

京都大学	博士（医科学）	氏名	弘澤 萌
論文題目	Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch (マイクロRNA応答性CRISPR-Cas9スイッチを用いた細胞種特異的なゲノム編集)		
(論文内容の要旨) CRISPR-Cas9 system は、バイオテクノロジーや生物医学的応用に役立つ強力なゲノム編集ツールである。 <i>Streptococcus pyogenes</i> に由来する CRISPR-Cas9 system は、Cas9 エンドヌクレアーゼとプログラム可能な CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) を融合させた単一のガイド RNA (sgRNA) の二つの要素より構成される。sgRNA により標的 DNA 配列にリクルートされた Cas9-sgRNA 複合体は、RNA-DNA ハイブリットを形成する。その後、Cas9 のエンドヌクレアーゼ活性により標的的部位で DNA 二本鎖切断が引き起こされる。これにより、宿主自身の持つ DNA 修復機構が活性化しゲノム変異が誘発される。ここで、多細胞生物は様々な細胞から構成されることから、細胞種特異的なゲノム編集は、細胞運命を調節する重要なツールになると考えられる。 マイクロ RNA (miRNA) は、mRNA の翻訳制御や分解を介して遺伝子発現を制御する低分子 RNA である。この miRNA の活性は個々の細胞で異なるので標的細胞を特徴づけるマーカーとなる。これまでに、細胞内で活性のある miRNA を検知することで、外来遺伝子の発現を制御可能にする「miRNA スイッチ」が開発された。この miRNA スイッチは、合成 mRNA 上の 5'UTR に標的とする miRNA に対して完全相補な配列を組み込んだものである。これにより、内在性の miRNA 活性に基づいた標的細胞の検出や選別が可能となった。つまり、この miRNA スイッチに CRISPR-Cas9 system を組み込むことで miRNA 依存的なゲノム編集ができると考えられた。そこで、合成 RNA を基盤とした miRNA 応答性 CRISPR-Cas9 system 「miR-Cas9 スイッチ」を開発した。 上記仮説を実証するため、HeLa 細胞で特異的に活性が高い miR-21 に応答する Cas9 mRNA を HeLa 細胞に導入したところ、Cas9 活性が抑制された。そこで、内在性 miRNA によりこのゲノム編集の制御がなされたかを確認するため miR-21 に対する阻害剤を用いたところ、Cas9 活性が上昇した。また、iPS 細胞で特異的に活性の高い miR-302a に応答する Cas9 mRNA を iPS 細胞に導入したところ、同様の結果が得られた。これらの結果は、ヘテロな細胞集団から所望の細胞のみのゲノム編集ができる可能性を示唆する。そこで、HeLa 細胞と iPS 細胞の共培養条件下のもとで HeLa 細胞のみのゲノム編集が可能かを試みた。miR-302a に応答する Cas9 mRNA を HeLa/iPS 混合細胞集団に導入したところ、HeLa 細胞のみでゲノム編集がなされた。つまり、ヘテロな細胞集団から標的細胞のみのゲノム編集ができることが明らかとなった。上記 miR-Cas9 スイッチは、標的 miRNA の活性が高い時にゲノム編集を行わなくするものであった。そこで、cell classifier circuit を利用することで標的 miRNA			

の活性が高い時にゲノム編集が起きるシステムを構築し、HeLa 細胞で実証した。

以上のように本研究では、細胞内で特異的に機能する miRNA を検知することでゲノム編集の制御が可能であること、また、ヘテロな細胞集団から選択的に標的細胞のゲノムが編集できることを実証した。

(論文審査の結果の要旨)

多細胞生物は様々な細胞集団より構成されるため、細胞種特異的なゲノム編集は、標的細胞の運命を調節する重要なツールになると考えられる。そこで、miRNA の活性により外来遺伝子の発現が抑制される合成 mRNA である「miRNA スイッチ」に注目した。miRNA の活性は個々の細胞種で異なるため、標的細胞を特徴付けるマーカーとなる。つまり、miRNA スイッチにゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 system を組み込むことで細胞種特異的なゲノム編集の実行が期待される。まず、miR-21 の活性が高い HeLa 細胞に miR-21 に応答する Cas9 mRNA を導入したところ、Cas9 活性が抑制された。そこで、miR-21 阻害剤を加えたところ Cas9 活性が上昇した。また、miRNA-302a の活性が高い hiPS 細胞に miR-302a に応答する Cas9 mRNA を導入したところ、同様の事象がみられた。次に、HeLa 細胞と hiPS 細胞の共培養条件下で、miR-302a に応答する Cas9 mRNA を導入したところ、HeLa 細胞のみで Cas9 が機能した。最後に、標的 miRNA の活性が高い時に Cas9 活性を上昇させるシステムの構築に成功した。

以上の研究は、内在性の miRNA により選択的に標的細胞のゲノム編集を行う手法を確立したものであり、生物医学的応用やバイオテクノロジーの発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成30年10月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降