
細胞種に応じてゲノム編集を制御する技術を開発

ポイント

- 細胞内には、細胞種によって異なる活性をもつマイクロ RNA(miRNA)^{注1}が存在する。
- 細胞内の miRNA 活性に応じて、ゲノム編集を制御するシステム「miR-Cas9 スイッチ」を開発した。
- HeLa 細胞^{注2}と iPS 細胞それぞれに活性の高い細胞内 miRNA を感知し、ゲノム編集を制御することができた。
- HeLa 細胞と iPS 細胞が混在した細胞集団において、HeLa 細胞にだけ特異的にゲノム編集を行うことに成功した。
- 合成 RNA を用いた手法のため、DNA を傷つける危険性を低減でき、安全性が高い。

1. 要旨

弘澤萌大学院生(京都大学 CiRA 未来生命開拓部門)、齊藤博英教授(京都大学 CiRA 同部門)らの研究グループは、細胞種に応じてゲノム編集を制御する技術を開発しました。

CRISPR-Cas9 システムは、ゲノムの狙った配列を特異的に切断し、特定の配列を削除したり、新たな配列を置換・挿入できるゲノム編集技術の一つとして注目されています。細胞内には、細胞種によって異なる活性をもつ miRNA が存在し、細胞のマーカーとしての利用が有望視されています。研究グループは、細胞内にあり、細胞種によって異なる活性をもつ miRNA を利用することで、細胞種を識別し、それに応じて CRISPR-Cas9 システムの働き、つまり、ゲノム編集を制御できる新たな手法を開発しました。具体的には、HeLa 細胞、iPS 細胞それぞれで特異的に活性の高い miRNA に応答する CRISPR-Cas9 システム「miR-Cas9 スイッチ」を構築し、細胞内に導入しました。すると、それぞれで活性が高い miRNA が存在する場合は、導入された Cas9 遺伝子から Cas9(DNA を切断する酵素)が作られず、標的の緑色蛍光タンパクを作る DNA が切断されないため、蛍光を発しました。一方、それぞれで活性が高い miRNA が存在しない場合は Cas9 が作られ、緑色蛍光タンパクを作る DNA が切断され、弱い蛍光強度を示しました。これを利用し、HeLa 細胞と iPS 細胞が混在する細胞集団において、iPS 細胞には影響を与えず、HeLa 細胞にだけ特異的にゲノム編集を行うことに成功しました。

本技術により、細胞種に応じたゲノム編集の制御ができるようになりました。今後、目的の細胞を選別して再生医療研究や創薬研究などに役立てるという応用や、生体内において目的の細胞のみにゲノム編集を行うことで、遺伝病治療のための技術としての可能性が期待されます。

この研究成果は 2017 年 5 月 19 日に英国科学誌「Nucleic Acids Research」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

CRISPR-Cas9 システムは、Cas9 というゲノムを切断する酵素を利用してゲノムの狙った特定配列を特異的に切断し、もともと細胞に備わっている修復機構を利用して特定の配列を削除したり、新たな配列を置換・挿入できるゲノム編集技術の一つとして注目されています。多様な細胞に CRISPR-Cas9 システムを導入すると、細胞種に関係なくゲノム編集が行われてしまいます。そこで、特定の細胞種を認識し、細胞種に応じてゲノム編集を制御できるような技術が求められています。これまで、ウイルスベクターやプラスミド DNA を用いて CRISPR-Cas9 システムを導入する方法などが検討されてきましたが、これらの DNA

が細胞内 DNA にランダムに組み込まれてしまい、がん化を起こす危険性などが指摘されています。そこで、そのような心配のない RNA を用い CRISPR-Cas9 システムを導入し、細胞種に応じたゲノム編集の制御を可能とする技術が求められています。

研究グループは細胞を識別するための目印として、miRNA に着目しました。miRNA は、タンパク質をコードしていない RNA の1つで、メッセンジャーRNA(mRNA)^{注3} からタンパク質への翻訳を抑制する働きがあります。様々な種類の miRNA が細胞内に存在しますが、その細胞種によってよく働いている(活性が高い)miRNA の種類は異なります。そのため、ある細胞内で活性の高い miRNA は、その細胞の目印として用いることができると考えられます。

今回、グループは細胞内の miRNA の活性に応じて、ゲノム編集のオン・オフを制御できるシステムを合成 mRNA を用いて開発しました。

3. 研究結果

1. 細胞内の miRNA 活性に応じてゲノム編集の制御できる技術を開発した

まず、グループは細胞種により異なる活性を示す細胞内 miRNA に着目し、特定の miRNA を認識する配列と CRISPR-Cas9 技術においてゲノムを切断する酵素 Cas9 を作る配列を組み込んだ mRNA を合成し、miR-Cas9 スイッチと名付けました。

本スイッチを miRNA の活性が低い細胞に導入すると、Cas9 タンパクが作られ、緑色蛍光色素を作る EGFP 遺伝子へと誘導するガイド RNA と結合し、標的の EGFP 遺伝子を切断します。EGFP 遺伝子が切断された細胞は蛍光を発しません。一方、miRNA の活性がある細胞内では、miRNA がその認識配列と結合することにより、Cas9 タンパクの合成が抑制され、作られません。そのため、EGFP 遺伝子は切断されることなく、細胞は緑色蛍光を発します。つまり、ある miRNA の活性の低い目的外の細胞ではゲノム編集機構がオンとなり、miRNA の活性の高い目的の細胞ではゲノム編集機構がオフとなります。

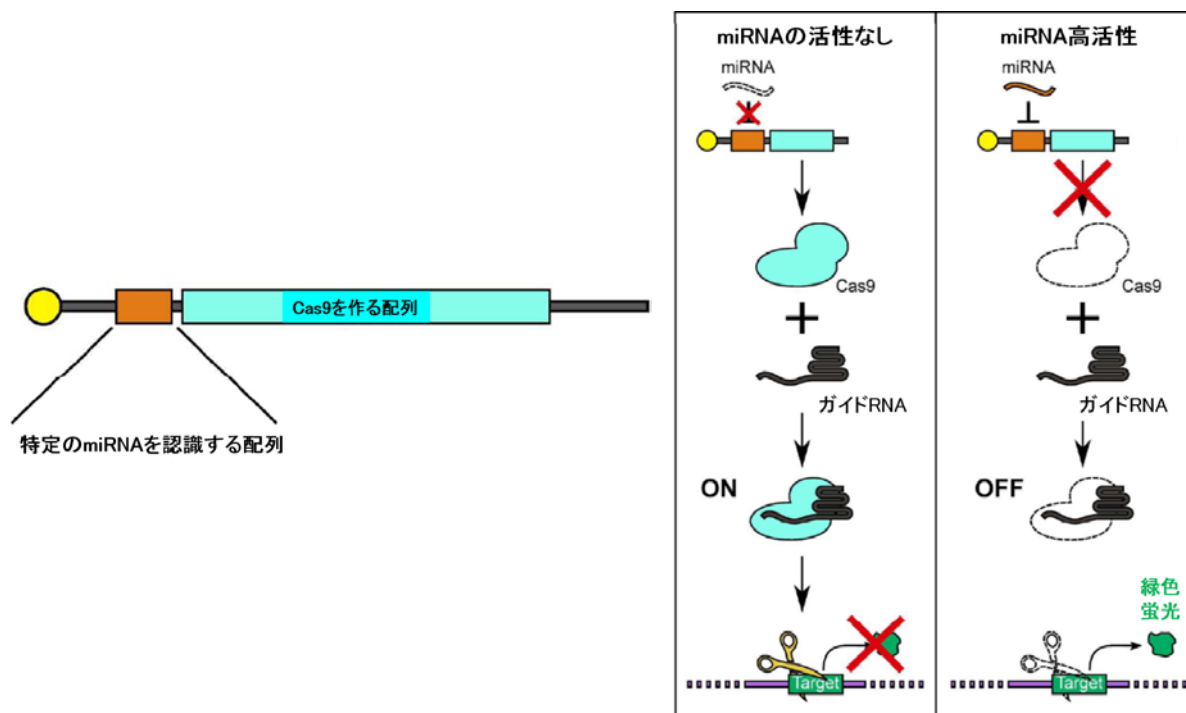


図1. miR-Cas9 スイッチの構造(左)と働き(右)

2. 実際の細胞でゲノム編集を制御できることを確認した

次にグループは実際の細胞で本スイッチにてゲノム編集を制御できるか実験を行うため、HeLa 細胞で活性の高い miRNA (miR-21) を検知するスイッチ (miR-21-Cas9 スイッチ)、iPS 細胞で活性の高い miRNA (miR-302) を検知するスイッチ (miR-302-Cas9 スイッチ)、miRNA を感知する配列を持たない対照スイッチを用意しました。

まず、実際に HeLa 細胞に miR-21-Cas9 スイッチ、miR-302-Cas9 スイッチ、そして対照スイッチを導入し、miR-21-Cas9 スイッチを導入した場合に Cas9 の産生が抑えられることを確認しました。

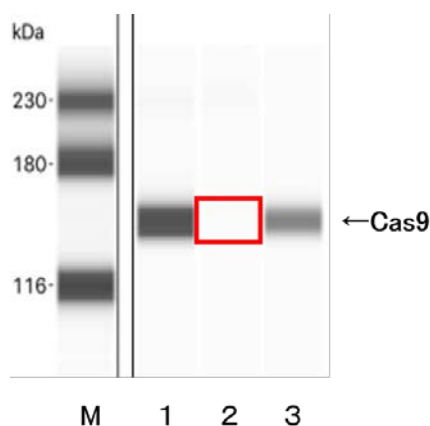


図2. HeLa 細胞における Cas9 の産生

HeLa 細胞に下記の各スイッチを導入した。

miR-21-Cas9 スイッチ (2) を導入すると、Cas9 の産生が抑えられた (赤で囲まれたところ)。

(M はマーカー。)

1: 対照スイッチ、2: miR-21-Cas9 スイッチ、3: miR-302-Cas9 スイッチ

次に、EGFP 遺伝子を組み込んだ HeLa 細胞に、miR-21-Cas9 スイッチ、miR-302-Cas9 スイッチ、そして対照スイッチのそれぞれを導入し、72 時間後に細胞の蛍光強度をフローサイトメトリー^{注4}で計測しました。すると、対照スイッチと miR-302-Cas9 スイッチを導入した HeLa 細胞は蛍光強度が低く、miR-21-Cas9 スイッチを導入した HeLa 細胞は高い蛍光強度を示しました。なお、miR-21 を阻害したところ、蛍光強度が低くなりました。

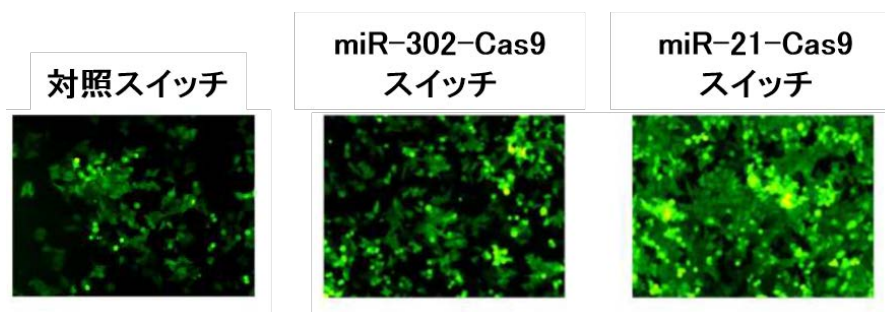


図3. HeLa 細胞における miR-21-Cas9 スイッチの働き

HeLa 細胞に miR-21-Cas9 スイッチを導入すると、Cas9 が作られず、高い蛍光強度を示した。

また、iPS 細胞に実験を行ったところ、対照スイッチと miR-302-Cas9 スイッチ、さらに miR-302 を阻害した上で miR-302-Cas9 スイッチを導入しました。すると、miR-302 を阻害せずに miR-302-Cas9 スイッチを導入した iPS 細胞は高い蛍光強度を示しましたが、miR-302 を阻害して miR-302-Cas9 スイッチを導入した iPS 細胞は低い蛍光強度を示しました。このことから、miR-302-Cas9 スイッチが iPS 細胞で活性のある miR-302 により制御されていることが確認できました。

これらの結果より、本スイッチを用いることで、各細胞内で活性の高い miRNA を感知して細胞種ごとにゲノム編集を制御できることが示されました。

3. 異種の細胞が混在した細胞集団においても、目的の細胞を識別し、ゲノム編集を制御できる

さらに研究グループは、miR-Cas9 スイッチが異なる細胞種が混在している細胞集団においても目的の細胞を識別した上でゲノム編集を制御できるかを調べました。

HeLa 細胞と iPS 細胞を培養皿上で混在させ、iPS 細胞で活性の高い miR-302 を認識する miR-302-Cas9 スイッチと対照スイッチを導入し、72 時間後に細胞群の蛍光強度を調べました。この際、TRA-1-60 抗体という、多能性幹細胞 (iPS 細胞を含む) に特異的な細胞表面マーカーを利用して、HeLa 細胞と iPS 細胞が見分けられるようにしました。

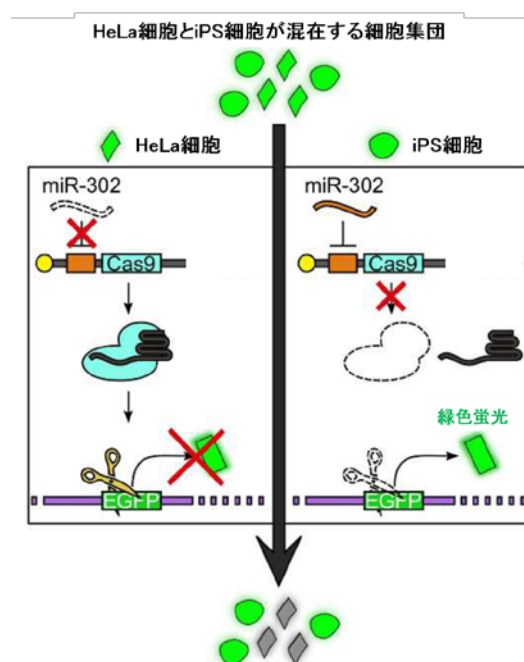


図4. 混在する細胞集団における目的の細胞の識別とゲノム編集制御のしくみ

すると、対照スイッチを導入した場合は、HeLa 細胞と iPS 細胞の双方に蛍光を発しない細胞が見られましたが、miR-302-Cas9 スイッチを導入すると、蛍光を発しない細胞のほぼすべてが HeLa 細胞でした。この結果は、miR-302-Cas9 スイッチの導入により、選択的に iPS 細胞ではゲノム編集機構がオフとなり、

HeLa 細胞ではオンとなったことを示しており、miR-Cas9 スイッチによって異種の細胞が混在した細胞集団においても細胞を識別し、ゲノム編集を制御できることを示しています。

4. miRNA 活性が高い細胞でゲノム編集を引き起こすことも可能となった

最後に研究グループは、miRNA 活性が高い細胞でゲノム編集を引き起こすシステム、miR-Cas9 オンスイッチも開発しました。ここでは、グループが過去に開発した、RNA からなる人工回路（参照：2015 年 8 月 4 日 CiRA HP 掲載「細胞の機能を精密に制御する人工回路を RNA で構築：ヒトの細胞で成功」）を活用しました。2種類の合成 mRNA（miRNA に応答して RNA 結合タンパクの産生を制御する mRNA と、RNA 結合タンパクに応答して Cas9 タンパクの産生を制御する mRNA）を導入することで、HeLa 細胞で標的とする miR-21 に応答して、ゲノム編集を活性化することに成功しました。したがって、標的細胞で目印となる miRNA に応答して、ゲノム編集をオフにすることも（オフスイッチ）、オンにすることも可能となります。

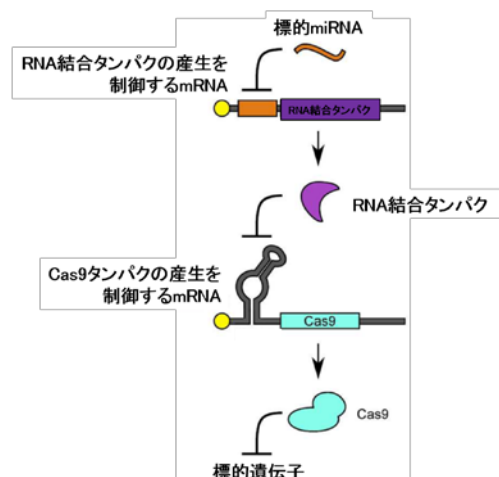


図5. miR-Cas9 オンスイッチのしくみ

4. まとめ

本研究では、細胞種により活性の違う miRNA を応用することで、細胞種に応じたゲノム編集の制御を可能とする技術を開発しました。本技術は安全性の高い RNA を利用しているため、将来的な医療応用にも役立てられると考えられます。正常細胞に対する不用意なゲノム編集のリスクの低減できることから、今後、目的の細胞を選別して再生医療研究や創薬研究などに役立てるとともに、細胞の内部環境（miRNA の状態）に応じたゲノム編集が実現できるため、細胞状態の記録や機能改変など、基礎研究での活用も期待できます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch”

○ ジャーナル名

Nucleic Acids Research

○ 著者

Moe Hirosawa^{1,2}, Yoshihiko Fujita¹, Callum J.C Parr¹, Karin Hayashi¹, Shunnichi Kashida¹, Akitsu Hotta¹, Knut Woltjen^{1,3}, and Hirohide Saito¹

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所
2. 京都大学大学院医学研究科
3. 京都大学白眉センター

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- ・ 日本学術振興会 科学研究費補助金「基盤研究 S」
- ・ 日本学術振興会 特別研究員制度
- ・ 公益財団法人 内藤記念科学振興財団
- ・ キヤノン財団
- ・ 公益財団法人 上原記念生命科学財団

7. 用語説明

注 1) マイクロ RNA (miRNA)

20～30 塩基程度の長さの短いノンコーディング(タンパク質をコードしていない)RNA。相補的な配列を持つ mRNA と結合して翻訳を抑制したり、mRNA を分解したりすることで、その mRNA からのタンパク質の合成を抑制する働きをもつと考えられている。

注 2) HeLa 細胞

ヒト由来の最初の細胞株。ヒト子宮頸がんから分離され株化された細胞で、世界中で広く研究に利用されている細胞の 1 つ。

注 3) メッセンジャーRNA (mRNA)

DNA の持っている遺伝情報(遺伝子配列)から転写され、合成される RNA。この mRNA の配列に従って、アミノ酸が連結されてタンパク質が合成される。

注 4) フローサイトメトリー

流動細胞計測法。レーザー光を用いて光散乱や蛍光測定を行うことにより、水流の中を通過する単一細胞の大きさ、DNA 量など、細胞の生物学的特徴を解析することができる。