

## 2.4 基礎基盤科学技術 分子・細胞

### 2.4.1 遺伝子発現機構 (RNA、エピゲノム、クロマチン)

#### (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、クロマチン高次構造の視点から、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、ゲノム高次構造、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。ヒトの場合はおおよそ 200 種類、30 兆個の細胞が存在していると言われる。個体を構成する細胞はひとつの受精卵に由来するため、一部の免疫細胞等を除いて体細胞はすべて同じゲノムをもつ。それにも関わらず、個々の分化した細胞は多様な形・機能をもっている。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、ゲノム DNA 情報は維持されるが、ゲノム上で使われる (すなわち、RNA やタンパク質が生産される) 遺伝子が異なるため、細胞独自の機能を持つようになる。一般的に、分化した細胞において遺伝子発現パターンは安定に維持されるため、細胞が増殖してもその形質は維持される。このような遺伝子発現の調節は、生命の維持や機能発現に極めて重要であり、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は、細菌からヒトなどの高等真核生物まで全ての生物種で保存されている。この過程では多様な因子が関与して、どの細胞で、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。この調節は、完全にプログラムされているばかりでなく、確率論的に決定されることがあることもわかってきている。

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維持・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、DNA 自体の修飾と DNA に強く結合しヌクレオソーム構造を形成するヒストンタンパク質の翻訳後修飾が知られている。DNA の修飾は、酵母やショウジョウバエではみられないものの、高等真核生物の発生や分化の制御に重要である。ヒトの細胞では、CpG 配列のシトシンの大部分がメチル化されており、転写開始点付近のメチル化は遺伝子発現抑制に働く。生殖細胞や受精卵では、DNA メチル化がダイナミックに変動するが、体細胞では一旦うけたメチル化は DNA 複製過程で維持され、娘細胞にも継承される。ヒストンは、様々なアミノ酸が多様な翻訳後修飾をうける。特に、リジン残基のアセチル化、

メチル化、ユビキチン化等が遺伝子発現制御に働いている。一般的に、アセチル化は転写の活性化、メチル化は転写の抑制に働く（特定のアミノ酸残基のメチル化は転写活性化に働く）。これらの修飾を介したエピジェネティクス制御は、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。

また、広い意味でのエピゲノム制御の一つとして、遺伝子の核内配置・ゲノム高次構造も重要であることがわかっている。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、その転写因子のDNAへの結合は、ゲノムの凝縮状態や核内構造による局在化によっても制御される。すなわち、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。このクロマチン構造や核内高次構造は、ヒストン修飾等と密接に関係している。さらに、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明らかにされつつある。

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、また、エピゲノム状態やクロマチン構造の統合的理解が必要とされ“ヌクレオーム（網羅的細胞核）”という概念による研究の重要性が言われ始めている。細胞核内で起こる遺伝子発現の制御機構を理解することで、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タログが作られた。2004年頃よりNIHが1,000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年に米国Pacific Biosciences社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。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<sup>1)</sup>、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<sup>2-5)</sup>。単一細胞トランスクリプトーム解析は、比較的低コストでスループットも高い優れた手法であるが、もともとそれらの細胞が持っていた空間情報を失うという問題があった。そのため、マーカーとなる遺伝子の発現情報や計算等により、個々の細胞の空間的な分布を推定する方法なども開発されてきた。一方、実際に空間分布を維持したままの単一細胞トランスクリプトーム解析技術が開発されるなど、空間トランスクリプトームの需要は高まっている<sup>6)</sup>。

### 【エピゲノム】

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

に入り転写因子やヒストン修飾部位を解析できるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法が普及したことに伴い、世界各国においてエピゲノム研究が積極的に推進された。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 3,000 万箇所)。シーケンサーにより、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程度のリード量 (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。

2010 年頃から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、国際的なプロジェクトの一つとして、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (International Human Epigenome Consortium : IHEC) が 2010 年から活動しており<sup>7)</sup>、様々なヒト正常組織のエピゲノムデータが 6,000 以上集積している。本コンソーシアムには、米国、EU、韓国、ドイツ、カナダ、イタリアが参加している。日本も JST-CREST (2015 年以降は AMED-CREST) 「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」を主体として 2011 年から 2018 年まで IHEC メンバーとなり、500 以上のデータセットを取得している。IHEC は 2020 年度から第 2 ステージとなり、データセットの統合解析や疾患のエピゲノムなどを進めており、日本からは AMED-CREST 「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」のメンバーが参画している。

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が行われる。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。また、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も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。

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、近接してい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 DNA メチル化、ヒストン修飾等の 1 次配列上の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も重要である。

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考えが広がり、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<sup>8)</sup>。この「ヌクレオーム」研究は、次世代シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析と顕微鏡解析、計算機科学・数理モデル研究等の異分野が発展、融合して萌芽し、展開されつつある。

なかでも遺伝子発現制御機構の解明に関わる近年のイメージング技術の発展は眼を見張るものがある。光学顕微鏡の分解能は理論的に200nmを超えることができないとされていたが、様々な超解像顕微鏡技術が開発され、100nm以下の分解能での検出が可能になった。特殊な方法を用いれば10nm以下の分解能も達成できることが示されている。さらに、蛍光タンパク質を用いた生細胞解析により遺伝子発現制御の時空間動態も明らかにされ始めた。様々な転写因子やRNAポリメラーゼ、ヒストンの生細胞動態がフォトブリーチ法や1分子イメージング法により解析され、転写開始複合体がダイナミックに構成されることが示された。また、ゲノム編集に用いるタンパク質からDNA切断活性を除くことで、特定のゲノム領域を可視化することができる。転写産物についても、特定のRNAに結合するタンパク質や蛍光アンチセンス鎖を用いた検出が可能となっている。さらに、DNAメチル化やヒストン修飾を検出するプローブも開発され、エピゲノム状態と遺伝子発現のダイナミクスを生細胞で捉えることが可能になってきた。

エピゲノム制御に着目した創薬開発も進められており、抗がん剤として既に2種類のDNAメチル化酵素阻害剤と3種類のヒストン脱メチル化酵素阻害剤が米国で承認されている。azacytidine (DNAメチル化阻害薬: 米国 Celgene 社が開発) は骨髄異形成症候群の治療薬として米国で2004年に上市され<sup>9)</sup>、日本では日本新薬<sup>10)</sup> がライセンス生産し2011年に承認された。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) 等が上市されている。

低分子化合物によるエピゲノム制御は特定の遺伝子に作用するものではないため、特定の遺伝子のエピゲノム状態を人工的に制御し、遺伝子発現を自在に操作できるような「エピジェネティック編集」技術の開発が進められている。これは、上述のゲノム可視化技術と転写の活性化や不活性化に働くタンパク質ドメインを用いることにより、特定のゲノム上のヒストン修飾状態等を変化させることで、遺伝子発現を制御するものである<sup>11)</sup>。その制御を低分子化合物や光により自在に操作できる系も開発されるなど、この制御技術は急速に進展している。

エピゲノム情報を単一細胞レベルで解析する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<sup>12), 13)</sup>、クロマチン高次構造を検出する Hi-C<sup>14), 15)</sup>、ヌクレオソームの位置を検出する MNase-seq<sup>16)</sup> 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<sup>17)</sup>。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&RUN<sup>18)</sup>、抗体と Tn5 トランスポザーゼを結合させた CUT&Tag<sup>19)</sup>、抗体に結合させたオリゴ DNA を Tn5 トランスポザーゼにより近傍のゲノムへと挿入する ChIL-seq<sup>20)</sup> 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り、顕微鏡レベルでの局在情報との同時取得や2つ以上の標的を同時に解析できるユニークなものである<sup>21)</sup>。

ヒストン修飾や転写因子の結合部位の解析には、それらの特異的抗体が必要であるが、抗体の特異性や再現性の問題が科学的・産業的観点から改めて取り上げられることが増えている<sup>22), 23)</sup>。すなわち、ポリクローナル抗体を用いた場合の再現性や特異性の検証が不十分な抗体を用いた場合の問題が無視できないほど大きく、モノクローナル抗体や組換え抗体の利用が推奨されている。ヒストン修飾抗体に関する特異性に関する包括的データベースの作成<sup>24)</sup> 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<sup>25)</sup> 等、信頼性の高い抗体の作製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

## 2.4

米国が圧倒的に主導している。日本でも網羅的な抗体作製が試みられたこともあるが広がりには限定的である。

## 【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非コード (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<sup>26), 27)</sup> (ただし、後述のように、非コードとされていた RNA からペプチド鎖が合成されている場合も多く見つかっており、この定義自体を見直す必要もでてきている)。

### ① small RNA

真核生物の 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。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-interacting RNA (piRNA) の複雑な生合成経路や作用機構に関しても、欧米、中国に加え日本の研究者による研究が積極的に積み重ねられている。

Small RNA の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。しかし、効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) や生体内での安定化等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。また、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日本で大規模に進められている。特に、がんの診断目的での期待が高い。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、韓国とともに日本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<sup>28)</sup>。

### 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 20,000 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に比較して、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やアンチセンス核酸を用いて 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 の制御因子群としての確固な機能概念が確立された。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。

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った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 研究や翻訳研究を大きく加速させている。最近の翻訳研究において、真核生物においても非 AUG からの翻訳開始、繰返し配列からの翻訳開始等、これまでの配列予測からは想定されなかったタンパク質が合成されることも示されている。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<sup>29), 30)</sup>。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。さらにバックスプライシングと呼ばれる形式によって生み出される環状 RNA が多数発見され、マイクロ RNA やタンパク質因子のスポンジなどの機構を介して様々な生理機能や疾患での重要な役割が明らかになっている。またスプライシングによって上流プロモーターが活性化される新規制御機構やスプライシングの中心的因子 U1 snRNA の新規機能の発見など既に確立された基盤的機能概念を修正するような知見が相次いでいる。

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<sup>31)</sup>。現時点では、具体的な機能解析が行われた lncRNA はほんの一部に過ぎないが、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事が大いに期待される。

転写後修飾に関しては、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<sup>32)</sup>。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、性転写後修飾決定、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<sup>32)</sup>。

タンパク質発現過程の 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 1,500 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行われ最近その成果が発表され、今後の RNA 研究の有用なリソースとなると考えられる<sup>33)</sup>。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-液相分離 (LLPS) 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。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、最近では複数遺伝子の転写制御エレメントであるスーパーエンハンサー領域から合成された ncRNA (eRNA, eIncRNA) が特異的なエピジェネティック制御因子を集約してその場で相分離を誘発することが示され<sup>34)</sup>、今後これらの現象が多彩な生理現象に関わっていることが期待されている。

RNA 生物学の応用研究も近年盛り上がりを見せている。スプライシングに関わる複数の基盤因子の変異が様々な癌の原因となっていることが疾患ゲノム解析によって明らかにされ、スプライシング因子が重要な創薬標的として浮上した。またスプライシングを人為的に改変すること<sup>35)</sup>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 (2016 年)、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日本を含めて成果が上がりつつある。

#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

###### ・ RNA-タンパク質複合体

遺伝子発現を網羅的かつ定量的に測定する RNA の次世代シーケンス解析は、1 細胞で実施されるようになり、その手法の改良が著しく進展している。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、架橋、ライゲーシオンと次世代シーケンスを組み合わせることでゲノムワイドにマッピングする手法 (例: SHAPE, PARIS, RIC) 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<sup>33)</sup>。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。

###### ・ 単一細胞マルチオミクス技術

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-seq<sup>36)</sup> 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-seq<sup>37)</sup> 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-CAR<sup>38)</sup> 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。2 つの修飾や転写因子の結合部位を同時に解析できる mtChIL-seq 法も開発された<sup>21)</sup>。これらの 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

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 用キットが販売された。また、空間的遺伝子発現解析システム (Visium) も販売されている。

・ クロマチン高次構造解析

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 GAM<sup>39)</sup>、multiplexing 法に用いられる split-and-pool の概念を応用した SPRITE<sup>40)</sup>、Tn5 トランスポザアーゼを利用した TRAC-looping<sup>41)</sup> 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<sup>42)</sup>。

・ 液-液相分離 : liquid-liquid phase separation : LLPS

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 (液-液相分離 : liquid-liquid phase separation : 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、膜を介さずに特定の因子を空間的に隔離、濃縮したり、特異的生化反応の場、クロマチン構造ハブとして働くことを可能にしており、その意義の解明が今後進むと考えられる。この機構で RNA は上記タンパク質を集約するだけでなく、RNA-RNA 相互作用によっても相分離を促進しており、細胞内での相分離の誘導に様々な様式で関与していることが明らかになってきた。また相分離を制御する因子として RNA ヘリカーゼ、修飾酵素なども同定され始めており、今後 RNA を中心とした局所的な相分離制御の研究が、様々な細胞内現象を説明するために大きく展開していくと考えられる。

・ CRISPR/Cas9

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<sup>43)</sup>、遺伝子の核内局在やクロマチン高次構造の編集<sup>44)、45)</sup>、特定のゲノム領域の可視化への応用<sup>46)</sup>、cell barcoding による lineage tracing<sup>47)</sup> 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。

・ RNA 関連創薬

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、日本でも神経疾患関連のリピード配列由来 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。一方で、mRNA をベースにしたナノテクノロジー技術を取り入れた遺伝子治療技術開発が盛んになってきている。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

#### ・米国 4D nucleome project

2015年に米国 NIH の「Common Fund」で予算化された。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。技術開発に特化した第1期の成功を受けて、2020年から第2期がスタートした。なお、欧州でも同様のプロジェクトとして 4DNucleome Initiative in Europe が存在している。

#### ・米国 ENCODE プロジェクト

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 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つの先導的な 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。

#### ・欧州 EXPERT プロジェクト

mRNA をベースにした癌、心疾患の遺伝子治療技術の改善を目的として2020年に開始された5年間のナノメディシンに関する欧州10か国が参加する研究プロジェクトである。mRNA のデリバリーを行う上で障壁となる様々な事象について集中的に研究する。

・中国科学院 (CAS) 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、最近主要な成果を複数の論文に報告した<sup>48)</sup>。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。

・新学術領域「非コード RNA 作用マシナリー」

「ncRNA ネオタクソミ」領域の後継領域として、ncRNA の機能と作動原理の理解を目指した。mRNA 制御についても「RNA 制御学」「新生鎖生物学」が2期に亘って継続してきた。いずれにおいても日本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<sup>49)</sup>。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。

**(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。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、2,000~5,000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。

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<sup>50)</sup>。よって、時間解像度に優れた (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、Monocle<sup>51)</sup> 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 velocity<sup>52)</sup> 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、これからのヌクレオーム研究の鍵となるのは情報・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。また、理論研究や機械学習が重要となる一方で、機械学習の教師となるようなさらに質や網羅性の高いデータを得る必要性も増してきている。

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 lncRNA 作用機構の全貌解明

最近ゲノム編集やアンチセンス核酸を用いた lncRNA の機能スクリーニング成果が報告され、様々な生理活性を有する lncRNA の存在が明らかにされた。今後、それらの作用機構に関する個別の深掘り研究によって、small RNA も含めた ncRNA の多彩な作用機構や基盤ルールが明らかにする研究を速やかに推進する必要がある。また並行して個体レベルの ncRNA の機能探索を進めていくことによって、膨大な ncRNA の機能がタンパク質機能だけでは実現不可能な複雑な生命現象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の新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知見の獲得につながる。

### 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環境を構築し、因子の隔離、生化学反応場、構造ハブとしての機能があ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細胞核内のクロマチン 3D 構造が規定される際の 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原理に基づいた細胞内の環境構築機構やその動態、さらに生物学的意義を理解すること、またその異常に起因する疾患発症機構の解明が、新しい細胞内動態の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俯瞰的視点によ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 RNA 制御の複雑性と相互の連携、それら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、複雑かつ堅牢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」の人材育成が日本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。

・最先端機器を用いた解析プラットフォームの整備

研究分野全体の推進のために、計測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。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小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。ゲノム解析・画像解析共、特に情報分野の人材不足が深刻である。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。その際、拠点での利益誘導の排除やリソースへの他の研究者のアクセスの確保などの配慮が必要である。例えば、最近理研 FANTOM グループがアンチセンス核酸を用いた lncRNA 機能スクリーニングの成果を発表したが、このような貴重な日本オリジナルな基盤リソースを国内研究者が効率よく利用できる体制の整備が重要であろう。

(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	○	→	一部の突出した研究成果が出されてはいるものの、層が薄いことは否めない。特に、基本原理の発見や新規概念の創出、基盤技術開発などの基礎分野で米国や欧州に遅れをとり始めている。 また、次世代シーケンサーの導入や情報解析の遅れを取り戻すに至っておらず、新規技術・装置の導入の遅れはクライオ電子顕微鏡などにも見られている。そのなかで、ゲノムやクロマチン、RNAに関連する文科省新学術領域の活動が、本分野の継続的推進や若手育成を支えている。エピゲノムや一細胞解析に関連したJSTやAMEDのCRESTによるサポートも国産の新規技術の開発や多様な研究の推進に貢献している。 日本も1分子蛍光イメージング分野の開拓に貢献してきたことに加え、生細胞イメージングに適した超解像技術 <sup>53)</sup> 、クライオ蛍光顕微鏡による超解像技術 <sup>54)</sup> など独自技術の開発で世界に対峙している。また、独自のエピゲノム可視化プローブの開発も行われている。 一方、ゲノムコホートやFANTOMのような大型プロジェクトで構築されたリソースが国内研究者に十分に有効利用されているとはいえず、先駆的基礎研究に効率的に結びつける道筋の整備や予算配分の再検討も重要であろう。研究の裾野拡大と設備共用化等による効率化等により、この分野で実績を積み重ねてきた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。

2.4 俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

	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。機能的アプタマー、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。さらに、一細胞解析の技術移転やエピゲノム関連ベンチャーの導出なども行われており、一定の実用化が見られる。しかし、これらは稀な例であり、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は多くない。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、依然としてゲノム、エピゲノム、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。4D Nucleome Initiativeの第一期が成功し、第二期の開始が決まっている。この Initiative でサポートされた研究成果の迅速なリリースやデータを統合するプラットフォームなどが整備され、研究成果が次の研究に広がる仕組みが構築されている。エピゲノムや RNA に特化した研究所が多く、研究機関に設立されており、エピゲノムや 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仕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。GAMや1細胞Hi-C、1細胞DamIDなどの新規技術は、欧州発である。各国独自のグラントに加えて、ECRグラントにより最先端研究や若手研究がサポートされる仕組みができています。また、複数国にまたがる共同研究の推進を行うためのグラントも整備されている。エピゲノム関連では多くの成果を挙げたBlueprintが2016年に終了したが、FLAGSHIPが2018年から始まっている。また、日本の新学術領域程度の中規模のグループグラントで、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。ドイツでは、独自のエピゲノム解析プロジェクトDEEPの終了後、一細胞解析やゲノムアーキテクトに関するグループグラントが発足しており、伝統を維持しつつも最先端研究を推進している。また、ドイツMax Plank研究所やオーストリアIMBAなど、若手の優秀な研究者を世界中から集め、充実したリソースのもとで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、Galaxo-WellcomeやNovartis、Rocheなど大手製薬企業による基礎から応用研究までをカバーする研究所や研究費のサポートなど、シームレスな実用化への取り組みが行われている。mRNAナノメディシンに注力した国際プロジェクト（EXPERT）が開始され、今後の発展が期待される。

2.4  
俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

中国	基礎研究	◎	↗	次世代シーケンサーやクライオ電子顕微鏡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。 発生初期や幹細胞のエピゲノム解析などで目覚ましい成果を挙げている。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。 さらに、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。 近年では、中国国内で生み出された独自の成果が、一流雑誌に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限られている。
	応用研究・開発	○	↗	エピゲノムや RNA 分野に限ったことではないが、国家の研究費全体に占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。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。COVID-19 RNA の解析についても世界を牽引する先駆的成果を得ている。 IHECに参加したが目立った成果は出ていない。
	応用研究・開発	△	→	目立った活動・成果は見えていない。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む可能性はある。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

## 参考・引用文献

- 1) F. Tang et al., “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell”, *Nat. Methods* 6, no. 5 (2009) : 377-382. doi : 10.1038/nmeth.1315
- 2) V. Svensson, R. Vento-Tormo and S. A. Teichmann, “Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade”, *Nat. Protoc.* 13, no. 4 (2018) : 599-604. doi : 10.1038/nprot.2017.149
- 3) E. Z. Macosko et al., “Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1202-1214. doi : 10.1016/j.cell.2015.05.002

- 4) A. M. Klein et al., “Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1187-1201. doi : 10.1016/j.cell.2015.04.044
- 5) O. Hayashi et al., “Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 619. doi : 10.1038/s41467-018-02866-0
- 6) D. J. Burgess, “Spatial transcriptomics coming of age”, *Nat. Rev. Genet.* 20, no. 6 (2019) : 317. doi : 10.1038/s41576-019-0129-z
- 7) H. G. Stunnenberg, International Human Epigenome Consortium and M. Hirst, “The International Human Epigenome Consortium : A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery”, *Cell* 167, no. 5 (2016) : 1145-1149. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.007
- 8) 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』60巻8号 (2017) : 555-563. doi : 10.1241/johokanri.60.555
- 9) 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」」『大和総研グループ』, <https://www.dir.co.jp/report/consulting/other/101013.html> (2021年2月15日アクセス) .
- 10) 日本新薬 「骨髓異形成症候群治療剤「ビダーザ®注射用100mg」製造販売承認取得のお知らせ」『日本新薬』, [https://www.nippon-shinyaku.co.jp/company\\_profile/news.php?id=156\\_topics/ns2011/2332](https://www.nippon-shinyaku.co.jp/company_profile/news.php?id=156_topics/ns2011/2332) (2021年2月15日アクセス) .
- 11) N. L. Baskin and K. A. Haynes, “Chromatin engineering offers an opportunity to advance epigenetic cancer therapy”, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, no. 10 (2019) : 842-845. doi : 10.1038/s41594-019-0299-6
- 12) D. A. Cusanovich et al., “Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing”, *Science* 348, no. 6237 (2015) : 910-914. doi : 10.1126/science.aab1601
- 13) J. D. Buenrostro et al., “Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation”, *Nature* 523, no. 7561 (2015) : 486-490. doi : 10.1038/nature14590
- 14) T. Nagano et al., “Single-cell Hi-C reveals cell- to-cell variability in chromosome structure”, *Nature* 502, no. 7469 (2013) : 59-64. doi : 10.1038/nature12593
- 15) T. Nagano et al., “Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution”, *Nature* 547, no. 7661 (2017) : 61-67. doi : 10.1038/nature23001
- 16) B. Lai et al., “Principles of nucleosome organization revealed by single-cell micrococcal nuclease sequencing”, *Nature* 562, no. 7726 (2018) : 281-285. doi : 10.1038/s41586-018-0567-3
- 17) A. Rotem et al., “Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 11 (2015) : 1165-1172. doi : 10.1038/nbt.3383
- 18) P. J. Skene and S. Henikoff, “An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites”, *eLife* 6 (2017) : e21856. doi : 10.7554/elife.21856
- 19) H. S. Kaya-Okur et al., “CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 1930. doi : 10.1038/s41467-019-09982-5
- 20) A. Harada et al., “A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling

- with lower input”, *Nat. Cell Biol.* 21, no. 2 (2019) : 287-296. doi : 10.1038/s41556-018-0248-3
- 21) T. Handa et al., “Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input”, *Nat. Protoc.* 15, no. 10 (2020) : 3334–3360. doi : 10.1038/s41596-020-0375-8
- 22) A. Bradbury and A. Plückthun, “Reproducibility : Standardize antibodies used in research”, *Nature* 518, no. 7537 (2015) : 27-29. doi : 10.1038/518027a
- 23) F. Edfors et al., “Enhanced validation of antibodies for research applications”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 4130. doi : 10.1038/s41467-018-06642-y
- 24) S. B. Rothbart et al., “An Interactive Database for the Assessment of Histone Antibody Specificity”, *Mol. Cell* 59, no. 3 (2015) : 502-511. doi : 10.1016/j.molcel.2015.06.022
- 25) A. Venkataraman et al., “A toolbox of immunoprecipitation-grade monoclonal antibodies to human transcription factors”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 330-338. doi : 10.1038/nmeth.4632
- 26) 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—』DOJIN BIOSCIENCE SERIES 25 (京都: 化学同人, 2016) , <https://www.rnaj.org/publications/item/363-noncoding-rna>.
- 27) T. Hirose, Y. Mishima and Y. Tomari, “Elements and machinery of non-coding RNAs : toward their taxonomy”, *EMBO Rep.* 15, no. 5 (2015) : 489-507. doi : 10.1002/embr.201338390
- 28) S. Iwasaki et al., “Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex”, *Nature* 521, no. 7553 (2015) : 533-536. doi : 10.1038/nature14254
- 29) T. Kondo et al., “Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila embryogenesis”, *Science* 329, no. 5989 (2010) : 336-339. doi : 10.1126/science.1188158
- 30) K. Hanyu-Nakamura et al., “Drosophila Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells”, *Nature* 451, no. 7179 (2008) : 730-733. doi : 10.1038/nature06498
- 31) S. Nakagawa, “Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs”, *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, no. 1 (2016) : 177-183. doi : 10.1016/j.bbagr.2015.06.011
- 32) K. D. Meyer and S. R. Jaffrey, “Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33 (2017) : 319-342. doi : 10.1146/annurev-cellbio-100616-060758
- 33) D. Dominguez et al., “Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins”, *Mol. Cell* 70, no. 5 (2018) : 854-867.e9. doi : 10.1016/j.molcel.2018.05.001
- 34) B. R. Sabari et al., “Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control”, *Science* 361, no. 6400 (2018) : eaar3958. doi : 10.1126/science.aar3958
- 35) Y. Hua et al., “Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model”, *Nature* 478, no. 7367 (2011) : 123-126. doi : 10.1038/nature10485
- 36) M. Stoeckius et al., “Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells”,

- Nat. Methods* 14, no. 9 (2017) : 865-868. doi : 10.1038/nmeth.4380
- 37) L. Li et al., “Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos”, *Nat. Cell Biol.* 20, no. 7 (2018) : 847-858. doi : 10.1038/s41556-018-0123-2
- 38) J. Cao et al., “Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in thousands of single cells”, *Science* 361, no. 6409 (2018) : 1380-1385. doi : 10.1126/science.aau0730
- 39) R. A. Beagrie et al., “Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping”, *Nature* 543, no. 7646 (2017) : 519-524. doi : 10.1038/nature21411
- 40) S. A. Quinodoz et al., “Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 744-757.e24. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.024
- 41) B. Lai et al., “Trac-looping measures genome structure and chromatin accessibility”, *Nat. Methods* 15, no. 9 (2018) : 741-747. doi : 10.1038/s41592-018-0107-y
- 42) B. Bintu et al., “Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells”, *Science* 362, no. 6413 (2018) : eaau1783. doi : 10.1126/science.aau1783
- 43) S. Morita et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 10 (2016) : 1060-1065. doi : 10.1038/nbt.3658
- 44) H. Wang et al., “CRISPR-Mediated Programmable 3D Genome Positioning and Nuclear Organization”, *Cell* 175, no. 5 (2018) : 1405-1417.e14. doi : 10.1016/j.cell.2018.09.013
- 45) S. L. Morgan et al., “Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping”, *Nat. Commun.* 8 (2017) : 15993. doi : 10.1038/ncomms15993
- 46) H. Ma et al., “CRISPR-Sirius : RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging”, *Nat. Methods* 15, no. 11 (2018) : 928-931. doi : 10.1038/s41592-018-0174-0
- 47) J. M. Kebschull and A. M. Zador, “Cellular barcoding : lineage tracing, screening and beyond”, *Nat. Methods* 15, no. 11 (2018) : 871-879. doi : 10.1038/s41592-018-0185-x
- 48) J. A. Ramilowski et al., “Functional annotation of human long noncoding RNAs via molecular phenotyping”, *Genome Res.* 30, no. 7 (2020) : 1060-1072. doi : 10.1101/gr.254219.119
- 49) T. Yamazaki et al., “Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation”, *Mol. Cell* 70, no. 6 (2018) : 1038-1053.e7. doi : 10.1016/j.molcel.2018.05.019
- 50) J. A. Schofield et al., “TimeLapse-seq : adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding”, *Nat. Methods* 15, no. 3 (2018) : 221-225. doi : 10.1038/nmeth.4582
- 51) C. Trapnell et al., “The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells”, *Nat. Biotechnol.* 32, no. 4 (2014) : 381-386. doi : 10.1038/nbt.2859
- 52) G. La Manno et al., “RNA velocity of single cells”, *Nature* 560, no. 7719 (2018) : 494-498. doi : 10.1038/s41586-018-0414-6

- 53) S. Hayashi and Y. Okada, “Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics”, *Mol. Biol. Cell* 26, no. 9 (2015) : 1743-1751. doi : 10.1091/mbc.E14-08-1287
- 54) T. Furubayashi et al., “Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy : Evaluation with DNA Origami”, *J. Phys. Chem. B* 124, no. 35 (2020) : 7525-7536. doi : 10.1021/acs.jpcc.0c04721

## 2.4

## 2.4.2 細胞外微粒子・細胞外小胞

### (1) 研究開発領域の定義

生体内には、外部から侵入した（外因性）または体内で生じた（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浮遊粒子状物質（Suspended Particulate Matter：SPM）、PM2.5など、内因性微粒子としては細胞外小胞（extracellular vesicles：EVs）などが挙げられる。

どちらも共通して、小胞に含有されるDNA、RNA、タンパク質、脂質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おいて、その機能解析やバイオマーカーとしての探索が進められている。

### (2) キーワード

細胞外小胞、エクソソーム、メンブレンベシクル、細胞間情報伝達、バイオマーカー、リキッドバイオプシー、細胞外DNA/RNA、ドラッグデリバリーシステム

### (3) 研究開発領域の概要

#### 【本領域の意義】

細胞外小胞は脂質二重膜で形成され、主に生成機構の違いに基づきエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体に分類される。エクソソームは、ほぼ全ての細胞から分泌される直径50～150 nm程度の小胞であり、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、細菌も同様に脂質二重膜からなる細胞外微粒子であるメンブレンベシクル（Membrane vesicles：MVs）（直径20～400 nm程度）を産生していることが知られている。

#### 【外因性微粒子】

近年、環境中の様々な外因性微粒子の生体への影響が注目されている。例えば、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、観察技術、定量的分析手法の制約から生体内への取り込み過程、分布や局在の挙動などの多くが未解明のままとなっており、有害微粒子へ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するものである。

#### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

細胞外小胞の発見は1946年に遡り<sup>1)</sup>、1981年に網状赤血球の研究で発見された粒径100 nm程度の分泌小胞が1987年にエクソソームと命名された<sup>2)</sup>。その後、長いあいだ細胞内の不要物排出機構と考えられていたが、2007年スウェーデン Göteborg 大学 Lötvallらによって、エクソソーム内に分泌細胞由来の mRNA や miRNA が存在し、それらが他の細胞に受け渡されることで細胞間の情報交換が行われている可能性が示された<sup>3)</sup>。この報告をきっかけに、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標的とした研究開発および応用した研究開発が世界中で活発に行われている。

エクソソームに内包、あるいは膜に存在するRNAやタンパク質などの機能性分子の量、種類が疾病で変動

することから、疾病の検出や予後予測、また治療標的として利用することが期待されている。また、エクソソームが生体内に存在する天然のドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System : DDS) と捉えられることから、DDSなど創薬技術として利用することも広く試みられている。さらに、エクソソームは種を超えて多くの生物種に存在していることから、異種間での情報伝達を行っている可能性も示唆され、様々な生命現象のメカニズム解明や健康・医療分野での広い応用に向けた研究開発が行われている。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。

### 【内因性微粒子 : 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ひとつであり、環境・健康・食料に渡って我々の生活に直接関わっている。ほとんどの細菌は細胞外に脂質二重膜で構成される20~400 nm程度の細胞外微粒子を放出する<sup>4), 5)</sup>。細菌が形成する細胞外微粒子はメンブレンベシクル (MVs) と呼ばれ、その種類と機能が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 (コミュニケーション) や細胞間での遺伝子のやり取り (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<sup>6), 7)</sup>。細菌由来のMVsは広く環境中にも存在していることから、日常的に我々は暴露されていると考えられるが、その影響については不明なままである<sup>8)</sup>。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開発の基盤として注目されており、すでに認可されているものもある。近年では、ガン細胞など特定の細胞をターゲットにしたDDSの開発も行われている<sup>9)</sup>。

### 【研究開発の動向】

#### 【外因性微粒子】

世界の疾病負担研究2015では、PM2.5による死者が全世界で420万人に上り、総死亡数原因の7.6%を占めると報告されるなど、外因性微粒子の健康への影響が注目されている<sup>10)</sup>。PM2.5が呼吸器系疾患や循環器系疾患などのリスクを上昇させると考えられることから、そのメカニズムを細胞、動物実験レベルで解明する試みが進んでいる<sup>11)</sup>。一方、疫学的にPM2.5への曝露と死亡、腎機能の関連などを調査し、その関連性を明らかにする研究も多数報告されている<sup>12), 13)</sup>。しかし、外因性微粒子には多種多様な物質が含まれており、どの微粒子・成分がどの細胞にどのような反応を引き起こしているのか正確に捉えるための技術開発が進行中である。

#### 【細胞外小胞 : EVs、エクソソーム】

内因性の微粒子として、ほとんど全ての細胞が細胞外に放出する膜小胞である細胞外小胞 (extracellular vesicles : EVs) に注目が集まっている。EVsは主にその生成機構に基づいて、エクソソーム、マイクロベシ

クル、アポトーシス小胞に分類される。しかし、細胞外に分泌されたEVsの由来を同定することは難しく、EVsをサイズで分画、分析することで脂質二重膜を持たないexomere、小さいエクソソーム (Exo-S)、大きいエクソソーム (Exo-L) に分類できることも報告されている<sup>14)</sup>。EVsの分類に関する定義にはまだ曖昧な部分があるが、国際細胞外小胞学会 (International Society for Extracellular Vesicles : ISEV) が主導して整理が進んでいる<sup>15)</sup>。

EVs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。2010年に280報程度であった論文数は、2015年に1,100報を超え、2019年には3,200報にも及び、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。

エクソソームの機能、応用に向けた研究が最も進んでいるのはがんの領域である。膵臓がん由来のエクソソームは正常細胞を悪性形質転換させることが示され、膵臓がん細胞が分泌するエクソソームに内包され形質転換に関与するタンパク質が同定されている<sup>16)</sup>。がん細胞から放出されるエクソソームに内包されるmiRNAが腫瘍内から血管新生を誘導して増殖、転移に関与すること<sup>17)</sup>、転移性がん細胞から分泌されるエクソソームには特定のタンパク質が多く含まれ、それらが前転移ニッチの形成を促進していること<sup>18)</sup>、<sup>19)</sup>などが示されている。また、乳がん細胞が分泌するエクソソームに内包されるmiR-155が脂肪細胞のベージュ化、褐色化を促進、PPER $\gamma$ 発現抑制による代謝リモデリングを誘導してがんの悪液質に関与することが示唆されている<sup>20)</sup>。このように、エクソソームが発がん、悪性化に関与することが次々に見出されている。

また、神経変性疾患では、原因タンパク質と考えられる異常な凝集タンパク質がエクソソームによって細胞外へ放出され、周囲の細胞に伝播することが明らかとなっている<sup>21)</sup>。ウイルスが生体内で細胞間を伝播する過程でも、エクソソームがウイルスのゲノムやタンパク質などを感染細胞の周囲の細胞に送達し、ウイルスの生存に有利に働いていると考えられている<sup>22)</sup>。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<sup>23)</sup>。

このように、様々な疾病にエクソソームが関与し、疾病によってエクソソームに内包される、あるいは膜に存在する機能性分子の種類や量の変動することから、疾病の検出や予後予測、また治療標的としてなど、その応用が広く期待されている。

エクソソームに内包あるいは膜に発現するRNAやタンパク質などの機能性分子は安定に保持され、疾病によりその量、種類が変動することから、疾病の検出や予後予測のバイオマーカーとして有望視されている。例えば、診断が難しい筋痛性脳脊髄炎、慢性疲労症候群患者において、血漿中EVs量が増大しており、特徴的に内包されるtalínやfilamin-Aなどアクチンネットワークタンパク質がバイオマーカーとなる可能性が報告されている<sup>24)</sup>。臨床応用に向けて最も研究開発が盛んなのはがん診断の領域である。米国Exosome Diagnostics社は、2016年に非小細胞肺癌に対するALK阻害薬のコンパニオン診断として血液由来エクソソーム中RNA検出をベースとしたExoDx Lung (ALK) を上市、さらにExoDx Lung (T790M)、ExoDx Lung (EGFR)、尿由来エクソソームRNAを解析するExoDx Prostateも開発した。いずれも自家調製検査法 (Laboratory Developed Test : LDT) として利用されている。ExoDx Prostateは、2019年にFDAから画期的医療機器/デバイス指定を受け開発中である。我が国では、2014年度から国立がん研究センターがNEDOの支援の下、東レ、東芝など9機関と共同で体液中miRNA測定技術基盤開発事業を開始した。血液中エクソソームのmiRNAを独自の電気化学的検出技術を活用して解析し、膵臓がん、乳がんなど13種類のがん患者と健常者を2時間以内に高精度で網羅的に識別できることが確認され、今後、社会実装に向けた実証試験が進められる見込みである。

また、神経細胞由来エクソソームには、タウや $\alpha$ -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<sup>25)</sup>。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。

エクソソームが疾病のメディエーターとして機能することから、エクソソームの分泌を抑制することが新しい治療法になるとして注目されている。例えば、既存薬のドラッグリポジショニングでエクソソームの生成、分泌を制御することを目的に、前立腺がん細胞で4,580化合物のハイスループットスクリーニングを行い、エクソソーム生成阻害剤候補5化合物、生成活性化剤候補6化合物が見いだされている<sup>26)</sup>。さらに、がん特異的制御を目指した検討として、前立腺がん細胞では、miR-26aとその制御遺伝子であるSHC4、PFDN4、CHORDC1がエクソソームの分泌を制御していることが同定され<sup>27)</sup>、治療標的となる可能性が示されている。

また、様々な細胞への分化能を有していることから再生医療において応用が進んでいる間葉系幹細胞治療の効果は、移植した細胞由来のエクソソームに内包されるmRNA、miRNA、タンパク質、脂質を含む液性因子に因ることが示唆されており<sup>28)</sup>、エクソソームを治療薬として利用する検討も進んでいる。間葉系幹細胞由来のエクソソームは肝臓疾患や腎臓疾患における組織の線維化を抑制するほか、心疾患やアルツハイマー病などにも治療効果があると報告されている<sup>29), 30)</sup>。オーストリア Celericon Therapeutics 社は臍帯由来間葉系間質細胞が分泌するエクソソームによる人工内耳手術後の神経保護、線維化抑制効果を検証する臨床試験を2019年に開始している。オーストラリア Exopharm 社は血小板由来エクソソームで創傷治療効果を評価する臨床試験を2020年に開始したことを発表している。

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DDSとしても期待されており、siRNA、miRNAあるいは低分子化合物などを目的の細胞へ送達する試みが盛んになっている。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<sup>24), 31), 32)</sup>。米国 Codiak BioSciences 社は、エクソソーム膜に治療用あるいはターゲティング用タンパク質を発現させる技術を有しており、Prostaglandin F2 receptor negative regulator (PTGFRN) を高発現させたエクソソームにSTINGアゴニストを内包し、がんで抗原提示細胞特異的にSTING経路を活性化するexoSTING、および表面にIL-12を発現させたエクソソームでIL-12ががん局所で作用するexoIL-12を開発しており、2020年9月に臨床試験が開始されている。また、米国 PureTech Health 社は、ウシ乳汁由来のエクソソームを、従来経口投与が困難であった核酸、ペプチド、低分子などの経口投与化するキャリアとして開発している。2018年、スイス Hoffmann-La Roche 社により核酸医薬の経口投与製剤化にこの乳汁由来エクソソームの利用を検討することが発表されて話題となった。

上述のようにEVs、エクソソームに関して様々な研究開発が行われているが、EVsの製造・分離・解析のための標準的、効率的な技術が不足していることが大きなボトルネックとなっている<sup>33-35)</sup>。体液を扱う場合において、EVsは多くのタンパク質やEVsと同様の物理的・化学的な特性を持つ細胞と共存しており、EVsの分離は本質的に複雑なものとなる。現在用いられている主な分離方法は、EVsの密度や大きさ、特定の表面マーカーの違いを用いる分離方法である<sup>36)</sup>。これらの原理に基づく手法は、超遠心法や沈殿法、ろ過法、サイズ排除クロマトグラフィー法、イムノアフィニティ（抗原抗体反応）法がある。

## 2.4

超遠心法は、細胞、EVs、タンパク質間の密度と大きさの違いを利用する分離法である。EVsの回収には、通常、超遠心機を用いる分離法が用いられる<sup>36), 37)</sup>が、回収にかかる時間やハイスループット性に大きな難がある。細胞やアポトーシス体、EVsの大きな小胞分画は、標準的な遠心分離法 (<20,000 g) で分離可能であるが、タンパク質などからエクソソームを精製するには、超遠心分離法 (>100,000 g) を使用する必要がある。本手法は、大きなスピン速度と長い操作時間 (約5時間) が必要なのが大きな欠点である。また、超遠心分離法は、エクソソームの回収率が低く、タンパク質の凝集体が共沈するという欠点がある。超遠心分離法の追加技法として、シヨ糖密度勾配遠心分離法がエクソソームの分離純度効率を向上させるために使用される<sup>38-40)</sup>。

沈殿法は、回収時間やハイスループット性に難がある超遠心分離を用いない方法として開発され、EVs・エクソソーム単離キットが販売されている (例えば、Exo-spin™、ExoQuick™ Exosome precipitation、Total Exo-some Isolation Reagent from Invitrogen™、PureExo® Exo-some Isolation kit、および miRCURY™ Exosome Isolation kit)。これら市販品は、EVs・エクソソームの沈殿を誘導するために特別な試薬 (例えば、高分子添加剤) を使用しており、標準的な遠心機 (約10,000 g) を使用して約30分以内に単離を行うことが可能である。複数の研究報告において、これら沈殿法の分離効率を従来の超遠心分離法との分離効率と比較し、市販キットの高い分離効率が示されている<sup>41-43)</sup>。しかし、沈殿マトリックス (高分子添加剤など) が残留することで、EVs・エクソソームの生物学的活性および特性に影響を与える可能性が指摘されており、重大な欠点となっている<sup>44), 45)</sup>。

ろ過法として、市販のメンブレンフィルター (例えば、polyvinylidene difluoride (PVDF) またはポリカーボネート、細孔径: 約50~450 nm) が、生物学的サンプル中の細胞およびEVsの大きな小胞成分を分離するために使用されている。ろ過法は、膜を用いて細胞やEVsの大きな小胞分画をふるいにかけて、その後、超遠心分離でタンパク質からEVsの小さな小胞分画・エクソソームを分離するフローで、超遠心分離と組み合わせて使用されることが多い<sup>43), 46), 47)</sup>。超遠心分離を回避するため、タンパク質凝集体からEVsの小さな小胞分画・エクソソームを分離する手段として、市販の限外ろ過 (例えば、Amicon フィルター、100 kD MWCO) が使用されることもある<sup>43), 48)</sup>。ろ過法は一般的に超遠心分離法よりも迅速に処理可能であるが、操作手順の最適化が行われていない場合、目詰まりの影響によりエクソソームの収率が低下する恐れがある<sup>36), 43)</sup>。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法は、EVs・エクソソームをタンパク質凝集体から分離するために使用されている。一般的に、細胞やEVsの大きな小胞分画を除去するため、最初に遠心分離やろ過を行い、その後、市販のサイズ排除カラムを使用してEVsの小さな小胞分画・エクソソームの分離が行われる<sup>43), 48-51)</sup>。タンパク質のような小さな物質はカラムに長い間保持されるが、より大きな物質 (EVsの小さな小胞分画・エクソソーム) は早く溶出する。そのため、EVsの小さな小胞分画・エクソソームの分離は、特定の時間に溶出する画分を回収することで達成可能である。SEC法を用いて分離するエクソソームは不純物が少ないという報告もあるが、最適な効率を得るためには適切なカラムマトリックスの選択が不可欠である<sup>50)</sup>。

イムノアフィニティ分離法は、EVs・エクソソームの特定の表面マーカーの違いを用いて分離する方法である。EVs・エクソソームは、起源細胞に特異的なマーカーを含んでおり、抗原抗体反応が利用可能な場合がある。一般的なイムノアフィニティに基づく分離法は、体液中の特定のマーカーを含むEVs・エクソソームを捕捉するために抗体コーティングされた磁気ビーズを利用して行われる。本手法は、EVs・エクソソームの特定のサブ分画を分離することを可能にするが、一般に、大量の生物学的サンプルからEVs・エクソソームを分離する

場合には適していない<sup>36)</sup>。

これらの従来の分離方法は、専用の実験装置あるいは実験試薬や多段階の作業工程を必要とし、臨床現場でのルーチン診断ツールとしてEVs・エクソソームを解析することは多くの困難を伴っている。マイクロ流体システムは、これらの欠点を克服する可能性があり、臨床検体のEVs・エクソソームの迅速な分離・分析や、診断や治療のためのアプリケーションが期待されている。また、マイクロ流体システムは、EVs・エクソソームの分離・分析のための多目的プラットフォーム提供だけでなく、複数のプロセスの統合と簡素化や、クロスコンタミネーションのリスク低減にも貢献することが期待されている。現在、様々なマイクロ流体プラットフォームが世界中で開発されている。

### 【内因性微粒子：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<sup>52)</sup>。2010年頃からは、急速に発展してきたタンパク質の網羅的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MVsの形成機構や役割があること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MVs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<sup>7)</sup>。

MVsの中身として、DNA、RNA (mRNAs, rRNAs, tRNAs, small RNAs (sRNA))、タンパク質、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MVs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存在するが、MVsもそれを媒介する新たな機構として報告された<sup>53)</sup>。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、早くからMVsにRNAが含まれることが明らかになっていたが、RNAシーケンシング技術の急速な発展によって、その解析が進んでいる。さらにMVs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<sup>54)</sup>。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<sup>6)</sup>。その後、情報伝達物質が高濃度にMVs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<sup>55)</sup>。

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、MVs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MVsが形成されると考えられた<sup>4)</sup>。その後、超解像顕微鏡の開発によってMVsの形成過程を細胞が生きのまま観察できるようになり、MVs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MVs形成機構が存在することが明らかになった<sup>56)</sup>。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、MVs形成因子としては最も広く細菌に保存されており、細菌に感染するウイルスであるファージ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MVs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MVs形成機構がはじめて明らかとなった<sup>57)</sup>。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MVs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。単細胞生物である細菌においてもMVs形成機構はいくつか存在しており、環境に応じてそれらを使い分けられていることが分かってきている。MVsはこれまで一括りに扱われてきたが、形成機構によってMVsの中身が異なることから、2019年にはMVsの分類が提唱された<sup>58)</sup>。

#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

##### 【外因性微粒子：PM2.5 など】

- ・ 外因性微粒子による免疫活性化機構の解明

外因性微粒子の成分は多種多様であり、生体への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、血中に入ってから反応など、様々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。さらに、免疫応答を人為的にコントロールする研究も進み始め、期待が持たれる。

##### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

- ・ 研究ガイドライン整備

エクソソームは細胞のエンドサイトーシスの過程で多胞性エンドソームから産生、細胞外に分泌されるEVsのひとつである。しかし、マイクロベシクルなど他のEVsと厳密に分離することは困難であり、EVsが沈降する遠心力の違いによって、small EVs (超遠心100,000 × gペレット画分：エクソソームに相当するサイズの粒子が沈降)、medium EVs (中間速度遠心20,000 × gペレット) およびlarge EVs (低速度遠心2,000 × gペレット) という呼称も提案されている<sup>59)</sup>。エクソソームは、検出、単離が難しく、さらに分類の曖昧さがあるため、文献ごとにエクソソームと呼んでいるEVsが一致しておらず、実験データの解釈や再現性の確認を困難にしている。2012年に設立された国際細胞外小胞学会 (ISEV) が、EVsに関するPosition paperを発表し、ガイドラインを整備している<sup>15)</sup>。

- ・ 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、富士フイルム和光純薬より、国産試薬として世界販売が開始されている<sup>60)</sup>。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<sup>61), 62)</sup>。また、ヒトが摂取する食物に含まれるエクソソームの生体に与える機能なども検討が進んでおり、摂取した植物由来のエクソソームが腸内微生物叢組成や宿主の生理機能に影響することが報告されている<sup>63)</sup>。

・ 個別の細胞外小胞に含まれる分子の網羅的解析

細胞外小胞の個性を理解する重要性が認識されるにつれ、それらを1個1個独立に単離し、その中に含まれる分子を分析する技術が求められている。微細加工技術などを利用し流体中で単離するデバイスや、バーコードなどのタグをつけて単離する方法など、模索が続いている。1個の小胞に含まれる分子を分析する手法は課題であり、従来のオミクス的技術の延長では限界がある。金属近接場を利用した増強ラマン散乱法には期待がもたれる。個別の細胞外微粒子の表層タンパク質を、蛍光抗体を用いて解析する装置が最近市販され、JSTさがけでは共通機器として導入してその有用性を検証中である。

・ EVsのライブイメージング

EVs形成のメカニズムを知るために有力な方法として、ライブイメージングが挙げられる。直径200 nm以下のエクソソームを観察するためには超解像イメージングが必須であり、その生細胞への適用が課題であったが、我が国では高速超解像のライブイメージング技術がすでに開発されており、その利用に期待がもたれる。また、一細胞観察チップを利用して、細胞外に放出された微粒子を実時間観察する手法が開発され、期待されている。

・ 内因性細胞外微粒子の新しい形成メカニズムの解明

多胞体由来のエクソソーム以外に、細胞外小胞が形成されるさまざまなメカニズムが想定されているが、その実態はまだまだ不明な点が多い。その解明を目指す細胞生物学的な基礎研究が進みつつある。

・ エクソソームへの積荷選別機構の解明

エクソソームにはmRNA、miRNA、タンパク質など様々な機能性分子が内包される。しかし、その組成は必ずしも分泌由来細胞と一致しないことが知られている<sup>64), 65)</sup>。多胞体において内腔小胞に特定の分子が選別されるメカニズムは、まだ多くが謎に包まれているが、いくつかのRNA結合タンパク質の関与が示されるなど、研究が進みつつある

・ データベースの構築

研究者間で評価の対象としているエクソソームが異なることから、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。また、エクソソームの生成細胞、組成、含有物などに関する

がデータベース (ExoCarta、Vesiclepedia、EVpedia) の構築が進んでいる。

### 【内因性微粒子：MVs】

- ・ MVs を利用したワクチン開発、新しい療法

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、髄膜炎菌のワクチン開発がいち早く着手され、BEXSERO® として商品化されている。MVs ワクチン開発に資する新たな技術も出てきており、COVID-19 を含め、感染症に対するワクチン開発が世界中で加熱している。また、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、新しい免疫療法を提示した<sup>66)</sup>。そのメカニズムは分かっているものの、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ドラッグデリバリー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。

- ・ 生体内や腸内の MVs の解析

MVs が体液中や腸内にも存在することが確認されているが、それらの機能は未解明である。その機能解明に向けた第一段階として、MVs の精製が重要となるが、生体由来の他の細胞外微粒子から細菌の MVs をどのように分離するかが課題となっている。現在のところ、密度勾配遠心による分離の有効性が示されているが、改善の余地があるため、技術革新が待たれる。

- ・ 発酵食品中の MVs の解析

ヨーグルトなどの発酵食品は微生物の力を利用して生産されており、その中に MVs を含んでいることが確認された。発酵食品中の MVs の機能が解明されれば、それを強化した機能性食品の開発にも繋がり、健康増進などに役立つと考えられている。

### 【注目すべき国内外のプロジェクト】

- ・ 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であり、毎年 Annual Meeting を開催している。"EV in immunology" (2020 年 3 月)、"EV imaging in vivo" (2020 年 9 月) など、特化した領域のワークショップなども開催している。

- ・ Extracellular RNA Communication

米国 NIH common fund による研究プログラムとして 2013 年に開始された。資金提供を受けた研究者は Extracellular RNA Communication Consortium (ERCC) を発足させている。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していた。2019 年より第 2 期として延長されており、細胞外 RNA を運ぶ EVs との複合体の理解やそのためのツール、技術開発が行われている<sup>67)</sup>。

- ・ 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であり、学会誌 Matters を出版している。上述の Extracellular RNA Communication Consortium と連携している。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。

・JST-ERATO「野村集団微生物制御プロジェクト」(2015～2020年度)

最先端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。

・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」(2017～2024年度)

EVs、MVsをはじ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「感染症実用化研究事業」、「次世代がん医療創生研究事業 (P-CREATE)」

2020年度からそれぞれの事業で「抗線維化・再生誘導剤の開発：臨床を見据えた肝硬変に対する間葉系幹細胞由来のエクソソームを用いた次世代治療法開発への基盤研究」「細胞外脂質代謝酵素によるエクソソームの脂質修飾を介したがん微小環境の制御」がスタートしている。さらに循環器疾患領域においても、「循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業」によりエクソソームによる重症化予測マーカーとしてエクソソームの研究開発（高齢化・生活習慣病時代における末梢動脈疾患の動脈硬化重症度とその全身重複性を反映するバイオマーカーの開発）が開始されている。

【内因性微粒子：MVs】

- ・ERATO野村集団微生物制御プロジェクトが2015年にスタートし、MVsを中心に細胞間相互作用の解析が行われた。
- ・さきがけの「生体における微粒子の機能と制御」の領域において、微生物関連の課題が2019年度からスタートした。
- ・2019年10月に開始したERATO深津共生進化機構プロジェクトにおいても、MVsが細菌と宿主の共生で担う役割について、腸内細菌を中心にして研究が始まっている。
- ・MVsの生体への影響が明らかになる一方で、MVsを基盤としたワクチン開発が非常に活発化し、ERCがサポートする大型プロジェクト”OMVac”が2014年から5年計画で実施され、一部計画の延長が決まっている。
- ・オランダでは、保健福祉スポーツ省によって設立されたIntravacc (Institute for Translational Vaccinology) が中心となって、MVsを利用したワクチンの研究開発を行なっている。

- ・2020年（COVID-19の影響により2021年に延期）の11月には世界で初めてのMVに関する国際学会（EMBO work shop）が、Bacterial membrane vesicles : Biogenesis, functions, and medical applicationsと題してつくばで開催されることが決定した。

## （5）科学技術的課題

### 【外因性微粒子：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。

### 【内因性微粒子：EVs、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。

- ・エクソソーム動態制御機構解明

生体内において、どのエクソソームがどこへ行くのかの生体内動態が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。

- ・エクソソーム内容物操作法の開発

エクソソームに内包される機能性分子を特異的に操作、改変できる技術は、エクソソームの機能解明およ

び有効な機能発現に貢献する。

・エクソソーム製造・品質保証方法の開発

エクソソームを治療薬やDDSのツールとして利用するためには、大量に安定した品質でエクソソームを調製することが必要である。産生する細胞の状態もエクソソームの品質に影響することから、厳密な培養条件の設定等が必要となる。エクソソーム産生量を増大させる手法なども期待される。また、超遠心法を使った単離・精製法を工業スケールで実施することは難易度が高く、大量に処理できる他の方法論の確立が望まれる。さらに、エクソソームの品質（量、純度、粒度分布、均一性、力価、など）を厳密に規定する評価方法および考え方の確立が必要である。

【内因性微粒子：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<sup>54)</sup>。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見出されている<sup>68)</sup>。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。ゲノム編集技術の開発で2020年にノーベル化学賞を共同受賞したCharpentierのグループも細菌のMVs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<sup>69)</sup>。また、抗生物質耐性遺伝子や病原性遺伝子の獲得は、新興・再興感染症の拡大にも繋がるため、MVsを介した遺伝子の水平伝播を理解する必要がある。

・ファージ（バクテリアに感染するウイルス）とMVsの関係の解明

MVs形成機構のひとつにファージが関わっていることが明らかとなった<sup>56), 57)</sup>。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つことも報告された<sup>70)</sup>。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、ファージに対する機能が注目されている<sup>57)</sup>。ファージのみならず、ウイルスは宿主に対して極め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。生体におけるウイルスと細胞外微粒子の関係も未知であるため、ファージとMVsの関係を解明することは、細胞外微粒子研究全般に適用できる新たな概念を提供する可能性がある。

・MVsによる中身の受け渡し

MVs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。しかし、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。MVsは特異的に細胞に付着することも報告されており<sup>55), 71)</sup>、この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、MVsによる物質運搬制御の糸口が得られ、その成果はMVsを模倣した人工微粒子の設計にも役立つ。

・腸内や生体内における MVs の働きの解明

腸内細菌は MVs 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。さらに、体液からも MVs は同定されており<sup>72)</sup>、生体内での MVs の働きに注目が集まっている。今後解析するためには、MVs の回収・精製技術の発展、さらには 1 微粒子解析手法の開発が必要である。

・土壌環境における MVs の働きの解明

これまで MVs は主に水環境で解析されてきた。土壌 1 g に 100 億匹もの微生物がいるとも言われているが、土壌環境における MVs の解析は全く進んでいない。根圏微生物の働きなども踏まえると、土壌微生物の MVs は微生物間や微生物-宿主間相互作用に重要な役割を担っている可能性がある。腸内や生体内における MVs の機能解明と同様に、解析に当たっての課題になるのは、土壌からの MV の回収・精製である。特に MVs の土壌粒子への吸着が問題になると思われるが、土壌からの細菌の単離や DNA の精製で様々なノウハウが蓄積されているので、こうした知見が応用できる可能性がある。

・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 MVs であっても、その大きさや中身は不均一である。これは、MVs 形成経路が複数存在することに由来すると考えられる。近年、異なる経路によって形成された MVs は性質や機能が異なることが示唆されているが、現在まで MVs は一括りに解析されてきた。今後、それぞれの MVs の種類を分けて解析することで、MVs 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。この解明を促進させる基盤技術が MVs のソーティング技術と 1MV 粒子解析技術である。マイクロ流体デバイスとイメージングを用いた技術が考案され始めており、今後本分野の発展が見込まれる。こうした技術は上に挙げた MVs と他の細胞外微粒子を見分ける技術にも転用できる。

・MVs を対象としたオミクス解析や化合物スクリーニング

メタゲノム解析やメタボロミクス解析など、これまで細菌の細胞に対して行われてきた解析の対象を MVs にすることで、細胞とは異なる情報を得ることができる。MVs に関するオミクス情報を蓄積していくことで、将来的には環境モニタリングのマーカ―や生体での診断に使える可能性がある。さらに、MVs には特定の化合物が濃縮しやすい傾向も見られており、新規化合物スクリーニングの新たなターゲットとなり得る。

・MVs の改変および人工合成

MVs 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が、MVs は不均一であるため社会実装には製品として均一性を高める必要がある。しかし、まだ世界の多くの MVs の（ワクチン応用も含めた）研究者はそれに気付いていない。一方、我が国の MVs 研究者らは、MVs 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<sup>73)</sup>。よって、MVs 不均一性の質の理解にはアドバンテージがあり、MVs のワクチン利用についても海外との競争に打ち勝つことができると考えられる。そのためには、分野融合による MVs の改変や人工合成に取り組む必要がある。具体的には、リポソームを使用した 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、MVs をミミックした新た

な人工膜粒子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50-70 nm、長さが数mmに及ぶチューブが報告された<sup>74)</sup>。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抗生物質耐性など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にはまだ不明な点が多い。ナノチューブと MVs は、互いの形成に関わっていることが示唆されている<sup>75)</sup>。また、共通して細胞壁の損傷がその形成や需要に関与することから<sup>76)</sup>、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、サンプルを観察するのに伴う技術の開発も必要である。

**(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) が設立されている。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、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。CRESTの馬場総括の提案により、研究計画が折り合えば、さきがけ終了研究者が最長2年間CRESTチームに加わることを可能とする制度が始まり、その成果が期待される。

・ 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

国内外の規制当局はエクソソームに関する規制ガイドラインを整備していない。創薬モダリティとしての位

置づけ等、今後の課題である。また、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。

(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"> <li>AMEDや文部省科研費でのエクソソームの基礎分野に対する支援が年々伸びており、医学生物学はもちろん、薬学、工学、さらに農学などの他分野に広がっている。</li> <li>MV形成に関する基礎研究は世界をリードしている。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>再生医療分野でエクソソームの応用研究が進展している。間葉系幹細胞の細胞治療はその上澄またはエクソソームに焦点を当てた治療研究として成長が見込まれる。</li> <li>エクソソームは皮膚科学や美容分野、さらには機能性食品の開発分野でも産業化への気運が高まっている。</li> <li>国立がん研究センターにおいて血中エクソソームのmiRNAをバイオマーカーとする乳がん診断の有用性評価が行われる。</li> <li>発酵食品をターゲットにしたMV研究が盛んになってきており、生体への影響が解明されることが期待される。ワクチン開発に資する基盤技術研究も活発である。</li> </ul>
米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>リキッドバイオプシー技術をベースとしたGrail社など大手ベンチャーもエクソソーム診断の開発に着手している。</li> <li>NIHのグラントにおいてエクソソームの基礎研究分野がかなり台頭している。</li> <li>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。また、腸内細菌のMVなど、生体内におけるMVの役割について研究されている。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>幹細胞を使った細胞治療を手掛けていた企業が、次々にエクソソーム治療に転換するなど、再生医療の分野での急伸はもちろん、すでにエクソソームの診断が上市されている。</li> <li>コーネル大を中心にMVの改良技術の開発研究が盛んである。これを基にもとにVersatope Therapeutics社など細菌のMVを利用したワクチン開発企業が設立され、MVを基盤にしたCOVID-19ワクチンも開発されている</li> </ul>
欧州	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>ウイルス関係や疾患バイオマーカー開発の基礎研究が盛んである。</li> <li>スウェーデンのウメオ大などを中心にしてMVの細菌感染症病原性への関与について盛んに研究され、現在のワクチン開発の流れに繋がっている。</li> <li>宿主-細菌間相互作用に関する基礎研究が盛んであり、MVを体液や糞便から分離する試みがベルギーのゲント大を中心に行われている。また、イスラエルのヘブライ大のグループが明らかにしたナノチューブとMVの関連性について関心が高まっている。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>複数の大学と企業が再生医療の分野で臨床試験のパイプラインを走らせており、エクソソーム創薬に力を注いでいる。EUのエクソソームに対する予算は、応用研究が70%に上る。</li> <li>オランダのIntravacc社を中心にMVを利用した感染症ワクチン研究開発が長年に渡って行われている。</li> </ul>

2.4  
俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 2019年にエクソソームの学会が正式に発足し、エクソソームの教書が中国語で発売されるなど、若手基礎研究者の育成に努めている。</li> <li>・ MVsの病原性への関与およびワクチン利用を目指した基礎研究が活発化している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 再生医療関連の法律が改定され、間葉系幹細胞やエクソソーム治療の可能性が生まれ、多くのベンチャーや製薬企業が注目している。</li> <li>・ 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。</li> </ul>
韓国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 基礎研究の費用は十分ではないとの情報がある一方、毎年、エクソソームの国際シンポジウムを熱心に開催している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ILIAS Biologics社などアカデミアベンチャーが多く立ち上がり、DDS応用を軸に創薬に力を入れている。またサムソンなどの資金をバックに、美容から皮膚疾患治療を扱うベンチャーがアトピー性皮膚炎の臨床試験を韓国国内で開始した。</li> <li>・ がん免疫療法プラットフォームの利用を視野に入れたMVsの研究が浦項工大を中心に精力的に行われている。</li> </ul>
その他の国・地域 (任意)	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ オーストラリア、シンガポール、台湾、などのアジアパシフィックの国々も、エクソソームの基礎研究には引き続き、国が支援している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ オーストラリアは、神経疾患やがんなどの分野で、エクソソームの臨床応用を準備中である。さらにシンガポールは、エクソソームベンチャーが複数立ち上がり、国の支援のもと、がんの診断や、間葉系幹細胞エクソソーム治療の治験を推進している。台湾も積極的にエクソソーム診断と治療を視野に入れた産業化を目指している。</li> </ul>

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

### 関連する他の研究開発領域

・ ナノ医療システム (ナノテク・材料分野 2.2.2)

### 参考・引用文献

- 1) Chargaff E, West R., "The biological significance of the thromboplastic protein of blood", *J. Biol. Chem.* 166, no. 1 (1946) : 189-197.
- 2) R. M. Johnstone, et al., *J. Biol. Chem.* 262, no. 19 (1987) : 9412-9420.
- 3) Valadi, H., et al, "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nat Cell Biol* 9, no. 6 (2007) : 654-9. DOI : 10.1038/ncb1596.

- 4) Schwechheimer, C. & Kuehn, M.J., “Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria : biogenesis and functions”, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) : 605-619.
- 5) Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A., “Through the wall : extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi”, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) : 620-630. DOI : 10.1038/nrmicro3480.
- 6) Mashburn, L.M. & Whiteley, M., “Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote”, *Nature* 437 (2005) : 422-425.
- 7) Biller, S.J. et al., “Bacterial vesicles in marine ecosystems”, *Science* 343, no. 6167 (2014) : 183-186. DOI : 10.1126/science.1243457
- 8) Toyofuku, M. et al., “Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid : Biology, environmental perspectives and applications”, *Adv. Colloid Interface Sci.* 226 (2015) : 65-77. DOI : 10.1016/j.cis.2015.08.013.
- 9) Gujrati, V. et al., “Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy”, *ACS nano* 8, no. 2 (2014) : 1525-1537. DOI : 10.1021/nn405724x.
- 10) Aaron J Cohen et al., “Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution : an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015”, *Lancet*, 389, no. 10082 (2017) : 1907-1918. DOI : 10.1016/S0140-6736 (17) 30505-6.
- 11) Ching-Chang Cho et al., “In Vitro and In Vivo Experimental Studies of PM2.5 on Disease Progression”, *Int J Environ Res Public Health* 15, no. 7 (2018) : 1380. DOI : 10.3390/ijerph15071380.
- 12) Michikawa, T. et al., “Japanese nationwide study on the association between short-term exposure to particulate matter and mortality”, *J Epidemiol* 29 (2019) : 471-477. DOI : 10.2188/jea.JE20180122.
- 13) Qin Li et al., “Association between airborne particulate matter and renal function : An analysis of 2.5 million young adults”, *Environ Int.* 147 (2020) : 106348. DOI : 10.1016/j.envint.2020.106348.
- 14) Zhang H. et al. “Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation”, *Nat Cell Biol* 20, no. 3 (2018) : 332—343. DOI : 10.1038/s41556-018-0040-4.
- 15) Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al., “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) : a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines”, *J Extracell Vesicles* 7, no. 1 (2018) : 1535750. DOI : 10.1080/20013078.2018.1535750.
- 16) Karoliina Stefanius et al., “Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation”, *eLife* 2019;8 : e40226. DOI : 10.7554/eLife.40226.
- 17) Kosaka, N. et al., “Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) -dependent exosomal transfer of

- angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis”, *J. Biol. Chem.* 288, no. 15 (2013) : 10849-59. DOI : 10.1074/jbc.M112.446831.
- 18) Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J. et al., “Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver”, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) : 816-826. DOI : 10.1038/ncb3169.
- 19) Gonçalo Rodrigues et al., “Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis”, *Nat Cell Biol.* 21, no. 11 (2019) : 1403-1412. DOI : 10.1038/s41556-019-0404-4.
- 20) Qi Wu et al., “Tumour-originated exosomal miR-155 triggers cancer-associated cachexia to promote tumour progression”, *Mol Cancer* 17, no. 1 (2018) : 155. DOI : 10.1186/s12943-018-0899-5.
- 21) Kramer-Albers, E. M., and A. F. Hill, “Extracellular vesicles : interneural shuttles of complex messag- es.”, *Curr Opin Neurobiol* 39 (2016) : 101-107. DOI : 10.1016/j.conb.2016.04.016.
- 22) Arenaccio, C. et al., “Exosomes from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) -Infected Cells License Quiescent CD4+ T Lymphocytes To Replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-Dependent Mechanism”, *J. Virol.* 88 (2014) : 11529. DOI : 10.1128/JVI.01712-14.
- 23) Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, and C. Thery, “Exosome secretion : molecular mechanisms and roles in immune responses”, *Traffic* 12, no. 12 (2011) : 1659-68. DOI : 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.
- 24) Akiko Eguchi et al., “Identification of actin network proteins, talin-1 and filamin-A, in circulating extracellular vesicles as blood biomarkers for human myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome”, *Brain Behav Immun.* (2020) : 106-114. DOI : 10.1016/j.bbi.2019.11.015.
- 25) 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.
- 26) Amrita Datta et al., “High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion : A drug repurposing strategy for advanced cancer”, *Sci Rep.* 8, no. 1 (2018) : 8161. DOI : 10.1038/s41598-018-26411-7.
- 27) Fumihiko Urabe et al., “miR-26a regulates extracellular vesicle secretion from prostate cancer cells via targeting SHC4, PFDN4, and CHORDC1”, *Sci Adv.* 6, no. 18 (2020) : eaay3051. DOI : 10.1126/sciadv.aay3051.
- 28) Spees JL, Lee RH, and Gregory CA., “Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function”, *Stem Cell Res Ther.* 7, no. 1 (2016) : 125. DOI : 10.1186/s13287-016-0363-7.
- 29) Yin K, Wang S, and Zhao RC, “Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells : a new therapeutic paradigm”, *Biomark Res.* 2019 7 : 8. DOI : 10.1186/s40364-019-0159-x
- 30) Forsberg Mher al., “Mesenchymal Stromal Cells and Exosomes : Progress and Challenges”, *Front Cell Dev Biol.* 8 (2020) : 665. DOI : 10.3389/fcell.2020.00665

- 31) 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.* 9 (2018) : 530–539. DOI : 10.1007/ s12975-017-0599-2.
- 32) S Ohno et al., “Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells”, *Mol Therapy* 21, no. 1 : 185-191.
- 33) Van Deun, J. et al., “The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling”, *J. Extracell. Vesicles* 3, no. 1 (2014) . DOI : 10.3402/jev.v3.24858.
- 34) Cvjetkovic, A., Lotvall, J. & Lasser, C., “The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles”, *J. Extracell. Vesicles* 3 (2014) . DOI : 10.3402/jev.v3.23111.
- 35) Abramowicz, A., Widlak, P. & Pietrowska, M., “Proteomic analysis of exosomal cargo : the challenge of high purity vesicle isolation”, *Mol. Biosyst.* 12, no. 5 (2016) : 1407-1419. doi : 10.1039/c6mb00082g.
- 36) Momen-Heravi, F. et al., “Current methods for the isolation of extracellular vesicles”, *Biol. Chem.* 394, no. 10 (2013) : 1253-1262. DOI : 10.1515/hsz-2013-0141.
- 37) Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A., “Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids”, *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3.22 (2006) . DOI : 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- 38) Bard, M. P. *et al.*, “Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, no. 1 (2004) : 114-121. DOI : 10.1165/rcmb.2003-0238OC.
- 39) Andre, F. *et al.*, “Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes”, *Lancet* 360 (2002) : 295-305. DOI : 10.1016/S0140-6736 (02) 09552-1.
- 40) Keller, S. et al., “Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics”, *J Transl Med* 9 (2011) : 86. DOI : 10.1186/1479-5876-9-86.
- 41) Lane, R. E. et al., “Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing”, *Sci. Rep.* 5 (2015) : 7659.
- 42) Lobb, R. J. et al., “Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma”, *J. Extracell. Vesicles* 4 (2015) : 27031. DOI : 10.3402/jev.v4.27031.
- 43) Alvarez, M. L. et al., “Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers”, *Kidney Int.* 82, no. 9 (2012) : 1024-1032. DOI : 10.1038/ki.2012.256.
- 44) Paolini, L. et al., “Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity”, *Sci. Rep.* 6 (2016) : 23550. DOI : 10.1038/srep23550 (2016) .
- 45) Gamez-Valero, A. et al., “Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents”, *Sci. Rep.* 6 (2016) : 33641. DOI : 10.1038/srep33641.
- 46) Im, H. et al., “Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-

- plasmonic sensor”, *Nat. Biotechnol.* 32, no. 5, 490-495 (2014) . DOI : 10.1038/nbt.2886.
- 47) Tanaka, Y. et al., “Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma”, *Cancer* 119 (2013) : 1159-1167. DOI : 10.1002/cncr.27895.
- 48) Nordin, J. Z. et al., “Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties”, *Nanomedicine* 11, no. 4 (2015) : 879-883. doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.003.
- 49) Muller, L. et al., “Isolation of biologically-active exosomes from human plasma”, *J. Immunol. Methods* 411 (2014) : 55-65. DOI : 10.1016/j.jim.2014.06.007.
- 50) Baranyai, T. et al., “Isolation of Exosomes from Blood Plasma : Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods”, *PLoS One* 10 (2015) : e0145686
- 51) Boing, A. N. et al., “Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography”, *J. Extracell. Vesicles* 3 (2014) : 23430. DOI : 10.3402/jev.v3.23430.
- 52) Wai, S.N. et al. “Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin”, *Cell* 115, no. 1 (2003) : 25-35. DOI : 10.1016/S0092-8674 (03) 00754-2.
- 53) Domingues, S. & Nielsen, K.M., “Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes”, *Curr. Opin. Microbiol.* 38 (2017) : 16-21. DOI : 10.1016/j.mib.2017.03.012.
- 54) Koeppen, K. et al., “A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles”, *PLoS pathogens* 12 (2016) . DOI : 10.1371/journal.ppat.1005672.
- 55) Toyofuku, M. et al., “Membrane vesicle-mediated bacterial communication”, *ISME J.* 11 (2017) : 1504-1509. DOI : org/10.1038/ismej.2017.13.
- 56) Turnbull, L. et al., “Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms”, *Nat. Commun.* 7 (2016) : 11220. DOI : 10.1038/ncomms11220.
- 57) Toyofuku, M. et al., “Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*”, *Nat Commun* 8, no.1 (2017) : 481. DOI : 10.1038/s41467-017-00492-w.
- 58) Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L., “Types and origins of bacterial membrane vesicles”, *Nature reviews. Microbiology* 17, no. 1 (2019) : 13-24. DOI : 10.1038/s41579-018-0112-2.
- 59) Mateescu B, Kowal EJ, van Balkom BW et al., “Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper”, *J Extracell Vesicles* 6, no. 1 (2017) : 1286095. DOI : 10.1080/20013078.2017.1286095.
- 60) 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.
- 61) Regente, M, et al., “Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth”, *J Exp Bot* 68, no. 20 (2017) : 5485-5495. DOI : 10.1093/jxb/erx355.

- 62) Cai, Q, et al., “Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes”, *Science* 360, no. 6393 (2018) : 1126-1129. DOI : 10.1126/science.aar4142.
- 63) Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al., “Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota”, *Cell Host Microbe* 24, no. 5 (2018) : 637-652. DOI : 10.1016/j.chom.2018.10.001.
- 64) Llorente, A., Skotland, T., Sylvanne, T. et al. “Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells”, *Biochim. Biophys. Acta.* 1831, no. 7 (2012) : 1302-1309. DOI : 10.1016/j.bbailip.2013.04.011.
- 65) Yoshioka, Y., Konishi, Y., Kosaka, N. et al., “Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types”, *J. Extracell. Vesicles* 2 (2013) : 20424. DOI : 10.3402/jev.v2i0.20424.
- 66) Kim, O.Y. et al., “Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon-gamma-mediated antitumor response”, *Nat Commun* 8 (2017) : 626.
- 67) Saumya Das et al., “The Extracellular RNA Communication Consortium : Establishing Foundational Knowledge and Technologies for Extracellular RNA Research”, *Cell.* 177, no. 2 (2019) : 231–242. DOI : 10.1016/j.cell.2019.03.023.
- 68) Cai, Q. et al., “Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes”, *Science* 360, no. 6393 (2018) : 1126-1129. DOI : 10.1126/science.aar4142.
- 69) Resch, U. et al., “A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus”, *MBio* 7 (2016) . DOI : 10.1128/mBio.00207-16.
- 70) Tzipilevich, E., Habusha, M. & Ben-Yehuda, S, “Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors”, *Cell* 168. No. 1-2 (2017) : 186-199 e112. DOI : 10.1016/j.cell.2016.12.003.
- 71) 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. DOI : 10.3389/fmicb.2017.00571.
- 72) Tulkens, J., De Wever, O. & Hendrix, “A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization”, *Nature protocols* 15, no. 1 (2020) : 40-67.
- 73) Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L., “Types and origins of bacterial membrane vesicles”, *Nat Rev Microbiol* 17 (2019) : 13–24.
- 74) Dubey, G.P. & Ben-Yehuda S., “Intercellular nanotubes mediate bacterial communication”, *Cell* 144, no. 4 (2011) : 590-600. DOI : 10.1016/j.cell.2011.01.015.
- 75) Dubey, G.P. et al., “Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes”, *Dev Cell* 36, no. 4 (2016) : 453-461. DOI : 10.1016/j.devcel.2016.01.013.
- 76) Baidya, A.K., Rosenshine, I. & Ben-Yehuda, S., “Donor-delivered cell wall hydrolases facilitate nanotube penetration into recipient bacteria”, *Nat Commun* 11 (2020) : 1938.

## 2.4.3 一細胞オミクス

### (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、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、空間的解析、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)、RNA-seq、ライトシート顕微鏡、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し、複雑なからだを作り出す。細胞はその個数を増やすだけでなく、適切な細胞に分化することで、骨や皮膚、筋肉などの細胞に運命づけられ、新しい機能を獲得する。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、がん化や老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には、個々の細胞を包括的な分子の振る舞いから理解することが必要不可欠である。これまでも分子・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基礎研究としては可能であった。しかし、このような介入は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計測は臓器もしくはディッシュレベルで行われてきた。細胞種に特異的なマーカー因子が同定されている場合は、そのマーカーを用いて細胞を選別する技術も存在する。しかし、多くの細胞種では細胞を選別するマーカーは知られていない。さらに標識された細胞も分化成熟度や老化などの影響で、不均一な細胞集団である。基礎研究だけでなく臨床検査や創薬の観点からも、生命システムの根幹を担う細胞のレベルで、その機能の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個体を構成する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。同じ細胞種であっても分化の成熟度や細胞周期、細胞老化など細胞状態が異なることを考えると細胞種類はさらに増えると考えられている。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、どの遺伝子がどのぐらい機能しているかを調べる必要がある。そのため、ゲノム配列やその変異だけでなく、

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 DNA 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。

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が行われている。それら集団間の分化系譜解析などができるようになった。

一方で、3 次元的に臓器全体がもつすべての細胞を顕微鏡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。創薬においても疾患の原因となる細胞種を直接標的とする創薬を行うことで、副作用が少なく効果の高い薬の開発に繋がる。

### [研究開発の動向]

近年ゲノム科学・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、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変革が起きている。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、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<sup>1)</sup>(SMART-seq)、日本<sup>2)</sup>(Quartz-Seq)、イスラエル<sup>3)</sup>(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。その後、計測できる細胞数を向上させる高出力型と遺伝子領域全長をカバーしようとする完全長型に大別され開発が続いている。高出力型はたくさんの細胞数を観測するかわりに RNA の一部しか配列決定しない。2020 年に後述する Human Cell Atlas 計画の一環で高出力型一細胞 RNA シーケンス法の国際的

性能比較研究が行われた。その結果、理研が開発したQuartz-Seq2が他の手法の1.5-5倍程度の遺伝子検出感度を持ち、細胞分類精度や他のデータの統合可能性などの評価を統合した総合スコアでも他を圧倒した<sup>4)</sup>。

完全長型はRNAの全長を捉えようとするがその分、反応の煩雑さとコストからたくさんの細胞を観測できない。この手法としてはSMART-seq2, SMART-Seq3<sup>5)</sup> が発表され、日本からは非ポリA RNAをも検出できる唯一の手法であるRamDA-seqが理研で開発され東洋紡社からキットが発売されている。また2018年頃からPacBio社やOxford Nanopore社が開発した長鎖DNAシーケンサーを利用し、SMART-seqで得られたDNAをシーケンスする技術<sup>6-8)</sup> が開発された。これにより1分子1細胞レベルの選択的スプライシングの解析が可能になりつつある。

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、マイクロウェルなどを利用する。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った。FACSソーティングを除けば、半導体技術である微細加工を利用して作製されるもので、かつては日本で先行した技術であり研究グラントも多く存在したが、現在利用されているほとんどの技術は海外製である。

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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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と情報技術

一細胞トランスクリプトームは全遺伝子が計測した細胞でどの程度働いているかという表(行列)を出力する。この行列から細胞種類や機能が似ている遺伝子を分類したり、疾患に関わる遺伝子や細胞を発見したりするには、機械学習が必要となる。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<sup>11)</sup>。一細胞トランスクリプトームは、機械学習そのものの研究テーマの題材となり、情報技術の発展にも大きく寄与している。

代表的な技術として、一細胞トランスクリプトームから細胞分化系譜を予測する手法が開発されている。この手法を用いることで細胞の出自から細胞分化の仕組みを理解できる。これにより目的の細胞に分化させる必要のある再生医療などへの応用が期待される。データからの計測ノイズを除く手法、遺伝子同士の関連の予測、データベース中にある類似細胞の検索アルゴリズム<sup>12)</sup>、複数データの統合<sup>13)</sup> など様々な分野で情報科学が用いられている。一方で情報科学者ではないユーザーが最新のアルゴリズムを利用しやすいよう統合解析ソフトウェア<sup>14)</sup> の開発も進んでいる。

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<sup>15)</sup>、神経膠芽腫<sup>16)</sup>、乳がん<sup>17)</sup>、希突起神経膠腫<sup>18)</sup>、白血病<sup>19)</sup>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<sup>20)</sup>。

・一細胞トランスクリプトーム解析と細胞系譜計測法

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ることができれば、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。これまでは顕微鏡観察によって細胞系譜が調べられてきた。例えば、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<sup>21)</sup>などが登場した。

しかしこのような方法は見た目や細胞を標識したDNAだけが計測されるため、1つ1つの細胞の種類やその機能の情報は得られない。そこで顕微鏡観察で得られる画像やDNA標識と同時に1細胞RNAトランスクリプトームが得られる手法が開発されつつある。

1つずつの細胞のゲノム配列にバーコードを付加して、1細胞トランスクリプトームでバーコードとトランスクリプトームを同時に計測する手法として、ゲノム編集型と組み換えタンパク質型が報告されている。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、組織像のような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<sup>22)</sup>。

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。このような空間的関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、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 MARFISH<sup>23)</sup> や seqFISH<sup>24)</sup> 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ィッシュやマウスの胚発生<sup>25)</sup>、心臓組織再生過程<sup>26)</sup>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。SpatialDE<sup>27)</sup> や trendsceek<sup>28)</sup> 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<sup>29)</sup>。

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ブを用いることで、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<sup>23)</sup>。またスライドガラスに RNA を補足するプライマーを約 1,000 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<sup>30)</sup>。2019年に10x Genomics社から空間トランスクリプトームを実施できるキット Visium が発売された。

#### ・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<sup>31)</sup>。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<sup>32)</sup>。

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<sup>33), 34)</sup>、DNase-seq<sup>35)</sup> 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-seq<sup>36)</sup> によって、DNAメチル化修飾を Bisulfite-seq<sup>37), 38)</sup>、5hmC-seq<sup>39)</sup> 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-C<sup>40)</sup> 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<sup>41), 42)</sup>、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-seq<sup>43)</sup>・CRISP-seq<sup>44)</sup>・CROP-seq<sup>45)</sup> 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<sup>43-45)</sup>。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。

#### (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<sup>44), 45)</sup>。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<sup>46)</sup>。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が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<sup>47)</sup>。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)<sup>48)</sup>。本報告では培養細胞のみならず、150 μ m 厚の3D in situ sequencing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<sup>30)</sup>。

###### ・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-seq<sup>49)</sup>、SIDR<sup>50)</sup> 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-seq<sup>51)</sup> 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。

・ 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<sup>52)</sup>。また低発現の遺伝子に対して発現量をリカバーする MAGIC<sup>53)</sup> や SAVER<sup>54)</sup> 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、Seurat<sup>55)</sup> や Scanpy<sup>56)</sup> 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<sup>57)</sup>。1 細胞ゲノム科学は細胞を破碎してしまう。そのため時刻や空間ごとに計測しても 1 細胞として対応づかない。時刻や空間ごとに類似の細胞が含まれており、これを擬似的に同一の細胞系譜として解析できれば、細胞分化や空間的位置を再構築し解析に活かせる。現在、最適輸送問題を利用して異なるデータポイント間の 1 細胞を対応づける手法が開発されつつある<sup>58)</sup>。これらの機械学習のアプローチだけでなく、化学反応モデルを利用したデータ解析手法も開発されている。RNA の転写・分解をモデル化し、1 細胞 RNA-seq で得られた exon, intron の量を学習することで、細胞分化の系譜や速度を予測できる<sup>59)</sup>。

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<sup>60)</sup>、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]**

**【海外】**

・ NIH Common Found, The Single Cell Analysis Program (SCAP)

2012-2017 年に実施された。2018 年より NIH Common Found The Human BioMolecular Atlas (HuBMAP) が、568 万米ドルでスタートした。

・ Human Cell Atlas (HCA)

2017 年、ヒトの全細胞種類を同定する 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。
- ・細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、2020年10月の段階で74ヶ国、1,980名が参加している。

HCAではCOVID-19を踏まえて感染者の末梢血単球細胞など解析をいち早く実施し、実施者会議でその情報を共有している。

#### ・ Chan Zuckerberg Initiative

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、2016年に、10年間6億米ドル以上の規模の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。

#### ・ Platform for Advanced Single Cell Manipulation and Analysis (PASCA)

欧州も、早期の段階から一細胞解析に着目し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<sup>61)</sup>。ドイツ連邦教育研究省 (BMBF) がSingle Cell Omics Germany<sup>62)</sup> 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 PILOT ACTIONS TO BUILD THE FOUNDATIONS OF A HUMAN CELL ATLAS

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300-500万ユーロが予定されている。

#### ・ LifeTime プロジェクト

EUが中心となり100以上の研究機関、80以上の企業が参加し、細胞ベース医療を開発することが目的である。一細胞技術の開発や医療応用に重きをおいておりHCAのメンバーと一部重複がある。

## 【国内】

・JST CREST/ さきがけ「統一細胞解析のための革新的技術基盤」

2014年に立ち上がり、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。2019年度 JST CREST/ さきがけ「多細胞間での時空間的な相互作用の理解を目指した技術・解析基盤の創出」がスタートし、一細胞技術を応用し多細胞生物の定量生物学的な研究プロジェクトが進行している。

・内閣府 ImPACT「セレンディピティの計画的創出」(2014～2018年度)

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た。

その他新学術領域研究「細胞ダイバーシティの統合的解明と制御 (2018年度)」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<sup>63)</sup>。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<sup>64)</sup>。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、シーケンスを用いなくて、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 の深部組織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

1,000 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、1,000 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 1,000 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なると、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<sup>65)</sup> やマウス<sup>66)</sup> 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多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<sup>67)</sup>、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<sup>68)</sup>、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。

(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つ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。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。

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会議を提供する Oxford global<sup>69)</sup> が活動しており、一細胞解析に特化した学会会議も含まれる<sup>70)</sup>。

米国では一細胞オミ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。共同創設者は HCA の代表

者であり、一細胞オミ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。HCAの代表者は大学をやめ Genentech 社の研究開発のトップとして転出した。日本では2018年に理研の1細胞 RNA-seq 技術を元にした Knowledge Palette, Inc. や早稲田大学の1細胞ゲノムシーケンス技術を元にした bitBiome 株式会社などのスタートアップ企業が創立されている。

(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"> <li>一細胞完全長 Total RNA-seq 法 RamDA-seq や高出力・高感度を両立した一細胞 RNA-seq 法 Quartz-Seq2、世界最速の一細胞検索エンジン開発 CellFishing、jl 遺伝子制御ネットワーク予測 SCODE などで世界をリードしている (理研)。また1細胞エピゲノム解析 ChIL-seq で世界をリードしている (九大)。</li> <li>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。</li> <li>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}。</li> <li>理研・宮脇らの Scale 法、理研・今井らの SeeDB 法、東大 / 理研・上田らの CUBIC 法、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、名古屋大・東山らの ClearSee 法、東京理科大・松永らの TOMEI 法など、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、SeeDB 法における超解像度と組み合わせ、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。</li> </ul>
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>横河電機が一細胞イメージング &amp; 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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ul>

2.4

俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ シングルセル解析の技術・応用が飛躍的に進展</li> <li>・ 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大)。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。</li> <li>・ 一細胞トランスクリプトームの解析環境 Seurat がデファクトスタンダードになりつつある (NYU)</li> <li>・ 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。</li> <li>・ ヒト/マウス一細胞発現アトラス (CZI BioHub) がある。</li> <li>・ CLARITY、SWITCH、iDISCO、Ce3D 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)、ライトシート顕微鏡開発、Expansion microscopy法開発、in situ sequencing 開発</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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 代表者の一細胞オミクス技術を利用した創薬スタートアップ Celsius Therapeutic が 65Mドルを確保</li> <li>・ 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</li> <li>・ 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)</li> <li>・ iDISCO ベースの脳神経活動データベース化と起業化 (Certaera アメリカ)</li> <li>・ 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</li> </ul>
欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ SMARTer 法による一細胞 RNA-seq の開発でリード</li> <li>・ 英国 (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</li> <li>・ 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</li> <li>・ 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、脊髄疾患モデルやウイルスラベル脳への応用例、2,2'-チオジエタノールを使用した透明化法、ヒト 3次元病理開発、ライトシート顕微鏡開発と透明化組織への応用</li> <li>・ Spatial Transcriptomics による組織からの空間的遺伝子発現解析</li> <li>・ 画像解析ツールの開発 (ilastik, Icy, TeraStitcher, BigStitcher, BigDataViewer, CARE 等)</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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)</li> <li>・ 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)</li> </ul>

中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表論文は玉石混合だが数的に急激に増加している。</li> <li>・ 世界的に利用されている技術は少ない。</li> <li>・ 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</li> <li>・ Scale/SeeDB/CUBIC 派生プロトコル (FLUIT 法、UbasM法) の報告</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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)</li> <li>・ 欧米、日本に比べて倫理的規制が低く、ヒト臨床サンプルを用いた大胆な研究が行われている。</li> </ul>
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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)</li> <li>・ CLARITY 派生プロトコル (ACT-PRESTO 法他) の報告</li> <li>・ 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</li> </ul>
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ CLARITY 専用機の商品化 X-CLARITY システム (Logos Biosystems アメリカ・韓国)</li> </ul>

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

### 参考・引用文献

- 1) D. Ramsköld et al., "Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells", *Nat Biotech* 30, no. 8 (2012) : 777-782. doi : 10.1038/nbt.2282
- 2) Y. Sasagawa et al., "Quartz-Seq : a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity", *Genome Biol.* 14, no. 4 (2013) : R31. doi : 10.1186/gb-2013-14-4-r31
- 3) T. Hashimshony et al., "CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification", *Cell Rep* 2, no. 3 (2012) : 666-673. doi : 10.1016/j.celrep.2012.08.003
- 4) Mereu E, Lafzi A, Moutinho C, et al. Benchmarking Single-Cell RNA Sequencing Protocols for Cell Atlas Projects Nature Biotechnology (2020)
- 5) Hagemann-Jensen, M. et al. Nat. Biotechnol. 38, 708-714 (2020)

- 6) Gupta I. et al. *Nature Biotechnology* volume 36, pages1197-1202 (2018)
- 7) Singh M. *Nature Communications* volume 10, Article number: 3120 (2019)
- 8) Volden R. et al. *PNAS* September 25, 2018 115 (39) 9726-9731
- 9) M. Hulsmans et al., “Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart”, *Cell* 169, no. 3 (2017) : 510-522. doi : 10.1016/j.cell.2017.03.050
- 10) S. Nomura et al., “Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 4435. doi : 10.1038/s41467-018-06639-7
- 11) L. Zappia, B. Phipson and A. Oshlack, “Exploring the single-cell RNA-seq analysis landscape with the scRNA-tools database”, *PLoS Comput. Biol.* 14, no. 6 (2018) : e1006245. doi : 10.1371/journal.pcbi.1006245
- 12) Kiselev VY et al. *Nat Methods*.2018 May;15 (5) :359-362., Sato K. et al. *Genome Biology* volume 20, Article number: 31 (2019)
- 13) Stuart et al., *Cell* 177, 1888–1902 June 13, 2019
- 14) Butler et al *Nature Biotechnology* volume 36, pages411–420 (2018)
- 15) I. Tirosh et al., “Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq”, *Science* 352, no. 6282 (2016) : 189-196. doi : 10.1126/science.aad0501
- 16) A. P. Patel et al., “Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma”, *Science* 344, no. 6190 (2014) : 1396-1401. doi : 10.1126/science.1254257
- 17) R. Gao et al., “Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple- negative breast cancer”, *Nat. Genet.* 48, no. 10 (2016) : 1119-1130. doi : 10.1038/ng.3641
- 18) J. Wang et al., “Clonal evolution of glioblastoma under therapy”, *Nat. Genet.* 48, no. 7 (2016) : 768-776. doi : 10.1038/ng.3590
- 19) S. Li et al., “Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia”, *Nat. Med.* 22, no. 7 (2016) : 792-799. doi : 10.1038/nm.4125
- 20) I. Tirosh et al., “Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma”, *Nature* 539, no. 7628 (2016) : 309-313. doi : 10.1038/nature20123
- 21) A. McKenna et al., “Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing”, *Science* 353, no. 6298 (2016) : aaf7907. doi : 10.1126/science.aaf7907
- 22) K. L. Frieda et al., “Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells”, *Nature* 541, no. 7635 (2017) : 107-111. doi : 10.1038/nature20777
- 23) K. H. Chen et al., “RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells”, *Science* 348, no. 6233 (2015) : aaa6090. doi : 10.1126/science.aaa6090
- 24) S. Shah et al., “In Situ Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus”, *Neuron* 92, no. 2 (2016) : 342–357. doi : 10.1016/j.neuron.2016.10.001
- 25) J. P. Junker et al., “Genome-wide RNA Tomography in the zebrafish embryo”, *Cell* 159, no. 3 (2014) : 662-675. doi : 10.1016/j.cell.2014.09.038

- 26) C. -C. Wu et al., “Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration”, *Dev. Cell* 36, no. 1 (2016) : 36-49. doi : 10.1016/j.devcel.2015.12.010
- 27) V. Svensson, S. A. Teichmann and O. Stegle, “SpatialDE : identification of spatially variable genes”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 343-346. doi : 10.1038/nmeth.4636
- 28) D. Edsgård, P. Johnsson and R. Sandberg, “Identification of spatial expression trends in single-cell gene expression data”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 339-342. doi : 10.1038/nmeth.4634
- 29) R. Satija et al., “Spatial reconstruction of single-cell gene expression data”, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) : 495-502. doi : 10.1038/nbt.3192, K. Achim et al., “High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 5 (2015) : 503-509. doi : 10.1038/nbt.3209
- 30) P. L. Ståhl et al., “Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics”, *Science* 353, no. 6294 (2016) : 78-82. doi : 10.1126/science.aaf2403
- 31) Y. Luo et al., “Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1175-1186. doi : 10.1016/j.cell.2015.04.001
- 32) F. Paul et al., “Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors”, *Cell* 163, no. 7 (2015) : 1663-1677. doi : 10.1016/j.cell.2015.11.013
- 33) J. D. Buenrostro et al., “Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation”, *Nature* 523, no. 7561 (2015) : 486-490. doi : 10.1038/nature14590
- 34) D. A. Cusanovich et al., “Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing”, *Science* 348, no. 6237 (2015) : 910-914. doi : 10.1126/science.aab1601
- 35) W. Jin et al., “Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples”, *Nature* 528 (2015) : 142-146. doi : 10.1038/nature15740
- 36) A. Rotem et al., “Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 11 (2015) : 1165-1172. doi : 10.1038/nbt.3383
- 37) S. A. Smallwood et al., “Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity”, *Nature Methods* 11, no. 8 (2014) : 817-820. doi : 10.1038/nmeth.3035
- 38) M. Farlik et al., “Single-cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics”, *Cell Rep.* 10, no. 8 (2015) : 1386-1397. doi : 10.1016/j.celrep.2015.02.001
- 39) D. Mooijman et al., “Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 8 (2016) : 852-856. doi : 10.1038/nbt.3598
- 40) T. Nagano et al., “Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell”, *Nat. Protoc.* 10, no. 12 (2015) : 1986-2003. doi : 10.1038/nprot.2015.127

- 41) C. Angermueller et al., “Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity”, *Nat. Methods* 13 (2016) : 229-232. doi : 10.1038/nmeth.3728
- 42) I. C. Macaulay et al., “G&T-seq : parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes”, *Nat. Methods* 12, no. 6 (2015) : 519-525. doi : 10.1038/nmeth.3370
- 43) A. Dixit et al., “Perturb-Seq : Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens”, *Cell* 167, no. 7 (2016) : 1853-1866.e17. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.038
- 44) D. A. Jaitin et al., “Dissecting Immune Circuits by Linking CRISPR-Pooled Screens with Single-Cell RNA-Seq”, *Cell* 167, no. 7 (2016) : 1883-1896.e15. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.039
- 45) P. Datlinger et al., “Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout”, *Nat. Methods* 14 (2017) : 297-301. doi : 10.1038/nmeth.4177
- 46) M. Stoeckius et al., “Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells”, *Nat. Methods* 14, no. 9 (2017) : 865-868. doi : 10.1038/nmeth.4380
- 47) A. Q. Sofia et al., “Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 744-757.e24. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.024
- 48) X. Wang et al., “Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states”, *Science* 361, no. 6400 (2018) : eaat5691. doi : 10.1126/science.aat5691
- 49) I. C. Macaulay et al., “Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq”, *Nat. Protoc.* 11, no. 11 (2016) : 2081-2103. doi : 10.1038/nprot.2016.138
- 50) K. Y. Han et al., “SIDR : simultaneous isolation and parallel sequencing of genomic DNA and total RNA from single cells”, *Genome Res.* 28 (2018) : 75-87. doi : 10.1101/gr.223263.117
- 51) S. J. Clark et al., “scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 781. doi : 10.1038/s41467-018-03149-4
- 52) L. Haghverdi et al., “Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 5 (2018) : 421-427. doi : 10.1038/nbt.4091
- 53) D. van Dijk et al., “Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 716-729. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.061
- 54) M. Huang et al., “SAVER : gene expression recovery for single-cell RNA sequencing”, *Nat. Methods* 15 (2018) : 539-542. doi : 10.1038/s41592-018-0033-z
- 55) A. Butler et al., “Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 5 (2018) : 411-420. doi : 10.1038/nbt.4096
- 56) F. A. Wolf, P. Angerer and F. J. Theis, “SCANPY : large-scale single-cell gene expression data analysis”, *Genome Biol.* 19 (2018) : 15. doi : 10.1186/s13059-017-1382-0
- 57) L. McInnes, J. Healy and J. Melville, “UMAP : Uniform Manifold Approximation and

- Projection for Dimension Reduction”, *arXiv* (2018) : 1802.03426v1. <https://arxiv.org/abs/1802.03426> (2021年2月1日アクセス)
- 58) Schiebinger G. et al. *Cell*. 2019 Feb 7;176 (4) :928-943.e22
- 59) La Manno G. et al. *Nature* volume 560, pages494-498 (2018)
- 60) BBSRC Strategic Review of Bioimaging 2018
- 61) <https://www.ebi.ac.uk/about/news/press-releases/single-cell-centre> (2021年2月1日アクセス)
- 62) <http://icb-scog.helmholtz-muenchen.de/> (2021年2月1日アクセス)
- 63) T. Hayashi et al., “Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs”, *Nat Commun* 9, no. 1 (2018) : 619. doi : 10.1038/s41467-018-02866-0
- 64) V. Davalos, S. Blanco and M. Esteller, “SnapShot : Messenger RNA Modifications”, *Cell* 174, no. 2 (2018) : 498–498.e1. doi : 10.1016/j.cell.2018.06.046
- 65) A. Sebé-Pedrós et al., “Cnidarian Cell Type Diversity and Regulation Revealed by Whole-Organism Single-Cell RNA-Seq”, *Cell* 173, no. 6 (2018) : 1520-1534. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.019
- 66) X. Han et al., “Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq”, *Cell* 172, no. 5 (2018) : 1091-1107. doi : 10.1016/j.cell.2018.02.001
- 67) C. Kim et al., “Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing”, *Cell* 173, no. 4 (2018) : 879-893. doi : 10.1016/j.cell.2018.03.041
- 68) B. B. Lake et al., “Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain”, *Science* 352, no. 6293 (2016) : 1586-1590. doi : 10.1126/science.aaf1204
- 69) <https://www.oxfordglobal.co.uk/> (2021年2月1日アクセス)
- 70) <https://www.oxfordglobal.co.uk/singlecell-congress/> (2021年2月1日アクセス)

## 2.4

## 2.4.4 ゲノム編集・エピゲノム編集

### (1) 研究開発領域の定義

ゲノム編集 (Genome Editing) は、微生物から動物、植物まで技術の適用生物種が広いこと、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。近年 DNA 切断による編集のみならず、DNA 修飾タンパク質などの機能ドメインの導入による配列特異的な修飾や標識など新たな技術開発も進展している。特に、DNA やヒストンの修飾酵素のドメインを連結することによって特異的にエピゲノム情報を改変する技術としてエピゲノム編集 (Epigenome Editing) が注目されている。

### (2) キーワード

ゲノム編集ツール、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、塩基編集、RNA 編集、エピゲノム編集、微生物菌株育種、品種改良、疾患モデル、ゲノム編集治療、CRISPR 診断

### (3) 研究開発領域の概要

#### [本領域の意義]

ゲノム編集は、人工の DNA 切断酵素 (ゲノム編集ツール) を用いて標的遺伝子に塩基配列特異的な DNA 二本鎖切断 (Double-Strand Break: DSB) 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。ゲノム編集の新たな手法を開発した、ドイツと米国の研究者 2 人が 2020 年のノーベル化学賞に選ばれている。

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。ゲノムを自在に改変することが可能になれば、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全ての生物種を対象として可能にする技術である。実際、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、様々な生物を対象として遺伝子改変を行うことが現実となった。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・植物まで様々な生物種を対象として世界中から報告されており、生命現象の解明を目的とした基礎研究から応用研究まで幅広い展開が期待されている。応用研究としては、機能性物質を効率的に産生する微生物 (微細藻類など) の育種や農水畜産物の品種改良への適用が進んでいる。また医学分野では、iPS 細胞や免疫 T 細胞等を用いた細胞療法、デリバリー技術を伴う遺伝性疾患の治療などへの応用が始まっている。

DNA を切断する技術に加えて、ゲノム編集の基盤となる DNA 塩基配列の特異的な認識・結合システムを活用した技術開発も盛んである。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いる。特に、狙った遺伝子座でのエピゲノム (DNA やヒストンのメチル化やアセチル化修飾) の改変、DNA 標識などへの利用が精力的に行われている。また、CRISPR 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、疾患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】

ゲノム編集ツールとしては、DNAに特異的に結合するZinc-finger ドメインまたはTranscription activator-like effector タンパク質由来のドメインを制限酵素 *FokI* のDNA切断ドメインと連結させたキメラタンパク質としてZFN (Zinc finger nuclease)、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) が開発された。TALENの開発によってオフターゲット (目的以外のDNAの切断) の問題は大きく改善されたが、標的塩基配列ごとにタンパク質の作製が必要なうえ、作製方法が多段階で複雑であった。2012年に新しいゲノム編集ツールとしてCRISPR-Cas9が報告され、世界中でゲノム編集技術の利用が一気に広がった<sup>1)</sup>。ZFNやTALENがDNA認識ドメインとしてDNA結合タンパク質を用いたのに対し、CRISPR-Cas9は短鎖RNA (gRNA) をガイドとしてDNA配列を認識するため、gRNAとCas9タンパク質を導入するだけでゲノム配列を改変することができるようになり、その簡便さと効率の高さから多くの研究者に衝撃を与え、汎用的なゲノム編集ツールとなった。

CRISPR-Cas9では標的配列にPAM (Protospacer adjacent motif) 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の立体構造情報をもとにしたアミノ酸改変によって、PAM配列の特異性を変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た。また、新しいCasタンパク質の探索も精力的に進められており、Cas12 (Cpf1) 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搭載しやすいゲノム編集ツールとして注目されている<sup>2)</sup>。Cas12によるDNA二重鎖切断は、Cas9のようなblunt endではなくsticky endになるため、ドナーDNAの挿入を一方向に限定できるという特徴を持つ。さらに小型のCas14やCasX、CasΦなどが米国ブロード研究所とカリフォルニア大学バークレー校によって報告されており、CRISPRΦは最もコンパクトなCasタンパク質として期待されている<sup>3)</sup>。また、オフターゲット問題を改善するものとして、切断特異性を高めたCRISPR-Cas9 (HiFi-Cas9) が発表されている<sup>4)</sup>。

国内では東京大学の濡木らによって開発されたSpCas9-NGでは、これまでのSpCas9のPAM (5'-NGG-3') が5'-NG-3'に改良され、標的配列の制限がほぼなくなった<sup>5)</sup>。また、東京大学の真下らからCRISPR-Cas3による国産のゲノム編集ツールが報告された<sup>6)</sup>。CRISPR-Cas3は、DNA認識配列が27bpと長い (CRISPR-Cas9は20bp)、切断の特異性が高いと同時にDNAを大きく削ることも長けており、大規模ゲノム欠失を起こす、安全性が高いゲノム編集ツールとして期待されている。

これらゲノム編集ツールは、基本的に二本鎖切断DSBに依存しており、非相同末端修復によるノックアウト、相同組換え修復によるノックインが可能ではあるが、その効率や割合を予測・制御することは困難である。そこでDNA切断活性を失活させたdCas9 (あるいはnCas9) を利用して一塩基置換酵素と結合させることにより、ゲノムを切らずに一塩基置換するBase editor (米国)<sup>7)</sup>、Target-AID (日本)<sup>8)</sup> が開発された。

さらにnCas9と逆転写酵素を組み合わせ、gRNAにコードされた鋳型配列 (数十塩基程度) を直接ゲノムに書き込むプライム編集が報告された<sup>9)</sup>。CRISPRシステムを伴うトランスポゼースCASTとdCas12、あるいはクラス1のCascadeと協働させることで、欠失変異の起こらない長鎖DNAノックインも報告されている<sup>10), 11)</sup>。これらゲノム編集技術はDSBを伴わないより安全かつより正確な技術として、特に遺伝子治療などへの利用が期待されている。

エピゲノムは、DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御によって、様々な生命現象に関与する重要なシステムである。ゲノム編集は塩基配列を書き換える不可逆的な改変だが、可逆的に遺伝子の発現だけを制御するエピゲノム編集の技術開発が急速に進められている。dCas9に転写活性化因子VP64や抑制因子KRABなどを融合して、標的遺伝子の転写量を制御するCRISPR activation (活性化) やCRISPR

interference (抑制) が報告されている<sup>12), 13)</sup>。最近では内在性の転写制御因子を dCas9 へ集積、転用する方法も開発されている<sup>14)</sup>。また、dCas9 に DNA メチル化やヒストン修飾を制御する酵素を連結して、標的遺伝子の発現を制御する技術も開発されている<sup>15)</sup>。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、VPR システムがあり、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を実現している。さらに、SAM と SunTag を組み合わせた TREE システムにより複数種類の因子を集積することも可能となっている。

CRISPR-Cas13 は、一本鎖 RNA に配列特異的に結合して、切断する。この性質を利用して、ヒト細胞で標的遺伝子の mRNA をノックダウンできる<sup>16)</sup>。さらに、ヌクレアーゼ活性を欠失した dCas13 と RNA 変換酵素 ADAR を融合させることで、RNA 一塩基置換 REPAIR が報告された<sup>17)</sup>。さらに内在性の RNA 変換酵素を標的 RNA に誘導する、RNA オフターゲット編集がほとんどない究極の RNA 編集も発表されている<sup>18)</sup>。RNA 編集はゲノム編集に比べて効果が一過性である。

動物を対象にしたゲノム編集には体外 (ex vivo) 法と体内 (in vivo) 法がある。例えば、ヒトの造血幹細胞またはリンパ球が標的の場合、細胞を体外に取り出して編集する体外法を適用できる。一方、神経細胞、肝細胞、骨格筋を標的にしてゲノム編集する場合は体内法が適する。ゲノム編集ツールの導入は、体外法ではエレクトロポレーション法によってヌクレアーゼタンパク質を導入し、体内法では AAV ベクターを用いてヌクレアーゼ遺伝子を導入するのが主流である<sup>19)</sup>。疾患モデル動物の治療などにおいて、ヌクレアーゼのデリバリーを遺伝子でなくタンパク質 (具体的には、Cas9 タンパク質と gRNA の複合体) の形で行うことが近年注目を集めている。動物体内で異種タンパク質 Cas9 が発現し続けると、Cas9 に対する免疫反応が惹起され、その発現細胞は免疫拒絶されることが想定され、標的以外の DNA を切断するオフターゲットのリスクが高まるかもしれない。各種導入法による Cas9 の細胞内残存時間を比べると「AAV>mRNA>タンパク質」となる。Cas9 の発現をなるべく短期間で済ませるという観点からはタンパク質の形での導入が最もよいといえる。タンパク質導入法としてはエレクトロポレーションが一般的であるが、最近、レンチウイルスベクター外殻を使ってヌクレアーゼタンパク質を運ぶベクターが開発された<sup>20)</sup>。

植物においては (作物の品種改良等)、アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え技術によって、一旦ヌクレアーゼ遺伝子をゲノム DNA 中に挿入するのが一般的であるが、発現カセットを除くためには戻し交雑が必要となり煩雑である。そのため、ヌクレアーゼタンパク質をプロトプラスト (細胞壁を除いたもの) に導入する方法によって、遺伝子組換え体を経ることなく新品種を作出する方法が開発されている<sup>21)</sup>。

ヌクレアーゼによる DNA 切断部位に遺伝子を導入する遺伝子ノックイン技術としては、広島大学が開発した 20 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<sup>22)</sup> や 大阪大学が開発した ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide) を介して長鎖 DNA を挿入する 2H2OP 法<sup>23)</sup> などが知られている。また、理研と米国・ソーク研究所は、NHEJ (non-homologous end joining) 修復経路を利用した効率的かつ正確な HITI 法を開発している<sup>24)</sup>。この手法は相同組換え活性が低い非分裂細胞においては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 システムによる培養細胞での同時複数遺伝子座へのノックインが報告されている<sup>25)</sup>。

ゲノム編集技術の応用という観点では、以下のような動きが見られる。

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指向した研究開発が進められている。

これらの分野では、CRISPR-Cas9によって改変のPOC検証を行いつつ、産業向けに使いやすいゲノム編集ツール（使用料が比較的安価）に置き換える傾向が見られる。

農業におけるゲノム編集の応用としては、米国ではCRISPR-Cas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。さらに、オレイン酸を豊富に含む大豆がTALENを使って作出され、商業利用されている。中国でもゲノム編集を用いた育種が積極的に進められている。農作物に加えて、ブタ、ウシ、家禽における耐病性付与を指向した育種が世界中で進められている。遺伝子ノックアウトにより新しい品種を作出する動きは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。米国農務省はゲノム編集によって遺伝子機能を失わせた場合には遺伝子組換え作物に相当せず、規制は必要ないとの見解を示した。一方、EU最高裁判所は通常の遺伝子組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。日本では、ゲノム編集によって生じた欠失変異については、ゲノム編集ツールの発現に使われた導入核酸が残存していないことが証明できれば、遺伝子組換え生物から除外できることが示されている。

遺伝性疾患の治療に向けた研究が欧米や中国を中心に進められている。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。

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。最近、米国を中心にCRISPRを使ったレーバー先天性黒内障の臨床試験が開始された。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（PD-1など）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されている。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が、CAR-T細胞やTCR-T細胞を、ゲノム編集を用いて作製する取り組みが進行している。

ヒト受精卵でのゲノム編集の基礎研究は、中国、英国、米国を中心に進められている。中国で3倍体の受精胚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。ヒト受精卵でのゲノム編集を臨床応用することは、中国の事件があったため、世界的に禁止することが確認されている。しかしながら、ロシアの研究者がCRISPR-Cas9を利用したゲノム編集ベビーを作製する計画を発表するなど注意が必要である。日本では、文部科学省からヒト受精胚にゲノム編集技術等を用いる研究に関して、「ヒト受精胚に遺伝情報改変技術等を用いる研究に関する倫理指針」が制定され、基礎研究目的については審査を経て研究することを認める方針を示している。

CRISPRに関連した注目技術としてCRISPR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ガイドRNA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が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。この方法は、様々な生命現象の解明に貢献すると期待され、創薬のターゲット因子スクリーニングでは複数の因子を同時に絞り込むことも可能である。

CRISPR-Casシステムは、環境中の核酸検出にも利用可能であることが示されている。Cas13は標的RNAに結合して、蛍光レポーターRNAを切断、検出することができる（SHERLOCK）<sup>26</sup>。Cas12はDNAに結

合して非特異的に一本鎖DNAを切断する (DETECTR)<sup>27)</sup>。日本からは同様にCas3を利用したCONANが報告されている<sup>28)</sup>。これらCRISPR診断技術は、新型コロナウイルスの迅速診断技術POCTとして開発が進められている。

#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

###### ・ゲノム編集ツールの新規開発

CRISPR-Cas9が現在広く使われているが、PAM配列の制限や特異性、ベクターを利用する際のサイズの問題などが指摘されている。そこでCas9と異なる新しいCasヌクレアーゼの開発が世界中で進行している。最近、米国からはほぼPAM配列に依存しないSpRY-Cas9が報告された<sup>29)</sup>。Doudnaらのグループからはメタゲノム解析で見つかった小型のCasΦによるゲノム編集が報告された<sup>3)</sup>。日本からはCas9特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3によるゲノム編集が報告された<sup>6)</sup>。

###### ・DSBを介さない安全で正確なゲノム編集

ゲノム編集によるDSBは目的以外のDNA切断が避けられない。そこでDSBを伴わないゲノム編集が開発されている。一塩基置換酵素Base editor、Target AIDに続き、nCAs9に逆転写酵素を連結させることにより、DNAの標的部位に設計した遺伝情報を直接書き込む新たなゲノム編集法Prime editorが開発された<sup>9)</sup>。さらに、CRISPR-CasシステムとトランスポザラーゼCASTの協働<sup>10)</sup>やタイプI Cascadeとの協働<sup>11)</sup>により、DSBなしでドナーDNAを標的ゲノムに挿入可能にした。

###### ・エピゲノム編集

エピゲノム編集は、転写調節領域への結合・制御やゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾を超えて、内在性の転写制御因子をゲノム領域に集積・転用する方法が開発されている<sup>14), 30)</sup>。ソーク研究所はmdx欠損DMDモデルマウスにおいてユートロフィン増強発現により病態改善に成功し<sup>31)</sup>、筋ジストロフィーモデルマウスでは、ラミニン相同遺伝子の活性化による病態改善に成功した<sup>32)</sup>。脆弱X症候群患者由来iPS細胞において脱メチル化によるFMR1遺伝子のエピゲノム編集治療を報告している<sup>33)</sup>。

###### ・RNA編集

タイプVI CRISPR-Cas13を利用したヒト/植物細胞でのRNAノックダウン、RNA一塩基置換が進められている。中国では疾患モデルマウスにおいてCas13d/CasRxによりグリア細胞を神経細胞にリプログラムすることで神経細胞の修復に成功している<sup>34)</sup>。さらにシンプルに、RNAにより内在性ADARを標的部位に集積することで、CRISPRを使わないRNA編集も報告された<sup>35)</sup>。

###### ・CRISPR診断 (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注目されている。臨床現場で特殊な装置を必要とせず、血液や尿に含まれるウイルスや細菌を短時間、高感度に検出するPOCT技術として利用される。米国からCas12を使ったDETECTR<sup>27)</sup>、Cas13のSHERLOCK<sup>26)</sup>、日本からはCas3を利用したCONANが報告されている<sup>28)</sup>。これらのCRISPR検査法はPCR検査法とほぼ同等のCOVID-19検出感度をもち、新たな新型コロナウイルス迅速診断技術として期待されている。

#### ・ゲノム編集による遺伝子治療

ゲノム編集治療はヌクレアーゼを用いる点が従来の遺伝子治療と異なる。ゲノム編集治療はヌクレアーゼを用いてゲノム部位特異的な遺伝子ノックアウトとノックインを実現できる。

遺伝子ノックアウト治療の世界初の実施例は、米国におけるAIDSに対するものであった。体外に取り出したAIDS患者リンパ球のHIVコレセプターCCR5遺伝子をZFNで破壊し（ZFNのデリバリーはアデノウイルスベクターを使用）、そのリンパ球を患者に戻した。治療後、リンパ球の増加が報告された<sup>36)</sup>。

遺伝子ノックイン治療の世界初の実施例は、2018年サンガモ・セラピューティクス社がZFNを利用して行ったムコ多糖症に対するものであった。AAVベクターを用いて、正常遺伝子を肝細胞のアルブミン遺伝子プロモーター下流に導入し、導入遺伝子の大量発現を狙った。2019年の中間報告によると有効性は確認されず、最大用量のベクターを投与された患者で免疫性肝炎の発症が見られたという。何に対する免疫反応が明らかにされていないが、AAVベクター自体が抗原となって免疫性肝炎を発症した可能性の他、ZFNを抗原とする免疫性肝炎の可能性があり、ヌクレアーゼの免疫原性が問題になりそうである。また、CRISPR-Cas9を用いたレーバー先天性黒内障の臨床試験が米国を中心に開始された。

#### ・ゲノム編集食品

ゲノム編集技術により遺伝子ノックアウトした品種改良は実用化段階にある。筑波大学はGABAを通常のトマトの約15倍多く含むトマトを開発した。農研機構は収量の多いイネを開発した。近畿大学と京都大学は筋肉量の多いマダイを開発した。ただ、これらはまだ上市・流通されていない。

#### ・その他

抗生剤濫用による耐性菌増加問題に対して、自治医科大学はCRISPR-Cas13aをバクテリオファージに搭載し、特定の遺伝子を持つ細菌を狙い撃ちでき人間に無害な新しい殺菌技術を開発した<sup>37)</sup>。米国ではCRISPR-Cas9によってステロイド受容体をノックアウトしてステロイド抵抗性に改変した殺ウイルスTリンパ球が作成された<sup>38)</sup>。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

#### ・戦略的イノベーション創造プロジェクト(SIP第2期、2019～2023年度)

府省連携SIP「スマートバイオ産業・農業基盤技術」として、2014年度から農水畜産物のゲノム編集技術開発、標的遺伝子探索、有用品種作出、社会実装の検討が行なわれた。第2期プロジェクトとして、複数形質の同時改変によるゲノム編集農作物の開発、DNAの精密な書き換えを可能とするゲノム編集技術の開発等が行なわれている。

#### ・AMED先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業(2019～2023年度)

立体構造解析からCas9のコンパクト化、高活性化、PAM改変などが実施され、デリバリー技術を中心サービスとしたモダリス株式会社(2020年にIPO)を生み出した、革新的バイオ(2014～2019年度)の次期開発事業プロジェクト。安全な遺伝子治療を目指した万能塩基編集ツールの創出、次世代CAR-T細胞療法の開発など遺伝子治療に向けた研究開発が主体。

・ NEDO スマートセルプロジェクト (2016～2020年度)

遺伝子設計に必要な大規模生物情報の高速取得システム、細胞内プロセス設計、国産のゲノム編集技術、植物の育種や生育を制御する技術などを研究開発している。核酸結合ドメインである PPRモチーフを利用した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。徳島大学の刑部によりクラス1の新しい技術としてTiDが開発された。

・ 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、2016～2020年度)

産学連携研究のコンソーシアムを形成し、ゲノム編集基礎技術開発、微生物での改変、動物や植物での改変などのテーマを設定し、効率的な技術開発を目指すと同時に、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。広島大学のPlatinum TALEN技術をベースにしたプラチナバイオ社が設立され、本プロジェクトに参加した。

・ NIH Somatic Cell Genome editing (SCGE) (1億9,000万ドル)(米国)

体細胞治療実現に向けて必要な各技術の開発。

・ DAPRA Safe Gene (6,500万ドル)(米国)

Gene driveなど、安全保障の側面が強い研究開発が進められている。

・ HORIZEN2020 (欧州)

Improving Genome Editing Efficiency (IMGENE)として、2017年から5年間のCRISPRゲノム編集研究が産学連携で進められている。

ゲノム編集技術研究の軸足は大学から企業に移りつつあり、米国ではゲノム編集によりオレイン酸を多く含む大豆が世界初のゲノム編集食品として上市されている。医療分野では、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。塩基編集を基盤技術として2018年に設立されたビーム・セラピューティクス社は、2019年に米ナスダック市場に新規上場(IPO)を果たした。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。

ZFNを用いたゲノム編集治療では、AIDSに対する世界初の実施例が発表されてから既に数年が経過した。CRISPR-Cas9を用いた治療では、CRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するクリスパー・セラピューティクス社が2019年11月、遺伝性血液疾患(ベータサラセミアと鎌状赤血球症)に対して治験を実施中である。クリスパー・セラピューティクス社と同じくCRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するエディタス・メディシン社が2019年8月遺伝性の眼疾患患者の治験を行なうための患者の募集開始を発表した。この治験はCRISPR-Cas9を用いた*in vivo*ゲノム編集治療としては世界初となる見込みである。ゲノム編集技術のCAR-T細胞療法への応用も早晚始まるだろうと思われる。

(5) 科学技術的課題

ゲノム編集技術に関する課題は複数あげられるが、まずは、国産ゲノム編集ツールの開発が重要である。日本からはCas9特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3によるゲノム編集が報告された<sup>6)</sup>。しかしながら効

率、改変体、小型化、*in vivo*ゲノム編集などの点では、長年研究が重ねられてきたクラス2のCas9、Cas12より遅れている。今後も国内プロジェクトにおいて基盤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。

今後、遺伝子治療などに利用されるためには、オフターゲット変異を起こさない、より安全、より正確なゲノム編集技術が必要である。この部分でも日本は米中に後れを取っている。特に米国では、ゲノムを切断しない編集、Base Editor, Prime Editor, Casトランスポゾンなどさまざまなゲノム編集技術が登場している。また、標的遺伝子の転写調節領域に結合することで遺伝子発現を調節したり、ゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾によるエピゲノム編集が進められており、すでに前臨床段階におけるモデル動物でのエピゲノム編集治療が報告されている。日本でもTarget-AIDやDNA脱メチル化編集が報告されているが、エピゲノム編集分野におけるさらなる研究開発が必要である。

さらにゲノム編集を止める技術も必要になるだろう。細菌の免疫系であるCRISPR-Casシステムに対抗するためにファージがCas活性を阻害するタンパク質としてAnti-CRISPR (Acr) が発見された<sup>39)</sup>。Acrは、CRISPR-Casの3段階の免疫応答（獲得、発現、阻害）のそれぞれを阻害し、またCRISPRのタイプごとに異なるため、たくさんの種類（約2500候補遺伝子）が存在する<sup>40)</sup>。実際にAcrタンパクを使って、細胞、植物、動物でゲノム編集の制御可能であることが報告されている。別の方法としては、光や化学物質によるゲノム編集/エピゲノム編集制御技術の開発も進められている。基礎研究から応用研究、遺伝子治療まで、これらゲノム編集制御技術が必要とされている。

ゲノム編集を利用した一塩基置換や数十塩基挿入、相同組換えを利用したノックインの効率化、実用化が進められ、より効率的、より正確なゲノム編集ができるようになってきた。一方で大規模ゲノム領域、染色体レベルでの編集という意味では、さらなる研究開発が必要である。細胞内におけるDNA損傷修復メカニズムの解明、修復機構因子の集積、相同組換え効率のさらなる向上が求められる。細胞周期や細胞分化状態に合わせた異なるゲノム編集技術や方法が求められている。ヒストン解析、染色体解析、一細胞解析、機械学習、AIなどの新規解析技術と組み合わせた基礎研究が重要である。

様々な生物におけるゲノム編集技術の開発はまだ必要とされている。植物のCasタンパク質RNPを用いた、より効率的な品種改良が重要である。動物受精卵においては、ブタ、サルなどのより大きなモデル動物においては、100%ノックアウト、ノックイン動物の作製が求められる（同一個体中にゲノム編集された細胞とされなかった細胞が混在する、いわゆるモザイク問題の解決）。今後はゲノム編集を利用することにより、ヒト遺伝子を置換したヒト化動物の研究開発が進められるだろう。

ゲノム編集技術は、遺伝子改変とは異なる用途にも利用されている。前述の核酸検出薬としてのCRISPR診断法は代表的なものといえる。新型コロナウイルスを含む新興感染症の診断薬として、ウイルスゲノムが解読できればすぐに診断薬を開発できるメリットが挙げられる。さらには微量サンプルにおいて一塩基変異を判別できる（感度と特異度が高い）ことから、がんの超早期発見（リキッドバイオプシー）としても期待されている。パネル技術と組み合わせることで、網羅的な感染ウイルスの検出<sup>41)</sup>、核酸だけでなく細菌やタンパク質の検出も可能になっている。環境中の核酸モニタリング技術として研究開発が進められている。

テープレコーダーのようにDNAを記録媒体として利用する研究（DNA writer）も行われている。GESTALT法をゼブラフィッシュ受精卵に利用することで、成体各器官の細胞系譜を明らかにすることができた<sup>42)</sup>。そもそもCRISPR-Casは細菌に感染するファージの一部配列をCRISPRアレイに記憶するシステムであり、Cas1-Cas2を利用して馬が走る数秒の映像をDNAに記録保存する事に成功している<sup>43)</sup>。さまざまな生体反応や細胞間相互作用の解明、生体全体の細胞系譜解析など時空間的解析への利用が期待される。

## 2.4

## (6) その他の課題

産学連携においては、ゲノム編集ツールの特許が大きな問題となる。特にCRISPR-Cas9については、企業がこの技術を利用するためには複数の特許権者へ多額の使用料を支払う必要があるとされている。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が低下している。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。国産技術での巻き返しは見られるが、国プロや産業界からの支援は必須である。

2019年、各国でゲノム編集により作出された作物の取り扱い方針が決まった。米国は植物については規制対象外とした。南米諸国や日本、オーストラリアなどは、外来遺伝子等が残存していないことが確認されれば規制対象外とする。一方、EUやニュージーランドは、ゲノム編集を遺伝子組換えとして扱う。これはリスク評価の結果ではなく法律条文の解釈の結果であった。なお、米国はゲノム編集動物については遺伝子組換え生物として規制する方針を打ち出している。日本の取扱いについては厚生労働省ホームページに記載されている(www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya)。基本的に厚労省に届出、安全性確認、公表を経て、流通される。遺伝子組換えに該当しないノックアウトなどの作物は基本的に食品表示基準の対象外となっている。諸外国との基準の統一化、グローバル競争に見合った考えが必要とされる。

中国からゲノム編集したヒト受精卵から双子が誕生して、世界中の科学者から非難を浴びた。ヒト受精胚でのゲノム編集は、世界各国で基本的に中止されており、基礎研究においてその目的に応じて受精胚までの研究が認められている。2020年7月厚生労働省と文部科学省の合同部会は、ゲノム編集技術を使ってヒトの受精卵を改変し、遺伝性疾患の原因解明や治療法を探る基礎研究を進める上での指針案を了承した。併せて不妊治療に役立てる目的に限り、提供された精子と卵子から新たに受精卵を作り、ゲノム編集で改変する基礎研究に関する別の指針案も了承した。いずれの指針案も今後、意見公募などを経て指針となる。一方、ゲノム編集で改変した受精卵を母胎に戻す臨床研究については、安全性や倫理面の課題から、厚労省の専門委員会が法制化を含め規制強化の必要性を提言する報告書をまとめている。

また、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。一般社団法人日本ゲノム編集学会および関連団体において、社会受容に向けた活動を活発にしていくことが重要である。

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。2018年JSTの卓越大学院プログラムにおいて広島大学の「ゲノム編集先端人材育成プログラム」が採択され、基礎研究者、治療開発者、産業技術開発者の育成を進めている。このような教育システムを産学連携のもとに展開し、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"> <li>・ 小型 Cas9 や PAM の制約を回避する SpCas9-NG の開発に成功した。</li> <li>・ クラス 1 CRISPR-Cas3 によるヒト細胞におけるゲノム編集に成功し、日本発ゲノム編集基盤技術として知財も確保された。</li> <li>・ 脱アミノ化酵素と nCas9 を利用した一塩基置換酵素 Target-AID に続いて、標的配列の C→T および A→G の異種塩基置換を起こす Target-ACEmax が開発された。</li> <li>・ RNA 編集の可能な PPR が開発された。</li> <li>・ エピゲノム編集：dCas9 を利用して標的遺伝子のはたらきを ON にする新技術 (TREE システム) が開発されている。</li> <li>・ マウス胚におけるエピゲノム編集によって DNA 脱メチル化に成功。</li> <li>・ CRISPR ライブラリーを利用して、細胞増殖遺伝子、がん遺伝子、エピゲノム修飾などの探索が進められている。</li> <li>・ ゲノム編集の共同研究論文数で日本の研究者が世界で 2 位と 5 位に入る<sup>44)</sup>。</li> </ul>
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 農水畜産物でのゲノム編集が進展している (イネ、トマト、キノコ、ジャガイモ、ニワトリ、ブタ、ウシ、マダイでの遺伝子改変)。</li> <li>・ Cas3 を用いた新型コロナウイルスの検出技術の開発が進行する。</li> <li>・ エピゲノム編集技術を用いて動物実験においてヒト疾患の治療に成功している。</li> <li>・ iPS 細胞、免疫 T 細胞、疾患モデル動物を用いて、血友病、表皮水疱症、筋ジストロフィーなどの治療法開発、再生医療に向けた研究が進展している。</li> <li>・ 優れた基礎研究の成果を応用に結びつけるために技術研究組合やコンソーシアムを設立しようとする動きが見られる。</li> <li>・ ゲノム編集関連ベンチャーのモダリス株式会社が IPO を果たす。</li> <li>・ 知財係争のためか日本の製薬企業、ベンチャー、産学連携研究が米中に比べて進んでいない。</li> </ul>
米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 基礎研究の全ての分野で世界トップの水準を維持し、技術レベルをさらに向上させている。</li> <li>・ 全く新規の小型の Cas Φ が開発され、遺伝子治療での送達が可能ツールと期待される。</li> <li>・ ヒストンのセロトニン化という新しい概念がエピゲノム編集によって解明された<sup>45)</sup>。</li> <li>・ オフターゲットの少ない HiFi-Cas9 が開発された。</li> <li>・ CRISPR にトランスポゾン転移酵素をつなげたゲノム編集ツールが開発された。</li> <li>・ nickase-Cas9 に逆転写酵素を融合させたゲノム編集ツールが開発された。</li> <li>・ アミノ進化による Cas ヌクレアーゼ変異体開発が進み、PAM レス Cas9 など多くの改変体が報告されている。</li> <li>・ デアミナーゼを連結した Base Editor、標的に自在に塩基改変できる Prime Editor、ノックイン技術として Cas トランスポゾン、など、DSB を伴わないゲノム編集技術が次々と報告されている。</li> <li>・ ゲノム編集を DNA 記録媒として利用したり、体細胞系譜を追跡する技術など新しい利用方法が開発されている。</li> </ul>

	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>微生物での有用菌株育種、農水畜産物の品種改良、遺伝子治療への応用など、全ての分野での開発で世界トップレベルであり、大学機関、大手企業、ベンチャー企業、寄付財団等の密接な連携により、さらなる研究開発力の向上が進められている。クリスパー・セラピューティクス、エディタス・メディシン、インテリア・セラピューティクス、ビーム・セラピューティクスなどを代表とする多数のベンチャー企業が農作物開発、産業エネルギー開発、ヒト疾患治療法などの最先端研究開発を進めている。</li> <li>CRISPR/Cas9, Cas12, Cas13さらにCRISPR関連の基盤技術および応用技術知財の多くを確保している。</li> <li>TALAEINでの高オレイン酸大豆の作出と産業利用が進んだ。</li> <li><i>in vivo</i>と<i>ex vivo</i>のゲノム編集治療を積極的に進める。<i>in vivo</i>ゲノム編集治療としてレーパー先天性黒内障の臨床試験が開始された。</li> <li>ZFN、CRISPRを使ったゲノム編集治療、より安全なエピゲノム編集治療の研究開発治験が進められている。FDAには30以上の治験が登録され、世界の遺伝子治療研究をリードしている。</li> <li>新規核酸検出技術（Sherlock法およびDETECTR法）が開発され、新型コロナウイルスPOCT診断技術として開発されている。</li> </ul>
欧州	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>CRISPR-Cas9でのゲノム編集によって哺乳類培養細胞で大規模な欠失や染色体の再編が誘導されることを示した。</li> <li>ゲノム編集技術を利用して、遺伝子スクリーニング、遺伝子の機能解析など生物学的な基礎研究が目立つ。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>がん治療のターゲットをゲノムワイドに探索する研究成果が報告されている。</li> <li>TALENの基本特許を有するセレクトイス社がCAR-T細胞作製など牽引している。米国企業や大学と連携して、ゲノム編集治療を進めている。</li> <li>巨大製薬会社によるサラセミアなどの先天性遺伝性疾患に対する遺伝子治療への応用研究が進んでいる。</li> <li>ドイツ・メルク（Merck）は米国からCRISPR-Cas9特許を取得して、科学研究支援、遺伝子治療開発プログラムを推進している。</li> <li>ゲノム編集作物は遺伝子組換え技術によって生み出された作物と同等という、欧州司法裁判所の判決が示されている。</li> </ul>
中国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>CRISPRゲノム編集関連の研究論文数が増えており、自国雑誌への成果報告も多数あるが、最先端の研究がメジャー誌にも掲載されてきている。全体の基礎研究レベルが上昇傾向にある。</li> <li>ゲノム編集ツールや遺伝子ノックインなどの技術開発の論文も複数発表が見られる。</li> <li>CRISPR-Cas9を用いた植物でのゲノム編集関連の論文数を多数発表している。</li> <li>マウス個体でのエピゲノム編集（Mecp2のDNAメチル化）で、自閉症スペクトラムの表現型を示した。</li> <li>結晶構造解析、エピゲノム編集、ライブラリー解析などゲノム編集研究に関して米国と競争するレベルにまで進んでいる研究も多数存在する。</li> </ul>

	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 国策としてゲノム編集による技術開発と新品種開発を進めている（年間数十億から数百億円の研究費を投入）ただし、利用されているゲノム編集ツールや方法に中国独自のものは少ない。</li> <li>・ 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、大豆など）研究が継続して進展している。</li> <li>・ 多様な動物に積極的にゲノム編集を利用している。イヌ、マウス、ラット、ブタ、ウサギ等のゲノム編集動物作製を進め、特にサルの大規模なコロニーを対象とする実験を進めている。</li> <li>・ 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進行中である。</li> <li>・ ゲノム編集によって作製したサルの体細胞からクローンサルを誕生させた。</li> <li>・ 中国の研究者が、世界初となる遺伝子进行操作した双子の女兒を誕生させたが、世界中の非難を浴びて、中国の法廷で懲役3年の実刑判決を受けた。</li> </ul>
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ゲノム編集研究を先導してきたソウル国立大学は、高い質の論文を発表している。</li> <li>・ dCas9やdCpf1 を利用してA→Gなどの一塩基置換 Base Editorを開発した。</li> <li>・ CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用の検出技術(Digenome-Seq法)やクロマチン解析 (DIG-seq) を開発している。</li> </ul>
	応用研究・開発	△	↘	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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Casタンパク質RNPを利用した遺伝子組換えを介さないゲノム編集が報告されており、塩基改変技術を利用した植物ゲノム改変にも成功している。</li> <li>・ 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で研究開発を進めている。</li> </ul>

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

### 関連する他の研究開発領域

・ 遺伝子治療（CAR-T等）・細胞治療（ライフ・臨床医学分野2.1.6）

### 参考・引用文献

- 1) M. Jinek, et al., “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, *Science* 337, no. 6096 (2012) : 816-821. doi : 10.1126/science.1225829
- 2) B. Zetsche, et al., “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system”, *Cell* 163, no. 3 (2015) : 759-771. doi : 10.1016/j.cell.2015.09.038

- 3) P. Pausch, et al., “CRISPR-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor”, *Science* 369, no. 6501 (2020) : 333-337. doi : 10.1126/science.abb1400
- 4) CA. Vakulskas, et al., “A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells”, *Nat. Med.* 24, no. 8 (2018) : 1216-1224. doi : 10.1038/s41591-018-0137-0
- 5) H. Nishimasu, et al., “Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space”, *Science* 361, no. 6408 (2018) : 1259-1262. doi : 10.1126/science.aas9129
- 6) H. Morisaka, et al., “CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 5302. doi : 10.1038/s41467-019-13226-x
- 7) NM. Gaudelli, et al., “Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage”, *Nature* 551, no. 7681 (2017) : 464-71. doi : 10.1038/nature24644
- 8) K. Nishida, et al., “Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems”, *Science* 353, no. 6305 (2016) : aaf8729. doi : 10.1126/science.aaf8729
- 9) AV. Anzalone, et al., “Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA”, *Nature* 576, no. 7785 (2019) : 149-57. doi : 10.1038/s41586-019-1711-4
- 10) J. Strecker, et al., “RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases”, *Science* 365, no. 6448 (2019) : 48-53. doi : 10.1126/science.aax9181
- 11) SE. Klompe, et al., “Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration”, *Nature* 571, no. 7764 (2019) : 219-25. doi : 10.1038/s41586-019-1323-z
- 12) LA. Gilbert, et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”, *Cell* 154, no. 2 (2013) : 442-51. doi : 10.1016/j.cell.2013.06.044
- 13) LS. Qi, et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, *Cell* 152, no. 5 : 1173-83. doi : 10.1016/j.cell.2013.02.022
- 14) AM. Chiarella, et al., “Dose-dependent activation of gene expression is achieved using CRISPR and small molecules that recruit endogenous chromatin machinery”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 1 : 50-5. doi : 10.1038/s41587-019-0296-7
- 15) S. Morita, et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 10 (2016) : 1060-5. doi : 10.1038/nbt.3658
- 16) OO. Abudayyeh, et al., “RNA targeting with CRISPR-Cas13”, *Nature* 550, no. 7675 (2017) : 280-4. doi : 10.1038/nature24049
- 17) DBT. Cox, et al., “RNA editing with CRISPR-Cas13”, *Science* 358, no. 6366 (2017) : 1019-27. doi : 10.1126/science.aaq0180
- 18) T. Merkle, et al., “Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 2 (2019) : 133-8. doi : 10.1038/s41587-019-0013-6
- 19) J. van Haasteren, et al., “The delivery challenge : fulfilling the promise of therapeutic genome editing”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 7 (2020) : 845-855. doi : 10.1038/s41587-020-

0565-5

- 20) P. Gee, et al. “Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 1334. doi : 10.1038/s41467-020-14957-y
- 21) Y. Osakabe, et al., “CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine”, *Nat. Protoc.* 13, no. 12 (2018) : 2844-2863. doi : 10.1038/s41596-018-0067-9
- 22) T. Sakuma, et al., “MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems”, *Nat. Protoc.* 11, no. 1 (2018) : 118-133. doi : 10.1038/nprot.2015.140
- 23) K. Yoshimi, et al., “ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes”, *Nat. Commun.* 7 (2016) : 10431. doi : 10.1038/ncomms10431
- 24) K. Suzuki, et al., “In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration”, *Nature* 540, no. 7631 (2016) : 144-149. doi : 10.1038/nature20565
- 25) S. Nakade, et al., “Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 3270. doi : 10.1038/s41467-018-05773-6
- 26) JS. Gootenberg, et al., “Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2”, *Science* 356, no. 6336 (2017) : 438-42. doi : 10.1126/science.aam9321
- 27) JS. Chen, et al., “CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity”, *Science* 360, no. 6387 (2018) : 436-9. doi : 10.1126/science.aar6245
- 28) K. Yoshimi, et al., “Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3”, *medRxiv.* (2020) : 1-30. doi : <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.20119875>
- 29) RT. Walton, et al., “Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants”, *Science* 368, no. 6488 (2020) : 290-6. doi : 10.1126/science.aba8853
- 30) M. Jost, et al., “Titrating gene expression using libraries of systematically attenuated CRISPR guide RNAs”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 3 (2020) : 355-64. doi : 10.1038/s41587-019-0387-5
- 31) HK. Liao, et al., “In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation”, *Cell* 171, no. 7 (2017) : 1495-1507. doi : 10.1016/j.cell.2017.10.025
- 32) DU. Kemaladewi, et al., “A mutation-independent approach for muscular dystrophy via upregulation of a modifier gene”, *Nature* 572, no. 7767 (2019) : 125-130. doi : 10.1038/s41586-019-1430-x
- 33) XS. Liu, et al., “Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene”, *Cell* 172, no. 5 (2018) : 979-92. doi : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.012>
- 34) HB. Zhou, et al., “Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice”, *Cell* 181, no. 3 (2020) : 590-603. doi : 10.1016/j.cell.2020.03.024
- 35) L. Qu, et al., “Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 9 (2019) : 1059-69. doi : 10.1038/s41587-019-0178-z
- 36) P. Tebas, et al., “Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV”, *N. Engl. J. Med.* 370, no. 10 (2014) : 901-910. doi : 10.1056/NEJMoa1300662

- 37) K. Kiga, et al., “Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 2934. doi : 10.1038/s41467-020-16731-6
- 38) R. Basar, et al., “Large-scale GMP-compliant CRISPR-Cas9-mediated deletion of the glucocorticoid receptor in multivirus-specific T cells”, *Blood Advances* 4, no. 14 (2020) : 3357–3367. doi : 10.1182/bloodadvances.2020001977
- 39) J. Bondy-Denomy, et al., “Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system”, *Nature* 493, no. 7432 (2013) : 429-32. doi : 10.1038/nature11723
- 40) AB. Gussow, et al., “Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families” *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 3784. doi : 10.1038/s41467-020-17652-0
- 41) CM. Ackerman, et al., “Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13”, *Nature* 582, no. 7811 (2020) : 277-82. doi : 10.1038/s41586-020-2279-8
- 42) A. McKenna, et al., “Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing”, *Science* 353, no. 6298 (2016) : aaf7907. doi : 10.1126/science.aaf7907
- 43) SL. Shipman, et al., “CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria”, *Nature* 547, no. 7663 (2017) : 345-9. doi : 10.1038/nature23017
- 44) Y. Huang, et al., “Collaborative networks in gene editing”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 10 (2019) : 1107-1109. doi : 10.1038/s41587-019-0275-z
- 45) YE. Loh, et al., “Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3”, *Nature* 567, no. 7749 (2019) : 535-539. doi : 10.1038/s41586-019-1024-7

## 2.4.5 オプトバイオロジー

### (1) 研究開発領域の定義

生命現象を光照射で自由自在に操作するための技術の総称である。最近の研究により、チャンネルロドプシンとは全く異なる新たな基盤技術が創出され、神経科学・脳科学のみならず、生命科学の広範な分野への応用が始まっている。今後は、基礎研究のみならず、医療を含めた様々な応用分野にも研究が広がっていくと思われる。

### (2) キーワード

光操作、光スイッチタンパク質、タンパク質、ゲノム、細胞、細胞デザイン、合成生物学、医療

### (3) 研究開発領域の概要

#### [本領域の意義]

例えば、脳であれば、ヒトの場合は約860億個、マウスの場合は約7,000万個の神経細胞がそれぞれの役割を持って活動している。マウスの脳に光刺激を与えて特定の神経細胞の特定の遺伝子の働きを光操作した上で、マウスの行動等がどのように変化するかを観察すれば、光刺激で狙った神経細胞の遺伝子が脳の中でどのような役割を持っているのかを解明できる。また、同様の光操作のアプローチにより、生体内で生じたゲノムや遺伝子の異常（変異や欠失など）がどのように様々な疾患に繋がるのかを解明できる。上述の例で挙げたような生命現象の解明や疾患の解明にとどまらず、創薬や医療等の様々な分野への応用が期待されている。例えば、これまでの薬は、体内をくまなく循環することを大前提として開発する必要があったため、薬効と副作用のバランスに主眼をおいた創薬にならざるを得なかった。光操作技術の導入によって、光を照射した部位に限定して強い薬効を生じさせ、疾患部位以外での副作用を大幅に低減するといった、新しいコンセプトの創薬が可能になるかもしれない。また、遺伝子治療において、必要なタイミングで遺伝子の働きをONにして、治療が終わったら、あるいは、問題が生じたらOFFできるようになれば、遺伝子治療の有効性の観点のみならず、安全性の観点でも非常にメリットが大きい。このように、光操作技術は、既存の技術では不可能だった様々なアイデアを実現し、様々なニーズに答えることができる可能性を秘めている。

生命現象の光操作技術に関する研究は、2005年のチャンネルロドプシンの神経科学・脳科学への応用が大きな転機になった。さらに、光刺激によって構造変化を起こしたり、光刺激によって速やかに二量体を形成し光照射を止めると解離する、光スイッチタンパク質と呼ばれる基盤技術が2009年以降に次々と開発されたことにより、生命現象に関わる様々なタンパク質の光操作が可能になった。この一般性の高い基盤技術の創出により、光が得意とする高い時間・空間制御能に基づいて、狙った細胞・生体部位のみで、かつ狙ったtime windowのみで、様々な生命現象を自在に光操作することが可能になり、今まさに光操作の分野は大きく発展しようとしている。このような光操作技術に関する期待から、生命科学の諸分野の研究者が光操作の分野に参入している。加えて、光操作技術を高度化したり、新たな光操作技術を開発すべく、生命科学、化学、物理学、情報科学の諸分野の多くの研究者が当該分野に注目している。

#### [研究開発の動向]

分子の機能を光で操作する技術は、1970年代に創案された“ケージド化合物 (caged compound)”が最初のものである。ニトロベンジル基に代表される光感受性官能基を用いて不活性化(caged)した小分子(グ

ルタミン酸等の神経伝達物質や環状核酸など)の当該官能基を光照射で解離させ、当該小分子の本来の機能を出現(uncaging)させるという優れたアイデアである。1980年代から光線力学療法(photodynamic therapy:PDT)で利用されるポルフィリン誘導体も、ケージド化合物と同様に有機化合物を利用した光操作技術の源流をなすものであろう。これらの研究は、Rakuten Medical, Inc.(日本法人は楽天メディカルジャパン株式会社)が2020年に我が国で製造販売の承認を得た頭頸部癌の光免疫療法の開発につながっている。しかし、有機合成化学に基づくアプローチは光操作が可能な対象が小分子に限定される点や、光操作の可逆性が無いという点などが課題として残っていた。また、有機合成化学に基づくアプローチが精密な合成化学の技術を必要とする点も当該分野への参入障壁を高め、その発展を遅らせる要因となっていた。

光操作技術は、2005年に単細胞緑藻のクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)の光受容器官(眼点)の細胞膜に発現する光駆動型イオンチャネルのチャンネルロドプシンが神経細胞の膜電位の光操作に利用できることが発見され、神経科学・脳科学に応用されることにより転機を迎える<sup>1),2)</sup>。チャンネルロドプシンを用いることにより、光照射で狙った神経細胞を活性化できるため、神経科学・脳科学の分野で爆発的に利用されている。しかし、チャンネルロドプシンは膜電位をコントロールすることしかできないので、その応用範囲は興奮性細胞である神経細胞や心筋細胞等に限定される。このことから、非興奮性細胞のコントロールにも応用可能な、新たな光操作技術の開発が求められていた。このような中、2009年に光刺激によって構造変化を起こす光スイッチタンパク質(AsLOV2ドメイン)<sup>3)</sup>が開発され、2010年には光刺激によって結合・解離を制御できる、より一般的な光スイッチタンパク質(CRY2-CIBシステム)<sup>4)</sup>が開発され、非興奮性細胞のコントロールにも応用可能な、新たな光操作技術への道が開かれた。光スイッチタンパク質は光操作の基盤技術であるため、上述のもの以外にも様々な光スイッチタンパク質が開発されている<sup>5)</sup>。初期に開発された光スイッチタンパク質の多くは、植物等が有する天然のタンパク質をそのまま利用していたが、天然のタンパク質に大幅にプロテインエンジニアリングを施して、天然のタンパク質が抱える問題点を克服した光スイッチタンパク質も、我が国の研究グループ等から発表されている<sup>6)</sup>。最近では、生体組織透過性が高い赤色光や近赤外光等の長波長の光照射で利用できる新たな光スイッチタンパク質が報告されるようになってきている<sup>7),8)</sup>。

光スイッチタンパク質による光操作が報告された対象は、イオンチャネル、受容体タンパク質、抗体、キナーゼ、GTP結合タンパク質、ヌクレアーゼ、DNAリコンビナーゼ、RNAポリメラーゼ、プロテアーゼなど、多岐にわたっている。また、生命現象についても、細胞内シグナル伝達、ベシクル輸送、細胞骨格、セカンドメッセンジャー、細胞周期、細胞死、細胞分化、遺伝子発現、遺伝子編集、エピゲノムなどの光操作が報告されている。このように数多くのタンパク質や幅広い生命現象の光操作が可能になった背景には、上述の光スイッチタンパク質の開発と共に、光スイッチタンパク質を用いて様々なタンパク質を制御するための一般的アプローチが確立してきたことが挙げられる。このアプローチは大きく次の三つに分けるとことができる:(1)光スイッチタンパク質の構造変化を光刺激で誘導してタンパク質の活性を制御するアプローチ、(2)タンパク質の局在変化を光刺激で誘導してタンパク質の活性を制御するアプローチ、(3)タンパク質を分割し、その断片の会合を光刺激で誘導してタンパク質の活性を制御するアプローチ。それぞれのアプローチに最適な光スイッチタンパク質が開発されている。

重要なことは、チャンネルロドプシンや光スイッチタンパク質を導入した光操作ツールがすべてタンパク質を利用しているという点である。光操作ツールがタンパク質であるため、細胞種特異的のプロモーターを用いて、特定の細胞種のみでの光操作が可能であり、プラスミドベクターや各種ウィルスベクターを用いて、細胞や生体に光操作ツールを導入できる点が大きなメリットである。また、光操作ツールを染色体に組み込んだトランスジェニック生物やノックイン生物を樹立して利用できる点も大きな特徴である。上述のように、従来の有機合

成化学に基づく光操作技術は、精密な合成化学の技術を必要とする点が当該分野への参入障壁になっていたが、チャンネルロドプシンや光スイッチタンパク質を導入した光操作ツールは、簡便な遺伝子工学的手法を用いて光操作ツールを開発したり、細胞生物学の分野で広く用いられている方法で光操作ツールを細胞や生体に導入して利用することができるため、様々な分野の研究者が光操作技術の分野に参入することが可能である。光操作自体が既存の技術では不可能だったアプローチを可能にするといった魅力があるだけでなく、このような参入障壁の低さも、当該分野の急速な発展の大きな要因となっている。

諸外国の状況について、チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術に関する開発研究および応用研究は、神経科学・脳科学に関係する世界中の研究室で行われているが、米国が特に優勢である。これは、米国が進める脳科学に関係した大型プロジェクト「Brain Initiative」の影響が強く出ていると思われる。一方、光スイッチタンパク質による光操作技術については、トップジャーナルに論文を発表する研究室が米国、日本、欧州、カナダ、韓国、中国に存在している。当該分野で日本が存在感を発揮しているのは、光スイッチタンパク質という光操作の基盤技術の一つが日本で開発されていること、および、JST-CRESTとJST さきがけにおいて、チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術に限定されない光操作技術の研究を進めていることが理由として挙げられる。当該分野の潮流として、チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術については、これらを使って神経科学・脳科学に関係する生命現象を解明する研究がメインである。光スイッチタンパク質による光操作技術についても、生命現象の解明を目指した光操作技術の開発研究がメインである。ただ、ゲノムエンジニアリング技術の光操作やがん治療技術の光操作など、医療応用を目指した、光操作技術の開発研究が増加の傾向にある。なお、2018年に、光操作に関する情報を集約したデータベース「OptoBase」が発足し、光操作に関する国際的な研究状況を把握しやすくなっている。

#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

###### ・医療応用

当該分野はこれまで生命現象の解明のための研究が主流であったが、ここ数年、医療応用に通じる光操作技術が報告されるようになってきた。主要なものについて、いくつか紹介する。まずゲノムの光操作技術の開発が挙げられる。この技術はCRISPR-Cas9システムなどのゲノムエンジニアリング技術と光操作技術を組み合わせた新たな技術であり、光刺激によってゲノムの塩基配列を書き換えたり、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を光刺激で自在に操作することが可能になっている<sup>9-11)</sup>。当該技術の研究は我が国が世界をリードしている。抗体も医療応用に通じる技術であるが、韓国と米国のグループによって、細胞内で働く抗体の光操作技術が開発されている<sup>12-14)</sup>。ゲノムや抗体のような分子レベルでの治療技術に加えて、免疫細胞やウイルスを用いた治療技術にも光操作技術が応用され始めている。免疫細胞への応用として、キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法（CAR-T細胞療法）への光操作技術の応用が挙げられる。CAR-T細胞療法はがんに対する薬効の高さが注目される一方で、活性のコントロールが難しいという課題があった。アメリカのグループは、CAR-T細胞療法に光操作技術を導入することにより、当該療法の特異性と安全性を高めることができることを示している<sup>15)</sup>。がん治療への光操作技術の応用については、日本のグループが光で増殖能を制御できる腫瘍溶解性ウイルスの開発に成功している<sup>16)</sup>。

###### ・光免疫療法

Rakuten Medical, Inc.（日本法人は楽天メディカルジャパン株式会社）が光免疫療法として開発していた

光操作技術「イルミノックス」に基づく頭頸部がんの治療薬「アキシャルクス」、および光照射のための医療機器「BioBladeレーザーシステム」が、2020年、日本での製造販売について承認を得た。最先端の光操作技術が医療技術として実用化に至ったことは、光操作技術の今後の発展にとって追い風になると思われる。

・光スイッチタンパク質の長波長化

光操作の基盤技術である光スイッチタンパク質について、その長波長化に関する研究が進められている。これまで青色光で制御できる光スイッチタンパク質が広く光操作技術に利用されてきたが、青色光の生体組織透過性が低いため、より生体組織透過性の高い長波長の光照射で利用できる光スイッチタンパク質の開発が強く求められていた。米国の研究グループは、バクテリア (*Rhodospseudomonas palustris*) が有するフィトクロム (RpBphP1) とその結合タンパク質 (RpPpsR2) が、遠赤色や近赤外の光照射で光スイッチタンパク質として利用できることを示している<sup>7)</sup>。この光スイッチタンパク質は、哺乳類を含めて様々な動物種が広く有するビリベルジンを補因子として結合し、光操作の長波長化を実現したという点で注目されたが、この光スイッチタンパク質を利用した研究が開発者の研究室以外からあまり報告されていないため、その実用性については改良の必要があるのかもしれない。長波長化という点では、シアノバクテリアから、非常に小さな光受容ドメイン (シアノバクテリオクロム) が発見されている<sup>17), 18)</sup>。この研究は我が国が分野をリードしており、今後の発展が期待されている。

・アップコンバージョン現象

光操作の長波長化については、光スイッチタンパク質以外にも研究が進められている。特にアップコンバージョン現象を利用した技術が近年開発され、神経科学の分野を中心に利用が始まっている。これまでは、光駆動型のイオンチャネルであるチャンネルロドプシンを使って神経細胞を光操作する場合に、生体組織透過性の低い青色光を使う必要があったため、頭蓋骨に穴を開け、光ファイバーを脳に挿入して光を照射しなくてはならなかった。アップコンバージョンナノ粒子を用いることにより、光ファイバーを脳に挿入することなく、生体外からの近赤外光で脳の活動を制御できるようになった<sup>19)</sup>。また、アップコンバージョンナノ粒子として、これまで無機結晶が利用されていたが、無機結晶よりも制御しやすい有機物でアップコンバージョン現象を生起する技術が日本から発表され、生命現象の光操作に利用できることが示されている<sup>20)</sup>。また、日本から、共鳴エネルギー移動現象を利用して、多光子励起による光操作技術の基盤技術が開発されたことも特筆に値し、今後のさらなる発展が期待される<sup>21)</sup>。

・光操作に関する情報を集約したデータベース「OptoBase」

このデータベース (URL: <https://www.optobase.org/about/>) は、ドイツのフライブルク大学の研究者によって2018年に開設された。光操作に関係した最新の論文の出版情報と関連文献の検索、用途別に整理された光操作の基盤技術や光操作ツールのリスト、光操作に関係した統計データ、光操作に関係したQ&Aなどからなっている。このデータベースを見れば、光操作の分野が今まさにどうなっているのか、光操作の研究を始める場合にどのツール選べばいいのか、光操作の研究で困難に直面した場合にどうすればいいのか、などが分かるようになっている。この統合的なデータベースの構築は、光操作の分野の今後の発展に大きく貢献すると思われる。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

脳科学に関係した大型プロジェクトとして、米国の「Brain Initiative」、欧州の「Human Brain Project」、我が国の「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト (Brain/MINDS)」がある。これらのプロジェクトの中で、チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術の開発と応用研究が数多く実施されている。チャンネルロドプシン関連とは異なる光操作技術の開発とその応用研究については、研究課題は非常に限定的である。

我が国では、2016年にJST-CRESTの「光の特性を活用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用」(オプトバイオ) 領域、およびJSTさきがけの「生命機能メカニズム解明のための光操作技術」(光操作) 領域が立ち上がり、光操作技術の開発とその応用研究が実施されている。JST-CRESTのオプトバイオ領域では、チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術の応用研究の採択数が全体の6割程度であり、チャンネルロドプシン関連とは異なる光操作技術の開発とその応用研究の採択数は全体の4割程度である。JSTさきがけの光操作領域でも、チャンネルロドプシン関連とは異なる光操作技術の開発とその応用研究について、挑戦的な課題に取り組む若手の研究者が数多く採択されている。

### (5) 科学技術的課題

- ・ 生体深部に存在する分子や細胞の光操作を実現する技術開発

光操作の基盤技術である光スイッチタンパク質について、その長波長化に関する研究が進められている。生体組織に光を照射した場合に、その光の透過性が高い「第一の生体の窓」と言われる650 nmから900 nmの波長領域、「第二の生体の窓」と言われる1,100 nmから1,350 nmの波長領域、「第三の生体の窓」と言われる1,550 nmから1,800 nmの波長領域でコントロールできるような新たな光スイッチタンパク質を開発することができれば、生体外からの光照射で操作できる生体部位は、現状の主流である青色光による光操作に比べて、格段に増えると思われる。加えて、生体組織透過性が高い「磁場」や「超音波」等で生命現象をコントロールする技術も報告されており、長波長の光による操作に加えて、今後の発展が期待されている。

- ・ 疾患の治療を目的とした光操作技術の研究推進

従来の薬は、身体中を循環することを大前提として、薬効と副作用のバランスに主眼をおいた創薬にならざるを得なかったが、光操作技術の導入によって、光照射部位でのみ強い薬効を発揮させるような、新しいコンセプトの創薬が可能になるかもしれない。また、遺伝子治療に光操作技術を導入することにより、状況に応じてON/OFFが可能な、有効性と安全性の両面でメリットが大きい治療が実現できるかもしれない。このように、既存の技術では不可能だった様々なアイデアを実現できる光操作技術は、がん治療や遺伝子治療のみならず、今まで治療法がなかった様々な疾患においてアンメットメディカルニーズに答えることができる可能性を秘めている。

- ・ 関連する周辺技術との連携・融合

例えば、ドラッグデリバリーシステム、タンパク質の細胞への送達技術、抗体関連技術と光操作技術の組み合わせによって、疾患治療への光操作技術の応用が格段に進歩すると思われる。また、近年の合成生物学の発展により、人工的な遺伝子回路を導入するなどして新たな機能を有する細胞をデザインすることが可能になっているが、この細胞デザインのアプローチと光操作技術を融合することによっても大きな相乗効果が期待でき、今までにない治療技術や物質生産の技術を創出することが可能になると期待される。さらに、レーザ

技術などの光量子技術およびウェアラブルデバイス技術などの生体への光照射に関係する技術分野との連携はもとより、疾患に関する生体情報を正確に計測し、これらを統合的に診断する「IoT-AI技術」と光操作技術の連携も、疾患の精密なモニタリングから精密な治療までをシームレスに行い新たな医療技術を創出する上で重要になると思われる。

(6) その他の課題

我が国では、神経科学・脳科学にフォーカスした「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト (Brain/MINDS)」だけでなく、JST-CRESTのオプトバイオ領域、およびJSTさきがけの光操作領域を立ち上げて、戦略的に光操作技術の開発研究と応用研究を進めている。これにより、光操作技術の研究分野をリードする国の一つになっており、関連のベンチャー企業も立ち上がっている。このような戦略的研究推進により得られた研究シーズや研究人材を活用して当該分野をさらに大きく発展させるために、継続的な支援や適切な施策が必要である。

また、光操作技術は様々な周辺技術との連携により大きな相乗効果が期待できる分野であるため、分野横断的な支援体制の構築や、異なる専門性を持つ研究者が一つの方向を向いて研究できる体制の構築が非常に有効と思われる。

(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"> <li>チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術の応用研究について、国際的に高いレベルの研究成果を報告している。</li> <li>膜電位以外の光操作技術についても、光操作の基盤技術である光スイッチタンパク質を開発するとともに、ゲノムの光操作技術や多光子励起による光操作技術の開発など、分野をリードする研究成果を多数発表している。</li> <li>JST-CRESTのオプトバイオ領域、およびJSTさきがけの光操作領域を立ち上げるなど、戦略的に研究を行なっている。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>ゲノムの光操作技術や腫瘍溶解性ウイルスの光操作技術など、医療技術につながる光操作技術に関する研究が行われている。</li> <li>光操作技術の実用化を目指すベンチャー企業の株式会社ミーバイオ (miibio, Inc.) が立ち上がっている。</li> </ul>
米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術の開発と応用について分野をリードしている。</li> <li>膜電位以外の光操作技術についても、光操作の基盤技術である光スイッチタンパク質を開発して分野をリードしている。</li> <li>光スイッチタンパク質の長波長化等の技術の高度化についても分野をリードしている。</li> <li>光操作の研究分野を研究する研究者の数が非常に多い。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>チャンネルロドプシンの臨床応用に関する研究が活発に行われている。</li> <li>Rakuten Medical, Inc. (日本法人は楽天メディカルジャパン株式会社) が立ち上がり、光免疫療法を実用化した。</li> <li>抗体の光操作技術、がん免疫療法 (CAR-T) の光操作技術など、医療技術につながる光操作技術の研究が多数行われている。</li> </ul>

2.4  
俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

欧州	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・チャンネルロドプシン等の膜電位の光操作技術の応用研究について、国際的に高いレベルの研究成果を報告している。</li> <li>・膜電位以外の光操作技術についても、ドイツを中心に、高いレベルの研究成果を報告している。</li> <li>・ドイツの研究者によって開設されたデータベース「OptoBase」に光操作に関する情報が集約されており、分野の発展に大きく貢献している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・チャンネルロドプシンの臨床応用に関する研究が活発に行われている。</li> <li>・チャンネルロドプシンを用いた遺伝子治療を目指すベンチャー企業のGenSight Biologicsがフランスで立ち上がっている。</li> </ul>
中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・長波長の光で駆動できる光スイッチタンパク質の開発と応用研究で、分野をリードする成果を報告する研究グループがある。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・長波長の光スイッチタンパク質を応用してゲノムをコントロールする研究が行われている。</li> </ul>
韓国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞内シグナル伝達の光操作技術において、分野をリードする成果を報告する研究グループがある。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・抗体の光操作技術に関する研究が行われている。</li> </ul>
その他の国・地域	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カナダにおいて、細胞内シグナル伝達の光操作技術において、分野をリードする成果を報告する研究グループがある。</li> <li>・蛍光タンパク質を応用した独自の光操作技術も開発している。</li> </ul>
	応用研究・開発	×	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・特記事項なし。</li> </ul>

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

## 参考・引用文献

- 1) E. S. Boyden et al., "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity", *Nat. Neurosci.* 8, no. 9 (2005) : 1263-1268. doi : 10.1038/nn1525
- 2) F. Zhang et al., "Optogenetic interrogation of neural circuits : technology for probing mammalian brain structures", *Nat. Protoc.* 5, no.3 (2010) : 439-456. doi : 10.1038/nprot.2009.226
- 3) Y. I. Wu et al., "A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells", *Nature* 461 no. 7260 (2009) : 104-108. doi : 10.1038/nature08241
- 4) M. J. Kennedy et al., "Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells", *Nat. Methods* 7, no. 12 (2010) : 973-975. doi : 10.1038/nmeth.1524
- 5) J. I. Spiltoir and C. L. Tucker, "Photodimerization systems for regulating protein-protein interactions with light", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57 (2019) : 1-8. doi : 10.1016/j.sbi.2019.01.021

- 6) F. Kawano et al., “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins”, *Nat. Commun.* 24, no. 6 (2015) : 6256. doi : 10.1038/ncomms7256
- 7) A. A. Kaberniuk, A. A. Shemetov and V. V. Verkhusha, “A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light”, *Nat. Methods* 13, no. 7 (2016) : 591-597. doi : 10.1038/nmeth.3864
- 8) T. A. Redchuk et al., “Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing”, *Nat. Chem. Biol.* 13, no. 6 : 633-639. doi : 10.1038/nchembio.2343
- 9) Y. Nihongaki et al., “Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 7 (2015) : 755-760. doi : 10.1038/nbt.3245
- 10) Y. Nihongaki et al., “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation”, *Nat. Methods* 14, no. 10 (2017) : 963-966. doi : 10.1038/nmeth.4430
- 11) Y. Nihongaki et al., “A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation”, *Nat. Chem. Biol.* 15, no. 9 (2019) : 882-888. doi : 10.1038/s41589-019-0338-y
- 12) D. Yu et al., “Optogenetic activation of intracellular antibodies for direct modulation of endogenous proteins”, *Nat. Methods* 16, no. 11 (2019) : 1095-1100. doi : 10.1038/s41592-019-0592-7
- 13) A. A. Gil et al., “Optogenetic control of protein binding using light-switchable nanobodies”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 4044. doi : 10.1038/s41467-020-17836-8
- 14) C. Carrasco-López et al., “Development of light-responsive protein binding in the monobody non-immunoglobulin scaffold”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 4045. doi : 10.1038/s41467-020-17837-7
- 15) Z. Huang et al., “Engineering light-controllable CAR T cells for cancer immunotherapy”, *Sci. Adv.* 6, no. 8 (2020) : eaay9209. doi : 10.1126/sciadv.aay9209
- 16) M. Tahara et al., “Photocontrollable mononegaviruses”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, no. 24 (2019) : 11587-11589. doi : 10.1073/pnas.1906531116
- 17) R. Narikawa et al., “A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*”, *Sci. Rep.* 5 (2015) : 7950. doi : 10.1038/srep07950
- 18) K. Fushimi et al., “Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, no. 17 (2019) : 8301-8309. doi : 10.1073/pnas.1818836116
- 19) S. Chen et al., “Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics”, *Science* 359, no. 6376 (2018) : 679-684. doi : 10.1126/science.aag1144
- 20) Y. Sasaki et al., “Near-Infrared Optogenetic Genome Engineering Based on Photon-Upconversion Hydrogels”, *Angew. Chem.* 58, no. 49 (2019) : 17827-17833. doi : 10.1002/anie.201911025
- 21) T. Kinjo et al., “FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon

optogenetics”, *Nat. Methods* 16, no. 10 (2019) : 1029-1036. doi : 10.1038/s41592-019-0541-5

## 2.4

俯瞰区分と研究開発領域  
基礎盤科学技術  
分子・細胞

## 2.4.6 ケミカルバイオロジー

### (1) 研究開発領域の定義

ケミカルバイオロジーとは、化学を基盤とした生命科学研究である。タンパク質や核酸などの生体分子やそれらが制御する分子プロセスを「可視化」あるいは「操作」する化学ツールを開発し、種々の生命現象や疾患の分子レベルでの作用機序解明ならびに制御を目指す領域である。現在、有機化合物を用いて生体分子や生命システム（細胞・組織・個体）を制御する技術開発研究が盛んになっており、生命研究ツールとしてのみならず、新しい創薬体系や治療法への展開が期待されている。本項では、特にケミカルバイオロジーによる「生体分子制御」に焦点を当てる。

### (2) キーワード

小分子化合物、中分子化合物、タンパク質、細胞、創薬、コバレント阻害剤、プロテインノックダウン創薬、in vivo、ケモジェネティクス（化学遺伝学）、細胞治療

### (3) 研究開発領域の概要

#### [本領域の意義]

ゲノム解読技術の目覚ましい発展に伴い、ヒトをはじめとする生物（生命体）を構成する膨大な種類のタンパク質に関する情報（プロテオーム）が明らかとなった。それらタンパク質群の活性や相互作用が細胞・組織内で時空間的にどのように調節され、生命現象や生体機能を制御しているのかを分子レベルで解明することは次世代生命科学の大きな課題の一つである。また、医学の観点からは、がん、生活習慣病、難治性疾患などの原因となるタンパク質を特定し、その疾患発症機構を明らかにすることも、新たな治療法を開発する上で不可欠である。

従来、タンパク質の機能を調べるためのアプローチとして、遺伝子ノックアウトやRNA干渉法を用いて細胞内の対象タンパク質の発現を抑制するという戦略が用いられてきた。このような分子生物学的手法は大変有用である一方、タンパク質の発現レベルが十分下がるまでに数時間以上の時間を要する。そのため、その間に細胞システムによる補償機構が働き、対象タンパク質の発現抑制による効果が見られない場合も多い。これに対して、ケミカルバイオロジーでは、タンパク質の機能（活性・相互作用・局在など）を有機小分子化合物によって素早く制御することができる。このような迅速な生体分子制御技術は、細胞内のダイナミックな分子プロセスを任意のタイミングで操作し、その機能を解析・解明するきわめて強力な基盤技術となる。さらに、標的分子特異的な小分子化合物は、新たな治療薬としての展開に直結するばかりでなく、再生医療や細胞治療、合成生物学のための細胞機能制御スイッチなどへの利用も期待されている。

ケミカルバイオロジーは、有機化合物（薬剤）を武器に生命システムや疾患の分子レベルでの理解と制御を切り拓く学際的分野である。基礎生命科学・基礎医学のみならず、医薬品開発、細胞工学、細胞治療、再生医療などに資する新しい化合物テクノロジーを開拓・提供し、新医療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]

ケミカルバイオロジーによる生体制御は、大別すると2つの方向性がある。一つ目は、古典的な薬学に相当するもので、細胞に内在するタンパク質を制御する生物活性化合物の探索・開発研究である。二つ目は、

人工的に改変したタンパク質の機能を化合物によって制御する手法で、近年では「ケモジェネティクス」(化学遺伝学)と呼ばれるアプローチである。以下、それぞれの分野における最近の動向について記述する。

### 【生物活性化合物のケミカルバイオロジー】

生物活性化合物の最大の特徴は、細胞に発現している内在性タンパク質(疾患の原因となる異常タンパク質を含む)を制御できる点にあり、生物活性化合物は常に創薬としての展開に繋がる。生物活性化合物の開発研究では、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングが今なお中核となる化合物探索アプローチとなっている。現在では、東京大学創薬機構をはじめ、理化学研究所、東京医科歯科大学、大阪大学、名古屋大学ITbMなどの主要の大学・研究機関に独自の化合物ライブラリーが整備され、それらを研究者が利用できる体制が国内に整いつつある。化合物ライブラリーのソースとしては、合成化合物と天然物があり、このあたりの動向は特に大きく変わっていない。また現状、化合物ライブラリースクリーニングによって得られる生物活性化合物のほとんどは、標的タンパク質に非共有結合的に結合してその機能を抑制する阻害剤である。多くの場合、酵素を標的とした酵素活性阻害剤である。一方、化合物ライブラリースクリーニングは膨大なコスト・労力に反して、ヒット化合物を得られる確率は今なおきわめて低い。生命科学や医学・疾患治療の対象となる標的分子は急速に多様化しており、従来のアプローチでは限界が見え始めている。そのため、近年、従来とは異なる様式・原理に基づいて作用する薬剤や、これまでundruggableと考えられてきた標的分子を制御するための新しい創薬モダリティを開発することが、アカデミアおよび製薬企業研究者の急務となっている。

上述のように、これまでの生物活性化合物は、非共有結合型の可逆的阻害剤が多い。これに対して、標的タンパク質と共有結合を形成し、その機能を不可逆的に阻害する薬剤は「コバレント阻害剤」として知られる。例えば、アファチニブは、世界で初めてFDAから承認されたコバレント阻害剤で、上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とした抗悪性腫瘍薬である。コバレント阻害剤は一般に、強い薬理作用や薬効の長期持続などの利点を有する。一方で、標的以外のタンパク質と非特異的に反応すると強い副作用を引き起こすため、製薬企業でのコバレント阻害剤開発は長年にわたり避けられてきた。しかしここ数十年の間に、有用性と安全性を兼ね備えた新しいタイプのコバレント阻害剤の開発が展開されており、新しい創薬体系として大きな期待が寄せられている。

従来の酵素活性の阻害とは異なり、有機化合物を用いて標的タンパク質の分解を誘導する「プロテインノックダウン技術」が新しい創薬モダリティとして注目を集めている。プロテインノックダウン技術は、転写因子や酵素活性のないタンパク質など、これまで制御が難しいと考えられてきた(undruggableな)標的分子を分解することでその機能を消失させることができる。米国イェール大学のCraig Crews教授らが開発した「PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera)」<sup>1)</sup>がその代表例であり、本技術では、標的タンパク質とE3ユビキチンリガーを二量化するようなキメラ化合物を用いることで、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームによる分解経路へと導く。CrewsらはPROTAC技術をもとに、創薬ベンチャーArvinas社を設立し、それに続く形で、プロテインノックダウンを基盤とする多くのベンチャーが設立されるに至った。日本では、2018年にファイメクス社が設立され、独自のRaPPIDS (Rapid Protein Proteolysis Inducer Discovery System)をプラットフォーム技術とした標的タンパク質分解誘導剤の開発が展開されている。最近では、標的タンパク質を分解する機構として、オートファジー系を利用する「AUTAC (Autophagy Targeting Chimera)」<sup>2)</sup>や、リソソーム系を利用して細胞外タンパク質を分解する「LYTACs (Lysosome Targeting Chimeras)」<sup>3)</sup>なども報告されており、プロテインノックダウン技術は着実にその勢いを増している。

プロテインノックダウン技術の開発には、日本の貢献も大きく、東北大学の有本は上記のAUTACを、国立医薬品食品衛生研究所の内藤はPROTACと同様の原理の「SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser)」<sup>4)</sup>を独自に開発している。

### 【ケモジェネティクス (化学遺伝学)】

上述の生物活性化合物 (薬剤) のケミカルバイオロジーは、内在性タンパク質の機能制御を実現する強力な化学的方法論である。一方、標的タンパク質特異的な化合物の創製には多大な時間と試行錯誤を要するため、生命科学の対象となる非常に多くの種類のタンパク質に対して特異的な化合物を個々に開発するのは現実的ではない。また、PROTACなどの分解誘導薬剤を含め、生物活性化合物のほとんどは標的分子の機能を抑制する薬剤であり、標的タンパク質を化合物で活性化するという応用展開は難しい。このような課題を克服するケミカルバイオロジーのアプローチとして、「ケモジェネティクス (化学遺伝学)」と呼ばれる手法が注目されている。ケモジェネティクスでは、既知の小分子化合物や薬剤を利用し、その化合物と結合することで機能 (活性・相互作用・局在など) がスイッチングされるように設計した人工タンパク質を創製する。その人工タンパク質を細胞や組織に発現させ、化合物を添加することで、任意のタイミングでそのタンパク質を制御することができる。近年、光でタンパク質機能を操作する「オプトジェネティクス (光遺伝学)」が注目されているが、ケモジェネティクスは (光ではなく) 化合物をタンパク質制御スイッチとして用いる技術であり、オプトジェネティクスよりもその歴史は古い。また、オプトジェネティクスを *in vivo* に展開する場合、基本的に光が届く領域でしか使うことができないが、ケモジェネティクスは小分子化合物を用いるため、化合物の経口もしくは静脈・腹腔内投与などにより、光が届かないような生体深部でのタンパク質機能制御を実現できる。このような利点から、ケモジェネティクスは培養細胞レベルのみならず、組織や個体内の標的タンパク質を化合物で人為的に操作する次世代テクノロジーとして期待されている。

CAR-T細胞療法は、通常免疫機能だけでは完全に死滅させることが難しい難治性のがんに対する治療法として大きな注目を集めている。しかし、CAR-T細胞はその高い免疫活性のために重篤な副作用・毒性を示す可能性があることが問題となっている。米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校のLimらは、キメラ抗原受容体とケモジェネティクスを融合することで、特定の化合物 (ケミカルダイメライザー) の存在下でのみ抗腫瘍活性を示すCAR-T細胞を作り出せることを実証した<sup>5)</sup>。このような小分子応答性スイッチを導入したCAR-T細胞は、化合物の非存在下では活性を示さず、化合物の投与によってその活性をコントロール・調節できるため、通常の (小分子応答機能をもたない) CAR-T細胞よりも毒性が低く、安全な細胞治療を実現できることがマウスを用いた実験により示された。この技術は現在、臨床応用へ向けた研究が展開されている。また、米国ジャネリアリサーチキャンパスのSternsonらは、禁煙補助薬であるバレニクリンの誘導体に応答して活性化する高親和性人工イオンチャネルを創製し、マウスや猿といった動物の神経細胞の活性を *in vivo* で制御することに成功している<sup>6)</sup>。このように、ここ数年で、動物の神経細胞や免疫細胞の活性を化合物を用いて *in vivo* でリモート操作することが可能になり始めており、ケモジェネティクスは今後、基礎研究から医療応用までを指向したさらなる技術開発が盛んになるものと予想される。

### (4) 注目動向

#### 【新展開・技術トピックス】

- ・コバレント阻害剤

多くの小分子阻害剤は標的タンパク質に非共有結合的に結合してその機能を可逆的に阻害する。これに対

して、標的タンパク質と共有結合を形成してその機能を不可逆的に阻害する薬剤を「コバレント阻害剤」と呼ぶ。コバレント阻害剤は、強力で持続的な薬理効果を発揮することができるばかりでなく、従来の可逆的薬剤では標的とするのが困難であった (undruggable な) タンパク質に対する阻害剤を提供できる可能性があることから、創薬における重要なモダリティの一つとして注目されている<sup>7)</sup>。特に近年、その開発が盛んになり、腫瘍関連のキナーゼを標的としたコバレント阻害剤開発が成功を収めている。例えば、非小細胞肺癌治療薬として上市されたアフアチニブ (Boehringer Ingelheim) やオシメルチニブ (AstraZeneca) は代表的なコバレント阻害剤で、上皮成長因子受容体 (EGFR) の ATP 結合ポケット内で Cys797 と共有結合してキナーゼ活性を不可逆的に阻害する。これらのコバレント阻害剤はゲフィチニブ耐性の EGFR 二重変異体 (L858R/T790M) も強力に阻害し、可逆的薬剤に対する耐性の克服にも成功している。また最近では、長年 undruggable だと考えられてきた KRas (G12C) に対するコバレント阻害剤となる AMG510 が Amgen 社によって開発され、第 II 相試験へと進んでいる<sup>8)</sup>。

#### ・ プロテインノックダウン創薬

小分子阻害剤の標的のほとんどは酵素である。そのため、酵素活性のないタンパク質に対して有効な分子標的薬を開発することは一般的に難しく、細胞の全タンパク質のおよそ 7 割が undruggable な標的とされてきた。これら undruggable な標的タンパク質に対する新しい創薬コンセプトとして、化合物を使って標的タンパク質を選択的に分解する「プロテインノックダウン創薬」が注目を集めている<sup>11), 9)</sup>。これまでに報告されたプロテインノックダウン活性を示す化合物には、E3 モジュレーター、キメラ化合物 (PROTAC や SNIPER)、DUB 阻害剤がある。例えば、E3 モジュレーターとして知られるサリドマイド誘導体は、E3 コビキチンリガーゼ複合体中の CRBN と転写因子 IKZF1 (あるいは IKZF3) の結合を媒介し、それら転写因子のコビキチン化とプロテアソームによる分解を誘導することで、多発性骨髄腫への治療効果を生じる<sup>10)</sup>。有本が開発した AUTAC では、オートファジーを利用することで、機能不全ミトコンドリアなど、非タンパク質を含むさまざまな基質を分解できることが示されている<sup>2), 11)</sup>。キメラ化合物を用いるアプローチでは、それ単独では薬剤として有効な活性や効能を示さなかった化合物を PROTAC などに展開することで、新しいプロテインノックダウン化合物として再活用 (repurposing) できる可能性がある点も大きな魅力である。プロテインノックダウン創薬は世界中で注目を集めており、競争が激化している。

#### ・ RaPID システムによる特殊環状ペプチド創薬

東京大学の菅が開発した「RaPID (Rapid Peptide Integrated Discovery) システム」は、N-メチル化や人工側鎖といった特殊官能基を持つ多様な ( $10^{13}$  以上の) 環状ペプチドライブラリーの中から、さまざまな標的分子に対する高親和性ペプチドリガンドを効率良くスクリーニングすることのできる日本発の技術である<sup>12)</sup>。PeptiDream 株式会社のコア技術として、世界中の製薬企業との連携のもと、創薬展開が繰り広げられている。最近では、 $\beta$ アミノ酸<sup>13)</sup> やアミノ安息香酸<sup>14)</sup> の導入も可能になり、RaPID システムに適用できる特殊ペプチド・ペプチドミメティクス構造 (ケミカルスペース) の多様化・拡張が進んでいる。本技術は、さまざまな基礎研究・創薬研究に展開可能な標的分子特異的リガンドを取得するための革新的プラットフォームとして、今後ますます重要性が高まるものと期待される。

#### ・ ケモジェネティクス (化学遺伝学)

化合物でタンパク質を制御する方法論の一つで、特定の化合物に応答して機能が変化するようにエンジニア

リングした人工タンパク質を用いる手法（化合物とタンパク質工学の融合技術）である。ケモジェネティクスでは、改変型タンパク質を細胞や組織に外来発現させて使用するため、その発現細胞特異的に標的タンパク質を制御することができる。また、既存の化合物を用いてさまざまなタンパク質を制御できるため、拡張性と汎用性にも優れている。現在、細胞内のさまざまなタンパク質の活性・相互作用・局在・分解などを制御するためのケモジェネティクスツールの開発が海外を中心に精力的に進められており、生命科学、脳神経科学、細胞治療などの領域で積極的に利用されるようになってきた。ゲノム編集技術やin vivo 遺伝子導入技術などとの融合により、化合物でタンパク質機能、そして細胞機能を自在に操るための基盤技術としてさらなる発展が期待されており、臨床応用も視野に入れた研究が展開されている。

・ DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug)

動物脳内の特定の神経細胞の機能・活性をin vivoで特異的にオン/オフ制御する技術は、脳機能や神経疾患の理解のための強力なツールとなる。DREADDは、合成リガンドによって活性化される改変型GPCRを用いたケモジェネティックシステムであり、改変型GPCRを発現した神経細胞の活性を特異的に操作することができる<sup>15)</sup>。その代表例として、クロザピン-N-オキシド(CNO)と、CNOによって活性化される改変型M3ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)のペアがある<sup>16)</sup>。この改変型受容体は、内在性のアセチルコリンには応答せず、合成リガンドCNOにのみ応答し、一方、CNOは薬理的に不活性である。すなわち、mAChRを発現させた神経細胞を特異的にCNOでのみ活性化することができる。最近では、CNOよりも性能と安全性を大幅に高めた改変型受容体作動薬DCZが放射線医学総合研究所のグループから報告され、サルを用いた実験でその有効性が確認された<sup>17)</sup>。同様の原理をイオンチャンネルに適用した技術(LGIC:Ligand-Gated Ion Channel)の開発も進んでおり<sup>6), 18)</sup>、in vivoでの薬効・薬理動態・直交性などに優れた化合物をいかに見いだしていくかが重要な焦点となっている。

・ 化学誘導二量化法

タンパク質-タンパク質間相互作用は、生命現象や細胞内シグナル伝達を制御する普遍的原理の一つである。化学誘導二量化法は、ケミカルダイメライザーと呼ばれる化合物を用いて二種類のタンパク質を人為的に結合・相互作用・近接させる技術で、細胞内のタンパク質の活性や局在をケモジェネティックに制御するための基盤ツールとなっている<sup>19)</sup>。最も代表的な化学誘導二量化法として、免疫抑制剤ラパマイシンによるFKBPとFRBの二量化システムが知られており、これを利用した細胞内シグナル分子操作ツールが細胞生物学研究でその威力を発揮してきた<sup>20)</sup>。近年では、化学誘導二量化法の原理を生命研究ツールのみならず、創薬や細胞工学へと応用展開しようとする流れになっている。上述のプロテインノックダウン技術(PROTACやAUTACなど)やCAR-T細胞の活性スイッチなど、化学誘導二量化法を基盤とする次世代バイオテクノロジー・創薬技術が創出され始めている。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

・ AMED創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS)

オールジャパン体制による創薬研究支援システムであり、医薬品開発などの実用化を指向したライフサイエンス研究やケミカルバイオロジー研究が展開されている。

・ JST ERATO 浜地ニューロ分子技術プロジェクト (2018～2022 年度)

脳・神経系の分子レベルでの理解と操作を革新するケミカルバイオロジー技術の開発が進められている。特に、配位結合を利用したAMPA型グルタミン酸受容体の構造制御技術<sup>23)</sup>や、金属錯体-アゴニストコンジュゲートを用いたGPCR活性化技術<sup>24)</sup>などは、京都大学の浜地格が独自に開発した日本発のケモジェネティクスツールとして内外の注目を集めており、その *in vivo* 展開に期待が寄せられている。

・ 文部科学省科研費 新学術領域研究

・ 「化学コミュニケーションのフロンティア」(2017～2021 年度)

本新学術領域の中で、生物機能を制御する化学コミュニケーションの理解や、新規天然物リガンド・生物活性化合物の探索などが推進されている。

・ 「分子夾雑の生命化学」(2017～2021 年度)

本新学術領域では、細胞内の分子夾雑環境下で使用できる分子ツールの開発を大きな目標の一つに掲げており、生体分子制御のための独自のケミカルバイオロジー研究が展開されている。特に、標的コバレント阻害剤の開発においては、標的タンパク質と共有結合を形成するための新しい反応性基の開発が待たれている中、本領域から新規のクロロフルオロアセトアミド (CFA) 基<sup>21)</sup> や N-アシル-N-アルキルスルホンアミド (NASA) 基<sup>22)</sup> が開発され、当該領域を世界的にリードしている。

・ 「ケモテクノロジーが拓くユビキチンニューフロンティア」(2018～2022 年度)

本新学術領域の中で、ユビキチン・プロテアソーム系を利用したプロテインノックダウン創薬やタンパク質分解制御技術の開発が強力に推進されている。

## (5) 科学技術的課題

・ コバレント阻害剤

コバレント阻害剤では、リガンド結合ポケットの近傍にある求核性アミノ酸と求電子性反応性基が化学反応を引き起こすことで、阻害剤と標的タンパク質間に共有結合が形成される。現在、マイケルアクセプターを反応性基として有するコバレント阻害剤が最も多いが、マイケルアクセプターはシステイン側鎖と反応するため、リガンド結合ポケット周辺にシステイン残基を有するタンパク質にしか適用できない。リガンド結合ポケット周辺のアミノ酸の種類は標的タンパク質によって異なるため、さまざまな標的タンパク質に対するコバレント阻害剤を開発していくためには、さまざまなアミノ酸側鎖に対応するための反応性基レパートリーを飛躍拡張することが急務である。そのためには、タンパク質の化学修飾のための有機化学のさらなる発展が不可欠である。

また、標的コバレント阻害剤のケミストリーにおいては、反応性基と求核性アミノ酸との近接効果が共有結合形成反応の効率を決める重要な因子となる。そのため、高効率なコバレント阻害剤を設計・創製するためには、リガンドが標的タンパク質に結合した際の反応性基と標的アミノ酸の空間配置をその動態も含めて事前に精度よく予測することのできる技術の開発が望まれる。今後、*in silico* ドッキングやモデリングなどの計算化学との融合が重要な課題となるであろう。

・ プロテインノックダウン創薬

プロテインノックダウン創薬は、現在、世界中で競争が激化している。今後は、タンパク質分解誘導剤の創製に必須である E3 リガーゼリガンドや、標的タンパク質特異的リガンドのさらなる探索・開発が重要な焦点の一つとなる。特に、組織特異的に発現する E3 リガーゼのリガンドや経口投与が可能なリガンドは多くの興

味を集めている。タンパク質分解誘導剤の中でも、キメラ化合物を基盤とする PROTAC は汎用性と拡張性に優れるが、高効率な標的タンパク質分解を誘導するためのリガンドとリンカー（つなぎ方）を予測することは非常に困難である。そのため、リガンドやリンカー構造の異なる多数の候補化合物ライブラリーを高効率に短期間で構築することのできる合成技術やオートメーション化、およびそのスクリーニングプラットフォームの確立も重要な鍵となる。

・ペプチドリガンドの低分子化技術

現在、mRNA ディスプレイや RaPID システムなどの分子進化工学的手法を利用することで、標的タンパク質特異的な（特殊）ペプチドリガンドを短期間で取得することが可能になった。その一方、ペプチドリガンドは細胞膜透過性が低い、酵素分解を受けやすい、体内動態が悪い、などの欠点も多い。そのため、ペプチドリガンドの低分子化が中分子創薬における重要課題の一つとなっており、第一三共株式会社の TaNeDS をはじめ、複数の製薬企業ではそのためのシーズ技術の探索・開拓に力を入れている。ペプチドミメティクスとなるような中分子化合物は、タンパク質-タンパク質間相互作用（PPI）阻害剤のためのモダリティとして以前より注目を集めているが大きくは進展しておらず、ブレイクスルーが待たれている。

・ケモジェネティクス

ケモジェネティクスは、さまざまな標的タンパク質の化合物による制御を実現するための汎用的なコンセプトとしてさらなる発展が期待される。特に今後は、標的タンパク質の *in vivo* での制御を実現するケモジェネティクスシステムの開発が大きな課題の一つである。*in vivo* ケモジェネティクスに適した化合物の探索においては、抗ウイルス治療薬のような、ヒトや動物の内因性分子には作用しない臨床承認薬を用いるというアプローチが現在注目されている。抗ウイルス治療薬を化合物として用い、その標的となるウイルス由来タンパク質をリガンド結合タンパク質として利用することで、生体直交性の高いケモジェネティクスシステムを創製することができる。*in vivo* ケモジェネティクスが汎用的な技術となることで、免疫細胞や神経細胞をはじめとする、さまざまな細胞の機能を生きた動物やヒトの体の中で操作するという新しい展開が切り拓かれる。

**(6) その他の課題**

ケミカルバイオロジーは、化学と生物学の融合領域であるため、化学者と生物学者の連携が極めて重要である。欧米ではそのような連携・共同研究が当たり前のように行われているにも関わらず、日本では分野横断的な連携に対する垣根がいまだに非常に高いというのが現状である。

ケミカルバイオロジーの分野では、サポーティングインフォメーションの普及により、論文を一報通すためにかなりの量の実験を要求される場合が増えている。分野のレベルが上がっている証拠であり、素晴らしいことではある一方、国内では（戦力、時間、予算の不足のために）この要求をこなすのが困難な研究者が増えており、当該分野における発表論文数の低迷につながっている。特に、ケミストリーを専門とするケミカルバイオロジー研究者にはその傾向が強く、細胞レベルの実験までは行えても、組織や個体レベルの実験を要求された際に対応できない場合が多い。このような状況を打破し、日本のケミカルバイオロジーを強化するためには、化学者と生物学者との有機的な連携が不可欠であり、それを実現するための体制や仕組みを整備することが急務である。また、欧米との競争に負けない独創的なケミカルバイオロジー研究を展開するためには、ツール開発者は、生命科学ではどのようなツールが求められているのか、そのニーズを正確に把握する必要があり、生物学者は、どのような最新ツールが開発されているのか、またそれをどのように使えば、どのよう

2.4  
俯瞰区分と研究開発領域  
分子・細胞  
基礎基盤科学技術

な新しい実験が可能になるのかをいち早く知る必要がある。このような、ツール開発者とツールユーザーの連携の場を、学会などを利用して、今後より積極的に企画していくことも重要であろう。

(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"> <li>天然物化学や生物有機化学をバックグラウンドとして持つ研究者がケミカルバイオロジーの分野に参画し、日本独自のケミカルバイオロジーが次第に確立しつつある。</li> <li>AMED BINDSにおいて、オールジャパン体制で医薬品開発を指向したケミカルバイオロジー研究が展開されている。</li> <li>新学術領域研究「化学コミュニケーション」の中で、生物活性化合物の開発に関する研究が精力的に展開されている。</li> <li>新学術領域研究「分子夾雑化学」では、標的コバレント阻害剤のための新しい反応性基の開発において世界をリードしている(京大 浜地、九大 王子田など)。</li> <li>金属錯体を利用した神経伝達物質受容体やGPCRの人工制御法(京大 浜地)や、タンパク質局在制御化合物(名工大 築地)など、ケモジェネティクスツールの開発においても、卓越した成果を上げている。</li> <li>京大浜地によるERATOプロジェクトが発足し、脳・神経系の理解を制御のためのケミカルバイオロジー技術の創出に期待が寄せられている。</li> <li>新学術領域研究「ケモユビキチン」の中で、プロテインノックダウン創薬を目指した研究が展開されている。</li> <li>プロテインノックダウン技術に関して、サリドマイド(東京医 大半田)、SNIPER(NIHS 内藤)、AUTAC(東北大 有本)、AID法(遺伝研 鐘巻)など、日本発の独自技術の開発に成功している。</li> <li>蛍光イメージングプローブの開発においても、東大浦野を筆頭に、日本の強みを見せている。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>エーザイ株式会社やファイメクス社がプロテインノックダウン創薬に力を入れている。</li> <li>PeptiDream 株式会社が成功モデルとして飛躍的成長を見せる一方、これに後続するような成功例が出てきていない。</li> <li>中規模企業と比べると、基礎研究の産業展開を橋渡しする役目となるベンチャー企業が圧倒的に少ない。</li> </ul>
米国	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>ケミカルバイオロジーの発祥の地であり、当該分野を世界的に牽引している。研究資金もトップクラスで、優秀で活力のある人材が豊富で流動性も高く、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。</li> <li>圧倒的な研究者人口の利もあり、米国内のさまざまな大学や研究所から、新しい独自の生物活性化合物やケミカルバイオロジーツールが誕生している。</li> <li>化学誘導二量化技術の細胞生物学への応用研究は、ジョンズホプキンス大のInoueとスタンフォード大のMeyerが先駆的存在であり、最近ではInoueらによって化学誘導三量化技術が報告された。</li> <li>ケモジェネティクスツールのin vivo応用を指向した研究がすでに展開されており、CAR-T細胞や神経細胞のin vivoでの活性制御に成功し始めている。</li> <li>Jenalia Research Campusでは、化学ラボと生物ラボの融合研究が非常に多くの成功を収めており、Science誌やNature誌に多数の論文を発表している。特筆すべきは、Jenalia Research Campusでは、Lavisのラボが唯一の化学ラボで、そこに最先端のバイオロジーの情報が集まる形で共同研究が展開されている点である。</li> </ul>

2.4 俯瞰区分と研究開発領域  
基礎盤科学技術  
分子・細胞

	応用研究・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>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・大規模企業がクラスターを形成しており、アカデミアとの情報交換も障壁がなく、アカデミア発のシーズ技術がすぐに産業展開できる体制が整っている。</li> <li>PROTACsを基盤としたベンチャー企業Arvanis社の設立後、多くのベンチャーが設立され、プロテインノックダウン創薬の競争が加速している。最近では、細胞外タンパク質の分解を誘導可能なLYTACsを基盤としたLycia Therapeutics社も設立された。</li> <li>Cell Design Labs社では、小分子応答性CAR-T細胞を「Throttleテクノロジー」として臨床応用へ向けた研究を展開している。</li> </ul>
欧州	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>ドイツ、スイス、英国の三ヶ国を中心として、ケミカルバイオロジーを牽引する実力がある。特に、スイスのETH、ドイツのマックスプランク研究所とEMBL、英国トップ大学からは、素晴らしい研究成果が継続的に発表されている。</li> <li>ケミカルバイオロジーでは、ドイツのWaldmannのグループが圧倒的なマンパワーと実績を有しており、独自の化合物ライブラリーを駆使してさまざまな生物活性分子を次々と見出している。</li> <li>化学誘導二量化工具においては、ドイツのSchultzやWuのグループが卓越した成果を上げている（現在は米国に異動）。</li> <li>タンパク質ラベリングタグである「SNAP-tag」の発明者であるJohnssonが最近では、ケモジェネティクスツールの開発に力を入れており、小分子応答性Nanobodyの開発などに成功している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>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。ドイツ、英国も新薬を創出できる実力を維持しているが、ベンチャー企業設立や新産業創出へ向けた取り組みは限定的のようである。</li> </ul>
中国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>海外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、海外で研鑽を積んだ優秀な研究者が中国に戻り、研究レベルが確実に向上している。</li> <li>有機合成が強い研究室も多いため、ケミカルバイオロジーには力を入れており、新規生物活性化合物の同定などの論文発表数も多い。</li> <li>ケモジェネティクスに関しては、今のところ目立つ研究者はいないが、北京大学のPeng Chenなどは非天然アミノ酸導入技術を駆使した人工機能性タンパク質の創製などでトップクラスの論文を多数発表している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>海外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、海外で研鑽を積んだ優秀な研究者が中国に戻り、研究レベルが確実に向上している。</li> <li>ケミカルバイオロジー関連産業では、独自性の高い社会実装した例は限定的と思われる。</li> </ul>
韓国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>Young-Tae Chang、Seung Bum Park、Injae Shinの3名は韓国のケミカルバイオロジーの代表的研究者であり、3名とも独自の研究スタイルで卓越した成果を上げている。</li> <li>Won Do Heoがオプトジェネティクスの分野で独創的なツール開発を展開しており、世界を牽引している。</li> </ul>
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>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は少ない。新薬を開発できる規模の製薬産業基盤が整っていない。</li> </ul>

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

## 参考・引用文献

- 1) G. M. Burslem and C. M. Crews, “Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery”, *Cell* 181, no. 1 (2020) : 102–114. doi : 10.1016/j.cell.2019.11.031
- 2) D. Takahashi et al., “AUTACs : Cargo-Specific Degraders Using Selective Autophagy”, *Mol. Cell* 76, no. 5 (2019) : 797–810. doi : 10.1016/j.molcel.2019.09.009
- 3) S. M. Banik et al., “Lysosome-Targeting Chimeras for Degradation of Extracellular Proteins”, *Nature* 584, no. 7820 (2020) : 291–297. doi : 10.1038/s41586-020-2545-9
- 4) N. Ohoka et al., “In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) -Dependent Protein Erasers (SNIPERs)”, *J. Biol. Chem.* 292, no. 11 (2017) : 4556–4570. doi : 10.1074/jbc.M116.768853
- 5) C. Y. Wu et al., “Remote Control of Therapeutic T Cells Through a Small Molecule-Gated Chimeric Receptor”, *Science* 350, no. 6258 (2015) : aab4077. doi : 10.1126/science.aab4077
- 6) C. J. Magnus et al., “Ultrapotent Chemogenetics for Research and Potential Clinical Applications”, *Science* 364, no. 6436 (2019) : eaav5282. doi : 10.1126/science.aav5282
- 7) 進藤直哉, 王子田彰夫「コバレント阻害剤の標的特異性向上を目指した新規反応基の探索と EGFR 阻害剤への応用」, *MEDCHEM. NEWS* 27, no. 2 (2017) : 92–99. <https://ci.nii.ac.jp/naid/130007685118> (2020年12月19日アクセス)
- 8) J. Canon et al., “The Clinical KRAS (G12C) Inhibitor AMG510 Drives Anti-Tumor Immunity”, *Nature* 575, no. 7781 (2019) : 217–223. doi : 10.1038/s41586-019-1694-1
- 9) 内藤幹彦「プロテインノックダウン技術の沿革と今後の展開」『実験医学』内藤幹彦編, 第38巻14号 (東京：羊土社, 2020) 2300–2304.
- 10) 伊藤拓水, 半田宏「サリドマイドの作用機序とセレブロンモジュレーター」『実験医学』内藤幹彦編, 第38巻14号 (東京：羊土社, 2020) 2310–2314.
- 11) 高橋大輝, 有本博一「オートファジー創薬の扉をひらく AUTAC の開発と展望」『実験医学』内藤幹彦編, 第38巻14号 (東京：羊土社, 2020) 2331–2336.
- 12) T. Morioka et al., “Selection-Based Discovery of Macrocyclic Peptides for The Next Generation Therapeutics”, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 26 (2015) : 34–41. doi : 10.1016/j.cbpa.2015.01.023
- 13) T. Katoh et al., “Ribosomal Synthesis and De Novo Discovery of Bioactive Foldamer Peptides Containing Cyclic  $\beta$ -Amino Acids”, *Nat. Chem.* 12, no. 11 (2020) : 1081–1088. doi : 10.1038/s41557-020-0525-1

- 14) T. Katoh and H. Suga, “Ribosomal Elongation of Aminobenzoic Acid Derivatives”, *J. Am. Chem. Soc.* 142, no. 39 (2020) : 16518–16522. doi : 10.1021/jacs.0c05765
- 15) D. J. Urban and B. L. Roth, “DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) : Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility”, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55 (2015) : 399–417. doi : 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803
- 16) B. N. Armbruster et al., “Evolving the Lock to Fit the Key to Create a Family of G Protein-Coupled Receptors Potently Activated by an Inert Ligand”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, no. 12 (2007) : 5163–5168. doi : 10.1073/pnas.0700293104
- 17) Y. Nagai et al., “Deschloroclozapine, a Potent and Selective Chemogenetic Actuator Enables Rapid and Neural and Behavioral Modulations in Mice and Monkeys”, *Nat. Neurosci.* 23 (2020) : 1157–1167. doi : 10.1038/s41593-020-0661-3
- 18) C. J. Magnus et al., “Chemical and Genetic Engineering of Selective Ion Channel–Ligand Interactions”, *Science* 333, no. 6047 (2011) : 1292–1296. doi : 10.1126/science.1206606
- 19) B. Z. Stanton, E. J. Chory and G. R. Crabtree, “Chemically Induced Proximity in Biology and Medicine”, *Science* 359, no. 6380 (2018) : eaao5902. doi : 10.1126/science.aao5902
- 20) R. DeRose, T. Miyamoto and T. Inoue, “Manipulating Signaling at Will : Chemically-Inducible Dimerization (CID) Techniques Resolve Problems in Cell Biology”, *Pflugers Arch.* 465 (2013) : 409–417. doi : 10.1007/s00424-012-1208-6
- 21) N. Shindo et al., “Selective and Reversible Modification of Kinase Cysteines with Chlorofluoroacetamides”, *Nat. Chem. Biol.* 15, no. 3 (2019) : 250–258. doi : 10.1038/s41589-018-0204-3
- 22) T. Tamura et al., “Rapid Labeling and Covalent Inhibition of Intracellular Native Proteins Using Ligand-Directed *N*-Acyl-*N*-Alkyl Sulfonamide”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 1870. doi : 10.1038/s41467-018-04343-0
- 23) S. Kiyonaka et al., “Allosteric Activation of Membrane-Bound Glutamate Receptors Using Coordination Chemistry within Living Cells”, *Nat. Chem.* 8, no. 10 (2016) : 958–967. doi : 10.1038/nchem.2554
- 24) R. Kubota et al., “Chemogenetic Approach Using Ni (II) Complex–Agonist Conjugates Allows Selective Activation of Class A G-Protein-Coupled Receptors”, *ACS Cent. Sci.* 4, no. 9 (2018) : 1211–1221. doi : 10.1021/acscentsci.8b00390

## 2.4.7 合成生物学 (人工生体高分子・人工細胞合成)

### (1) 研究開発領域の定義

合成生物学は、生体高分子を組みあわせることを研究手段とする研究開発領域である。合成生物学のアプローチは大きく分けて、top-downとbottom-upに大別される。前者は主として、ゲノム編集技術などにより細胞をリデザインするもの、後者は、主として細胞を構成する生体分子やそれに改変を加えた分子を用いて、現在の生命の規格を超えた人工生体高分子、ないしは細胞の機能・性質の一部を持つ人工の分子システム(人工細胞)を構築する研究領域をいう。合成生物学は、「ありえた生命」をつくることで生命を理解するという理学的な側面と、作る手段の進展を活かして人類にとって有用な分子や生命システムを構築するという工学・医学的な側面が共存している。Top-downアプローチは、発酵・代謝工学の発展形としての有用分子生産が注目され産業化のフェーズに入りつつある一方で、bottom-upアプローチはまだ理学的な側面が大きい領域である。

後者が本稿で概説する合成生物学 (人工生体高分子・人工細胞合成) に対応する。

### (2) キーワード

ボトムアップ生物学、In vitro 合成生物学、蛋白質工学、核酸工学、進化分子工学、人工生体高分子、Xenobiology、人工細胞、遺伝暗号、生命システム、自己複製、遺伝子合成・長鎖DNA合成・ゲノム合成、無細胞翻訳系、マイクロタス (mTAS)、ELSI、バイオセキュリティ

### (3) 研究開発領域の概要

#### [本領域の意義]

ゲノム解読プロジェクト以降の遺伝子情報の蓄積と長鎖DNA合成技術の発展により、種々の生物から必要な生体高分子の遺伝子を集積することで、任意の機能を有する細胞を構築できると期待されていたが、実際には困難であることが明らかになった。DNA配列を大規模に決定するのみでは任意の機能をもつ細胞を組み立てることができず、どのように組み立てるのかを解明する研究が進められている。

生体分子を組み合わせることを研究手段とする合成生物学分野についても、情動的基盤、物質供給基盤が揃い、情報と分子を大規模に蓄積・合成できるようになった今だからこそ、実際に分子を組み合わせて、理学・工学的に有用な人工システムを実装するための学理を構築する研究領域が重要になっている。本研究領域は、構築を目指す階層の違いにより、生体内で機能する素子としての人工生体高分子と、細胞の機能・性質を有するシステムとしての人工細胞の2つに分かれる。

人工生体高分子は、普遍遺伝暗号に含まれる4種類の塩基と20種類のアミノ酸以外のビルディングブロックを活用して、人工的に選別した遺伝情報によって合成される生体高分子のことをいう。天然のビルディングブロックを用いても天然の生体高分子とは異なる遺伝子の起原を持つ(完全ランダムライブラリから得られた)生体高分子も対象に含む。世界的には、非天然アミノ酸・塩基を用いた研究は、Xenobiologyとも呼ばれる。非天然アミノ酸や塩基、コドンを用いた合成を行なうためには、それを利用するtRNAやポリメラーゼといった転写・翻訳に関わる生体分子も非天然のものを導入する必要があるため、人工生体高分子生成のための基盤として、セントラルドグマの改変が重要な研究対象となっている。理学的な研究の意義としては、つくること理解をすすめる構成的アプローチと、1回きりの進化の産物である現在の地球生命の共通規格に縛られない「ありえた生命」の具現化である。工学面での意義は、複雑なシステムを構築するための技術確立とし

ての基礎工学と、直近の産業・医学応用を目指した人工物の作成にあると言える。

人工細胞は、主として細胞を構成する（天然の）生体分子を用い、細胞の機能・性質の一部を持つ分子システムの構築を目指す研究である。理学的な研究の意義としては、構成的アプローチによる細胞システムの理解である。単純なモデル生物である大腸菌でさえ、数千万以上の分子から構成されてにもかかわらず僅か20分で自らのコピーを正確に作り出すことができる。また、内部状態を変化させることで様々な環境条件に適応し生育する。このような驚異的な自己複製能力、環境適応能力がどのようなメカニズムから構成されているのか、また、どのように誕生したのか。自己複製能力、環境適応能力をもつ人工細胞をボトムアップに作ることであれば、これらの性質を持つ分子システムを構築する十分条件が明らかになる。加えて、本研究領域では、非生物から生物を構築するため、非生物と生物の境界が明らかにできることが期待される。工学的観点では、天然の細胞に対してシステムの設計自由度やモジュラリティが高いという点が期待されている。人工細胞は、既知の物質のみから構成されているため、構成成分を自由に調整することが出来る。この利点を生かせば、原理的には人工細胞に望みの機能を付与することが可能となる。同様に不要な性質を持たないようにデザインすることも可能である。これは「生きている」ことを絶対条件とする細胞にはない性質である。従って、医療応用、バイオセンサー、物質生産などに資する人工細胞をデザインできることが期待される。

分子を大規模に組み合わせる開発を効率よく進めるためには、組み合わせ爆発への対応が重要となる。人工生体高分子と人工細胞のそれぞれの領域で組み合わせ爆発への対応が少しずつ進んでおり、今まさにさらなる対応策を開発する機運が世界各所で交流しており、本邦からも先導的な研究が発信されている。分子を組み合わせる際には、研究そのものだけでなく、組み合わせるための視野を持った標準化や人材供給も重要となっており、これらに対応する動きも世界的に進んでいるが、本邦では若干の遅れがみられる状況である。

### 【研究開発の動向】

ゲノム編集技術などにより細胞をリデザインするtop-downの研究は、大きな進展を見せており、マイコプラズマ、大腸菌、酵母などのゲノムの全合成などが報告されている<sup>1)</sup>。これは、大規模に決定されたゲノム配列を活かして任意の機能をもつ細胞を組み立てるためには、DNAの配列を計算機中で適切にデザインするのみならず、そのデザインされた長鎖DNAを実際に物質として調製できる、という点から非常に重要な研究である。具体的には、Sc2.0やGP-writeなどのプロジェクトがこれに相当する。加えて、ゲノム編集技術を用いた宿主の改変による医薬品、バイオ燃料生産・産業化に成功しており、基礎から応用までが出そろった研究分野として確立されたと考えて良い<sup>2-5)</sup>。一方、bottom-up的なアプローチによる研究については理学的な研究が中心で、特に人工細胞についてはまだ産学連携・社会実装のフェーズに到達していないと考えるのが妥当であろう。

人工生体高分子の合成と人工細胞の創出、それぞれの動向を記した後、共通する領域の動向を説明する。

### 【人工生体高分子】

人工生体高分子研究の源流は、人工進化（Directed evolution）を核酸に適用したin vitro selectionによりRNAアプタマーを創出した研究事例にあると言える<sup>6), 7)</sup>。進化の初期集団として、天然の生体高分子ではなく完全にランダムな配列の核酸断片ライブラリを用いることで、「進化を1からやりなおせる」ことを示した。また、種々のリボザイムの合成は、RNAワールドが存在したという状況証拠を提供し、現在の地球生命には見られないフォールドの具現化といったタンパク質の人工進化研究についても、生体高分子の可能性を広く示すこととなった。

セントラルドグマの改変については、人工塩基対を形成するヌクレオチドや非標準アミノ酸を酵素によって生体高分子に取り込む系を創出した研究事例に源流を見ることができる<sup>8), 9)</sup>。機能性高分子の構成要素である原子団（タンパク質ではアミノ酸）とその遺伝情報を記したデジタル配列（塩基配列）のバリエーションを増やせば、高分子の機能の幅も広がる、という発想に基づいた研究である。ヌクレオチドの種類については新たな核酸塩基をデザインする有機化学が、アミノ酸の種類についてはtRNAとこれにアミノ酸を付加するアミノアシルtRNA合成酵素の改変が、それぞれ研究の鍵であった。最近では、非天然アミノ酸を指定するコドンに標準アミノ酸が混入しないように、大腸菌内のゲノム中のコドンを非天然塩基によって記す研究や<sup>10)</sup>、ゲノムをまるごと書き換えたうえで特定のtRNAを欠損させる研究も発表された<sup>11)</sup>。また、非天然アミノ酸を細胞に導入する研究は技術として一般化しており、多くの研究成果が報告されている。さらに、本邦における過去の研究の蓄積から、遺伝暗号を改変できる人材の層は広く、アミノ酸を持たせない人工進化や、意図的に翻訳の正確性を低下させることによる人工進化の効率化など、新技術の萌芽がみられる。

人工生体高分子は、原性が低い、生体内で安定する、といった天然の生体高分子にはない性質を持たせることができるため、理学的研究の成果を応用研究に適用することにより、アプタマー創薬や、さらにセントラルドグマの改変も適用したペプチドセレクションでの創薬リードの創出（菅CRESTなど）に繋がっている。アプタマーの応用については、修飾核酸や（Somalogic社）、光学異性体を用いた安定化<sup>12), 13)</sup>（NOXXON社）により、応用が進んでいる。天然タンパク質を人工進化で改変する研究も巨大な広がりを見せており、人工進化の2018年ノーベル化学賞の授与に繋がった。最近では、計算の能力の向上を活かして、既知の立体構造データを活かしつつも、配列は天然物とは全く異なるタンパク質をデザインする研究も進展している。

人工生体高分子の進化について、本邦の現状では領域としてのまとまりが弱く、また、海外ほどは産業応用に結びついていない。

## 【人工細胞】

細胞を創る研究の重要性は古くから議論され<sup>14)</sup>、Szostak<sup>15)</sup>、Deamer<sup>16)</sup>、Luisi<sup>17)</sup>らがその初期に中心的な役割を果たしてきた。この分野の最終的な目標の一つは、自律的に複製する人工細胞を創ることにある。このためには、細胞の内容物を閉じ込める役割を果たす区画（細胞膜）の複製、遺伝情報の複製という二つの事象が同期して起こるシステムを構築する必要がある<sup>18)</sup>。区画と遺伝情報の複製を再構成する研究は、近年も盛んに行われている。

区画の複製に関しては、脂肪酸を加えるとリン脂質からなる区画（リポソーム）が成長分裂するというLuisiらの初期の研究から<sup>19)</sup>、最近ではリン脂質よりも単純な脂肪酸だけからなる区画の複製が報告されている<sup>20), 21)</sup>。遺伝子の複製に関しては、RNAワールド仮説を実証すべく自己複製するRNAを創り出す試みが長年行われている。RNAをつなぎ合わせるリガーゼの発見に始まり<sup>22)</sup>、それらが最適化され100塩基ほどのRNA分子を伸長できるまでになっている<sup>24), 25)</sup>。しかし自己複製するRNAを創り出すにはまた及ばず、さらに100塩基を繋ぐRNAを創り出すだけに20年以上の歳月が掛かっていることから、原始地球ではRNAだけでは無く他の分子も自己複製に関与していた可能性を示唆している<sup>18)</sup>。実際、ペプチドの存在がリボザイムの活性を著しく向上させることが示された<sup>26)</sup>。加えて、区画と遺伝情報の複製を同期させるには至っておらず、現時点では脂質や脂肪酸の区画内でRNA複製反応を行えることを示すに留まっている<sup>26), 27)</sup>。これらの研究は、非酵素的に化合物でのみ自己複製する人工細胞を創る試みであり、原始地球で起こりえた生命の誕生プロセスを解明する重要な研究である。

一方で、近年、天然に存在する酵素など原始地球には存在しなかった材料を用いて人工細胞を創り出す

試みが盛んに行われ、この方向性の研究が主流になっている<sup>28), 29)</sup>。材料にこだわらず人工細胞を作る研究には2つの意義がある。一つは、原材料は異なるが原始地球にあり得た生命体の一部の特徴・性質を持つ細胞を調製し、その特性を明らかにできる点、もう一つは、現存の細胞の一部の性質を取りだし、これを実験室で再構成した人工細胞を詳しく調べることができる点にある<sup>1), 30)</sup>。何れも、ボトムアップに創った人工細胞であるため構成要素を自在に調整でき、そのため構成要素と細胞全体の性質の関係性を容易に結びつけることができる。

人工細胞を用いることで生命の起源や細胞の性質に関する新たな知見が得られており、研究事例としては、RNA自己複製系を区画することで区画化が寄生体を取り除くのに有効であることを示した例<sup>31-33)</sup>、区画内での遺伝子発現が分子混雑条件や区画サイズに依存することを示した例<sup>34)</sup>。脂質膜の内膜と外膜の脂質組成が膜タンパク質の機能に与える影響を明らかにした例<sup>35)</sup>などが挙げられる。また、人工細胞を用いて、自律的に複製する細胞機能の再現を目指す研究成果も多く報告されている。光によりエネルギー物質を生産する人工細胞<sup>36), 37)</sup>、成長する区画を持つ人工細胞<sup>38), 39)</sup>、巨大遺伝子の複製を行える人工細胞<sup>40), 41)</sup>の構築などが報告されており、少しずつではあるが、自律的に自己複製する人工細胞の構築に近づいていると考えることができる。

合成生物学の中心的課題は、多種の生体高分子を天然には存在しない組み合わせで集積する人工生命システムの構築である。効率の良いシステム構築のために、生体高分子を用いた実験を重視することと同様に、生体高分子システムの挙動を数理モデル化して事前の設計、実験結果を受けた改良の方向を知る、というプロセス (Design-Build-Test-Learn : DBTL サイクル) が重視されている。学際的で分野融合が求められる領域であり、そのため専門性の異なる研究者を集結させる必要がある。米国ではNSFの大型予算に基づいて2006年に設置されたSynBERC<sup>42)</sup>が、非営利の官民連携体であるEBRC (Engineering Biology Research Consortium) へと改組され積極的な活動を行っている。英国では、マンチェスターのSYNBIOCEMを始めとした6つの研究所から成るNational Synthetic Biology Research Centresを組織化した。アジア地域においては、工学寄りの性質が強いAsian Synthetic Biology Association (ASBA) が組織されている。また人工細胞研究においては、Build-a-Cell (アメリカ)、BaSyC (Building a Synthetic Cell) (オランダ)、MaxSynBio (ドイツ)、fabriCELL (イギリス) などの人工細胞構築を目指すコンソーシアムや関連する教育プログラムが海外において次々と設立されている<sup>43-46)</sup>。国内においても、JSTにおいて細胞機能の再構成など、合成生物学を一つの軸としたプロジェクトが運営されたが、各種プロジェクトにおける合成生物学研究は少なく、多くは既存生物学の枠組みが強くなりがちであった。研究者団体としては、2005年に活動を開始した「細胞を創る」研究会を挙げるることができる。

生体高分子を組み合わせる際に今後重要視されることは、標準化である。例えば、ネジにおけるピッチと溝の深さの規格 (産業革命以前の家内制手工業の時代は工房によって規格が異なった)、コンピューターにおけるUSBポートの規格の例にも見られるように、標準化に基づく組み合わせ可能性が、工学の発展の基盤となっていることは間違いない。対して生物学実験については、ラボ固有のプロトコルの存在が標準化に対する阻害となってきた。しかし、組み合わせを重視する合成生物学においては、工学一般と同様に、今後標準化がますます求められるようになることは間違いない。実際、EUのBioroboostなど、すでにいくつかのプロジェクトが進展しつつある。

合成生物に関する人材育成では、2005年から米英で、2006年からアジアを含めた国際展開を行なった結果、近年では毎年4000人近くが集結する大会となっている合成生物学の国際コンテストiGEMが大きく寄与している。

#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

人工生体高分子の進化について、天然とは異なる側鎖や塩基を使用した研究が行われてきたことに対し<sup>47)</sup>、今後は、重合装置の改変を含めたアミノ酸や核酸のバックボーンも変更した研究がより活発に行われていくと考えられる。すでに、核酸のバックボーン変更については、ポリメラーゼの改変事例が報告されている<sup>48)</sup>。アミノ酸についても、 $\beta$ アミノ酸の取り込みなどが、リボソームの改変も含めた研究として報告されつつある<sup>49-50)</sup>。

ゲノム合成による遺伝暗号の改変 (Genome recoding) が、ハーバード大を中心したチームなど各所で進められてきたが、2019年に英国MRCのChinのグループが競争に勝利して、特定のコドンを使わない大腸菌ゲノムを設計し、全合成に成功した<sup>11)</sup>。これまでにストップコドンの一つUAGを持たない菌が合成されたことはあったが<sup>51)</sup>、今回はセンスコドンも改変したという点に大きな意義がある。これら特定のコドンが20種類の標準アミノ酸にも停止コドンにも対応しない場合、そのコドンへの非天然アミノ酸の導入効率は極めて高くなる。また、大澤らによるコドン捕獲説<sup>52)</sup>の手順に則った水平伝搬 (例えばアラニンとセリンのコドンの入れ替わりなど) を起こしにくいという意味で、新たな「生物学的封じ込め」という遺伝子組み換え実験の安全装置になりうる。基盤技術として、約4億塩基ものゲノムを高精度に全合成できたという点も注目される。

人工細胞が持つ共通の性質の一つに内容物を閉じ込めている区画を有している点にある。細胞と同じようにその容積が小さい区画を調製するのに、2000年頃からマイクロデバイスが使われてきた<sup>53)</sup>。本領域が、ここ数年でさらに成熟してきた。これまでは困難であった、均一サイズの人工脂質二重膜小胞 (リボソーム) を創ることが可能になってきた<sup>54-56)</sup>。加えて、その内膜と外膜の脂質組成を調製し、非対称の脂質組成を持つリボソームの調製も可能となってきた<sup>23)</sup>、<sup>51)</sup>。人工細胞の多細胞化技術なども開発されている<sup>58)</sup>、<sup>59)</sup>。マイクロデバイスを用いることで、より生細胞に類似した区画を多く調製することが可能となってきた。技術としてかなり成熟した領域に達したように思われる。

人工細胞に様々な機能を付与する研究が盛んに行われ、高機能化が近年著しく進んできた<sup>28)</sup>。これは人工細胞構築技術の実用化に向けた流れと解釈できる。その中でも着目すべきは、人工細胞内の遺伝子回路を外部環境により操作する技術の開発がある<sup>60-64)</sup>。これにより人工細胞を用いて生細胞を操作することができるようになりつつある<sup>65-67)</sup>。これらの技術は最終的には生細胞の選別など、医療応用分野への展開が考えられる。その他にも、光からエネルギー化合物を生成する人工細胞の構築も報告されており<sup>37)</sup>、<sup>68)</sup>、将来的には太陽光による物質生産が実現する可能性がある。また近年、安定性の高い頑強な材料を用いた微小区画の調製が報告されている<sup>58)</sup>、<sup>69)</sup>。自己複製しない人工細胞であれば、遺伝子改変技術と比較して倫理的な問題は小さく、通常環境中での使用に対する抵抗が低いと考えられる。一方で、これらの研究はモデル実験を示しているに過ぎず、実用化にはまだ遠いと考えられる。

人工細胞を構築する研究の目的の一つは、ボトムアップに自己複製するシステムを構築することである。そのために細胞を模した分子システムを創る研究が行われてきた。これらとは一線を画す研究として、細胞を模擬することに捕らわれずボトムアップに社会実装可能な分子システムを構築する研究の潮流がある。特筆すべきは、Collinsのグループの研究である。彼らは、paper-based sensorという新しい技術を開発した<sup>70-72)</sup>。これは紙に様々な分子から構成される遺伝子反応ネットワークを染み込ませ乾燥させたセンサーである。紙できているので、輸送コストも安く、さらには長期の常温保存も可能である。サンプルをろ紙に染み込ませるだけで、ウイルス、化合物、微生物種などが検出できる。オックスフォードナノポア社が開発した1分子の長鎖DNAの配列を決定できるシーケンサーもボトムアップに構築された分子システムである<sup>73)</sup>。今後、これら

に続く実用化技術が現れることが期待される<sup>74)</sup>。

人工細胞の構築の一つの材料として試験管内でタンパク質を合成する無細胞タンパク質合成系が用いられている。近年、無細胞タンパク質合成系を用いた応用研究の発展が顕在化してきた<sup>75)</sup>。100 Lスケールでの蛋白質合成<sup>76)</sup>、医薬品生産<sup>77)</sup>、非天然アミノ酸を有するウイルス様粒子の調製<sup>78)</sup>、糖鎖修飾タンパク質の生産<sup>79)</sup>などが挙げられる。また、平行して産業界では、Genomatica、Greenlight Biosciences、Sutro Biopharma、Tierra Biosciencesなどの企業がセルフリーでのタンパク質や物質生産に取り組んでいる。

合成生物学の標準化の流れが、欧米で進んできている<sup>80)</sup>。EUではHrizon2020の一つとして、Bioroboostが運営されている。このプロジェクトでは、遺伝子、宿主といった実験材料の標準化だけではなく、デザインツールや知的財産権を含めた政策面までを扱っている。また、実験の安全性評価のためにも標準化が必用である、という観点を、(2017年の細胞を創る研究会のシンポジウムと同様に) 打ち出している。標準化を広める一つの方法が、ある程度の参加人数を持つ集団への強制から、より広い集団へのデファクトスタンダードを目指す方法である。合成生物学の国際学生コンテストiGEMにおける標準化測定は、コンテストのメダル要件とすることで、244チームによる同一サンプルの測定を行うことができた。この測定では、プロモーター強度が異なるGFP発現プラスミドのセットのみならず、かつてのメートル原器のように同一の蛍光物質およびコロイド粒子を各チームに送付することで、機械ごとの感度の違いを補正した<sup>81)</sup>。また、数年間の同様の標準化測定での各チームの失敗を反映したプロトコルとすることで、学部生が大半であるこれらチームによってでも、誤差が極めて小さい(95.5% of teams having residuals less than 1.2-fold) 測定が行えることを示した。顕微鏡の測定においても、標準化の策定と、その基準を満たすことを論文投稿の要件とするような運動が始まっている<sup>82)</sup>。

ソフトウェアハウスの多くが、学生に無料または安価にソフトを提供していることは、最初に習得したソフトを社会人としても継続的に使用する、ということ期待しての経営戦略である。合成生物学の学生コンテストiGEMにも、計算ソフトMATLABや、DNA配列操作ソフトsnapgene、実験データ管理ソフトBenchlingの提供が行われている<sup>83)</sup>。また、合成生物学における分子ネットワーク記述言語SBOLとiGEMとの連携が進みつつあり、将来的に、使用人口の多さからデファクト化が進む可能性がある。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

国内外において、下記のような合成生物学に関するファンディングプロジェクトが進められている。

- ・ Center for Genomically Encoded Materials (C-GEM)<sup>84)</sup>

米国NSFのプロジェクトで、研究チームはUC Berkeleyを中心とした6研究機関からなり、天然の翻訳系を改変してペプチドではないポリマーの合成を目指す。5年間で2,000万ドルの資金を拠出することを2020年に決定した。

- ・ CREST「ゲノムスケールのDNA設計・合成による細胞制御技術の創出」

本研究領域では、ゲノムの構造と機能に関する基本原理の解明および細胞利用に向けた基盤技術の構築に向け、「ゲノムの構造と機能の解明」、「ゲノム設計のための基盤技術」、「ゲノムスケールのDNA合成技術」、「人工細胞の構築」の4つの課題を推進する。「人工細胞の構築」では、設計したゲノムの機能を用いて人工細胞を駆動させることを目指している。

・学術変革領域A「分子サイバネティクス：化学の力によるミニマル人工脳の構築」

外部のシグナルを受け取り自律的に運動するのに必要な最低限の人工脳を実装した化学システムを構築することを目指している。2020年に終了する新学術領域「分子ロボティクス」と同様、試験管内反応系の構築を志向するプロジェクトである。

学際的な研究分野である人工細胞構築を目的として、欧米では以下のようなコンソーシアムや関連する教育プログラムが次々と設立されている。

・ Build-a-Cell (米国)<sup>85)</sup>

2017年にスタートした人工細胞構築コンソーシアム。NSFによる支援を受けている。セミナーなどを主催する、人材交流などが主目的。

・ BaSyC (Building a Synthetic Cell) (オランダ)<sup>86)</sup>

分子を用いてボトムアップに自律的で自己複製可能な合成細胞を作ることとした研究プログラム。2017年に開始。物理学、化学、生物学のバックグラウンドを持つ17人（6研究機関）のチームリーダーが参画。オランダ科学研究機構を含めた複数機関から資金提供を受けている。

・ MaxSynBio (ドイツ)<sup>87)</sup>

2014年にスタートした研究プロジェクト。ドイツ国内の9つのマックスプランク研究所が参画。完全なる人工細胞を再構成することを目的としていないことを明言している。代わりに、特定の機能を持つ人工細胞の構築を目指しており、応用のための技術開発を狙っている。

・ fabriCELL (英国)<sup>88)</sup>

Imperial College London と Kings College London が中心になって運営する人工細胞構築コンソーシアム。2017年に発足。教育プログラムを構築している点で特徴的。

日本では「細胞を創る」研究会が15年前に発足し、その時点では世界的に見ても先駆的であったが、現時点では世界的な情勢から遅れを取っているのが実情である。

## (5) 科学技術的課題

人工進化学において、中長期的に、機械学習とオリゴプール合成の組み合わせが今後ますます盛んになっていくと考えられる。機械学習は、active learning などと呼ばれる方式でライブラリをデザインすることで、これまでに探索していなかった範囲をランダムライブラリを用いる研究と比較して効率よく探索することができる。このようなライブラリのデザインは、ランダムな変異導入によっては困難であるが、遺伝子合成技術の進展により、数万種類のオリゴDNAを10万円程度で供給できるようになっている。その結果、あるラウンドの結果について機械学習を行なうことで、次世代のライブラリを調製する、といった進化学が行われるだろう。核酸アプタマーについては一本のオリゴDNAによって全長をカバーすることも可能であり、容易に達成される。タンパク質についても、DNAシャッフリングと同様にオリゴDNA集団からのコード配列全長がデザインされるようになるだろう。

人工細胞構築については、基礎研究レベルにおいて生細胞が持つ一部の機能を持つ人工細胞を構築した例がいくつも報告されている。一方で、人工細胞を構築することによりどのような理解が進んだのか、今までわからなかった何をどのように明らかにしたのか、こうした問いが明確ではない研究が散見される。生命の起源に関しての知見を与えるのか、もしくは、細胞生物学的に新たな知見を与えるのか、研究の意義を明確し、細胞の機能を模倣したシステムを創ること自体を目的化してはいけない。分野融合研究である人工細胞構築においてその意義や出口が明確でないと、何を旨とする融合研究であるかが不明瞭となり、結果的に分野横断的なコミュニティや人材育成システムの構築が難しく可能性がある。また、実用研究・開発においては、人工細胞の構築という大きな目標と分けて、社会実装可能なスケールの分子システムをボトムアップに構築することを目指す必要がある。

## (6) その他の課題

Top-down・Bottom-upに関わらず、合成生物学における一番の課題は人材育成である。合成生物学の本質は、理論と生物実験を両輪として進める研究サイクルにあり、どちらかを得意とする者は、もう一方の基礎知識を習得していることが望ましい。人工細胞の構築においては、数学、計算科学を専門とする研究者がシステムを設計・デザインし、化学を専門とする研究者が必要な分子を合成し、物理を専門とする研究者が必要なデバイスを開発し、生物を専門とする研究者が生体分子を組み合わせる、といった多分野に跨がる知識と技術が必要である。大学院で実質的な座学もなされるアメリカ型の教育システムでは、システム生物学・合成生物学の専攻の教育が行われている。対して本邦では、大学院教育の実質化が求められる一方、外部資金による限定的な教育プログラムを除けば、そのようなWet-Dry双方を学ぶ教育プログラムや研究組織はほぼない。また、この教育を負荷と感じられることが多いせいか、外部資金のサポート終了後には教育プログラムへの参画者は減少しがちである。また、学部教育についても、ごく一部の学際学科を除くと、有力大学においては古典的な生物学関連の枠組みによる教育が主であることが現状となっている。中長期的な人材育成の方策は学部教育の枠組みの変更であるが、短期的には、学生コンテストのフォーマットの活用も視野に入れるべきであろう。世界的には、年間300チーム4,000人が参加する学生コンテストiGEMが、人材供給エコシステムの基盤になっている。このコンテストには各年100名以上の審判が動員されるが、彼らの何割かが、過去にこのコンテストに学生として参加し、ベンチャー企業やアカデミアでのポストドクや若手PIとなっている人材である。実際、iGEMの企画から、すでに150社以上が起業された、とアナウンスされている<sup>89)</sup>。

「細胞を創る」研究は、人類にとって大きな挑戦である一方、現時点でビジネスとして成立する要素はない。従って、アカデミアが主導している分野であり、今のところ産業界が参入する気配はない。一方で、人工細胞を創る研究から産み出させる分子や分子システムが人に利便性を与えるものとなる可能性が見えてくれば、その時点で直ちに産学連携が始まることが期待される。現時点で、世界のどこにもこのようなシーズは見えていないが、分野横断型のコンソーシアム等により人工細胞構築研究を進めることでいち早くシーズを産みだし、世界をリードするビジネスへと発展させることが期待される。

合成生物学の工学的な活用について期待される一方で、生体や環境、生態系に与える影響が常にリスクとしてある。特に非標準・非天然のビルディングブロックを用いた人工生体高分子を薬剤として用いる際には、生体がこれまで遭遇していなかった化合物を用いることによる副作用が潜在的な懸念として残るだろう。こうした合成生物学に対して生じる不安からの、新規法規制の出現についても留意する必要がある。原理的には、合成生物学については、組換え、および、化合物に対する既存の法規制の体系で理解されることが可能である。しかし、生物多様性の国際会議では、合成生物学に別途の枠組みが求められる、また、組換え体から得られ

たタンパク質等の産物についても、新たにこの規制の枠組みに包含する、といった議論がみられている。逆に、組換え細菌を実験室外で使用する、という動きもみられ、こちらについては既存の制度でカバーされつつも、遺伝子組換え植物の栽培のように大きな議論を巻き起こす可能性がある。合成生物学分野の立場としては、社会一般への丁寧な説明とともに、水平伝搬を起こさない遺伝暗号やキルスイッチなど、リスクを低減する技術開発が必要となる。

(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	◎	↘	一定の成果が見られるものの研究者が単独で進めている個別研究が多く、特に新規な人工生体高分子の創出系については、一時期よりその傾向が強い。非天然アミノ酸の使用については広がりが見られる。人工細胞構築はCREST「ゲノム合成」の課題の1つに挙がるものの、強力に進める機運は見られない。
	応用研究・開発	○	→	人工生体高分子について、核酸アプタマー、ペプチドアプタマーに関するベンチャー企業が一定の収益を得ている。非天然アミノ酸を含有したタンパク質の応用については、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業による一定の成果が得られていた <sup>90)</sup> 。人工細胞の応用研究は、研究者が単独で進めている研究が散見され、一定の成果が見られている。
米国	基礎研究	◎	→	人工生体高分子についてはCenter for Genomically Encoded Materials (C-GEM) のNSFファンディングの効果が大きい。Szostak, Deamer, Joyceらを中心に、酵素を用いることなく人工細胞を構築する研究が数多く行われてきた <sup>15), 16)</sup> 。材料を規定しない人工細胞の構築に関する研究も、世界に先駆けて行ってきた <sup>91)</sup> 。2017年にコンソーシアムを創り、研究が進められている。
	応用研究・開発	◎	→	非天然塩基と非天然アミノ酸を組み合わせた研究を行ってきたRomesbergの設立したSynthorx社がフランスSanofiに23.5億ドルで買収され、今後のタンパク質製剤化が期待される。人工細胞の構築よりも、ボトムアップに実用化に資する分子システムを構築する応用研究が進められている <sup>75), 92)</sup> 。
欧州	基礎研究	◎	↗	MRCのゲノム合成を伴う遺伝暗号の改変は、今後の研究の大規模化のための重要な1ステップであり、さらに、今後の応用研究も期待される。人工細胞構築を目指すコンソーシアムがドイツ、オランダ、英国でそれぞれ出来上がっており、精力的に研究を進めている <sup>44)</sup> 。
	応用研究・開発	○	↗	Xenobiologyとして人工生体高分子の合成を行う研究者が集っており、ChemBioChem誌に特集号を発行した <sup>93)</sup> 。コンソーシアムにおいて、人工細胞の応用展開を見いだすべく研究を精力的に推進している。
中国	基礎研究	△	→	小数の研究グループで、無細胞蛋白質合成系を用いた人工細胞構築に関する基礎研究が精力的に行われている <sup>28), 94)</sup> 。まだ国として目立った動きはない。
	応用研究・開発	○	↗	人工生体高分子については、北京大などの伝統校のみならず深圳地区の積極的な活動がみられる。人工細胞については特に目立った動きはない。

韓国	基礎研究	△	↗	光合成する人工細胞を世界で初めて調製することに成功した <sup>37)</sup> 。まだ国として目立った動きはないが、米国の合成生物学研究室からの留学帰りの若手が独立した研究室を運営し始めており、今後の成長が期待される。
	応用研究・開発	△	→	Asian Synthetic Biology Association (ASBA) の初回が韓国開催であるなど、KAISTの代謝工学を核とした研究が進んでいる。人工細胞については特に目立った動きはない。
シンガポール	基礎研究	△	→	国全体として応用志向が強い
	応用研究・開発	○	↗	人工生体高分子について、Xnobiologyの人材がA*STARに集まっている。また、シンガポール国立大を中心としたFoundryの活動がみられる。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：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 ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

## 参考・引用文献

- 1) R. A. Hughes and A. D. Ellington, "Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology", *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9, no. 1 (2017): a023812. doi: 10.1101/cshperspect.a023812
- 2) S. Auslander, D. Auslander and M. Fussenegger, "Synthetic Biology-The Synthesis of Biology", *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, no. 23 (2017): 6396-6419. doi: 10.1002/anie.201609229
- 3) S. Jagadevan et al., "Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production", *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018): 185. doi: 10.1186/s13068-018-1181-1
- 4) F. Lienert et al., "Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, no. 2 (2014): 95-107. doi: 10.1038/nrm3738
- 5) C. A. Voigt, "Synthetic biology 2020–2030: six commercially-available products that are changing our world", *Nature Communications* 11 (2020): 6379. doi: 10.1038/s41467-020-20122-2
- 6) A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", *Nature* 346, no. 6287 (1990): 818-822. doi: 10.1038/346818a0
- 7) C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", *Science* 249, no. 4968 (1990): 505-510. doi: 10.1126/science.2200121
- 8) D. Kiga et al., "An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific

- incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system”, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, no. 15 (2002) : 9715-9720. doi : 10.1073/pnas.142220099
- 9) L. Wang et al., “Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*”, *Science* 292, no. 5516 (2001) : 498-500. doi : 10.1126/science.1060077
- 10) Y. Zhang et al., “A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information”, *Nature* 551, no. 7682 (2017) : 644-647. doi : 10.1038/nature24659
- 11) J. Fredens et al., “Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome”, *Nature* 569, no. 7757 (2019) : 514-518. doi : 10.1038/s41586-019-1192-5
- 12) W. G. Purschke et al., “An l-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin *in vivo*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, no. 13 (2006) : 5173-5178. doi : 10.1073/pnas.0509663103
- 13) O. Khorkova and C. Wahlestedt, “Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system”, *Nat. Biotechnol.* 35, no. 3 (2017) : 249-263. doi : 10.1038/nbt.3784
- 14) J. W. Szostak, D. P. Bartel and P. L. Luisi, “Synthesizing life”, *Nature* 409, no. 6818 (2001) : 387-390. doi : 10.1038/35053176
- 15) G. F. Joyce and J. W. Szostak, “Protocells and RNA Self-Replication”, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10, no. 9 (2018) : a034801. doi : 10.1101/cshperspect.a034801
- 16) D. Deamer and A. L. Weber, “Bioenergetics and life's origins”, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, no. 2 (2010) : a004929. doi : 10.1101/cshperspect.a004929
- 17) P. L. Luisi, “Toward the engineering of minimal living cells”, *Anat. Rec.* 268, no. 3 (2002) : 208-214. doi : 10.1002/ar.10155
- 18) O. D. Toparlak and S. S. Mansy, “Progress in synthesizing protocells”, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 244, no. 4 (2019) : 304-313. doi : 10.1177/1535370218816657
- 19) N. Berclaz et al., “Growth and transformation of vesicles studied by ferritin labeling and cryotransmission electron microscopy”, *J Phys Chem B* 105, no. 5 (2001) : 1056-1064. doi : 10.1021/jp001298i
- 20) T. F. Zhu and J. W. Szostak, “Coupled growth and division of model protocell membranes”, *J. Am. Chem. Soc.* 131, no. 15 (2009) : 5705-5713. doi : 10.1021/ja900919c
- 21) T. F. Zhu et al., “Photochemically driven redox chemistry induces protocell membrane pearling and division”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, no. 25 (2012) : 9828-9832. doi : 10.1073/pnas.1203212109
- 22) D. P. Bartel and J. W. Szostak, “Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]”, *Science* 261, no. 5127 (1993) : 1411-1418. doi : 10.1126/science.7690155
- 23) E. H. Eklund and D. P. Bartel, “RNA-catalysed RNA polymerization using nucleoside triphosphates”, *Nature* 382, no. 6589 (1996) : 373-376. doi : 10.1038/382373a0
- 24) D. P. Horning and G. F. Joyce, “Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, no. 35 (2016) : 9786-9791. doi : 10.1073/pnas.1610103113
- 25) A. Wochner et al., “Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme”, *Science* 332, no.

- 6026 (2011) : 209-212. doi : 10.1126/science.1200752
- 26) S. Tagami, S. J. Attwater and P. Holliger, “Simple peptides derived from the ribosomal core potentiate RNA polymerase ribozyme function”, *Nat. Chem.* 9, no. 4 (2017) : 325-332. doi : 10.1038/nchem.2739
- 27) D. K. O’Flaherty et al., “Copying of Mixed-Sequence RNA Templates inside Model Protocells”, *J. Am. Chem. Soc.* 140, no. 15 (2018) : 5171-5178. doi : 10.1021/jacs.8b00639
- 28) E. Cho and Y. Lu, “Compartmentalizing Cell-Free Systems : Toward Creating Life-Like Artificial Cells and Beyond”, *ACS Synth. Biol.* 9, no. 11 (2020) : 2881-2901. doi : 10.1021/acssynbio.0c00433
- 29) N. Laohakunakorn et al., “Bottom-Up Construction of Complex Biomolecular Systems With Cell-Free Synthetic Biology”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) : 213. doi : 10.3389/fbioe.2020.00213
- 30) N. Ichihashi, “What can we learn from the construction of in vitro replication systems?”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1447, no. 1 (2019) : 144-156. doi : 10.1111/nyas.14042
- 31) Y. Bansho et al., “Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, no. 15 (2016) : 4045-4050. doi : 10.1073/pnas.1524404113
- 32) T. Furubayashi et al., “Emergence and diversification of a host-parasite RNA ecosystem through Darwinian evolution”, *eLife* 9 (2020) : e56038. doi : 10.7554/eLife.56038
- 33) S. Matsumura et al., “Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites”, *Science* 354, no. 6317 (2016) : 1293-1296. doi : 10.1126/science.aag1582
- 34) C. Tan et al., “Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems”, *Nat. Nanotechnol.* 8, no. 8 (2013) : 602-608. doi : 10.1038/nnano.2013.132
- 35) K. Kamiya et al., “Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes”, *Nat. Chem.* 8, no. 9 (2016) : 881-889. doi : 10.1038/nchem.2537
- 36) S. Berhanu, T. Ueda and Y. Kuruma, “Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 1325. doi : 10.1038/s41467-019-09147-4
- 37) K. Y. Lee et al., “Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATP-dependent reactions in a protocellular system”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 6 (2018) : 530-535. doi : 10.1038/nbt.4140
- 38) M. Exterkate et al., “Growing Membranes In Vitro by Continuous Phospholipid Biosynthesis from Free Fatty Acids”, *ACS Synth. Biol.* 7, no. 1 (2018) : 153-165. doi : 10.1021/acssynbio.7b00265
- 39) A. Bhattacharya et al., “A minimal biochemical route towards de novo formation of synthetic phospholipid membranes”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 300. doi : 10.1038/s41467-018-08174-x
- 40) K. Libicher et al., “In vitro self-replication and multicistronic expression of large synthetic genomes”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 904. doi : 10.1038/s41467-020-14694-2
- 41) P. van Nies et al., “Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based

- synthetic cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 1583. doi : 10.1038/s41467-018-03926-1
- 42) <https://www.jst.go.jp/crds/pdf/2014/RR/CRDS-FY2014-RR-02.pdf> (2021年2月1日アクセス)
- 43) I. Cazimoglu et al., “Developing a graduate training program in Synthetic Biology : SynBioCDT”, *Synth. Biol.* 4, no. 1 (2019) : ysz006. doi : 10.1093/synbio/ysz006
- 44) O. Ces and Y. Elani, “Community building in synthetic biology”, *Exp. Biol. Med.* 244, no. 4 (2019) : 281-282. doi : 10.1177/1535370219832279
- 45) P. Schwille et al., “MaxSynBio : Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, no. 41 (2018) : 13382-13392. doi : 10.1002/anie.201802288
- 46) K. R. Sedgley, P. R. Race and D. N. Woolfson, “BrisSynBio : a BBSRC/EPSCRC-funded Synthetic Biology Research Centre”, *Biochem. Soc. Trans.* 44, no. 3 (2016) : 689-691. doi : 10.1042/bst20160004
- 47) V. B. Pinheiro et al., “Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution”, *Science* 336, no. 6079 : 341-344, doi : 10.1126/science.1217622
- 48) H. Yu, S. Zhang and J. C. Chaput, “Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor”, *Nat Chem* 4 (2013) : 183-187. doi : 10.1038/nchem.1241
- 49) T. Katoh and H. Suga, “Ribosomal Incorporation of Consecutive  $\beta$ -Amino Acids”, *J. Am. Chem. Soc.* 140, no. 38 (2018) : 12159-12167, doi : 10.1021/jacs.8b07247
- 50) J. Lee et al., “Ribosome-mediated polymerization of long chain carbon and cyclic amino acids into peptides in vitro”, *Nat Commun* 11 (2020) : 4304. doi : 10.1038/s41467-020-18001-x
- 51) M. J. Lajoie et al., “Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions”, *Science* 342, no. 6156 (2013) : 357-360. doi : 10.1126/science.1241459
- 52) S. Osawa and T. H. Jukes, “Codon reassignment (codon capture) in evolution”, *J. Mol. Evol.* 28, no. 4 (1989) : 271-278. doi : 10.1007/BF02103422.
- 53) K. Kamiya, “Development of Artificial Cell Models Using Microfluidic Technology and Synthetic Biology”, *Micromachines* 11, no. 6 (2020) : 559. doi : 10.3390/mi11060559
- 54) M. Morita et al., “Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions”, *Chembiochem.* 16, no. 14 (2015) : 2029-2035. doi : 10.1002/cbic.201500354
- 55) K. Karamdad et al., “Preparation and mechanical characterisation of giant unilamellar vesicles by a microfluidic method”, *Lab. Chip* 15, no. 2 (2015) : 557-562. doi : 10.1039/C4LC01277A
- 56) P. C. Hu, S. Li and N. Malmstadt, “Microfluidic fabrication of asymmetric giant lipid vesicles”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, no. 5 (2011) : 1434-1440. doi : 10.1021/am101191d
- 57) L. R. Arriaga et al., “Single-step assembly of asymmetric vesicles”, *Lab. Chip* 19, no. 5 (2019) : 749-756. doi : 10.1039/C8LC00882E
- 58) N. N. Deng et al., “Microfluidic Assembly of Monodisperse Vesosomes as Artificial Cell Models”, *J. Am. Chem. Soc.* 139, no. 2 (2017) : 587-590. doi : 10.1021/jacs.6b10977

- 59) M. J. Booth et al., “Light-activated communication in synthetic tissues”, *Sci. Adv.* 2, no. 4 (2016) : e1600056. doi : 10.1126/sciadv.1600056
- 60) K. P. Adamala et al., “Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells”, *Nat. Chem.* 9, no. 5 (2017) : 431-439. doi : 10.1038/nchem.2644
- 61) Y. Qiao et al., “Predatory behaviour in synthetic protocell communities”, *Nat. Chem.* 9, no. 2 (2017) : 110-119. doi : 10.1038/nchem.2617
- 62) H. Shum and A. C. Balazs, “Synthetic quorum sensing in model microcapsule colonies”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, no. 32 (2017) : 8475-8480. doi : 10.1073/pnas.1702288114
- 63) T. D. Tang et al., “Gene-Mediated Chemical Communication in Synthetic Protocell Communities”, *ACS Synth. Biol.* 7, no. 2 (2018) : 339-346. doi : 10.1021/acssynbio.7b00306
- 64) M. Dwidar et al., “Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch”, *J. Am. Chem. Soc.* 141, no. 28 (2019) : 11103-11114. doi : 10.1021/jacs.9b03300
- 65) R. Lentini et al., “Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells”, *ACS Cent. Sci.* 3, no. 2 (2017) : 117-123. doi : 10.1021/acscentsci.6b00330
- 66) H. Niederholtmeyer, C. Chaggan and N. K. Devaraj, “Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 5027. doi : 10.1038/s41467-018-07473-7
- 67) G. Rampioni et al., “Synthetic cells produce a quorum sensing chemical signal perceived by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Chem. Commun.* 54, no. 17 (2018) : 2090-2093. doi : 10.1039/C7CC09678J
- 68) Z. Chen et al., “Light-Gated Synthetic Protocells for Plasmon-Enhanced Chemiosmotic Gradient Generation and ATP Synthesis”, *Angew. Chem.* 131, no. 15 (2019) : 4950-4954. doi : 10.1002/ange.201813963
- 69) M. Weiss et al., “Sequential bottom-up assembly of mechanically stabilized synthetic cells by microfluidics”, *Nat. Mater.* 17, no. 1 (2018) : 89-96. doi : 10.1038/nmat5005
- 70) M. K. Takahashi et al., “A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 3347. doi : 10.1038/s41467-018-05864-4
- 71) K. Pardee et al., “Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components”, *Cell* 165, no. 5 (2016) : 1255-1266. doi : 10.1016/j.cell.2016.04.059
- 72) K. Pardee et al., “Paper-based synthetic gene networks”, *Cell* 159, no. 4 (2014) : 940-954. doi : 10.1016/j.cell.2014.10.004
- 73) M. Ayub and H. Bayley, “Engineered transmembrane pores”, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34 (2016) : 117-126. doi : 10.1016/j.cbpa.2016.08.005
- 74) E. Spruijt, S. E. Tusk and H. Bayley, “DNA scaffolds support stable and uniform peptide nanopores”, *Nat. Nanotechnol.* 13, no. 8 (2018) : 739-745. doi : 10.1038/s41565-018-0139-6
- 75) A. D. Silverman, A. S. Karim and M. C. Jewett, “Cell-free gene expression : an expanded

- repertoire of applications”, *Nat. Rev. Genet.* 21, no. 3 (2020) : 151-170. doi : 10.1038/s41576-019-0186-3
- 76) J. F. Zawada et al., “Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production - a new approach for shortening protein production development timelines”, *Biotechnol. Bioeng.* 108, no. 7 (2011) : 1570-1578. doi : 10.1002/bit.23103
- 77) K. Pardee et al., “Portable, On-Demand Biomolecular Manufacturing”, *Cell* 167, no. 1 (2016) : 248-259.e12. doi : 10.1016/j.cell.2016.09.013
- 78) R. W. Martin et al., “Cell-free protein synthesis from genomically recoded bacteria enables multisite incorporation of noncanonical amino acids”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 1203. doi : 10.1038/s41467-018-03469-5
- 79) T. Jaroentomeechai et al., “Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 2686. doi : 10.1038/s41467-018-05110-x
- 80) J. Beal et al., “The long journey towards standards for engineering biosystems”, *EMBO Rep.* 21 (2020) : e50521. doi : 10.15252/embr.202050521
- 81) J. Beal et al., “Robust estimation of bacterial cell count from optical density”, *Communications Biology* 3 (2020) : 512. doi : 10.1038/s42003-020-01127-5
- 82) <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/2010/2010.10107.pdf> (2021年2月1日アクセス)
- 83) <https://igem.org/Sponsors> (2021年2月1日アクセス)
- 84) <https://gem-net.net/research/> (2021年2月1日アクセス)
- 85) <https://www.buildacell.org/> (2021年2月1日アクセス)
- 86) <https://www.basyc.nl/> (2021年2月1日アクセス)
- 87) <https://www.maxsynbio.mpg.de/home> (2021年2月1日アクセス)
- 88) <http://fabricell.org/> (2021年2月1日アクセス)
- 89) <https://igem.org/Startups> (2021年2月1日アクセス)
- 90) [https://www.amed.go.jp/content/files/jp/houkoku\\_h28/0101002/h27\\_008.pdf](https://www.amed.go.jp/content/files/jp/houkoku_h28/0101002/h27_008.pdf) (2021年2月1日アクセス)
- 91) V. Noireaux and A. Libchaber, “A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, no. 51 (2004) : 17669-17674. doi : 10.1073/pnas.0408236101
- 92) R. J. R. Kelwick, A. J. Webb and P. S. Freemont, “Biological Materials : The Next Frontier for Cell-Free Synthetic Biology”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) : 399. doi : 10.3389/fbioe.2020.00399
- 93) <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/toc/10.1002/> (ISSN) 1439-7633. *Xenobiology* (2021年2月1日アクセス)
- 94) K. Yue, Y. Zhu and L. Kai, “Cell-Free Protein Synthesis : Chassis toward the Minimal Cell”, *Cells* 8, no. 4 (2019) ; 315. doi : 10.3390/cells8040315