

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870355

研究課題名(和文)細胞質因子検出 RNA 回路による細胞分画法の開発

研究課題名(英文) Identification and separation of living cells based on synthetic RNA circuits detecting intracellular information

研究代表者

遠藤 慧 (ENDO, Kei)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：40626074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞療法など生きた細胞の利用のためには、培養した細胞から目的とする特定の細胞のみを分画する必要がある。しかし生細胞を分画する既存の方法は細胞の表面抗原の有無に依存している。本研究課題では、細胞内部のマーカー因子によって発現制御される外来の遺伝子を設計して導入することにより、細胞内部の情報に基づいて生細胞の分画技術の開発に取り組んだ。特に医療分野での応用を目指し、対象細胞のゲノム DNA 損傷を避けるため、mRNA 分子を細胞に直接導入することとした。本課題で開発した手法により、2倍程度の小さなマイクロRNA活性の差に基づいて細胞を分画することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Methods for identifying the cell types are critical not only to analysis of specific tissues and cells, but also to preparation of particular cells for therapeutic purposes. Marker proteins on the surface of living cells have been investigated to identify target cells. However, it is still hard to find a specific set of antibodies that determines a variety of cell types. In addition, possible combinations of binary classification are quite limited.

In this project, we developed a method that enables to distinguish living cells based on intracellular markers in a quantitative manner. We focused on the activity of microRNAs, which are short, non-coding RNAs expressed in a cell. We designed and synthesized microRNA-responsive mRNAs that produce fluorescent proteins as a reporter, and transfected them directly to target cells. With the synthetic mRNAs, we succeeded in isolating multiple cell types based on subtle (less than 2-fold) difference in the microRNA activity.

研究分野：分子生物学, 合成生物学, RNA医工学

キーワード：細胞分画法 mRNA マイクロRNA 人工遺伝子回路 合成生物学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 特定分子の結合により発現制御可能な外来遺伝子 (mRNA スイッチ) の構築

RNA 分子は mRNA や small RNA として遺伝子発現制御の中心的分子であるだけでなく、多様な分子に特異的に結合する機能も持ちうる。特に後者はアプタマーとも呼ばれ、目的の分子に結合する RNA アプタマーを人工的に取得することが可能である。実際に研究代表者は、低分子として蛍光色素(文献)、タンパク質として翻訳関連因子(文献) に特異的に結合する RNA アプタマーの取得と結合特異性についての生化学的解析に取り組んできた。このような RNA 分子の 2 面性をうまく融合させることにより、細胞内部の状態を示すマーカー分子に結合して、その相互作用に応じて細胞特異的に遺伝子発現を制御できると期待された。

実際、これまでに研究代表者らのグループでは、特定のマーカータンパク質の存在下において、mRNA からの翻訳を抑制する OFF スイッチ(文献)、shRNA による RNA 干渉を抑制する ON スイッチ(文献) が開発された。さらに研究代表者が中心となって、入力因子への応答性を調節する方法(文献) や OFF スイッチを ON スイッチへと変換する mRNA カセット(文献) の開発にも成功しており、mRNA スイッチの応用・開発に関して先駆的な研究が進められていた。

(2) 細胞内マーカー因子の検出による細胞分画法

一方で、それまでに開発されたスイッチは細胞に強制発現させた特定の RNA 結合タンパク質に結合しており、細胞内在の因子へ応答することには未だ成功していなかった。そこで本研究課題では、mRNA スイッチを細胞質に存在するマーカー因子に結合させることにより、細胞内マーカー因子の存在情報に基づく細胞分画技術の実現を目指した。

一般的な細胞分画技術では、表面抗原の発現の有無を識別している。一方で、細胞の特異性は細胞内に存在するマーカー因子でも評価される。特定の細胞の分画には表面抗原が必須であるとともに、表面抗原による識別と細胞内因子による識別の同一性についても問題が残る。細胞質内のマーカーを個々の細胞について検出する方法として、抗体を細胞内に導入する方法が開発されている(文献) が、この手法は細胞を固定する必要があるため生細胞の分画は実現できていない。また DNA を用いて外来遺伝子を導入すると、導入した DNA と対象細胞のゲノム DNA との間で予期せぬ組換えが起こりえる。このような組換えにより細胞ゲノムが損傷すると対象細胞ががん化するなどの危険性が生じてしまう。そこで原理的にゲノムを損傷しない RNA を細胞に直接導入する外来遺伝子の導入手法に注目した。

2. 研究の目的

本研究課題では、試験管内で合成された mRNA 分子として細胞に直接導入可能な、細胞内マーカー因子に結合する mRNA スイッチを開発することを目的とした。細胞療法など細胞を応用的に使用する際には、培養した細胞集団から目的とする特定の細胞のみを分画する必要がある。細胞の表面抗原の有無に依存した既存の生細胞分画技術を補完、代替する技術として、外来遺伝子の発現制御を細胞内のマーカー因子に結合させることによって、細胞内因子の有無を基準とした生細胞の分画技術の開発に取り組んだ。特に医療分野での応用を目指し、対象細胞のゲノム DNA 損傷を避けるために mRNA 分子を細胞に直接導入することとした。さらに高次機能を備えた遺伝子発現制御回路を mRNA 分子として細胞に導入することによって、細胞分画技術の向上を目指した。

3. 研究の方法

(1) マイクロ RNA 応答性 mRNA の設計

細胞内のマーカー因子として、細胞で一般の遺伝子と同様に転写され、翻訳段階の発現制御を担うマイクロ RNA に着目した。一般的に用いられているマイクロ RNA 応答性の mRNA のように 3' 非翻訳領域ではなく、mRNA の 5' 末端から 20 塩基程度下流の 5' 非翻訳領域にマイクロ RNA と完全に相補的な配列を挿入した。設計した mRNA からの遺伝子発現量を細胞が生きた状態で定量解析するため、レポーター遺伝子として蛍光タンパク質を用いた。ただし、レポーター遺伝子の開始コドンの上流に別の開始コドンが挿入されることを防ぐため、本課題では CAU を含まないマイクロ RNA のみを対象とした。

(2) mRNA の試験管内合成

試験管内で合成した mRNA を用いて iPS 細胞を誘導した研究報告(文献) に基づいて mRNA を合成した。まず PCR 法により鋳型 DNA を合成し、その後 T7 RNA ポリメラーゼを用いて mRNA を合成した。本研究課題で用いた合成 mRNA は全てのシトシンとウリジンがそれぞれ 5-メチルシトシンとシュードウリジンに置き換えられている。また 5' 末端にはキャップアナログ、3' 末端には 120 塩基長のポリ A を転写反応時に付加した。

(3) mRNA の培養細胞導入

mRNA 導入の 1 日前に細胞を 24 ウェルプレートに播種した。翌日、リポフェクション法で 2 から 4 種類の mRNA をあらかじめ混合してから導入した。mRNA 導入試薬の細胞毒性を提言するため、mRNA 導入 4 時間後に培地を交換した。

(4) フローサイトメトリー解析

マイクロ RNA 応答性 mRNA を導入して 24 時間後の細胞をフローサイトメトリーに

より解析し、導入した mRNA から発現された蛍光タンパク質を細胞ごとに定量した。その後、複数の蛍光タンパク質の輝度の比率を細胞ごとに算出して細胞識別のための指標として用いた。

(5) イメージングサイトメトリー解析

フローサイトメトリーとは異なり、イメージングサイトメトリーでは生きた接着細胞の形や位置をそのまま解析することができる。本研究課題では、細胞を効率よく識別するため核局在化シグナルを付加した蛍光タンパク質をレポーター遺伝子として用いた。マイクロ RNA 応答性 mRNA を導入して 24 時間後に、培養ディッシュ上に接着した状態の細胞を蛍光顕微鏡により撮影した。得られた蛍光画像に対して、フローサイトメトリーにおける解析と同様に、蛍光強度の比率を算出した。

4. 研究成果

(1) 細胞間にある大きなマイクロ RNA 活性の差を指標にした細胞分画法の開発

試験管内で合成した mRNA は培養中の細胞集団のほぼ全ての細胞に導入できること、個々の細胞ごとの発現量は 100 倍程度の範囲のばらつきがあることが観察された。さらに、複数種類の mRNA を細胞に共導入した場合に細胞集団中で各 mRNA からの発現量が極めて高い相関を示すことを見いだした。すなわち、発現量の大きなばらつきに関わらず、その比率は細胞集団内で一定であることを発見した。そこで、2 種類のレポーター遺伝子の発現量の比率を指標とし、マイクロ RNA 応答性の mRNA を用いることによって、細胞内の特定のマイクロ RNA 活性を精度よく検出できると考えられた。

モデル実験として HeLa 細胞と 293FT 細胞の分離を試みた。HeLa 細胞では miR-21 の活性が 293FT より 17 倍高かった。そこで miR-21 応答性の緑色蛍光タンパク質の mRNA を設計し、マイクロ RNA には応答しない赤色蛍光タンパク質の mRNA とともに、HeLa 細胞と 293FT 細胞を混合した細胞集団に共導入した。導入後の細胞集団をフローサイトメトリー解析した結果、2 種類の蛍光タンパク質の蛍光強度の比率を指標にすることによって、細胞集団を明確な 2 集団に分離することに成功した。

この技術シードを応用して、京都大学 iPS 細胞研究所の山中伸弥教授、吉田善紀講師、三木健嗣博士らのグループと共同研究を実施し、iPS 細胞から分化させた心筋細胞を効率よく精製できることが示された。

(2) 細胞間にある小さなマイクロ RNA 活性の差を指標にした細胞分画法の開発

2 種類の mRNA を同一細胞株の細胞集団に導入したとき、そこから発現した蛍光タンパク質の比率は集団中で 2 倍以下程度のば

らつきを示した。このことは 2 倍程度のマイクロ RNA 活性の違いに基づいて細胞を分離できることを示す。さらに、一方の細胞で高い活性を示すマイクロ RNA ともう一方の細胞で高い活性を示すマイクロ RNA のそれぞれに応答する mRNA を組み合わせることで細胞に共導入することによって、細胞間にあるより小さなマイクロ RNA 活性の差を、蛍光比率を算出する段階で増幅して細胞を分離することができると考えた。実際に HeLa 細胞と MCF-7 細胞を分離したモデル実験では、驚くべきことに、わずか 1.3–1.5 倍程度のマイクロ RNA 活性の差に基づいてこれらの細胞種を分離することに成功した。

3、4 種類のマイクロ RNA 応答性 mRNA を用いて 2、3 種類の蛍光比率を指標として算出し、生きた細胞を 2、3 次的に分離することにも成功した。また、蛍光顕微鏡によって撮影された画像を用いたイメージングサイトメトリー解析においても、同様に蛍光比率を指標とした解析を実施することによって蛍光画像中の細胞を高精度に識別することに成功した。

(3) 試験管内合成 RNA によって導入可能な人為的な遺伝子発現制御回路の構築

生きた細胞内部の情報に反応して複雑な遺伝子発現制御を実現する人工的な遺伝子発現制御回路を構築できれば、場合分けなど、より複雑な情報の判断に基づいた細胞分画が可能になると期待される。より複雑な遺伝子発現制御を実現するためには、細胞に導入した外来の制御因子自身も制御されること、複数の制御因子の間でネットワークが形成されることが必須となる。直接細胞に導入された RNA による遺伝子発現の制御としては RNA 干渉が著名だが、この場合には制御因子となる siRNA の機能をネットワーク内で制御することが難しい。一方、外来 mRNA からの遺伝子発現を制御できるタンパク質因子であれば、制御因子の発現も制御できるので都合がよい。そこで RNP と翻訳制御を基盤とした遺伝子回路の構築を試みた。

研究代表者らのこれまでの研究で蓄積された知見を総合し、制御因子として用いる RNA 結合タンパク質が特異的に結合する RNA 配列を合成 mRNA の 5' 末端のごく近傍に挿入することによって、試験管内合成 mRNA を用いた遺伝子導入法に適用可能なタンパク質応答性 mRNA の設計に成功した。

一方、米国マサチューセッツ工科大学の Weiss 教授らは、従来のプラスミド DNA の細胞導入、または RNA ウイルスのレプリコンの細胞導入によって、RNP と翻訳制御を基盤とした遺伝子回路の構築研究を行っていた。そこで、試験管内合成 mRNA の細胞導入による方法を開発していた研究代表者らは、Weiss 教授らと共同で研究を実施し、複数マイクロ RNA 情報の合算回路、一方向性の逐次回路、双方向性のトグルスイッチ様回

路を設計した。これらの人工遺伝子回路を、それぞれ3種類の方法(プラスミドDNA、合成 mRNA、RNA ウィルスレプリコン)を用いて対象の細胞に導入し、その細胞内動態を解析した。研究代表者らの合成 mRNA を用いた遺伝子導入法は、複数マイクロ RNA 情報の合算回路、一方向性の逐次回路の導入にはよく適しているが、長期的な遺伝子発現制御を必要とするトグルスイッチ様回路の導入には適さないことを見いだした。

<引用文献>

- Endo, K. et al., *Anal. Biochem.*, 400 (1): 116–120, 2010.
Nakamura et al., *Prog. Mol. Biol. Trans. Sci.*, 90: 369–395, 2009.
Saito, H. et al., *Nat. Chem. Biol.*, 6 (1): 71–78, 2010
Saito, H. et al., *Nat. Commun.*, 2: 160 2011
Endo, K. et al., *Nucleic Acids Res.*, 41 (13): e135, 2013
Endo, K. et al., *Nat. Commun.*, 4: 2393, 2013
Kruzick, P.O. & Nolan, G.P., *Cytometry A*, 55A: 61–70, 2003
Warren, L. et al., *Cell Stem Cell*, 7 (5): 618–630, 2010

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Endo, K.*, Hayashi, K., and Saito, H.*:
(*責任著者)

“High-resolution identification of cell types by microRNA-responsive mRNAs.” *Scientific Reports*, 6: 21991 (2016). (査読あり)

doi:10.1038/srep21991

Wroblewska, L., Kitada, T.‡, Endo, K.‡, Siciliano, V., Stillo, B., Saito, H., and Weiss, R. (‡共第二著者):

“Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery.” *Nature Biotechnology*, 33 (8): 839–841 (2015). (査読あり)

doi: 10.1038/nbt.3301

Miki, K.‡, Endo, K.‡, Takahashi, S., (ほか 15 名), Yamanaka, S., Saito, H., and

Yoshida, Y. (著者 21人中2番目) (‡共筆頭著者):

“Efficient detection and purification of cell populations by synthetic microRNA switches.” *Cell Stem Cell*, 16 (6): 699–711 (2015). (査読あり)

doi: 10.1016/j.stem.2015.04.005

Endo, K., Parr, C., and Saito, H.:

“Expanding the synthetic ribonucleoprotein world in cells.” *Nature Methods*, 11(11): 1105–1106 (2014). (査読なし)

doi: 10.1038/nmeth.3148

Endo, K., and Saito, H.:

“Engineering protein-responsive RNA switch in mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 1111: 183–196 (2014). (査読なし)

doi: 10.1007/978-1-62703-755-6_13

遠藤 慧, 齋藤 博英 :

「複数の哺乳類 mRNA の同時かつ特異的な翻訳チューニング法」 *実験医学* 32 (4): 595–599 (2014). (査読なし)

[学会発表](計 4 件)

遠藤 慧 :

「合成 mRNA により miRNA 活性プロファイルに従って生細胞を精密に分画する」情報計算化学生物学会 2015 年大会, 2015 年 10 月 29 日, タワーホール船堀 東京都江戸川区)

遠藤 慧, 齋藤 博英 :

「mRNA のエンジニアリングに基づく動物細胞の遺伝子発現制御系」日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 30 日, 明治大学(神奈川県川崎市)

遠藤 慧 :

「細胞内の情報にもとづいて細胞を生き
たまま精製したい」再生医療学会 サテラ
イトミーティング, 2014年3月4日, 国立
京都国際会館 (京都府京都市)

Endo, K., and Saito, H.:

“High-resolution identification of cell
types by microRNA-responsive
mRNAs.” The 7th Takeda Science
Foundation Symposium on
Pharmasciences, Jan. 16-18, 2014,
Center for learning and innovation,
Takeda Pharmaceutical Company, Ltd.
(Suita, Osaka)

[産業財産権]

出願状況 (計 5 件)

名称:細胞分離を行うための miRNA の選
択方法

発明者: 齋藤 博英、遠藤 慧

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-212176 号

出願年月日: 2015 年 10 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: RNA-based logic circuits with
RNA binding proteins, aptamers and
small molecules.

発明者: Weiss, R., Wroblewska, L.
Siciliano, V., Kitada, T., Hottelet-Foley,
M., Bodner, K., Saito, H., Endo, K., and
Irvine D.J.

権利者: Massachusetts Institute of
Technology

種類: 特許

番号: USA 62/195,747;PCT/US15/49045

出願年月日: September 8, 2015

国内外の別: 国外

名称: 分化細胞の抽出方法

発明者: 齋藤 博英、遠藤 慧、片山 翔太、
PARR, Callum

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-146070 号

出願年月日: 2014 年 7 月 6 日

国内外の別: 国内

名称:細胞分離を行うための miRNA の選
択方法

発明者: 齋藤 博英、吉田 善紀、三木 健

嗣、遠藤 慧、高橋 誠弥

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-58926 号

出願年月日: 2014 年 3 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: miRNA の発現を指標として所望の
細胞種を判別する方法

発明者: 齋藤 博英、遠藤 慧

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-3726 号

出願年月日: 2014 年 1 月 10 日

国内外の別: 国内

[その他]

京都大学プレスリリース

- http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/160223_1.html
- http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150804_1.html
- http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150522_1.html

京都大学 iPS 細胞研究所プレスリリース

- <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/160224-100000.html>
- <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/150804-110938.html>
- <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/150522-085314.html>

遠藤慧の研究ブログ

<http://blog2014endou.japanprize.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 慧 (ENDO, Kei)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
助教

研究者番号: 4 0 6 2 6 0 7 4

(2) 連携研究者

齋藤 博英 (SAITO, Hirohide)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号: 2 0 4 2 3 0 1 4

(3) 研究協力者

林 香倫 (HAYASHI, Karin)