

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12644

研究課題名（和文）mRNA医薬の実現に向けた高機能人工mRNAプラットフォームの開発

研究課題名（英文）Development of a highly functional artificial mRNA platform for the realization of mRNA medicine

研究代表者

大野 博久（Ohno, Hirohisa）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：90612391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、RNAワクチンに代表されるように、人工メッセンジャーRNA（mRNA）を利用する遺伝子導入法が注目されている。RNAは、ゲノムDNAに予期しない変異を生じさせる危険性が少ないため安全性が高いが、不安定性などの課題も抱えている。本研究では、そのような課題を解決し、より実用的な人工mRNAを開発することを目指した。mRNAの安定性とタンパク質発現レベルを改善するため、5'キャップ構造に着目し、キャップ部位に多様な修飾を導入する方法を確立し、タンパク質発現レベルを向上させる修飾キャップを見出すことができた。また、標的細胞のみでタンパク質を発現させることが可能なmRNAの開発にも取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、mRNAの5'キャップ構造に多様な化学修飾を導入できる方法を確立した。本研究で見出したタンパク質発現レベルを向上させる修飾キャップは人工mRNAの作製に利用できる。また、修飾キャップの化学構造を利用することで、キャップ部位を蛍光色素などの様々な機能性分子で標識できることを示した。これはRNA研究のための新たなツールになりうる。さらに、標的細胞のみでタンパク質発現を行えるmRNAの開発を行った。これは副作用の低減につながり、より安全なmRNA医薬の実現の役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, gene introduction methods utilizing synthetic messenger RNA (mRNA), as exemplified by RNA vaccines, have garnered significant attention. RNA is considered highly safe due to its lower risk of causing unexpected mutations in genomic DNA; however, it also faces challenges such as instability. This study aims to address these challenges and develop more practical synthetic mRNA. To improve mRNA stability and protein expression levels, I focused on the 5' cap structure, establishing methods to introduce various modifications at the cap site and identifying modified caps that enhance protein expression levels. Additionally, I worked on developing mRNA capable of expressing proteins exclusively in target cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：mRNA 遺伝子治療 キャップ

1. 研究開始当初の背景

細胞への遺伝子導入は、基礎的な生物学研究においても遺伝子治療のような医薬研究においても非常に重要かつ欠かせない技術である。その遺伝情報の担体としては、現在主に DNA が用いられている。しかし、DNA ベースの遺伝子導入法はその原理上、ゲノム中への DNA 断片の挿入を引き起こし、標的外の正常な遺伝子に変異を生じさせる危険性が常につきまとう。そこで近年、より安全な遺伝子導入技術としてメッセンジャー RNA (mRNA) を利用した方法が注目されている。DNA とは異なり、目的遺伝子の発現は一過的ではあるものの、ゲノム DNA を傷つける危険性がないため安全性が高い。mRNA は細胞質に到達すれば翻訳が開始されるため、核内に運ばれて転写される必要がある DNA よりも遺伝子導入効率が一般的に高い。このように、その特性を理解して利用すれば、RNA は非常に有用な遺伝子治療フォーマットの一つとなりうると期待されている。

しかしながら、mRNA による遺伝子導入には解決すべき課題も多い。特に問題となるのが、RNA の不安定さである。RNA は DNA に比べて化学的に不安定であり、生物由来の核酸分解酵素に対しても非常に脆弱である。生体内・細胞内での半減期が極めて短いため、遺伝子発現の持続時間が短い。細胞内に直接導入された mRNA は増幅されないこととも相まって、一分子の DNA から多コピーの mRNA が転写される DNA ベースの遺伝子導入と比較すると、タンパク質の発現レベルも低い。mRNA の幅広い応用に向けて、これら mRNA における問題の解決が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、生物学的な不安定性のような既存の人工 mRNA の問題点を解決し、実用的な遺伝子治療ツールとなりうる高機能な人工 mRNA を開発することを目的とする。そのための方法として、化学修飾の導入を試みた。特に、mRNA の安定性と翻訳活性に大きく関わっている 5' キャップ構造の修飾に取り組んだ。また、人工 mRNA の副作用を低減させるため、標的となる細胞種においてのみ特異的に目的タンパク質の発現を行わせるシステムの開発にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) キャップ修飾法の確立

様々な種類の修飾キャップを簡便に合成できる手法として、酵素を用いる方法を検討した。ワクシニアウイルス由来のキャッピング酵素を利用し、様々な修飾 GTP アナログを基質として、それらを RNA の 5' 端に付加できるかどうかを評価した。

(2) 修飾キャップの機能性評価

(1) で合成できた修飾キャップについて、組換えタンパク質を用いた試験管内アッセイによって、脱キャップ化酵素に対する抵抗性を評価した。また、修飾キャップを持つ mRNA を合成してヒト培養細胞に導入し、蛍光タンパク質を用いたレポーターアッセイによってタンパク質合成活性を、一定時間経過後の RNA 量をリアルタイム PCR 法で定量することで mRNA の細胞内安定性を評価した。

(3) 修飾キャップのさらなる修飾

(1) で合成できた修飾キャップのうち、アジド基などを有するものについて、クリックケミストリー反応を利用して、ビオチンや蛍光色素といった機能性分子を共有結合させた。反応効率はゲルシフトアッセイで確認した。また、蛍光色素を付加した mRNA をヒト培養細胞に導入し、外来 mRNA の細胞内分布観察に利用できるかどうかを評価した。

(4) 細胞種特異的遺伝子発現システムの開発

細胞種特異的に発現しているマイクロ RNA によって遺伝子発現を制御する、細胞種特異的な人工 mRNA システムが多数報告されている。ここでは、それらのシステムと、タンパク質スプライシング反応を担うインテインを利用した翻訳後制御を組み合わせ、より高い細胞種特異性を持たせることを企図した。具体的には、発現させたい目的タンパク質を分割し、それぞれのペプチド断片をスプリット化したインテインと融合し、マイクロ RNA 応答性の人工 mRNA にコードさせた。それらの mRNA をヒト培養細胞に導入し、人工マイクロ RNA 存在下における目的タンパク質の発現量を評価した。

4. 研究成果

(1) キャップ修飾法の確立

ワクシニアウイルス由来のキャッピング酵素を用いることで、様々な修飾 GTP アナログを RNA の 5' 端に付加できることが確認できた。当初の予想以上に幅広い化学構造の GTP アナログを基質として利用できることが分かった他、リボースや塩基の各部位における修飾について反応活性への影響の傾向が確認できた。今後、他のウイルス由来のキャッピング酵素についても基質特異性や反応活性等の評価を行い、より優れたキャップ修飾法の探索を行いたい。

(2) 修飾キャップの機能性評価

(1) で合成できた様々な修飾キャップ構造の生化学的な機能を評価した。脱キャップ化酵素に対する安定性を調べたところ、有意に抵抗性が増大しているものが確認できた。キャップの安定性は mRNA の安定性に寄与すると期待される。しかしながら、細胞内における修飾キャップを持つ mRNA の安定性を調べたところ、いずれの修飾キャップについても天然型のキャップを持つ mRNA と差が無かった。今回評価を行った条件では、3' 末端からの分解やエンドヌクレアーゼ活性による内部からの分解、細胞の分裂に伴う希釈による効果が大きいためだと考えられる。修飾キャップの翻訳活性についても評価を行ったところ、天然のキャップ構造よりも翻訳活性が高いものが複数見つかった。mRNA の安定性に顕著な差は見られなかったことから、翻訳開始因子との相互作用能の改善によると考えられる。これらの結果は、より効果的なキャップ構造を考える上で有益な知見となりうる。

(3) 修飾キャップのさらなる修飾

ワクシニアウイルス由来のキャッピング酵素を利用して合成した、アジド基を持つ修飾キャップに、クリックケミストリー反応を利用してビオチンや蛍光色素といった機能性分子を共有結合で付加させることができた。反応は容易で効率も高く、新たな部位特異的 RNA 修飾法として、様々な用途が期待できる。ここでは、細胞外から導入した RNA を可視化することを試みた。本手法でキャップ部位に蛍光色素を付加した mRNA をヒト培養細胞に導入したところ、外来 mRNA の細胞内分布を観察することができた。本手法により、蛍光色素の他にも様々な機能性分子を簡単に RNA に付加できるため、mRNA への新たな機能の付与が可能である。RNA 機能を解析するための新たな手法にもなりうる。

(4) 細胞種特異的遺伝子発現システムの開発

人工 mRNA の副作用を低減させるため、目的の細胞のみでタンパク質発現を行う mRNA の開発を行った。そのような、細胞種特異的なタンパク質発現を実現する人工 mRNA として、細胞種特異的に発現しているマイクロ RNA を利用するシステムが多数報告されている。しかし、非標的細胞でも有意なレベルのタンパク質発現が見られるなど、特異性にはさらなる改善が必要である。そのため、タンパク質スプライシング反応を担うインテインを利用した翻訳後制御を組み合わせることで、より高い細胞種特異性を実現できないか検討した。発現させたい目的タンパク質を複数のペプチド断片へと分割し、それぞれのペプチド断片をスプリット化したインテインと融合し、マイクロ RNA 応答性の人工 mRNA にコードさせた。標的細胞では各断片が発現することで、機能を持つ目的タンパク質が発現される。また、非標的細胞においてはプロテインスプライシングを阻害するペプチドが発現されることで、目的タンパク質の生成が抑制される。このような mRNA を作製しヒト培養細胞に導入して評価したところ、実際に、人工マイクロ RNA に応答した目的タンパク質の発現が確認できた。期待通りに、非標的細胞におけるタンパク質発現を抑制できることも確認できた。本システムは mRNA 医薬の安全性の向上に役立つと考えられる。今後、このシステムの汎用性の評価を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kameda Shigetoshi, Ohno Hirohisa, Saito Hirohide	4. 巻 51
2. 論文標題 Synthetic circular RNA switches and circuits that control protein expression in mammalian cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e24 ~ e24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac1252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Hirohisa, Akamine Sae, Mochizuki Megumi, Hayashi Karin, Akichika Shinichiro, Suzuki Tsutomu, Saito Hirohide	4. 巻 51
2. 論文標題 Versatile strategy using vaccinia virus-capping enzyme to synthesize functional 5' cap-modified mRNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e34 ~ e34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 H. Ohno, S. Komatsu, H. Saito	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 296
3. 書名 Molecular Robotics: An Introduction (S. Murata, Ed.), pp.249-258	

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 RNAのキャッピング方法、修飾RNAの製造方法、及び修飾RNA	発明者 齊藤博英、大野博久、赤峰冨	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/15168	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------