

41. 人工 RNA を活用した標的細胞の選別と分化制御法開発

齊藤 博英

*京都大学 iPS 細胞研究所 初期化機構研究部門

Key words : RNA, iPS 細胞, 再生医療, マイクロ RNA, 合成生物学

緒言

生体分子やシステムを「人工的に創り出す」ことで細胞や生命の構築原理を理解し、新しいテクノロジーを誘発しようとするシンセティック・バイオロジー（合成生物学）研究が世界的に進展している。細胞の機能や運命を自在に制御する人工システムを創成することは、合成生物学分野の研究目標の一つである。しかしながら現在、細胞内でシステム制御のための分子材料として利用できる生体分子の多くは、DNA や転写因子等のタンパク質に依存している。従って、機能性分子のデザインや、生命システム制御のための新しい戦略・技術の開発が期待されている。

我々のグループはこれまでに、人工 RNA の分子デザインが、細胞運命制御の基盤技術となりえることを示した。具体的には、細胞内で発現する特定のタンパク質を検知し、人工 RNA からの目的遺伝子の翻訳を自在に オン・オフ 制御し、かつその生死を決定できる「人工 RNA スイッチ」の基盤技術開発に成功した¹⁻³⁾。本研究では、これら独自の人工 RNA 技術を拡張し、人工機能性 RNA を細胞に「直接導入」することで、標的細胞内の状態に応じて遺伝子発現を精密に制御することを目指した。構築した人工 RNA システムはゲノム損傷のリスクがないため、標的細胞の安全・精密・自律的な選別、かつ細胞内状態に応じた運命制御の実現が期待できる。この方法論は、社会的に解決が急務である革新的な医療技術の開発に直結する。

方法

本研究では、以下2つの計画により、細胞内在性マイクロ RNA 因子の発現変動を精密に検知し、目的遺伝子（蛍光タンパク質や細胞死誘導タンパク質など）の発現を制御する人工 RNA システムを活用した細胞操作技術の開発を目指した。

(1) 標的細胞で発現するマイクロ RNA 群の発現変動を検知し、その細胞を細胞内状態に応じて生きたまま選別し、かつその運命を決定できる人工 RNA システムの開発。

(2) RNA 及び RNA 結合タンパク質の相互作用からなる人工 RNA 回路を設計し、動的な遺伝子発現パターンを再構築することで、標的細胞の生死を精密に制御できる新技術の開発。

結果

1. マイクロ RNA スイッチによる標的細胞の選別

本研究の成果として、マイクロ RNA を使って標的生細胞を選別する新しい方法、「マイクロ RNA スイッチ」の開発に成功した⁴⁾。これまで目的の細胞種を高純度で得るためには、細胞表面の抗原を識別して細胞を選別するという操作を行うことが一般的であった。しかし、特異的な表面抗原が同定されていない細胞種も多く、細胞を選別することは困難を伴う場合が多い。そこでわれわれは、標的細胞内で高い活性をもつマイクロ RNA を検知することで、その標的細胞を選別する方法を開発した。本技術をヒト iPS 細胞から分化した細胞の選別に活用するため、iPS 細胞研究所の吉田善紀准教授らのグループと共同研究を行い、心筋細胞を効率良く選別することに成功した。その概要を図1に示す。心筋細胞で高い活性をもつマイクロ RNA を同定した後に、マイクロ RNA を認識する配列と蛍光タンパク質の遺伝子の配列を繋いだ人工 RNA を設計した。この人工 RNA を用いると、標的以外の細胞では蛍光タンパク質を強く産生

*現所属：京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門

し、標的細胞では蛍光が弱くなる。この方法により、95%以上の高効率で心筋細胞を選別することができた。また、蛍光タンパク質の代わりにアポトーシスを誘導する遺伝子を繋ぎ、心筋細胞に特有のマイクロRNAを持たない細胞ではアポトーシスが起こるよう設計した。このシステムにより、細胞を一つ一つ機械で選別することなく、心筋細胞だけを純化することができた。さらに、心筋細胞以外の肝細胞やインスリン産生細胞といった細胞も同様に選別することができた。このことから、従来の方法では選別が困難であったさまざまな生細胞が、今後本手法で選別できるようになると期待される。

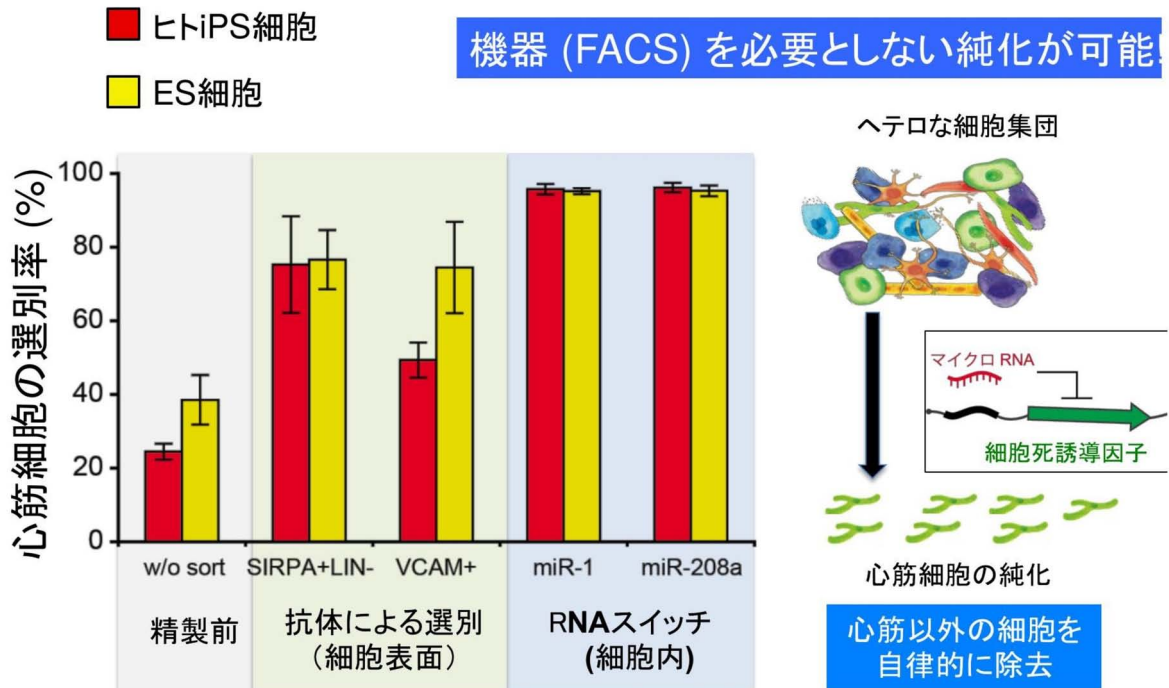


図1. マイクロRNAスイッチによる分化した心筋細胞の選別

抗体とRNAスイッチによる心筋細胞の選別後、心筋の割合をフローサイトメトリーにより解析した (左)。細胞のソーティングを必要としない心筋細胞の純化方法 (右)。

2. 人工RNA回路による精密な細胞運命制御

我々は、ロン・ワイス教授 (マサチューセッツ工科大学) らとの共同研究で、RNAを細胞に導入することで機能するさまざまな人工回路を開発した⁵⁾。これまで、DNAとDNAに結合するタンパク質 (転写因子) を用いた人工回路は数多く作製されてきたが、DNAを導入することでゲノムDNAを傷つける可能性があるという課題が存在した。そこで我々は、細胞にRNAを導入するだけで実現できる、RNAとRNA結合タンパク質から構成される人工回路の作製に取り組んだ。その概要を図2に示す。その結果、細胞内部状態を検出できる回路、多段階のシグナル伝達回路、細胞内の状態を保持するスイッチ回路などの開発に成功した。さらにモデル実験として、人工RNA回路を細胞集団に導入することで、標的細胞のみ細胞死を誘導することに成功した。

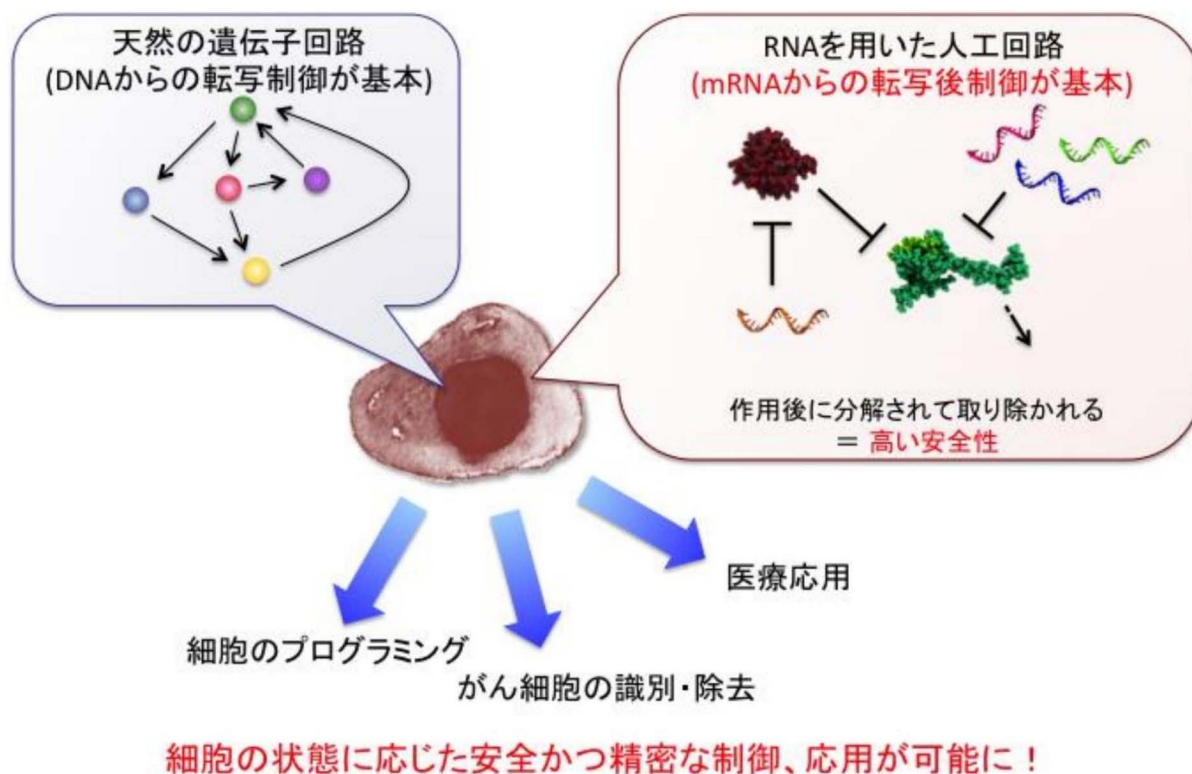


図2. RNA を用いた人工回路のヒト細胞内での構築

RNA をヒト細胞に直接導入することで、細胞内で人工回路が形成される。この回路は DNA からの転写制御を基盤とする天然の回路（左）とは異なり、RNA と RNA 結合タンパク質の相互作用による転写後制御を基盤とする（右）。

3. 細胞内の状態を検知し、細胞運命をコントロールする回路

まず、細胞内の複数のマイクロ RNA を検知し、かつ標的がん細胞にのみ細胞死（アポトーシス）を誘導できる RNA からなる人工回路を作製した。その概要を図3に示す。この人工回路は、マイクロ RNA に応答する2種類の人工 mRNA（RNA 結合タンパク質 L7Ae を発現する mRNA-1 と L7Ae により翻訳が抑制される mRNA-2）を細胞に導入するだけの単純な仕組みで構築できる。細胞内で mRNA-1 から翻訳される L7Ae はキンクターンという RNA 配列に結合する性質があり、出力タンパク質をコードする mRNA-2 の先頭側にキンクターン配列を挿入することで、mRNA-2 からタンパク質の合成（翻訳）を抑制するしくみを利用した。具体的には、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞中で特徴的な miRNA プロファイル [miR21 の発現量が多い、miR141 と miR142(3p) と miR146a の発現量が少ない] を認識し、HEK293（ヒト胎児腎）細胞 [miR21 の発現量が少ない、miR141 と miR142(3p) と miR146a の発現量が多い] と識別する回路を作製することに成功した。さらに、出力として細胞死を誘導するタンパク質（hBax）を用いることで、シャーレ上で培養中の HeLa 細胞と HEK293 細胞の中から、HeLa 細胞のみに細胞死を誘導することに成功した。

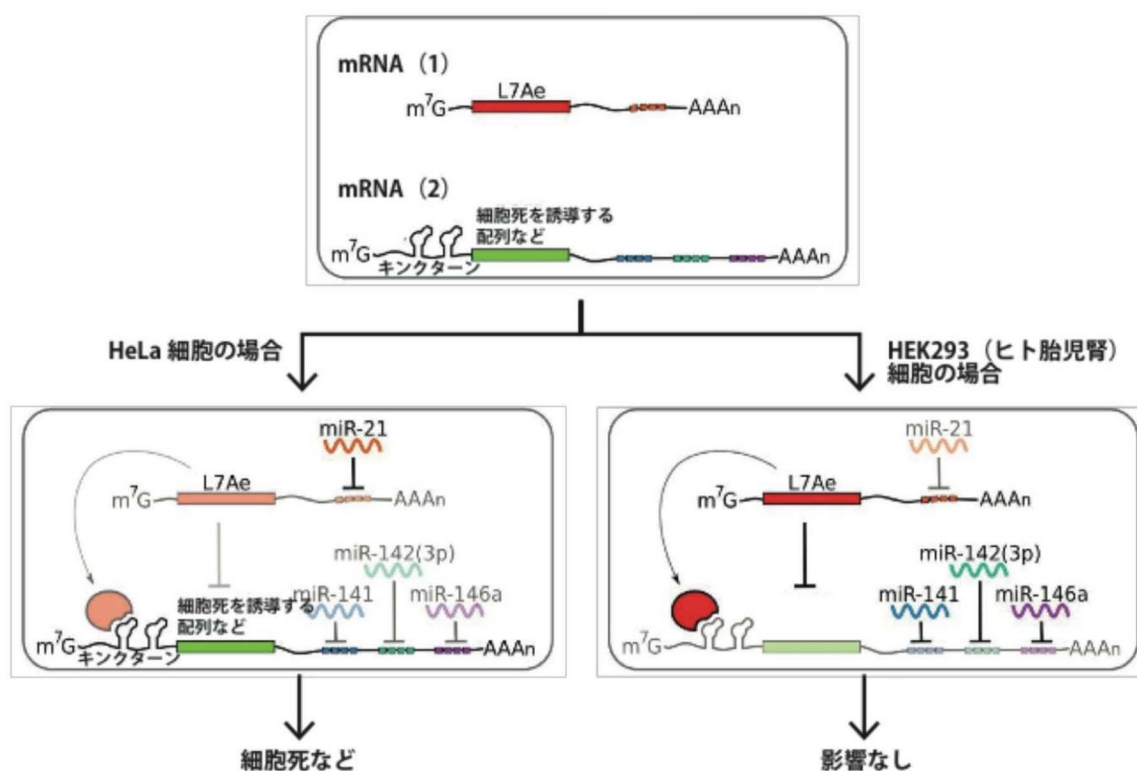


図3. HeLa 細胞の細胞状態を検知して細胞死に導く人工 RNA 回路

HeLa 細胞（左）では、miR-21 により、L7Ae の発現が抑制され、細胞死を誘導するタンパク質が発現し、細胞死を起こす。一方、HEK293（ヒト胎児腎）細胞では（右）、L7Ae が発現し、細胞死に導くタンパク質が抑制され、細胞状態に影響をあたえない。

考 察

このように、目的のがん細胞で発現する miRNA プロファイルに基づいた人工回路を作製することで、正常細胞には影響を与えることなく、目的のがん細胞を検知しかつ選択的に除去できる技術の開発が期待される。今後、様々な人工 RNA 回路を構築することで、細胞内の状態に応じて、安全かつ精密にその運命決定を制御することを目指したいと考えている。

共同研究者

本研究は、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の遠藤慧研究員（現 東京大学大学院新領域創成科学研究科 助教）、三木健嗣研究員（現 CiRA 特定助教）、吉田善紀准教授、マサチューセッツ工科大学のロンワイズ教授らとの共同研究に基づく。ここに心から謝意を表す。最後に、上原記念生命科学財団の皆様方に深く感謝したい。

文 献

- 1) Saito H, Kobayashi T, Hara T, Fujita Y, Hayashi K, Furushima R, Inoue T. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch. *Nat Chem Biol.* 2010 Jan;6(1):71-8. doi: 10.1038/nchembio.273. Epub 2009 Dec 13. PMID: 20016495.
- 2) Saito H, Fujita Y, Kashida S, Hayashi K, Inoue T. Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches. *Nat Commun.* 2011 Jan 18;2:160. PMID: 21245841.
- 3) Endo K, Hayashi K, Inoue T, Saito H. A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches. *Nat Commun.* 2013;4:2393. doi: 10.1038/ncomms3393. PMID: 23999119.

- 4) Miki K, Endo K, Takahashi S, Funakoshi S, Takei I, Katayama S, Toyoda T, Kotaka M, Takaki T, Umeda M, Okubo C, Nishikawa M, Oishi A, Narita M, Miyashita I, Asano K, Hayashi K, Osafune K, Yamanaka S, Saito H, Yoshida Y. Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches. *Cell Stem Cell*. 2015 Jun 4;16(6):699-711. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.005. Epub 2015 May 21. PMID: 26004781.
- 5) Wroblewska L, Kitada T, Endo K, Siciliano V, Stillo B, Saito H, Weiss R. Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery. *Nat Biotechnol*. 2015 Aug;33(8):839-41. doi: 10.1038/nbt.3301. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26237515.