

# がんの進化の力を白日のもとに

～がん細胞の環状の染色体外 DNA を標的にしたゲノム編集技術の開発に成功～

## 【本研究のポイント】

- ・近年、がんの進化・不均一性・治療抵抗性の重要なメカニズムとして環状の染色体外 DNA (extrachromosomal DNA, ecDNA) <sup>(※1)</sup>が注目されています。一方で、がん細胞内における ecDNA の機能や動態については不明な点が多く、この理由の1つとして ecDNA を人工的に改変する技術が確立されていないことが挙げられます。
- ・CRISPR-Cas9 <sup>(※2)</sup>によるゲノム編集で用いるガイド RNA を最適化することにより (「セーフガード gRNA<sup>(※3)</sup>」を使用)、ecDNA の効率的なゲノム編集技術を世界で初めて確立しました。
- ・従来型の CRISPR-Cas9 では、ecDNA の過剰な DNA 切断が生じ、細胞死や ecDNA の喪失が誘導されること、「セーフガード gRNA」を用いると、細胞毒性を抑えつつ効率的なゲノム編集が可能になることを体系的に明らかにしました。
- ・コンピューターシミュレーションを用いることにより、ecDNA に DNA 切断が起きた時の細胞の応答を体系的に理解することに成功しました。
- ・今回確立した ecDNA のゲノム編集技術は、がんの悪性化や薬剤耐性に深く関与する ecDNA の機能解析・動態解明を可能にする基盤技術であり、将来的には ecDNA を標的とした新しいがん研究や治療戦略の発展に大きく貢献することが期待されます。

## 【研究概要】

名古屋大学大学院医学系研究科分子腫瘍学の杉本陽平 大学院生、鈴木洋 教授らの研究グループは、がん細胞に多数存在する環状の染色体外 DNA (extrachromosomal DNA, ecDNA) を対象に、CRISPR-Cas9 を用いて効率的にゲノム編集できる技術の開発に成功しました。

近年、がんの進化・不均一性・治療抵抗性の重要なメカニズムとして ecDNA が注目されています。ecDNA は、がんの増殖を強く促す遺伝子などを含む特殊な環状 DNA で、多くのがん細胞に存在し、1つの細胞内に数十コピーが存在することが知られています。細胞分裂のたびに不均等に分配されるため、結果としてその数が細胞ごとに不均一になります。このため、がんの悪性度が増し、がんが治療に抵抗性を獲得したり再発したりする原因になると考えられています。そのため ecDNA の働きを調べることは、ecDNA を持つがんの本質を理解する上で欠かせません。

ecDNA の機能や挙動を詳しく理解するためには、CRISPR-Cas9 などを用いて ecDNA の配列を改変し、ecDNA の可視化や機能の解析などを実施することが重要です。しかし、がん細胞内における ecDNA の機能や動態については不明な点が多く、この理由の1つとして ecDNA を人工的に改変する技術が確立されていないことが挙げられます。

本研究では、従来型の CRISPR-Cas9 と、研究グループがこれまでに開発してきた CRISPR-Cas9 の切断活性を任意に調節できるセーフガード gRNA を比較することにより、最適な ecDNA のゲノム編集技術の開発に取り組みました。

興味深いことに、従来型の CRISPR-Cas9 を ecDNA に適用したところ、ecDNA が編集される効率が低だけでなく、細胞死や ecDNA の減少が顕著に生じることが明らかになりました。これらの現象は、1つの細胞内に多数存在する ecDNA に DNA 切断が過剰に生じることで、細胞に強いストレスが加わった結果である可能性が示唆されました。このため、多くの分野で広く使われている従来型の CRISPR-Cas9 が、ecDNA のゲノム編集にはそもそも不向きであることが浮き彫りになりました。

この問題を解決するために、セーフガード gRNA を利用して切断活性を適度に抑えると、ecDNA の減少を回避しつつ、ecDNA に高効率でゲノム編集を行うことが可能になりました。さらに、実験結果とコンピューターシミュレーションを組み合わせた解析から、短い時間に ecDNA の DNA 切断がどれだけ集中するかが、細胞の生存や ecDNA の維持、ecDNA 編集の可否を左右する重要な要因であることを見出しました。

本研究の成果により、これまでゲノム編集が難しかった ecDNA を効率よく編集することが可能になります。これにより、ecDNA がどのように振る舞い、がんの悪性化や治療抵抗性にどのように関与しているのかを、より詳しく調べることができるようになることが期待されます。

本研究成果は、2026年1月14日に国際学術誌『Nucleic Acids Research』のオンライン版に掲載されました。また、2026年1月27日付発行の印刷版に掲載予定です。

## 1. 背景

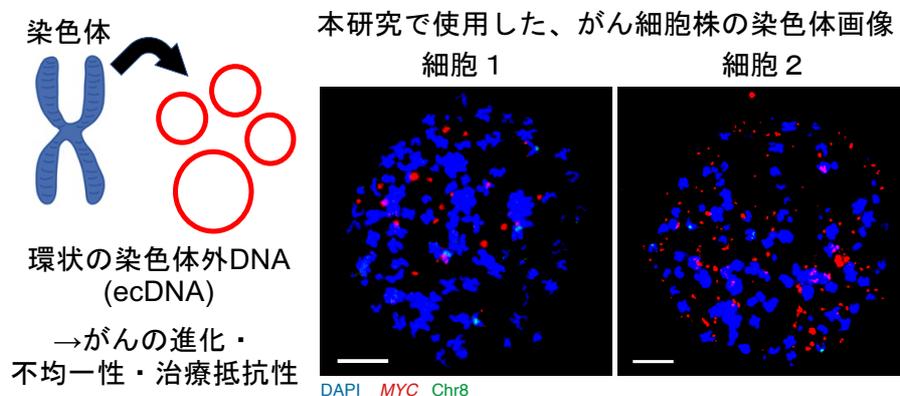
がんは、細胞の遺伝子に DNA の異常が発生・蓄積することで発生・進行する病気です。がん細胞のゲノム異常には、単純な遺伝子の変異だけではなく、より複雑な染色体の構造の異常もあります。その代表例の1つが、染色体外 DNA (extrachromosomal DNA, ecDNA) <sup>(※1)</sup>であり、近年注目を集めています。

ecDNA は、もともと染色体上に存在していた遺伝子領域が、染色体から飛び出して環状の DNA として細胞内に存在するようになったものです (図1右)。ecDNA には、がんの増殖を強く促す遺伝子などが多く含まれ、通常の染色体とは異なり、細胞分裂の際に均等に分配されません。その結果、同じがんの組織の中でも、細胞ごとに ecDNA の数 (量) が異なる状態になり、がん細胞の不均一性が生じます。この性質は、がんが環境の変化に適応し、薬剤耐性を獲得したり再発したりする重要な要因の一つと考えられています。

このように ecDNA は、がんの進化や悪性化に深く関与する重要な因子であるにも関わらず、その働きや振る舞いについては未解明な点が多く残されています。その大きな理由の一つとして、ecDNA を直接ゲノム操作して解析するための技術が十分に確立されていないことが挙げられます。ecDNA の機能を理解するためには、ecDNA をゲノム編集し特定の配列を改変することにより、蛍光タンパク質などを用いて ecDNA の細胞内での挙動を観察したりすることが不可欠ですが、こうした解析手法の有用性はこれまで十分に評価されていませんでした。

近年、CRISPR-Cas9<sup>(※2)</sup>に代表されるゲノム編集技術の発展により、染色体上の DNA を簡便に編集することが可能になりました。しかし、ecDNA は1つの細胞内に数十も存在するという点で、通常の染色体 DNA とは大きく性質が異なります。これまでの CRISPR-Cas9 に関する研究の多くは、二倍体細胞における2つの DNA 配列 (相同染色体) を前提として進められてきたため、1細胞内に多数存在する ecDNA に適用した際にどのような影響や細胞応答が生じるのかについては、体系的な評価はほとんど行われていませんでした。

本研究では、こうした背景のもと、ecDNA を安全かつ効率的に操作するためにはどのようなゲノム編集条件が最適なのかを明らかにすることに取り組みました。



【図1：ecDNA と本研究で使用したがん細胞株の染色体画像】

右の画像は DNA FISH<sup>(※4)</sup>の画像で、青のシグナルが染色体を、赤のシグナルが ecDNA

を、緑のシグナルが ecDNA が飛び出してきた染色体領域を示しています。細胞 1 と細胞 2 で赤色のシグナルの数 (= ecDNA の数) が異なり、ecDNA の数は細胞ごとに不均一であることがわかります。

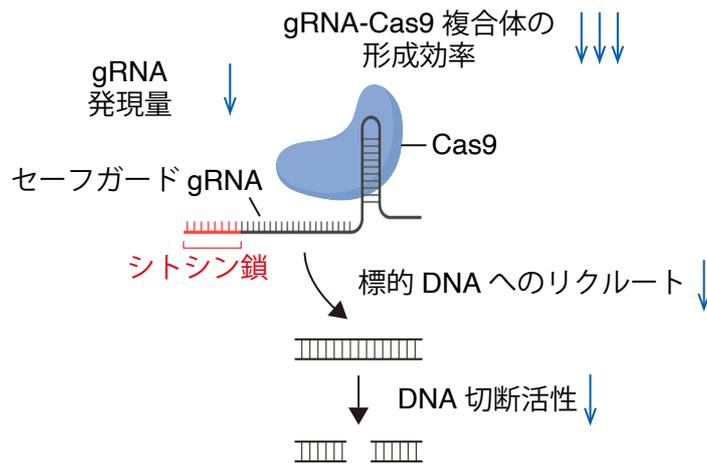
## 2. 研究成果

本研究では、がん細胞に存在する ecDNA (図 1 左) を対象として、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行った際に生じる細胞応答を解析しました。まず、ecDNA を標的として従来型の CRISPR-Cas9 を用いたところ、細胞死や ecDNA の喪失が高頻度で観察されることがわかりました。これらの結果から、多くの分野で広く使われている従来型の CRISPR-Cas9 が、ecDNA のゲノム編集にはそもそも向いていないことが明らかになりました。

DNA FISH を用いて細胞あたりの ecDNA の量を調べたところ、従来型の CRISPR-Cas9 を適用した細胞集団では、ecDNA を多く保持していた細胞が著しく減少していることが明らかになりました。一方で、細胞死を起こした細胞を解析すると、これらの細胞は ecDNA を多く保持していることがわかりました。このことから、ecDNA を多く含む細胞ほど、従来型の CRISPR-Cas9 の適用によって強い影響を受けやすく、細胞死へと至る可能性が示唆されました。

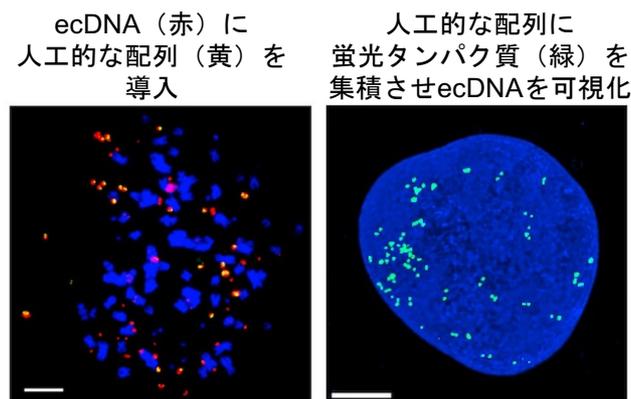
さらに、細胞を詳細に観察したところ、従来型の CRISPR-Cas9 処理後の細胞では、ecDNA が微小核<sup>(※5)</sup>と呼ばれる小さな核様構造として核外に分離される現象が高頻度で認められました。微小核内部には ecDNA が含まれていることがほとんどであったことから、ecDNA が切断された後、細胞の核から排除される現象が生じている可能性が示唆されました。これらの結果は、CRISPR-Cas9 による ecDNA 編集が、ecDNA の維持に大きな影響を及ぼすことを示しています。

一方で、本研究では、研究グループの九州大学生体防御医学研究所の川又理樹 助教らが開発してきた、Cas9 の切断活性を精密に調整するセーフガード gRNA<sup>(※3)</sup> (図 2) を用いることで、これらの問題を大きく改善できることを明らかにしました。Cas9 活性を適度に抑えた条件では、細胞死の頻度が大幅に低下し、細胞あたりの ecDNA の数を低下させることなくゲノム編集を行うことができる細胞の割合が増加しました。さらにこの条件下で ecDNA のゲノム編集を行ったところ、ecDNA の可視化を目的としたゲノム配列が ecDNA 上に正しく挿入された ecDNA の割合が上昇するとともに、そのような ecDNA を多数保持した細胞の割合も増加していました (図 3 左)。さらに、この技術を用いて、細胞内の ecDNA を蛍光タンパク質で効率よく可視化することもできました (図 3 右)。これらの結果から、セーフガード gRNA を用いて Cas9 活性を適切に制御することで、ecDNA の数を減らさずに高い効率でゲノム編集を行うことが可能となることが示されました。



【図 2：セーフガード gRNA とは】

セーフガード gRNA とは、ガイド RNA の 5'末端にシトシン鎖を付加したガイド RNA のことです。付加するシトシン鎖の長さを変えることで、ガイド RNA の発現量や Cas9 酵素との複合体形成能力、標的 DNA へのリクルート効率などを調整することができ、結果として Cas9 の DNA 切断活性を幅広くコントロールすることができます。

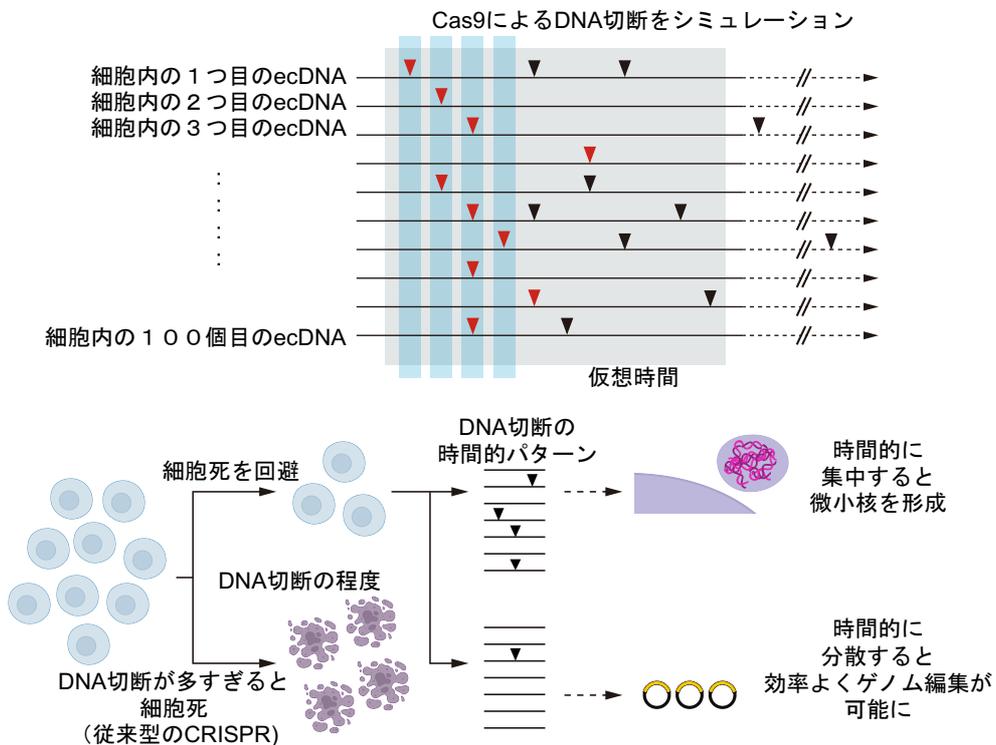


【図 3：セーフガード gRNA による ecDNA の改変に成功】

左の画像では、ecDNA (赤) に人工的な配列 (黄) が効率よく導入され、赤と黄のシグナルがオーバーラップしていることが確認できます。右の画像では、ecDNA に導入した人工的な配列に蛍光タンパク質 (緑) を集積させた状態の画像です。

また、本研究ではコンピューターシミュレーションを行い、上記の実験結果が起きる理由を明らかにしました。具体的には、仮想時間軸上で ecDNA の DNA 切断イベントを Cas9 の活性に応じた頻度でランダムに発生させるシミュレーションを実施しました (図 4 上)。また、ecDNA が不均等に娘細胞に分配されるシミュレーションも実施しました。その結果、細胞の生存や ecDNA 数の維持には、DNA 切断の総量だけでなく、ecDNA の DNA 切断が短時間に集中するかどうか重要であることが明らかになりました (図 4 下)。セーフガード gRNA を用いると、ecDNA の DNA 切断が時間的に分散し、細胞が致命的なダメージを受けにくく、ecDNA を保持したまま編集が成立しやすいことが分かりました。

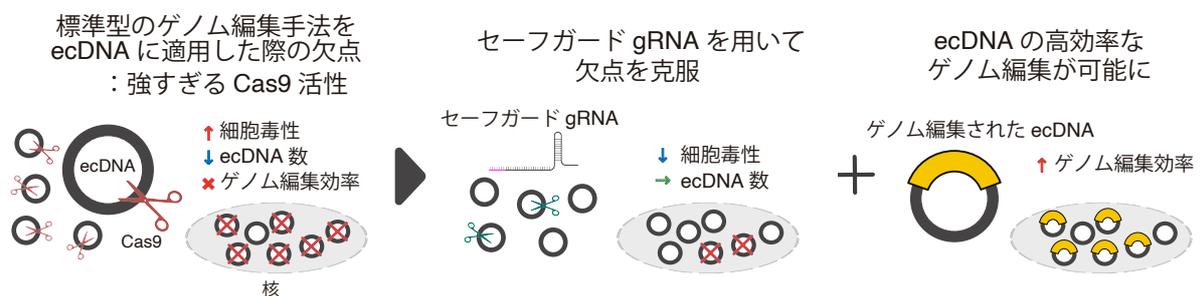
これらの結果から、本研究により、ecDNA を対象としたゲノム編集においては、「強く切る」という発想ではなく、「必要最小限の切断を起こす」ことが重要であるという新しい指針を示すことができました（図5）。



【図4：コンピューターシミュレーションの概要】

上：仮想時間軸上で ecDNA の DNA 切断イベントを Cas9 の活性に応じた頻度でランダムに発生させるシミュレーションを実施しました。

下：DNA 切断の総量、および、ecDNA の DNA 切断が短時間に集中するかどうかによって、細胞の生存、ecDNA 数の維持、微小核の形成、ゲノム編集の成功率がどのように変わるかが明らかになりました。



【図5：研究成果のまとめ】

ecDNA に対して従来型のゲノム編集手法を用いると、その標的の多さ故に Cas9 による DNA 二本鎖切断が過剰に生じます。結果として、高い細胞毒性や ecDNA 数の減少、さらにゲノム編集効率が著しく低いといった問題が発生します。一方でセーフガード gRNA を使用すると、これらの欠点を克服することができ、ecDNA のゲノム編集が可能になることを明らかにしました。

### 3. 今後の展開

本研究により、ecDNA のゲノム編集技術を確立することができました。これにより、ecDNA に対して効率的にゲノム編集を行うことが可能となり、今後は、この手法を活用した ecDNA の機能解析が大きく進展すると期待されます。特に、可視化を目的とした配列が導入された ecDNA を解析することで、ecDNA の細胞内における局在や動態を観察することが可能になります。

本研究で確立した ecDNA ゲノム編集の最適化技術は、ecDNA を対象とした基礎研究を加速させるとともに、新しいがん治療を切り拓く技術的基盤になることが期待されます。ecDNA をもったがんに対しては、現時点では、ecDNA が見つかっていても、これを抑えるような治療が世界的に確立されていません。研究グループは、本研究をもとに ecDNA をもったがんに対する新しい治療法の確立を進めます。

### 4. 支援・謝辞

本研究は JSPS 科研費：国際共同研究加速基金(帰国発展研究) 19K24694, 基盤研究(A) JP24H00614 (研究代表者: 鈴木洋), 特別研究員奨励費 24KJ1238 (研究代表者: 杉本陽平), AMED 研究費：次世代がん医療加速化研究事業 JP22ama221111, 革新的がん医療実用化研究事業 JP23ck0106791, ゲノム創薬基盤推進研究事業 JP23kk0305026, ゲノム研究を創薬等出口に繋げる研究開発プログラム JP23tk0124003, 革新的がん医療実用化研究事業 JP24ck0106875, 革新的がん医療実用化研究事業 JP25ck0106019, 創薬基盤推進研究事業 JP25ak0101291 (研究代表者/分担者: 鈴木洋), 稲盛財団, 武田科学振興財団, 東レ科学振興会, その他の様々なご支援を受けて実施されました。

本プレスリリースに用いた図の一部は BioRender.com で作成しています。

#### 【用語説明】

(※1) 染色体外 DNA (extrachromosomal DNA, ecDNA) :

10~60%のがん細胞で観察されることが報告されている、染色体とは独立して存在する環状の DNA。がんの増殖を強く促す遺伝子を含むことが多く、細胞分裂の際に均等に受け継がれないという特徴を持つ。この性質により、がん細胞集団内の不均一性が高まり、悪性化や治療抵抗性、再発に関与すると考えられている。

(※2) クリッパー・キャス 9 (CRISPR-Cas9) :

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated proteins 9 の略。細菌の免疫機構を応用したゲノム編集技術で、ガイド RNA (gRNA) によって標的された DNA 配列を Cas9 という酵素が切断することで、遺伝子を編集することができる。

(※3) セーフガード gRNA :

gRNA の構造を工夫することで、Cas9 による DNA 切断の活性を調整できる技術。具体的には gRNA の 5'末端にシトシン鎖を付加することで、付加したシト

シン鎖の長さに依存して Cas9 活性を段階的に調整することができる。本研究ではこの仕組みを利用して、過剰な DNA 切断を抑制し、ecDNA に対するゲノム編集を可能にした。研究グループは 2023 年にセーフガード gRNA を開発し発表している。

(参考)

- Nature Biomedical Engineering, Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs. 2023 May;7(5):672-691. DOI:10.1038/s41551-023-01011-7.
- プレスリリース：「ゲノム編集の効率や安全性を 100 倍以上高める新技術を開発」九州大学・名古屋大学、2023 年 4 月 11 日

(※4) DNA FISH：

DNA fluorescence in situ hybridization の略。特定の DNA 配列を携行標識し、プローブで検出し、細胞内での位置や数を観察する手法。

(※5) 微小核：

本来の核とは別に形成される小さな核様構造。

### 【論文情報】

雑誌名：Nucleic Acids Research

論文タイトル：Optimized CRISPR-Cas9 system for efficient engineering of ecDNA in cancer cells

著者：Yohei Sugimoto<sup>1</sup>, Takeru Kachi<sup>1</sup>, Yu Watanabe<sup>1,2</sup>, Mei Kubokawa<sup>1,3</sup>, Koichi Ogami<sup>1</sup>, Masaki Kawamata<sup>4</sup>, Seiko Yoshino<sup>1</sup>, Hiroshi I. Suzuki<sup>1,5,6,7</sup>,

1 Division of Molecular Oncology, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

2 Department of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

4 Division of Organogenesis and Regeneration, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

5 Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University, Nagoya, Japan

6 Center for One Medicine Innovative Translational Research (COMIT), Nagoya University, Nagoya, Japan

7 Inamori Research Institute for Science (InaRIS), Kyoto, Japan

DOI: [10.1093/nar/gkag005](https://doi.org/10.1093/nar/gkag005)

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Nuc\\_260123en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nuc_260123en.pdf)