

2. 研究開発領域

2.1 基礎基盤科学技術—分子・細胞

2.1.1 遺伝子発現機構 (エピゲノム、RNA)

(1) 研究開発領域の定義

遺伝情報の発現機構、つまり遺伝子の情報が細胞における構造および機能に変換される過程の作用機序と生理機能の解明は、次世代シーケンサー (NGS) 等の技術進展を受け近年大きく解析が進んでいる。ここでは、ゲノム、RNA、エピゲノムの視点から、多種の医学・生物学現象の遺伝子的あるいはゲノムの基盤を明らかにすると同時に、プロセッシング、修飾、翻訳といった分子レベルで構造・機能の相関や生理機能ネットワークを解明する領域である。

(2) キーワード

エピゲノム・エピジェネティクス、DNA メチル化、ヒストン修飾、バイサルファイト法、ChIP-seq、Hi-C 法、クロマチン、ヌクレオーム、一細胞オミクス、次世代シーケンサー、ノンコーディング RNA、RNA プロセッシング、RNA 修飾、RNA-タンパク質複合体、液体相分離、核酸医薬

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ひとつの個体は、多様な種類・分化段階の体細胞と生殖細胞により構成されている。ヒトの場合はおよそ 200 種類、37 兆個の細胞が存在していると言われる。これらの細胞はすべて同じゲノムをもつ細胞に由来しているにも関わらず、多様な形・機能をもつ細胞に分化していることになり、言い換えれば、受精卵が増殖・分化して細胞、組織、器官、個体を形成する過程において、遺伝子発現パターンが異なる (使われる遺伝子が異なる) ようになり、それが安定的に継承されるということの意味している。遺伝情報は DNA 上からセントラルドグマ (DNA (転写) → RNA (翻訳) → タンパク質) と呼ばれる一連のプロセスを経て伝達される。この過程では多様な因子が関与して、どのタイミングでどの遺伝子が発現するかを調整している。

エピゲノムは、遺伝子発現制御に関わるゲノムの修飾の態様といえ、DNA の塩基配列の変化を伴わずに、細胞世代を超えて安定的に表現形質を継承させるシステムといえる。このゲノム上の遺伝子を選択的に活性化あるいは不活性化する仕組みとして、ヒストンの修飾ではアセチル化による転写の活性化、メチル化による転写の活性化と抑制があり、DNA 自体の修飾ではメチル化による転写の抑制がある。これらは発生から老化・各種疾患にいたるまでの生命活動全般に幅広く関係する。

遺伝子の発現制御には、DNA に直接結合する転写因子が必須であるが、細胞核内でのゲノム高次構造なども重要な役割を果たすことがわかってきた。遺伝子発現の差異は、ゲノム DNA とその機能を司る核内タンパク質が相互作用する場であるクロマチン構造で生み出される。従って、個々の細胞におけるクロマチン構造上の遺伝子発現制御の解明が必要とされている。

近年では、ゲノム上でタンパク質をコードしないジャンク領域と従来見なされてきたゲノム領域から膨大な量の RNA が転写されていることが明らかとなった。またこれらの RNA 群が、RNA を始めとする多様な生体分子と相互作用し、様々な生命現象を特異的に制御していること、その機能の破綻ががん、神経疾患や感染症など、多様な疾患に深く関与していることが解明されつつある。

このように遺伝子の発現機構の全体像はまだ解明されていないことも多く、これらの作用機序と生理機能ネットワークを解明、把握することで、生命科学の深化のみならず、疾患の原因解明や治療法の確立などへの貢献が期待される。本領域は、これまで医学・生物学の特定の分野を指すものであったが、近年における次世代シーケンサーをはじめとする技術の急速な進歩により、方法論を中心とした医学・生物学全体の基盤となる領域に変貌している。

[研究開発の動向]

2000 年代前半に、国際 HapMap 計画によりヒトゲノム遺伝多型のカatalogが作られた。2004 年頃より NIH が 1000 ドルゲノム (=個人のヒトゲノム全配列の解読コストを 1,000 ドルにする試み) 技術開発として投資してきたシーケンサー技術が実用化されている。2011 年に Pacific Biosciences 社 (米国) が研究開発し市場化した第三世代シーケンサー PacBio RS II の性能が著しく高く、状況は大きく変化した。2013 年に同社が微生物のゲノム配列をギャップなく配列決定し、99.999% の塩基配列の精度を出すソフトウェアを発表した。例えば 2 倍体のヒトゲノムの場合、米国 Illumina 社のシーケンサーのデータと比較しながら、ソフトウェアによるデータ処理により精度を 99.9% (残り 0.1% は多型変異) にまで上げることができる。2014 年初頭に、Illumina 社が大型 NGS 機器である HiSeq X Ten シリーズを発表し、1,000 ドルゲノムを達成したと報告された。

近年、次世代シーケンサーを用いた解析技術 (単一細胞シーケンシング) の発展により、個々の細胞におけるトランスクリプトーム、エピゲノムを解析することが可能になりつつある。中でも、単一細胞 RNA-seq 技術は 2009 年に登場して以来¹⁾、多くの手法が開発、発表されており、現在最も汎用されている単一細胞シーケンシング法となっている²⁾。細胞の単離操作には、FACS による細胞ソーティング、あるいは細胞の単離に特化した Fluidigm 社の C1 システムが利用されている。一方、「細胞の単離」のステップを伴わない、ナノリッタースケールのドロップレットを利用する方法も開発されている (Drop-seq³⁾、inDrop⁴⁾ 等)。オリゴ DNA ビーズと細胞懸濁液をマイクロ流路へ流し込み、形成したドロップレット内で単一細胞からの mRNA のビーズへのキャプチャーあるいは逆転写を行う。この方法では、単一細胞ごとにハンドリングする必要がなく、一度に数千~数万細胞を処理することが可能である。また、転写産物の定量法としては分子バーコード (UMI) により各遺伝子の 3' 末端のみをカウントする方法が現在の主流であるが、一方で単一細胞レベルにおいて全長の転写産物を解析できる方法 RamDA-seq が国内のグループにより報告された⁵⁾。これらに加え、翻訳中の RNA を測定する Ribo-seq、キャップ構造を持つ RNA のみを測定する TSS-seq、転写中の RNA を測定する NET-seq などがある。つまり、転写のみならず、スプライシング、翻訳までを含めたより定量的な RNA の測定技術が次々と報告されてきている。

【エピゲノム】

エピゲノム研究は、1980年代にがんにおけるメチル化異常の報告がなされ、1990年代前半にがんの抑制遺伝子のメチル化異常による不活化が発見されたことを契機としてがん分野でのエピゲノム研究が大きく進展した。2000年代に入りヒストンコードの提唱に伴い、世界各国において研究が積極的に推進された。エピゲノム情報は多様である。まずDNAメチル化は微生物と脊椎動物では様式が大きく異なるが、ここでは脊椎動物に普遍的なCpGのシトシンメチル化の検出について述べる。ゲノム中のCpGサイトは非常に多く、ヒトゲノムの場合、全ゲノム配列の1%程度を占める(約3000万箇所)。シーケンサーの低コスト化により、すべてのCpGサイトのシトシンメチル化状態を検出するバイサルファイト法(非メチル化シトシンをウラシルに変換することでメチル化シトシンとの違いを明確化する方法)を低コストで実施することが可能になった。この結果、例えば、世代ごとにCpGサイトのシトシンメチル化が変化する率は、塩基が変異する率よりも3桁近くも高く、生物が環境に適応する能力を高めていること、重要な発生関連遺伝子をコードするゲノム領域の多くは、低メチル化かつヒストンH3の27番目のリジンがメチル化されることで初期胚における発現が抑えられており、細胞運命決定が進む過程で高メチル化へと変化し発生関連遺伝子が転写されるようになるという現象が発見されている。バイサルファイト処理を使う場合、シトシンメチル化判定にはパーソナルゲノム解読と同じぐらいのリード量(ゲノムを30倍程度被覆)が必要になり、バイサルファイト処理したDNA断片を解読したリードはゲノム上に高速にアラインメントする必要がある。世界各国でエピゲノムに関する国家(間)プロジェクトが開始されており、米国(NIHによるロードマップ計画)、EU(BLUEPRINT3)の他、イタリアで2011年から、ドイツでは2012年から2017年の研究計画(DEEP)が公表されている。また、韓国においてはKNIHによる計画が2012年から開始されている。

エピゲノムや転写因子の局在を1次元のゲノム情報の上にマッピングすると、遺伝子の抑制と活性化に働く修飾が異なる場所に存在していることがわかる。このすみ分けがうまくできていることにより、発現する遺伝子と発現しない遺伝子の分別と継承行われる。しかしながら、これらの標識は必ずしも安定に保持されるわけではなく、むしろダイナミックに変化しつつ定常状態として維持されることがわかってきた。実際の細胞核中では、1次元的にはゲノム上の距離が離れているにもかかわらず、ループ構造を作ることで2つの領域が空間的に近接して存在したり、近傍にあるにもかかわらず空間的に離れて存在したりする場合がある。このような空間局在性は、転写因子間の結合や転写そのものに影響される場合もあるが、2本のDNAをつなぎ留めるタンパク質も寄与すると考えられている。したがって、遺伝子発現の制御機構を理解するためには、転写因子やエピゲノム情報のみならず、細胞核内の高次構造を知ることやその制御機構を解明することが重要である。

細胞核内の遺伝子制御機構を解明するためには、ゲノム配列、転写因子、エピゲノム状態、空間配置と凝縮状態、さらには核内構造体の役割、分子動態等を統合的に理解する必要があるとの機運が高まり、細胞核の包括的な理解という意味で「ヌクレオーム(Nucleome)」という概念が形成された⁶⁾。

エピゲノムに着目した創薬開発も進められており、骨髄異形成症候群の治療薬⁷⁾が米国で2004年に上市された(azacytidine、DNAメチル化阻害薬:米国Celgene社が開発;日本では日本新薬⁸⁾がライセンス生産し、2011年に日本でも承認)。他にも皮膚T細胞リンパ腫

の治療薬 vorinostat、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬：米国 Merck 社が開発し 2006 年に FDA 承認；日本では大鵬薬品が 2011 年 7 月に承認を取得）が上市されている。

エピゲノム構造の解析により、ヒトゲノムの非コード領域が個人の多様性を決定する上で極めて重要であることが明らかになってきた（SNPs の大部分は非コード領域に存在する）。このように、非コード領域の役割を理解するためにはエピゲノム解析は重要であり、ヒトの疾患、老化の本質的な理解とともに、治療戦略、創薬の上でも鍵となると認識されている。

エピゲノム解析を単一細胞レベルで行う技術の開発も進んでいる。クロマチンのアクセシビリティを検出する ATAC-seq^{9,10)}、クロマチン高次構造を検出する Hi-C^{11,12)}、ヌクレオソームの位置を検出する MNase-seq¹³⁾ も単一細胞解析への最適化が行われている。一方、ゲノムワイドなヒストン修飾状態や転写因子の結合の解析には ChIP-seq が広く用いられてきた。ChIP-seq の単一細胞解析への応用としてドロップレットを用いた手法が報告されている¹⁴⁾。さらには免疫沈降を伴わない手法の開発が行われ、カルシウム依存性エンドヌクレアーゼ Micrococcal nuclease (MNase) を結合させた抗体により特定のゲノム領域を切断、回収する CUT&RUN¹⁵⁾、抗体に結合させたオリゴ DNA を Tn5 トランスポザラーゼにより近傍のゲノムへと挿入する ChIL-seq¹⁶⁾ が報告された。特に ChIL-seq は抗体による単一細胞エピゲノム解析を達成した唯一の国産の解析法である。現在、ヒストン修飾抗体の特異性に関する包括的データベースの作成¹⁷⁾ や、NIH のプログラムの一環として転写因子に対する免疫沈降グレードのモノクローナル抗体の大規模な樹立、バリデーションが行われる¹⁸⁾ 等、抗体の作成と選択を促す試みが進められており、多種多様なエピゲノム解析が発展する土壌形成が行われている。これらの技術開発は米国が圧倒的に主導している。本領域の応用研究はいずれも発展途上といえる。

【RNA】

RNA 研究は、古典的な RNA (mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA) に加え、近年ではタンパク質をコードしないとされる non-coding RNA (ncRNA) に関する研究が精力的に進められている。ncRNA は極めて多様性に富む生体分子群であるが、大別すると、① 20 ~ 30 塩基程度の鎖長の small RNA、② 200 塩基を超える鎖長の long ncRNA の 2 つのグループに分けられる^{19,20)}。

① small RNA

small RNA 研究は 1998 年の RNA 干渉の発見に端を発する。small RNA のうち、二本鎖構造の small interfering RNA (siRNA) は mRNA の分解 (RNA 干渉) を、一本鎖構造の microRNA (miRNA) は mRNA の翻訳阻害を引き起こすことが明らかとなり、RNAサイレンシングと総称される。これら small RNA による遺伝子発現抑制機構の分子メカニズムの理解は急速に進みつつある。これらは「アルゴノート」と呼ばれる共通タンパク質と共に RISC という作動装置を形成し、翻訳制御、mRNA の安定性制御、クロマチン制御を抑制する制御因子群であることが明らかにされた。現在では、RISC 構築機構全貌の理解、small RNA が関わる様々な生理現象や疾患メカニズムの理解に向けた研究が拡張を続けている。

医療応用研究も世界中で進められており、siRNA の糖鎖 (GalNAc) 修飾などの基盤技術が整えられつつあるが、依然として高効率な DDS や、生体内での高効率化のための化学修飾デザインなど複数の技術的ボトルネックが顕在化している。この他には生殖細胞のゲノムをトランスポゾンによる卵・精子形成異常から守る PIWI-interactingRNA (piRNA) に関しても我

が国の研究者による研究が積極的に積み重ねられている。

リキッドバイオプシーの一環として、体液に含まれるエクソソーム中の microRNA のプロファイリングをバイオマーカーに用いようとする試みも我が国で大規模に進められている。また、「原核生物における RNA 干渉」とも言える、CRISPR/Cas9 システムも RNA 生物学としては非常に大きなトピックである。

Small RNA 研究では、米国、欧州、韓国とともに我が国の研究者が先導的な成果を上げ、その発展に大きく貢献してきた²¹⁾。

② long ncRNA

数百塩基を超える long ncRNA については、ヒトのゲノムから少なくとも 20000 種類を超える膨大な種類が転写されていると言われている。タンパク質をコードする遺伝子の種差はほとんど無いが、ncRNA は種差が大きく、進化における生物の複雑性や種特異的機能の獲得に重要な役割を果たしていると考えられている。また、近年の疾患シーケンスの結果から、様々な疾患において long ncRNA に特異的な変異が入っており、それに伴うエピゲノムの変化が異常な遺伝子発現制御の原因になっていることが示唆されている。がんをはじめとした多数の lncRNA の疾患への関与例が多数報告され、さらにはゲノム編集技術を用いて lncRNA の機能性が網羅的にスクリーニングされ、多数の lncRNA の細胞腫特異的な機能性が確認され、lncRNA の持つポテンシャルが再確認された。long ncRNA はすでに知られているエピゲノム制御や細胞内構造体形成のみならず、多彩な生命現象と関係しているものと予想される。

古典的 RNA 生物学と最新知見の融合分野研究が進められている。ncRNA についての最新の知見が蓄積していく中で、わが国が伝統的な強みを持つ翻訳やスプライシングといった古典的な RNA 生物学が再び大きな脚光を集めている。例えば、ncRNA の 1 つである microRNA は、標的 mRNA からの翻訳開始を阻害すると同時に、標的 mRNA の poly-A 鎖を分解しその安定性を下げるという 2 重の作用様式によって、標的 mRNA からのタンパク質合成を抑制することが知られている。このように、ncRNA の働きを解明するためには、翻訳をはじめとした古典的な RNA が関与する様々な過程を、最新の知見をふまえて正しく理解することが不可欠であると言える。また、コドンの新たな意味づけ (mRNA 安定化に関係)、リボソーム品質管理、RNA 修飾など、古典的な RNA が関与する様々な過程において新たな発見がなされており、リボソームプロファイリングといった革新的な解析技術は新旧 RNA 研究を大きく加速させている。なお、ncRNA と mRNA の境界は極めて曖昧である。例えば、long ncRNA として同定されていたものが、実は非常に短いペプチドをコードしており、そのペプチドが生理活性を有している例がいくつも報告されている^{22,23)}。一方、タンパク質をコードする mRNA 遺伝子のイントロン部分には、多数の microRNA が含まれていることもよく知られている。また、mRNA のスプライシング異常によって「ncRNA 化」した異常な mRNA は、リボソームの品質管理機構によって速やかに排除されるが、long ncRNA には品質管理機構による分解を免れているものも多い。さらに特殊なスプライシングを受けて環状化し安定化した long ncRNA が、microRNA を効率よくトラップする「スポンジ」として働いている例も知られている²⁴⁾。

したがって、mRNA か ncRNA か、あるいは small RNA か long ncRNA か、という様な画一的な分けにとらわれず、それらの複雑で巧みな関係を正しく理解することが重要である。

動物個体を用いた lncRNA 変異体の表現型解析が本格化しており、生理機能も徐々に明ら

かになっている²⁵⁾。現時点では、大多数の lncRNA は未だ手つかずの状態であり、上記最先端技術による今後の解析によって、「lncRNA ならでは」の作用機序や生理機能の理解が進み、ゲノムの広範な領域から生み出される lncRNA による新しい遺伝ルールの解明につながることで大いに期待される。

mRNA や lncRNA に多数の m6A 修飾が付加され、スプライシング、mRNA 安定性、mRNA 輸送、翻訳の制御に大きな役割を果していることが示された²⁶⁾。また lncRNA の機能にもこの修飾が必要であることが報告された。m6A 修飾を介した制御が、がんなどの疾患、性決定、生物時計などの重要な生理現象に関わっていることも報告されている。m6A 修飾制御は、メチル化と脱メチル化のバランスによって決定される動的なものであるというエピトランスクリプトミクス説と、一度付加されたメチル化は変動しにくいという説が相反した状態にある²⁶⁾。

RNA 制御には、共通して多数の RNA 結合タンパク質 (RBP) が関与し、ヒトでは 1500 種類ほどが存在している。米国の ENCODE 関連プロジェクトでは、eCLIP、ゲノム編集、次世代シーケンスなどの先端技術を駆使して、各 RBP の結合 RNA 配列、細胞内局在、トランスクリプトームへの影響を網羅的に解析するプロジェクトが進行しており、RNA 研究の有用なリソースとなると考えられる²⁷⁾。しかし一方で、各 RBP の結合特異性は一見明瞭でない場合が多く、細胞内での特異性獲得の詳細な機構は未だ完全には理解されていない。さらに、制御因子としての RNA 結合タンパク質が誘発する液体相分離現象による RNA を起点とした局所的な細胞内環境の形成原理が注目されている。

RNA 生物学の応用研究も近年盛り上がりを見せている。スプライシングを人為的に改変すること²⁸⁾によって難病の神経筋疾患治療を可能にしたアンチセンス核酸、脊髄性筋萎縮症治療薬ヌシネルセンが米国 FDA で初めて認可され、RNA を標的とした核酸医学の扉を開いた。依然デリバリーと副作用の問題は残るが、今後これに続く治療法の開発が急速に進むと考えられる。一方で、スプライシング関連タンパク質を低分子化合物で機能制御し、スプライシング異常に起因した神経疾患を治療しようとする応用研究も我が国を含めて成果が上がりつつある。

米国、中国、韓国、欧州では政府機関直轄の RNA 研究拠点が設立され、特に重要な研究領域として強力に推進されている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

- 単一細胞シーケンシング技術の急速な発展により、現在では単一細胞から 2 つ以上の情報を同時に取得する単一細胞マルチオミクス技術の報告が相次いでおり、今後しばらくの技術開発のトレンドとなることが予想される。例えば、CITE-seq²⁹⁾ ではタンパク質情報の「核酸化」によりタンパク質とトランスクリプトームの同時定量が可能となった。この手法では、poly-A を含むオリゴ DNA を結合させた抗体を細胞に反応させ、単一細胞 RNA-seq のプラットフォームにおいて mRNA とともに抗体結合オリゴを定量する。scCOOL-seq³⁰⁾ は、細胞内での DNA CpG のメチル化状態と GpC メチル化酵素によるオープンクロマチン領域のマーキングを bisulfite sequencing により同時解析する。sci-CAR³¹⁾ では、逆転写プライマーや Tn5 トランスポザラーゼによる indexing と split-and-

pool PCR による indexing を組み合わせることにより、数千の同一細胞からの ATAC-seq と cDNA ライブラリーの同時構築を可能とした。この indexing の組み合わせによる multiplexing 法は他のマルチオミクス技術にも原理上応用可能であるため、今後の単一細胞解析のハイスループット化において重要な概念となると考えられる。

- 米国 10x Genomics 社の Chromium システムというドロップレットベースの単一細胞解析プラットフォームの開発が進んでいる。マイクロ流路装置から試薬類、解析ソフトウェアまでをパッケージ化しており、国内でもいくつかの研究機関において導入されている。また、Chromium システムをベースにした単一細胞 ATAC-seq キットの販売が既に開始されており、さらには米 BioLegend 社とともに「TotalSeq」という名称でオリゴ結合抗体等の CITE-seq 用キットの販売が予定されている。
- CRISPR/Cas9 はその操作性、簡便性、フレキシビリティから、現在では遺伝子改変マウス作成等におけるゲノム編集ツールの第一選択になりつつある。さらには、DNA 切断活性を持たない dCas9 と DNA・ヒストン修飾酵素との結合によるエピゲノム編集³²⁾、遺伝子の核内局在やクロマチン高次構造の編集^{33,34)}、特定のゲノム領域の可視化への応用³⁵⁾、cell barcoding による lineage tracing³⁶⁾ など幅広いアプリケーションに応用されており、現在のゲノム、エピゲノム研究において欠くことのできないツールとなっている。
- クロマチン高次構造解析のスタンダードである、いわゆる 3C 系アッセイに代わる技術の報告が増えつつある。例として、核の凍結超薄切片を用いた GAM³⁷⁾、multiplexing 法に用いられる split-and-pool の概念を応用した SPRITE³⁸⁾、Tn5 トランスポザターゼを利用した TRAC-looping³⁹⁾ 等がある。これらの新技術は、いずれも「in situ でのゲノムの制限酵素切断とライゲーション」という 3C 系アッセイの原則とは別の動作原理に基づいている。また、次世代シーケンサーをベースにした解析法とは別のアプローチとして、連続的 smFISH と超高解像度顕微鏡の組み合わせによりクロマチン高次構造を可視化する試みも報告されている⁴⁰⁾。多くの RBP が有する天然変性領域同士が、複雑な相互作用ネットワークを形成して相分離した液滴を形成する現象 (LLPS) が挙げられる。この LLPS は、細胞内に存在する膜構造を持たない顆粒状構造体形成の原動力になっており、細胞内での特定因子の空間的隔離、またその内部での特定の化学反応の促進などの機能が提唱されており、新しい生体分子の局所化機構として注目を集めている⁴¹⁾。特にこの LLPS では、RNA が重要な役割を果たしており、特定の RNA が合成されることによって、そこに RBP が集約されて LLPS が誘発され、一方で RNA の分解によってそれが解消される動的な制御環境形成が細胞内で局所的に起こっており、多彩な生理現象に関わっている可能性があり、今後の研究が大いに期待される。
- 一本鎖の RNA は柔軟に高次構造を形成し、その構造が相互作用因子によって認識され、作動装置としての RNA-タンパク質複合体が形成される。この RNA 高次構造を RNA の化学修飾あるいは架橋と次世代シーケンスを組み合わせるゲノムワイドにマッピングする手法 (例: SHAPE, PARIS) が複数考案され、RNA 構造情報が収集され始めた。一方、RNA と相互作用するタンパク質の結合部位のマッピング法 (eCLIP) が簡便化され、米国の ENCODE プロジェクトの一環として体系的に実施され、膨大な情報が蓄積しつつある²⁷⁾。この RNA 構造とタンパク質相互作用部位の情報を組み合わせることによって、細胞内 RNA の挙動とそれを規定する規則性の理解につながると考えられる。

- 2018年になって遺伝性 ATTR アミロイドーシスの RNA 干渉治療薬パティシランが初めて FDA 認可され、RNA 干渉創薬開発に弾みがつくことが期待される。また RNA と低分子化合物の直接相互作用の研究が盛んになり、RNA・タンパク質、RNA-RNA 相互作用を低分子化合物で阻害する試みが試行されている。こうした RNA モチーフは、バクテリアでリボスイッチとして盛んに研究されてきたが、最近でヒトの RNA に結合する化合物スクリーニングが産学双方で盛んに行われ、我が国でも神経疾患関連のリポート配列由来 RNA に結合する化合物が得られており、低分子化合物と RNA の相互作用は今後の注目すべき創薬シーズとなることが期待される。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

- 2010年に1,000の標準エピゲノムの決定を目標とした国際ヒトゲノムコンソーシアム (International Human Epigenome Consortium (IHEC)) が発足し、測定プロトコルの標準化、データベース構築とデータ公開が図られている。日本も2011年から当該コンソーシアムに参加し、データ提供などを実施している。本コンソーシアムには日本の他、米国、EU、韓国、ドイツ、カナダ、イタリアが参加している。
 - 米国では、NIH 傘下の複数の疾患研究所での共通した取り組みとして2007年からエピゲノム研究 (ロードマップ計画) を開始し、IHEC の一環としての標準エピゲノムの決定に加え、技術開発、様々な疾患の本態解明と治療開発の研究¹⁹⁾ が行われており、エピゲノム分野でも世界をリードする状況にある。2008年から2013年までに1億9千万ドルの投資を行った。このプロジェクトでは、正常状態と疾患の状態のエピゲノムを比較検証してマップ化し、生命現象や疾患本態の解明に活用することを目的とした。
 - EU BLUEPRINT 計画
EU の研究により支援され IHEC に参加する研究チーム。NIH ロードマップと同様にヒトの疾患に関連したエピゲノムを扱うが、血液が関与する疾患 (白血病や免疫応答など) を中心に血液細胞のエピゲノムマップ作成、この結果を応用してこれらの疾患に関連するバイオマーカーの特定・開発を目的としている。EU 域内の41研究機関が参加するとともに企業も協力している。2011年に開始され、2016年4月までの計画。予算は約4千万ユーロ (うち EU 負担分は3千万ユーロ)。
 - エピゲノムに関連する研究交流を促進するため、2006年12月に日本エピジェネティクス研究会が設立されている。CREST の研究課題から IHEC に参加している他、エピゲノムの制御基板の解明、疾患の本体解明と治療開発に向けた研究など幅広い分野での取り組みが見られる。
- 英国では、公的助成機関 O Medical Research Council (MRC)、Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) など) に加えて、Cancer Research UK、Wellcome TRUST など民間からの助成も英国のエピゲノム研究のおよそ10%を占めるなど積極的に支援が行われている。
- 4D nucleome project : 2015年に米国 NIH の「Common Fund」として予算化された。2018年予算だけで約2千万ドルという大型研究費である。「4D nucleome」とは、3次元空間 + 時間で「4D」、核を意味する「Nucleus」に全てを意味する「-ome」を付加し「Nucleome」となっており、核内におけるゲノムの時空間的制御機構を包括的に理解し

ようという試みである。3C系アッセイによるクロマチン高次構造解析、イメージング解析、ポリマーシミュレーション等の数理モデリングを含む多角的なアプローチによる解析、技術開発をサポートし、数多くの成果を挙げている。また、解析に用いるセルライン、データフォーマット、専門用語等の共通化、標準化を進める他、ポータルサイトでは承認された実験プロトコルを公開し、プログラムの支援を受けた論文に関しては学術誌への投稿前に bioRxiv などのプレプリントサーバーにアップロードする方針をとる等、透明性、オープン性を重視している。なお、欧州でも同様のプロジェクトとして 4DNucleome Initiative in Europe、LifeTime Initiative が存在している。

- 米国 ENCODE プロジェクトの中で、RBP に関する情報整備が精力的に行われている。すでに 250 種類もの RBP の特異的抗体が作成され、これを用いた各 RBP の結合部位のゲノムワイドマッピング、細胞内局在の解析、トランスクリプトームへの影響解析が、若手の気鋭研究者によって精力的に行われている。この基盤的リソース情報は、特異的な RBP によって制御されているスプライシング、RNA 安定性、翻訳などの制御機構、ncRNA 機能の理解に大きく貢献すると考えられる。
- 欧州の metaRNA ネットワーク：RNA と低分子代謝物との相互作用にフォーカスした中規模プロジェクトであり、欧州各国の 8 の先導的な RNA 研究グループが参加して、リボスイッチ、アプタマーのような機能性 RNA モチーフに注目し、一方で細胞内での代謝産物自体の研究を並行して行い、その接点としての RNA・低分子化合物の相互作用を利用したセンサーなどの RNA デバイスの開発を目指している。RNA に直接相互作用する化合物のスクリーニングは、製薬会社を含めて今後のトレンドになりつつあり、本プロジェクトから画期的な成果が生み出されることが期待できる。
- 中国科学院 (CAS) の Key Laboratory of RNA : CAS の生物物理分野の 1 つの重点領域として ncRNA が掲げられ、米国在住の著名な中国人研究者の指揮のもとで、12 名の気鋭 PI が重要な機能性 ncRNA のネットワーク解析、ncRNA と相互作用因子解析、ncRNA の生物学的機能を 3 点について多面的かつ集中的に研究する体制が組織され、論文が量産されている。
- 日本 FANTOM6 プロジェクト：理化学研究所が長年実施してきた FANTOM プロジェクトの 6 期目として、lncRNA に特化したプロジェクトが実施されている。特に各 lncRNA をアンチセンス核酸によって個別に機能阻害した結果、それによって影響を受ける遺伝子発現を理研オリジナルな CAGE-seq によって解析する研究を基軸にし、そのほかにも lncRNA とクロマチンとの相互作用を網羅的に解析する手法を開発し、エピジェネティック制御に関係する lncRNA 及び mRNA を網羅的に取得するなどの基盤的研究が大規模に展開している。FANTOM プロジェクトは発足時から、遺伝情報リソースとして国際的にも評価が高い成果を生み出してきた。
- ncRNA の機能と作動原理の理解を目指した新学術領域「非コード RNA 作用マシナリー」「ncRNA ネオタクソノミ」という領域が、一方 mRNA 制御についても「RNA 制御学」「新生鎖生物学」が 2 期に渡って継続してきており、いずれにおいても我が国オリジナルな国際的に注目される先駆的成果が数多く生み出されている。例えば、lncRNA の共通機能を指標にした機能分類を目指しており、新たな機能としての細胞内構造体の骨格機能をもつ lncRNA をオリジナルな分類群として提唱した⁴²⁾。ここでは国際連携推進事業として国際

交流が特に促進され、国内の優れた研究成果を海外に向けて発信するのに重要な役割を果たしている。またさらには、それがきっかけで海外会議に招聘される機会につながるなどの望ましい循環を生み出している。

(5) 科学技術的課題

現在のゲノム科学は、脆弱なゲノム概要配列の上になんとか立脚している。個人間のゲノムの差異、RNA-seq 技術を遺伝子発現量の定量化、エピゲノムデータの収集は、どれもゲノム配列に DNA 断片をアラインメントすることで成り立っている。しかし最も完成度の高いヒトゲノム配列でさえ解読されているのは 90% 程度である。欠けている情報としては、Alu, LINE, LTR などの繰り返し配列の分布、セントロメア、長いゲノム重複領域などある。理由は、繰り返し配列が存在するゲノム上の位置を、従来の短いシーケンシング技術では確定しにくいからである。ヒトゲノムには 10 万塩基を超えるような繰り返し配列領域が存在し、解明は当面困難であろう。典型的な例はセントロメアであり、2000 ~ 5000 塩基を単位とした配列が数千個繰り返していると考えられ、全長は数百万塩基に達する。他にも脳疾患関連の遺伝子をコードした数百万塩基の長さの領域がコピーされている場所も知られている。

単一細胞シーケンシングにおいて、1 遺伝子あたり数十~数千コピー存在する mRNA を解析する RNA-seq とは異なり、2 コピーしかないゲノムを対象とするエピゲノム解析では検出感度の向上が当面と課題と言える。例えば、最新の単一細胞 ATAC-seq 解析の報告においても 1 細胞あたり得られるリード数は数千~数万であり、ゲノムサイズを考慮するとそのカバー率は圧倒的に低い。

今後取り組むべき研究テーマとして下記のようなものが挙げられる。

単一細胞解析において、位置情報取得への試みは行われているのに対し、時間情報に対するアプローチはほとんど行われていないのが現状である。一般に、単一細胞シーケンシング解析では細胞を溶解して DNA、RNA を抽出するため、時系列データを同一細胞から得ることはできない。ただし、トランスクリプトーム解析ではヌクレオチドアナログのパルスラベル等によるアプローチは可能である⁴³⁾。よって、時間解像度に優れる (ライブセル) イメージングとの連携など異なるアプローチが求められる。一方、情報科学的アプローチとしては、Monocle⁴⁴⁾ に代表される、データの並べ替えにより擬似的に時間情報を作り出す pseudo-time reconstruction の手法、最近では RNA velocity⁴⁵⁾ のようなスナップショットのトランスクリプトームデータから時間情報を抽出するような解析手法が提案されている。

ヌクレオーム研究の機軸となるのは、(1) 顕微鏡解析、(2) ゲノム解析、(3) 情報・数理解析であるが、その中でも情報科学・数理科学分野が要である。これまでも情報科学はハードとソフトの両面から顕微鏡画像解析やゲノム解析の発展を支えてきた。これからのヌクレオーム研究の鍵となるのもまさしく情報・数理科学であり、生物科学との融合研究が期待されている。

膨大な種類の long ncRNA による生体制御機構の全体像を理解し、医療応用への道筋をつけるためには、個々の long ncRNA 分子の機能を分子・細胞・個体レベルで丁寧に解析し、その特性に応じて分類・整理した上で、体系的に研究を推進するための戦略が必要である。

1. ncRNA 作用機構の全貌解明

大多数の lncRNA 中で、すでに解析の手がつけられたものはわずかであり、残りの手付かずの lncRNA の中には、これまで予想もしないような RNA 機能が隠されていることが期待される。また、すでに機能的知見が得られている small RNA も含めて ncRNA の作動装置の構造と作用機構のさらなる理解が重要である。また細胞・個体での ncRNA の機能探索を継続的に進めていくことによって、膨大な ncRNA 機能が複雑な生命現象の制御にどのように関与しているかの理解につながる。ncRNA の機能や作用ルールの解明は、これまで隠れていたゲノム機能とそれを支える新規な遺伝ルールという生物学上の本質的な理解につながる。

2. RNA による細胞内制御環境形成の理解

ヒトのタンパク質全体の約 5% を占める RNA 結合タンパク質は、特異性を持って RNA に結合してその挙動を制御する役割を果たし、またその天然変性領域を介した多価的なタンパク質間相互作用によって、液体相転移によって空間的に隔離した局所的な制御環境を構築することがわかってきた。例えば、そうした環境形成によって動的に変化するクロマチンの 3D 構造に及ぼす lncRNA の役割の理解は、今後の重要な課題である。さらに液体相分離のような新しい原理に基づいた環境構築機構の理解とそれに依存した生化学的反応と生理学的機能を紐付けして、この現象の生物学的意義を理解することが、細胞内の新しい制御コンセプトの確立につながる。

3. タンパク質合成過程における RNA 制御の複雑性と精密性の理解

解析技術の進展に伴って明らかになってきた RNA プロセッシング、輸送、翻訳の各段階の複雑性とそれを支える品質管理の機構を、さらに深部まで理解することによって、複雑な生命現象を支える RNA 制御の重要性の理解につながる。

(6) その他の課題

● 基礎研究から応用技術開発への橋渡し体制の整備

最近 FDA によって認可されたアンチセンス核酸によるスプライシング改変を介した脊髄性筋萎縮症治療薬は、もともとスプライシング研究のパイオニアであった基礎研究者が、長年のノウハウを駆使して成し遂げた偉業である。また同じく FDA 認可までにこぎつけた RNA 干渉治療薬開発も、RNA 干渉現象の発見から 20 年かけて成し遂げられたものである。このように、基礎研究者が自ら発見・構築したオリジナルな知見や技術を重視し、それを実用化に向けて、長い時間をかけてシームレスにサポートする体制が必要である。応用研究者と基礎研究者の認識のギャップは常に存在するものなので、双方の重要性を理解しマッチングするような「目利き」の人材育成が我が国独自の医薬品開発を推進するために重要であろう。患者由来サンプルなどヒト検体の活用は、本領域の発展において不可欠である。一方で、倫理申請等の手続きが機関ごとに細分化されているため、許諾に時間がかかり、かつデータへのアクセスも容易ではなく、海外と比べても明らかに立ち遅れた状況にある。法的な整備も含めた国レベルでのシステムの整備は喫緊の課題である。

● オリジナル解析系とリソースとサポート体制の整備

次世代シーケンス、高感度質量分析、クライオ電子顕微鏡、光学イメージングなどは、生物学全体で共通の先端技術であるが、それぞれの技術を改変して、解析に特化して開発された基盤技術 (CLIP, ChIRP など) が存在する。現在の単一細胞解析、そして今後の組織・

個体レベルでの生命活動の包括的理解に向けて、トランスクリプトームやエピゲノム情報に加え、メタボローム、プロテオーム情報等を統合した「トランスオミクス」の理解が求められる⁴⁶⁾。そのためには、各種オミクスデータ量の爆発的増加への対応(インフラ含め)、研究グループ間の緊密な連携体制、分野横断的解析手法の確立が急務となる。

研究分野全体の推進のために、上記解析技術やバイオインフォマティクスのサポート、また抗体や遺伝子改変細胞株などのリソースを総合的にサポートする体制の構築が望まれる。欧米、中国、韓国では、最新鋭のサポート体制を効率化し、センター内外の研究推進に大きく貢献している。我が国でも同様の集中的研究機関の設立が望まれる。

ゲノムに限っては、東北メディカルメガバンク、理化学研究所バイオリソース研究センター、東京大学ヒトゲノム解析センター、国立遺伝学研究所など中規模の拠点の形成は行われている。しかし、今後見込まれるシーケンス量に対応できる規模はない。また、技術革新は早く、情報インフラなどは規模的にも不足することが予想される。大型研究機器(次世代シーケンサー、質量分析機など)は世代交代が早く、高価である上に、メンテナンスや運用、データ解析において高度な専門知識を要する。これらは単独のラボで対応可能なレベルを大きく越えており、機器およびデータ解析環境の双方における大規模集約化が必要となり、国策としての拠点集約化が重要である。

Monocle など 1 細胞解析データを理解するためのさまざまな手法が考案、実装されている。その主導を行っているのは従来のバイオインフォマティクス分野ではなく、統計・数理を専門とする“分野外”の研究者である。現在のところ、生物系オミクス情報データは 1 解析当たりのデータ量が多いのに対して、解析コストの制約から解析件数は限られており、deep learning 等人工知能が活躍する場は限られている。今後、海外と連携し、データベースの活用が進んだ際に国内の人工知能研究者等が参入しやすい状況を予め整備しておくことが肝要と考える。また臨床応用に当たって、ゲノム解析、特に情報分野の人材不足が深刻である。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↑	分子生物学初期から RNA 研究には伝統的な強みがあり、ncRNA 研究についてもそこで培われた重厚な研究スタイルを生かした多くの独創的な研究が国際的に高く評価されている。特に文科省新学術領域の継続的サポートが、本分野推進の大きな原動力になっている。一方で米国に比べて研究層は薄く、また爆発的に発展しつつある中国の動向を考えると、すでに実績ある日本独自の研究を継続的にサポートし、次世代に向けて発展させていく体制作りと人材育成が重要な課題である。また FANTOM のような大型プロジェクトで構築されたリソースを国内研究者が有効利用して先駆的基礎研究に効率的に結びつける道筋の整備も重要であろう。
	応用研究・開発	○	→	NEDO/AMED プロジェクトによって推進された血中エクソソーム内マイクロ RNA による癌診断法は先導的な成果である。また機能性アプタマー、核酸や化合物によるスプライシング病治療では、独創的な応用研究が成果に結びつきつつある。一方で日本独自の優れた基礎研究成果を応用に向けて有機的につなげて行く試み自体ほとんど存在しない。オリジナルな応用研究のシーズを探索する試みは、産官学連携の名目で実施されているが、基礎と応用の守備範囲のギャップを埋めることに成功していない。リスクの許容、優れたシーズを見極めるセンス、最終的な実用化までを想定した息の長い研究体制を整備するなど多くの課題が存在する。製薬企業では化合物と相互作用する RNA を模索するなど、基礎研究に根ざした新しい RNA 創薬への展開を目指している動きもあり、今後の本格的な産学連携体制の整備が望まれる。
米国	基礎研究	◎	→	世界中から一流の研究者が集まり、依然として RNA 研究の先端をリードしている。研究者の層が厚く、先駆的知見の獲得にとどまらず、その知見を補完し拡張していく二次的な動きが迅速であり、新しい研究分野の構築に至らせる力強さと精密さを兼ね備えている。以前からマサチューセッツ大、カリフォルニア大、ニューヨーク大、ケースウェスタンリザーブ大などに RNA に特化した研究所が設立されており、RNA 研究を多面的かつ集中的に行うことによって様々な先駆的な成果が生まれ、応用研究に向けた産学連携の拠点としても機能している。
	応用研究・開発	◎	→	基礎研究によって生み出された基盤的成果の中から様々な形での応用を想定したシーズを選定し、速やかにベンチャー企業等に委譲し、効率よく実用化を目指す枠組みがうまく機能している。基礎研究者はベンチャー企業のアドバイザーの役割を果たすことで互いに有益な関係性を確保し、大多数の若手研究者の受け皿としても機能している。
欧州	基礎研究	◎	→	日本と同様、伝統的な強みを生かした新しい独創的な研究が進められている。日本の新学術領域程度の中規模のグループ грант (RNATRIN, MetaRNA など) で、RNA 生物学のホットトピックスを選びすぐりの研究グループで集中的に研究する体制が生まれ、高い成果を上げている。またオーストリア科学院の元に設置された IMBA など、若手の優秀な RNA 研究者を世界中から集め、高い成果を生み出すことに成功している。
	応用研究・開発	○	→	米国ほどではないが、大手製薬企業による研究費のサポートなど、応用研究に向けた取り組みが高まっている。

中国	基礎研究	○	↗	中国科学院 (生物物理分野) の重点課題にノンコーディング RNA を挙げて、Key Laboratory を設置し、気鋭の研究者を結集させて研究費や研究環境を手厚くサポートし RNA 生物学を強力に推進している。一方で、米国在籍の指導的な中国人研究者のリーダーシップによる RNA 修飾分野に、多大な研究資金を投入し、世界をリードしている。また以前より、次世代シーケンサーやクライオ電子顕微鏡等などの最先端機器を多数整備し、豊富なマンパワーを投入するスタイルの大規模研究でも発展がめざましい。近年では、欧米の借り物ではない中国国内で生み出された独自の成果が、一流雑誌を占める数が明らかに増加しており、こうした研究体制が高い成果に結びついていると言える。一方で、成果全体を俯瞰すると未だ玉石混交であり、高いレベルにあるのは一部の卓越した機関に過ぎないと言える。
	応用研究 ・開発	○	↗	RNA 分野に限ったことではないが、国家の研究費全体に絞める応用研究費の割合は他の国に比べて極めて高い。その分、国内外で得られた多様な研究シーズを利用した応用研究に豊富な資金が投入されていると考えられ、こちらも未だ玉石混交の感は否めないが、近いうちに中国発の画期的応用技術に結びつき、その動きはさらに加速していくものと思われる。
韓国	基礎研究	○	→	国家プロジェクトとして基礎研究に特化した Institute for Basic Science という組織の一部門に Center for RNA Research が設立され、国際的に著名なリーダー研究者に牽引されて優れた RNA の基礎研究成果が生み出されている。こうした何人かのレベルの高い研究者によって独自の成果が生み出されている一方で、他国に比べると層が薄く分野にも偏りがある感が否めない。
	応用研究 ・開発	○	→	RNA 構造、機能の基盤的知見をナノテクノロジーと融合させた新規デバイスを開発する試みが盛んであり、今後独自の技術を用いた応用研究が進んでいくものと予想される。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発 (プロトタイプの開発含む)・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. Nat Methods. 2009;6 (5) :377-82.
- 2) Svensson V, Vento-Tormo R, Teichmann SA. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. Nat Protoc. 2018;13 (4) :599-604.
- 3) Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. Cell. 2015;161 (5) :1202-14.
- 4) Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. Cell. 2015;161 (5) :1187-201.
- 5) Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y, Umeda M, Danno H, Nikaido I. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nat Commun. 2018;9(1):619.
- 6) 木村 宏、佐藤 優子「ゲノム、エピゲノムからヌクレオームへ 遺伝情報発現制御機構の包括的理解に向けて」情報管理. 2017, vol. 60, no. 8, p. 555-563.
- 7) 渡邊 愛、新たな創薬アプローチとして期待される「エピゲノム創薬」(大和総研レポート) <http://www.dir.co.jp/consulting/insight/management/101013.html>

- 8) 日本新薬ホームページ 2011 年 1 月 21 日付けニュースリリース <http://www.nippon-shinyaku.co.jp/topics/ns2011/2332>
- 9) C 米 国 novich DA, Daza R, Adey A, Pliner HA, Christiansen L, Gunderson KL, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science*. 2015;348 (6237) :910-4.
- 10) Buenrostro JD, Wu B, Litzenburger UM, Ruff D, Gonzales ML, Snyder MP, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature*. 2015;523 (7561) :486-90.
- 11) Nagano T, Lubling Y, Stevens TJ, Schoenfelder S, Yaffe E, Dean W, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*. 2013;502 (7469) :59-64.
- 12) Nagano T, Lubling Y, Varnai C, Dudley C, Leung W, Baran Y, et al. Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature*. 2017;547 (7661) :61-7.
- 13) Lai B, Gao W, Cui K, Xie W, Tang Q, Jin W, et al. Principles of nucleosome organization revealed by single-cell micrococcal nuclease sequencing. *Nature*. 2018;562 (7726) :281-5.
- 14) Rotem A, Ram O, Shores N, Sperling RA, Goren A, Weitz DA, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol*. 2015;33 (11) :1165-72.
- 15) Skene PJ, Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife*. 2017;6.
- 16) Harada A. A chromatin integration labeling method enables epigenomic profiling with lower input. *Nat Cell Biol*. 2018
- 17) Rothbart SB, Dickson BM, Raab JR, Grzybowski AT, Krajewski K, Guo AH, et al. An Interactive Database for the Assessment of Histone Antibody Specificity. *Mol Cell*. 2015;59 (3) :502-11.
- 18) Venkataraman A, Yang K, Irizarry J, Mackiewicz M, Mita P, Kuang Z, et al. A toolbox of immunoprecipitation-grade monoclonal antibodies to human transcription factors. *Nat Methods*. 2018;15 (5) :330-8.
- 19) 廣瀬 哲郎, 泊 幸秀『ノンコーディング RNA: RNA 分子の全体像を俯瞰する』(京都: 化学同人, 2016)
- 20) Hirose T., Mishima Y. & Tomari Y. “Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy.” *EMBO Rep* 15, 15, 489-507 (2014) .
- 21) Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tadakuma H, Tomari Y. Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex. *Nature*. 521:533-536. (2015) doi: 10.1038/nature14254.
- 22) Kondo T. et al. “Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila embryogenesis.” *Science* 329, 5989, 336-339 (2010) .
- 23) Hanyu-Nakamura K. et al. “Drosophila Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells.” *Nature* 451, 7179, 730-3 (2008) .
- 24) Lasda E. & Parker R. “Circular RNAs: diversity of form and function.” *RNA* 20, 12, 1829-42 (2014) .
- 25) Nakagawa S. Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 1859:177-83 (2016) doi: 10.1016/j.bbagr.2015.06.011.
- 26) Meyer KD, Jaffrey SR. Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 33:319-342 (2017) doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060758.
- 27) Dominguez D, Freese P, Alexis MS, Su A, Hochman M, Palden T, Bazile C, Lambert NJ, Van Nostrand EL, Pratt GA, Yeo GW, Graveley BR, Burge CB. Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Mol Cell*. 70:854-867 (2018) e9. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.001.

- 28) Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature*. 478:123-126 (2011) doi: 10.1038/nature10485.
- 29) Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods*. 2017;14(9):865-8.
- 30) Li L, Guo F, Gao Y, Ren Y, Yuan P, Yan L, et al. Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos. *Nat Cell Biol*. 2018;20 (7) :847-58.
- 31) Cao J, C 米 国 novich DA, Ramani V, Aghamirzaie D, Pliner HA, Hill AJ, et al. Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in the 米 国 nds of single cells. *Science*. 2018;361 (6409) :1380-5.
- 32) Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, et al. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol*. 2016;34 (10) :1060-5.
- 33) Wang H, Xu X, Nguyen CM, Liu Y, Gao Y, Lin X, et al. CRISPR-Mediated Programmable 3D Genome Positioning and Nuclear Organization. *Cell*. 2018;175 (5) :1405-17 e14.
- 34) Morgan SL, Mariano NC, Bermudez A, Arruda NL, Wu F, Luo Y, et al. Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nat Commun*. 2017;8:15993.
- 35) Ma H, Tu LC, Naseri A, Chung YC, Grunwald D, Zhang S, et al. CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging. *Nat Methods*. 2018;15 (11) :928-31.
- 36) Kechschull JM, Zador AM. Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond. *Nat Methods*. 2018;15 (11) :871-9.
- 37) Beagrie RA, Scialdone A, Schueler M, Kraemer DC, Chotalia M, Xie SQ, et al. Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping. *Nature*. 2017;543 (7646) :519-24.
- 38) Quinodoz SA, Ollikainen N, Tabak B, Palla A, Schmidt JM, Detmar E, et al. Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell*. 2018;174 (3) :744-57 e24.
- 39) Lai B, Tang Q, Jin W, Hu G, Wangsa D, Cui K, et al. Trac-looping measures genome structure and chromatin accessibility. *Nat Methods*. 2018;15 (9) :741-7.
- 40) Bintu B, Mateo LJ, Su JH, Sinnott-Armstrong NA, Parker M, Kinrot S, et al. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science*. 2018;362 (6413) .
- 41) Shin Y, Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 357 pii: eaaf4382 (2017) doi: 10.1126/science.aaf4382.
- 42) Yamazaki T, Souquere S, Chujo T, Kobelke S, Chong YS, Fox AH, Bond CS, Nakagawa S, Pierron G, Hirose T. Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol Cell*. 70:1038-1053 (2018) e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.019.
- 43) Schofield JA, Duffy EE, Kiefer L, Sullivan MC, Simon MD. TimeLapse-seq: adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding. *Nat Methods*. 2018;15 (3) :221-5.
- 44) Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, Pokharel P, Li S, Morse M, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32 (4) :381-6.
- 45) La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, et al. RNA velocity of single cells. *Nature*. 2018;560 (7719) :494-8.

- 46) Yugi K, Kubota H, Hatano A, Kuroda S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. Trends Biotechnol. 2016;34 (4) :276-90.

2.1.2 ゲノム編集

(1) 研究開発領域の定義

ゲノム編集 (Genome Editing) は、DNA 切断酵素 (DNA ヌクレアーゼ) を用いて標的遺伝子へ塩基配列特異的に二本鎖 DNA 切断 (DSB: Double Strand Break) を誘導し、その修復過程を利用して正確に遺伝子を改変する技術である。微生物、動物や植物など生物種を選ばないこと、様々な遺伝子改変が可能であることから次世代のバイオテクノロジーと位置づけられている。DNA の切断による編集のみならず、DNA 修飾タンパクなどの機能ドメイン結合による配列特異的な修飾など新たな発展技術の開発も進展しており、ゲノム編集は今後のライフサイエンス研究において不可欠な技術として注目されている。

(2) キーワード

DNA 切断酵素、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、一塩基改変、バイオ燃料、品種改良、疾患モデル、遺伝子治療

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ゲノムは個々の生物がその DNA 上に有する遺伝情報の総体である。このゲノムを自在に改変することが可能となれば、理論上では設計通りの遺伝情報を有する生物を得られることになる。ゲノム編集は、これまで一部のモデル生物に限られた標的遺伝子の改変を、原理的には全ての生物種を対象として可能にする技術である。簡便なゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システム (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated protein 9) が開発された 2012 年以降は、様々な生物を対象として遺伝子改変研究を行うことが可能となった。ゲノム編集では、挿入・欠失変異導入により遺伝子機能を欠損させる遺伝子ノックアウト、外来 DNA を挿入する遺伝子ノックインや、染色体レベルの改変 (大きな欠失、逆位や転座) も制御可能である。ゲノム編集を用いた遺伝子改変の成功例は微生物から動物、植物など様々な生物種を対象として世界中から報告されており、生命現象解明のような基礎研究から応用研究への展開が期待されている。特に応用研究では、高機能物質を効率的に産生する微生物 (藻類など) の作出や農水畜産物の品種改良に有用である。また遺伝子ノックアウトでは、外来 DNA の挿入を伴わない、自然突然変異で起こりうる変異と判別できない変異の導入により遺伝子機能を破壊することも可能である。疾患研究では、iPS 細胞など再生医療に必要な細胞の改変や遺伝子治療への利用が視野に入っている。

この他にも、ゲノム編集の基盤となる DNA 塩基配列の特異的な認識・結合能を活用した派生技術の開発も盛んである。詳細は後述するが、例えば DNA 切断ドメインの代わりに様々な機能ドメインを連結した新たな人工因子の作製が進められており、狙った遺伝子座でのエピゲノム状態 (DNA やヒストンのメチル化やアセチル化) の改変、DNA 標識など発展技術への利用が可能である。また、CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーを用いた機能因子のスクリーニング法は、未知の因子の探索に利用される優れた技術であり、がん関連因子の同定や遺伝子の転写調節領域の探索などの分野で成果が挙げられている。

[研究開発の動向]

20世紀中頃、DNAリガーゼ、制限酵素など遺伝子工学における重要な発見が相次いでなされ、遺伝子組換え技術は大きく発展した。しかし、その適用範囲は一部の生物に限られており、適用可能なDNA配列、正確性に関しても制限があったことから、より簡便で汎用的な手法開発が長らく求められていた。そういった中で、DNAを特定の位置で切断可能な部位特異的人工ヌクレアーゼが開発され、ゲノム編集技術開発の端緒となった。代表的なものとしてZFN (Zinc finger nuclease)、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) がある。これらはそれぞれDNA結合ドメインとして、Zinc-fingerタンパク質、Transcription activator-like effectorタンパク質を用い、これに制限酵素FokIのDNA切断ドメインを連結させた人工ヌクレアーゼである。これらの開発により正確性の問題は大きく改善されたが、標的DNA配列ごとに対応するタンパク質を作製する必要があり、多くのノウハウ、時間や労力を要するといった課題が残った。その後2012年には新たにCRISPR/Cas9システムが報告され世界中でゲノム編集技術が活用、改良されるきっかけとなった¹⁾。CRISPRは1987年、石野良純教授(九州大学)らによって、大腸菌のDNAにて見出された反復クラスター配列であり、細菌を攻撃してきたウイルスの情報を記憶する免疫獲得機構として機能していることが後に明らかとなった。CRISPR/Cas9システムの特徴としては、前者2種がDNA認識メカニズムとしてDNA結合タンパク質を用いていたのに対し、CRISPR/Cas9システムではRNAをガイドとしてDNA配列を認識することにある。RNAをガイドとして用いることで編集ツールの設計が容易に行えるようになり、その簡便さ・効率の高さから多くの研究者に衝撃を与え、その簡便性と効率性から、一般的なゲノム編集ツールとなった。一方、CRISPR/Cas9システムでは標的配列にPAM (Protospacer adjacent motif) 配列とよばれる認識配列が必要であり、これが標的配列を選択する制限となっていた。そのため国内外の研究者が、CRISPR関連の立体構造情報を元にしたアミノ酸改変によって、PAM配列の特異性を变化させた変異体や結合特異性を上昇させたCas9変異体の開発を競って進めている。また、新しいCasタンパク質の探索が精力的に進められており、中でもCpf1 (Cas12a)はPAMの特異性が異なることに加え、分子量が小さいことから遺伝子治療用のベクターに容易に搭載できるDNAヌクレアーゼとして注目されている²⁾。Cas9のPAM特異性を定向進化によって作製したxCas9のPAMは、これまでのSpCas9の5'-NGG-3'から5'-NG-3'に改良され、標的配列の制限がほぼなくなったと言える³⁾。国内においてもゲノム編集ツールの改良は進みつつあるが、全体的には海外に遅れをとっている。

また、派生技術としてCRISPR/Cas9システムで利用されるDNA切断酵素Cas9ヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインに変異を導入し、DNA切断活性を失活させたdead Cas9 (dCas9)に様々な機能ドメインを融合させた新しい人工酵素が開発されている。米国では、デアミナーゼを連結させることによって、DSBを伴わないで特異的に標的配列の塩基置換を誘導するBase editor技術が開発されている。さらに改良が加えられ、ヒトの疾患で見られるA→G変異を作り出す技術として注目されている⁴⁾。国内では、ヤツメウナギ由来の脱アミノ化酵素であるデアミナーゼをdCas9に付加したTarget-AID技術が開発されている⁵⁾。この技術を利用したイネやトマトでのゲノム編集が既に報告されている⁶⁾。さらに、dCas9に転写調節因子やエピゲノム修飾因子(ヒストンやDNAの修飾因子)を連結した人工因子を用いた標的遺伝子の効率的な発現制御が次々と報告されており、この分野の進展には目を見張るものがある。

さらに、転写活性化をより効果的にする方法として、複数の因子を集積する SAM システムや SunTag システムが開発され、人工因子を集積することによって数十倍から数百倍の効率化が実現している。

遺伝子ノックイン技術においては国内外において顕著な成果が近年報告されている。新規の国産遺伝子ノックイン技術としては、40 塩基対程度のマイクロホモロジーアームを利用した PITCh 法や ssONA (single-stranded oligodeoxynucleotide) を介して長鎖 DNA を挿入する 2H2OP 法、一本鎖長鎖 DNA を利用した Easi-CRISPR 法が開発され、海外からも注目されている。海外では、NHEJ (non-homologous end joining) 修復経路を利用した効率的かつ正確な HITI 法が開発され注目されている⁷⁾。この手法は相同組換え活性が低い非分裂細胞においてノックインが困難であった点を克服すると共に、挿入する断片の方向を制御できる優れた方法である。さらに集積技術を利用して修復因子を効率的に作用させる LoAD システムによって、培養細胞での同時複数遺伝子座へのノックインが最近報告されている⁸⁾。

微生物では、モデル微生物でのゲノム編集技術確立に加えて、産業用微生物・細胞を用いた高機能物質生産、微細藻類の脂質生産量を向上によるバイオ燃料生産など応用分野を志向した研究開発が進められている。

農業における応用としては、米国では米国農務省がゲノム編集による外来遺伝子の挿入を伴わない遺伝子ノックアウトで作出された作物は遺伝子組換え体に相当しないとの見解を示しており、CRISPR/Cas システムにより褐色化の原因遺伝子に変異を導入、黒くならないマッシュルームなど複数の品種が既に作出されている。中国においてもゲノム編集を用いた育種が積極的に進められており、論文報告数も増加している。このような農作物に加えて、ブタやウシ、家禽に関しても、ゲノム編集技術による耐病性などを志向した育種が世界中で進められている。このようにゲノム編集を用いた遺伝子ノックアウトによって新しい品種を作出する動きが今後益々盛んになると予想されるが、国によってその規制レベルには違いが見られる。米国農務省は前述のようにゲノム編集によって遺伝子の機能を失わせただけの場合には遺伝子組み換え作物に相当せず、特に規制も必要ないとの見解を示した一方、EU においては、EU 最高裁判所は通常の遺伝子組み換え作物と同じ規制で取り扱うべき、との判決を下している。

疾患モデル細胞を作製する技術としては、一塩基置換のため一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) を利用する方法が利用されているが、効率の面から全ての細胞種に適用することは困難である。そのため、改変した標的配列近傍に相同組換えを介して薬剤耐性遺伝子をノックインした iPS 細胞を樹立し、そのクローンにおいて薬剤耐性遺伝子を削除すると共に MMEJ (microhomology-mediated end joining) によって原因変異を導入する MhAX 法が報告された⁹⁾。iPS 細胞を筆頭に様々な疾患を培養細胞で再現する研究が国内でも進みつつある。疾患モデル作製は、依然マウスを中心に進められているが、ラットでのゲノム編集研究が進むと共に、マーマウスでのゲノム編集が報告されている¹⁰⁾。国内では、これら哺乳類受精卵へエレクトロポレーションによって簡便かつ効率的にゲノム編集ツールを導入する方法の開発が活発に進められている。

CRISPR に関連した注目技術として CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーを用いた機能因子のスクリーニングがあげられる。目的の生物の全遺伝子に網羅的に対応した sgRNA を発現するレンチウイルスベクターライブラリーを作製、培養細胞へ感染させることにより、遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを得ることが可能である。これをスクリーニングに用いることで

ん化に関わる遺伝子を同定するといった利用が行われている。

疾患治療に向けた研究は、海外が中心となって進められている。様々な遺伝性疾患モデルに加えて、がんのモデルマウスの作製も進んでいる。これらのモデルマウスを用いた前臨床試験が欧米や中国で行われている。例えば高チロシン血症のモデルマウスを用いて、CRISPR システムと ssODN を静脈注射することによって原因遺伝子の一塩基変異を修正することが証明された。国内における疾患治療研究例としては、血友病 B モデルマウスにおいて AAV ベクターを用いて Cas9 を肝臓細胞で発現させるゲノム改変が可能であることが示されている¹¹⁾。

ゲノム編集を利用した遺伝子治療は、in vivo 治療と ex vivo 治療に分けられる。in vivo 治療は、体内に直接ゲノム編集ツールを導入する方法で血友病やムコ多糖症の臨床試験が進められている。一方、ex vivo 治療としては、HIV 感染における共受容体である CCR5 遺伝子を破壊した T 細胞を作製して、感染者へ移植する臨床試験や免疫チェックポイント因子を破壊した T 細胞を移植する臨床試験が、米国と中国でがん治療として実施中である。国内では疾患治療に向けたゲノム編集を用いた臨床研究に大きな進展は見られない。

ヒト受精卵でのゲノム編集の基礎研究は、中国と英国、米国で進められている。中国で3倍体の受精卵を用いた研究が行われ、その後、CRISPR/Cas9 を用いたヒト正常胚でのゲノム編集によって、ヒト初期発生に必要な遺伝子や受精などに関わる遺伝子の機能解析などが進行中である。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

● 新規ヌクレアーゼの探索、評価、開発

CRISPR/Cas システムにおいてヌクレアーゼとして現在広く使われているのは Cas9 であるが、PAM 配列の制限と特異性の面で問題点も指摘されている。そのため遺伝子治療などの安全性を重視する研究のために、PAM の改変と特異性を向上した新しい Cas ヌクレアーゼの開発が世界中で進行している。例えば、結合特異性を高めた変異体が、PAM を改変した xCas9³⁾ が米国や韓国の研究グループから報告されている。国内においても同様の新技术が報告¹²⁾ されており、国産技術として発展することが期待される。

● DNA を切断しない人工酵素を利用した塩基改変技術

DNA の塩基を脱アミノ化する酵素 (デアミナーゼ) を利用したゲノム編集技術が、米国および日本から報告され、CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用を回避する技術として注目されている。米国のグループは自在に標的の塩基を改変する Base Editor 技術を日本からは Target AID 技術が、目的遺伝子の塩基改変技術として報告され、培養細胞や生物個体での塩基改変が実証されている。今後、遺伝子治療等安全性を重視する研究においてこの技術が重要となることが予想される。

● 核酸検出技術

ゲノム編集技術を利用して微量の核酸を検出する技術が開発され、大きく注目されている。臨床現場で血液や尿、糞便から含まれるウイルスや細菌を高感度に検出する技術であり、特殊な装置を必要とせず、短時間に検出できるシステムである。米国の2つの研究グループで基礎技術が開発され、既にこの技術を利用したベンチャー企業が設立されている^{13), 14)}。

● CRISPR/Cas sgRNA ライブラリー技術

全遺伝子を対象とした sgRNA をもつレンチウイルスベクターを利用したシステムで、遺伝子改変を網羅的に行う技術である。CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーによって遺伝子の網羅的機能解析、がん関連遺伝子の探索、遺伝子の転写調節領域の解析など基礎研究から応用分野での研究に急速に利用が広がっている。今後、この技術を利用した機能分子の探索がスタンダードになる可能性がある。現在は海外を中心とした研究が進むが、国内の研究においても利用開始されてきている。

● ゲノム編集による遺伝子治療

ゲノム編集治療では、in vivo 治療と ex vivo 治療が海外で進行中である。in vivo 治療では血友病に対する臨床試験が進行中であり、ムコ多糖症についても米国で開始された。一方、ex vivo 治療では、ZFN を用いたゲノム編集によって HIV 耐性細胞を作製し、これを用いた臨床試験が成功していると報告されている。さらに、ゲノム編集で作製した CAR-T 細胞や PD-1 を破壊した T 細胞を用いて、がん治療を目的としたゲノム編集の臨床研究が米国と中国で進められている。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

● 内閣府の戦略的イノベーション創造プロジェクト (SIP)

農水畜産物のゲノム編集基礎技術開発、標的遺伝子探索、有用品種作出、社会受容の検討を含めた府省連携の SIP の中で平成 26 年度から 5 年間のプロジェクトとして進められている。研究目標では新たな育種技術の改良・開発が盛り込まれており、神戸大学の Target-AID 技術などいくつかの技術が開発され、筑波大学におけるトマトなどでの実施例も示されている。

● NEDO スマートセルプロジェクト

スマートセルプロジェクトの中で国産ゲノム編集技術開発が平成 28 年度から 5 年間のプロジェクトとして進められている。核酸結合ドメインである PPR モチーフを利用したわが国発の核酸改変技術研究が九州大学と九大発ベンチャーによって進められ、産業分野での植物改変に使用可能な基礎技術の開発検討が行われている。ゲノム編集ツールの基本特許のほとんどが海外特許であるため、このプロジェクトでの成果に対する国内産業からの期待は大きい。

● AMED 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業

プロジェクトの一環として、立体構造解析のデータを元に CRISPR/Cas9 システムで利用される Cas9 ヌクレアーゼのコンパクト化、高活性化や PAM 要求性の改変、効率的なデリバリーの達成などが目指されている。既にコンパクトな Cas ヌクレアーゼの作製に成功しており、ベンチャー企業も設立されている。

● JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (OPERA) プロジェクト

複数のゲノム編集の産学連携研究に関してコンソーシアムを形成し、非競争的領域において必要な技術開発を共同して実施している。平成 28 年度から 5 年間でプロジェクトが進行中であり、基礎技術開発、微生物での改変、動物や植物での改変などテーマを設定し、効率的な技術開発を目指すと共に、この技術の社会受容のための社会動向調査を実施している。

● 海外の動向

米国の CRISPR の基礎技術開発は、NIH などの公的資金に加えて、多額の寄付金によって行われている。また、大学や研究機関の成果を元にベンチャー企業が設立され、ベンチャーキャ

ピタルからの投資金を利用して開発が進められている。CRISPR 関連のクリスパー・セラピューティクス社、エディタス・メディシン社、インテリア・セラピューティクス社が設立され、それぞれ 10 億ドル以上の資金を調達し、疾患治療法の開発を中心とした研究を進めている。中国では、政府主導でゲノム編集研究を推進しており、医療や農業に力を注いでいる。韓国では、ゲノム編集は国家プロジェクトとして進められており、ゲノム編集研究分野での重要な成果があげられている。

(5) 科学技術的課題

わが国においては国産ゲノム編集ツールの開発が課題である。この開発については、国内プロジェクトの成果から、ここ 1～2 年で新規のゲノム編集ツールの開発も見込まれている。また、コンパクト Cas9 についても国内から大きな成果が見込まれている。これらの状況から、ツール開発を継続的に進め、国産の改変技術（遺伝子ノックイン技術など）やデリバリー技術と融合することが、国産ゲノム編集技術を発展させる上で重要であると考えられる。

疾患モデル等の技術については、精密かつ効率的な改変技術が必要とされるが、効率の面で未だ十分とは言えない。特に、ゲノム情報の蓄積によって、疾患の原因 SNP が同定され、原因 SNP を改変した細胞のニーズは高まるものの、培養細胞等で複数の SNP を同時に改変することは現状では困難である。精密改変技術の開発は、海外においても報告が少なく、この技術を日本が開発できればこの分野での大きな成果となり日本の開発レベルをあげることにつながる。

マウスやラットではゲノム編集技術によって、高い効率で遺伝子ノックアウト個体の作製が可能となっている。遺伝子ノックインについても ssODN を用いた方法は効率的であり、長い DNA を挿入する方法も改良されつつある。一方、遺伝子ノックインの効率を上げるために開発された前述の技術（PITCh 法、2H2OP 法、HITI 法など）は、いずれも主に NHEJ 修復経路を利用する。NHEJ はエラーの起こりやすい修復であり、これらの技術では遺伝子挿入部位に変異（InDel）が生じやすい。相同組換えを介する遺伝子ノックインはエラーフリーであるものの効率が低いことから、高効率の相同組み換え手法の開発も依然として重要である。

神経疾患分野においてはサルでのモデルを作製することが重要である。サルでのゲノム編集については、マーモセットをモデルとしたゲノム編集動物作製について国内から成功例が報告されている。国外ではサルの改変が進められているものの、日本の改変技術は高く、この技術をさらに改良（効率化）し、高効率遺伝子ノックインなどを可能にする技術の開発を進めることが必要である。この他、細胞および個体での染色体レベルのゲノム編集技術は日本に高い技術があることから、この技術を利用したヒト化動物作成技術を開発することが重要である。

作物の品種改良においては、アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え技術を用いて、一旦ゲノム編集ツールの発現カセットをゲノム中に挿入するのが一般的である。そのため遺伝子組換え作物としてから、戻し交雑等で発現カセットを除くことが必要であるが、非常に煩雑である。そのため、Cas タンパク質と sgRNA の複合体であるリボヌクレオタンパク質（RNP）を調製、細胞壁を除いたプロトプラストへ導入する方法や、一過的に CRISPR/Cas9 を働かせる方法によって、遺伝子組み換え体を経ることなく新品種を作出する方法の開発が重要である。

標的遺伝子のエピゲノム状態の改変技術は、細胞の分化やがんを制御する重要な技術となる可能性を秘めている。dCas に様々な因子を連結させた人工因子の開発が進められているが、

ほとんどが海外の技術である。この状況を変えるためには、国産ゲノム編集ツールの DNA 結合ドメインと修飾因子ドメインを連結させた国産の人工修飾因子の開発が急務と考えられる。

(6) その他の課題

産学連携においては、ゲノム編集の特許が大きな問題となる。特に、CRISPR/Cas9 の基本特許は係争中であり、企業がこの技術を利用するためには複数の特許権者へ使用料を支払う必要がある。そのため、大企業がこの技術を利用することを控える傾向にあり、国内での産業開発力の低下を招いている。この問題を解決する方法は、国産技術の開発であるが、ベンチャー企業が特許料を払いつつ、新しい技術を開発する後押し（国策）が必要となる。

ゲノム編集で作出された生物の取り扱いについては、現在環境省を中心として「カルタヘナ法におけるゲノム編集技術の検討委員会」で議論がなされている。ゲノム編集によって作製された遺伝子ノックアウトについては、安全性が確認できれば既存の突然変異育種と同様の規制によって使用できる可能性がある。

ヒト受精卵や受精胚でのゲノム編集は、基礎研究においてその目的に応じて利用可能かどうかの検討がなされている。ゲノム編集技術の社会受容ためには技術の安全性を示し、市民を交えて議論することが急務である。2016年に設立された一般社団法人日本ゲノム編集学会を中心として、社会受容に向けた活動を活発にしていくことが必要と考えられる。

人材育成については、産業界からゲノム編集技術を使いこなせる人材の輩出を強く求められている。しかしながら、ゲノム編集に関する人材育成プログラムは、これまで国内では立ち上がっていない。そのため、早急にゲノム編集の人材育成プログラムを立ち上げ、産業利用に必要な技術を開発する人材、安全性評価をできる人材、ベンチャー企業家を育成することが必要である。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	↑	<ul style="list-style-type: none"> 立体構造解析データを元にしたコンパクトな Cas ヌクレアーゼの開発に成功している。 脱アミノ化酵素（デアミナーゼ）と dCas9 を利用した DNA を切らない Target-AID 技術が開発され、培養細胞や動物・植物個体において塩基改変が可能であることが示された。本成果は、Science 誌で発表された。 複数の遺伝子ノックインの新技術（PITCh 法など）が開発され、培養細胞や個体において成功例が報告された。 PPR 技術など新規のゲノム編集ツール開発に成果が見られつつある。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> TALEN や CRISPR を用いた農水畜産物でのゲノム編集が着実に進展している（キノコ、ジャガイモ、ブタ、マダイなどでの遺伝子改変）。 上述の Target-AID を利用することによって作物種（トマト）でのゲノム編集に成功している。本成果は Nat Biotech 誌で発表された。 iPS 細胞での疾患モデル細胞作製と治療法開発に向けた研究が進展している。

米国	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> ゲノム編集ツールの開発、遺伝子改変技術の開発、核酸検出技術の開発など全ての基礎開発において世界トップの水準を維持し、技術レベルを向上させている。 アミノ改変による Cas ヌクレアーゼ変異体作製が進み、PAM 配列の特異性を改変し、NG の配列特異性をもつ xCas9 (Nature 誌に発表) など多くの変異体が報告された。 デアミナーゼを連結した Base Editor が開発され、標的に自在に塩基改変を加えることを示した (Nature 誌に発表)。 ゲノム編集を利用した新規の核酸検出技術 (Sherlock 法および DETECTR 法) が開発された。これらの成果は Nature 誌と Science 誌に報告されている。 ゲノム編集を用いて細胞系譜を追跡する複数の技術が開発されている。
	応用研究 ・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 微生物でのゲノム編集を用いた有用株作出技術、農水畜産物の品種改良、遺伝子治療における開発など、全て分野の開発で世界トップレベルであり、さらなる開発力の向上が見込まれる。 デュボン・パイオニア社から CRISPR/Cas9 を用いたトウモロコシの初の製品の商品化が発表されている。 モンサント社が遺伝子組換えの次の技術としてゲノム編集を位置づけ、飼料用から食料用まで生産しやすく付加価値の高い農作物の開発をめざすことを表明している。
欧州	基礎研究	○	↓	<ul style="list-style-type: none"> 英国 ウェルカム トラスト サンガー 研究所では、CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーを用いたスクリーニング技術開発において高い研究成果が見られる。 ヒト受精卵でのゲノム編集によって、発生に関する遺伝子の機能解析を行った。 CRISPR でのゲノム編集が p53 経路を活性化し、幹細胞のがん化を誘導するという論文や、p53 経路を制御することで正確なゲノム編集が可能であることを示す論文が発表された。
	応用研究 ・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーを用いて遺伝子の転写調節領域や薬剤耐性のスクリーニング研究が進められている。 TALEN を用いた HIV のゲノム編集で遺伝子治療に向けた研究が進展中である。 TALEN の基本特許を有するセレクトィス社が CAR-T 細胞作製など牽引している。
中国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> CRISPR の研究論文数は増えているものの、全体の基礎技術レベルは高いとは言い難い。 バクテリアおよびヒト細胞で Cas9 を阻害する新たな抗-CRISPR タンパク質を同定した。 NgAgo 技術のような未完成の技術を報告する状況から基礎研究レベルの向上は見られない。
	応用研究 ・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 農作物の品種改良で研究成果が見られる。Chinese Academy of Sciences を中心として農作物 (イネ、トウモロコシ、小麦など) 研究が継続して進展している。 ゲノム編集治療に向けた研究も活発である。CRISPR を利用した T 細胞での PD1 遺伝子破壊によるがん治療の臨床試験が複数進行中である。 ゲノム編集技術を用いて筋細胞の増殖を抑制する遺伝子を破壊し、高い運動能力をもつ犬を作製した (また、クローン犬の開発に力を入れている)。

韓国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ソウル国立大学の研究は世界トップレベルであり、高い質の論文を発表している。 特異性を向上させた Cas スクレアーゼ (Sniper-Cas) の開発に成功した。 CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用の検出技術 (Digenome Seq 法) を開発した。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 農水畜産物での品種改良技術開発に力を入れており成果が見られる。植物での CRISPR の RNP を利用した遺伝子組換えを介さないゲノム編集が <i>Nat Biotech</i> 誌が発表された。 塩基改変技術を利用した植物ゲノムの改変に日本同様に成功している。 新しいツール開発やオフターゲット作用の検出サービスなどを提供している。ToolGen 社がモンサントとライセンス契約を結んだ。ToolGen 社は 2018 年 4 月に時価総額が 1 兆ウォン(約 1000 億円)を突破した。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発（プロトタイプの開発含む）・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science*. 337 (6096) :816-821, 2012. doi: 10.1126/science.1225829.
- 2) Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system." *Cell*. 163 (3) :759-771, 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- 3) Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. "Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity." *Nature*. 556 (7699) :57-63, 2018. doi: 10.1038/nature26155.
- 4) Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. "Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage." *Nature*. 551 (7681) :464-471, 2017. doi: 10.1038/nature24644.
- 5) Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. "Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems." *Science*. 353 (6305) , 2016. doi: 10.1126/science.aaf8729.
- 6) Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. "Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion." *Nat Biotechnol*. 35 (5) :441-443, 2017. doi: 10.1038/nbt.3833.
- 7) Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. "In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration." *Nature*. 540 (7631) :144-149, 2016. doi: 10.1038/nature20565.
- 8) Nakade S, Mochida K, Kunii A, et al. "Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system." *Nat Commun*. 9 (1) :3270, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-05773-6.
- 9) Kim SI, Matsumoto T, Kagawa H, et al. "Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs." *Nat Commun*. 9 (1) :939, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-03044-y.
- 10) Sato K, Oiwa R, Kumita W, et al. "Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing." *Cell Stem Cell*. 19 (1) :127-138, 2016. doi:

10.1016/j.stem.2016.06.003.

- 11) Tsukasa Ohmori, Yasumitsu Nagao, Hiroaki Mizukami, et al. " CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice." *Scientific Reports* 7: 4159 (2017) doi:10.1038/s41598-017-04625-5
- 12) Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. " Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space." *Science*. 361 (6408) :1259-1262,2018. doi:10.1126/science.aas9129.
- 13) Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. "Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6." *Science*. 360 (6387) :439-444, 2018. doi: 10.1126/science.aag0179.
- 14) Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. "CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity." *Science*. 360 (6387) :436-439, 2018. doi: 10.1126/science.aar6245.

2.1.3 ケミカルバイオロジー

(1) 研究開発領域の定義

広義には有機化学を基礎とした生命科学研究であり、核酸やタンパク質などの生体高分子と特異的に作用する化合物（生理活性化合物）を開発し、生体高分子やリガンドの機能解明や制御を目指す領域。化合物の探索源には天然物と合成化合物がある。蛍光プローブ等の研究ツール、診断薬、センサー、疾患・感染症の予防薬、臨床治療薬・農薬など有用な化合物の開発につながる。

(2) キーワード

低分子化合物、核酸、タンパク質、脂質、糖質、中分子化合物、天然物化学、生合成遺伝子、標的分子同定、ケミカルゲノミクス、ゲノムマイニング、イメージング、センサー、マシニング、創薬、診断、農薬

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

化学を基盤として生命の謎を解き明かしていくケミカルバイオロジー研究が進展すれば、様々な生体分子の機能や相互作用についての理解が進み、化学と分子生物学や細胞生物学との融合が促進される。これにより、生命現象を（原子・）分子レベルの高い解像度で研究し、定量性のある分子論的な観点で解析・理解しすることが可能となり、さらに人工分子による時空間的な制御を実現する基盤技術の開発へと繋がっていく。

ケミカルバイオロジーを触媒として、化学・生物学・医学・工学が発展的に融合することで、①生命活動を分子レベルで追跡できるセンサー・検査薬・診断キット等の開発や②生命現象を合理的に制御できる医薬品・農薬の創製に直結し、新産業の創出や人類の健康と福祉の向上へ大きく貢献する重要な領域である。

[研究開発の動向]

特定の生命現象を制御する化合物が取得されたとき、最初のハードルの高い課題はその細胞内標的分子の同定である。興味深い表現型を示す化合物が手元にあった時、その標的分子を同定する手法としては、物理的相互作用に基づくものと、遺伝学的相互作用に基づくものがある。

いまだに第一選択手法となっているのが、化合物を化学的に修飾して単体に固定し、そこに夾雑系である細胞や組織抽出液を流し、そこに結合する標的タンパク質を精製・同定する方法である。1990年前後に Stuart L. Schreiber（米・ハーバード大学）らが免疫抑制剤 FK506 やヒストンデアセチラーゼ阻害剤トラポキシンなどを樹脂に化学的に固定して標的タンパク質を同定したことはこの研究領域の金字塔である。以来、物理的相互作用を指標にした標的探索の手法は、タンパク質を基盤上に固定して作製したタンパク質アレイや、化合物を光反応性官能基によってランダムに樹脂に固定する方法なども開発され、化合物の標的同定における重要な手法となっている。この場合に、化学修飾を施しても化合物が標的タンパク質との結合活性を維持していることが重要である。ところが分子量が小さい場合には特に、この方法は困難なことがある。

そのような場合、遺伝学的相互作用に基づいた方法論が有効である。例えば、化合物に感受性を示す細胞に、標的タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現させると、標的分子が増えることで化合物に対する耐性を獲得する。近年では、ゲノム情報に基づいた網羅的な変異株作製と次世代シーケンサーの組み合わせにより、非常に簡便に作用経路を推定できる。この場合のメリットとして、化合物を化学的に誘導体化する必要がない点も挙げられる。化合物の標識を必要としない標的分子の探索方法としては、タンパク質の熱安定性を指標にした DARTS 法も有効である。

近年は AI を用いた化学合成やメタゲノムの本格活用など、今後のブームになるであろう融合研究が登場している。

以下にいくつかの研究の潮流について記述する。

● 構造情報に基づいたリガンド開発

生体高分子受容体（主にタンパク質）の三次元構造（鍵穴）に適合する小分子リガンド（鍵）を創製し、医薬品候補化合物を開発する手法（Structure-Based Drug Design: SBDD）が着実な進展を遂げている。ポストゲノム後、構造生物学研究の進展により、多数のタンパク質の三次元構造が PDB (Protein Data Bank) に登録され、拡充されている。近年のコンピューター計算性能の著しい進展や非営利機関が無償提供する受容体-リガンドのドッキングシミュレーション支援サービス (AutoDock 等) の普及とあいまって、in silico スクリーニング・創薬がより重要で普遍的な技術となってきた。膨大な数の化合物ライブラリーからターゲットタンパク質に結合するかどうかを予測するバーチャルスクリーニング技術やタンパク質に対する結合親和性を精度良く見積もるインシリコシミュレーションが更に高速化・高精度化しながら、より一般性・信頼性の高い基盤技術として発展している。

● 化学合成の自動化

ペプチドや核酸については自動合成法が確立済みであり、現在では所望の配列のペプチドや核酸を受託合成で簡便に入手できる。ペプチド・核酸に比べると糖鎖の自動合成は格段に困難であるが、単糖ユニットをモジュラー式に連結する手法（化学的/酵素的グリコシル化）が開発されている。一方、複雑で高度に官能化された天然物やそれらのアナログ分子の合成については、従来、高度な知識と豊富な経験を持つ有機合成化学者にしか取り組むことができない状況となっていた。化学合成の自動化を指向して我が国では、高橋ら（当時東工大、現横浜薬科大）が、制ガン剤タキソールを自動合成機で全合成した先駆的研究や、フロー・マイクロ合成法が大きな発展をみせている（京大 吉田潤一ら 新学術領域 反応集積化の合成化学）。

● 中分子化合物を活用したアプローチ

これまで創薬の王道であった低分子医薬品については、副作用の観点から開発の難易度が向上し、また、標的とする生体分子の枯渇などが指摘されている。一方、抗体を基盤としたバイオ医薬品が長足の進歩を遂げ、適用範囲を拡大している。低分子医薬は経口投与が可能で安価に製造できる利点があるが、オフターゲットへの特異性の低い相互作用に起因する副作用・細胞毒性が問題となることが多い。一方、抗体に代表されるバイオ医薬品は、標的分子と高い特異性で相互作用するので、副作用を大幅に低減できる。しかし、免疫毒性や製造コスト高騰、薬剤投与手法などに問題がある。また、生体高分子医薬は、一般に細胞膜を透過できないので、細胞表層の標的分子に限られる。

近年では、低分子と生体高分子の中間のサイズを持つ中分子（分子量 500 - 5000 程度）を

活用した細胞内機能制御法の開発がケミカルバイオロジーや創薬研究の重要な課題となっている。中分子は、①細胞膜を透過でき、②標的分子との多点相互作用による特異性の高い分子認識能力があり、③免疫毒性や副作用のリスクを大幅に軽減できるので、低分子と生体高分子の両者の長所を兼ね備えた革新的な機能性分子となることが期待されている。免疫抑制剤タクロリムス（藤沢薬品）、ハラヴェン（エーザイ）に代表されるように分子量 500 を優に超え、中分子化合物が革新的な医薬品として上市されている。既存の化合物ライブラリーとは、構造特性が大きく異なる多官能性の高次構造分子群を現実的なコストで人工的に創出する技術は、基礎・応用研究の両面で重要と考えられる。

● 化合物によるタンパク質の近接誘導

本来は生体内で適切な時空間制御を受けているタンパク質間相互作用であるが、化合物を用いて強制的に二種のタンパク質を相互作用させることで、細胞内におけるシグナル伝達や遺伝子発現、タンパク質輸送を制御することが出来る¹⁾。この手法は元々、免疫抑制剤 FK506 やシクロスポリン、抗癌剤ラパマイシンが 2 種のタンパク質と三者複合体を形成することに着想を得ている。すなわち、タンパク質 A を FK506 の標的分子である FKBP との融合タンパク質として発現させ、タンパク質 B をシクロスポリンの標的分子であるシクロフィリン A との融合タンパク質として発現させた細胞を作製する。そこに FK506 とシクロスポリンのキメラ化合物を処理すると、タンパク質 A とタンパク質 B の複合体形成を誘導できるのである。

現在この手法を用いた治療薬の創出に期待がかかっている。融合タンパク質を発現させることなく、キメラ化合物により特定のタンパク質の分解を誘導できるようになったからである。Craig Crews 教授（米国イェール大学）らが先導する PROTACs (Proteolysis Targeting Chimeras) はその代表的なものである。すなわち、分解したい目的タンパク質に結合する化合物と E3 ユビキチンリガーゼの基質認識部位 (VHL) に結合する化合物を、リンカーを通して融合したキメラ分子を用いる²⁾。このキメラ分子を投与すると、目的タンパクがユビキチンリガーゼにリクルートされ、ユビキチン化された後、プロテアソームによって選択的に分解される。サリドマイド³⁾ やエーザイの開発しているスルホンアミド系抗癌化合物もそれぞれの標的タンパク質を介して E3 リガーゼによる特定のタンパク質のユビキチン・プロテアソーム経路による分解を誘導することが明らかになっており⁴⁾、VHL リガンドに加えてキメラ分子創出の際の化合物選択肢は増えつつある。また、この手法のもう一つのメリットは、既存の化合物を活用できる点 (repurposing) にある。特異性の高いタンパク質・リガンドのペアがあれば、そのリガンドと VHL リガンドやサリドマイド、スルホンアミド系化合物とを融合したキメラ分子を合成すれば、それを細胞や生体に処理することで、標的タンパク質を迅速に分解してその機能を解析することが出来る。また、毒性や ADME が悪いため見放された化合物であっても、PROTACs に展開することで新たな創薬展開が期待できる。

● 微生物の生合成解析による天然物の拡充

天然物は、これまでに約 50 万の化合物が報告されているとされ、植物や海洋無脊椎動物とともに、重要なリソースの一つが微生物である⁵⁾。微生物は土壌や水圏から単離されてきたが、培養されている種は 1 パーセントに満たないといわれ、難培養性の微生物をいかにリソースにするかが大きな課題である。最近では、データベースにデポジットされている細菌のゲノム配列や、ヒト微生物叢から取得した DNA 配列情報から、数千～数万の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを同定することが可能である^{6,7)}。また、土壌のメタゲノムからは数百の微生物

物ゲノムが再構築され、そこから 1,500 余りの生合成遺伝子クラスターが同定され、さらにこれまで研究されていなかった門のバクテリアからはユニークな生合成遺伝子クラスターが見出されている⁸⁾。

国内でも理化学研究所や東京大学を中心に化合物バンクの整備が進められてきた。今後の天然物の拡充のためには、難培養性の生物資源の活用や、膨大に蓄積しているゲノム情報からの化合物のマイニング手法の整備が課題である。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

● 化合物リガンドと分子標的のペアを抽出する網羅的手法

ケミカルバイオロジーのボトルネックは、生理活性化合物の分子標的を同定することである。通常は、生理活性分子を発見し、その後に分子標的を決定する。米国スクリプス研究所の Cravatt らは、分子標的を先に網羅的に決定して、その後に生理活性化合物を発見する方法を報告している⁹⁾。例えば、医薬品によく見られる小さなフラグメント構造に着目し、その構造に結合するタンパク質を全て同定する。そのタンパク質の中から疾病に関するものを選び、フラグメント構造を化学修飾することでより選択的な化合物を見つけ出す。

● 細胞サーマルシフト法 (CETSA)

化合物と標的タンパク質の相互作用を簡便に検出する方法が開発され、多用され始めている¹⁰⁾。この方法は今後ケミカルバイオロジーや医薬品開発で広く使われると予想される。細胞や組織に化合物を加え、温度を変えて、変性したタンパク質を遠心分離する。変性していないタンパク質を電気泳動し、ウエスタンブロットで検出する。化合物がタンパク質に結合すると、そのタンパク質は熱変性に対して抵抗性ができ、変性に必要な温度は上昇する。これにより、細胞内や組織内での化合物・タンパク質結合を検出できる。

● 生体高分子の指向進化

本年度のノーベル化学賞でその重要性が広く浸透したファージディスプレイ法や核酸の SELEX 法を適用するアプローチには更に発展する可能性が高い。ペプチド、タンパク質、核酸 (DNA/RNA) の構造を系統的に自在に改変した膨大な数のライブラリーを創製し、最善・最適の分子を選別する手法に期待が大きい。

● 化合物の標的分子の同定について

Charles Boone 博士 (トロント大学、理研) らは出芽酵母を用いて遺伝子間相互作用と化合物・遺伝子間相互作用を解析しており、最近、13,000 余りの化合物について化合物・遺伝子間相互作用情報を取得し、情報解析により化合物の作用アノテーションを行うことに成功した¹¹⁾。この方法は、脂質や金属のようにゲノムに直接コードされていない分子を標的とする場合にも有効であると期待できる。

これまでケミカルゲノミクス解析による化合物の作用経路、標的分子の同定は酵母を用いたものが主流であった。この場合のネックは、ヒト疾患治療薬が酵母で表現型を出さなければ解析不能な点にある。近年の Crispr Cas9 技術の出現により、従来よりも簡便に大規模な遺伝子操作を行うことが可能になったことで、ヒトなどの酵母以外の生物を用いたケミカルゲノミクス解析が現実的なものになったと言える。

一方、天然物の場合にはその生合成遺伝子に着目することも標的分子の同定に有効である。

天然物を生合成する生物は自己耐性遺伝子を生合成遺伝子クラスターの近傍に有することがある。例えば高コレステロール血症の治療薬であるロバスタチンを産生する糸状菌では、生合成遺伝子クラスターの中にロバスタチンに耐性な HMG-CoA 還元酵素をコードすることで、自己耐性を獲得している。スクリプス海洋研究所の Bradley S. Moore 博士らが 86 の海洋放線菌のゲノムを探索したところ、ハウスキーピング遺伝子が生合成遺伝子クラスター中に位置する例が 900 余り見出されており¹²⁾、効果的な標的分子同定に直結すると期待される。また、これを逆手に取ることで特定の標的分子に対する化合物の取得が可能である。既存の除草剤の標的タンパク質として分岐鎖アミノ酸の生合成酵素が挙げられるが、当該酵素を生合成遺伝子の近傍に持つ遺伝子クラスターを真菌ゲノムから探索することで、新しい阻害剤の取得が報告されている¹³⁾。ターゲット・オリエンティッドな阻害剤探索の新しい潮流になりそうである。

● メタゲノム解析による創薬応用

ジェネンテック社 (米国) は土壌メタゲノムからの創薬リード化合物の開発に 969 億ドルを Lodo Therapeutics 社 (米国) に投資している¹⁴⁾。

● コンビナトリアル生合成による機能性分子群の創製¹⁵⁾

次世代シーケンサーの普及により、植物や菌類の二次代謝を担う生合成酵素群の遺伝子同定が容易になった。放線菌や糸状菌に代表される菌類が生産する二次代謝産物については、当該酵素遺伝子を異種株で発現して人工的に生合成する技術が確立されてきた。生物種によっては遺伝子操作に依然困難があるものの、ゲノムにコードされている生合成マシナリーを人工的に再構築する技術は大きな発展を遂げている。二次代謝産物生合成関連遺伝子群を根こそぎ発掘・発現して、地球上に眠る未活用の分子資源を活用していく時代が到来すると期待される。更にゲノム編集技術等を活用して、酵素や生合成関連の機能性タンパク質 (トランスポーター等) の機能を指向進化させるアプローチにより、遺伝子工学を駆使して、所望の機能を持つ高次構造天然物群を簡便に人工合成し、自在に改変できるようになる可能性が高い。また、生合成プロセスの基質や鍵中間体を再設計して、生合成プロセスを人工的に改変するアプローチからも生体機能性分子群が創製されることが期待される (新学術領域: 生合成リデザイン)。

● 化学合成の自動化¹⁶⁾

近年、アミノ酸、単糖とは異なり、共通基盤性の高い非天然型の構築ブロックを順次連結して高次構造を持つ機能性分子群を自動合成する研究が本格化しつつある。主にアミド結合の連結やクロスカップリング反応で化合物ライブラリーを構築する従前のコンビナトリアル合成とは一線を画し、より複雑な構築ブロックを多段階の連続フロー合成で集積化し、中分子サイズの化合物群を機械で自動合成するプラットフォームが開発されるようになった。多種類の構築ブロックに対する多彩なカップリング反応から、官能基変換を並列/分岐型のマイクロフロープロセスで実施できる。このアプローチは、生体機能性分子群の探索資源を網羅的に低コストで供給する革新的な手法となりうる。ハード面では、ナノ加工技術、3D プリンタ、チップ技術の進展と呼応しており、ソフト面でも AI による自動制御・網羅的解析・最適化技術や最新のケモインフォマティクス技術と融合しながら大きく発展する可能性が期待される。

(5) 科学技術的課題

● 化合物群の構造特性

コンビナトリアル化学は、多種類の化合物群の供給を可能とした。しかし、sp² 炭素含有率

の高い平板なヘテロ芳香環同士のカップリング反応が多用されるので、三次元的な構造のバリエーションは限定的である。一方、複数の sp^3 不斉炭素で構成される天然物や生体高分子は複雑な凹凸を持つ分子表面を提示し、多点相互作用による特異性の高い分子認識により生命現象を司る情報伝達を制御する。精緻な天然物群と従前の化合物ライブラリーとの構造特性のギャップを解消しつつ、複雑で高度に官能化された化合物群を低コストで網羅的に合成する手法の開発が重要である。

近年では、膨大な配列多様性を持つ環状中分子ペプチドライブラリーから、これまで困難とされてきた生体分子間相互作用を変調・制御できる技術が開発されている（東大、菅ら、ペプチドリーム）。本年度のノーベル賞に象徴されるように生物の進化を摸倣して、最善・最適の分子を創製していく研究の重要性がより顕在化していくことが考えられる。

● 標的とする生体高分子間相互作用

従前の創薬研究では、鍵と鍵穴形式で相互作用するリガンドと生体高分子の複合体（酵素や小分子リガンド受容体等）の機能制御に力点が置かれてきた。中・長期的には、タンパク質-タンパク質間相互作用、タンパク質-核酸相互作用を制御する機能性分子群を設計・合成し、機能評価する研究が本格化していくと考えられる。これらの相互作用は核内で起こるので、細胞膜透過性の低いバイオ医薬品では制御困難であり、低／中分子医薬の独壇場となる可能性が高い。これらタンパク質-タンパク質間／タンパク質-核酸相互作用は、転写、増殖、分化、細胞死等の生命現象を司るシグナル伝達を担っている。これらの相互作用を変調・制御できる機能性分子の開発は重要であり、生命科学研究・創薬研究を革新する可能性を秘めている。

タンパク質同士は、一般に比較的広く浅い形状の領域 ($1,500-3000 \text{ \AA}^2$) で相互作用している。この相互作用を特異性に低濃度で制御する医薬品開発の成功例はほとんどない。タンパク質間の相互作用領域を標的とする低／中分子群を設計・合成し、そのリード化合物を創製していく研究は、基礎・応用の両面から非常に重要である。

● コンピューテーションとの融合

化合物の薬効や標的分子の予測へのコンピューテーションの導入は少しずつ展開されているが、化学反応の予測は容易ではないとされていた。しかしここ数年、機械学習とリアルタイム測定を組み合わせた有機合成ロボットを用いることで化学反応スペースを効果的に探索することができることが報告され、そこでは新しい化学反応が見出されている¹⁷⁾。また、難しいとされていた反応収率や生理活性化合物の全合成ルートのコンピューターによる予測や提案の成功例が報告されている^{18,19)}。化合物の創製から標的分子の推測、副作用や主作用の予測まで、ケミカルバイオロジーとコンピューテーションの融合が今後ますます重要な研究課題になる。

(6) その他の課題

化合物をさまざまな生命現象の解明に適用しようとするケミカルバイオロジーの分野では、分野連携が特に重要である。この事実はよく認識されていて、例えば新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」や「化学コミュニケーション」では化学合成、化合物探索、生物活性評価、情報科学の専門家が集まり、そこではコラボレーションが推奨されている。しかしそういった研究領域に参加していない研究者の方が大多数であり、オールジャパンでの情報交換と共同研究開発を推進しやすい場の設定が必要である。そこではアカデミアと企業の研究者が集まり、産業的なニーズと基礎技術の展開について状況をシェアするべきである。

アカデミアでは、“尖った”手法や分子にこだわりと熱意を持つ研究者が多い。天然物アナログや中分子を基盤としたケミカルバイオロジー・創薬研究を着実に進展させるためには、米国のようにアカデミア発の基礎研究をベンチャー企業で孵化させ、中・大規模企業へ橋渡ししていくシステムの構築が不可欠と考えられる。日本のケミカルバイオロジー研究に興味を持つ企業は大半が中規模企業であり、大学との共同研究を活性化する仕組み（A-STEP等）は限定的と判断せざるを得ない。ベンチャー企業による活動を官民一体となってサポートし、優秀で若い人材がチャレンジングな課題に果敢に取り組める仕組み・体制の整備が鍵を握ると考えられる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 天然物化学での伝統があり、有機化学分野も世界をリードしてきた。生物活性分子の探索・合成研究の実力・実績が国際的に評価されている。 伝統的な化合物探索とユニークなアッセイ系の融合により、新しい作用機序を持つ抗生物質ライソシンなど、創薬シードとして有用なものが報告されている²⁰⁾。 ケミカルツールを用いた可視化技術の進展は顕著で、例えば東京大学の浦野泰照らによる腫瘍の可視化プローブの開発は目覚ましいものがある²¹⁾。また、京都大学の浜地格らの開発するプローブは夾雑系の生体内における特定のタンパク質機能の活性観測を可能にしている²²⁾。 大型研究プロジェクトが複数推進されており、化合物の取得・創製、化合物を用いた細胞機能の解析手法の開発が盛んにおこなわれている。新学術領域研究（「生合成リデザイン」、「化学コミュニケーション」、「分子夾雑化学」）はその好例であり、常に新しい領域開拓が試みられている。研究者人口も多く、独創性の高い研究成果も継続的に生み出されている。一方で、有機化学と生命科学を融合する学際的な取り組みは少ない。 大学院生・若手研究者育成策が現段階では十分に機能しておらず、博士課程進学率や国際一流誌への論文投稿数が低迷している。
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 日本の主要製薬企業の大半は、国際的には中規模である。オープンイノベーション等も試行されているが、リスクの高いプロジェクトにチャレンジする余力は限定的である。 中規模企業の数に比して、基礎研究を孵化させていく橋渡し役のベンチャー企業が圧倒的に少ない。また、革新的なアプローチを育てていける目利き人材も少ない。ペプチドリームのような成功モデルもあるので、革新的創薬のみならず、我が国の強みであるものづくり関連企業（精密計測・分析・診断・治療機器）との連携を進めて、予防医学、診断薬、センサー、次世代型治療等についても社会実装へ繋がる取り組みを強化する必要がある。

米国	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ケミカルバイオロジー分野でも世界を牽引している。有機化学、医薬化学、生物学のいずれもトップの実力があり、革新的な研究が生まれ続ける仕組みが有効に機能している。 質量分析計を基盤にした情報解析 (Molecular networking) やメタゲノム情報を効果的に取り入れることで、新しい化学構造を持つ生理活性化合物が天然から取得されている。 タンパク質をケミカルプローブで標識することでタンパク質の機能を解析する、ケミカルプロテオミクスが秀逸な研究者によって推進されている。UCSD の Mike Burkart らは天然物の生合成タンパク質²³⁾、スクリプス研究所の Benjamin Cravatt 博士らはヒト疾患タンパク質の解析に応用展開している²⁴⁾。 感染症治療薬の創出にむけて、微生物が環境中から鉄を取り込むために用いる低分子化合物シデロフォアを利用した戦略が試みられている。MIT の Elizabeth M. Nolan らは、シデロフォアに抗生物質を結合させることで抗生物質を病原性細菌に選択的に効かせることを可能にしている²⁵⁾。 伝統的な感染症治療薬アムフォテリシン B の改変体を高度な化学合成力で創製することで、イリノイ大学の Marty Burke らは低毒性の化合物創出に成功している^{26,27)}。 分野横断的学際研究、産学共同研究等についても最もアクティビティが高い。優秀で活力のある人材が豊富で流動性も高い。化学者が NIH から予算を獲得することができ、研究資金も世界トップレベル。
米国	応用研究 ・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> シリコンバレーに代表されるように世界屈指の大学の周辺にベンチャー企業・中・大規模規企業が産業クラスターを形成している。 最先端技術産業やベンチャー企業がひしめき合いながら応用開発研究を他の追随を許さないスピード感とスケールで展開している。
欧州	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> ドイツ、スイス、英国の三カ国を中心として、ケミカルバイオロジーや有機化学研究を牽引する実力がある。有機化学・基礎医学研究とも世界トップレベルである。スイスの ETH、ドイツのマックスプランク研究所、英国トップ校には、素晴らしい研究成果が継続的に発信されている。人工生合成の分野はドイツに強みがある。 独・ミュンヘン工科大学のグループ (Stephan A. Sieber ら) は化学反応性の高い天然物に注目し、ケミカルプロテオミクス解析により生理活性化合物の細胞内標的を効率的に明らかにしている²⁸⁾。 スイス ETH の研究グループ (Jörn Piel ら) は海洋生物内のメタゲノム情報の解析を得意とし、海綿に含まれる数々の生理活性物質が難培養性の共生微生物がコードする遺伝子クラスターにより産生されることを次々と示している²⁹⁾。鍵になる生合成酵素の生化学的検証も堅実に行っており、新しい生合成反応を見出している³⁰⁾。 独 HKI の Christian Hertweck らは多くの天然物の生合成を明らかにしてきたが、ジャガイモや稲の病原菌の産生する化合物の生合成経路を明らかにするなど、農学的な応用も期待される³¹⁾。
	応用研究 ・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> スイスは国際的な製薬企業が多く、欧州をリードしている印象である。ドイツ、英国も新薬を創出できる実力を維持している。ベンチャー企業育成や新産業創出へ向けた取り組みは限定的か。

中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> 研究のレベルが格段に向上した。海外で研鑽を積んだハイレベル人材招致国家プロジェクト(千人計画)等により、研究者の国際的な流動性が高い。米国や欧州から帰国した30-40代PIの活躍により、独自性が高く、世界を先導するような研究が続々と発信されるようになってきた。博士取得→海外留学→帰国してキャリア形成というビジョンを持った学生の割合も増加している。母国に帰還して若手研究者への手厚いサポート、豊富な資金力に支えられ、基礎研究をアグレッシブかつ楽観的に推進できる環境が整備されている。短期的には産業に直結しない(天然物全合成研究等)基礎研究についても、中長期的で持続的な科学技術研究開発力の強化という観点から、しっかりと育成する方針を採用している点は特筆に値する。また、最近では、日本トップレベルの研究者を招聘して、基礎研究力の向上にも努めている。 化合物探索を行う研究グループは非常に多く、アメリカ化学会の専門誌でも化合物報告の半数は中国のグループからのものである。また化学合成力の高い研究グループが散見され、化学のトップジャーナルにも複雑化合物の全合成の報告がしばしば掲載されている。 ウリ科植物中の苦み成分の生合成遺伝子を比較ゲノム解析から同定しており^{32,33)}、品質改良された遺伝子改変作物の創出も予想される。 上海に中国科学院・国家化合物祥品庫があり、約100万個の化合物を保有。国内研究者に提供している。
	応用研究 ・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 新薬開発製薬企業が少なく、歴史が浅い。国家主導の経済特区(深圳等)や主要都市では、基礎研究力の高い基幹大学と産業応用を試行した企業との連携を推進する試みがある。ケミカルバイオロジー関連産業では、独自性の高い技術を社会実装した例は限定的と推定される。
韓国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 他国の研究を追従するアプローチが主流であるが、トップ大学では独自性の高い研究も展開されている。 海外から帰国した研究者による化合物の標的分子同定の方法論構築や生理活性化化合物を用いた生物学の展開がなされている。
	応用研究 ・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 財閥関連産業が主流であり、ケミカルバイオロジー関連の企業が少ない。新薬を導出できる規模の製薬産業基盤が整っていない。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発(プロトタイプの開発含む)・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Stanton B.Z., Chory E.J. & Crabtree G.R. "Chemically induced proximity in biology and medicine." *Science* 359, 1117 (2018) DOI: 10.1126/science.aao5902.
- 2) <http://crewslab.yale.edu/research/induced-protein-degradation-protac/>
- 3) *Science*
- 4) Uehara T, et al. "Selective degradation of splicing factor CAPER α by anticancer sulfonamides." *Nat Chem Biol*. 13, 675-680 (2017) . DOI: 10.1038/nchembio.2363.
- 5) Bérdy, J. "Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading." *J. Antibiot.* 65, 385-395 (2012) . DOI 10.1038/ja.2012.27.

- 6) Cimermancic P. et al. "Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters." *Cell* 158, 412–421 (2014) . DOI 10.1016/j.cell.2014.06.034.
- 7) Donia M.S. et al. "A Systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics." *Cell* 158, 1402–1414, (2014) . DOI 10.1016/j.cell.2014.08.032.
- 8) Crits-Christoph A., Diamond S., Butterfield C.N., Thomas B.C. & Banfield J.F. "Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis." *Nature* 558,440-444 (2018) . DOI 10.1038/s41586-018-0207-y.
- 9) *Cell*, 168, 527-541, 2017
- 10) *Science*, 341, 84-87, 2013
- 11) Piotrowski JS, et al. "Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes." *Nat Chem Biol.* 13, 982-993 (2017) . DOI: 10.1038/nchembio.2436.
- 12) Tang,X. et al. "Identification of thiotetronic acid antibiotic biosynthetic pathways by target-directed genome mining." *ACS Chem Biol.*10, 2841 – 2849 (2015) . DOI: 10.1021/acscchembio.5b00658.
- 13) Yan, Y. et al. "Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action." *Nature* 559, 415-418 (2018) . DOI: 10.1038/s41586-018-0319-4.
- 14) NEWS in Nat Biotechnol. 36, 674 (2018) .
- 15) Ziemert, N.; Alanjary, M.; Weber, T. "The evolution of genome mining in microbes – a review" *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33, 988-1005.
- 16) Trobe, M.; Burke, M.D.; "The molecular industrial revolution: automated synthesis of small molecules" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 4192-4214.
- 17) Granda JM, Donina L, Dragone V, Long DL, Cronin L. "Controlling an organic synthesis robot with machine learning to search for new reactivity." *Nature* 559, 377-381 (2018) . DOI: 10.1038/s41586-018-0307-8.
- 18) Ahneman D.T., Estrada, J.G., Lin, S., Dreher, S.D. & Doyle A.G. "Predicting reaction performance in C-N cross-coupling using machine learning." *Science* 360, 186-190 (2018) . DOI: 10.1126/science.aar5169.
- 19) Klucznik, T. et al. "Efficient Syntheses of Diverse,Medicinally Relevant Targets Planned by Computer and Executed in the Laboratory." *Chem* 4, 522–532 (2018) .
- 20) Hamamoto, H, et al. "Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane." *Nat. Chem. Biol.* 11, 127-133 (2015) . DOI: 10.1038/nchembio.1710.
- 21) https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/a_00504.html
- 22) <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>
- 23) <http://burkartlab.ucsd.edu/index.html>
- 24) <https://www.scripps.edu/cravatt/>
- 25) Neumann, W., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M. & Nolan, E.M. "Esterase-catalyzed siderophore hydrolysis activates an enterobactin-ciprofloxacin conjugate and confers targeted antibacterial activity." *J. Am. Chem. Soc.* 140, 5193-5201 (2018) . DOI: 10.1021/jacs.8b01042.
- 26) Wilcock, B.C., Endo, M.M., Uno, B.E. & Burke, M.D. "C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells." *J. Am. Chem. Soc.* 135, 8488-8491 (2013) . DOI: 10.1021/ja403255s.
- 27) <http://faculty.scs.illinois.edu/burke/index.php?p=home>
- 28) <https://www.oc2.ch.tum.de/index.php?id=329&L=0>

- 29) Wilson, M.C. et al. “An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire.” *Nature* 506, 58-62 (2014) . DOI: 10.1038/nature12959.
- 30) <http://www.micro.biol.ethz.ch/research/piel.html>
- 31) <https://www.leibniz-hki.de/en/institut-staff-details.html?member=4>
- 32) Shang, Y. et al. “Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber.” *Science* 346, 1084-1088 (2014) . DOI: 10.1126/science.1259215.
- 33) Zhou, Y. et al. “Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae.” *Nat. Plants* 2, 16183 (2016) . DOI: 10.1038/nplants.2016.183.

2.1.4 構造解析技術

(1) 研究開発領域の定義

構造生物学とは、複雑な生命の仕組みに原子の空間的配置から迫る学問である。タンパク質などの生体分子の立体構造を X 線結晶構造解析や NMR 分光法、電子顕微鏡解析などによって決定し、原子分解能のレベルで解明する研究である。生体分子が細胞中では動的な性質（ダイナミクス）をもち、他のタンパク質や核酸などと多数の相互作用を持つことを考慮し、単一の実験手段ではなく、複数の構造解析技術や分子動力学（Molecular Dynamics, 以下 MD）などの計算科学技術によるデータを統合することで、分子メカニズムを根本的に理解する研究へと発展している。創薬など応用的な産業分野に広く貢献する。

(2) キーワード

X 線結晶構造解析、NMR、クライオ電子顕微鏡、X 線自由電子レーザー（XFEL）、SACLA、分子動力学（MD）、計算機シミュレーション、創薬

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

生命を物質としてとらえ、遺伝子情報をアミノ酸の空間情報へとつなぐ。生命を化学と物理のことばで記述するために情報を得る。得られる知見から実際に生体分子が機能する仕組みが説明可能となり、ひいてはそこで起きる化学反応から、信号が生まれ伝達される仕組み、形が生まれる仕組み、力が生まれる仕組み等々について原子レベルから説明が可能になる。対象とする分子は単独で機能するわけではなく、複雑でダイナミカルなネットワークを築き、互いの連関によって生命体の存続を担っている。

ヒトの一つの細胞は数十億個のタンパク質分子をもつと言われており、個々のタンパク質は、その平均相互作用距離が水分子数個分と推定されるような、非常に狭い空間に封じ込められている。このような細胞の中でタンパク質どうしの局在、移動、相互作用、機能調節は時間的・空間的に厳密にコントロールされ、緊密なネットワークを作り、機能の統合、生命機能の実現がなされている。こうした遺伝子の産物、そしてそれらによって作られる分子の相関を 2 次元平面情報ではなく、3 次元の座標として、さらに時間を加えた 4 次元として捉え、生きている姿に近づいて生命を理解するのが現代の構造生物学である。

分子生物学は遺伝子（タンパク質）を記号化して生命システムの中での働きを理解することに威力を発揮したが、現実生命を制御している精緻なしくみを探るには、生命反応を実行している主体であるタンパク質などの機能性生体分子の形（構造）を明らかにする必要がある。

構造生物学で得られた知見の利用としては、創薬が代表的で、中でも身近なものとしては抗インフルエンザ薬であろう。DANA からザナミビル（リレンザ）開発へ、そして、経口薬への転換としてオセルタミビル（タミフル）への開発と進んだのは、原子構造情報が存在し、そこから低分子薬をデザインするための計算機を使ったシミュレーションなどの技術があったからである。このような高い価値をもった成果が手に入るため、構造を得るための測定技術の開発には多くの労力が注がれ、長い年月が費やされている。

[研究開発の動向]

近年の本領域における世界最大規模のプロジェクトとして、米国における構造ゲノムプロジェクト「Protein Structure Initiative (PSI) (2000-2015)」があげられる。巨額の資金が投入され、5年区切りで3つの段階分けて実施された。第一段階は、構造決定のためのパイプラインの整備、技術の向上；第二段階は、第一段階で確立されたインフラを使った構造決定とパイプラインの整備、技術の向上；第三段階は、第一段階、第二段階で確立された事項を継承し、生物学を理解するための構造、生体機能に重要なタンパク質の構造を決定することを目的とした。当該大型プロジェクトは、決して単発終了型のものではなく、その後も個々の研究に関しては、米国国立衛生研究所 (NIH), 米国科学振興会 (NSF) を通じて継続遂行されている。特に基盤的設備である放射光施設、得られた生体分子の原子構造のデータベースである Protein Data Bank (PDB) の運営については、政府がサポートを続けている。こうした背景が現在の米国における構造生物科学・構造解析技術の基盤になっている。

一方、欧州 FP7 では、30 の研究者からなる、EDICT (European Drug Initiative on Channels and Transporters) が形成され、15 M ユーロ (24 億 5 千万円) が拠出された (2008-2011)。このプロジェクトにより、創薬標的のトランスポーターや膜チャネルの構造機能解析が大幅に進んだ。PRIME-XS (2011-2015) のようなプロテオミクスのための基盤整備や、Biostruct-X (2011-2016) のように X 線結晶構造解析による統合された支援システムの構築と提供といった複数の大型プロジェクトが遂行された。次の Horizon2020 では、iNEXT (2015-2019) が実施されている。構造生物科学で得られた基礎的な知見を生物科学の応用へと移行を図ることを謳った事業である。X 線、NMR、電子顕微鏡といった代表的な構造解析技術を使用してデータ取得を行いたい研究者が iNEXT に申請し、専門家による審査を経て採択されると、共同研究を通じて施設での実験を行う仕組みとなっている。インフラ構築の面では、フェーズ 1 が 2010 年からスタートし、現在まで続いている EURO-BIOIMAGING (EuBI) がある。構造生物科学というだけでなく、光学顕微鏡などの生物学、医学におけるイメージングの技術とデータ管理を扱った大型プロジェクトである。このように大型施設を必要とする構造生物科学は、特に欧州において共同利用施設化による運営、その維持における継続した試みがみられる。

日本では、文部科学省大規模研究開発事業「タンパク 3000 プログラム」(平成 13 年～ 17 年) および「ターゲットタンパク研究プログラム」(平成 19 年～ 23 年) などの戦略的な研究推進により、我が国の構造生物学研究環境は、SPring-8 や KEK の放射光施設の高度化および構造解析用 NMR 装置の導入など大きな進展をみせ、同時に若手研究者の育成に成功した。

特定の構造解析技術に特化した大型プロジェクトとしては、米国スタンフォードの LCLS や我が国における理化学研究所播磨事業所における SACLA に代表される X 線自由電子レーザーの開発・運営があげられる。フェムト秒のパルス光を用いて測定を行うため、タンパク質結晶が X 線による損傷を受けていない状態の構造を明らかにすることができる。したがって光合成系など X 線損傷に敏感な膜タンパク質であってもその影響を受けていない状態の立体構造を明らかにできる。非凍結の結晶を用いるため、時間分解能をもった膜タンパク質の構造解析の可能性も開けてきている。欧州の XFEL がある DESY や、スイスのポール・シェラー、韓国の PAL-XFEL よりも早くからユーザー向けの稼働を行っている。中でも我が国の SACLA は国家基幹技術として推進され、実際に 2016 年に Science 誌に報告されたバクテリオロドプ

シンにおける構造変化の研究や¹⁾、2017年にNature誌に報告された光化学系II複合体の反応中間体構造²⁾、2018年のNature誌報告のバクテリオロドプシンのレチナル異性化³⁾など、世界でもトップの成果を継続的に排出し続けている。

構造解析技術で特に大きな進展をみせたのは、クライオ電子顕微鏡技術である。結晶を作製せずに生体分子の画像のみから原子モデルを構築する構造解析技術である。電子顕微鏡で得られた構造のデータベース (EM Data Bank または EMDB) において現在9割以上の登録データは、Thermo Fischer Scientific社の電子顕微鏡によって得られたものである。高い品質の画像が得られるということは言うまでもないが、自動撮影機能や一旦観察した凍結試料を回収して再び観察可能な仕組みなど、ユーザーが非常に高い作業効率でデータ取得することを実現する機能が満載のクライオ電子顕微鏡を販売し、それがこれだけの世界的なデータ量産につながっているのは間違いない。同社のクライオ電子顕微鏡は、海外では米国が最も多く、100台以上が導入され、ついでドイツが30台以上、3位が中国で急激に導入数を増やしている。日本は、4位の英国について5番目である。我が国でも若い研究者が二次元結晶の解析を止めて、最新の単粒子解析法に切り替えることで、国産の日本電子製のクライオ電子顕微鏡を使って膜タンパク質の構造を得ることに成功している。モデリングが可能な分解能に到達したことで信頼性が一気に高まったといえよう。このような流れにおいて結晶が得られないターゲット分子が構造解析対象となり、多くの研究者が利用を希望するようになった。

一方でクライオ電子顕微鏡の高機能高性能化は価格を押し上げ、かつてのように一研究室が保有し維持することは大変困難であり、また望ましくない。そのため、クライオ電子顕微鏡の共同利用施設としての運営が世界的にも取り組みがなされ始め、そのこと自体が2017年には論文となって報告された⁴⁾。それによると、米国のNational Resource for Automated Molecular Microscopy (NRAMM) によってオーガナイズされたクライオ電子顕微鏡大規模施設のマネージメントに関するワークショップが2017年2月にNew York Structural Biology Centerで開かれた。米国だけでなく、EMBLや英国のeBIC、カナダのマギル大学などが参加した。逆にこれまで放射光施設のような組織だった共用施設としての運営がさほど行われていなかったことをうかがわせるものである。

我が国においても、ナノテックプラットフォームや科研費の枠組みでABiSといった取り組みはあるものの、構造生物科学に焦点を合わせた大規模な運営といえば、2017年度から始まったAMEDのBINDS事業であろう。東京大学と大阪大学タンパク質研究所にハイエンドのクライオ電子顕微鏡設備が整備され全国の支援希望者が利用を始めている。他には、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) のクライオ電子顕微鏡施設群が、国内ではずば抜けて充実しており、今後の共同利用の成果が期待される。国産の日本電子製でレベルの高い成果を出している施設としては、大阪大学の生命機能研究科と名古屋大学が管理する施設があげられる。これら全ての施設を合わせても先ほど述べたように世界的には少ない。

NMRについては、過去数年間で動的構造解析やリアルタイム測定の観点から広範な応用展開が図られた。国内ではBruker社の950MHzと800MHzの装置が大阪大学と横浜市立大学に設置され、理研の900MHzや800MHzの装置などを含めて広くアカデミアや企業に公開・使用され、NMRの使用に関するノウハウが浸透している。これらの大型装置は一機関で保持するには維持費や更新費などを含めて困難になってきているのでプラットフォーム化して公開することで応用展開が急速に進展した。高磁場装置やクライオプローブの使用などによる

NMR の高感度化は LC-NMR による代謝化合物のリアルタイムでの構造解析や細胞内の酸化還元状態のモニタリングなど適用範囲を急速に拡大している。また動的構造解析としては東大嶋田グループによる GPCR の動的構造解析や横浜市大西村グループによる天然変性タンパク質の構造解析がある。固体 NMR に関しても大阪大学藤原グループの DNP による高感度化や理研と日本電子や横浜市大と Bruker による高速回転 MAS による材料系の測定は顕著な成果が上がり、タンパク質への適用が急速に図られている。しかし、高磁場装置 NMR 装置の設置は国内ではまだ限られており、高度化の展開はまだ欧米に比して遅れていると言わざるを得ない。特に欧州で非常に成果が挙げられている生化学反応のリアルタイムモニタリングや巨大タンパク質の天然変性領域の解析や固体 NMR による原子レベルでの複合体構造解析など派手ではないが着実に専門雑誌に成果が報告されている。

また次世代 NMR 装置でも日本電子では超高磁場装置の開発を目指しているが、装置の高度化に見合った測定における高感度化や長時間安定性など、特にタンパク質などの高感度測定の点で Bruker に完全に遅れている。Bruker は欧州、特にドイツ、フランス、オランダ、イタリアに加えて最近では英国の支援も含めて着実にタンパク質の実際の測定に適用できる大型装置を開発している現状であり、ただ単に大きな装置一台開発すればよいという日本の現状の間には構造生物学 NMR として相当なギャップがある。超高磁場 NMR 装置として、日本は理研を中心に 1.3GHz NMR 装置一台の開発を 10 年計画で開始した。Bruker は 1.2GHz の販売を開始し 2018 年に 1 号機を導入予定で、既に欧州を中心に 10 台を受注し、アジアでは韓国が発注予定であり、日本は現時点では未発注で最短でも今のままでは 2024 年以降の導入にならざるを得ない危機的な状況である。

X 線結晶構造解析、X 線自由電子レーザー、クライオ電子顕微鏡単粒子解析、NMR の主要な構造解析技術で得られた結果全てと関連があるのが、生体分子シミュレーション技術である。ゲノム解析・遺伝子ネットワークとともに計算機科学分野における一つの主要な項目である。基本的に全原子分子動力学、粗子化分子動力学の 2 つに分かれる。前者のアプリケーションとしては、世界的に普及しているものが数多くあり、AMBER (米国)、CHARMM (米国)、DESMOND (米国)、GROMACS (蘭国)、LAMMPS (米国)、NAMD (米国)、TINKER (米国) などは全て海外で開発されたものである。国内で開発されたものとしては、MARBLE、MODYLAS、GENESIS がある。計算スピードとしては、その手法をハードウェアに組み込んだものが速いのが現状である。粗子化分子動力学法をとり入れたソフトウェアとしては我が国における CafeMol があげられる。構造変化の可視化ができるようになってきたクライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果に対しては、本手法が多く用いられているようである。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

- クライオ電子顕微鏡では、2018 年 7 月に東大のグループが 1.62 Å という驚異的な分解能の解析に成功し、実際にこれまでにない高品質のデータであることがアナウンスされている。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析は、近原子分解能の域を出ないと思われていたが、難結晶性の試料に対して X 線結晶解析を凌ぐデータ取得が可能な時代の到来である。この進化はしばらく続くものと思われる。
- クライオ電子顕微鏡による構造解析は日進月歩で進化しているため、構造の解像度も従来

とは比較にならないほど向上している。そのため、*de novo* 解析 (既存の X 線構造を用いない) で立体構造が解かれている例が増えている。しかし、一方で原子解像度の X 線結晶構造を用いた *flexible fitting* によって構造精密化できる場合も多い。*Flexible fitting* においては、分子動力学などのシミュレーションを使って X 線結晶構造をフレキシブルに扱い、ターゲット構造へとつなげる。

- シミュレーションの長時間化にともない、分子力場 (エネルギー関数) の信頼性の問題が顕在化している。指摘されている問題は、1) タンパク質間相互作用が強すぎる、2) 天然変性タンパク質がよりコンパクトな状態として予測されている、3) タンパク質・脂質膜の相互作用も強すぎる、ことなどである。力場の改善は続くものの、ベイズ統計などビッグデータ解析の手法を取り入れることによって、シミュレーションで避けることのできないモデル依存性を減らした動的構造解析を行う可能性が見えてきた⁵⁾。
- 構造多形解析へのクライオ電子顕微鏡、AFM、X 線自由電子レーザーを使った取り組みは、世界的に大きな一つの流れとして始まっている。また、大きさ 68nm の非常に複雑な巨大分子フィコビリソームの構造がクライオ電子顕微鏡解析によって 2017 年に *Nature* に報告されたように従来は不可能と考えられていた複雑で明かに結晶化不能な分子についての解析の取り組みもなされている。
- 細胞や組織環境下での構造解析が次世代の構造解析技術として注目されており、それには、半導体など無機物の切削に使用していた *Focused-Ion Beam (FIB)* にクライオ技術を加えた装置の展開がみられる。国内でも、OIST に 1 台あり、新型が東大と阪大蛋白質研究所で 2018 年度から稼働している。
- X 線結晶構造解析、NMR についてはデータ取得から解析まで急ピッチで自動化が進んでいる。ピクセルディテクターなどの導入により放射光施設ではスピード自体もかつてとは比較にならないくらい進んでいる。クライオ電子顕微鏡は、自動化が遅れており、現在各地で開発の努力がなされている。特に凍結方法のロボット化についての開発が、海外を中心に話題になっている。
- 細胞内で生じる相分離 (*Phase Separation*) が多くの生命現象と関係していることが分かってきた。細胞質のみならず染色体においても DNA、RNA と天然変性タンパク質との相互作用で相分離・相転移的に大きな変化が生じている。
- エクサフロップスの計算パワーによって、化合物ライブラリからのより早い結合定数計算が試みられている。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

- 英国の放射光施設 *Diamond* や、スタンフォードの *SLAC*、そして我が国のエネルギー加速器研究機構 (KEK) には、ハイエンドのクライオ電子顕微鏡が導入され、運営が始まっている。特に放射光施設では、共同利用施設としての運営のノウハウが蓄積していることから、スムーズに導入と運営開始が進んでいる。これからこうした放射光施設とクライオ電子顕微鏡の物理的にも同一箇所での運営は益々進むものと思われる。
- AMED における BINDS 事業 (平成 29 年度～) の中の構造解析ユニットは、ターゲット分子の発現・精製から X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析、NMR、計算機シミュレーションによる支援、データベースによる支援と、本領域における全てをカバーし、実

質的に日本における構造生物学を牽引している。

- 自動化やクライオ電子顕微鏡の参入によって加速的に増えている構造生物学の成果は、Protein Data Bank (PDB) によって人類の財産として整備管理されている。日本では PDBj として、他の米国 (RCSB PDB)、欧州 (PDBe) と連携して早くからこの PDB の管理に貢献し世界的にも大きな役割を果たしている。現在では、クライオ電子顕微鏡の大規模生データを登録する EMPIAR が進められ、まだ十分ではないが、今後スタンダードになってくると思われる。この EMPIAR にも PDBj は貢献している。それによって計算結果の妥当性の検証等が進むものと期待される。
- 電子顕微鏡技術、光学顕微鏡を組み合わせた相関構造解析がライカなどの企業がシステムティックな装置を開発していることで汎用性が広まる可能性がある。国内でも日本電子と日本光学が共同で開発を行っている。これも次は細胞・組織環境下での分子形状観察という流れである。
- NEDO においてクライオ電子顕微鏡の凍結装置に関する新型の開発が行われている。
- 日本電子によって、高性能の冷陰極電界放出型電子銃を備えたクライオ電子顕微鏡装置の開発がなされており、さらに高分解能化進むものと期待されている。

(5) 科学技術的課題

総じて、これからの技術展開のキーワードは、「細胞環境」、「相関解析」、「自動化」、「大規模データ処理」と考えられる。大きな流れとしては、特定の手法に依ることなく、生物学、医学の研究者が研究を展開できる環境が整備されていく必要がある。

- 非常に速い分子の動きについて、光応答するものについては SACLA で解明が進んでいる。これを光ではなく、基質との結合など、より一般化していくことは課題である。結晶の中の分子すべてを同調させるのは難しい課題である。
- 結合の弱い相互作用をする分子同士の構造生物学的研究は、非常にチャレンジングなテーマで、様々な学会、研究者間の議論で頻繁に出てくる話題である。生体内では、多くはこうした相互作用であると考えられ、計算機シミュレーションとあわせて新しい解析方法のアイデアを創出することが先決である。
- 天然変性タンパク質の近年の報告を考えると、生理的な役割が大きく、新しいアプローチが期待される分野である。細胞環境の中で初めて機能を測定できるような構造について、構造解析は急務となっている。これまでも紐状天然変性領域の一部が標的タンパク質に結合してヘリックス等を取る場合や伸びた紐として結合する場合は溶液 NMR や SAXS 等で解析されている。しかし最近天然変性領域同士が非常に強く特異的にしかも動的に結合する例が報告されてきた。動的な挙動は NMR で解析され、その相互作用部位も NMR で同定できるようになってきたが、動的な複合体構造をどのように記述し表示するかに関してはまだ研究途上である。動的な複合体構造に関しては MD 計算によるシミュレーションと一緒に表示する例が多いが天然変性領域の MD 計算もまだ研究途上であり NMR とタイアップした解析が必要である。計算量だけでなく、天然構造と変性構造の両方を再現できる分子力場 (エネルギー関数) の開発が必要である。
- エピゲノムの動的な構造解析 (超分子タンパク質複合体、細胞内タンパク質、タンパク質と協同してネットワークを形成する RNA、タンパク質複合体等の構造とダイナミクス解

析)が急務である。エピゲノムはDNAのメチル化やヒストンの化学修飾などの分子生物学的解析が急速に進展し、発生、分化、老化に伴って変化する実態が分かって膨大なデータが蓄積されつつある。それに伴ってiPS細胞やES細胞更には各種のがん細胞で解析も進行している。しかしエピゲノムの構造的な理解はほとんど進行していない。ヒストンの化学修飾は殆どの場合ヒストンテイルの天然変性領域であり化学修飾によりヌクレオソームのコアの構造はほとんど変化しないので、結晶構造やクライオ電顕構造ではエピゲノムの実態に迫ることは非常に困難である。ヌクレオソームを溶液NMRで解析するとヒストンテイルのみが観測でき化学修飾による動的構造の変化を追跡できる。ここ数年間で溶液NMRによる研究が急速に進展しているのでNMRによる動的構造解析で老化やがん化によるクロマチン基本構造の変化の実態を解明できる可能性が高い。

- 大腸菌など原核生物の1細胞を、原子・分子解像度で再構築し、そのダイナミクスとともに分子機能とそのネットワークを理解する。原核細胞のみならず、真核細胞におけるオルガネラなどもターゲットになりうる。
- MAS高速回転固体プローブの高速での試料管の安定性や微量試料のハンドリングや更にはクライオプローブの開発は急務を要する。これらが解決すると極微量の巨大タンパク質で天然変性部位と構造をとっている部位を別々に観測でき結晶構造やクライオ電顕構造と比較することによって巨大タンパク質の全体の動的構造を解析できることになる。装置の大型化ではなく付属装置の高感度化や安定化の開発が急務であるが、それら付属装置だけでも数千万円になる現状では一機関で維持管理するのは困難であろう。
- In cell NMRは細胞内のタンパク質の挙動を観測するNMR手法である。細胞内ではタンパク質が限られた空間に存在し、通常のin vitroにおける環境と大きく異なる分子混雑環境を形成している。そのような条件下でのタンパク質の機能発現を解明することは、生命科学に大きく貢献すると同時に、医薬品候補化合物が、細胞内でどのように薬効を発揮するか、創薬開発研究においても重要な課題である。したがって、細胞内タンパク質のリガンド、エフェクター相互作用は興味のもたれる分野あるが、in cell NMRの感度的限界により、十分な解析が行われていない。今度、測定法、試料調整法などを改良することで、in cell NMRに高感度測定・解析法の確立が必要になる。

(6) その他の課題

今後の日本の状況を考えた際、特に医学生物学研究者の計算機資源や計測機器へのアクセスやノウハウの取得を容易するための研究支援体制などのプラットフォーム整備が喫緊の課題である。京を利用することができるものの、与えられた計算資源は十分ではなく、また多くの待ち時間が発生するために真に挑戦的なシミュレーションを実行することが困難であり、この分野の計算に適した計算機センターや拠点の整備が必要である。

分野間連携では、生物学・医学研究者の積極的なプロジェクトへの参加と、X線、NMR、電子顕微鏡、中性子、1分子解析、計算科学、物理計測、ケミカルバイオロジーなどの研究者との密接な共同研究を促す仕組み作り。単に連携するだけでなく、複数の計測・シミュレーションの結果をいかに統合して動的な構造を得るかが最も重要である。

人材育成は、X線、NMR、電顕で大問題である。利用する人口、つまりユーザーは増えているが、装置の面倒や解析の本質を理解している専門家が逆に減っている。もともとそのよう

な縁の下の力持ちとしての専門家志望の人口が少ない上、一朝一夕に育たない人を雇用期限のために雇止めしなければならない。いくら施設に貢献しても、アカデミックポジションでは、今もって論文でしか判断されない。それならば、他人の仕事に貢献するより自分の成果のみに集中せざるをえないというのが現状である。このような歪な現場の切り盛りには、施設マネージャー自体も疲弊する。かつての技官とは違った、アクティブな現場を支える専門家の育成が必要である。

産学連携においては、共同開発等は良いが、企業から構造解析を依頼されるときに大きな矛盾した問題が上がっている。秘匿案件の扱いである。もしも、全く公開不可、成果占有となると、任期付研究員、任期付職員にはまったくキャリアパスに生かせない時間と労力の無駄な業務となってしまう。研究費をもらったところで、機械の維持費には使用できても、キャリアパスには全くつながらない。依頼者を教育して自分で測定・解析してもらおうというのは、もっと負担である。よって、時間貸しというのは名目だけの運営になる。サービスを企業化することで、教育され、習熟した社員が請け負って、施設は大学のものを使用料を払って使用するというのが理想的だが、それは、OISTでは実現しているものの、国立大学法人では教育機関として難しい。しかし、産業界の期待と利用を考えるとこうした仕組みの実現は急務と思われる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> • SACLA によるバクテリオロドプシンのレチナールの構造変換や光化学系 II の反応中間体の構造解明など経時変化に相当する構造解析において世界をリードしている。 • X 線結晶構造解析では、東大濡木等が世界のトップレベルの成果をコンスタントに出し続けている。 • 動的構造研究では東大嶋田、横市西村が成果をあげている。 • クライオ電子顕微鏡は、AMED による装置整備がなされるまで単粒子解析を国内で行う適切な装置がなかったため、完全に出遅れた。これまで二次元結晶を使った電子線結晶学で解析しようとしていたものを単粒子解析に切り替えたところ、レベルの高い成果が出た例が先行した。現在、整備された装置による成果が集まりつつある。 • 拡張アンサンブル法の開発や粗視化分子モデル開発では世界の最先端を走ってきた。 • 京に向けた超並列分子動力学のソフトウェア開発がなされ、細胞環境を考慮したシミュレーションやヌクレオソーム・クロマチンの計算が推進され、優れた研究成果を挙げた (GENESIS : RIKEN)。 • データベースとして PDBj が大きな役割を果たし続け、その品質を維持している。
	応用研究・開発	△	↘	<ul style="list-style-type: none"> • NMR の高感度・高磁場の装置開発が遅れている。 • 日本電子によるクライオ電子顕微鏡開発はほぼトップレベルに追いつきつつあるが、現在世界を占有している装置と比して特色ある機能に欠ける。 • 創薬応用に向けた MD シミュレーションは京の利用などでようやく進んできたが、それまでは世界的なレベルから遅れていた。 • 日本は、MD 専用計算機開発では元祖にあたる。現在は MDGRAPE-4 を開発中であるなど、継続的に世界トップレベルの開発が進められている。

米国	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> メーカーによる電子直接検出器の開発。 大量のハイエンドクライオ電子顕微鏡の導入による構造生物学の促進。 UCSFの Yifan Chen や NIH の Sriram Subramaniam によるクライオ電顕原子分解能解析のパイオニア的業績と、その継続的な成果によるリーダーシップ。 メジャーなターゲットの構造解析によるトップジャーナルへの継続的な成果。 研究開発の歴史は長く、様々な分子力場関数 (AMBER、CHARMM、OPLS) が開発されているだけでなく、分子動力学パッケージ (AMBER、CHARMM、OPLS、NAMD、DESMOND) や計算手法も次々に開発されている。近年では GPU を用いた高速化に成功している。 Wet 実験と連携したプロジェクトや、数理・物理と連携したプロジェクトなどが推進されており、継続的な発展が見込まれる。
	応用研究・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> LSI (スタンフォード) による XFEL の開発促進。 クライオ電顕において最大のネックとなっていた試料凍結操作において、新しい装置の開発を行い、注目を浴びている。 NMR の開発に関しては世界トップ。 基礎研究で開発された計算手法やモデルが商用パッケージに導入されるなど、応用研究に向けた開発も行われている。 創薬応用に向けた研究も数多く行われている。 D.E.Shaw research における先進的な MD 専用計算機の開発。数十台の Anton、Anton-2 による創薬応用の推進など、充実した研究環境が整備されている。
欧州	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> クライオ電顕では、英国 MRC が世界を牽引。スプライソソームなどの非常に複雑な分子でも成果。その運営においても eBIC 施設など英国は世界をリード。 分子動力学パッケージ Gromacs の開発に集中しており、その追加機能として粗視化分子モデル MARTINI や、Metadynamics を利用するためのモジュールとして Plumed などが開発されている。
	応用研究・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 現在のクライオ電子顕微鏡 (サーモフィッシャーサインティフィック) の本体はオランダにて開発され、次世代に向けた改良も進行中。 現在世界標準でなおかつ 2018 年に X 線結晶構造解析に匹敵する高分解能を達成した解析ソフトウェア RELION も英国 MRC にて継続開発中。 シミュレーションだけでなく、タンパク質構造分類、構造比較に長い研究の歴史がある。その知見をいかした薬剤候補分子の結合予測などバイオインフォマティクスを中心とした創薬応用開発が多く行われている。
中国	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 意図的にトップジャーナルを狙ったターゲット分子の構造解析 (ほとんどクライオ電顕による) を近年量産している。フィコビリソームのように解析不能と思われていた分子においても成功。非常に成果が目立ってきている。 クライオ電顕の近年の導入はアジアで日本を抜いてトップ。 構造生物科学の学会等の運営もアジアをリード。 近年、自前の専用コンピュータ・ソフトウェアを開発しようとする計画がある。大きな予算的措置がありうる。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 創薬応用の Dry 計算・Wet 実験の連携が増えている。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析が盛んだが、データ解析は英国と共同で行っている場合が多い。
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> KBSI にクライオ電顕を導入し、ポスドク経験者らによる解析が構造解析が進行中。 タンパク質構造予測において近年優れた成果をあげており、CASP という構造予測コンテストでは上位の成績を占めている。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> MD シミュレーションを用いる研究者の数は多くない。 創薬応用も増えつつあるが、目に見える成果を上げるにはまだ時間がかかるものと思われる。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発 (プロトタイプの開発含む)・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↑：上昇傾向、→：現状維持、↓：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Nango, E., et al. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science* 2016, 354, 1552-1557. doi: 10.1126/science.aah3497.
- 2) Suga, M., et al. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* 2015, 517, 99-103. doi: 10.1038/nature13991.
- 3) Nogly, P., et al. Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond x-ray laser. *Science* 2018, 361, pii: eaat0094. doi: 10.1126/science.aat0094
- 4) Alewijnse, B., et al. Best practices for managing large CryoEM facilities. *J. Struct. Biol.* 2017 Sep;199 (3) :225-236. doi: 10.1016/j.jsb.2017.07.011.
- 5) MSMBuilders HP (マルコフ遷移モデルビルダー)、<http://msmbuilder.org/> (2017年2月アクセス)

2.1.5 オミクス（プロテオミクス、メタボロミクス、多階層オミクス）

(1) 研究開発領域の定義

生体内の各種分子を網羅的に解析し、生命現象を包括的に理解する手法をオミクス（オーム解析）と呼ぶ。近年、計測技術が急速に高度化し、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなど、各階層におけるオミクスデータが大量に得られつつある。本研究開発領域は、これら個々の階層におけるオミクスのさらなる高度化およびデータ解析技術の開発を進め、さらには複数階層を同時に解析するマルチオミクス、階層横断的なネットワークを明らかにするトランスオミクスへとつなげて、分子メカニズムから生理学的現象まで、生命現象を全体的なシステムとして理解・制御し、医療・創薬などに応用することを目的とする。

(2) キーワード

オミクス、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、多階層オミクス、トランスオミクス、統合オミクス、質量分析、ビッグデータ

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

生命は、DNA、RNA、タンパク質、代謝物などから形成される多階層にわたる大規模な分子ネットワークから成り立っている。近年のライフサイエンスと、次世代シーケンサーや質量分析計などの計測技術の驚異的な進歩により、生物の遺伝子や酵素、代謝物等の相違や変化を包括的かつ網羅的に解析することが可能になってきたが、分子の相互作用まで含めたネットワークの全貌は明らかにされていない。また、創薬に目を移せば、薬の7～8割は十分な分子プロファイリング（薬理薬効機序を理解するための化合物標的とその表現型パスウェイ情報）が得られていないのが現状である。すべての生命現象や各種疾患は本来、分子等の相互作用を含んだ網羅的ネットワークシステムとして包括的にとらえるべきものであり、体系的な分子プロファイリング技術の基盤構築は、創薬全体の効率化を図る上でも最重要テーマである。これまで行われてきた、表現型を特定の遺伝子やタンパク質や代謝物でとらえそれらの機能解析をする、いわゆる一対一の関係の解析ではなく、生体反応全体を網羅的にあらゆる方向からとらえる多次元解析を行うことにより、これまで明らかにされていなかった相関関係を見出すことが近年着実に可能になりつつある。将来的には複数階層にまたがるマルチオミクス、トランスオミクスを実施することで、様々な分子の動的変化や個体差、生体ネットワークへの影響、薬剤応答などを予測する信頼性の高い方法を確立することが期待される。

[研究開発の動向]

個別の原因遺伝子や分子に病態を帰着させる従来の方法による理解はほぼ限界に達しており、多因子を系統的に捉えることによる疾患・治療の理解が望まれている。網羅的な解析手法であるオミクス解析はこの課題を解決する重要な技術として注目されており、単独階層のオミクスデータについては、医療への応用が急速に普及している。ここからさらに生命を全体的システムとして捉えるために、背後にある多階層分子ネットワークを明らかにしようとする試みが、近年注目されている。

多階層オミクスを実現するためには、各階層におけるオミクス技術の深化が必須である。単独階層のオミクスについては遺伝子を対象としたゲノミクスが最初に発展し、2000年代前半にはヒトゲノム遺伝多型のカタログが作られ、2014年には1000ドルゲノム（個人のヒトゲノム全配列の解読コストを1000ドルにする試み）が達成された。ビッグデータを取り扱う数理・統計・情報学的手法の成熟にも後押しされ、ゲノム、メタボローム、プロテオーム、トランスクリプトーム、エピゲノム、マイクロバイオーム等、それぞれの階層に着目したプロジェクトが世界各国で実施されている。以下、近年の技術革新が著しく、今後の多階層統合オミクス実現の鍵となりうるプロテオミクスおよびメタボロミクスを中心に、取り上げたい。

【プロテオミクス】

プロテオミクスは、主に質量分析計を用いてタンパク質の発現、翻訳後修飾、局在、あるいは他の分子との相互作用を網羅的に計測する領域である。ここ10年ほどで一定の技術的成熟を果たし、基礎生物学から医学領域において重要な役割を担っているが、その一方で、装置の高感度化や測定原理、さらには新たな前処理法など技術開発的な研究も活発に行われており、そのアプリケーションの幅が広がっている。

プロテオーム解析は2次元電気泳動によるタンパク質ディスプレイと高感度な質量分析計によるタンパク質同定を組み合わせることで始まった。当初、質量分析計でタンパク質を同定するには、酵素消化によって得られる複数のペプチド断片質量の組み合わせをタンパク質配列データベースに照合するペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法が主流であり、目的タンパク質が単一成分まで精製されている必要があった。やがて、液体クロマトグラフィーと連結したタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた自動 MS/MS 解析 (data-dependent acquisition: DDA) の実用化と、得られる MS/MS スペクトルを用いたペプチド配列同定アルゴリズムの開発によって、多数のタンパク質が含まれる試料をまとめて酵素消化することで得られたペプチド混合物を直接分析できるようになり、いわゆるショットガンプロテオミクスとして普及していった。その後、質量分析計の加速的な技術開発によって、高い質量精度や高分解能を持つ MS スペクトルを高速・高感度で取得可能になり、全細胞抽出物のような極めて複雑な試料であっても、DDA を用いたショットガンプロテオミクスによって数千のタンパク質を一度に同定することが可能となった¹⁾。さらに、各種安定同位体標識法の開発による比較定量技術の確立によって、大規模な比較定量解析が可能となった。最近では、高分解能質量分析計の普及と液体クロマトグラフィーの再現性向上に伴い、未標識ペプチドの MS シグナル強度を独立した測定間で比較可能となりラベルフリー定量法として普及している。また、化学標識を用いた安定同位体標識法において多重標識法が開発され一度に10種類の検体を混合して計測が可能となり、コホート研究などへの適用が行われている。

DDA をベースとしたプロテオミクスの基礎技術開発の多くは欧米で行われているが、これはプロテオミクスで使われる質量分析計ベンダーの開発拠点が欧米を中心としていることが主な要因であると思われる。日本では、ショットガンプロテオミクスで必須である酵素消化における効率の向上や超高性能カラムによる高深度プロテオミクス解析技術の開発など前処理技術の開発が盛んである。

DDA を用いた網羅的なタンパク質同定の流れと並行して、特定のペプチドだけを正確に定量するターゲットプロテオミクスの技術基盤が確立された。これは、古くから低分子化合物の定量などに利用されていた multiple-reaction monitoring (MRM) /selected reaction

monitoring (SRM) をペプチドに適用したものである。また、最近では親イオンの選定を行わずに、試料中に含まれる全てのイオンに対して MS/MS スペクトルを継続的に取得する手法である data-independent acquisition (DIA) が開発され DDA の網羅性と MRM の定量性を兼ね備えた新たな定量プロテオミクス技術として注目されている²⁾。MRM と DIA は共に測定前あるいは測定後に解析対象となるペプチドの MS/MS スペクトル情報が必要であり、そのための情報集約のためのリポジトリやデータベース、さらには大規模リソース (合成ペプチドや組み換えタンパク質など) 開発がここ数年盛んに行われている。合成ペプチドを用いた戦略は米国および欧州で盛んであるが^{3,4)}、組み換えタンパク質を用いた手法は日本の貢献度が高い^{5,6)}。

タンパク質発現解析に加えて、タンパク質の機能に直結した様々な情報取得もプロテオーム研究の重要な対象である。例えばタンパク質間で生じる相互作用の解析や、各タンパク質上で生じるリン酸化、アセチル化、ユビキチン化、さらには糖鎖付加などの各種翻訳後修飾の網羅的解析が盛んに行われている¹⁾。特に、重要な翻訳後修飾であるリン酸化は極めて特異的なリン酸化ペプチド濃縮技術が開発され、プロテオーム解析で最も実用化が進み幅広い応用がなされている。また、アフィニティー精製を用いたタンパク質間相互作用解析 (AP-MS) は、質量分析計によるタンパク質同定が実用化された時点から盛んに行われている。近年では質量分析計の高性能化に伴って、より高速に分析が可能になったことから、多数のペイト・タンパク質 (相互作用を知りたい元タンパク質) を対象とした大規模化が進んでいる^{7,8)}。これまでアフィニティー精製一辺倒であった相互作用解析にも様々な新規技術が開発され、より広い範囲の相互作用を解析可能になっている⁹⁻¹¹⁾。また、タンパク質の活性や構造の変化を評価するための手法も開発されており、基礎生物学から創薬など様々な分野への応用が期待されている^{12,13)}。機能プロテオミクスの基礎技術開発に関しては、欧米に限らず世界的に多種多様な技術が開発されている。その利用に関しては大規模あるいは網羅的な研究が欧米で盛んであるのに対し、日本やアジア諸国では比較的中小規模な解析が行われている傾向にある。

上述したように、プロテオーム解析の要素技術が揃ったことで、大規模にプロテオームの全体像を俯瞰する研究が可能となった。生体内のどの部位にどのようなタンパク質が発現しているかを網羅的に取得する、プロテオームのカatalog化プロジェクトが盛んに行われている。特に、ヒトに関してはヒトプロテオーム機構 (HUPO) 主導する国際連携研究であるヒトプロテオームプロジェクト (Human Proteome Project: HPP) が 2010 年より開始された。

【メタボロミクス】

1970 年代頃までに教科書に載るような代謝経路がほぼ解明し尽くされて以来、「代謝」は概ね完成された分野だと思われていた。しかし近年、がん、免疫、幹細胞、エピジェネティクス等の分野で代謝が「再発見」され、“代謝ルネッサンス”の観を呈している。このような代謝分野の研究の再興隆はメタボロミクスに負うところが大きい。

メタボロミクスは、上流のプロテオームおよびゲノム情報の解析では解明できない生体反応を明らかにできるのではないかと、その期待感から表現型解析の有望技術とみなされている。すなわち、メタボロミクスは、表現型としては現れにくい生体内の変化を代謝物の変化として表現できる、高解像度のフェノタイピングシステムといえる。また、遺伝子配列情報とは独立に運用可能であり、ゲノムプロジェクトが終了していない多くの生物にも適用が可能であることから、応用範囲の広がり期待が高まっている。

メタボローム計測技術の高度化により特に発展しているのが、がん代謝の分野である。が

ん細胞の代謝については、酸素存在下（好氣的環境）においても酸素を使わない解糖系（嫌氣的代謝）が亢進する Warburg 効果が古くから知られていたが、メカニズムは長年明らかにされていない。好氣的代謝が嫌氣的代謝にシフトする仕組みについて近年メタボロミクスを生かした研究が活発に行われており、関連遺伝子や酵素が明らかにされつつある¹⁴⁾。また、発がん等に関与するがん代謝作物 (oncometabolite) も複数発見されている^{15,16)}。このような代謝状態のシフトはがんのみならず、免疫系細胞でも見つかっており¹⁷⁾、免疫代謝 (immunometabolism) と呼ばれる分野が勃興しつつある。さらに、幹細胞の運命決定にも代謝が関わっていることが報告されている¹⁸⁾。

シグナル伝達や転写制御と異なり、代謝は全ての分子が相互に関連しており、その相互作用を背景とした動的挙動を示すことも特徴的である。たとえば、任意の分子の増加は必ずしも合成速度の増加によるものではなく、分解速度の減少による可能性もある。また、ある酵素の濃度の変化は必ずしも代謝フラックスの変化と比例していない。したがってパスウェイの制御をメカニスティックに議論するためには分子の量よりもそれを合成・分解する各反応の速度を知ることの方がより重要であり、近年メタボロミクスを含む各オミクス階層で速度を測定する技術が提案されている。炭素 13 や窒素 15 など標識した代謝物質を細胞に取り込ませ、メタボローム測定をすることにより、パスウェイを流れる代謝物質の時間当たり流量（代謝フラックスまたは代謝流速）を求める手法「代謝フラックス解析 (Metabolic Flux Analysis)」がスイス連邦工科大の Uwe Sauer によって近年確立された。炭素 13 標識メタボロームによる代謝フラックス解析は当初、定常状態にある微生物細胞を主たる対象としていたが、非定常状態の動物細胞についても代謝フラックスを求める試みがなされている^{19,20)}。これらの試みにより、見かけ上減少している物質であっても、それを合成する反応の速度が増加（すなわち活性化）しているような酵素反応が珍しくないことが明らかとなった。

メタボロミクスにおいては、解析対象の代謝物が親水性から疎水性までの非常に幅広い性質を有し、またそれら多成分の一斉分析であるために、その技術は複雑なものとなっている。サンプル調製、機器分析、データ解析がメタボロミクスの重要行程であるが、それぞれの行程の個々の手法において特異的な技術を必要とするため、実際にメタボロミクスを実施するためには目的に応じて好適な技術を選択する必要がある。また、信頼性の高い解析を行うためには、それぞれの技術を良く理解し効率的に組み合わせたシステムを構成することが重要になる。そのため、メタボロミクスは必然的に多岐にわたる分野から構成される学際領域研究となるが、それぞれの技術を理解し総合的に運用することは容易ではない。これが、当初メタボロミクスが一般的な技術として定着しにくかった要因の一つである。この複雑さを乗り越えるべく様々な技術開発が行われているが、現状は試料調製、機器分析、データ解析における種々の実験誤差のために微少な差を捉えることが難しく、今後の課題となっている。企業（特に製薬業界）においてメタボロミクスが積極的に導入される段階へは、この課題を乗り越える必要がある。この現状を打開すべく、Metabolomics Society が主導してメタボロミクス技術の標準化やデータ統合を目指した取り組みを試みている。日本においても、有志のメタボロミクス研究者が、メタボロミクスデータ統合に向けた代謝物相対定量値の実験室間比較プロジェクト Japan Metabolome Technical Challenge Consortium を実施しており、その結果を第 11 回メタボロームシンポジウム、MSP2018 で報告した。

【多階層オミクス (マルチオミクス、トランスオミクス)】

環境または遺伝的ストレスに対する生命システムの応答の正確な全体像を得るためには、ゲノム情報の他に、転写情報、プロテオーム情報、メタボローム情報の測定が必要となる。多階層にわたるオミクス情報を接続して理解するためには、数理情報学的手法が必須である。情報・数理・工学的手法を導入し、生命現象をシステムとして理解することを目的とした研究分野は **Systems Biology** と呼ばれ、2000年代から急速に進展し、各国で解析のためのセンターが整備されてきた。数理モデルとしては、ヒト代謝系の定常状態モデル **Human metabolism reconstruction**^{21,22)} や、Covertらによるマイコプラズマモデル²³⁾ など、全細胞規模 (ゲノムスケール) のものが現実的に構築可能な段階にきている。また、モデルの記法として、システム生物学のコミュニティで **Systems Biology Markup Language (SBML)** が整備され広く用いられているほか、SBMLで記述されたモデルのシミュレーションを行うためのライブラリとして慶大・舟橋らによって **libSBMLsim** が公開されるなど、基盤の整備も進んでいる。近年の生命科学においては、システム生物学を含むデータドリブンの解析はすでに世界的に用いられているアプローチであり、数々の発見にもつながっている。大規模オミクスデータが得られるようになり、ネットワークそのものの構造を評価するような解析や、機械学習を用いた解析など、新たな解析手法も野心的に開発されている。定量的な多階層オミクスデータを取得し、そのネットワークを再構築することで理解しようとする「トランスオミクス」の応用研究においては、日本が世界をリードしている²⁴⁻²⁶⁾。数理情報学的手法によって再構築されたネットワークの整合性を評価する方法のひとつとして、シミュレーションを行い時系列データと比較する方法が近年実践されている。例えば、Linkらは大腸菌から得られた時系列メタボロームデータを説明する未知アロステリック制御経路の仮説を実装した数千の数理モデルを用いてシミュレーションを行い、赤池情報量の意味で当該時系列メタボロームデータを良く説明するモデルに含まれる未知経路について、実際に存在することを立証した²⁷⁾。このように、生命システムについて未知の経路等の存在を予言できるモデルが構築可能となっており、今後の発展にも期待が持たれる。

一方、多階層オミクスデータを統合して解釈することは未だチャレンジングな領域であり、データ取得方法と情報数理的解析法とを合わせてさらなる技術開発が望まれる。データ取得については、スループット、定量性、再現性をさらに高める必要があり、これまで行われてこなかった地道で詳細な条件検証と、そのデータに基づいた技術開発を再度行うことが重要である。一部のオミクスデータについては、すでに関連付けや統合による成果が報告されはじめている。例えば、プロテオミクスではこれまで質量分析データを標準的なタンパク質配列に対して検索することが行われて来たが、近年、ゲノム情報から得られる様々な変異や読み枠を考慮した配列データベースに対して検索を実施するプロテオゲノミクスが試みられている。実際、がんにおけるゲノム変異の意義の理解や新規タンパク質の発見などの成果が米国を中心に挙がっており^{28,29)}、今後主流となるプロテオミクスの利用法となることが予測される。メタボロミクスを軸とした多階層オミクスとしては、慶應義塾大学の曾我らによるがん代謝の解析¹⁴⁾、スイスイタリア大学 (**Universita Svizzera Italiana**) の Lanzavecchia らの免疫代謝研究¹⁷⁾ などが報告されている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

● 定量プロテオームのための基盤整備

ターゲットプロテオミクスやDIAによる定量プロテオーム解析を行うためには、ペプチドの開裂パターン (MS/MS スペクトル) や液体クロマトグラフィーでの溶出時間などの事前情報が必要である。これらの事前情報はリポジトリに集められたデータからある程度は収集できるが、発現量が低いタンパク質などは高質のMS/MS スペクトルが取得できないことも多い。このような状況を打破するために、ハイスループットなペプチド化学合成技術や、cDNA ライブラリと試験管内タンパク質合成技術を用いた大規模組み換えタンパク質合成技術を利用することで、人工プロテオームを作製しこれを対象に理想的なMS/MS スペクトルを取得する試みが行われている。このようなアプローチによって、ゲノムがコードするあらゆるペプチド配列を評品として取得可能となり、さらにはターゲットメソッドの構築や最適化が可能となった。特に、2016年から2017年にかけて、ヒト人工プロテオームを用いた質量分析データの取得が複数報告されており^{3,4,6)}、今後は他の生物種への展開も予測される。

● プロテオミクスによるタンパク質構造特性の解析

タンパク質の構造や活性などに関する情報を網羅的に取得することもプロテオーム研究の大きな課題である。近年、タンパク質の構造状態をプロテアーゼ感受性や熱安定性などを指標に評価する手法が開発され、他のタンパク質や低分子化合物との相互作用の解析に利用する試みがなされている^{13,30-33)}。これらの手法は、タンパク質の構造に関する具体的な情報を得ることはできないが、多数のタンパク質の構造変化を一斉に検出することができるため、事前に目的タンパク質の精製を必要とする従来の構造生物学的手法を補完する技術であり、非常に注目されている。

● 代謝物質によるシグナル制御

従来代謝産物はシグナル伝達や遺伝子発現などの制御カスケードの下流の存在と見なされてきた。しかし近年、代謝物質がシグナル分子や転写因子などと相互作用することによりシグナルの受け手のみならず発信元としての役割を併せ持つことが明らかとなりつつあり³⁴⁾、代謝物質によるシグナル分子の制御に広い関心が集まっている。mTOR, AMPK など代謝センサーとなるシグナル分子はそれぞれアミノ酸、AMP など代謝物質の存在量によって活性が変わることが明らかにされている。また、代謝物質と転写因子との相互作用については、原核生物では一般的であったが、質量分析計を用いた技術により高等生物においても多数発見された¹⁷⁾。たとえば腸ではAryl hydroxycarbon receptor (AhR) がキヌレニンと結合することで複数の遺伝子の発現を制御し、腫瘍形成メカニズムの一端を担っていることが見出されている³⁵⁾。代謝物質によるシグナル制御として、さらに、腸内微生物叢が分泌する代謝物質と宿主動物の細胞との相互作用にも注目が集まっている。例えば、ルクセンブルク大のThieleらは773菌種のパスウェイを統合し、宿主と代謝を介して相互作用するモデルを構築し³⁶⁻³⁸⁾、微生物群と分泌代謝物質をメカニスティックにつなぐ重要な成果として注目されている。

● 多階層オミクス

プロテオームやメタボロームなど質量分析計を主要解析基盤とするオミクス計測技術の成熟を踏まえて、近年、複数のオミクス階層に対する計測を実施し、これらのオミクス階層間の関連性を明らかにすることが可能となった。先述の、がん領域におけるゲノミクスとプロテオミ

クス^{28,29)}、メタボロミクス¹⁴⁾の統合や免疫細胞の制御に関わるメタボロームとプロテオームの解析¹⁷⁾の他にも、mRNAとタンパク質³⁹⁾、ゲノム変異とタンパク質の発現やリン酸化、タンパク質のリン酸化と代謝物⁴⁰⁾などの異なる階層のオミクスデータを繋ぐことが盛んに行われている。システムズバイオロジーの方法論に基づいて遺伝子ネットワークを用いた創薬ターゲットの探索や抗がん剤の効果、疾患メカニズムの解明などの応用研究では成果がでており、多階層オミクスを統合したアプローチによりさらなる成果が期待される。

● シングルセルオミクス

NGSによる1細胞レベルでの核酸解析が実用化されたことを受けて、質量分析を用いたオミクス解析においても1細胞を目指した計測技術開発が盛んになりつつある。プロテオームでは、米Northeastern大のNikolai Slavovらが質量分析計を用いて1細胞プロテオーム測定を行うSCoPE-MS法を開発している⁴¹⁾他、質量分析計を用いないアプローチとして、蛍光フィンガープリンティングや、トンネル電流、ナノメートルスケールの小孔などを用いた諸手法による1分子タンパク質のアミノ酸配列シーケンシング技術が出現しつつある⁴²⁾。特にトンネル電流を用いたアプローチでは大阪大学の谷口正輝らが1分子アミノ酸配列の読み取りおよび翻訳後修飾の検出で先駆的な業績を発表している⁴³⁾。メタボロームでは、慶應義塾大学・曾我研の平山らが高感度メタボローム測定手法であるシーレスCE-MS法⁴⁴⁾を開発し、これにより従来よりも少量サンプルでメタボローム解析が可能となり、応用が期待される。1細胞のメタボローム計測は理研・広島大の升島努⁴⁵⁾やスイス連邦工科大のRenato Zenobi⁴⁶⁾、オクラホマ大のBoris Wawrik⁶¹⁾らがいずれも質量分析計を用いて先駆的な試みをしている(升島氏は惜しくも2017年に逝去された)。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

● ヒトプロテオームプロジェクト

ヒトプロテオーム機構(HUPO)主導する国際連携研究であるヒトプロテオームプロジェクト(Human Proteome Project: HPP)が2010年より開始された。HPPは染色体毎に担当国を割り当て、対応するタンパク質の情報を取得するChromosome-centric HPP(C-HPP)が中心的に行われている。C-HPPでは特定の検体や方法の指定はなく、各国がそれぞれ独自の研究の一環として、割り当てられた染色体にコードされている未同定タンパク質を探ることが行われている。それらの結果は、年に1度Journal of Proteome Research誌に関連論文を募り、特集号として刊行されている。その一方で、2014年には二つの研究グループからヒトの組織や培養細胞から得られた質量分析データを統合してヒトプロテオームのドラフトマップが報告された^{48,49)}。しかしながら、これらの論文では多数の質量分析データを統合しているため、偽陽性ヒットが多数含まれるなどの問題が指摘されており、今後新たな評価法の確立による偽陽性ヒットの除去や再解析が待たれている。

● プロテオゲノミクス

米国のCancer Moonshot Initiativeにサポートされて発足したInternational Cancer Proteogenome Consortium(ICPC)には日本を含む12カ国が参画しており、国際的にプロテオゲノミクスを用いてがん研究を推し進める機運が高まっている。特に、米国では2011年にスタートしたClinical Proteomic Tumor Analysis Consortium(CPTAC)によってがん臨床検体におけるプロテオーム解析が先導されており、ICPCにおけるプロテオゲノミクス研究

も CPTAC チームが担当している。日本では国立がん研究センターが担当機関として共同研究を展開している。

● プロテオーム・データベース

大規模データの蓄積と共有は新たなアルゴリズムによる再解析やプロジェクトを跨いだ比較解析などを行うための重要な資産となることから、多くのジャーナルが論文投稿の際に、プロテオーム質量分析の生データを公開することを義務付けている。これまで、質量分析データの公開は個人的 Web サイトから外部からのデータを一元管理するリポジトリサイトまで様々なものが構築されてきたが、データ登録のルールが統一されていない、資金の不足でデータの維持管理が不可能になるなどの問題が生じていた。そこで、データフォーマットやメタデータの標準化を図るために ProteomeXchange Consortium (PXC) が設立された⁵⁰⁾。PXC は PRIDE (欧州)⁵¹⁾ および PESSSEL/PeptideAtlas (米国)⁵²⁾ によってスタートし、MassIVE (米国) が加入した。その後、アジアオセアニア地区初のリポジトリとして日本から jPOST⁵³⁾ が、さらには iProX (中国) および Panorama (米国)⁵⁴⁾ が参画し、2018 年 8 月現在計 6 つのリポジトリサイトで構成されている。ユーザーは PXC に参画しているどのリポジトリにデータを登録しても PXC から統一の ID が割り振られる仕組みとなっている。また、PXC の ProteomeCentral サイトからリポジトリを横断して検索が可能である。それぞれのリポジトリの開発を行っている研究チームは、リポジトリの運営に加えて、集約されたデータの再解析ワークフローの開発や、解析データ可視化技術の開発などを独自に実施しており、今後、蓄積した大規模な質量分析データを利用した様々な研究展開が期待される。

● メタボロミクスの標準化

メタボロミクス技術の理解を深めて課題を明らかにし、技術面、応用面での進展を促すべく、標準化やデータ統合を目指した取り組みが盛んに行われている。例えば 40 ヶ国以上に会員を有する Metabolomics Society では、6 つの scientific-task-groups (Data Quality Task Group, Data Standards Task Group, Metabolite Identification Task Group, Computational Mass Spectrometry Task Group, Model Organism Metabolomes Task Group, Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group) を作って、メタボロミクス技術の標準化と共用データベースの構築、応用に取り組んでいる。日本においても、有志のメタボロミクス研究者によって、データ統合に向けた代謝物相対定量値の実験室間比較プロジェクト Japan Metabolome Technical Challenge Consortium が実施されている。

● 階層横断的研究

トランスオミクスについては、新学術領域「代謝アダプテーションのトランスオミクス解析」(2017～2021年)が推進中である。メタボローム、エピゲノム、トランスクリプトーム、ゲノム等の解析に精通した研究者と、数理統計的手法に精通した研究者が集まり、各オミクス計測技術の定量化、精密化、および多階層オミクスのためのデータ解析技術を開発している。また、九州大学、東京医科歯科大学、熊本大学、徳島大学による「トランスオミクス医学研究拠点ネットワーク形成事業」が第 22 期学術の大型研究計画 (マスタープラン 2014) に選定され、2016 年に始動した。海外では、2014 年～2016 年に米国において iHMP (integrative Human Microbiome Project) Research Network Consortium (特定疾病リスク保持者のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、マイクロバイオームを網羅的に測定するコホート研究プロジェクト) が実施され、その成果の多くは公開されており、成果は新

規ベンチャー企業等にも活用されている。米国 Precision Medicine Initiative で推進されている All of US (100 万人規模)、英国の UK BioBank (50 万人規模) 等、各国で投資と整備が進む大規模コホートプロジェクトも、今後の階層横断的研究の基盤として注目される。

(5) 科学技術的課題

質量分析計の高性能化が続いている一方で、プロテオミクスについては最新の装置においても DDA を用いた解析が未だ主流である。DDA においては、取得された膨大な数の MS/MS スペクトルをデータベースに対して照合することでペプチド配列の同定が行われるが、一定の割合の偽陽性ヒットが含まれている。これを除去するために同定スコアや各種指標を用いたフィルタリングが行われる。フィルタリングの基準を厳しくすると偽陽性は極力抑えることができるが、その分、偽陰性として除去される配列が生じる。一方、基準をゆるくすると同定ペプチド数は増えるが多数の偽陽性ヒットが含まれる結果となる。この偽陽性ヒットの問題は、多数の解析結果を統合しようとする場合やプロテオゲノミクスのように検索対象のデータベースが巨大になる場合に特に深刻である。このような問題を解消するには、データ解析の手法の開発や、これまでリポジトリに集積された MS/MS スペクトルを精査／統合して得られるスペクトルライブラリを対象とした検索法などが提案されており、今後の動向に注目すべきである⁵⁵⁾。

試料中のタンパク質の濃度を決定することは、生化学反応の数理モデリングやタンパク質複合体の組成決定、さらには異なる研究機関や時期に取得されたデータの統合を可能にする。そのため、定量プロテオミクスにおいては、これまで主流であった比較定量から内部標準品を用いた絶対定量が普及していくと思われる。精密な絶対定量のためには、個々のペプチドに対して安定同位体標識品を用意する必要がある。これまで一般的であった安定同位体標識は、合成コストが極めて高く、一度に多数の標識ペプチド評品を得ることは非現実的であった。この問題を解消するためには、遺伝子合成技術で作製した任意の配列を含む人工タンパク質の作製⁵⁶⁾が有効であり、日本国内で盛んに開発や利用が行われている *in vitro* 翻訳系の利用によるハイスループットな組み換えタンパク質産生技術を組み合わせれば今後さらなる大規模化が期待される⁵⁷⁾。また、評品作製の材料である人工遺伝子を含むプラスミドは恒久的に維持することができるため分配が容易であり、今後これらの情報や物体を共有するための基盤整備が必要と思われる。また、組み換えタンパク質技術を用いて特定のアミノ酸に翻訳後修飾を入れることは技術的に困難であったため、翻訳後修飾部位ペプチドの同位体標識評品を得るには化学合成が唯一の手段であった。ごく最近、特定コドンにリン酸化セリンを割り振った大腸菌を用いて、任意のペプチドにリン酸化セリンを導入する技術が報告されており⁵⁸⁾、これを利用して安定同位体標識リン酸化ペプチドを安価に得ることができる可能性も高い。

メタボローム分析においては、親水性から疎水性までの幅広い性質の代謝物をカバーするために複数の分析系が必要であり、それぞれの分析系にあわせた試料調製、データ解析が必要である。しかし、クエンチング、抽出、前処理、誘導体化などの試料調製における条件の最適化は現時点で不十分であり、分析法の統一も難しく、個々のデータの互換性と再現性の確保が最重要課題となっている。また、検出器に質量分析計を用いる場合は定量値を取得することが容易ではなく、一般的にはピーク面積(高さ)の値を用いた相対比較解析であること、化合物名が同定できない Unknown 成分が多く存在することも現状における限界である。実用的なデータベースの構築のためにも、まずは、安定同位体標準品の整備を含めた定量データ取得のため

の手法の開発が重要である。また、これまで行われてこなかった詳細な条件検証を地道に行い、そのデータに基づいた技術開発を再度行うことが望まれる。さらに、各機関間でのデータ統合、大規模解析の実施を目指して、技術の平準化に向けた取り組み、プロトコル構築、ガイドラインの作成を行うことも必要であろう。地道な技術開発を行うことができる日本の研究者の強みを活かし力を結集することが、世界に先駆けて取り組むべき重要な課題であると考えられる。

また、現状のメタボロミクスは、ある時点での代謝物の量比を解析するいわゆるスナップショット解析が主流であり、代謝のダイナミクスをとらえることが容易ではない。このため、代謝フラックス解析のような動的側面を捉える手法のさらなる開発が望まれる。また、代謝物は遺伝子のように増幅することができないためシングルセルやオルガネラなどの局在解析における極微量成分分析のための技術開発も求められている。

マルチオミクス／トランスオミクスを実現するためには、それぞれの階層においてオミクスデータを取得して統合する形ではなく、統合を目的としたデータ取得方法の検討も必要である。例えば、他のオミクスデータをもとに重要タンパク質と代謝物に対象を絞りそれらの定量値の取得を主として統合解析を進めるとともに、並行して従来のノンターゲット（ワイドターゲット）での包括的な測定を行っておく。包括的な解析において重要分子と相関を示す分子が見つかった場合は、それらについて再度定量値を取得して、統合解析を行う、といったように、それぞれのオミクス計測技術のスループット、データの性質を考慮したデータ取得が統合オミクスの実施においては非常に重要となる。また、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの階層間にわたる解析を、数学的／情報科学的な高度な手法をもって包括的に、人手や事前知識に頼らず、データ主導のバイアスの少ない方法で実行でき、そのためのアルゴリズム、ソフトウェアの開発を行い、さらにこれらを使いこなせる人材の育成が課題である。特に、階層内の組合せおよび階層間の組合せをいかに解析するかは極めてチャレンジングな課題である。

(6) その他の課題

現状のオミクス研究、特にメタボローム・プロテオームは高額装置をその技術基盤としている。質量分析計の高性能化は未だ着実に進んでおり、2～3年で装置をアップデートしない限り、国際的な競争力を失ってしまう可能性が危惧されるが、大学等アカデミア研究機関での質量分析計への設備投資は停滞気味である。また、質量分析計によるオミクス解析はその原理から、一台の装置で並列計測ができないため、多検体のハイスループット計測を必要とする医学研究などにおいては、複数の装置を並列で運用することが必須となる。これらの装置の導入費用やその維持管理費の捻出が大きな課題であり、個別の研究室での対応は難しい。

また、統合オミクスを目指した研究開発を進めるためには、技術的な課題を解決することも重要であるが、その取り組み方、体制が非常に重要である。同一条件、同一サンプルにより得られたオミクスデータ群を用いた分析をすることが特に重要であるが、複数の異なるオミクスデータ計測とデータ解析を密接に行う必要がある。単独の研究室で実施可能なレベルを越えている。また、どのようにデータを取得し統合するかについて基本的な部分においても構築できていない現状で、それぞれのオミクスデータを別の拠点で取得する形では、状況を変えることは難しい。

これらの課題を解決するためには、国内に拠点を設置して重点的に投資し、国内の研究者が

利用できるようにすべきである。世代交代が早く、高価かつ保守点検に専門知識を要する質量分析計をはじめとした計測技術・機器の維持・運用・更新はそれに特化した拠点に一任できるよう、機器およびデータ解析環境の双方における大規模集約化が必要となり、国策としての集約化が重要である。研究開発についても、各研究機関で手分けして行うのではなく、必要な技術の開発、その最適化、さらにデータ取得に向けたプロトコル構築までの技術を一拠点に集約し実施することが望ましい。また、オミクスは大規模データの解析に立脚しており、分野の進展には情報科学の研究者と技術者が必須である。情報科学の研究者と医学・生命科学の実験系の研究者が研究デザインの段階から協力してプロジェクトを立案できる体制を整える必要がある。そのため、大学や研究機関での組織編成を抜本的に見直し、計測・解析は表裏一体となって組織運営を行うべきであり、国を挙げてデータ計測・解析のインフラ整備を行なうなど、戦略的な取り組みが必要である。それらインフラ整備によって、結果的に質の高い各種オミクス情報が集積され、将来の生命科学・医科学における重要な研究基盤になるものと考えられる。

また、インフォマティクスの人材育成が重要な課題となっている。現在、日本においてはゲノムやトランスクリプトームに関連したインフォマティクスの人材はある程度確保されているが、プロテオーム・メタボローム研究に関わる研究者は依然として少ない。海外との競争力を高めるためにはインフォマティクス研究者の育成が急務であると思われる。このような人材の課題についても、拠点化によって、ハイレベルの研究者のもと技術開発と同時にオンザジョブトレーニングを行い効率的な人材育成を実施することで解決に向かうと考えられる。海外におけるアンダーワンルーフ型の研究所の設立が注目される中、オミクス領域においては日本が世界に先駆けて国家戦略として課題解決に向けたプロジェクトを実施することによって、世界のオミクス研究の中心的な存在となることが期待される。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究 (技術開発)	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 超高性能カラムを用いた高深度プロテオミクス技術開発やリン酸化や糖タンパク質の精製および解析技術開発が盛んに行われている。 大規模なヒト組み換えタンパク質ライブラリを用いたターゲットプロテオミクスのためのリソースが公開された⁶⁾。 アジアオセアニア地区で初めてのプロテオーム関連質量分析データのリポジトリおよびデータベースが構築された⁵³⁾。 メタボロミクスの技術レベルは高いが、特定の拠点とそれ以外でレベルの差が大きい。 標準化に向けた動きが加速している。 新学術「代謝統合オミクス」が立ち上がった。また、国内4拠点を結んだ「トランスオミクス医学研究拠点ネットワーク形成事業」も始動した。 統合オミクス解析を進める研究チームの核となる融合型人材（生命科学以外に情報・数理科学、計測技術など複数の分野に通じた人材）の登用および育成は不足している。
	応用研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> がんを対象とするプロテオーム解析による診断マーカーの探索／開発が盛んに行われている⁵⁹⁾。 ヒト cDNA ライブラリを用いた大規模なタンパク質相互作用解析を基盤とした創薬研究が展開されている。 がん、免疫、幹細胞領域でメタボロミクス研究が盛んに行われている。 代謝中心の統合オミクス解析は発酵産業からの関心が高く、従来の代謝工学の延長線上で今後産業応用につながる可能性がある。 オミクス計測の機器開発は一部国内企業が質量分析計を開発して世界展開を図っているが、シーケンサーはほぼ外資に占められている。クオンタムバイオシステムズのように1分子塩基配列およびアミノ酸配列シーケンシング技術で市場参入を目指すスタートアップ企業も存在する。
米国	基礎研究 (技術開発)	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> 定量プロテオーム解析のための標準化の推進など、疾患プロテオーム研究を意識した基礎研究が盛んである^{60,61)}。 ターゲットプロテオミクスのための解析プラットフォームである Skyline の開発⁶²⁾。 がん代謝、免疫代謝が猛烈な競争に突入している。哺乳類全身の代謝恒常性維持機構ではプリンストン大学の Joshua Rabinowitz が世界の先端を切り開いているほか、Duke 大学の Jason Locasale がメタボロームとエピゲノムの相互関連で活発に成果を発表している。
	応用研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> Cancer Moonshot プロジェクトの一環として潤沢な臨床検体などを対象としたプロテオゲノミクス研究が非常に活発に行われている。 がん関連タンパク質の定量のための MRM アッセイがデータベース化されている⁶³⁾。 薬剤応答を、オミクス技術を用いて定量的に解析するなどの応用研究も盛んである。 オミクス計測の基盤を担うシーケンサー、質量分析計ともに技術開発でトップを走る。さらに、革新的アイデアを世に送り出すスタートアップ企業が次々に生まれている。

欧州	基礎研究 (技術開発)	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析計における測定原理の開発やソフトウェアの開発などオミクス研究のための要素技術開発をリードしている。 DDA データの解析プラットフォームである MaxQuant の開発、最大規模のプロテオームデータリポジトリである PRIDE の開発・運営⁵¹⁾、合成ペプチドライブラリを用いた各種リソース整備等が盛んである^{3,4)}。 ベルギーのコペンハーゲン大学に Center for Protein Research (Novo Nordisk foundation : ~100 million USD) が設立され、プロテオーム研究が展開されている。 伝統的にメタボローム、フラクソームなど代謝系を中心としたオミクス解析が強く、世界をリードするレベルにある。 スイス連邦工科大 (ETH) には拠点が創設され、Uwe Sauer、Ruedi Aebersold、Paola Picotti らを中心に統合オミクス解析が本格的に行われている。このような拠点から成果も出始めており、特に ETH は世界の先端を走る。また、免疫代謝の Mihai Netea (蘭 Radboud University Nijmegen) や Erika Pearce (独 Max Planck, Freiburg) が分野を牽引する。
	応用研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析計メーカーが多数あり、アカデミアと連携して、基礎研究で得られた成果を、迅速に実装している。 構造プロテオミクスを薬剤の標的探索に応用する研究が行われている。 定量プロテオミクスを中心とした受託研究を行う企業 BIOGNOSYS (スイス)、人工遺伝子を元に作製した組み換えタンパク質を用いた定量プロテオーム解析の受託を行う企業 POLYQUANT (英国) が設立。 理論研究のレベルが伝統的に高く、世界中で用いられるようになった欧州発の解析手法は多数にのぼる。ソフトウェアやデータベースの開発力も高い。EBI (European Bioinformatics Institute) はその代表的機関で、最近は特に EBI GWAS Catalog などゲノム医療関連のツール開発に注力している。
中国	基礎研究 (技術開発)	△	↑	<ul style="list-style-type: none"> 他で開発された技術の導入が種であり、オリジナルの成果は多いとは言えないが、莫大な研究費が投入され、最新装置を複数台並べて大規模な研究が展開されている。 特異的な DNA 配列を用いた転写因子の網羅的探索法を開発⁶⁴⁾。 Beijing Proteome Research Center (BPRC) にて Phoenix Project が開始され 102.4 million USD が投資された⁶⁵⁾。 ゲノム、トランスクリプトームなど核酸配列のオミクス研究では世界的な研究成果を出すところまで急速に発展している。しかし、プロテオームやメタボロームなどクラフトマンシップを要求するオミクス階層についてはそこまで発展していない。
	応用研究	△	↑	<ul style="list-style-type: none"> 近年急速に増加しているが、独自技術を利用したものは見当たらない。 20 台以上の質量分析計を用いたハイスループットなプロテオーム解析システムを構築し、がんなどの疾患を中心に解析を進行中。 BGI (Beijing Genome Institute) などはシーケンサーに立脚した受託計測だけでなく質量分析にも進出しつつある。しかしメタボロームやプロテオーム測定の基盤となる質量分析の基礎技術開発ではまだ世界の最先端とは差がある。
韓国	基礎研究 (技術開発)	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 他で開発された技術の導入が主であり、基礎技術開発研究などはあまり目立った動向はない。 プロテオゲノミクスや HUPO のヒトプロテオームプロジェクトに関わる研究が盛んに行われている。 KAIST の Sang Yup Lee が代謝工学では気を吐くが、統合オミクス解析に顕著な動きはない。
	応用研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 近年増加傾向 複数の企業が受託業務を行っているが、独自の技術に基づくものは調査した限り見当たらない。 オミクス計測、統合オミクス解析ともに目立った動きは見られない。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発（プロトタイプの開発含む）・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↑：上昇傾向、→：現状維持、↓：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Aebersold, R. and Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347-355, (2016) .
- 2) Gillet, L. C. et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 11, O111 016717, (2012) .
- 3) Kusebauch, U. et al. Human SRMAtlas: A Resource of Targeted Assays to Quantify the Complete Human Proteome. *Cell* 166 (3) 766-778 (2016) .
- 4) Zolg, D. P. et al. Building ProteomeTools based on a complete synthetic human proteome. *Nat. Methods* 14 (3) : 259-262 (2017) .
- 5) Narumi, R. et al. Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E3461-3467 (2016) .
- 6) Matsumoto, M. et al. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat. Methods* 14 (3) : 251-258 (2017) .
- 7) Hein, M. Y. et al. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* 163, 712-723 (2015) .
- 8) Huttlin, E. L. et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 545, 505-509 (2017) .
- 9) Wan, C. et al. Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature*. 525 (7569) 339-344 (2015) .
- 10) Larance, M. and Lamond, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 269-280, (2015) .
- 11) Li, P. P., et al. Proximity Labeling of Interacting Proteins: Application of BioID as a Discovery Tool. *Proteomics* 17, (2017) .
- 12) Boersema, P. J., Kahraman, A. and Picotti, P. Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. *Curr Opin Biotechnol* 34: 162-170 (2015) .
- 13) Schopper, S. et al. Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry. *Nat Protoc.* 12 (11) 2391-2410 (2017) .
- 14) Satoh, K. et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E7697-E7706, (2017) .
- 15) Dang, L. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-744, (2009) .
- 16) Dang, L. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 465, 966, (2010) .
- 17) Geiger, R. et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* 167, 829-842 e813, (2016) .
- 18) Wei, P., Dove, K. K., Bensard, C., Schell, J. C. & Rutter, J. The Force Is Strong with This One:

- Metabolism (Over) powers Stem Cell Fate. *Trends Cell Biol* 28, 551-559, (2018) .
- 19) Krycer, J. R. et al. Dynamic Metabolomics Reveals that Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism. *Cell Rep* 21, 3536-3547, (2017) .
 - 20) Sun, R. C. et al. Noninvasive liquid diet delivery of stable isotopes into mouse models for deep metabolic network tracing. *Nat Commun* 8, 1646 (2017) .
 - 21) Thiele, I. et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat Biotechnol* 31, 419-425 (2013) .
 - 22) Brunk, E. et al. Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nat Biotechnol* 36, 272-281 (2018) .
 - 23) Karr, J. R. et al. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell* 150, 389-401 (2012) .
 - 24) Krycer JR, et al., Dynamic Metabolomics Reveals that Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism. *Cell Rep*.21 (12) :3536-3547. (2017)
 - 25) Kawata K., et al., Trans-omic Analysis Reveals Selective Responses to Induced and Basal Insulin across Signaling, Transcriptional, and Metabolic Networks. *iScience*. 7:212-229 (2018)
 - 26) Yugi K., Kubota H, Hatano A, Kuroda S., Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol*. 34 (4) :276-290 (2016)
 - 27) Link, H., Kochanowski, K. & Sauer, U. Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity in vivo. *Nat Biotechnol* 31, 357-361 (2013) .
 - 28) Zhang, B. et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513 (7158) : 382-387 (2014) .
 - 29) Mertins, P. et al., Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*, 534 (7605) : 55-62 (2016) .
 - 30) Piazza, I. et al. A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication. *Cell* 172, 358-372 e323 (2018) .
 - 31) Leuenberger, P. et al. Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science*. 355 (6327) eaai7825 (2017) .
 - 32) Becher, I. et al. Pervasive Protein Thermal Stability Variation during the Cell Cycle. *Cell* 173, 1495-1507 e1418 (2018) .
 - 33) Dai, L. Y. et al. Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle. *Cell* 173, 1481 (2018).
 - 34) Yugi, K. & Kuroda, S. Metabolism as a signal generator across trans-omic networks at distinct time scales. *Current Opinion in Systems Biology* 8, 59-66, (2018) .
 - 35) Opitz, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203 (2011) .
 - 36) Magnusdottir, S. & Thiele, I. Modeling metabolism of the human gut microbiome. *Curr Opin Biotechnol* 51, 90-96 (2018) .
 - 37) Bauer, E., Zimmermann, J., Baldini, F., Thiele, I. & Kaleta, C. BacArena: Individual-based metabolic modeling of heterogeneous microbes in complex communities. *PLoS Comput Biol* 13, e1005544 (2017).
 - 38) Magnusdottir, S. et al. Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nat Biotechnol* 35, 81-89 (2017) .
 - 39) Schwanhaussner, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342 (2011) .

- 40) Yugi, K. et al. Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep* 8, 1171-1183 (2014) .
- 41) B. Budnik, et al., SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation. *Genome Biology* 19:161 (2018)
- 42) Restrepo-Perez, L., Joo, C. & Dekker, C. Paving the way to single-molecule protein sequencing. *Nat Nanotechnol* 13, 786-796 (2018) .
- 43) Ohshiro, T. et al. Detection of post-translational modifications in single peptides using electron tunnelling currents. *Nat Nanotechnol* 9, 835-84 (2014) .
- 44) Hirayama, A., Tomita, M. & Soga, T. Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis. *Analyst* 137, 5026-5033 (2012) .
- 45) Emara, S. et al. Single-Cell Metabolomics. *Adv Exp Med Biol* 965, 323-343 (2017) .
- 46) Ibanez, A. J. et al. Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8790-8794 (2013) .
- 47) Sun, M., Yang, Z. & Wawrik, B. Metabolomic Fingerprints of Individual Algal Cells Using the Single-Probe Mass Spectrometry Technique. *Front Plant Sci* 9, 571 (2018) .
- 48) Kim, M.-S. et al. A draft map of the human proteome. *Nature* 509 (7502) : 575-581 (2014) .
- 49) Wilhelm, M. et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 509 (7502) 582-587 (2014) .
- 50) Vizcaíno, J. A. et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature Biotechnology*. 32 (3) 223-226 (2014) .
- 51) Vizcaino, J. A. et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 44, 11033 (2016) .
- 52) Farrah, T. et al. PASSEL: the PeptideAtlas SRMexperiment library. *Proteomics* 12, 1170-1175 (2012) .
- 53) Okuda, S. et al. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Research*. 45 (D1) D1107-D1111 (2017) .
- 54) Sharma, V. et al. Panorama Public: A Public Repository for Quantitative Data Sets Processed in Skyline. *Mol Cell Proteomics* 17, 1239-1244 (2018) .
- 55) Griss, J., et al., PRIDE Cluster: building a consensus of proteomics data. *Nat Methods* 10, 95-96 (2013).
- 56) Beynon, RJ, et al., Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods* 2, 587-589 (2005) .
- 57) Takemori, N. et al. MEERCAT: Multiplexed Efficient Cell Free Expression of Recombinant QconCATs For Large Scale Absolute Proteome Quantification. *Mol Cell Proteomics* 16, 2169-2183 (2017) .
- 58) Barber, K. W. et al. Encoding human serine phosphopeptides in bacteria for proteome-wide identification of phosphorylation-dependent interactions. *Nat Biotechnol* 36, 638- 644 (2018) .
- 59) 朝長毅 . 定量プロテオミクスを用いたバイオマーカー探索とその医療への応用 . *Proteome Letters* 1, 1-10 (2016) .
- 60) Addona, T. A. et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nature Biotechnology*. 27 (7) : 633-641 (2009) .
- 61) Kennedy, J. J. et al. Demonstrating the feasibility of large-scale development of standardized assays to quantify human proteins. *Nat. Methods*. 11 (2) : 149-55 (2014) .
- 62) MacLean, B. et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966-968 (2010) .

- 63) Whiteaker, J. R. et al. CPTAC Assay Portal: a repository of targeted proteomic assays. *Nat Methods* 11, 703-704 (2014) .
- 64) Ding, C. et al. Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6771-6776 (2013) .
- 65) Beck, S. et al. The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Mol. Cell Proteomics*. 14 (7) 2014-2029 (2015) .

2.1.6 一細胞オミクス解析技術、細胞系譜・地図技術

(1) 研究開発領域の定義

一細胞ごとにゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどのオミクスを計測・解析する技術の総称を指す。またこのような技術や一細胞での蛍光タンパク質遺伝子、ないし DNA タグによる細胞標識・追跡技術との融合によって細胞分化の系譜を追跡し、オルガノイド系、胚発生系等の細胞社会、臓器を構成する一細胞の挙動を正確に理解し、究極的にはすべての細胞種のアトラスを構築するような研究が該当する。類似の領域に一細胞が持つ少数種類の分子や細胞のマクロな形態・機能を計測する一細胞解析がある。

(2) キーワード

シングルセルゲノム、シングルセルトランスクリプトーム、シングルセルエピゲノム、シングルセルプロテオーム、シングルセルメタボローム、空間的解析、シングルセルオミックス連関、オミックス同時解析、細胞系譜追跡、Human Cell Atlas (ヒト細胞アトラス)、細胞地図、3次元全臓器イメージング、DNA シーケンサー、RNA-seq、イメージング、多光子顕微鏡、ライトシート顕微鏡、蛍光タンパク質、組織透明化、DNA バーコード法、バイオインフォマティクス

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

多細胞生物は、1個の受精卵が分裂を繰り返すことによってその機能を獲得する。細胞はどんどん個数を増やす一方で、適切な細胞に分化することで、骨や皮膚、筋肉などの分化した細胞に運命づけられ、新しい機能を獲得する。また、細胞は増殖と分化を繰り返しながら、適切な配置に移動し、臓器を形成する。正常な個体として発生する過程や成熟後に、がん化してしまう細胞が現れたり、機能不全になって、個体に影響を及ぼしてしまう細胞も出現する。このように細胞には個性と多様性がありながら、全体として秩序が保たれている。個と全体の両者を見られれば、病気を引き起こす仕組みなどがより精緻にわかると期待されている。

個体の生命システム、そしてその破綻である疾患発症のメカニズムを解明するためには、細胞レベルの分子の振る舞いを包括的に理解することが必要不可欠である。これまでも実験レベルにおいては、分子・細胞を標的として介入を行い、その効果を観察することが可能であった。しかし、このような介入が実際には細胞レベルで行われているにも関わらず、そのアウトプットの解析は臓器もしくはディッシュレベルで行われてきた。細胞集団に特異的なマーカー因子が同定されている場合には、そのマーカーを用いて細胞を選別する技術も存在するが、それにより標識された細胞も不均一な細胞集団である可能性がある。基礎研究だけでなく臨床検査の観点からも、生命システムの根幹を担う細胞のレベルで分子機構を包括的かつ定量的に解析する技術が待望されていた。

現在組織学的には哺乳類生体を構成する組織細胞は形態的に異なる少なくとも200種類以上の細胞が存在していると考えられているが、これまでは技術的限界から、受精卵が発生する過程における内・中・外胚葉分化とそれらに由来するそれぞれの臓器、組織細胞への分化に至る個々の細胞の挙動については限られた知識しかなかった。また各臓器、組織に存在する成体

幹細胞の組織維持・障害後再生過程についても一細胞レベルでの挙動についての知見は限られていた。

多細胞生物がもつ細胞は、基本的にはほぼ同一のゲノム配列をもつ。そのため、細胞の機能を知るには、どの遺伝子がどのくらい機能しているかを調べる必要がある。そのため、ゲノム配列ではなく、タンパク質を生産するために必要な中間物質である RNA や、RNA 量を変化させるゲノム配列の修飾やクロマチン構造変化であるエピゲノム、タンパク質量、代謝産物量を一細胞で計測する必要がある。一方で、がんでは一細胞ごとにゲノム配列そのものに変異が入るため、その原因を知るには一細胞ごとにゲノム配列を決定しなければならない。

近年の技術的進展の結果、個々の細胞のマルチオミクスデータが得られたことで、例えば複数の表面マーカーを複合したフローサイトメトリーにて高度に純化した成体幹細胞集団であっても、個々の細胞には想像以上の不均一性が認められたこと、また細胞周期などの細胞の状態によっても変化することが確認された。こうしたオミクスデータに基づいて細胞集団のさらなる小集団への細分化、それら集団間関係性予測による分化系統譜解析などができるようになると考えられている。

3次元的に臓器全体を観察する技術が発展し、様々な細胞ラベリング技術と組み合わせて、細胞の位置情報に加えて細胞種・細胞状態の情報を全臓器・全身スケールで収集する技術開発が進められている。将来的にはこうした研究の結果、各臓器・組織に存在する細胞の細分化とそれらの受精卵からの正確な発生系譜が明らかとなり、全身に存在する全ての組織細胞アトラスが作成されることが期待される。

これらの情報は臨床医学において疾患細胞、医療用細胞等の研究や現実の治療に用いられる細胞の品質評価に活用でき、従来の集団細胞での情報に比べて、より精緻な性質を捉えることを可能とし、正確な品質評価基準を与える。その他にも、診断や予防医学では一細胞解析を用いた生検データと細胞知識を集積したヒト細胞データベースと比較することによって、より正確に疾患のステージを把握し、それに基づいた精度の高い診断を行って治療計画の立案に貢献することが可能になると期待される。

[研究開発の動向]

近年ゲノム科学・生化学・工学・バイオインフォマティクスなど様々な分野の発展および連携により、単一細胞レベルの解析技術が進歩し、生物学・医学研究において大きな改革が起きている。単一細胞レベルでの包括的かつ定量的な分子プロファイルの記述が可能となり（一細胞レベルのゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオーム、メタボローム解析がすでに可能）、そのデータは生命現象の本質的な分子機構の解明に有用であるだけでなく、時空間的な分解能を持った細胞挙動の解析、臓器・個体レベルの機能と連動した解析へと応用されており、単一細胞解析は生命現象の解析ツールとして確固たる地位を確立している。一細胞オミクス技術は極めて解像度の高い包括的な分子顕微鏡と考えることもできる。

● 一細胞トランスクリプトーム解析技術

細胞は生体において、自らに内在する分子を組み合わせ、時間的かつ空間的に制御された機能を発揮している。一細胞トランスクリプトーム解析により、このような細胞の時間的・空間的・分子機序的な解析が同時に可能となる。またこれまでの臓器細胞集団としての解析では埋もれていた希少な細胞集団の存在を同定し、その細胞集団における特異的な遺伝子発現制御

機構を明らかにする研究へと発展させることができる。

2007年頃に登場した超並列型 DNA シーケンサーの登場により一細胞レベルの RNA をシーケンスする技術の開発が進められており、2009-2013年頃には、現在利用されている3つの技術が、スウェーデン¹⁾ (SMART-seq)、日本²⁾ (Quartz-Seq)、イスラエル³⁾ (CEL-seq) でそれぞれ開発され、一細胞 RNA シーケンス法が確立した。一細胞 RNA シーケンス法では一細胞を容器に取り分けて、分子生物学的反応を行う。細胞の採取方法には、主にマイクロ流体装置や液滴形成流路、FACS ソーティング技術を利用する。マイクロ流体装置としては、マイクロチャンバー (ウェルプレート) に一細胞を捕捉し、細胞融解から cDNA 増幅までを 96 細胞分並列して実施できる Fluidigm 社の C1 が発売され、一細胞 RNA シーケンスの普及に大きな貢献をした。2014年には1000細胞にも満たない細胞数しか解析できないことが課題であったが、2015年には、数千から数万の一細胞 RNA シーケンスを行う装置が開発された^{4,5)}。これは、オイルと水を混合することで生成する液滴中に、細胞と細胞を標識する DNA バーコードや試薬を閉じ込める装置である。2018年に10x Genomics 社が装置を市販化し、高出力型一細胞 RNA シーケンスがさかんに実施されるようになりつつある。

例えば Hulsmans らは、房室結節におけるマクロファージを FACS でソートして single-cell RNA-seq 解析をすることで、マクロファージを3種類の状態に分類した⁶⁾。このように既存の細胞分類を超えた細胞不均一性を同定する上でシングルセル RNA-seq 解析は必須のツールとなる。心筋特異的 p53 ノックアウトマウスの心筋一細胞 RNA-seq 解析により、心筋リモデリングにおける p53 の意義をシングルセルレベルで明らかにした⁷⁾。あらゆる遺伝子や薬剤の意義をシングルセルレベルで評価できるため、組織全体を解析対象としていた以前の研究とは解像度の次元が大きく異なる。

● 一細胞トランスクリプトームによる時間軸の解像度を高めた解析

疾患発症過程において、細胞はある段階からある段階へ急激に状態を変えるわけではなく、徐々に状態が変化していく。このような細胞状態の変遷を解析するためには、時間的に解像度を高めた解析が必要である。

一細胞解析技術で得られるデータは、RNA や DNA、エピゲノムの変化するゲノム領域などの分子と観察した細胞数の次元の行列が得られる。このような一細胞オミクス行列から様々な生命機能を抽出・推定する技術が開発されている⁸⁾。一細胞発現データから細胞の増殖や分化時間や方向性を予測する擬時間推定法や、複数の細胞種に分岐する場合に、それに貢献する遺伝子を予測する分岐解析、遺伝子ネットワーク解析法が開発されている。またこれまで蓄積されてきた遺伝子発現データベースに対して、一細胞発現データを検索することで、類似の細胞を同定する方法も開発されている。その他、一細胞データ特有の実験のばらつきなどを考慮した変動遺伝子の統計検定や、幹細胞同定、希少細胞同定などのアルゴリズムが開発されている。また数千から数万の一細胞データを閲覧するための可視化法の研究もされている。

それには、蛍光シグナルを使った Brainbow システムのような細胞追跡法⁹⁾ が有用であるが、ひとつひとつの細胞の包括的な分子プロファイルのダイナミックな変遷を追跡するのは容易でない。そこで一細胞トランスクリプトームを用いて、様々なアルゴリズムによって細胞系譜を再構築し、細胞挙動における分子機構のダイナミクスを解析しようという試みがなされている。それを達成するためには、まず個々の細胞の状態およびその違いを定義する必要がある。

全遺伝子発現情報を用いて個々の細胞の状態を定義する上で、発現量を様々な数理モデルに

あてはめて次元削減を行うことができる。このような解析手法として主成分分析（線形モデルにより全体を表現する少数の変数を合成する）や t-SNE（高次元空間のデータポイントの近さを確率分布で表す）、diffusion map（遷移確率行列を構築し、拡散距離を測定する）などがよく用いられる。これらにより、全遺伝子の発現量という 20,000 程度の変数から数個の変数へと変換し、それを二次元（三次元）空間に落とし込んで細胞の状態の違いを考察することができる。細胞の状態が時間的に変化する生命現象を解析する場合には、空間上に仮想的な時間軸を設定して、細胞の系譜を推測することが可能である。このような手法によって生み出される仮想的な時間軸が、実際の生物学的プロセスを極めてよく模倣していることが、あらゆる生命現象において証明されている。このような細胞の系譜を独自のアルゴリズムで推測するプログラムも複数報告されている。Monocle というプログラムは、網羅的な遺伝子発現情報を数個の次元に圧縮した後に、細胞系譜に沿った形で 2 次元空間上に pseudo-time course という新たな架空の時間軸を作り出す¹⁰⁾。骨格筋分化の系や神経細胞の発生過程にこのアルゴリズムを応用することにより、高い解像度で分化遺伝子の発現変動を捉えることが可能となり、複数の新規分化制御因子が同定された。東大の野村、津田らは、CellTree というトピックモデル（機械学習アルゴリズム）を用いた一細胞系譜推測プログラムを共同開発している¹¹⁾。また Oscope というプログラムは、解析対象とする細胞の中で協調して振動する遺伝子群を抽出して細胞を並び替えることができ、これを用いてヒト ES 細胞において細胞周期関連遺伝子と協調して振動する新たな遺伝子グループが同定された¹²⁾。

このような一細胞トランスクリプトーム情報から細胞の時間的系譜を推測する手法は疾患解析にも応用されている。特にがん領域では細胞進化の研究が盛んであり、悪性黒色腫¹³⁾、神経膠芽腫¹⁴⁾、乳がん¹⁵⁾、希突起神経膠腫¹⁶⁾、白血病¹⁷⁾などの病態解明に応用されている。例えば、希突起神経膠腫の患者のがん組織の細胞を一細胞レベルで解析することで、がん化してからがん組織を形成するまでの細胞進化の系譜が明らかとなり、がん幹細胞と考えられる細胞集団における特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、個々の患者ごとの細胞分布を解析することで、細胞系譜と治療応答性との関係性が明らかとなっている¹⁸⁾。

● 一細胞トランスクリプトーム解析以外の細胞系譜解析法

多細胞生物は、1つの細胞が分裂と分化を重ねて、複雑な個体を形成する。細胞系譜と分化の関係を知らなければ、多細胞生物の成り立ちや疾患になる仕組みが理解できる。蛍光タンパク質と蛍光イメージング技術の発展により、線虫の全細胞系譜の同定から始まり、様々な生物・組織で系譜解析が行われてきた。in vivo にて細胞（特に成体幹細胞）の運命を追跡する手法として、Cre-LoxP の組み換え技術により、任意の位置・時間に任意の蛍光タンパク質の組み合わせを発現させる技術や、CRISPR/Cas9 を利用して、ゲノム配列中のバーコード領域に変異を入れることで、細胞を区別する方法¹⁹⁾などが登場した。このランダムな人為的 DNA 配列の細胞への導入付加法（DNA バーコード法）の開発とその進化によって組織における注目一細胞の挙動を追跡できるようになりつつある。

Cre-loxp システムを応用し、特異的遺伝子プロモータを使って興味対象細胞のみを LacZ にて標識する技術は 1999 年 Soriano²⁰⁾ によって開発され、その後複数種類の蛍光タンパク質を用いた多色細胞系譜追跡法の開発²¹⁾ によって一細胞系譜追跡の可能性が開かれた。現状 4 色程度の多色細胞系譜追跡が一般的になっており、15 色程度までの系譜追跡が可能となっているが、さらに多色の系譜追跡が開発されつつある。

個体の疾患発症の過程において、罹患臓器の細胞は分裂する度にゲノムに変異を蓄積していく。すなわち一細胞レベルのゲノム配列を解析することによって、高精度の細胞系譜追跡が可能である。例えば、脳の凍結組織から抽出した細胞核を用いて一細胞ごとの全ゲノム配列解析を行った報告があり、これによって詳細な細胞系譜追跡が可能になるとともに、変異が入りやすい部位は、神経細胞において特徴的な遺伝子の領域であることがわかった²²⁾。

しかし一細胞ごとに全ゲノム配列解析をするには膨大なコストがかかる。そこで細胞に特異的なバーコード配列を組み込んでおき、その領域に CRISPR/Cas9 をリクルートさせ、細胞分裂の度にそのバーコードの一部に突然変異を入れるシステムを作ることにより、このバーコードのみをシーケンスすれば細胞系譜を追跡できる。これは培養細胞だけでなく、最近ゼブラフィッシュの発生において CRISPR/Cas9 による random barcoding とトランスクリプトーム同時解析の報告があり²³⁾、細胞のクローン追跡と細胞表現型 (トランスクリプトーム) を同時に抽出できるようになり、組織再生における上皮間葉転換の分子機構が詳細に明らかとなった。モデル生物でも十分機能することが証明されている^{19,24)}。さらにそのバーコード配列の読み出しを次世代シーケンスではなく 1 分子蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (smFISH) で行うことで、空間情報を保持したまま細胞系譜の追跡が可能となった²⁵⁾。

上記の一細胞オミクス、一細胞イメージング技術、多色ないし DNA バーコードを用いた一細胞系譜解析はすでに成体幹細胞研究、発生研究に応用されつつある。

1 つの流れは ES 細胞ないし iPS 細胞の in vitro 分化系を用い、一細胞トランスクリプトーム解析にて解析対象組織の発生系譜を解析する研究である。現状、in vitro 分化技術の限界もあり、完全に正常発生を再現した形の結果は得られていない。

2 つめの流れは、成体幹細胞のオルガノイド培養系を用い、成体幹細胞・ニッチ細胞の正常および障害後再生過程における細胞動態を解析するものである。

3 つめの流れとして、受精卵ないし初期胚をもちいた発生系譜研究である。線虫、魚類については研究が先行し、哺乳類においても解析は進行中である。

● 一細胞トランスクリプトームと他の情報を統合した空間的 (空間発現パターン) 解析

臓器において種々の細胞が綿密な空間的構造を構築して恒常性を保っている。空間情報を保持したまま遺伝子発現解析をすることで、疾患発症の分子病態の空間的なダイナミクスを解析できる。このような空間的關係性を理解する上でシングルセル RNA-seq 解析は大きな意義を持っている。核酸のシーケンスは、一細胞を単離し、破壊して計測する必要がある。そのため、一細胞の組織内の位置や、分子の細胞内局在などは計測できない。そこで、細胞や分子を「本来の場所で (in situ)」で計測する手法の開発が盛んである。1988 年に、固定した組織に含まれる RNA を空間的な位置を保ったまま cDNA 合成をする技術が登場した。1996 年には細胞の位置を記憶して細胞を採取し、cDNA 増幅を行う実験がされている。2014 年にはイメージ質量分析計や質量イオンビームイメージングなどが開発され、タンパク質の空間発現分布が観測できるようになった。

2015-2016 年には、また空間構造を保持した細胞や組織切片中で直接 RNA を逆転写あるいはプロービングし、1 分子イメージングで配列をシーケンスする in situ sequencing と呼ばれる MARFISH²⁶⁾ や seqFISH²⁷⁾ が開発され、複数の遺伝子由来の RNA が計測できるようになった。

一細胞レベルまで分離することを要求しなければ、レーザーマイクロダイセクションなどによって空間情報を保持したまま細胞集団を抽出し、トランスクリプトームを得ることで十分解

析可能である。これまでにゼブラフッシュやマウスの胚発生²⁸⁾、心臓組織再生過程²⁹⁾における空間的トランスクリプトームデータが報告されている。

SpatialDE³⁰⁾や trendsceek³¹⁾というアルゴリズムを使うことで、シングルセル RNA-seq データから空間的特徴を持つ遺伝子発現パターンを予測できる。

また解析対象遺伝子が限られるが、RNA in situ hybridization によって空間情報を保持した遺伝子解析が可能である。このデータと一細胞 RNA-seq データを統合することで、特徴的なトランスクリプトームをもつ細胞の位置を概ね予想することができる³²⁾。

このような空間情報を維持した遺伝子発現解析もハイスループット化が急速に進展している。FISH の技術を多数のプロンプを用いることで、同時に1つの細胞の数百の遺伝子の発現を解析する技術が構築されている²⁶⁾。またスライドガラスに RNA を補足するプライマーを約1000種類程度配置しておき、その上に組織切片を貼り付けて溶解することにより、個々の細胞から溶出した RNA をその位置において捕捉し、その位置で cDNA 合成を行うことで位置情報を保持したままの cDNA ライブラリを作り、個々の細胞の網羅的な遺伝子発現情報を取得することができる³³⁾。

● エピゲノム・遺伝子制御関係の解析への応用

ゲノム配列の修飾やクロマチン構造、クロマチンの開閉位置などエピゲノムは、遺伝子発現の制御に関わっており、細胞ごとに特異的なパターンを示すため、一細胞で計測できれば、細胞機能やその成り立ちの理解が深まる。

転写因子のような制御性タンパク質は DNA と相互作用することによって、多くの遺伝子群を同時に制御し、細胞特有の機能を生み出している。このように同時に制御されている遺伝子群を、一細胞ごとのトランスクリプトームから抽出することができる。例えば重み付き共発現ネットワーク解析によって、いくつかの細胞で共発現している遺伝子群を抽出することができる。神経細胞の一細胞解析に応用した結果、将来的に神経細胞やグリア細胞に分化する幹細胞集団に特徴的な遺伝子ネットワークが同定されている³⁴⁾。これをゲノムワイドに予測する上で、エピゲノム情報は極めて重要である³⁵⁾。

近年一細胞レベルでエピゲノム情報を抽出する技術が生み出されたことで、遺伝子発現レベルではなく、制御領域のレベルで細胞の状態を定義することができるようになってきた。2013年以降、トランスポゼースの挿入位置をシーケンスすることで、(オープンクロマチン領域で)ゲノムの開構造をシーケンスする ATAC-seq^{36,37)}、DNase-seq³⁸⁾ によって、ヒストン修飾(特定のタンパク質がゲノムのどこに結合するか)を ChIP-seq³⁹⁾ によって、DNAメチル化修飾を Bisulfite-seq^{40,41)}、5hmC-seq⁴²⁾ によって、クロマチン高次構造(クロマチンの接近位置を特定する)を Hi-C⁴³⁾ によって、一細胞レベルでゲノムワイドに抽出する手法が報告されている。これらの手法によって、エピゲノムレベルで細胞集団を分類し、細胞系譜を詳細に解析することができる。しかしいずれの手法も、実験精度の問題で、ゲノム全体を真にカバーしているとは言えず、今後の技術開発の発展が期待される。また解析対象であるゲノム DNA が一細胞あたり2コピーしか存在しないので、RNA解析とは異なり、偽陰性となる情報が多くなることを考慮した解析が必要となる。

最近になって、1つの細胞から遺伝子発現とエピゲノムを同時に抽出する技術も確立され、その関係性を解析することが可能になった。例えば、一細胞からエピゲノム(DNAメチル化)とトランスクリプトームを同時に抽出することにより^{44,45)}、発生過程において転写因子が

DNAに結合することにより誘導されるDNA脱メチル化の程度が大きい細胞ほど、その標的となる遺伝子発現が高いことがわかった。

また制御関係を明確に示すためには、エピゲノム情報を遺伝学的な機能改変実験と統合することも重要である。遺伝子改変モデル生物から単離した細胞を一細胞レベルでトランスクリプトーム解析することにより、その遺伝子の機能を詳細に解析することができる。しかし遺伝子の機能を個別に解析するのは、スループットが低く、遺伝子間の関係性も不明瞭となる。現在は細胞レベルの表現型を一細胞トランスクリプトームとして解析できるようになったため、これを利用してCRISPR/Cas9による網羅的な機能抑制ライブラリを用いて個々の細胞に別々の遺伝子の機能欠失を誘導し、そのアウトプットを一細胞RNA-seqで解析し、改変遺伝子と表現型(トランスクリプトーム)を連結するPerturb-seq⁴⁶⁾・CRISP-seq⁴⁷⁾・CROP-seq⁴⁸⁾といった手法が開発され、遺伝子改変の影響を網羅的に解析できるようになった⁴⁶⁻⁴⁹⁾。このとき重要なのが、各々の細胞でどの遺伝子の機能抑制が働いたかの情報(すなわちCas9のガイドRNAの情報)をトランスクリプトームと同時に抽出することである。最近この技術を用いた報告が相次いでなされ、様々な生命現象において重要な遺伝子を網羅的に同定するだけでなく、各遺伝子がどのような遺伝子群を制御しているかまで一気に明らかにしており、今後の疾患解析研究に重要な役割を果たすと考えられる。

● 3次元全臓器イメージング

もともと3次元的な構築を持つ生体組織を3次元的に観察するための技術として、100年ほど前の解剖学者、Spalteholzによって開発された有機溶剤試薬に端を発する組織透明化技術が、2007年のドイツのDodtらの報告⁵⁰⁾を皮切りに大型サンプルをセクションせずに3次元イメージングを行うのに極めて有効であることが次々に示され、近年の当該分野の発展へとつながっている。現在、組織透明化手法は大別して1)有機溶剤を用いる方法(BABB法、3DISCO法とその派生プロトコル)⁵⁰⁻⁵⁶⁾、2)水溶性化合物を使用する方法⁵⁷⁻⁶⁷⁾、3)組織をアクリルアミドゲルなどのハイドロゲルで固定し透明化する方法^{68,69)}に分類される。

1)の有機溶剤を用いる方法は最も先行した研究開発だが、試薬の危険性、環境への影響(ジクロロメタンなど一部の試薬は、環境への廃棄が厳しく制限されている)や蛍光タンパク質の保持性の問題が指摘されていた。蛍光タンパク質の保持性については、2015年にドイツのGieseらがFluoClearBABB法を報告⁵³⁾、ErtürkらがuDISCO/vDISCO法^{54,56)}を報告し、改善が進められているが、ユーザーからの反応を伺う限り未だ問題が多いようである。

2)の水溶性化合物を用いる方法は、皮膚等の生体組織を医療目的で透明化することを目指した開発が2000年代前後から進められ、アルコールや糖などがテストされていた。2011年に日本の宮脇(理研BSI・当時)らが、蛍光タンパク質を消退させる有機溶剤の欠点を克服するため、水溶性化合物を使った組織透明化試薬と蛍光イメージング技術の開発に取り組み、2011年までに尿素を主要成分とする試薬(Scale)として発表した⁵⁷⁾。さらに後年、ソルビトールを加えて透明度を上げるとともに、微細な解剖学的構造の保持性を高めたScaleSを発表した⁵⁸⁾。同様の試みはアメリカのMason(コロンビア大)らのグループによるホルムアミドを主要成分とするClear^T⁵⁹⁾、日本の今井(理研CDB・当時)らによるフルクトースまたはイオヘキソールを主成分とするSeeDB/SeeDB2^{60,61)}、日本の上田ら(東京大学/理研QBiC・当時)による、大規模化合物スクリーニングを元にアミノアルコールやアミド化合物を主要要素としたCUBIC試薬^{62,67,70-72)}、日本の根本ら(北海道大学)、小野寺ら(東京大学)、イタリア

の Pavone (フローレンス大学) らによる 2,2'-チオジエタノールを使用した透明化法^{64,73,74)}などが報告されている。これらの手法はそれぞれ目的とする主要なアプリケーションが異なっており、例えば CUBIC 試薬は脱脂・脱色を実施し全臓器や全身のまるごとイメージングを目指す手法であり、一方 ScaleS や SeeDB2 は電子顕微鏡や超解像イメージングとの組み合わせを目指している。

3) のハイドロゲル包埋を行う方法は、Deisseroth ら (アメリカ・スタンフォード大) によって報告された、組織をアクリルアミドゲル中に包埋してドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と電気泳動による強力な脱脂によって透明化する手法 (CLARITY)⁶⁸⁾ に端を発する。CLARITY の派生プロトコルは多数報告があるが、手法を開発グループは、Chung (アメリカ・MIT)、Gradinaru (アメリカ・Caltech) らである。Gradinaru らは電気泳動を使用しない passive CLARITY 法 (PACT 法)、全身透明化のための PARS 法などを開発している^{69,75)}。また Chung らは組織を強力に固定するという発想を活かして、アクリルアミドの代わりにグルタルアルデヒドを利用した SWITCH 法も開発している⁷⁶⁾。

また、組織透明化技術は従来神経科学分野での活用が先行していたが、脱脂・屈折率調整および脱色の要素をすべて伴った高効率な透明化手法の開発に伴い、マウス全身臓器やヒト臓器を含む霊長類を対象とした応用も可能となってきている。CLARITY の改良版である PACT/ PARS 法、CUBIC 灌流法、3DISCO を改良した uDISCO 法では、成体マウス全身の透明化が報告されている^{54,69-71,75)}。また、クロロフィルの脱色と透明化が必要な植物に対して、名古屋大・東山らの ClearSee 法⁶³⁾、東京理科大・松永らの TOMEI 法⁷⁷⁾などが報告されている。近年ではリン酸カルシウムを EDTA で脱灰し透明化する骨透明化法 (Pact-deCal, Bone-CLARITY, CUBIC-B など) の開発も進み^{72,75,78)}、さらにこれらのプロトコルをすべて組み込んで骨を含むマウス全身などの大型サンプルを効果的に透明化するプロトコル (vDISCO、PEGASOS)^{56,79)} も報告されている。これらの動きから、組織透明化手法のプロトコル開発はほぼ飽和期に入っていると考えて良い。

組織を 3 次元的に観察するには、細胞の適切なラベリング法との組み合わせが重要である。ウイルスベクターを用いた全脳回路観察^{80,81)}、高速 (次世代) マウス遺伝学によるトランスジェーンの新規導入と解析^{62,71,82)} など、遺伝学的手法によるラベリングは早期から適応が進んでいた。近年ではアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを改良し、末梢投与でほぼ全脳がラベル可能な改変 AAV ベクターも報告されている⁸³⁾。さらに、組織化学的な染色技術 (低分子、核酸プローブ、抗体など) を利用する試みも相次いでいる。各種臓器や全身の低分子染色剤あるいは抗体による染色と 3 次元観察との組み合わせ例が報告され始めており、アルツハイマー病のアミロイド蓄積や神経活動の全脳可視化、ヒト胎児の 3 次元観察などの応用が進んでいる^{52,58,62,71,84,85)}。また、抗体の multiplex ラベリングや *in situ* hybridization の 3 次元化の試みが CLARITY の開発グループから報告されている^{76,86)}。

これらのサンプルから取得されるデータの解析について、特に臓器全体の 3 次元イメージを解析することを目的としたデータ解析パイプラインが、複数の研究グループから報告されている。上田らのグループは先んじて CUBIC 法における画像解析パイプラインを開発し、神経活動をラベルできるトランスジェニックマウスを用いたオミクス的な解析例を報告した^{62,70,87)}。続いて、アメリカ・内田らのグループ (ハーバード大) が狂犬病ウイルストレーサーを導入した脳の解析例を報告⁸⁰⁾、また同じくアメリカ・Tessier-Lavigne のグループが、cFos の全脳免

疫染色により神経活動をラベルした脳を解析するパイプライン「ClearMap」を報告⁸⁵⁾、アメリカ・Deisserothらのグループは神経活動によって遺伝学的に細胞をラベルできるマウスシステムやアデノ随伴ウイルスツールを用いて、ある条件下で活動した神経とその軸索のプロジェクションを同時にラベルし、CLARITYによる透明化と3次元イメージングで観察・定量化するパイプライン「CAPTURE」を構築し報告している⁸⁸⁾。さらに近年では、全脳アトラスと細胞解像度のイメージデータを用いてインタラクティブに解析を行えるマウス全脳のコンピュータ解析フレームワークが、スウェーデンのカロリンスカ研究所を中心としたグループから報告されている⁸⁹⁾。また日本からも、マウス全脳からすべての細胞の位置を取得して「点描画」として描出し、各細胞の位置に解剖学的情報を付加した細胞解像度アトラス「CUBIC-atlas」が報告されている⁹⁰⁾。本アトラスでは各細胞位置の周囲にある種の確率分布をもたせることで、レジストレーションしたサンプルデータ中の細胞位置をアトラス中の最も近傍と考えられる細胞位置にアノテーションする手法が用いられている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

● 多検体計測装置としての一細胞 RNA-seq

一細胞 RNA-seq を大量サンプル計測法として捉えなおす動きがある。例えば、CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトライブラリによって、一細胞ごとにランダムに遺伝子をひとつずつ破壊し、一細胞 RNA-seq を実施することで、数千から数万の遺伝子破壊とその結果のトランスクリプトームを1度の実験で得られる^{47,48)}。また、表面タンパク質に DNA バーコードを付加し、一細胞 RNA-seq によりトランスクリプトームと同時に DNA バーコードもシーケンスすることで、表面タンパク質の種類を同定する方法もある⁹¹⁾。細胞が増殖・分化するまえに、一細胞ごとに異なる変異をゲノムに挿入し、増殖・分化後に、その変異をシーケンスすることで、細胞の系譜を同定することができる。

● in situ sequencing・細胞・組織中の遺伝子発現の直接大規模解析法

一細胞レベルでゲノムの3次元構造をも把握する SPRITE 法が報告され、これまでの理解に加えてゲノムは隣の染色体同士で遺伝子発現に影響しうることなどが明らかとなっている⁹²⁾。細胞の位置情報を保ったまま一細胞のトランスクリプトームデータを得る方法の開発 (STARmap)⁹³⁾。本報告では培養細胞のみならず、150 μ m 厚の 3D in situ sequencing を成功させることに成功するなど今後の研究に風穴を開ける可能性がある。また、シーケンス以外の方法としては Joakin Lunderberg ら (KTH Royal Institute of Technology、スウェーデン) による Spatial transcriptomics 法が報告されており、同様に注目を集めている³³⁾。

● 多階層オミクスのシングルセルレベルでの統合

近年シングルセルレベルのゲノム・エピゲノム解析研究も発展しており、単一細胞から複数階層のオミクス情報を同時に取得する解析が構築されつつある。例えばゲノムとトランスクリプトームを同時に取得する手法として G&T-seq⁹⁴⁾、SIDR⁹⁵⁾ など、トランスクリプトームとエピゲノムを同時に取得する手法として scNMT-seq⁹⁶⁾ などが開発されている。オミクス同時解析により、単一のシングルセルオミクス解析で同定された制御状態が他オミクスとどのように関連するかを詳細に解析でき、細胞の分子制御構造の詳細な理

解に繋がる。

● 10x Genomics 社の Chromium システム

2018年2月のAdvances in Genome Biology and Technology (AGBT 2018)にて、10x Genomics社のChromiumシステムを用いてシングルセルバーコード、シングルセルエピゲノム(ATAC-seq)、シングルセルコピー数多型解析(CNV解析)が可能となることが報告され、今後これらの解析技術が身近なものになると期待される。

● Expansion Microscopy

2014年のノーベル賞受賞対象となった超解像顕微鏡は、特殊な顕微鏡セットアップや蛍光色素を必要とした。アメリカ・MITのEd BoydenらのグループおよびKwanghun Chungらのグループは、通常の1光子顕微鏡で超解像レベルの撮像解像度を得ることを目指し、サンプルを大きく膨潤・透明化させるExpansion Microscopyあるいはmagnified analysis of the proteome (MAP)と呼ばれる技術を開発した(97,98)。本技術では組織を吸水性ゲルに包埋し、組織の一部組成を処理した後にゲルの性質で組織を4倍から25倍程度まで膨潤させることができる(97,99)。東京大学・上田らは、マウス全脳的全細胞データを取得することを目指し、同様の発想でマウス全脳を膨潤させる新たな透明化手法「CUBIC-X」を開発した(90)。この手法では、人工ゲルを用いずに組織そのものの膨潤性質を増強させる化合物をスクリーニングで発見して利用している。

● データ解析パイプラインやソフトウェアの充実

- シングルセル解析において実験間のバッチ差を取り除き生命現象の本質を浮き彫りにするアルゴリズムが開発されている¹⁰⁰⁾。また低発現の遺伝子に対して発現量をリカバーするMAGIC¹⁰¹⁾やSAVER¹⁰²⁾などのアルゴリズムが開発され、発現量の低い転写因子の標的予測などを効率的に行えるようになった。このようなシングルセル解析を系統的に行うプラットフォームとして、Seurat¹⁰³⁾やScanpy¹⁰⁴⁾などが開発されている。さらにトランスクリプトームの次元削減手法として定番となってきたtSNEよりもさらに詳細な細胞分類が可能となるUMAPというアルゴリズムが開発された¹⁰⁵⁾。
- 一般的な画像データ解析のためのオープンソースソフトウェアとして、米国、欧州を中心としてImageJ、FijiやIcyなどが開発され広く利用されており、様々なプラグインの開発も進められている。また、大規模なサイズ(GB-TBサイズ)のデータへの適応も進んでおり、TeraStitcher、BigStitcher、BigDataViewerなどの解析ソフトの頒布が行われている。今後画像データ解析の需要はますます大きくなっていくと考えられており(BBSRC Strategic Review of Bioimaging 2018)、これらのプロジェクトの進展やファンディング状況は注視する必要がある。
- 顕微鏡を使ったタイムラプス蛍光イメージングでは、オルガノイド系、受精卵から胚への発生系など、解析対象が複雑化すれば、視野内に存在する多数の細胞を、またそれらを標識するために用いる多くの蛍光色を自動識別し追尾する必要が高まる。現在慶應義塾大学、九州大学などを中心とし、AIを用いて多数の細胞を自動識別し、追尾するシステムが開発されつつある。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

- NIH Common Found, The Single Cell Analysis Program (SCAP) が2012-2017年に実

施された。2018年より NIH Common Found The Human BioMolecular Atlas (HuBMAP) が、5.68M 米ドルでスタートした。

- 2017年、ヒトの全細胞種を同定する Human Cell Atlas (HCA) がスタート。ヒトの体を構成する全主要組織での一細胞トランスクリプトームによる、細胞種、細胞3次元位置、地理的、人種的な違いを考慮したヒト細胞の細胞地図を構築することを目指している。応用としては、発生、細胞周期、細胞状態、分子ネットワーク、細胞相互作用、コホート研究を挙げている。これは下記のような考え方に基づいている。
 - 一細胞単位のデータ解析により細胞集団を構成する細胞の種類・状態・反応等における多様性を明らかにすること。
 - 組織内における3・4次元位置を個々の細胞に付加する技術(空間トランスクリプトーム)やこれを推定する解析手法を組み合わせることで元の組織を計算機内で再構築し、位置座標に基づいた細胞の地図を構築すること。
 - 胞間相互作用などのこれまでにその詳細が明らかになっていない細胞集団として高次の性質を示す細胞間ネットワークを明らかにし、組織内や組織間での細胞間の関係性を明らかにすること。

また、これらを統合することで、受精卵から専門化された様々な細胞(分化細胞)が形成されていく発生過程を追跡した細胞系譜や、機能的な特徴に基づいた細胞間の関係を示す細胞連関地図を構築できる。

HCAでは、研究開発テーマの一般公募を行っている。2017年10月には、38プロジェクト(脳/免疫/消化管(胃腸)/皮膚/組織サンプル調整技術/解析技術)の採択が発表され、2018年4月にはソフトウェアツールの85プロジェクトが選ばれた。2017年6月に発表された Data Coordination Center が設立され、HCAで得られるデータの共有を目指す。HCAは国際プロジェクトであり、英国 EMBL-EBI、米国 Broad Institute、米国 UCSC Genomics Institute、日本の理研などが参加している。各国のプロジェクト予算に基づいた国際連携の下、2018年3月の段階で44ヶ国、185プロジェクト、482名が参加している。

- 2016年に、10年間600M\$以上の規模の「Chan Zuckerberg Initiative」が、スタンフォード大学やカルフォルニア大学などと連携し Chan Zuckerberg BioHUB 拠点を設立した。この研究拠点では、一細胞解析やHCAの研究開発を実施している。
- 欧州も、早期の段階から一細胞解析に着目し Platform for Advanced Single Cell Manipulation and Analysis (PASCA) などのプロジェクトを展開した。英国を中心とする機関から組織される一細胞技術の開発や技術を用いた研究を行う Single Cell Genomics Centre (SCGC) を発足させた¹⁰⁶⁾。ドイツ連邦教育研究省(BMBF)が Single Cell Omics Germany¹⁰⁷⁾ などの一細胞解析技術を応用した研究を支援している。
- EC Horizon 2020 の PILOT ACTIONS TO BUILD THE FOUNDATIONS OF A HUMAN CELL ATLAS にて、HCAの構築に協力する研究者に対してファンドすることを決定した。2年間3-5M EURが予定されている。
- 2018年に Wellcome Trust が6つの研究グループに総額8億円相当を配分した。
- 2014年に JST CREST/ さきがけ「統合一細胞解析のための革新的技術基盤」が立ち上がり、一細胞 ChIP-seq や RNA-seq、系譜解析、プロテオーム、メタボローム、一細胞捕捉技術、イメージング技術などの開発が行われている。

- 2014年より内閣府IMPACT「セレンディピティの計画的創出」では一細胞を高速にイメージング・単離する周辺技術の開発を実施している。
- 2018年度新学術領域研究「細胞ダイバーシティの統合的解明と制御」等、様々な研究領域でも一細胞遺伝子発現解析を中心技術に用いる場合も多く、組織発生や破綻の理解においても一細胞解析がもはやスタンダードな手法となっている。

(5) 科学技術的課題

- 多彩な分子の一細胞オミクス計測

普及しつつある一細胞RNA-seqであるが、機能性の非ポリA RNAや長鎖RNAを捉えることができない。cDNA合成法やPCR増幅技術に限界があるためである。HCAで主に利用される高出力型一細胞RNA-seqは、RNAの3'端しか検出できないため、ヒト細胞のアトラスが完成しても、RNA配列の全長が得られない問題がある。そのためHCAの成果は、RNAを標的とした核酸医薬、RNA編集技術による創薬に貢献しにくい。現在は、これらの分子を一細胞で捉えられるのは日本発の技術であるRamDA-seqのみである¹⁰⁸⁾。また、RNAは様々な修飾が知られているが、それらを一細胞でシーケンスした例はない¹⁰⁹⁾。今後は、エピトランスクリプトームの一細胞解析の開発が激化するだろう。

また、細胞のなかで起きる様々なイベントをpolyA RNAに変換することができれば、一細胞RNA-seqを利用して、数千から数万サンプルでも計測できる。現在のシーケンサーでは捉えることが困難である細胞間相互作用、タンパク質量、分子局在、細胞間空間配置などを生体内でpolyA RNAに変換し、シーケンスする手法を開発する、という方向性がある。現在、細胞分化系譜、表面タンパク質、ゲノム編集ノックインライブラリのゲノム挿入位置をポリAの付加されたDNAバーコードで記録し、トランスクリプトームと同時に計測する方法が提案されている。

- リアルタイム一細胞計測

オミクスは基本的に細胞を破壊する計測であり、1つの細胞を時系列で観測することは困難である。今後は、イメージングと分子プローブ技術により、シーケンスを用いずに、分子を網羅的に計測する技術の開発が望まれる。また、細胞内でのイベントを細胞内の核酸に逐次記録することで、破壊的なシーケンス技術を利用しても、擬似的にリアルタイムに計測したことと同義となる方法の開発方向も有り得る。特にイメージングでは捉えられないin vivoの深部で数ヶ月から数年に渡っておきる現象をゲノムDNAに記録し、シーケンスによって読み出す方法が日米で開発されている。

- DNAシーケンサーの開発

一細胞オミクスは、細胞バーコード法やcombinatorial indexing、マイクロ流体装置などの技術発展により、大量のサンプルを調製できるようになった。しかし、それらのデータをシーケンスするには、現在のコストやスループットでは足りなくなっている。少なくとも2-3桁のスループットを持つDNAシーケンサーの開発が必須である。現在のSequencing by synthesisやNanoporeベースとしたシーケンサーではこの限界を越えるのは困難であり、シーケンスの基礎原理からの開発が必要である。

Nanoporeシーケンサーの登場で、長鎖DNA配列決定が可能となった。しかし、ポア数が少なく、DNA分子数に対して決定できるシーケンス配列種の数も少ない。そのため、

一細胞由来の微量な核酸をシーケンスすることは困難である。DNA をシーケンスに変換する効率の向上が期待される。また、微量 DNA を長鎖 DNA シーケンサーで配列決定するには、今まで通り核酸の増幅が必要である。長鎖 DNA は切断されやすく、増幅も困難であるため、長鎖 DNA シーケンサー向けのシーケンスライブラリ作製技術の発展が望まれる。

固定された 3 次元組織内で DNA シーケンスできる技術が開発されつつある。これによって、RNA の局在や組織内での発現分布が得られる。現在は、決定できる RNA 種類が千程度であるが、細胞あたり数千の RNA が発現しているため、より決定できる種類数が増えることが期待される。

- 一細胞系譜追跡法の高度洗練化と AI による生物学的データ解析

1000 色までの超多色細胞系譜追跡法と DNA バーコーディング法の融合、1000 色までの超多色イメージングと 3 次元タイムラプスイメージング法と AI による個々の細胞識別とその追跡、あるいは上記超多色の自動識別技術の開発の組み合わせによって、オルガノイド、胚培養、ES/iPS 細胞分化系などによる興味対象一細胞（受精卵、生体幹細胞、単一 ES/iPS 細胞）の運命の追跡を可能とする研究開発が求められる。

SPRITE 法、STARmap 法など新しい技術の開発も行われ一細胞から得られる情報量はますます膨大となっている。さらに、一細胞の 3 次元タイムラプス解析（4 次元解析）による細胞の挙動、また複数細胞の相互作用（例えばニッチ細胞と幹細胞）などある組織の 1 場面に存在する数個から 1000 個単位の細胞の挙動を一定時間観察しそれらのオミクスデータ画像データを解析すると、情報が膨大すぎ、従来の解析手法では無理が生じることが予想される。そうした膨大なデータの中から意味のある生命現象を見出すためには、AI 等によるビッグデータ解析を取り入れ、進展させて行く必要があると考えられる。

- 日本人特有の細胞地図の構築

将来的に細胞系譜や細胞地図情報を臨床に応用することを目指した際、Human Cell Atlas 等の国際プロジェクトの報告を参照しつつ、日本人特有のリファレンスを作成することが重要になると考えられる。国際プロジェクトでは、人種間の細胞差を完全に考慮するのが困難であると予測されるため、日本人特有の細胞地図の構築は必須の課題となる。

- 個体全細胞解析による臓器連関解析

イソギンチャク¹¹⁰⁾ やマウス¹¹¹⁾ の個体全体におけるシングルセル解析が行われ、個体レベル解析による新規の細胞同定やその制御機構の解明、臓器間の細胞連関解析などが可能になった。様々な疾患や生命現象において他臓器連関をオミックスで解析することが可能となっており、シングルセルレベルの他臓器連関解析に発展することが期待される。

- シングルセルオミックス解析の臨床応用

シングルセル解析は少量検体でも解析可能であるため、臨床検体との相性が良い。がんの組織検体においてシングルセルレベルでゲノム変異とトランスクリプトーム変化を統合解析する研究が進んでおり¹¹²⁾、患者ごとにがんの細胞進化過程を詳細に明らかにしている。また臨床検体は容易に単一細胞に単離できないことが多く、保存可能な凍結組織から単離した細胞核を用いた single-nucleus RNA-seq 技術も確立されており¹¹³⁾、これにより single-cell RNA-seq と同様に細胞種分類・細胞機能解析を行うことができる。

- 3 次元組織化学と臨床応用

3次元組織学はマルチチャンネルな情報を容易に取得できる強みがあり、この利点を活かした組織サイトメトリーなどの適応例が報告されている⁶⁶⁾。また、病理診断などの臨床応用を目指した透明化・3次元染色技術の適応例がすでに複数報告されている^{114,115)}。今後、組織染色のチャンネル数、組織サイズ、染色スピードをさらに改善するとともに、応用範囲を広げる様々な試みが加速する可能性がある。

(6) その他の課題

● 分野連携

従来よりもさらに生命医学研究におけるデータ解析、数理モデル解析、工学的デバイスの開発、低分子化合物の作成とスクリーニング等々、複数の分野の研究者の共同研究が重要になっている。一方で、我が国の研究者が育ってきた環境から、異分野は異なるキャンパスに存在していて学生、院生、ポストドク時代とそれぞれ物理的に分けられた状況で育ってきているという点も問題点として挙げられるだろう。現在、旧来の大学教育、大学院教育の枠組みのあり方、例えば理学部、工学部、薬学部、医学部といった古い枠組み自体がすでに時代の進歩においていないのではないかという考え方もある。また、欧米ではそれらを複合し共同研究に主眼をおいた研究施設がすでに意味を持った形で機能し、成果を上げつつあるも我が国にはほとんどない。

一般にヒト細胞を使用するプロジェクトには検体から組織を採取することが必要である。従って、医療現場等との密接な連携が重要であり、ここで示している一細胞解析により細胞系譜、地図の構築を目指す研究領域も該当する。そこで、プロジェクト設立時にどの程度のサンプルを必要とし共有化できるか、また、人材、施設、費用の面での要求及び法整備に関して準備が重要である。国内プロジェクトとして組織体制を整理した結果、効率よく各プロジェクトが大学病院等と連携し、検体サンプルを得て臨床医学のテーマにも貢献できると考えられる。

● 人材育成

Human Cell Atlasでは情報解析者の組織化に莫大な投資を行っている。既に、細胞種決定のための機械学習等を用いた手法などが多数報告されており、特にバイオインフォマティクスの重要性が高まっているにも関わらず、その人材が極度に欠如している。最大の原因は、日本では大規模なバイオインフォマティクス研究所が存在せず、旧来の実験研究所や情報科学研究所の一研究室で大部分の生命情報科学教育が行われていることである。また、両分野を習得するには膨大な時間がかかり、米国の様にダブルメジャーの体制が我が国では不十分であることも課題である。

またウェットとドライの両者をバランス良く理解した人材も今後多数輩出される必要がある。ENCODEやHCAなどオミクスの国際プロジェクトは、バイオインフォマティクス研究者がオーガナイズしてきた。これは、オミクス技術の開発や利活用には、高度な情報処理が必須になっているためである。日本では、バイオインフォマティクス研究者がヘッドを務めるゲノム科学のラボや大型プロジェクトはほぼなく、国際競争力に乏しい。これまで、国をあげてバイオインフォマティクス「従事者」の育成プログラムが実施されてきたが、これは情報処理従事者に特化した人材の育成である。シーケンス技術の発展とともに我が国でも実験と情報科学の両方に明るい若手研究者が増えつつある。今後は、そのような人材に実験できる環境や予算配分を行い、研究室や大型プロジェクトをマネジメントできる人材を育成することが一細胞

オミクス分野の発展において必須である。また、そのような人材育成プログラムも必要であろう。

● コアファシリティと高度な研究開発チームの両立

一細胞解析における一細胞マルチオミクスが強力な解析手段になり、この2-3年の中でも各臓器、各種悪性腫瘍などで次々と新しい知見が見出されている現状は広く知られている。これらの解析は一般的にコストが高く、限られた研究施設でしか行うことができないために我が国では裾野が広がらない現状があり、欧米との同種研究との競合力の点で明らかな差が認められている。新しいオミクス解析の技術開発とともに既存技術のコストダウン、スピードアップ、より簡便な技術開発が極めて重要である。

臍臓は膜分解酵素等を含み、細胞を単離させると細胞融解するなど、ヒト組織の多くはそれぞれ専用の溶解液・技術が必要である。細胞の状態が得られる結果に強く影響するため、Human Cell Atlas では初期研究においては細胞処理の規格化を進めている。

日本では欧米との試薬・装置の価格差によって、中国や韓国、米国などの受託企業でシーケンスの方が安価になっている。そのため、国内のコアファシリティのシーケンサーはほぼ稼動しておらずシーケンサーを所有する意義が減少してきている。しかしながら、ライフラインであるシーケンシングを海外に完全に依存することは、国内のシーケンス技術レベルの低下やデータの流出、科学発展の独立性を担保できなくなる恐れがある。感染症の診断など、迅速性が求められる分野では、国内ですぐに利用できるコアファシリティが必須である。以上の理由で、受託による安価な実験と国内のコアファシリティの育成を両立させなければならない。シーケンス技術が低下すると、一細胞オミクス技術の開発力や運用力も向上せず、低下するであろう。

他国は、一細胞オミクス技術を開発しているトップラボでは、もはや共同研究や自身のデータプロダクションを実施していない。研究所内外のコアファシリティに技術移転を行い、自身は研究開発に集中しつつ、国内のユーザーがデータを得られるように工夫されている。日本では、技術の開発者が、開発から共同研究、支援、起業、試薬市販化、データ解析環境開発、他技術導入・評価などを1つの研究室で行うのが一般的である。そのため研究開発の生産性が著しく低下し、国際競争力も低下しつつある。コアファシリティを運営できる人材育成やその評価システム、長期的な予算配分とともに、各研究者の大型機器購入制限などが必要であろう。単に既存の技術を提供する作業だけでなく、最先端の技術に精通するための技術導入費用の確保も必須である。

イメージング、データ解析の標準化、および巨大データのストレージの問題は未だに大きな課題である。目的に応じた顕微鏡や解析パイプラインを一部の主要な研究者らが自力で構築している状況であり、開発を担当していないユーザーサイドからは、透明化が簡便化される一方でその後のイメージング、解析の部分が大きなボトルネックとして感じられ、参入が進んでいない部分も大きい。このような状況から、研究コミュニティ全体として本技術を活用していく体制がまだ整っていない。特にライトシート顕微鏡など、現時点では高額であるが3次元観察に適した顕微鏡の普及が必要である。データ解析については、ギガバイトからテラバイトのオーダーのデータを、知識や技術のないエンドユーザーが簡便に扱えるソフトウェア・ハードウェアの開発・普及が必要となっており、オープンソースソフトウェア (ImageJ 等) と組み合わせて使用できる plugin 等の開発がヨーロッパを中心に進められている。これらの標準化は基礎研究分野のみならず、臨床診断技術等への応用の点でも非常に重要な課題となると考えられる。

● 産学連携

一細胞解析や細胞系譜、細胞関連地図によって得られた結果を産業に提供し、活用するための枠組みを築くことが肝要である。解析プラットフォームを新規に構築しようとする企業とアカデミアによる共同研究や、商品化を目指す企業とアカデミアによる共同研究など、あらゆる面での産学連携が本研究領域で進む必要がある。英国、EU、米国を中心に、ライフサイエンスや製薬関連の企業との産学連携を目指す複数の学会を主催する Oxford global¹¹⁶⁾ が活動しており、一細胞解析に特化した学会も含まれる¹¹⁷⁾。産業との結びつきが強い学会が存在することは、基礎研究に続く、応用研究・開発において重要である。

米国では一細胞オミックスを用いた創薬で大型のスタートアップが設立された。コファウンダーは HCA の代表者であり、一細胞オミックスの国際協力と並行して、産業界での競争がヒートアップしている。国内でも ICT 企業がヒトの遺伝子検査や健康診断データなどのヘルスケア情報の統合などに参入しており、アカデミアと産業界で人材流動性が非常に高まっている。日本においても、DNA シーケンスの利活用を基盤技術としたスタートアップが増加しているが、一細胞オミックスを産業応用しようとする例はほぼない。今後はより積極的な起業支援が必要であろう。例として、一細胞技術を用いたバイオプシー検査は予防医学の面で精度の高い診断を提供できるだけでなく、個人への医薬品の効果を分析するための情報源ともなり、精密医療につながる。そして、そのような医薬品に関する情報などが細胞関連地図に付加的な情報として付与されると、医薬品の品質を上げるような好循環を生み出す仕組みが産学連携により可能になると考えられる。

顕微鏡についてはドイツ・LaVision Biotec 社が、透明化した大型組織を対象としたマクロズーム型ライトシート顕微鏡を商品化し販売している。現行では、本顕微鏡が世界展開しているほぼ唯一の大型透明化臓器対応型のマクロズームシート照明顕微鏡である。オリンパス社が東京大学と連携し、LaVision 社と同等またはより高性能なマクロズーム型ライトシート顕微鏡の個注販売を小規模に開始しているが、現時点では国内向けに限られる。ドイツ・Zeiss 社が販売しているライトシート型顕微鏡は、より小型のサンプルを高倍率で見ることを目的としているが、小型の透明化サンプルへも適応可能ではある。

またオリンパス社は Scale 法や SeeDB 法で透明化した組織に最適化された多光子用対物レンズを理化学研究所と連携して開発・販売している。近年ではライトシート顕微鏡も様々な光路構築がテストされており、斜めから 2 軸で観察するアメリカ・ASI 社の diSPIM 型顕微鏡なども透明化組織の観察に適用できる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 一細胞完全長 Total RNA-seq 法 RamDA-seq¹⁰⁸⁾ や高出力・高感度を両立した一細胞 RNA-seq 法 Quartz-Seq2¹¹⁸⁾、世界最速の一細胞検索エンジン開発 CellFishing.jl¹¹⁹⁾、遺伝子制御ネットワーク予測 SCODE¹²⁰⁾ などで世界をリードしている (理研)。 生殖細胞 (京大) やオルガノイド (横浜市大) の一細胞オミックス解析で世界をリード。再生医療、がん、免疫分野への応用で発展が見込まれる。臨床応用例などほぼない。 生細胞での一細胞質量分析で、エレクトロスプレーイオン化法において世界をリードしている {Mizuno:2008hk}。 理研・宮脇らの Scale 法^{57,58)}、理研・今井らの SeeDB 法^{60,61)}、東大/理研・上田らの CUBIC 法^{62,67,70-72,90)}、北大・根本ら、東大・小野寺らの 2,2'-チオジエタノールによる透明化法^{64,74)}、名古屋大・東山らの ClearSee 法⁶³⁾、東京理科大・松永らの TOMEI 法⁷⁷⁾ など、動植物を対象とした多数の透明化法の開発・応用。Scale におけるアルツハイマー病組織の 3次元観察⁵⁸⁾、SeeDB 法における超解像度と組み合わせ⁶¹⁾、CUBIC 法における全細胞網羅的観察と解析パイプラインの整備、睡眠・覚醒の機能回路同定、がん細胞の全身転移観察、3D 病理学など^{62,67,70,87,90,114)}。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 横河電機が一細胞イメージング & 採取装置を開発しコンソーシアムを構築。Takara CloneTech 社が一細胞採取装置 iCELL8 を上市 国内メーカーによる透明化試薬販売、ライトシート用 CMOS カメラ販売、最適化対物レンズ販売、ライトシート顕微鏡の個別受注開始等。 日本には産業と結びつけるための企業を積極的に受け入れる意見交流の場がないことが課題である。
米国	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> シングルセル解析の技術・応用が飛躍的に進展 マイクロ流体デバイスを利用した高出力な一細胞 RNA-seq 法 Drop-seq/inDrop RNA-seq で世界をリードしている (Harvard U.)。ゲノム編集ライブラリで網羅的な遺伝子ノックアウトを実施して一細胞 RNA-seq で捉える Perturb-seq (Broad Inst.)、トランスクリプトームと細胞表面タンパク質を同時に捉える CITE-seq (NYU) など一細胞 RNA-seq を利用した新技術開発が盛ん。 一細胞トランスクリプトームの解析環境 Seurat がデファクトになりつつある (NYU) Human Cell Atlas プロジェクトの提案にも米国のブロード研究所が中核機関として参画している。 ヒト/マウス一細胞発現アトラス (CZI BioHub) がある。CLARITY、SWITCH、iDISCO、C₃D などの透明化・3次元免疫染色手法の開発と応用例 (ウイルスラベル脳、cFos ラベル脳など)^{52,66,68,69,75,76,78,84-86,121)}、ライトシート顕微鏡開発^{122,123)}、Expansion microscopy 法^{97,98)}、in situ sequencing 開^{26,124,125,121)}
	応用研究・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 高出力型一細胞 RNA-seq 用の装置を開発・販売 (10x Genomics, Inc) され、デファクトスタンダードになりつつある。HCA 代表者が一細胞オミックス技術を利用した創薬スタートアップ Celsius Therapeutic が 65M 米ドルを確保 シングルセル解析の臨床応用も飛躍的に発展。例: Aviv Regev ラボなどが臨床検体を多数解析 CLARITY 専用機の商品化 sCLARITY システム (Quorum Technologies Inc. カナダ) X-CLARITY システム (Logos Biosystems アメリカ・韓国) iDISCO ベースの脳神経活動データベース化と起業化 (Cerrterra アメリカ) 米国では Human Cell Atlas などのプロジェクトに資金を企業が提供しており、産業に結びつきうる体制がある¹²⁶⁾。

欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> SMARTer 法による一細胞 RNA-seq の開発でリード。 UK (sangar, EBI/EMBL) やスウェーデン (Karolinska institutet) が HCA で中心的な役割を果たしている。ヒト脳やヒト発生 (胎児) 由来の網羅的な一細胞発現アトラスを構築中。 オランダ Hubrecht Institute は一細胞トランスクリプトームからの希少細胞同定、幹細胞予測ソフトウェア開発や消化器オルガノイドの解析でリード BABB 法によるマウス全脳イメージングの最初期の報告、3DISCO、uDISCO、vDISCO、FluoClearBABB 法の開発^{50,51,53,54,56}、脊髄疾患モデルやウイルスラベル脳への応用例^{51,53}、2,2'-チオジエタノールを使用した透明化法⁷³、ヒト3次元病理開発¹¹⁵、ライトシート顕微鏡開発と透明化組織への応用¹²⁷ Spatial Transcriptomics による組織からの空間的遺伝子発現解析³³ 画像解析ツールの開発 (ilastik, Icy, TeraStitcher, BigStitcher, BigDataViewer, CARE 等)
	応用研究 ・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> スウェーデンでは、空間発現量を計測する手法や装置を開発している (Spatial Transcriptomics) 顕微鏡メーカーによるライトシート顕微鏡の開発・販売 (Zeiss 社ドイツ、LaVision Biotec 社 ドイツ)
中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> 発表論文は玉石混合だが、数的に急激に増加している。世界的に利用されている技術は少ない。シングルセル解析でも欧米に負けずに結果を出している。マウスの全臓器を対象とした一細胞トランスクリプトームを世界で初めて実現: Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. Cell 2018. Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China Scale/SeeDB/CUBIC 派生プロトコル (FLUIT 法、UbasM 法) の報告^{65,128}
	応用研究 ・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> より低価格の一細胞 RNA-seq の試薬を 10x genomics と共同で開発 (MGI/BGI) 欧米、日本に比べて倫理的抑制が低く、ヒト臨床サンプルを用いた大胆な研究が行われている。
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 総合家電・電子部品・製品メーカーの付属研究所より一細胞マルチオミックス法やがんの一細胞トランスクリプトームの論文が出ている (Samsung Medical Institute) CLARITY 派生プロトコル (ACT-PRESTO 法他) 60 の報告。 Human Cell Atlas に参画する上で、一細胞解析に関する 2019 年から 2020 年までの予算を National Research Foundation (NRF) に計上している¹²⁹。
	応用研究 ・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 安価にシーケンス受託する企業があり、アジアではシーケンス外注先になっている (Mircogen)。マイクロ流体装置の研究が盛んで、開発のポテンシャルがある。 CLARITY 専用機の商品化 X-CLARITY システム (Logos Biosystems アメリカ・韓国)

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ: 大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ: 技術開発 (プロトタイプの開発含む)・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎: 他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○: ある程度の活動・成果が見えている、

△: 他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×: 特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↗: 上昇傾向、→: 現状維持、↘: 下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Ramsköld D, Luo S, Wang Y-C, Li R, Deng Q, Faridani OR, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. Nature Biotechnology. Nature Publishing

- Group; 2012 Aug;30 (8) :777–82.
- 2) Sasagawa Y, NIKAIDO I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, et al. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol. BioMed Central*; 2013 Apr 17;14 (4) :R31.
 - 3) Hashimshony T, Wagner F, Sher N, Yanai I. CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification. *Cell Reports. Elsevier*; 2012 Sep 27;2 (3) :666–73.
 - 4) Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells. *Cell. Elsevier*; 2015 May 21;161 (5) :1187–201.
 - 5) Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015 May;161 (5) :1202–14.
 - 6) Hulsmans M et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*. 169, 510-522 (2017)
 - 7) Nomura, S. et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat. Commun.* in press
 - 8) Zappia L, Phipson B, Oshlack A. Exploring the single-cell RNA-seq analysis landscape with the scRNA-tools database. Schneidman D, editor. *PLoS Comput Biol. Public Library of Science*; 2018 Jun;14 (6) :e1006245.
 - 9) Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 2007; 450: 56.
 - 10) Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 381
 - 11) duVerle DA, Yotsukura S, Nomura S, et al. CellTree: an R/bioconductor package to infer the hierarchical structure of cell populations from single-cell RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2016; 17: 363
 - 12) Leng N, Chu LF, Barry C, et al. Oscope identifies oscillatory genes in unsynchronized single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods* 2015; 12: 947
 - 13) Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016; 352: 189
 - 14) Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; 344: 1396
 - 15) Gao R, Davis A, McDonald TO, et al. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nat Genet* 2016; 48: 1119
 - 16) Wang J, Cazzato E, Ladewig E, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 2016; 48: 768
 - 17) Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2016; 22: 792
 - 18) Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C, et al. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. *Nature* 2016; 539: 309
 - 19) McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA, Horwitz MS, Schier AF, Shendure J. Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2016 May 26;:aaf7907.
 - 20) Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1):70-1.

- 21) RedHorse K, Ueno H et al. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):549-53.
- 22) Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science* 2015; 350: 94
- 23) Alemany A et al. Whole-organism clone tracing using single-cell sequencing. *Nature*. 556, 108-112 (2018)
- 24) Perli SD, Cui CH, Lu TK. Continuous genetic recording with self-targeting CRISPR-Cas in human cells. *Science* 2016; 353. pii: aag0511
- 25) Frieda KL, Linton JM, Hormoz S, et al. Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells. *Nature* 2017; 541: 107
- 26) Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, et al. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* 2015; 348: aaa6090
- 27) Shah S, Lubeck E, Zhou W, Cai L. In Situ Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus. *Neuron*. 2016 19;92 (2) :342-57.
- 28) Junker JP, Noël ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA Tomography in the zebrafish embryo. *Cell* 2014; 159: 662
- 29) Wu CC, Kruse F, Vasudevarao MD, et al. Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Dev Cell* 2016; 36: 36
- 30) Svensson V et al. SpatialDE: identification of spatially variable genes. *Nat Methods*. 15, 343-346 (2018)
- 31) Edsgård D et al. Identification of spatial expression trends in single-cell gene expression data. *Nat Methods*. 15, 339-342 (2018)
- 32) Satija R, Farrell JA, Gennert D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 495、Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 503
- 33) Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 2016; 353: 78
- 34) Luo Y, Coskun V, Liang A, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell* 2015; 161: 1175
- 35) Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* 2015; 163: 1663
- 36) Buenrostro JD, Wu B, Litzenburger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* 2015; 523: 486
- 37) Cusanovich DA, Daza R, Adey A, et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science* 2015; 348: 910
- 38) Jin W, Tang Q, Wan M, et al. Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples. *Nature* 2015; 528: 142
- 39) Rotem A, Ram O, Shores N, et al. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 1165
- 40) Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, Krueger F, Saadeh H, Peat J, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nature Methods*. 2014 Jul 20;11 (8) :817-20.

- 41) Farlik M, Sheffield NC, Nuzzo A, et al. Single-cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics. *Cell Rep* 2015; 10: 1386
- 42) Mooijman D, Dey SS, Boisset JC, et al. Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 852
- 43) Nagano T, Lubling Y, Yaffe E, et al. Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell. *Nat Protoc* 2015; 10: 1986
- 44) Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 2016; 13: 229
- 45) Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods* 2015; 12: 519
- 46) Dixit A, Parnas O, Li B, et al. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell* 2016; 167: 1853
- 47) Jaitin DA, Weiner A, Yofe I, et al. Dissecting Immune Circuits by Linking CRISPR-Pooled Screens with Single-Cell RNA-Seq. *Cell* 2016; 167: 1883
- 48) Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods* 2017; 14: 297
- 49) Adamson B, Norman TM, Jost M, et al. A Multiplexed Single-Cell CRISPR Screening Platform Enables Systematic Dissection of the Unfolded Protein Response. *Cell* 2016; 167: 1867
- 50) Dodt, H.U. et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4, 331-336 (2007) . DOI: 10.1038/nmeth1036
- 51) Ertürk, A. et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 7, 1983-1995 (2012) . DOI: 10.1038/nprot.2012.119
- 52) Renier, N. et al. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896-910 (2014) . DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.010
- 53) Schwarz, M.K. et al. Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains. *PLoS One* 10, e0124650 (2015) . DOI: 10.1371/journal.pone.0124650
- 54) Pan, C. et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* 13, 859-867 (2016) . DOI: 10.1038/nmeth.3964
- 55) Klingberg, A. et al. Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *J Am Soc Nephrol* 28, 452-459 (2017) . DOI: 10.1681/ASN.2016020232
- 56) Cai, R. et al. Panoptic vDISCO imaging reveals neuronal connectivity, remote trauma effects and meningeal vessels in intact transparent mice. *bioRxiv* (2018) . doi: <https://doi.org/10.1101/374785>
- 57) Hama, H. et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14, 1481-1488 (2011) . DOI: 10.1038/nn.2928
- 58) Hama, H. et al. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* 18, 1518-1529 (2015) . DOI: 10.1038/nn.4107
- 59) Kuwajima, T. et al. ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* 140, 1364-1368 (2013) . DOI: 10.1242/dev.091844
- 60) Ke, M.T., Fujimoto, S. & Imai, T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16, 1154-1161 (2013) . DOI: 10.1038/nn.3447
- 61) Ke, M.T. et al. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing

- Agent. Cell Rep 14, 2718-2732 (2016) . DOI: 10.1016/j.celrep.2016.02.057
- 62) Susaki, E.A. et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell 157, 726-739 (2014) . DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.042
- 63) Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y. & Higashiyama, T. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. Development 142, 4168-4179 (2015) . DOI: 10.1242/dev.127613
- 64) Aoyagi, Y., Kawakami, R., Osanai, H., Hibi, T. & Nemoto, T. A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain. PLoS One 10, e0116280 (2015) . DOI: 10.1371/journal.pone.0116280
- 65) Chen, L. et al. UbasM: An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging. Sci Rep 7, 12218 (2017) . DOI: 10.1038/s41598-017-12484-3
- 66) Li, W., Germain, R.N. & Gerner, M.Y. Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D) . Proc Natl Acad Sci U S A 114, E7321-E7330 (2017) . DOI: 10.1073/pnas.1708981114
- 67) Kubota, S.I. et al. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. Cell Rep 20, 236-250 (2017) . DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.010
- 68) Chung, K. et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature 497, 332-337 (2013) . DOI: 10.1038/nature12107
- 69) Yang, B. et al. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. Cell 158, 945-958 (2014) . DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.017
- 70) Susaki, E.A. et al. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. Nat Protoc 10, 1709-1727 (2015) . DOI: 10.1038/nprot.2015.085
- 71) Tainaka, K. et al. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. Cell 159, 911-924 (2014) . DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.034
- 72) Tainaka, K. et al. Chemical Landscape for Tissue Clearing based on Hydrophilic Reagents. Cell Reports in press (2018) . DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.056
- 73) Costantini, I. et al. A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. Sci Rep 5, 9808 (2015) . DOI: 10.1038/srep09808
- 74) Sekitani, T. et al. Ultraflexible organic amplifier with biocompatible gel electrodes. Nat Commun 7, 11425 (2016) . DOI: 10.1038/ncomms11425
- 75) Treweek, J.B. et al. Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping. Nat Protoc 10, 1860-1896 (2015) . DOI: 10.1038/nprot.2015.122
- 76) Murray, E. et al. Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. Cell 163, 1500-1514 (2015) . DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.025
- 77) Hasegawa, J. et al. Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. Plant Cell Physiol 57, 462-472 (2016) . DOI: 10.1093/pcp/pcw027
- 78) Greenbaum, A. et al. Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. Sci Transl Med 9 (2017) . DOI: 10.1126/scitranslmed.aah6518
- 79) Jing, D. et al. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. Cell Res 28, 803-818 (2018) . DOI: 10.1038/s41422-018-0049-z
- 80) Menegas, W. et al. Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically

- distinct subclass. *Elife* 4, e10032 (2015) . DOI: 10.7554/eLife.10032
- 81) Wang, L. et al. The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature* 558, 127-131 (2018) . DOI: 10.1038/s41586-018-0165-4
- 82) Susaki, E.A., Ukai, H. & Ueda, H.R. Next-generation mammalian genetics toward organism-level systems biology. *npj Syst Biol Appl* 3, 15 (2017) . DOI: 10.1038/s41540-017-0015-2
- 83) Chan, K.Y. et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 20, 1172-1179 (2017) . DOI: 10.1038/nn.4593
- 84) Liebmann, T. et al. Three-Dimensional Study of Alzheimer's Disease Hallmarks Using the iDISCO Clearing Method. *Cell Rep* 16, 1138-1152 (2016) . DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.060
- 85) Renier, N. et al. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165, 1789-1802 (2016) . DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.007
- 86) Sylwestrak, E.L., Rajasethupathy, P., Wright, M.A., Jaffe, A. & Deisseroth, K. Multiplexed Intact-Tissue Transcriptional Analysis at Cellular Resolution. *Cell* 164, 792-804 (2016) . DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.038
- 87) Tatsuki, F. et al. Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron* 90, 70-85 (2016) . DOI: 10.1016/j.neuron.2016.02.032
- 88) Ye, L. et al. Wiring and Molecular Features of Prefrontal Ensembles Representing Distinct Experiences. *Cell* 165, 1776-1788 (2016) . DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.010
- 89) Fürth, D. et al. An interactive framework for whole-brain maps at cellular resolution. *Nat Neurosci* 21, 139-149 (2018) . DOI: 10.1038/s41593-017-0027-7
- 90) Murakami, T.C. et al. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat Neurosci* 21, 625-637 (2018) . DOI: 10.1038/s41593-018-0109-1
- 91) Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nature Methods*. Nature Publishing Group; 2017 Sep;14 (9) :865–8.
- 92) Sofia A. Q et al. Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell* VOLUME 174, ISSUE 3, P744-757.E24, JULY 26, 2018.
- 93) Wang et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* 27 Jul 2018:Vol. 361.
- 94) Macaulay IC et al. Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq. *Nat Protoc*. 11, 2081-103 (2016)
- 95) Han KY et al. SIDR: simultaneous isolation and parallel sequencing of genomic DNA and total RNA from single cells. *Genome Res*. 28, 75-87 (2018)
- 96) Clark SJ et al. scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells. *Nat Commun*. 9, 781 (2018)
- 97) Chen, F., Tillberg, P.W. & Boyden, E.S. Optical imaging. Expansion microscopy. *Science* 347, 543-548 (2015) . DOI: 10.1126/science.1260088
- 98) Ku, T. et al. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *Nat Biotechnol* 34, 973-981 (2016) . DOI: 10.1038/nbt.3641
- 99) Chang, J.B. et al. Iterative expansion microscopy. *Nat Methods* 14, 593-599 (2017) . DOI: 10.1038/nmeth.4261

- 100) Haghverdi L et al. Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat Biotechnol.* 36, 421-427 (2018)
- 101) van Dijk D et al. Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion. *Cell*. pii: S0092-8674 (18) 30724-4 (2018)
- 102) Huang M et al. SAVER: gene expression recovery for single-cell RNA sequencing. *Nat Methods.* 15, 539-542 (2018)
- 103) Butler A et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol.* 36, 411-420 (2018)
- 104) Wolf FA et al. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.* 19, 15 (2018)
- 105) McInnes L & Healy J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. arXiv:1802.03426v1
- 106) <https://www.ebi.ac.uk/about/news/press-releases/single-cell-centre>
- 107) <http://icb-scog.helmholtz-muenchen.de/>
- 108) Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y, Umeda M, Danno H, NIKAIDO I. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2018 Feb 12;9 (1) :619.
- 109) Davalos V, Blanco S, Esteller M. SnapShot: Messenger RNA Modifications. *Cell*. 2018 Jul 12;174 (2) :498-498.e1.
- 110) Sebé-Pedrós A et al. Cnidarian Cell Type Diversity and Regulation Revealed by Whole-Organism Single-Cell RNA-Seq. *Cell*. 173, 1520-1534 (2018)
- 111) Han X et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*. 172, 1091-1107 (2018)
- 112) Kim C et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 173, 879-893 (2018)
- 113) Lake BB et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science*. 352, 1586-1590 (2016)
- 114) Nojima, S. et al. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci Rep* 7, 9269 (2017) . DOI: 10.1038/s41598-017-09117-0
- 115) Tanaka , N. et al. Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nature Biomedical Engineering* 1, 796-806 (2017) . DOI: 10.1038/s41551-017-0139-0
- 116) <https://www.oxfordglobal.co.uk/>
- 117) <https://www.oxfordglobal.co.uk/singlecell-congress/>
- 118) Sasagawa Y, Danno H, Takada H, Ebisawa M, Hayashi T, Kurisaki A, et al. Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2017 Jul 21::159384.
- 119) Sato K, Tsuyuzaki K, Shimizu K, Nikaido I. CellFishing.jl: an ultrafast and scalable cell search method for single-cell RNA-sequencing. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018 25::374462.
- 120) Matsumoto H, Kiryu H, Furusawa C, Ko M, 2017. SCODE: An efficient regulatory network inference algorithm from single-cell RNA-Seq during differentiation. *Academicoupcom*
- 121) Wang, X. et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* 361 (2018) . DOI: 10.1126/science.aat5691

- 122) Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B. & Deisseroth, K. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc* 9, 1682-1697 (2014) . DOI: 10.1038/nprot.2014.123
- 123) Bouchard, M.B. et al. Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high speed volumetric imaging of behaving organisms. *Nat Photonics* 9, 113-119 (2015) . DOI: 10.1038/nphoton.2014.323
- 124) Lubeck, E., Coskun, A.F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M. & Cai, L. Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Methods* 11, 360-361 (2014) . DOI: 10.1038/nmeth.2892
- 125) Lee, J.H. et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science* 343, 1360-1363 (2014) . DOI: 10.1126/science.1250212
- 126) <https://www.chanzuckerberg.com/human-cell-atlas/comp-tools>
- 127) Silvestri, L., Costantini, I., Sacconi, L. & Pavone, F.S. Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J Biomed Opt* 21, 081205 (2016) . DOI: 10.1117/1.JBO.21.8.081205
- 128) Hou, B. et al. Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Front Neuroanat* 9, 19 (2015) . DOI: 10.3389/fnana.2015.00019
- 129) http://www.riken.jp/~media/riken/pr/blog/2017/171220_1p.pdf

2.1.7 細胞外微粒子・エクソソーム

(1) 研究開発領域の定義

生体内には、外部から侵入する（外因性）または細胞から生じる（内因性）さまざまな「細胞外微粒子」が存在している。外因性微粒子としては環境中のPM2.5などが、内因性微粒子としては、エクソソームやメンブレンベシクル（MV）といったものが挙げられる。エクソソームはほぼ全ての種類の細胞が分泌する小型（直径30～100 nm程度）の膜小胞で、血液や尿・髄液・涙・唾液などの体液や細胞培養液中に数多く存在している。また、細菌も同様に細胞膜からなる細胞外微粒子、MV（直径20～400 nm程度）を産生していることが明らかになっている。どちらも共通して、内部に含有される分子（脂質・タンパク質・RNAなど）が他の細胞に受け渡されることで、1細胞レベルを越えた様々な細胞間情報伝達を担うことが近年判明し、その機能が注目されている。細胞の状態や疾患の進展、細胞間コミュニケーションに影響、関連していると考えられており、医療、創薬、診断、微生物叢など多くの研究領域にて、その機能解析やバイオマーカー探索が進められている。

(2) キーワード

エクソソーム、細胞外微粒子、mRNA / miRNA、がん微小環境、神経変性疾患、バイオマーカー、リキッドバイオプシー、ドラッグデリバリーシステム、ナノ粒子、PM2.5、細胞外小胞、オートファジー、メンブレンベシクル、細胞間相互作用

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

【外因性（PM2.5など）】

近年、環境中の様々な微粒子（外因性微粒子）の生体内への影響が注目されておえり、具体例としてはPM2.5やカーボンナノチューブなどと疾患との関連性の研究が進められている。しかしながら、外因性微粒子については、定量分析、観察技術の制約から生体内への取り込み過程、分布や局在等の挙動などの多くが未解明のままとなっており、有害微粒子の対策が遅々として進んでいない。動態解析のための新技術開発により、微粒子が惹起する生命現象の本質を理解し、環境や生体に影響を及ぼす微粒子の機能解明を目的とした研究開発を推進することは環境や健康に関する各種課題解決に貢献し、きわめて重要である。

【内因性（エクソソーム）】

エクソソームの発見自体は古く、1970年代には細胞内の不要物排出機構として存在が知られていた。しかし、2007年にLötvallらによって、エクソソーム内に分泌細胞由来のmRNAやmiRNAが含まれ、それらが他細胞に受け渡されることによって、遺伝子発現情報の交換に関与することが発見された¹⁾。その後、エクソソームは新たな細胞間情報伝達機構として注目され、新規機能解析やエクソソームを応用または標的とした創薬研究が世界中で活発に行われている。例えば、免疫系においては、免疫細胞間での抗原情報の交換や、免疫細胞の活性化／不活性化など、様々な免疫機能制御に関与する可能性が示されている²⁾。神経系では、細胞内での凝集により様々な神経変性疾患の原因となりうるタンパク質が、エクソソームによって細胞外へ放出され、周囲の細胞へと伝播される事が明らかとなり、神経変性の進展に関与する可

能性が示されている³⁾。一方、がん細胞が放出するエクソソームには、血管新生や転移、免疫逃避に関連する分子が含まれることが示されており、がん細胞進展に適した微小環境構築に重要な役割を担うと考えられている⁴⁾。更に、エクソソームに含まれる特定のタンパク質やRNAの発現様式が、細胞の状態や疾患の進展と関連し、細胞のバイオマーカーとして有用であることが示されており、様々な疾患の早期診断や治療効果の判定などへの応用が大きく期待されている。本研究領域の興隆に伴い、基礎生物学者のみならず、臨床研究、公衆衛生、ナノテクノロジー、検出技術開発、バイオインフォマティクスなど様々な分野の研究者が参入しており、分野横断的な融合研究が行われつつある。しかし、これらの研究の基盤となるエクソソームの解析技術や試料の調製法などは未熟であり、研究の進展に突破口となり得る新たな技術の開発が求められている。

【内因性 (MVs)】

細菌は地球上で最も多様で広範囲な環境に生息する細胞性生物の一つであり、環境・健康・食料に渡って我々の生活に直接関わっている。そのほとんどの細菌は細胞外に細胞膜により構成される20-400nm程度の細胞外微小粒子を放出する^{5,6)}。細菌が形成する細胞外微小粒子はメンブレンベシクル (MVs) と呼ばれ、その種類と機能は多岐に渡っていることが分かってきた。例えば、MVsは細菌間での情報伝達 (細菌間コミュニケーション) や遺伝子のやり取り (遺伝子水平伝播) などの「細胞間相互作用」、感染した動・植物細胞への毒素の運搬や抗生物質耐性などの「細菌の病原性」、ウイルスや宿主の免疫系から逃れるなどの、「防御機構」、さらには、細菌の栄養獲得や地球の「物質循環」にも寄与している^{7,8)}。細菌由来のMVsは広く環境中にも存在し、日常的に我々は暴露されているが、その影響については不明なままである⁹⁾。MVsの機能や作用機序はまだ全容が解明されていないが、細菌の多様性を考慮し、古細菌や真菌も同様な膜小胞を放出することを考えると、MVs研究は微生物間、微生物・動・植物間相互作用を包括する生命ネットワークの理解のための一つの大きな柱となると言える。加えて、MVsの応用研究は盛んに行われるようになっており、例えば、MVs表層に酵素を並べたナノ触媒としての利用や、宿主の免疫を誘導することから、ワクチンとして欧米ですでに認可されている。近年では、ガン細胞など特定の細胞をターゲットにした、薬物輸送システムの開発も行われている¹⁰⁾。

【研究開発の動向】

【内因性 (エクソソーム)】

近年、内因性の微粒子として、細胞が細胞外に放出する膜小胞、細胞外小胞 (extracellular vesicles, EV) の役割に注目が集まっており、その中でもエクソソームに関する研究が加速度的に進展している。5年前には年間500報程の論文数であったが、2017年には2000報にも及ぶ論文が発表され、様々な生理機能や病態発症との関連が示唆されるとともに、その知見を診断や治療に利用する研究開発が進んでいる。

エクソソームに関する新知見として、脂肪組織が多量のエクソソームを放出しており、このエクソソームを介して種々の臓器の遺伝子発現を制御したり、インスリンに対する感受性を制御したりしていることが明らかとなっている^{11,12)}。また、脂肪から分泌される善玉ホルモンアディポネクチンの作用機序は長らく不明であったが、血管内皮細胞からのエクソソームの

産生を促進することで、その抗炎症機能を発揮することが示されている¹³⁾。エクソソームは、RNAの細胞外排出のみならず、細胞内で傷害を受けた不要なDNAを細胞外へと排出することにより、細胞老化を防いでいる可能性が示されている¹⁴⁾。更に、脳の視床下部に存在する幹細胞から髄液中に放出されるエクソソームがmiRNAを介して老化の進展を抑制することが、マウスを用いた実験系で示唆されている¹⁵⁾。

脳内のアストロサイト（グリア細胞）由来のエクソソームが、血液脳関門を通り抜け、末梢の臓器の機能や血中のリンパ球の応答を制御する可能性が示唆され、エクソソームを介した脳-全身臓器連関研究の発展が期待されている¹⁶⁾。

応用利用に目を向けると、エクソソームは体液中で非常に安定であるとともに、小胞内に含まれるタンパク質やRNAはエクソソームの脂質二重膜に守られており分解されない。また、採取後長期間保存された体液中においてもエクソソームは比較的安定である為、エクソソームは臨床検査における新たな疾患バイオマーカーとして有望視されている。様々な疾患との相関が調べられているが、特に血中に放出されたがん細胞由来エクソソームのmiRNAは、健常細胞由来エクソソームと構成の違いが注目されており、がんの早期診断のツールとして相関関係が調べられている¹⁷⁾。これらのデータを元に、国立がん研究センターがNEDO（新エネルギー・産業技術総合開発機構）の支援の下、体液中マイクロRNA測定技術基盤開発事業を2014年度に東レ、東芝など9機関と共同で開始しており、血液1滴から13種類のがんの早期診断ができる次世代診断システムの開発を進めている。ステージ0期の超早期がんでも98%以上の確率で判別できる画期的な技術の確立を目指している。また、神経細胞由来エクソソームには、タウや α -シヌクレイン、TDP-43など、神経細胞内で凝集することによりそれぞれ、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症の発症原因となるタンパク質が含まれており、各疾患の発症との関連性が注目されている。現在、脳由来のエクソソームを用いた研究や診断には、腰椎穿刺によって採取した脳脊髄液を用いられるが、脳由来エクソソームの一部が末梢血にも検出される可能性が示され、それらのマーカーとしてNCAM1やL1CAMなどが報告されている¹⁸⁾。さらに、尿中のエクソソームは腎臓や前立腺、膀胱疾患の新たな診断マーカーとして、髄液中のエクソソームは脳内の腫瘍や神経変性疾患マーカーとして、羊水中のエクソソームは胎児の状態を反映するマーカーとして期待されるなど、様々な体液を用いたバイオマーカーの開発が活発に行われている。

エクソソームの機能が明らかになるにつれ、近年ではその機能を応用した様々な治療法の開発が行われている。例えば、間葉系幹細胞由来のエクソソーム内には、血管新生促進性miRNAや抗炎症性miRNA、コラーゲン沈着促進性miRNAなどが含まれ、角化細胞の遊走と増殖、血管新生を促進することで、創傷治癒を促進する¹⁹⁾。更に、心筋幹細胞から放出されるエクソソームは、心筋梗塞後の損傷部位の治癒を促進することがブタを用いた実験で確認されている²⁰⁾。同様に、ヒト神経幹細胞由来のエクソソームは、マウスにおいて脳梗塞後の損傷部位の治癒を促進することが示され²¹⁾、米国のAruna Biomedical社が、2019年までにヒトにおける効果の検証を行う予定である。

また、エクソソームを用いた制がん研究も数多く行われている。例えば、がん患者の樹状細胞から放出されたエクソソームには、様々ながん細胞由来のタンパク質が含まれており、がん細胞特異的な細胞傷害性T細胞の強い活性化を引き起こすことが知られている為、この機序を用いた抗腫瘍免疫療法の臨床試験が開始されている²²⁾。一方、がん細胞由来エクソソーム

ムには血管新生や転移などがんの微小環境の構築や、免疫逃避に関与する種々の分子が含まれており、がんの進展を促進することが知られている。中でも最近、免疫チェックポイントに関与する PD-L1 ががん細胞由来エクソソームに発現しており、細胞傷害性 T 細胞の活性を抑制することで、オプジーボなどによる抗 PD-1 療法の効果に影響を与えることが報告されており²³⁾、エクソソーム上のこれらの分子を阻害することで、がん進展を抑制する試みが活発に行われている。

一方、エクソソームはリポソームなどの人工物とは異なる、天然のドラッグデリバリーシステム (DDS) としても期待されており、種々の siRNA や低分子化合物などを目的の細胞へと運ぶ試みがなされている。エクソソームの膜表面には様々な細胞接着分子や糖鎖が発現しており、その発現様式によって、エクソソームがどの細胞と親和性があるかが明らかになりつつある。更に、エクソソームの特性を改変・応用することによる新規 DDS の開発が行われている²⁴⁾。

EV 研究が世界的に注目されるにつれ、各国で大型研究プロジェクトが開始されている。既に米国では NIH による戦略的大型プロジェクト (Extracellular RNA Communication) が開始されており、Gordon Conference や Keystone Symposia といった国際的に権威のある会議においても 2016 年より分科会が発足している。欧州の医薬品研究開発官民パートナーシップ「革新的医薬品イニシアチブ (IMI)」の支援を受け進められている CANCER-ID プロジェクトでは、EV を含めた研究が既に実施されている。日本においても、2017 年の文部科学省の研究開発戦略目標としてエクソソーム研究を 1 つの柱とする「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」が選定され、JST による戦略的創造研究推進事業が発足した。

【内因性 (MVs)】

1960 年頃より細菌外に細胞膜成分が放出されていることが報告され、MVs の存在が示唆されていた。その後、電子顕微鏡によって微細構造が確認され、様々な細菌でその生産が確認された。MVs の免疫原性や宿主への毒性が明らかになるにつれ、脚光を浴び始め、細菌の病原性との関わりが研究されるようになった。その結果、病原性細菌においては、MVs には特定の毒素が濃縮され、宿主細胞に運搬されることが明らかとなった²⁵⁾。2010 年頃からは、急速に発展してきたタンパク質の網羅的な解析が様々な細菌で行われるようになり、その解析結果から MVs の機能や形成機構を推定する研究が盛んに行われた。その結果、MVs と細胞膜は異なるタンパク質の組成を持つことが示唆され、MVs の膜組成の生化学的な解析と合わせて、MVs には特異的に物質が取り込まれることが議論されている。また、タンパク質の網羅的な解析により、同じ細菌の間でも増殖する環境によって MVs の中身が変わることが明らかとなり、環境に応じた MV の形成機構や役割があることが考えられるようになった。2014 年には海洋などの環境中にも MV が豊富に存在することが明らかとなり、生態システムでの物質循環への寄与が注目されるようになった⁸⁾。

MVs の中身として、DNA、RNA (mRNAs, rRNAs, tRNAs, small RNAs (sRNA))、たんぱく質、情報伝達物質、抗生物質などが報告されており、それらのほとんどは MV を受容した細胞で機能することが確認されている。例えば、DNA については、細菌はお互いに遺伝子のやりとりを種の壁を超えて行うことが可能であり、これは遺伝子の水平伝播と呼ばれている。遺伝子の水平伝播は生物の進化を考える上で、非常に重要なテーマである一方で、薬剤耐性遺伝子の伝播にも関わっていることから、医療分野においては問題視されている。遺伝子の水平

伝播がおこるメカニズムはいくつか知られていたが、MVs もそれを媒介する新たな機構として報告された²⁶⁾。さらに、MVs 自体も抗生物質を吸着、分解し、細菌が抗生物質から逃れるのに役立っていることが明らかとなっている。

RNA については、MVs に RNA が含まれることが長い間明らかになってきたが、RNA シーケンシング技術の急速な発展によって、その中身が解析されるようになった。さらに MV に含まれるいくつかの sRNA は宿主の mRNA に対して相補配列を持っており、タンパク質の発現を阻害することが報告されている²⁷⁾。従って、細菌の MVs は界を超えてタンパク質の発現制御に直接的に影響を与える可能性がある。

情報伝達物質については、2005 年には細菌間コミュニケーションで用いられるシグナル化合物が MVs によって運搬されていることが明らかになり、MVs を介した細菌間情報伝達機構が発表された⁷⁾。その後、情報伝達物質が高濃度に MV に濃縮されていることも明らかとなり、細菌に様々な情報伝達の形式があることが分かってきた²⁸⁾。

上記のような MVs の普遍性と多様な機能が明らかになってくるにつれ、MV 形成機構の解明に力が注がれることとなった。細菌の構造は、グラム陰性菌とグラム陽性菌で大きく二分される。グラム陰性菌は内膜と外膜の二重膜を有し、外膜が外側に露出している。グラム陽性菌は細胞質膜のみを有し、細胞質膜は厚い細胞壁で覆われているため、MVs を形成しないと長らく思われ、MVs 形成機構はグラム陰性菌を中心に研究されてきた。グラム陰性菌において MVs 形成に影響を与える因子はいくつか同定されており、電子顕微鏡解析と生化学的解析により、細胞膜がたわんで、出芽するようにして MV が形成されると考えられた⁵⁾。その後、超解像顕微鏡の開発によって MV の形成過程を細胞が生きたまま観察できるようになり、MV 形成過程が詳細に解析されるようになってきた。その結果、細胞外膜がたわむ機構に加えて、溶菌を介した MV 形成機構が存在することが明らかになった²⁹⁾。この溶菌機構には、細胞壁の分解酵素であるエンドリシンが関わっている。エンドリシンは、MV 形成因子としては最も広く細菌に保存されており、ファージ（細菌に感染するウイルス）が宿主細胞を壊して外に出て行く際に用いられる。2017 年には、グラム陽性菌の MV 形成にもエンドリシンが関わるということが明らかとなり、グラム陽性菌の MV 形成機構がはじめて明らかとなった³⁰⁾。エンドリシンを介したグラム陰性菌とグラム陽性菌における MV 形成機構はいずれも集団の一部の細菌の細胞死を伴い、細菌における細胞死の新たな役割が明らかとなった。複数の MV 形成機構が明らかになるにつれ、それぞれの環境に応答して MV が形成され、その MV 形成機構によって MV の種類や機能が変わってくるということが分かってきた。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

【外因性 (PM2.5 など)】

● 外因性微粒子による免疫活性化機構の解明

外因性微粒子も、その成分は多種多様であり、生体に及ぼす影響を理解するためには、どの微粒子がどの細胞にどのような反応を起こさせているのかを正確に理解する必要がある。呼吸器粘膜での反応、血中に入ってからからの反応など、いろいろな可能性を想定したモデル系が作られつつあり、とくに免疫活性化機構についての研究が進みつつある。ある種の外因性微粒子については、特異性の高い受容体が存在することもわかってきた。

【内因性 (エクソソーム)】

● 研究ガイドライン整備

エクソソームはエンドソーム由来の細胞外小胞 (EV) であるが、現在の技術においても、マイクロベシクルなど他の EV と厳密に分離することは困難であり、便宜的に $10,000 \times g$ で沈降しない EV を small EV (主にエクソソーム) と呼ぶことが増えている³¹⁾。エクソソームは、その検出・単離が難しく、更には種々の分類方法があるため、どのような方法により精製した EV をエクソソームと呼ぶのかが研究者間で統一されておらず、実験データの解釈や再現性の確認を困難にしている。その為、近年、国際細胞外小胞学会 (ISEV) が設立され、世界的な研究者コミュニティが形成されつつあり、国際基準の MISEV ガイドラインが提案されている^{32,33)}。また、このような混乱を回避する方法の1つとして、各論文における実験条件を記録する EV-TRACK というデータベースが公開されている³⁴⁾

● 細胞外小胞の新たな分離法・精製法の開発

エクソソームの膜表面に特異的に発現しているリン脂質ホスファチジルセリンと結合する分子を用いることで、超遠心法などの従来法と比較して、100倍以上高純度にエクソソームを精製かつ高感度にエクソソームを検出する技術が開発され、富士フィルム和光純薬より、国産試薬として世界販売が開始されている³⁵⁾。既に国内外の公的研究機関や民間検査機関などで導入されている。また、この他にも微粒子の粒径、形状、電荷などの特性を利用して分離するさまざまな方法が模索されつつある。

● 研究対象生物の拡大

これまでのエクソソーム研究は主に哺乳類などの動物を対象とした研究が行われてきたが、近年、植物もエクソソーム様の EV を放出することが明らかとなった。このエクソソームを用いることで、植物にとって有害となる真菌の増殖や毒性を抑制し、自身の防御を担う可能性が示唆されている^{36,37)}。

【内因性 (MVs)】

● 溶菌や細胞死を介した新奇 MV 形成機構の発見

前述のように、グラム陰性菌において MV は細胞が生きたま細胞外膜がたわんで形成されると考えられており、グラム陽性菌においてはその形成機構はほとんど理解されていなかった。2016年と2017年に超解像顕微鏡やクライオ電子線トモグラフィ法などの最先端のイメージング技術を利用して、それぞれグラム陰性菌とグラム陽性菌で溶菌あるいは細胞死を介した MV 形成機構が発表された^{29,30)}。この新奇 MV 形成機構の発見は当該分野に大きな影響を与えている。例えば、DNA や RNA などの細胞質成分がどのようにして MV に包括されるかは、外膜がたわむモデルでは説明できなかったが、溶菌モデルで説明できるようになった。また、細菌間で共通して、MV 形成に関わる遺伝子が見つかったことで、ゲノム情報から MV 形成を系統的に解析できるようになった。これによって、近年爆発的に増えているシーケンスデータが活用できるようになった。これまでに細胞死由来の膜成分は単純に細胞残渣として扱われていたが、それらが MV として機能することが明らかになり、細菌における細胞死を見直す動きに至っている。とりわけ、抗生物質処理によって MVs が生じることが明らかとなり、その MVs の細菌の病原性への関与について今後の解析する必要性が出てきた。MVs を利用したワクチン開発は急速に発展しており、MVs の大量調整に迫られているが、MV 形成機構の解明は MVs の大量調整に大きく貢献する。

● 1 細胞ライブセルイメージングの発展

2014年にノーベル賞を受賞した超解像顕微鏡の開発や2017年にノーベル賞を受賞したクライオ電子顕微鏡の開発に代表されるような、生物学における革新的なイメージング技術が発展してきた。MVsの形成過程と挙動解析には、水溶液中でのMVsのイメージングが欠かせない。MV形成に関して、関わる分子の同定をもとにして様々なモデルが推察されているが、実際にそのモデルが正しいのかが可視化されているのはほんの数例のみである^{29,30)}。これらの新しいイメージング技術が取り入れられることで、これまで唱えられてきた仮説の検証が可能となる。さらには、1細胞ライブセルイメージング技術によって、これまでブラックボックスであった、MVが形成されてからその中身が受け渡されるまでの、一連の過程が可視化できるようになり、MVsの作用機序が理解できるようになる。こうしたイメージング技術は、MVの宿主への侵入経路、つまりはMVを介した細菌と動・植物の相互作用を解明するためにも重要な技術となる。

● 実環境中のMVsの解析

多くのMV研究は培養した細菌、とりわけ病原性細菌を中心に解析が進められてきた。しかしながら、細菌は環境中の至るところに存在し、MVsも同様に環境中に偏在していることが示唆される。2014年には海洋中のMVsについての解析が発表され、地球の物質循環への寄与が推定されている⁸⁾。生態的な知見を取り入れることで、MVs研究の環境中における新たな役割の解明や動態解析が可能となると思われる。これに関連して、環境DNAの解析は生態システムを理解する一つの有力な方法であるにも関わらず、それらのDNAがどのような状態で環境中に存在するのかについて、きちんと議論されてこなかった。環境DNAの大半が細菌由来の細胞外DNAによって占められているとも言われており、MVが環境遺伝子プールになっている可能性も含め、環境DNAの形態を理解する必要がある。

● MVsを利用した新しい療法開発

MVsは免疫を活性化させることが様々な細菌で確かめられている。その性質を利用して、髄膜炎菌では欧米、オーストラリアなどではワクチンが認可され、BEXSEROとして商品化されている。さらに2017年には大腸菌由来のMVsにガン抑制効果があることが分かり、新しい免疫療法が提示された³⁸⁾。そのメカニズムは分かっていないものの、MVsはがん細胞に蓄積しやすいことも知られており、特定の細胞を標的とした薬剤輸送システムのプラットフォームとしてもMVsは注目を浴びている。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

【海外】

● The International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)

細胞外微粒子に関わる研究者の情報交換の場として、2012年にスウェーデンで発足した国際学会。

● Outer Membrane Vesicles (OMVs) from “Vaccinobacter” : A Synthetic Biology approach for effective vaccines against infectious diseases and cancer (2014年-2019年)

MVsを基盤としたワクチンやがんの免疫療法開発の大型プロジェクト。ERCによって2014年から5年計画でサポートされ、一部計画の延長も決まっている。

● Extracellular RNA Communication (2013年-)

米国 NIH common fund による研究プログラム。関連して Extracellular RNA Communication Consortium が発足している。細胞外 RNA の分泌、輸送、受容細胞に与える影響などに関する生物学的原理確立や臨床的有用性の評価を目的とする。

- American Society for Exosomes and Microvesicles
米国にて 2012 年に発足したエクソソームやマイクロベシクルに関する学会。上述の Extracellular RNA Communication Consortium と連携。学会誌 Matters を出版。その他、欧州では、ドイツ、フランス、オーストリア、英国、ベルギー、オランダで、アジアでは、韓国、シンガポールで同様の学会が活動している。
- Intravacc (Institute for Translational Vaccinology)
オランダ保健福祉スポーツ省によって設立。Intravacc を中心とした、MVs を利用したワクチンの研究開発を行なわれている。

【国内】

- 日本細胞外小胞学会が 2014 年に発足。日本 RNAi 研究会と年会を毎年広島にて共催。
- JST-ERATO 「野村集団微生物制御プロジェクト」(2015 年度 -2020 年度)
最先端の 1 細胞分析、イメージング、生化学的アプローチを駆使し、MVs を中心に微生物細胞間相互作用を解析することで、微生物集団の環境適応機構を明らかにすることを目指している。
- AMED 「細菌由来メンブレンヴェシクルを利用した粘膜ワクチンの基盤的研究」(2016 年 -2018 年)
MVs のワクチンとしての有効性を解析するために、AMED のプロジェクトが 2016 年にスタートした。
- JST-CREST/ さきがけ 「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」(2017 年度 -2024 年度)
エクソソーム、マイクロベシクルを始めとした内因性微粒子と PM2.5 などの外因性微粒子を研究対象とし、これらの細胞外微粒子に対する生体応答機序の解明や、その解明において必要な各種計測技術の開発、微粒子の体内動態制御による将来の医療や産業応用等に向けた基盤研究を推進する。また本領域の特色として、内因性微粒子と外因性微粒子の研究コミュニティの融合を掲げ、生体応答に共通する原理発見や、相乗効果による生命現象の解明など、分野横断的なアプローチによる研究進展を目指している。
- 農林水産省 「細胞外小胞を用いた農水包括的好循環サイクルの機能性強化のための革新的研究開発プラットフォーム」(2018 年 -)
牛乳や発酵食品など動物由来のエクソソームに加え、野菜や果実などに含まれるエクソソームの機能解析によって、農作物の機能向上やヒトの健康長寿の実現を目指す。
- AMED 「認知症研究開発事業」
平成 30 年度の AMED 認知症研究開発事業として、「ヒト脳由来エクソソームを利用した認知症患者を層別化する手法の開発研究」、「ヒト脳由来等のエクソソームを利用した認知症の病態解析または創薬ターゲットの開発」として公募が開始されており、侵襲性の低い末梢血内に含まれる脳由来エクソソームを用いた、認知症の早期診断法、創薬ターゲット開発が行われている。

(5) 科学技術的課題

【外因性 (PM2.5 など)】

● 外因性微粒子の生体応答

外因性微粒子には PM2.5 や花粉・黄砂といった、無機物、有機物を問わない多種多様なものが含まれ、これらが生体にどのような影響を及ぼすのかは、ほとんど解明されていない。これらの微粒子に対する生体応答を担う主役は、マクロファージや好中球などの貪食細胞で共通しており、内因性・外因性微粒子に対する応答の相乗効果によって様々な炎症性疾患の発症が加速される可能性がある。エクソソームの生成を阻害することによって、その相乗効果を中和できれば、外因性微粒子に起因する喘息やアレルギーなどの治療法の開発に繋がる可能性がある。そのためには精製された微粒子と、生体試料による実験系確立が必要だが、この問題に取り組む研究者の数は必ずしも多くはない。微粒子研究者とライフサイエンス研究者との活発な共同研究が望まれる。

【内因性 (エクソソーム)】

● 1細胞/1粒子レベルでのエクソソーム解析技術

現在の技術で解析されるエクソソームは、様々な細胞が放出したエクソソームの総和であり、それらが平均化されたものしか解析することができない。例えば、末梢血からエクソソームを単離し、病的細胞由来エクソソームの解析を行う場合においても、圧倒的多数の健常細胞由来エクソソームの影響により、バイオマーカーの検出感度が低くなる。よって、検査対象とする臓器や細胞に特異的なマーカーを用いたエクソソームの選別法の確立が求められる。更に、1細胞/1粒子レベルでエクソソームを解析する技術は未だ不十分であり、これらの技術の確立により、より感度の高い診断法の開発につながることを期待される。また、現在の技術では、エクソソームを他の EV と厳密に区別することが困難であり、より高純度にエクソソームのみを解析することができれば、さらなる高感度化が期待できる。

● エクソソーム生成機構解明

エクソソーム研究の根本的課題として、エクソソームの生成 (形成・放出・機能分子の内包化) 機構の解明が重要である。これらの機構の解明によって、特定の細胞や臓器特異的にエクソソームを欠損させ、その生理機能を解明することが可能となる。加えて、エクソソームの生成を制御する薬剤を開発し、それらを用いた治療法の確立も今後大きく期待される。また、体内において、どのエクソソームがどこへ行くのかの生体内動態もほとんど解明されておらず、その動態を制御する分子機構の解明によって、より標的精度の高い DDS の開発に貢献する可能性を持っている。

● 特異的な除去方法の開発

病的細胞由来エクソソームを対象としたバイオマーカーの同定と、それらを用いた診断法の開発研究が盛んに行われている一方で、病的細胞由来エクソソームのみを特異的に除去する方法の開発はほとんど進展していない。病的細胞由来エクソソームに特異的な表面マーカーの同定により、正常細胞由来エクソソームに影響することのない除去法が開発が望まれる。また、エクソソームは脂質二重膜に囲まれている為、内容物に直接アプローチすることができない。今後の技術開発によって、内容物を操作する技術の確立が期待される。

【内因性 (MVs)】

● MVsによるDNAやRNAの運搬

sRNAが細菌のMVsに含まれており、それらの一部は宿主細胞のタンパク質発現を制御することが報告された²⁶⁾。また、植物が産生する細胞外微粒子によって伝達されるsRNAが真菌の病原タンパク質の発現を抑えることが新たに見出されている³⁷⁾。DNAやRNAは生物が共通して用いている遺伝物質であり、生物の本質に関わる。ヒトに及ぼす影響も含め、細胞外微粒子によって伝播する遺伝物質が生物界全体に渡って、界を超えたクロストークに関わっている可能性があり、今後はその検証と、それらが生命ネットワークの中で果たしている役割を明らかにしていく必要がある。CRISPR-Casの研究で著名な研究グループも細菌のMVによるRNA輸送の研究に乗り出しており、競争が過熱する可能性がある³⁹⁾。

● ファージ (バクテリアに感染するウイルス) とMVの関係の解明

MV形成機構の一つにファージが関わっていることが明らかとなった^{29,30)}。以前からMVsはファージの宿主への感染を防除することが報告されていたが、MVsがファージの宿主域を広げるのに役立っていることも報告された⁴⁰⁾。さらにはMVsによってファージが運搬されることも明らかとなり、その機能性が注目されている³⁰⁾。ファージは我々がこれまでに考えていた以上に宿主に対して多様な働きかけを行っていることが次々に報告されており、その存在意義を捉え直す潮流ができています。MVs研究は新たなファージの位置付けを示す可能性がある。加えて、これまでのDNA染色を指標に環境中のファージ量を推定する手法は、ファージとMVを区別できていなかったため、既知の知見・手法の見直しも必要となってきた⁴¹⁾。

● MVによる中身の受け渡し

MVによってその中身が他の細胞に受け渡されることはDNA, RNA, タンパク質や細胞間シグナル物質で解析されているものの、その詳細な受け渡しのメカニズムは、最重要課題の一つであるにも関わらず、何も分かっていない。MVは特異的に細胞に付着することも報告されており^{28,42)}、当該機構を明らかにするためにはライブセルイメージングを含めた、観察技術開発が必要である。MVsの積荷の受け渡し機構を明らかにすることは、MVsがどの範囲の生物にまで影響を及ぼすのか、そのインパクトの真の理解に繋がるだけでなく、MVによる物質運搬制御の糸口が得られ、その成果はMVを模倣した人工微粒子の設計にも役立つ。

● 腸内におけるMVsの働きの解明

腸内細菌はMVを産生し、便からもMVsが回収されることから、腸内細菌のMVsが生体に影響を与えている可能性は高い。近年次々に腸内細菌の働きが明らかになっているなかで、MVsの機能はまだ注目されておらず、腸内細菌群と宿主の相互作用を解明するブレイクスルーが期待される。

● MVsの種類と機能の多様性の解明

単一細菌種によって産生されたMVであっても、その大きさや中身は不均一である。これは、MV形成経路が複数存在することに由来すると考えられる。これまでに、MVsは細菌が生きたままで放出すると考えられてきたが、細胞死を介す形成過程も存在することが明らかとなった。こうした異なる経路によって形成されたMVはその性質や機能が異なる。現在、MVsは一緒にたにされて解析されているが、今後それぞれのMVの種類を分けて解析することで、MVの本当の機能が明らかになり、その基礎的知見に基づいたより効果的な応用利用が見込まれる。さらに、MVsの分類を行うことで、例えば、実環境から単離したMVsの働きを類推で

きるようになり、診断のマーカーにもなり得る。環境中から単離した MV に含まれるタンパク質や DNA、RNA を解析することはすでに可能であり、当該オミクス分野の発展とともに、環境 MVs の解析が活発化すると考えられる。その情報解析基盤として、MVs の多様性とそれぞれの特徴、機能を明らかにする必要がある。さらに、1MV 解析が可能になれば、上記の課題の多くに大きく貢献出来る。具体的には、1MV に含まれる DNA, RNA, タンパク、代謝産物の定量・定性である。我が国の分析器機分野は微量分析においても優れているので、その技術開発は他国をリード出来るはずである。そして、MV ごとの DNA, RNA, タンパク、代謝産物のデータベース化を進め、1MV ごとの機能と効果を検証することで、その MV データベースが財産となる。

● MV の人工合成

MV のワクチンや抗生物質の輸送体としての利用が世界で始まりつつある。しかし、まだまだ問題がある。それは、MV が不均一なものなので、社会実装にはより均一な製品にする必要がある。しかし、まだ世界の多くの MV (のワクチン応用も含めて) の研究者はそれに気付いていない。一方、我が国の MV 研究者らは、MV 生成機構の解明に成功して、その不均一性を証明し、その基礎的な重要性をいち早く世界に発信している⁴³⁾。よって、MV の不均一性の質の理解にはアドバンテージがあり、MV のワクチン利用についても、世界と十分競合出来ると考えられる。そのためには、分野融合による MV の人工合成に取り組む必要がある。具体的には、リボソームを使用した DDS に関わる様々な分野(の研究者)との連携が必要であろう。そして、任意のタンパク質、核酸、その他の物質などの封入・局在化の技術開発も必須となる。言い換えると、MV をミミックした新たな人工膜粒子(一重膜型また二重膜型) 開発研究分野が必須となる。

● ナノチューブと MVs の関係の解明

MVs の他に細菌が細胞外に形成する膜構造体として、2011 年にナノチューブと呼ばれる、幅が 50-70nm、長さが数 μ m に及ぶチューブが報告された⁴⁴⁾。これらナノチューブは細胞間を架橋し、細胞質内の成分を交換できることが観察されている。その結果、抗生物質の分解に関わるようなタンパク質の交換も起き、受け取った細胞には一過性の表現型が現れる。同様の構造物は多くの細菌で観察されているにも関わらず、ナノチューブの実体の根本的な部分も含めて、どれほど細菌の生態に関わっているのかは分かっていない点が多い。ナノチューブと MV の関係について、お互いの形成に関わっていることも示唆されており⁴⁵⁾、今後両者の関係も含めて、基礎的な知見を蓄積する必要がある。

● イメージング技術の開発

数 nm 程度の構造物の動態解析にはイメージング技術の発達は欠かせない。これには、顕微鏡のみならず、サンプルの固定技術やマイクロ流体デバイスなど、サンプルを調整する側の技術の発展も伴う。

(6) その他の課題

● 研究体制

エクソソーム研究は、世界中で加速度的な広がりを見せており、欧州の研究者を中心として国際細胞外小胞学会 (ISEV) が設立された。その支部として日本細胞外小胞学会 (JSEV) が近年設立され、毎年広島で総会が開催されている。このような取り組みにより、エクソソーム

を研究する日本人研究者は徐々に増えており、研究者コミュニティの形成がなされつつある。今後、工学系など異分野の研究者が加わることによって、本研究分野の更なる活性化が期待される。特に、JSTの戦略的創造研究推進事業の開始に伴い、多くの研究者が新たに参入しているが、一時的なブームで終わらせるのではなく、情報や技術を共有するなど有機的な連携を取ることによって、研究を支援する体制の構築が重要である。とくにさきがけでは若い気鋭の研究者達が挑戦的な課題に取り組んでいるが、基本的に個人研究であり、しかも3年半という短期間の資金しか保証されないため、終了後に本分野を牽引するだけの体力をつけられるかどうかという点が懸念される。優秀な人材への継続的なサポートが可能なシステムが求められる。

● コンセンサス形成

エクソソームの検出や単離の難しさ、さらには種々の分類方法があるため、どの細胞外小胞をエクソソームと呼ぶのかは、未だに世界中でコンセンサスが得られておらず混乱している。国際基準のMISEVガイドラインに従った研究手法の共通化は有用であるが、それと同時に、このガイドラインに基づく新たな研究手法の開発も非常に重要である。特に、現在の主流である超遠心法やPEG沈殿法を用いたエクソソームの単離法では、多くの夾雑物が混入している為、これらのエクソソームを用いた実験結果が、真にエクソソームの機能を反映しているとは厳密には言い難い。革新的なエクソソーム解析技術の確立と普及が早急に求められている。

● 制度整備

今後、ウシ・ブタなどの家畜や野菜・果物に含まれるエクソソームの人体への影響が解明されるに従い、それらを用いた予防法や治療法などの開発が行われる可能性がある。エクソソームの中にはRNAやDNAが含まれており、これらの異種の遺伝子情報がヒトのゲノムに与える影響や継代的影響は明らかになっていない。遺伝子治療などに準じた法整備が必要になるのか否か、今後の検討が必要になるであろう。

● ワクチン開発

耐性菌の出現によって、抗生物質が効かなくなる時代に向かっているとされているなかで、早急な対策が必要である。抗生物質に代わる治療方法としてワクチンの接種が挙げられており、有効なワクチンの開発が必要である。こうしたワクチンの利用は、「ワン・ヘルス」という考えのもと、耐性菌出現の温床となっている畜産や養殖産業においても有効性が検討されている。MVsはすでに欧米など海外ではワクチンとして認可されて、そのマーケットは広がって来ているが日本においては、まだ認可されていない。遺伝子組換え技術も合わせると、多様なMVワクチンのデザインが可能であり、抗生物質の輸送体としての利用も検討されるなど、MVsは次世代の感染症治療技術のプラットホームとなっている。こうした分野の研究開発を加速させるための環境整備が必要である。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 2017年にJSTの戦略的創造研究推進事業が発足し、多くの有力研究者や若手研究者が参加して研究に取り組んでいる。 日本は脂質、RNA、生体膜などの研究に伝統があり、国際的に優位な位置にいる。 エクソソーム研究と関連の深いオートファジー研究において、大隅良典博士がノーベル賞を受賞し、研究の相乗効果が期待される。 多くの臨床系研究室で、バイオマーカーとしてのエクソソーム研究が盛んに行われている。 JSTのCRESTとさきがけ「細胞外微粒子」研究領域。日本細胞外小胞学会の活動。 ERATOなど、MVsの基礎的研究に関する大型プロジェクトも行われており、MV形成に関する基礎研究の成果は世界をリードしている。
	応用研究・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> 国立がんセンターにおいて、エクソソームを用いた13種類のがんの早期診断法の開発が行われており、その有用性の評価が注目されている。 富士フイルム和光純薬が、高純度エクソソーム精製法、高感度エクソソーム検出法の開発に成功し、国内外の公的・民間臨床検査に使用され始めている。 多くの製薬企業が、エクソソーム創薬の将来性を重要視しており、産学連携による研究が開始している。 JSTのCRESTとさきがけ「細胞外微粒子」研究領域。日本細胞外小胞学会の活動。 AMEDなどMVsをワクチンとして利用するための大型プロジェクトが行われており、今後はその成果を社会実装に結びつける段階になってくる。
米国	基礎研究	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> この数年で、数多くの研究者がエクソソーム研究に参入しており、様々な新規機能に関する論文が、トップジャーナルに多数掲載され始めている。 GordonやKeystone会議など著名な学会において、エクソソームを主題とした会議が開催されている。 NIHからがん・認知症・ウイルス感染などにおけるエクソソームの役割に関して大型の研究グラントがサポートされている。 R.Schekman(2013年ノーベル生理学医学賞受賞)などの有力な細胞生物学者の参入。 2017年のASM年会では、MVsについてのシンポジウムが開催されるなど、研究者同士の連携が取られはじめている。また、MVsの生態的な役割について、NSFの大型予算がついて基礎的研究が推進されている。
	応用研究・開発	◎	↑	<ul style="list-style-type: none"> エクソソーム創薬を目的とした臨床研究が多数行われており、その結果が近いうちに明らかになると期待されている。 エクソソームを用いた診断や治療法の開発を目指したベンチャー企業が幾つか設立されている。 NIHがExtracellular RNA Communicationにfunding。 細菌のMVsを利用したワクチン開発のベンチャー企業が設立され、実用に向けて準備がなされている。

欧州	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ・エクソソーム研究の黎明期を支えてきた有力研究者がフランスやスウェーデンなどに在籍しており主導的位置にある。 ・国際細胞外小胞学会などを中心として、解析技術法などのガイドラインの普及にも力を入れている。 ・欧州の医薬品研究開発官民パートナーシップ「革新的医薬品イニシアチブ (IMI)」の支援を受けた研究が開始されている。 ・Raposo, Théry など、本分野のパイオニアの存在。 ・スウェーデンのウメオ大学のグループなどを中心にして MVs の病原性への関与について盛んに研究されてきた。こうした基礎的研究が現在のワクチン開発の流れに繋がっている。
	応用研究 ・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ・米国に比べると顕著な活動は認められないが、臨床応用や創薬開発は着実に行われている。 ・エクソソームの解析機器で有名な英 NanoSight 社が、同じく英国の大手企業 Malvern 社に吸収され、技術開発が加速すると期待されている。 ・オランダ保健福祉スポーツ省によって設立された非営利団体が一つの拠点となり、MVs を利用した感染症に対するワクチン研究開発で世界をリードしている。
中国	基礎研究	○	↑	<ul style="list-style-type: none"> ・多くの研究者がエクソソーム研究に参入している。論文数も日本の2倍以上あり、トップジャーナルにも掲載され始めている。エクソソームに関する特許申請も盛んに行われている。 ・MVs の病原性への関与について研究がなされている。
	応用研究 ・開発	○	↑	<ul style="list-style-type: none"> ・エクソソームを標的とした創薬、診断法の開発にも熱心であり、存在感を増しているが、独自技術による産業化はまだあまり認められない。 ・臨床実験の規制が緩く、海外から優秀な研究者を迎え入れているため、MV ワクチン研究が活発になるにつれ、一気に研究開発が盛んになる可能性がある。
韓国	基礎研究	○	↑	<ul style="list-style-type: none"> ・研究者数はまだ比較的すくなく、バイオマーカーなど臨床研究が中心である。 ・Korean Society for Extracellular Vesicles の存在。 ・2008年には Korean Society for Extracellular Vesicles、が設立されるなど、早い時期から細胞外微粒子に着目した研究を推進している。逸早く、タンパク質の網羅的解析技術を MVs 研究に導入した。
	応用研究 ・開発	○	↑	<ul style="list-style-type: none"> ・がん細胞をターゲットにした免疫療法のプラットフォームの利用を視野に入れた MVs の研究を、浦項工科大学校のグループを中心に精力的に行っている。

(註1) フェーズ

基礎研究フェーズ：大学・国研などでの基礎研究レベル

応用研究・開発フェーズ：技術開発（プロトタイプの開発含む）・量産技術のレベル

(註2) 現状

※我が国の現状を基準にした相対評価ではなく、絶対評価である。

◎：他国に比べて顕著な活動・成果が見えている、○：ある程度の活動・成果が見えている、

△：他国に比べて顕著な活動・成果が見えていない、×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド

↑：上昇傾向、→：現状維持、↓：下降傾向

(8) 参考文献

- 1) Valadi, H., et al. "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9 (6) (2007) :654-9. doi: 10.1038/ncb1596.
- 2) Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry. "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." *Traffic* 12 (12) (2011) :1659-68. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.
- 3) Kramer-Albers, E. M., and A. F. Hill. "Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages." *Curr Opin Neurobiol* 39 (2016) :101-107. doi: 10.1016/j.conb.2016.04.016.
- 4) Tkach, M., and C. Théry. "Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We

- Need to Go.” *Cell* 164 (6) (2016) :1226-32. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- 5) Schwechheimer C, Kuehn MJ. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13:605-619.
 - 6) Brown L, et al. “Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi.” *Nat Rev Microbiol* 13 (2015) :620-630.
 - 7) Mashburn LM, Whiteley M. “Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote.” *Nature* 437 (2005) :422-425.
 - 8) Biller SJ, et al. “Bacterial vesicles in marine ecosystems.” *Science* 343 (2014) :183-186.
 - 9) Toyofuku M, et al. “Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications.” *Adv Colloid Interface Sci* 226 (2015) :65-77.
 - 10) Gujrati V, et al. “Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy.” *ACS Nano* 8 (2014) :1525-1537.
 - 11) Thomou, T, et al. “Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues.” *Nature* 542 (7642) (2017) :450-455. doi: 10.1038/nature21365.
 - 12) Ying, W, et al. “Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity.” *Cell* 171 (2) (2017) :372-384 e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.035.
 - 13) Obata, Y, et al. “Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release.” *JCI Insight* 3 (8) (2018) . doi: 10.1172/jci.insight.99680.
 - 14) Takahashi, A, et al. “Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.” *Nat Commun* 8 (2017) :15287. doi: 10.1038/ncomms15287.
 - 15) Zhang, Y, et al. “Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs.” *Nature* 548 (7665) (2017) :52-57. doi: 10.1038/nature23282.
 - 16) Dickens, A. M, et al. “Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions.” *Sci Signal* 10 (473) (2017) . doi: 10.1126/scisignal.aai7696.
 - 17) Thind, A., and C. Wilson. “Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets.” *J Extracell Vesicles* 5 (2016) :31292. doi: 10.3402/jev.v5.31292.
 - 18) Mustapic, M, et al. “Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes.” *Front Neurosci* 11 (2017) :278. doi: 10.3389/fnins.2017.00278.
 - 19) Geiger, A., A. Walker, and E. Nissen. “Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice.” *Biochem Biophys Res Commun* 467 (2) (2015) :303-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.166.
 - 20) Gallet, R, et al. “Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction.” *Eur Heart J* 38 (3) (2017) :201-211. doi: 10.1093/eurheartj/ehw240.
 - 21) Webb, R. L, et al. “Human Neural Stem Cell Extracellular Vesicles Improve Tissue and Functional Recovery in the Murine Thromboembolic Stroke Model.” *Transl Stroke Res.* (2017) doi: 10.1007/s12975-017-0599-2.
 - 22) Bell, B. M, et al. “Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy.” *Nanomedicine* 12 (1) (2016) :163-9. doi: 10.1016/j.nano.2015.09.011.
 - 23) Chen, G, et al. “Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response.” *Nature.* (2018) doi: 10.1038/s41586-018-0392-8.
 - 24) Armstrong, J. P. K., and M. M. Stevens. “Strategic design of extracellular vesicle drug delivery sys-

- tems.” *Adv Drug Deliv Rev.* (2018) doi: 10.1016/j.addr.2018.06.017.
- 25) Wai SN, et al. “Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin.” *Cell* 115 (2003) :25-35.
 - 26) Domingues S, Nielsen KM. “Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes.” *Curr Opin Microbiol* 38 (2017) :16-21.
 - 27) Koepfen K, et al. “A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles.” *PLOS Pathogens* 12. (2016)
 - 28) Toyofuku M, et al. “Membrane vesicle-mediated bacterial communication.” *ISME J* 11 (2017) :1504-1509.
 - 29) Turnbull L, et al. “Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms.” *Nat Commun* 7 (2016) :11220.
 - 30) Toyofuku M, et al. “Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*.” *Nat Commun* 8 (2017) :481.
 - 31) Kowal, J, et al. “Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (8) (2016) :E968-77. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
 - 32) Witwer, K. W, et al. “Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.” *J Extracell Vesicles* 2. (2013) doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
 - 33) Lotvall, J, et al. “Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.” *J Extracell Vesicles* 3 (2014) :26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.
 - 34) Consortium, et al. “EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research.” *Nat Methods* 14 (3) (2017) :228-232. doi: 10.1038/nmeth.4185.
 - 35) Nakai, W, et al. “A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles.” *Sci Rep* 6 (2016) :33935. doi: 10.1038/srep33935.
 - 36) Regente, M, et al. “Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth.” *J Exp Bot* 68 (20) (2017) :5485-5495. doi: 10.1093/jxb/erx355.
 - 37) Cai, Q, et al. “Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes.” *Science* 360 (6393) (2018) :1126-1129. doi: 10.1126/science.aar4142.
 - 38) Kim OY, et al. “Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon-gamma-mediated antitumor response.” *Nat Commun* 8 (2017) :626.
 - 39) Resch U, et al. “A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A *Streptococcus*.” *MBio* 7 (2016) .
 - 40) Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. “Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors.” *Cell* 168 (2017) :186-199 e12.
 - 41) Soler N, Krupovic M, Marguet E, Forterre P. “Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology.” *ISME J* (2014) doi:10.1038/ismej.2014.184.
 - 42) Tashiro Y, et al. “Interaction of Bacterial Membrane Vesicles with Specific Species and Their Potential for Delivery to Target Cells.” *Front Microbiol* 8 (2017) :571.
 - 43) Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. in press. “Types and origins of bacterial membrane vesicles.” *Nature Reviews Microbiology*.
 - 44) Dubey GP, Ben-Yehuda S. “Intercellular nanotubes mediate bacterial communication.” *Cell* 144

(2011) :590-600.

45) Dubey GP, et al. "Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes." Dev Cell 36 (2016) :453-61.