

RNA ナノテクノロジーを活用した細胞運命の人為的制御法の開発

研究代表者

齊藤博英 京都大学 iPS 細胞研究所 教授



1. 研究の背景と達成目標

近年様々な RNA が細胞の運命決定に重要な役割を果たすことが注目されている。本研究では、生体内で多彩な機能を担う RNA や RNA-タンパク質複合体 (RNP) を人工的にデザイン・作成できる独自の合成生物学技術を活用し、人工 RNA/RNP ナノ構造体からなる分子デバイスを作製し、細胞の機能や運命を制御できる新技術を開発することを目指した。さらに、人工 RNA デバイスの細胞内直接導入により、iPS 細胞等を活用した細胞運命制御技術を確立することを試みた。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- iPS 細胞を選択的に識別、分離、除去できる合成 RNA の開発 (2016, Scientific Reports)
iPS 細胞を含む多能性幹細胞を選択的に識別・分離・除去することが可能となった。
- 細胞分化を継続的に可視化できるマイクロ RNA 応答性レポーターベクターの開発 (2017, Biomaterials)
生きた細胞の分化を継続的に可視化する、簡便で低コストな技術を開発した。
- 内在タンパク質に応答して標的細胞を識別する RNA 分子デバイスの構築 (2017, Nucleic Acids Res.)
内在タンパク質の発現状態に応じて生きた細胞を識別できる新技術を開発した。
- 細胞種に応じてゲノム編集を制御する技術を開発 (2017, Nucleic Acids Res.)
マイクロ RNA の活性化状態に応じて細胞種ごとにゲノム編集を制御する新技術を開発した。

これら成果は、読売新聞、日本経済新聞、朝日新聞を含む各種メディアで報道された。

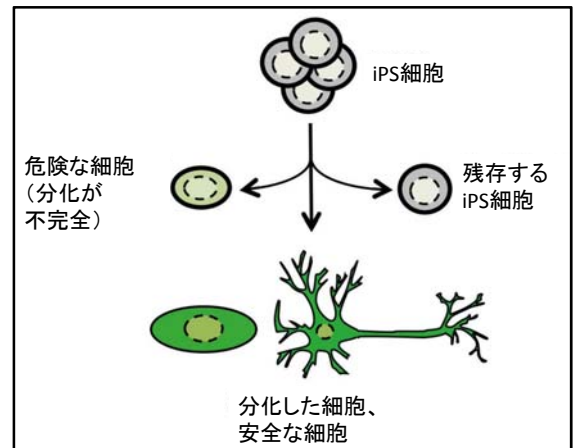
3. 研究成果

RNA スイッチによる iPS 細胞の識別と除去

iPS 細胞を含む多能性幹細胞は、体のほぼあらゆる細胞に分化することができ、その特性を利用して再生医療や創薬研究が盛んに行われている。しかし、多能性幹細胞が他の細胞へ分化する効率にはばらつきがあるため、分化細胞集団の中に iPS 細胞が残存したり、分化が不完全な細胞が混在することがある。これを防ぐため、未分化な iPS 細胞を識別して適切に除去し、安全な細胞集団を得ることが重要である。われわれは、合成 mRNA を iPS 細胞に導入することにより、iPS 細胞に特異的に発現するマイクロ RNA (miRNA) の活性を検知して iPS 細胞を精密に見分け、部分的に分化した iPS 細胞をも識別・除去できる方法を開発した。まず、ヒト iPS 細胞を含む多能性幹細胞のマーカー因子として、多能性幹細胞特異的に活性の高い miRNA である miRNA-302 に着目し、細胞内の miRNA-302 の活性に応じて異なる反応を示す mRNA を合成した。具体的には、miRNA-302 と相補的な配列と、その下流に蛍光タンパク質や薬剤耐性遺伝子をコードする配列を含む mRNA (miR-302 スイッチ)

を合成した。この mRNA を細胞に導入することで、iPS 細胞とそれ以外の細胞が混在した細胞集団から iPS 細胞を選択的に識別・分離でき、生体内での奇形腫の形成を抑制できた。

(図説明) プューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ miR-302 スイッチによる iPS 細胞除去システム。神経細胞と iPS 細胞を混合し、プューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ miR-302 スイッチを作用させることで、プューロマイシン存在下で iPS 細胞を選択的に死滅できる。



4. 今後の展開

今回の助成研究を通じて、細胞機能を制御する様々な人工 RNA デバイスの構築に成功した。RNA スイッチは iPS 細胞の識別にとどまらず、様々な分化細胞や標的疾患細胞の運命制御も可能になると期待できる。また、RNA ナノ構造体の細胞内構築も進展しているため、RNA や RNP を活用した細胞運命制御システムの基盤が構築できたと考える。今後、再生医療を見据えた幹細胞分野や生命科学分野、分子ロボティクス分野に本技術を活用していくことを目指す。

5. 発表実績

- [1] Hirosawa et al., “Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch” *Nucleic Acids Research*, in press (2017)
- [2] Kawasaki et al., “Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells” *Nucleic Acids Research*, in press (2017)
- [3] Nakanishi et al., “Monitoring and visualizing microRNA dynamics during live cell differentiation using microRNA-responsive non-viral reporter vectors” *Biomaterials* 128:121-135(2017)
- [4] Callum J.C Parr et al., “MicroRNA-302 switch to identify and eliminate undifferentiated human pluripotent stem cells” *Scientific Reports*, 6:32532, (2016)