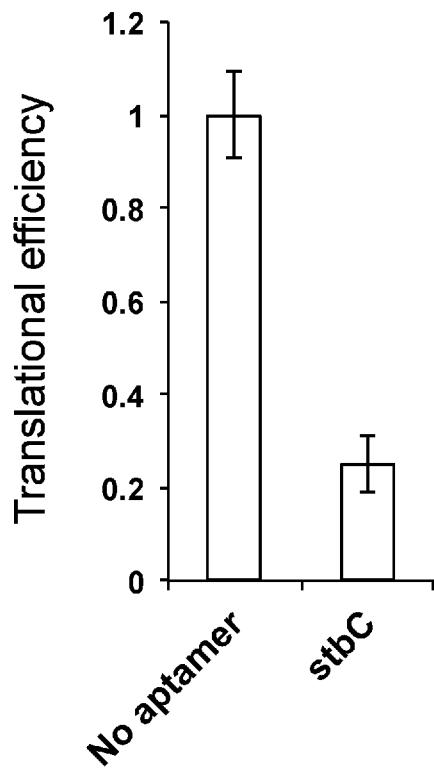
[図3]



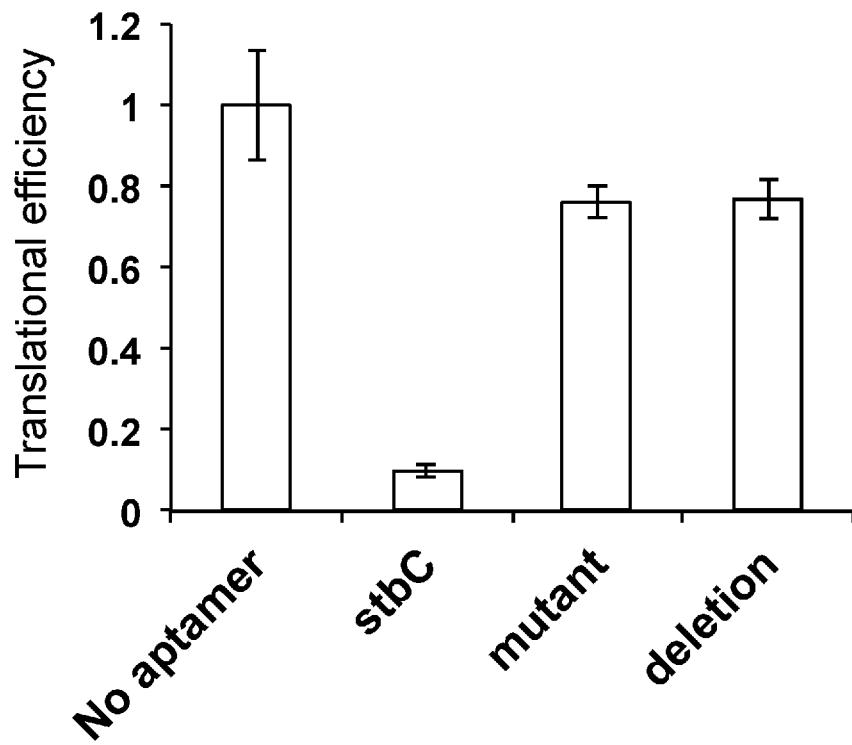
[図4]



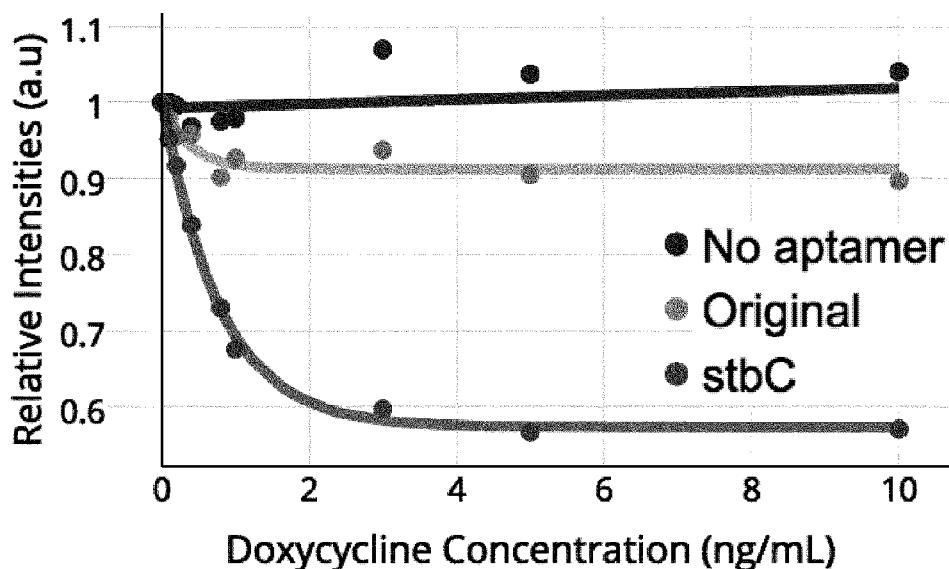
[図5]



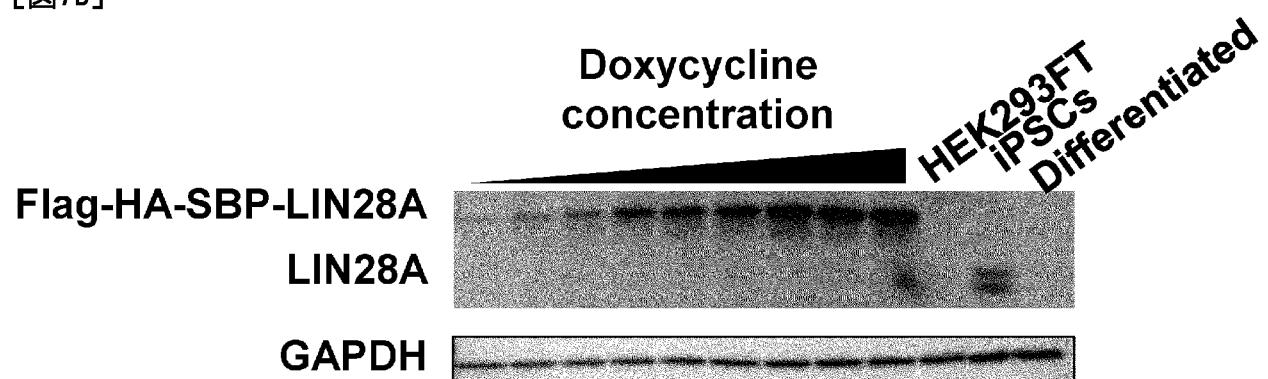
[図6]



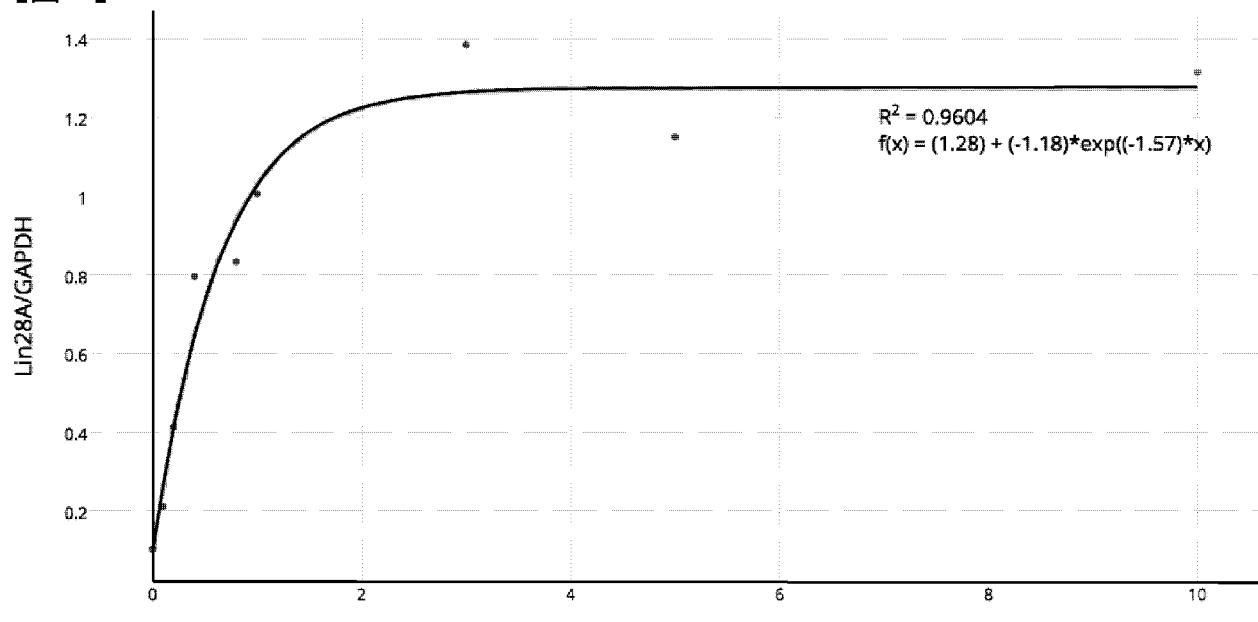
[図7A]



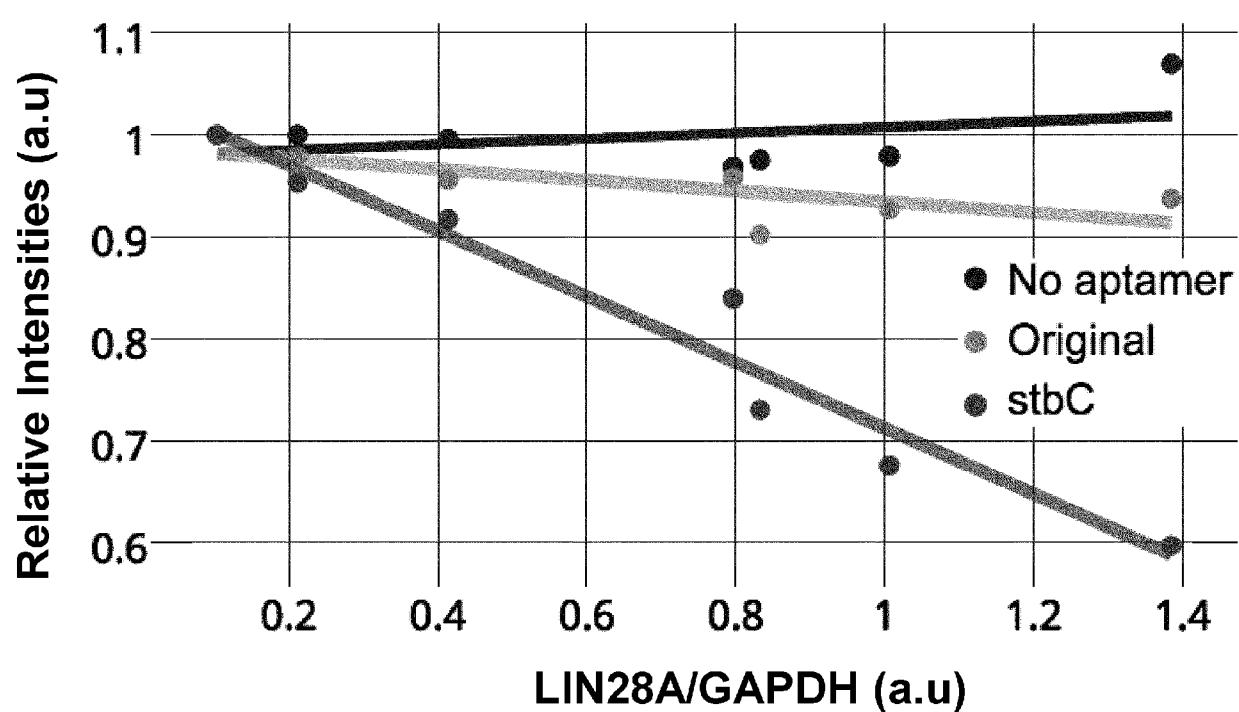
[図7B]



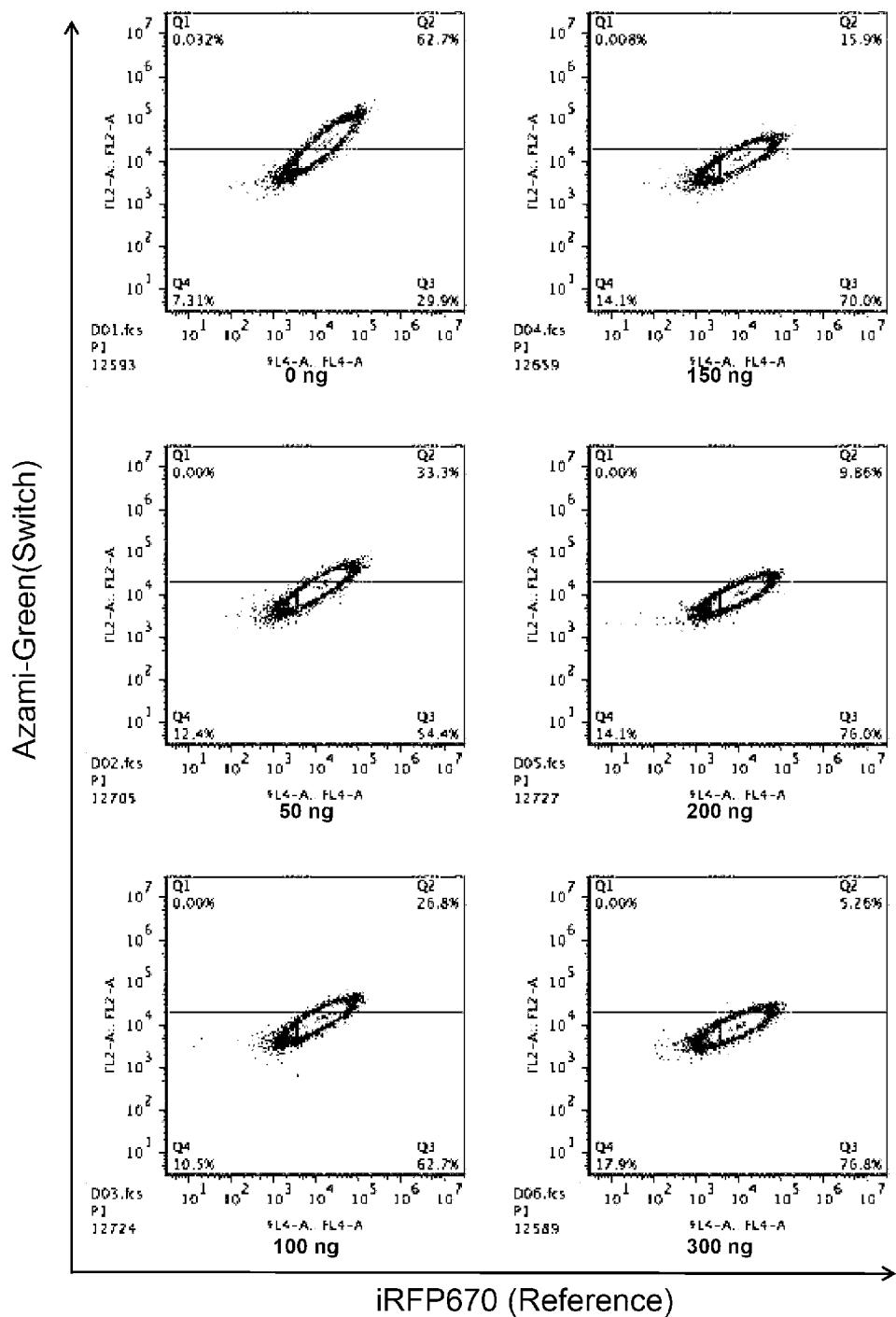
[図7C]



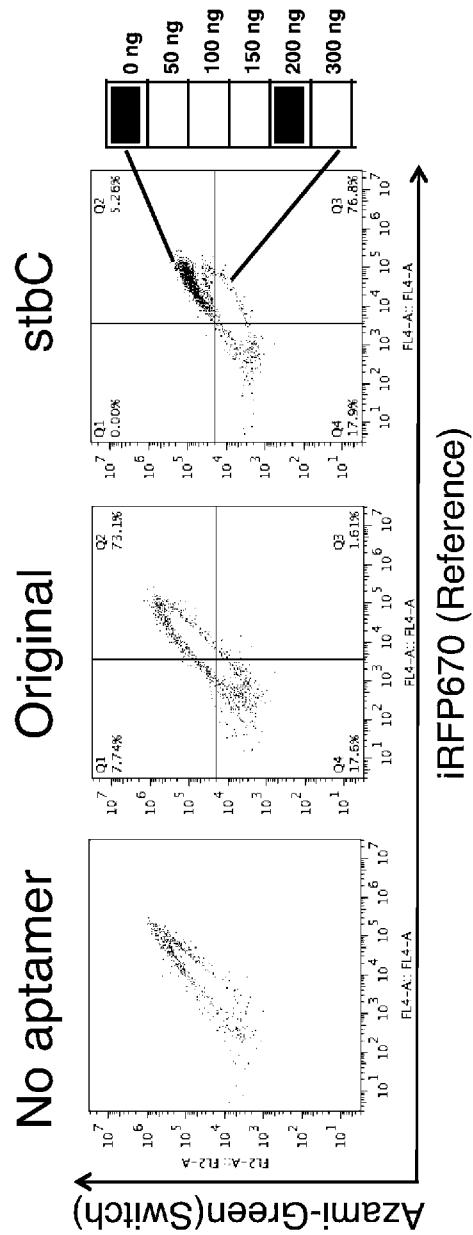
[図7D]



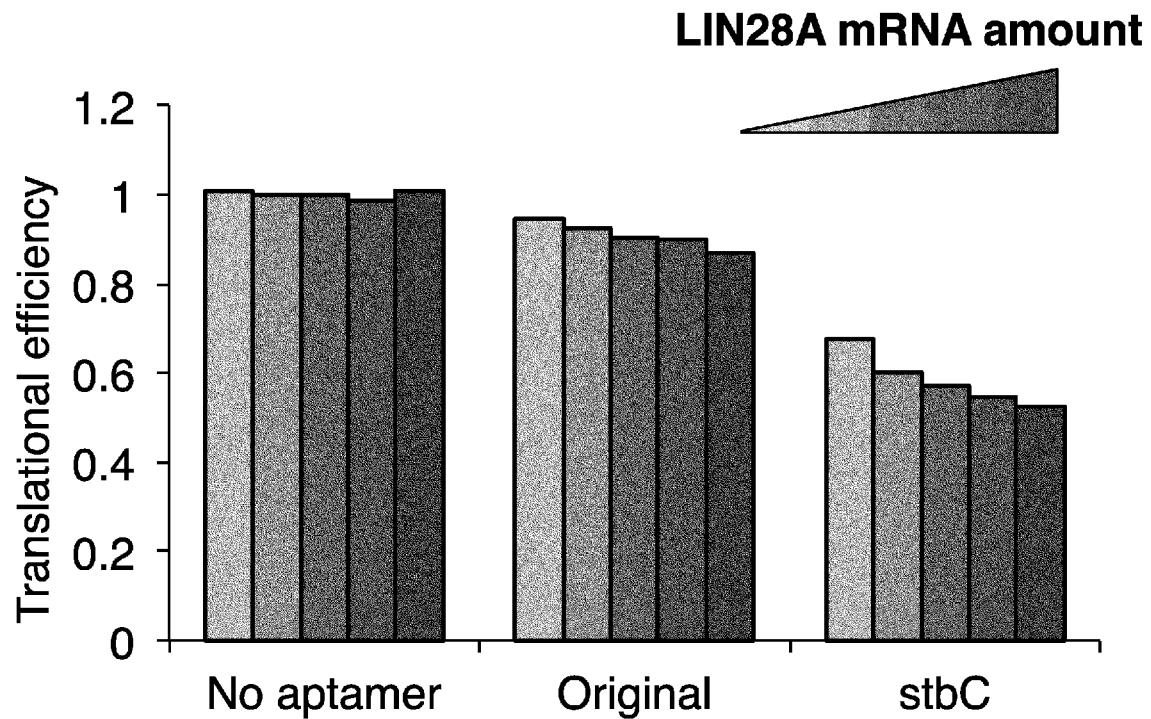
[図8A]



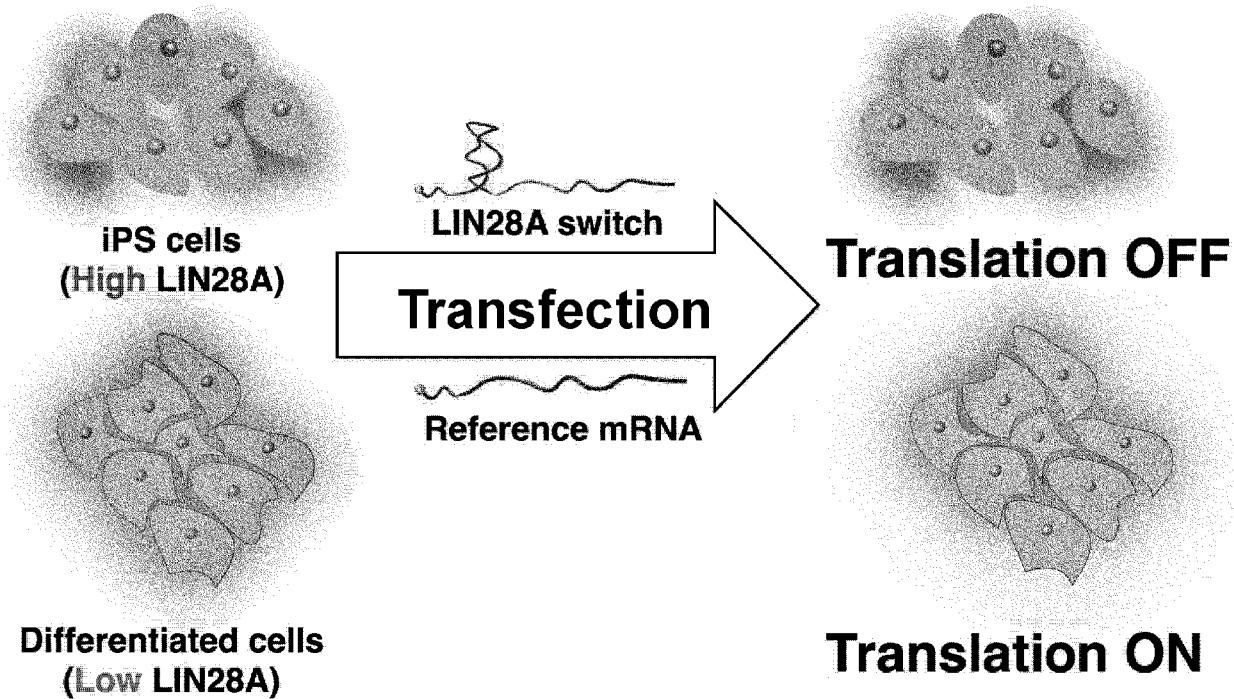
[図8B]



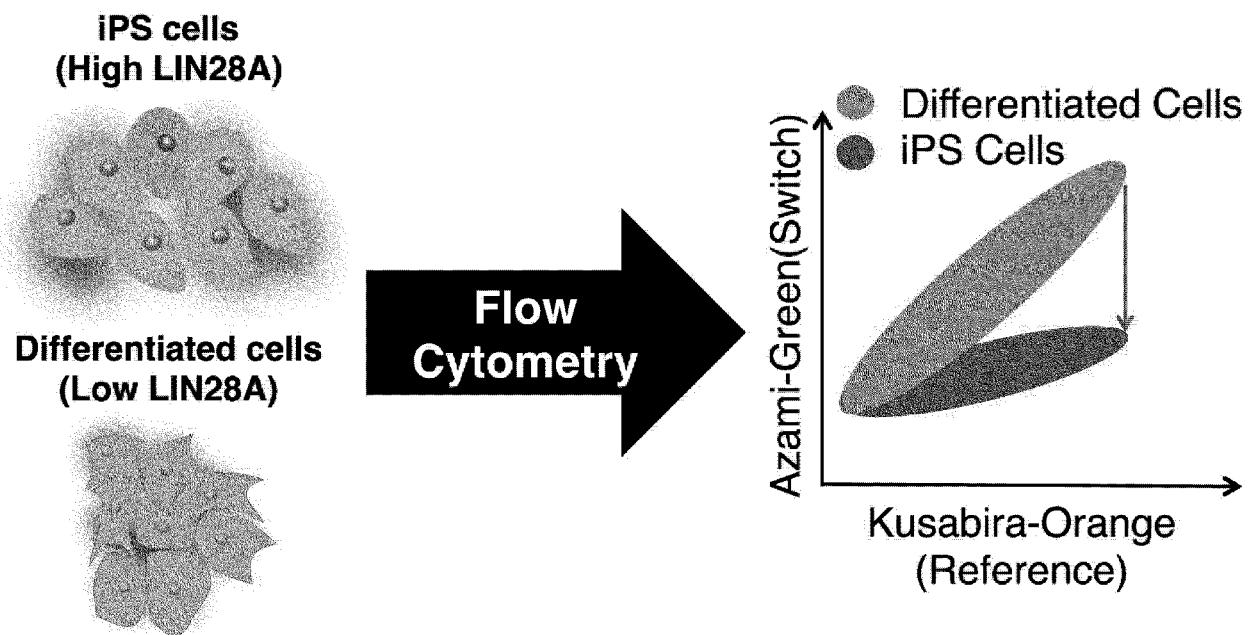
[図8C]



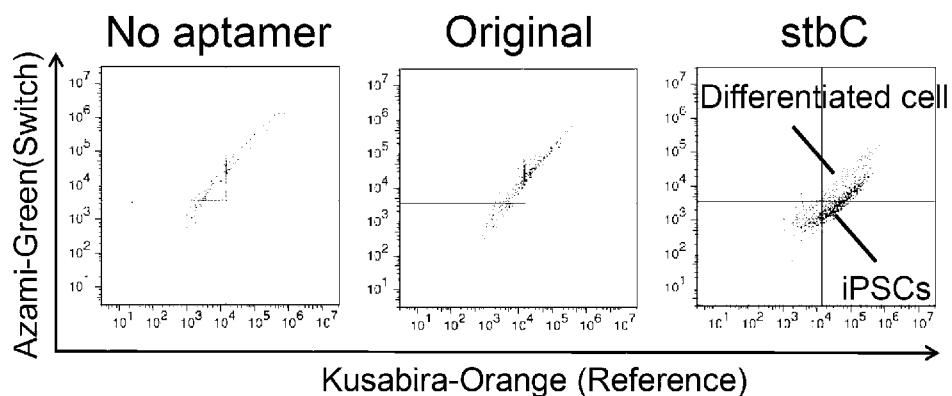
[図9A]



[図9B]

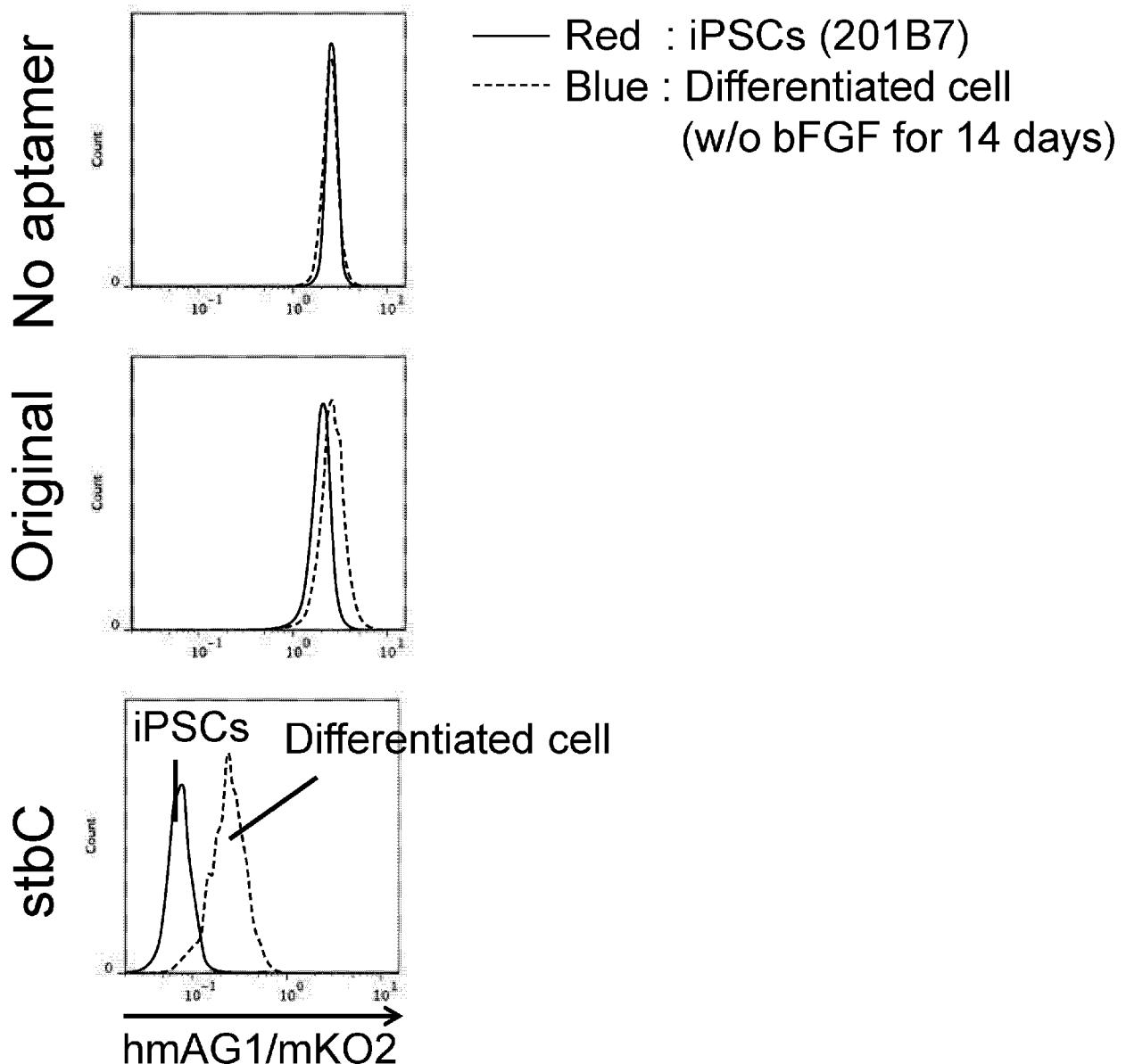


[図10A]

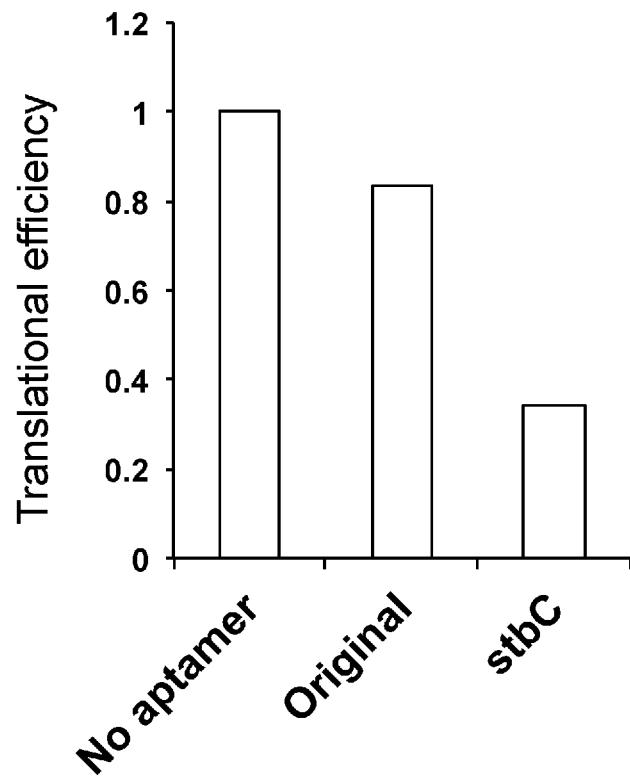


Red : iPSCs (201B7)
 Blue : Differentiated cell
 (w/o bFGF for 14 days)

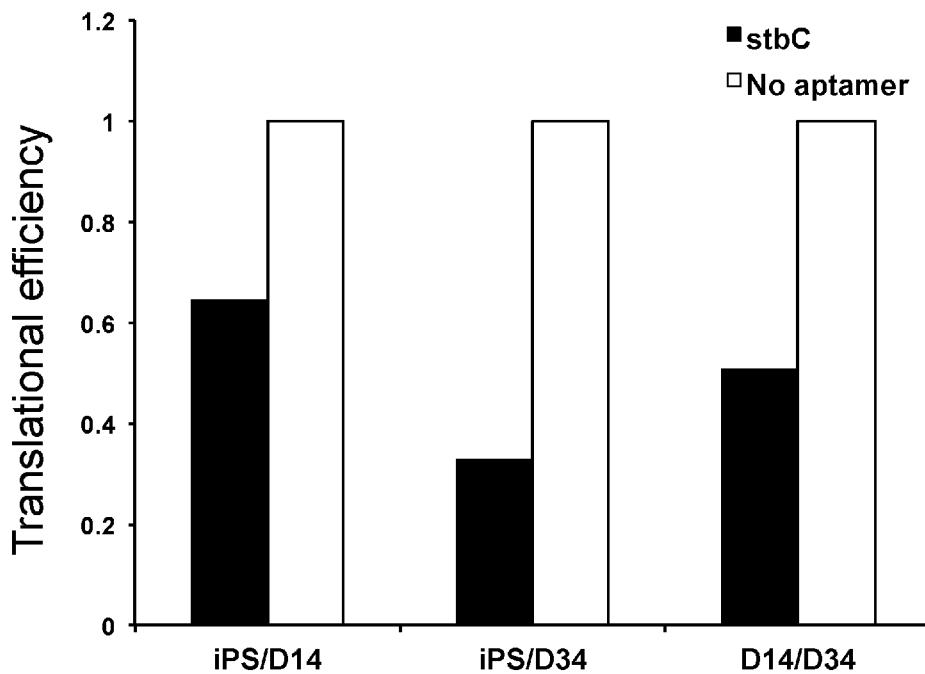
[図10B]



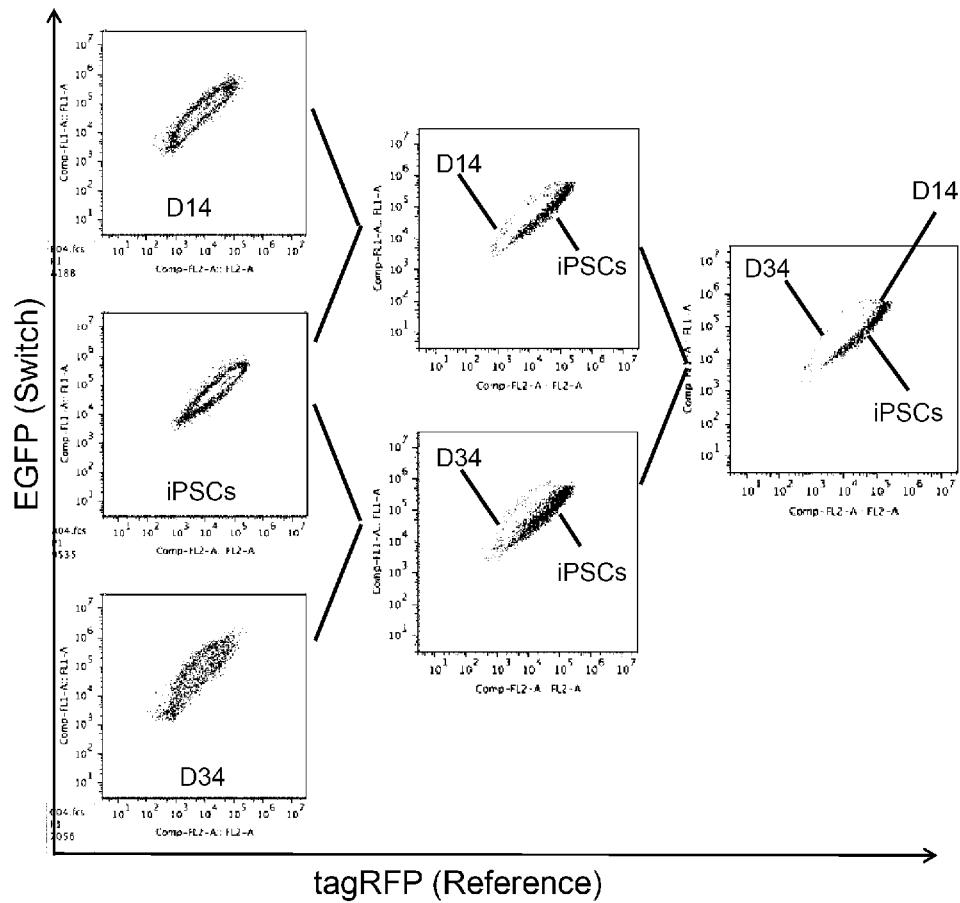
[図10C]



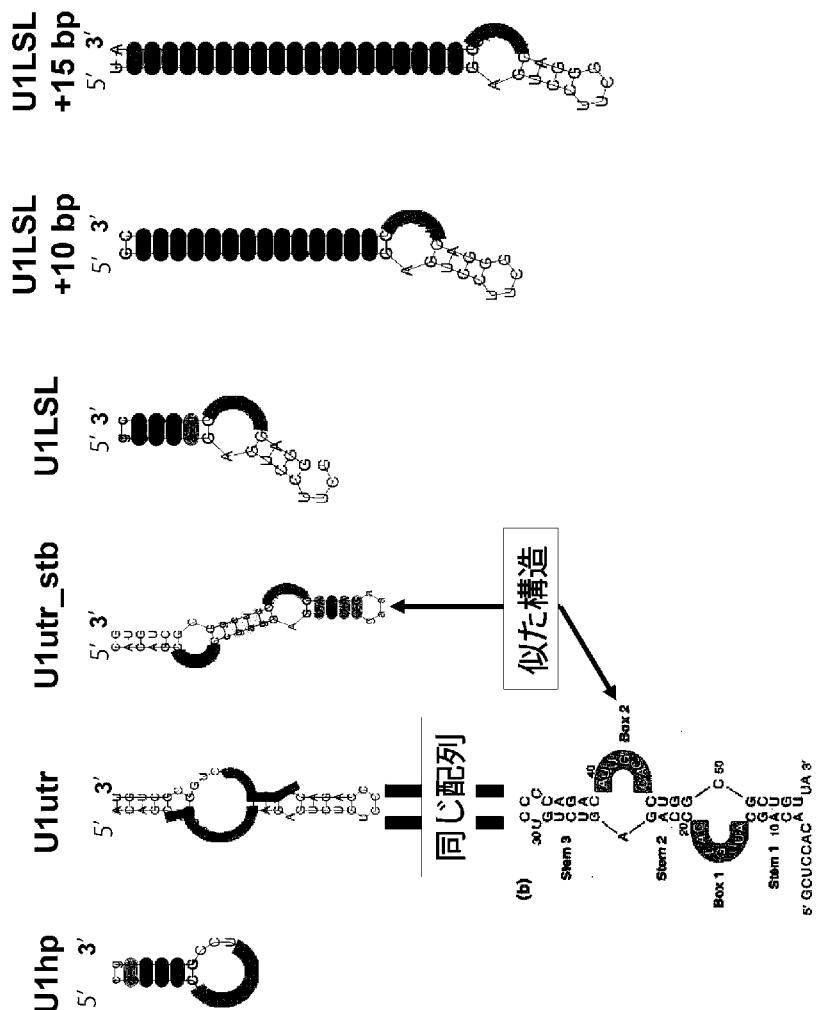
[図11A]



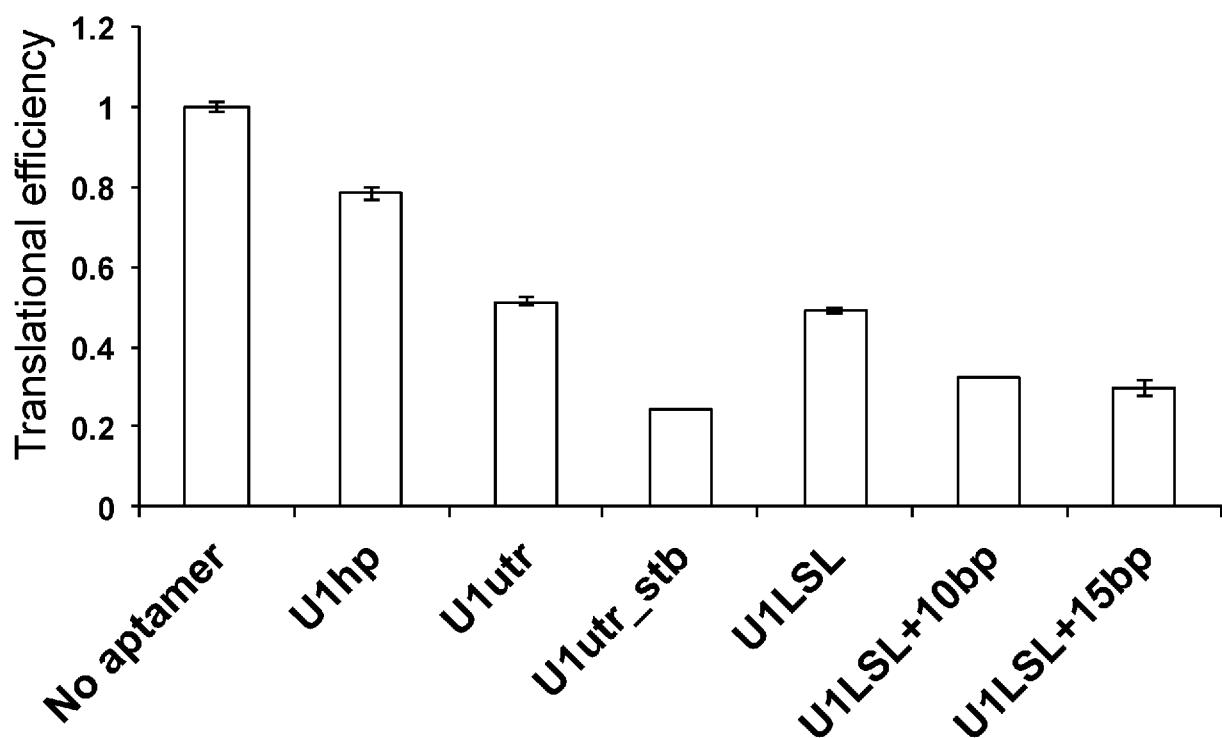
[図11B]



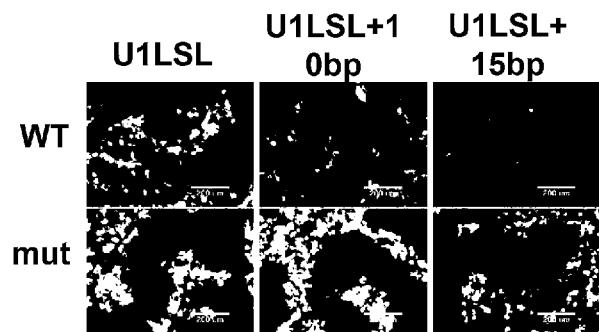
[図12]



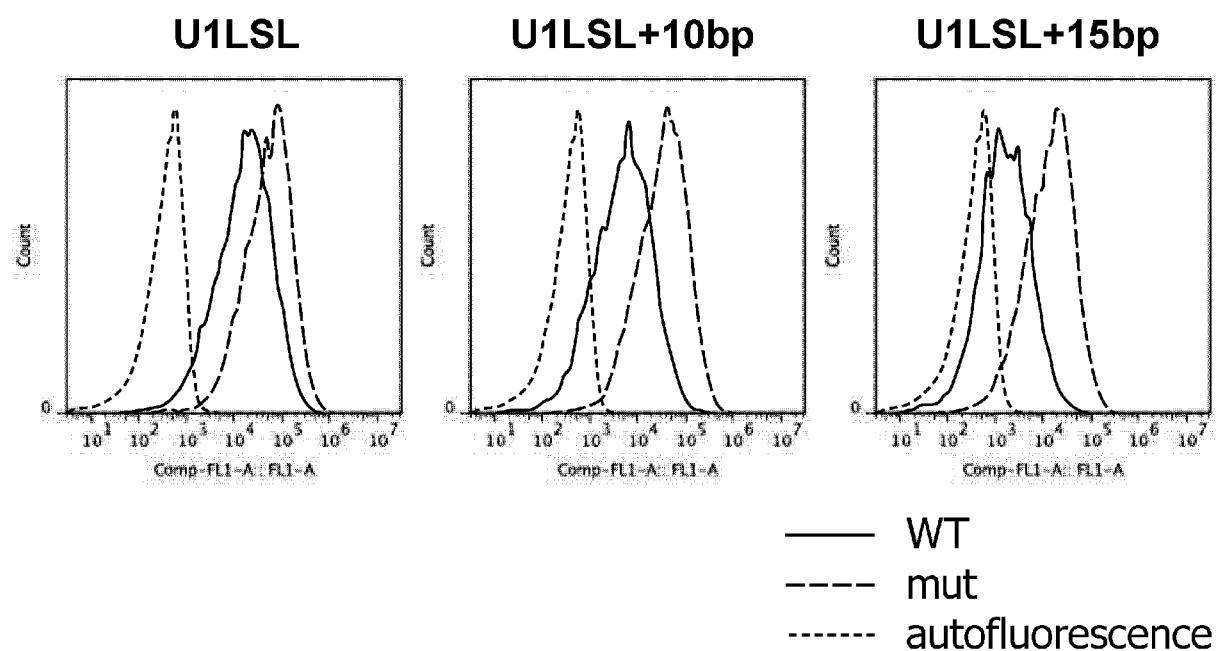
[図13]



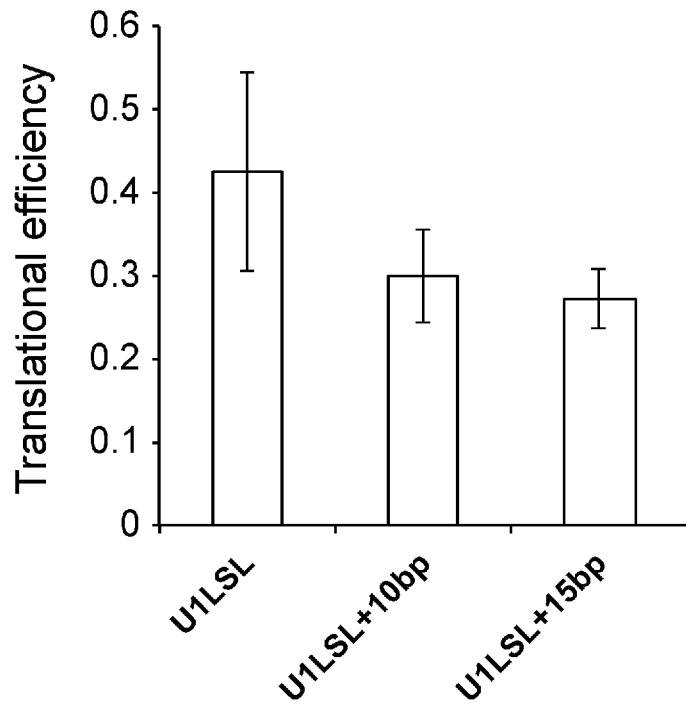
[図14A]



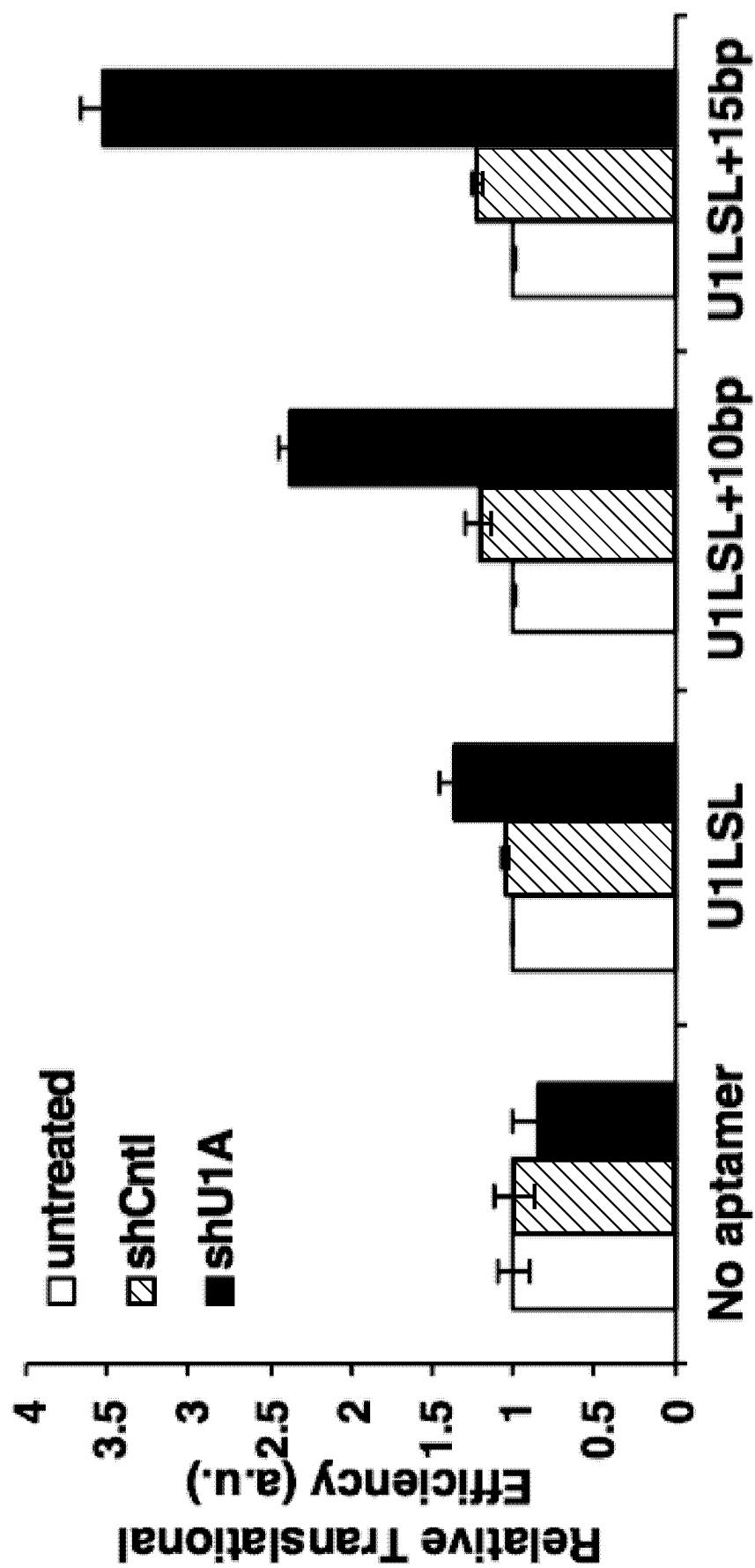
[図14B]



[図14C]



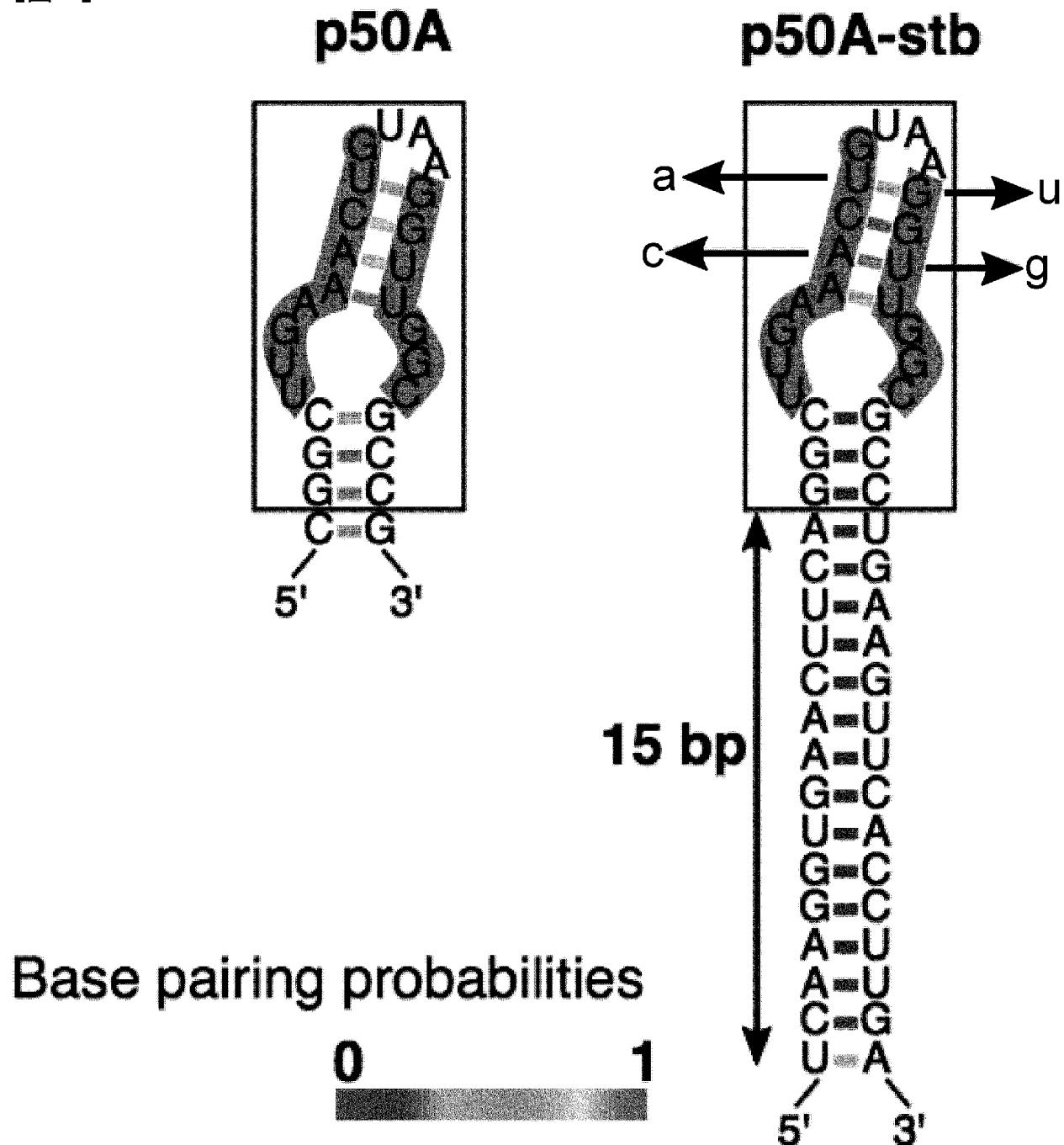
[図15]



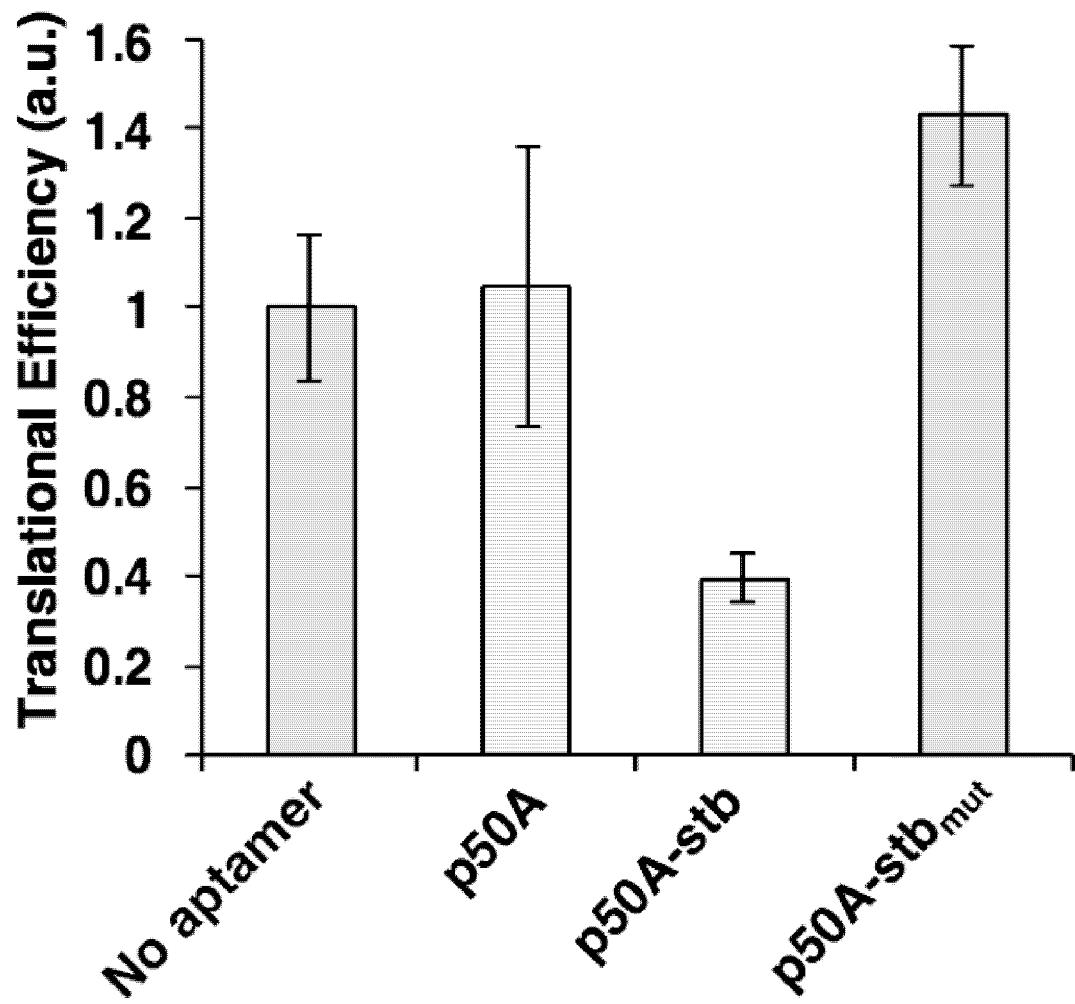
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N15/115, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922–1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996–2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971–2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994–2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shunsuke KAWASAKI, "Jinko mRNA Switch ni yoru Hito Naizaisei Tanpakushitsu no Kenchi", the 88th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Yoshishu [online], 16 November 2015 (16.11.2015), page 3LBA064, < http://www.aeplan.co.jp/bmb2015/online.html > [retrieved on 16 November 2015 (16.11.2015)]	1
X	Shunsuke KAWASAKI, "Hito Naizaisei Tanpakushitsu ni Oto suru Jinko mRNA Switch no Kaihatsu", The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 15 July 2015 (15.07.2015), vol.17, page 239	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 February 2017 (10.02.17)

Date of mailing of the international search report
07 March 2017 (07.03.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CULLER, Stephanie J. et al., Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins, SCIENCE, 2010, Vol.330, No.26, pp.1251-1255, ISSN 1095-9203, particularly, summary, page 1251, right column, lines 22 to 27, Fig. 1-4	1
X	JP 2009-142259 A (Japan Science and Technology Agency), 02 July 2009 (02.07.2009), claims; paragraphs [0040], [0044] & US 2011/0040077 A1 claims; paragraphs [0094], [0099] & WO 2009/066757 A1 & EP 2221367 A1	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(Stated in extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 3: CULLER, Stephanie J. et al., Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins, SCIENCE, 2010, Vol.330, No.26, pp.1251-1255, ISSN 1095-9203, particularly, page 1251, right column, lines 22 to 27

Claims are classified into the following eight inventions.

(Invention 1) claim 1

Document 3 describes a matter that protein-responsive RNA in which an RAN aptamer capable of binding to a protein ligand is integrated into an intron in a transcript is produced and a matter that a protein concentration and a gene expression level in a cell can be linked to each other through the RNA (p. 1251, right column, lines 22-27).

Consequently, the invention of claim 1 does not have a special technical feature, since the invention lacks novelty in the light of document 3.

There are no claims dependent on claim 1, and therefore, claim 1 is classified into Invention 1.

(Invention 2) claim 2

It is not considered that the invention of claim 2 has a special technical feature same as or corresponding to claim 1 which is classified into Invention 1.

Further, claim 2 is not dependent on claim 1.

In addition, claim 2 has no relationship such that said claim 2 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claim 2 cannot be classified into Invention 1, and is classified into Invention 2.

(Invention 3) claims 3-4, 10 and a part of claim 8

It is not considered that the invention of claim 3 has a special technical feature same as or corresponding to claims 1-2 which are classified into Inventions 1-2.

Further, claim 3 is not dependent on claims 1-2.

In addition, claim 3 has no relationship such that said claim 3 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-2.

Consequently, claim 3 cannot be classified into Inventions 1-2, and is therefore classified into Invention 3.

Further, claims 4, 10 and the part of claim 8 referring to claims 3-4 have an inventive relationship with claim 3, and are therefore classified into Invention 3.

(Invention 4) claim 5 and a part of claims 7-8

It is not considered that the invention of claim 5 has a special technical feature same as or corresponding to the parts of claims 1-4, 8, 10 classified into Inventions 1-3.

Further, claim 5 is not dependent on claims 1-4.

In addition, claim 5 has no relationship such that said claim 5 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-3.

Consequently, claim 5 cannot be classified into Inventions 1-3, and is therefore classified into Invention 4.

A part of the invention described in claim 7 which refers to a structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 7 and a part of the invention described in claim 8 which refers to a structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 7 as recited in the invention described in claim 5 or 7 relate to the invention described in claim 5, and are classified into Invention 4.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

(Invention 5) claim 6 and a part of claim 8

It is not considered that the invention of claim 6 has a special technical feature same as or corresponding to the parts of claims 1-5, 7-8, 10 classified into Inventions 1-4.

Further, claim 6 is not dependent on claims 1-5.

In addition, claim 6 has no relationship such that said claim 6 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-4.

Consequently, claim 6 cannot be classified into Inventions 1-4, and is therefore classified into Invention 5.

Further, the part of claim 8 referring to claim 6 has an inventive relationship with claim 6, and is therefore classified into Invention 5.

(Invention 6) a part of claims 7-8

It cannot be considered that a part of the invention described in claim 7 which relates to structure-stabilized U1A aptamers respectively represented by SEQ ID NOS: 9 and 10 has the same or corresponding special technical feature as or to the parts of the inventions described in claims 1-8 and 10 which are classified into Inventions 1-5.

Further, the invention of claim 7 is not dependent on claims 1-6.

In addition, there is not the substantially same or similar relationship between the structure-stabilized U1A aptamers respectively represented by SEQ ID NOS: 9 and 10 in the invention described in claim 7 and any claim classified into Inventions 1-5.

Therefore, the part of the invention described in claim 7 which relate to the structure-stabilized U1A aptamers respectively represented by SEQ ID NOS: 9 and 10 cannot be classified into Inventions 1-5, and is classified into Invention 6.

In addition, a part of the invention described in claim 8 which refers to the structure-stabilized U1A aptamers respectively represented by SEQ ID NOS: 9 and 10 recited in claim 7 has an inventive relationship with the part of the invention described in claim 7 which is classified into Invention 6, and is therefore classified into Invention 6.

(Invention 7) a part of claims 7-8

It cannot be considered that a part of the invention described in claim 7 which relates to a structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 84 has the same or corresponding special technical feature as or to the parts of the inventions described in claims 1-8 and 10 which are classified into Inventions 1-6.

Further, the invention of claim 7 is not dependent on claims 1-6.

In addition, there is not the substantially same or similar relationship between the structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 84 in the invention described in claim 7 and any claim classified into Inventions 1-6.

Therefore, the part of the invention described in claim 7 which relates to the structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 84 cannot be classified into Inventions 1-6, and is classified into Invention 7.

In addition, a part of the invention described in claim 8 which refers to the structure-stabilized U1A aptamer represented by SEQ ID NO: 84 recited in claim 7 has an inventive relationship with the part of the invention described in claim 7 which is classified into Invention 7, and is therefore classified into Invention 7.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085879

(Invention 8) claim 9

It is not considered that the invention of claim 9 has a special technical feature same as or corresponding to the parts of claims 1-8, 10 classified into Inventions 1-7.

Further, claim 9 is not dependent on claims 1-8.

In addition, claim 9 has no relationship such that said claim 9 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-7.

Consequently, claim 9 cannot be classified into Inventions 1-7, and is therefore classified into Invention 8.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12N15/115, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	川崎俊介, 人工mRNAスイッチによるヒト内在性タンパク質の検知, 第88回日本生化学会大会要旨集 [online], 2015.11.16, p. 3LBA064, < http://www.aeplan.co.jp/bmb2015/online.html > [retrieved on 2015-11-16]	1

☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 10.02.2017	国際調査報告の発送日 07.03.2017
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 厚田 一拓 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4 N 5575

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	川崎俊介, ヒト内在性タンパク質に応答する人工mRNAスイッチの開発, 日本RNA学会年会要旨集, 2015.07.15, Vol. 17, p. 239	1
X	CULLER, Stephanie J. et al., Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins, SCIENCE, 2010, Vol. 330, No. 26, pp. 1251-1255, ISSN 1095-9203, 特に要旨、第 1251 頁右欄第 22-27 行、Fig. 1-4	1
X	JP 2009-142259 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2009.07.02, 特許請求の範囲、【0040】、【0044】、 & US 2011/0040077 A1, CLAIMS、[0094]、[0099], & WO 2009/066757 A1 & EP 2221367 A1	1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページに記載。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

文献3 : CULLER, Stephanie J. et al., Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins, SCIENCE, 2010, Vol.330, No.26, pp.1251-1255, ISSN 1095-9203, 特に第1251頁右欄第22-27行

請求の範囲は、以下の8つの発明に区分される。

(発明1) 請求項1

文献3には、タンパク質リガンドと結合するRNAアプタマーを転写産物のイントロンに組み込んだタンパク質応答性RNAを製造したことや、該RNAによって細胞内のタンパク質濃度と遺伝子発現レベルが関連することが記載されている(第1251頁右欄第22-27行)。そうすると、請求項1に係る発明は、文献3により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。そして、請求項1に従属する請求項は存在しないため、請求項1を発明1に区分する。

(発明2) 請求項2

請求項2に係る発明は、発明1に区分された請求項1と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項2は、請求項1の従属請求項でもない。さらに、請求項2は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項2は発明1に区分できないので、発明2に区分する。

(発明3) 請求項3-4、10及び請求項8の一部

請求項3に係る発明は、発明1-2に区分された請求項1-2と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項3は、請求項1-2の従属請求項でもない。さらに、請求項3は、発明1-2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項3は発明1-2に区分できないので、発明3に区分する。

また、請求項4、10及び請求項8のうち請求項3-4を引用する部分は、請求項3に対して発明の連関を有しているので、発明3に区分する。

(発明4) 請求項5及び請求項7-8の一部

請求項5に係る発明は、請求項1-4、8、10の発明1-3に区分された部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項5は、請求項1-4の従属請求項でもない。さらに、請求項5は、発明1-3に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項5は発明1-3に区分できないので、発明4に区分する。

また、請求項7に係る発明のうち、配列番号7で表される構造安定化U1Aアプタマー、及び、請求項8のうち、請求項5又は請求項7に係る発明の配列番号7で表される構造安定化U1Aアプタマーを引用する部分は、請求項5に対して発明の連関を有しているので、発明4に区分する。

(次のページに続く。)

(発明5) 請求項6及び請求項8の一部

請求項6に係る発明は、請求項1-5、7-8、10の発明1-4に区分された部分と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項6は、請求項1-5の従属請求項でもない。さらに、請求項6は、発明1-4に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項6は発明1-4に区分できないので、発明5に区分する。

また、請求項8のうち、請求項6を引用する部分は、請求項6に対して発明の連関を有しているので、発明5に区分する。

(発明6) 請求項7-8の一部

請求項7に係る発明のうち、配列番号9、10で表される構造安定化U1Aアプタマーは、請求項1-8、10の発明1-5に区分された部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項7に係る発明は、請求項1-6の従属請求項でもない。さらに、請求項7に係る発明のうち、配列番号9、10で表される構造安定化U1Aアプタマーは、発明1-5に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項7に係る発明のうち、配列番号9、10で表される構造安定化U1Aアプタマーは、発明1-5に区分できないので、発明6に区分する。

また、請求項8のうち、請求項7の配列番号9、10で表される構造安定化U1Aアプタマーを引用する部分は、請求項7の発明6に区分された部分に対して発明の連関を有しているので、発明6に区分する。

(発明7) 請求項7-8の一部

請求項7に係る発明のうち、配列番号84で表される構造安定化U1Aアプタマーは、請求項1-8、10の発明1-6に区分された部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項7に係る発明は、請求項1-6の従属請求項でもない。さらに、請求項7に係る発明のうち、配列番号84で表される構造安定化U1Aアプタマーは、発明1-6に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項7に係る発明のうち、配列番号84で表される構造安定化U1Aアプタマーは、発明1-6に区分できないので、発明7に区分する。

また、請求項8のうち、請求項7の配列番号84で表される構造安定化U1Aアプタマーを引用する部分は、請求項7の発明7に区分された部分に対して発明の連関を有しているので、発明7に区分する。

(発明8) 請求項9

請求項9に係る発明は、請求項1-8、10の発明1-7に区分された部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項9は、請求項1-8の従属請求項でもない。さらに、請求項9は、発明1-7に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項9は発明1-7に区分できないので、発明8に区分する。