

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 細胞間 RNA 転送によるゲノム・エピゲノム編集技術の創生
(英語) Intercellular RNA transfer-driven gene and cellular programming

研究開発実施期間: 令和4年7月25日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 武部 貴則
(英語) Takanori Takebe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東京科学大学・総合研究院・教授
(英語) Institute of Science Tokyo, Institute of Integrated Science, Professor

II 研究開発の概要

和文:

細胞間における分子輸送は、さまざまな生命現象の要であり、多細胞の協調的動態を担保する上で、極めて重要な基盤システムである。例えば、マイクロ RNA がエクソソームを介して細胞から細胞へと伝播し、特定の遺伝子の発現量を調節することが注目を集めてきた。一方、われわれは最近、全く新たな細胞間の RNA 伝達メカニズムを発見した。すなわち、マウス細胞とヒト細胞の共培養系を用いることで、細胞質内の mRNA が細胞接触依存的に双方向へ転送され、転送先の細胞で翻訳されること、さらに転送された mRNA によって細胞運命の転換が生じていることを発見した。このような生理的な細胞間 RNA 転送メカニズムを駆使することで、mRNA を目的細胞へ転送することが可能となり、これにより、細胞運命転換（リプログラミング）やゲノム編集の実現が可能ではないかとの着想に至った。本研究開発では、「異なる細胞種間の直接接触を介した mRNA の転送機構」を活用することで、次世代の再生・細胞医療・遺伝子治療を担保するための2つの概念実証を試みた。すなわち、i) *in vitro* においてリプログラミングするための技術、および、ii) *in vivo* において細胞のゲノム編集を実現するための技術を構築することを目指した。

多能性幹細胞（ES 細胞や iPS 細胞）は、その発生分化の進行に応じて、ナীব型とプライム型に分類される。マウス ES 細胞は着床前の初期胚に相当するナীব型である一方、一般的に用いられているヒト ES/iPS 細胞はより分化の進んだ着床後胚に相当するプライム型であることが知られている。ナীব型とプライム型の多能性は、異なる遺伝子制御ネットワークによって規定されており、それぞれの状態の維持には固有の培養条件が必須となる。そのため、プライム型のヒト ES/iPS 細胞をマウス ES 細胞用の培地（2i+LIF）で培養すると速やかにその多能性を失う。ところが、マウス ES 細胞と直接接触する形で共培養すると、2i+LIF 条件でも一部のヒト ES/iPS 細胞は適応して多能性マーカーである Oct4 や Nanog を発現維持し、その後継続

して拡張培養できることを見出した。

そこで、この現象において異種細胞間の mRNA 転送が起きているかどうかを検討した。まず、高感度 *in situ* hybridization 法を用いて、マウス ES 細胞からヒト ES/iPS 細胞への mRNA 転送を評価した。具体的には、マウス細胞に導入した蛍光タンパク質遺伝子、または内在性遺伝子座に MS2 タグを挿入することで、標的マウス mRNA を特異的に検出する系を構築した。その結果、マウス ES 細胞と共培養した際に、ヒト ES/iPS 細胞内にマウス mRNA の存在が認められた一方、共培養から得た conditioned medium で培養するのみでは検出されなかった。ドナー細胞側の発現レベルをもとに、アクセプター細胞への移行量を推定すると、ドナー細胞内の約 7.1%相当の mRNA がアクセプター細胞へ移行していることが明らかとなった。また、別の検出方法として、別々の蛍光タンパク質でラベルしたマウス ES 細胞とヒト iPS 細胞を共培養した後、FACS によってそれぞれの細胞を分取し、種特異的なプライマー・プローブを用いた RT-qPCR 法によって内在性遺伝子の細胞間 RNA 転送を解析した。その結果、共培養するとβアクチンなどの mRNA が双方向性に転送されていることが明らかとなった。次に、細胞間で転送される mRNA についてゲノムワイドに探索するために、RNA-seq を実施した。すなわち、ヒトとマウスの mRNA の塩基配列の違いをもとに、共培養サンプルから FACS で得たヒト細胞画分に含まれるマウス特異的な mRNA を網羅的に解析した。その結果、転写や翻訳、ストレス応答などに関連するさまざまな分子をコードする mRNA がマウス ES 細胞からヒト ES/iPS 細胞へと転送されていることが明らかになった。転送される mRNAの中には転写因子をコードするものも含まれており、その多くは多能性を制御するための転写ネットワークの構成因子であることも判明した。続いて、細胞接触依存的に mRNA が細胞間を転送するメカニズムを解析した。接触部位の構造に着目したイメージングの結果、tunneling nanotube (TNT) と呼ばれる F-アクチン陽性の膜伸長突起がヒト細胞側からマウス細胞へと形成・接続していることを見出した。さらに、高感度 *in situ* hybridization 法によってこの TNT の内部にマウス mRNA が含まれていること、また、TNT の形成阻害剤を処理すると、マウス ES 細胞からヒト ES/iPS 細胞への mRNA 転送が阻害されることが明らかとなった。これらの検討から、マウス ES 細胞とヒト ES/iPS 細胞の間で生じる mRNA 転送は TNT を介していると考えられた。

次に、マウス ES 細胞から転送される mRNA の中に、多能性を維持するために必須な転写因子をコードするものが含まれていることを受けて、共培養後のヒト ES/iPS 細胞の形質変化を解析した。その結果、プライム型だったヒト細胞の一部がナイーブ型に類似した状態へリプログラミングしていることが細胞表面マーカー・転写因子のタンパク質発現解析、および網羅的遺伝子発現の観点から明らかとなった。さらに、このナイーブ型様リプログラミングは、マウス ES 細胞の conditioned medium や、両細胞間が直接接触しないように物理的に隔離した共培養条件では認められなかった。また、ナイーブ型様の状態へ移行した細胞がマウス ES 細胞からの mRNA を受け取っていたかどうかを明らかにするために、蛍光標識したレポーター mRNA を用いて、マウス ES 細胞由来の mRNA を受け取ったヒト ES/iPS 細胞を追跡した。その結果、マウス mRNA をより多く受け取ったヒト細胞がナイーブ型様にリプログラミングされやすいことがわかった。さらに、共培養の過程で TNT 形成阻害剤を処理すると、共培養後に得られたヒト細胞中のナイーブ型マーカーの遺伝子発現が抑制された。以上の結果から、マウス ES 細胞由来の mRNA を受け取ったヒト ES/iPS 細胞がナイーブ型へ転換しやすいことが示唆された。

マウス ES 細胞からの mRNA 転送とヒト ES/iPS 細胞のナイーブ型様リプログラミングとの因果関係を明らかにするために、ナイーブ型多能性に重要な転写因子である TFCEP2L1, TFAP2C, KLF4 に対するマウス特異的な機能喪失実験系を構築した。具体的には、配列の違いをもとに、ヒト内在性遺伝子には作用せず、マウス配列に特異的にノックダウンできる RNAi を発現するヒト iPS 細胞を作製し、マウス ES 細胞と共培養してその後起きるナイーブ型様リプログラミングに対する影響を解析した。その結果、上記のいずれの転写因子をマウス配列特異的にノックダウンすると、共培養後に誘導されるナイーブ型マーカー遺伝子の発現が抑制され、また、ナイーブ型に特徴的なドーム状のコロニーの形成も顕著に減少することがわかった。これらのノックダウン操作によって、ヒト iPS 細胞自身の未分化能や、化合物誘導によるナイーブ型へのリプ

ログラミングには影響がなかったことから、マウス ES 細胞由来の TFCEP2L1、TFAP2C、KLF4 といった転写因子をコードする mRNA がヒト ES/iPS 細胞内へ転送されることが、その後のナイーブ型リプログラミングに不可欠であることが立証された。以上のように、異なる哺乳類の多能性細胞の間で移動する mRNA が、単なる移動現象にとどまらず、細胞の運命転換を引き起こす生物学的に重要な影響を持つことが世界で初めて明らかとなった (Yoneyama et al., PNAS 2025)。

細胞間の RNA 転送を効果的に実現するためのキャリアとして、血小板に着目した。血小板は無核の細胞であり、血小板製剤として一般的に臨床投与されている。そのため、血栓形成機能を失った不活化した血小板を、mRNA を標的組織へと転送するドナー細胞として活用することができれば、生体適合性の高い mRNA 医薬となることが期待される。そこでまず、血小板に対して、mRNA やゲノム編集複合体を導入するための技術開発を行なった。具体的には、in vitro 転写反応によって得られた合成 mRNA に蛍光標識を施したもの、また、CRISPR-Cas9 の gRNA に蛍光標識をした RNA-Cas9 タンパク質複合体 (RNA) を血小板内に導入する条件を検討し、安定した導入効率を達成するための手技を確立した。

続いて、このような外来 mRNA や RNP を搭載した血小板を用いて、in vitro で細胞への遺伝子発現・ゲノム編集が可能かどうかを検証した。まず、蛍光タンパク質をコードする mRNA を搭載した血小板を調製し、複数のヒト細胞株と共培養し、蛍光タンパク質発現を解析した。その結果、未分化なヒト ES/iPS 細胞、肝がん細胞株 HepG2、血管内皮細胞 HUVEC など複数種類のヒト細胞において、血小板由来の mRNA が転送できることが明らかとなった。さらに、in vitro においてアクセプター細胞のゲノム編集ができるかどうかを検証した。すなわち、特定の gRNA によってターゲティングされたときのみ蛍光タンパク質のカラースイッチが起きるレポーター遺伝子を AAVS1 遺伝子座に組み込んだヒト ES 細胞に対して、CRISPR-Cas9 RNP を搭載した血小板を共培養すると、蛍光タンパク質のスイッチングが生じ、ゲノム配列上も設計どおりの編集が起きていることが明らかになった。したがって、血小板による RNA 転送は in vitro においてはゲノム編集へ応用可能であると考えられた。

血小板を RNA のドナー細胞として in vivo のゲノム編集にも活用できるかどうかを検証した。具体的には、まず、in vivo 投与のための RNA 搭載血小板の調製法を確立するとともに、投与する血小板数や投与ルートを複数条件検討した。続いて、Rosa26 ローカスに Cre リコンビナーゼ依存的に蛍光タンパク質が発現するマウスを複数系統用いて、血小板を介した Cre mRNA の転送と機能的な標的ゲノム編集を評価した。In vitro 転写反応によって得た Cre mRNA を血小板に搭載した後、経脾ルートで血小板を投与し、一定期間の後に肝臓・肺・脾臓を採材して組織切片による解析を行なった。その結果、脾臓において Cre 依存的な蛍光タンパク質の発現誘導を認めることができた。すなわち、血小板を介した RNA 転送によって in vivo においても特定臓器のゲノム編集が可能であることが示唆された。今後は、本手法の更なる効率化達成のための改良を進めるとともに、mRNA の転送先臓器の選択性・特異性を制御可能な手法の開発を進める予定である。

英文：

Intercellular communication constitutes a fundamental mechanism underpinning diverse physiological processes and coordinated multicellular systems. The intercellular propagation of miRNAs via extracellular vesicles has garnered significant attention for non-cell autonomous gene regulation. Using a co-culture system of mouse and human pluripotent stem cells, we discovered that cytoplasmic mRNAs are bidirectionally transferred in a contact-dependent manner, translated in the recipient cells, and induce cell fate conversion. This finding led us to further hypothesize that physiological mRNA transfer could be leveraged for cellular reprogramming and genome editing. Our study aimed to provide a proof-of-concept for two applications of contact-dependent intercellular mRNA transfer: (i) cell fate reprogramming in vitro and (ii) functional genome editing in vivo.

While mouse embryonic stem cells (ESCs) represent the naïve state, conventional human ESCs and induced pluripotent stem cells (iPSCs) correspond to the primed post-implantation epiblast stage. The maintenance of each state requires distinct culture conditions, and primed human cells typically lose pluripotency when exposed to 2i+LIF, a medium optimized for naïve mouse ESCs. We found that direct co-culture with mouse ESCs enabled a subset of human ESCs/iPSCs to maintain expression of core pluripotency markers and sustain their survival even under 2i+LIF conditions. To determine whether mRNA transfer takes place in this setting, we employed in situ hybridization to detect mouse-derived mRNAs within human cells. Using fluorescent reporter constructs or MS2-tagged endogenous transcripts introduced into mouse ESCs, we confirmed the presence of mouse-specific mRNAs in human cells only under direct co-culture conditions. Approximately 7.1% of donor cell mRNA content was transferred to recipient cells. RT-qPCR with species-specific primers following FACS-based separation further validated the bidirectional transfer of endogenous mRNAs such as β -actin. RNA sequencing of FACS-isolated human cells revealed a broad spectrum of mouse mRNAs, including those encoding transcription factors associated with pluripotency and stress-coping pathways.

To establish a causal link between transferred mRNAs and reprogramming, we generated human iPSCs expressing RNAi constructs that selectively knock down mouse-specific transcripts of key naïve TFs (TFCP2L1, TFAP2C, KLF4). When co-cultured with mouse ESCs, these knockdowns abolished naïve marker induction and dome-shaped colony formation, without affecting intrinsic human pluripotency or small-molecule-driven reprogramming. These results demonstrate that transferred mRNAs encoding key transcriptional regulators are required for the subsequent naïve-like reprogramming in human cells (Yoneyama et al., PNAS 2025).

To extend this mechanism toward gene therapy applications, we explored whether mRNA transfer could be mediated by anucleate cells such as platelets. As platelets are commonly used in clinical transfusions, we hypothesized that engineered platelets could serve as biocompatible RNA delivery vehicles. We developed methods to load synthetic mRNAs and CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) complexes into platelets and established co-culture conditions with human cells. Fluorescent reporter assays demonstrated successful mRNA delivery from platelets to various human cell types, including iPSCs/ESCs, hepatoma cells, and endothelial cells. Furthermore, we tested whether genome editing could be achieved via platelet-mediated delivery. Using a Cre-reporter system inserted at the AAVS1 locus in human ESCs, we observed fluorescent color switching and confirmed precise genome edits following co-culture with platelets loaded with Cre mRNA or CRISPR-Cas9 RNPs. In vivo studies further validated this approach. Platelets carrying Cre mRNA were injected via the splenic route into transgenic reporter mice. Post-injection analysis revealed Cre-dependent reporter activation in the spleen, indicating successful in vivo RNA delivery and genome editing. These findings suggest that platelets can be harnessed as a platform for targeted RNA delivery and therapeutic genome editing. Future efforts will focus on enhancing transfer efficiency and engineering organ-selective delivery strategies.