

令和元年6月14日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19357

研究課題名(和文)mRNA医薬を成功に導くmRNA安定化技術の開発

研究課題名(英文)Development of mRNA stabilization technology for mRNA therapeutics

研究代表者

星野 真一 (Hoshino, Shin-ichi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40219168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムへの挿入による発がん等の危険性があるDNA医薬に代わって、そのような危険性のないmRNA医薬を遺伝子治療やiPS細胞の作製、がん免疫療法などに臨床応用する試みに期待が高まっている。しかしながら、RNAのもつ不安定性がmRNA医薬実現に向けて大きな障壁となっていた。我々は、人工mRNAの細胞内における分解機構を解明し、その分解機構を抑えmRNAを安定化する技術を開発した。iPS細胞の作製と遺伝子治療(ゲノム編集)において、その有効性を検証し、とくにゲノム編集においてその有効性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子治療にはこれまでDNAを用いた治療が行われてきたが、ゲノムへの挿入による発がん等の危険性が問題視されてきた。本研究では、発がん等の危険性のない安全な医薬のとして期待されるmRNAの欠点であった不安定性を克服するmRNA安定化技術を開発し、ゲノム編集における有効性を確認できたことで、今後遺伝子治療をはじめ、iPS細胞の作製やがん免疫療法などへも広く応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Much attention has been focused on the mRNA-based therapeutics as an alternative to the DNA-based therapeutics, since mRNA can be used for generation of induced pluripotent stem (iPS) cells, cancer therapy etc. without the risk of transgene insertion into genomes. However, it remains a critical issue that mRNA is unstable and transient in cells. Here, we developed a method stabilizing synthetic mRNA in cells and found our methodology to be useful especially for genome editing in cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：人工mRNA mRNA医薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで細胞内における『mRNA 分解開始の分子機構』(Funakoshi et al., *GenesDev* 2007)をはじめとして種々の mRNA 分解制御機構を解明してきた背景のもと、RNA 医薬として用いる人工 mRNA の高効率発現を目的として、人工合成 mRNA の細胞内における安定化について検討した。そのなかで、RNA の修飾、mRNA の環状化、塩基配列の改変など、さまざまな手法を試みたが人工合成 mRNA の安定化は殆どみとめられなかった。このような試みは世界的に行なわれているものであるが、いまだ高効率に安定化する技術は開発されていない。その理由は、「人工合成 mRNA も内在性の mRNA と同じ分子機構で分解される」という誤った認識に基づくものであった。我々は、細胞内における人工合成 mRNA の分解機構について解析を行い、「外来性の人工合成 mRNA が、内在性 mRNA とは全く異なる分子機構で分解される」というこれまでの常識を覆す予想外の知見を得た。すなわち、この独自の発見に基づいて『mRNA 医薬(人工合成 mRNA)を細胞内において安定化するためには、外来性 mRNA に対して生体が備えている特異的分解機構を解明しこれを阻害することによってのみ達成される』と着想するに至った。

### 2. 研究の目的

人工の mRNA を RNA 医薬として遺伝子治療に応用しようという期待が最近急速に高まってきている。その最大の理由は、「mRNA は DNA と異なり、ゲノムへの組換えによる癌化等の危険性がない」という点にある。しかしながら、mRNA 医薬開発の実現に向けて最大の障壁となっているのが、「mRNA のもつ不安定生」である。我々は、外来性 mRNA が細胞内 mRNA とは異なる機構で分解されることを見出し、その分子機構の全容を解明した(Nogimori et al., *Nucleic Acids Research* 2019)。また、東大創薬機構化合物ライブラリーを用いてその外来性 mRNA の分解に関わる因子を標的とした阻害剤のスクリーニングを実施し、mRNA 安定化剤の候補化合物を得た。本研究においては、この安定化技術を iPS 細胞の作製などに応用することを目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 外来性人工 mRNA 安定化剤の有効性の検証 1 (iPS 細胞作製への応用): 人工合成 mRNA を RNA 医薬として応用することが期待されている代表例として、iPS 細胞の作製を取り上げ、同定した阻害剤の有効性の検証実験を行なう。c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2 をコードする人工合成 mRNA によるマウス線維芽細胞 MEF の初期化効率を、すでに iPS 細胞作製のスタンダードとして使用されているレトロウイルスベクター (RvMX4) と比較検証する。本研究によって同定した RNaseL 等特異性因子に対する阻害剤が、初期化効率を格段に改善し、iPS 細胞をはじめとする臨床応用に有効であることを検証する。

(2) 外来性人工 mRNA 安定化剤の有効性の検証 2 (人工 Cas9 mRNA を用いたゲノム編集への応用): Dom34 遺伝子の C 末端に Flag タグを付加するドナーベクター及びガイド RNA 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、24 時間後に OAS3 阻害剤を 10  $\mu$ M となるように添加した。阻害剤添加 1 時間後、Cas9 mRNA を導入した。3 時間後に培地交換を行い、培地中の mRNA を除去した。さらに 24 時間後に細胞を回収しウエスタンブロット法によりゲノム編集で挿入した Flag タグを検出した。

### 4. 研究成果

iPS 細胞の作製には山中 4 因子に対する人工 mRNA を約 1 週間に渡って毎日トランスフェクションを行う必要があり、その際人工 mRNA 安定化剤 (OAS3 阻害剤 H-13) を連続投与し続けることによる細胞毒性によって実験実施に困難を極めた。そこで、現在の OAS3 阻害剤 H-13 についてはさらに構造最適化を継続し、人工 mRNA の投与回数 1 回のみで実施可能な Crispr/Cas9 によるゲノム編集実験を iPS 細胞の作製に代る検証実験として実施した。Crispr/Cas9 システムを用いて目的遺伝子に FLAG タグを挿入する実験を人工 Cas9 mRNA を用いて実施したところ、Cas9 をプラスミドで発現させたポジティブコントロールでは FLAG 抗体による Dom34 タンパク質の検出が観察できたのに対し、人工 Cas9 mRNA では検出限界以下であった。その一方で、OAS3 阻害剤存在下においては弱いながら Dom34 タンパク質の検出が可能となった。ただし、Cas9 プラスミドを用いたポジティブコントロールと比較すると弱いことから、OAS3 阻害剤については引き続き構造最適化が必須であると判断した。

そこで、人工 mRNA の分解に関わる因子として同定した RNaseL に対する阻害剤についても検討した。外来性 mRNA の分解因子として同定した OAS3/RNaseL や Dom34 を siRNA によってノックダウンすることで外来性 mRNA の分解はほぼ完全に抑制されるという独自の知見に基づき、分解酵素 RNaseL を阻害する薬物を大手製薬企業の化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。スクリーニングは大腸菌組換えタンパク質を用いた酵素アッセイにより実施した。RNaseL の標的配列を有し、両端にフルオロセインとクエンチャーを付加した RNA を基質とし、切断によるフルオロセインの発光を測定することにより酵素活性を評価した。得られたヒット化合物について、セカンドスクリーニングでは細胞での人工 mRNA 安定化を指標に、安定化活性の高い化合物を取得した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nogimori, T., Nishiura, K., Kawashima, S., Nagai, T., Oishi, Y., Hosoda, N., Imataka, H., Kitamura, Y., Kitade, Y., Hoshino, S. (2019) Dom34 mediates targeting of exogenous RNA in the antiviral OAS/RNase L pathway. **Nucl Acids Res** 47, 432-449.

doi.org/10.1093/nar/gky1087

Nogimori, T., Furutachi K., Ogami, K., Hosoda, N., Hoshino, S. (2019) A novel method for stabilizing microRNA mimics. **Biochem Biophys Res Commun** 511, 422-426.

doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.075

### 〔学会発表〕(計 8 件)

合田凌也、野木森拓人、細田直、星野真一：RNase L を標的とした mRNA 医薬安定化剤の開発、第 28 回日本病院薬剤師会東海支部ブロック学術大会・平成 30 年度 日本薬学会東海支部例会、2018 年 11 月 4 日 (静岡)

大石結香、野木森拓人、細田直、星野真一：臨床応用を目的とした人工 long non-coding RNA の安定化、第 64 回日本薬学会東海支部大会、2018 年 6 月 30 日 (名古屋)

野木森拓人、永井貴広、細田直、星野真一：mRNA 医薬安定化技術の開発、第 64 回日本薬学会東海支部大会、2018 年 6 月 30 日 (名古屋)

星野真一：臨床応用を目的とした人工 RNA 安定化技術の開発、シンポジウム『人工 RNA による生体機能制御への挑戦』、日本薬学会第 138 年会 オーガナイザー兼シンポジスト、2018 年 3 月 28 日 (金沢)

星野真一：生体機能を制御する人工 mRNA 安定化技術の開発、ワークショップ『デザイナー RNA:人工 RNA/RNP による生命回路のコントロール』、ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会 / 第 40 回日本分子生物学会 / 第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 7 日 (神戸) オーガナイザー兼シンポジスト

大石結香、野木森拓人、細田直、星野真一：細胞内における long non-coding RNA 医薬の安定化および遺伝子治療への応用、第 27 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 29 年度日本薬学会東海支部例会、2017 年 11 月 26 日 (鈴鹿)

野木森拓人、西浦久達、川島生、永井貴広、細田直、今高寛晃、星野真一：RNA 品質管理因子 Dom34 は外来性 mRNA 分解を介して抗ウイルス防御において機能する、第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年 7 月 19 日-21 日 (富山)

小林純果、細田直、星野真一：mRNA の安定性に関わる因子の探索、第 63 回日本薬学会東海支部総会・大会、2017 年 7 月 8 日 (岐阜)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syk/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：細田直

ローマ字氏名：Nao Hosoda

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：40438198

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。