

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20696

研究課題名(和文) 時空間特異性と細胞種選択性を併せ持つmRNA光翻訳制御システムの開発

研究課題名(英文) Optical regulation system of mRNA translation with spatiotemporal and cell-type specificity

研究代表者

中西 秀之(Nakanishi, Hideyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：90722885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA医薬は治療効果を持つ任意のタンパク質を生体内の細胞に産生させることができるが、治療対象と異なる細胞での治療用タンパク質産生や過剰量の産生は副作用の原因となり得る。そこで本研究では、mRNAからタンパク質への翻訳を光や特定の細胞内タンパク質に応じて制御するシステムを開発した。これにより、光を照射した部位の細胞や、特定のタンパク質を発現している細胞選択的に治療用タンパク質を産生させることが可能となる。更に、治療用タンパク質を不活化状態で産生させ、その特定の条件下でのみ活性化させる手法も開発した。これらの技術により、高い効果と低い副作用を両立するmRNA医薬が実現すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳段階ならびに翻訳後段階でmRNA医薬を制御し標的細胞選択的な治療遺伝子発現を可能にした本研究成果は、正常細胞への影響を抑えつつがん細胞を死滅させるといったような、高い治療効果と低い副作用を兼ね備えたmRNA医薬の実現に貢献するものと考えられる。

また、mRNA医薬を直接投与する以外にも、再生医療・細胞治療の準備段階において移植したい細胞種だけ残して副作用の原因となる細胞種は死滅させるといった利用法も考えられる。同様に、ドラッグスクリーニング等の研究に用いる細胞種を様々な細胞種が混在した集団から選別といった応用も可能である。

以上のように、本研究成果は様々な治療法の発展への寄与が期待できる。

研究成果の概要(英文)：mRNA drugs can make cells to express any therapeutic transgenes, but they may induce adverse effects due to off-target or excessive expression. Therefore, in this study, we developed light and protein-responsive systems that control the translation from mRNAs to proteins. These translational control systems enable selective expression in cells which are irradiated by light or expressing a specific target protein.

Furthermore, we also developed the system to post-translationally control the therapeutic protein function. In this system, the proteins are translated from mRNA as inactive forms, and activated only under specific conditions.

These systems will help the development of mRNA drugs with high therapeutic effects and low adverse effects.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：mRNA医薬 遺伝子治療 合成生物学 翻訳 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラスミド DNA やウイルスを用いる一般的な遺伝子導入では、導入した遺伝子がゲノムに組み込まれることで内在遺伝子の変異を引き起こす危険性が伴うのに対し、試験管内転写反応にて調製した mRNA を遺伝子導入に用いる場合はこうした変異の危険性が無い。そのため、がんや感染症、心筋梗塞等に対する遺伝子治療、臨床で用いる細胞の初期化/分化の誘導、ゲノム編集に用いる DNA 切断酵素の導入など多様な領域において、mRNA を用いた遺伝子導入に期待が寄せられている。

しかしながら、予期せぬ副作用が生じた際に遺伝子発現を停止させる、あるいはがん細胞を死滅させつつ正常細胞への悪影響を避けるといったことが、DNA を用いた遺伝子導入では光応答性転写因子や細胞種特異的プロモーターを用いた転写段階での制御により可能であるのに対し、転写済みの mRNA を用いた遺伝子導入ではこうした発現制御は困難である。したがって、mRNA を用いた遺伝子導入の安全性と有効性を更に高めるためには、「必要時にのみ導入遺伝子を発現させ、副作用等が出た際には発現を停止する技術」や「導入遺伝子の発現を標的細胞種(がん細胞など)に限定し、その他の細胞種では発現させない技術」の開発が必須と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、mRNA がタンパク質へと翻訳される部位と時間ならびに細胞種を限定する技術を開発し、これを以て高い安全性と有効性を兼ね備えた遺伝子治療や、生命現象の精密な操作を実現することである。

3. 研究の方法

本研究の手順は大まかには次のようになる。まず、細胞に導入したい mRNA の配列の設計を行い、次にその配列を有するプラスミド DNA を作製した。ただし、環状であるプラスミド DNA はそのままでは試験管内転写反応により mRNA を作製する際の鋳型 DNA としては直接使用できないため、いったん、このプラスミド DNA から PCR により線状 DNA を作製した。この線状 DNA を鋳型として試験管内転写反応により mRNA を作製し、精製した。精製した mRNA は遺伝子導入試薬によってヒト由来培養細胞に導入し、必要に応じて光照射等を行った。その後、導入した mRNA から翻訳されたタンパク質をルミノメーター等により定量することで、翻訳量が光照射等によりどのように変化するかを解析した。

より詳細な研究の手順については以下に記載する。

(1) 細胞の培養

HeLa 細胞は 10% の FBS と 0.5 × のペニシリン・ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて培養した。継代に際しては、0.25% のトリプシン/EDTA を用いて培養皿から剥離した後、DMEM にて再懸濁し、細胞の 10~20% を新しい培養皿に再播種した。

(2) プラスミド DNA の構築

高正確性 PCR 酵素を用いた PCR によりインサートとなる DNA を作製した。また、インサートのクローニング先となるベクターは、同様の PCR またはプラスミド DNA の制限酵素処理により作製した。これらのインサートならびにベクターを DNA 精製キットにて精製した後、In-Fusion クローニングキットまたは DNA リガーゼを用いたクローニングによりベクターとインサートを繋いだ。このクローニングの反応液を用いて大腸菌コンピテントセル(DH5 株または HST08 株)を形質転換し、得られたコロニーを LB 培地にて培養後、プラスミド DNA を抽出した。抽出後のプラスミド DNA はシーケンス解析にて DNA 配列を確認し、正しい配列を有していたプラスミド DNA を以後の実験に用いた。

(3) 試験管内転写反応による mRNA の作製

高正確性 PCR 酵素を用いた PCR により、(2) で作製したプラスミド DNA を鋳型として、試験管内転写反応の鋳型 DNA を作製した。この鋳型 DNA は、発現させたいタンパク質のコード領域、5' ならびに 3' 非翻訳領域、T7 プロモーター配列、ならびに poly(A) 鎖の鋳型となる poly(T) 配列を有している。作製した鋳型 DNA を精製した後、これを T7 RNA ポリメラーゼ、mRNA の材料となる各ヌクレオチド、Cap アナログ、ならびに試験管内転写反応用のバッファーと混合することで mRNA を作製した。その後、DNase により鋳型 DNA を除去し、更に、mRNA の免疫原性を低減するために脱リン酸化処理を行った。脱リン酸化後の mRNA は精製した後、分光光度計により RNA 濃度を測定し、更に Bioanalyzer を用いた電気泳動により品質を確認した。

(4) 細胞への mRNA 導入と翻訳の定量

平底プレートに HeLa 細胞を播種し、翌日にトランスフェクション試薬(Lipofectamine MessengerMAX)を用いてこれらの細胞に mRNA を導入した。mRNA 導入の翌日、ルミノメーターやフローサイトメーターを用いて導入した mRNA の翻訳量を定量した。また、必要に応じて mRNA 導入後の細胞生存率測定も行った。

4. 研究成果

(1) 光に応答して翻訳を制御するシステムの開発

本研究ではまず、光による翻訳制御を可能とするシステムの開発に成功した。この光翻訳制御システムは、報告者らが以前に開発した人工翻訳制御タンパク質である Caliciviral VPg-based Translational activator (CaVT) をベースにして構築したものである。CaVT は特定の mRNA モチーフに結合する RNA 結合ドメインと、細胞内の真核生物翻訳開始因子 (eukaryotic translation initiation factor, eIF) 4F と結合する機能を持つ VPg タンパク質により構成されている。通常の mRNA は 5' 末端に Cap と呼ばれる構造を持ち、この Cap が eIF4F と結合することで翻訳が開始されるが、Cap を持たない mRNA を人工的に作製すると、この mRNA の翻訳は CaVT 依存的に開始させることができる。すなわち、CaVT の RNA 結合ドメインが Cap を持たない mRNA に結合すると、CaVT の VPg 部分への eIF4F の結合を介して mRNA の翻訳が活性化されるのである。また、CaVT が mRNA に結合するためには、RNA 結合ドメインの標的モチーフが mRNA の 5' 非翻訳領域上に存在する必要があるため、標的モチーフを持たない内在 mRNA には影響せず、人工的に作製した標的モチーフを持つ mRNA に対して選択的に作用する。更に、Cap を有しており、尚且つ通常の標的モチーフよりも CaVT と強固に結合するモチーフを持つ mRNA の場合、CaVT の結合により逆に翻訳が抑制される。したがって、制御対象の mRNA の設計次第で、CaVT は翻訳の活性化と抑制のいずれにも利用可能なのである (H. Nakanishi and H. Saito, *Nature Communications* 11(1), 1297, 2020)。

光翻訳制御システムでは、上述の CaVT に加え、特定の化合物と結合するタンパク質、ならびにその結合標的の化合物に光ケージをつけたものを利用している。本研究では 2 種類の異なる光翻訳制御システムを開発したが、それらのうち最初に開発したものでは、CaVT を RNA 結合ドメインと VPg に分割し、それぞれに対して特定の化合物と結合するタンパク質を融合させている。結合標的の化合物が存在しない状態においては、RNA 結合ドメインと VPg は分離したままである。したがって、翻訳活性化対象の mRNA に RNA 結合ドメインが結合しても、翻訳活性化に必要な VPg が無いため、翻訳は活性化されない。ここに、結合標的化合物を加えると、RNA 結合ドメインと VPg がこの化合物を介して結合する。これにより、VPg が翻訳活性化対象の mRNA に作用できるようになり、翻訳が活性化されるという仕組みである。しかしながら、これだけでは化合物の投与による翻訳制御はできても、光による翻訳制御はできない。そこで次に、結合標的の化合物に対して光ケージをつけることにした。この光ケージがつけられた化合物は、結合先のタンパク質と結合することができない。しかし光ケージは光照射により取り除かれるため、光を照射すると結合できる状態へと変換される。これにより、光を照射された細胞において選択的に翻訳活性化が起こるといいう仕組みである。実際に RNA 結合ドメインと VPg に分割した CaVT ならびに制御対象の mRNA を細胞に導入し、光ケージをつけた化合物を添加してから光を照射すると、翻訳量を約 3 倍に増大させることができた。更に、光の照射時間や光ケージをつけた化合物の添加量によって翻訳量を調節することも可能であった (H. Nakanishi, *et al.*, *Cell Chemical Biology* 28(5), 662-674.e5, 2021; H. Nakanishi, *et al.*, *STAR Protocols* 3(2), 101451, 2022)。

上述のように、光を照射した細胞において選択的に翻訳を活性化させることには成功したが、この分割型 CaVT を用いたシステムでは、逆に光を照射した細胞において選択的に翻訳を抑制させることは困難であった。これは、翻訳の活性化には RNA 結合ドメインと VPg の両方が必要であるが、翻訳の抑制は RNA 結合ドメインだけで生じるからである。そこで次に、光照射による翻訳抑制も可能にするため、化合物応答性の分解促進ドメインを融合させた CaVT (不安定化 CaVT) を作製した。この不安定化 CaVT は、結合標的の化合物が存在しない条件では急速に分解されるため、翻訳活性化と翻訳抑制のいずれも行うことができない。しかしながら標的化合物が分解促進ドメインに結合すると、分解促進ドメインの機能が阻害され、CaVT が安定化する。このようにして安定化した CaVT は、制御対象の mRNA に結合し、その翻訳を活性化または抑制できるといいう仕組みである。更に、この分解促進ドメインを阻害する化合物に光ケージをつけることで、光を照射した細胞において選択的に翻訳活性化や翻訳抑制を引き起こすこともできる。実際に、この不安定化 CaVT とその制御対象の mRNA を細胞に導入し、光ケージをつけた化合物を添加したところ、光を照射した細胞において翻訳量を 3~4 倍程度に上げることができた。更に、制御対象 mRNA の設計を CaVT により翻訳抑制を受けるものへと変更することで、光照射により翻訳量を約三分の一に低下させることも可能であった。また、分割型 CaVT の場合と同様、光の照射時間や光ケージをつけた化合物の添加量によって翻訳量を調節することもできた。

このように、不安定化 CaVT による光翻訳制御システムは翻訳活性化と翻訳抑制のいずれにも利用できるといいう点において分割型 CaVT による光翻訳制御システムよりも優れている。しかしながら、光照射から翻訳活性化までにかかる時間という観点で見ると、分割型 CaVT の方が迅速な応答を示した (図 1) (H. Nakanishi, *et al.*, *Cell Chemical Biology* 28(5), 662-674.e5, 2021; H. Nakanishi, *et al.*, *STAR Protocols* 3(2), 101451, 2022)。したがって、分割型 CaVT と不安定化 CaVT はどちらか一方がもう一方の上位互換というわけではないと言える。例えば、副作用が出た際に翻訳を抑制できることが重要な場合は不安定化 CaVT を、病状悪化時に翻訳を迅速に活性化させることが重要な場合は分割型 CaVT をそれぞれ使用するといったように、目的に応じて使い分けると良いと考えられる。

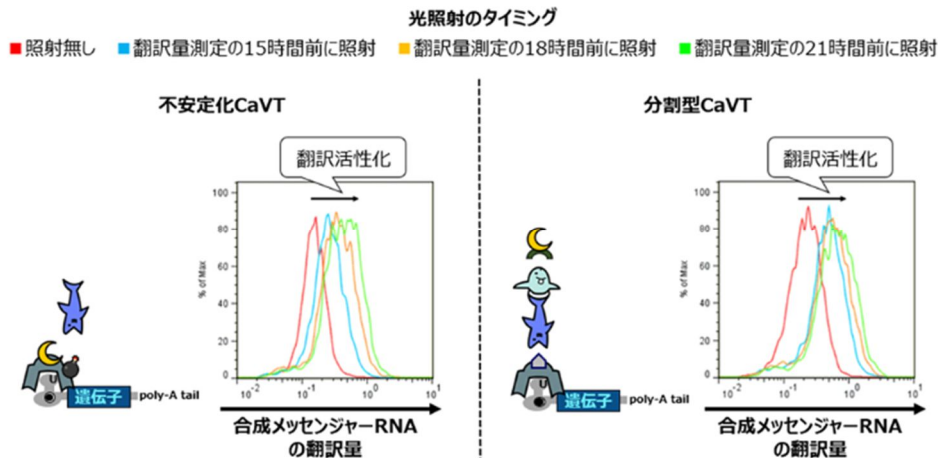


図 1：不安定化 CaVT ならびに分割型 CaVT による光翻訳制御（翻訳活性化）

(2) 特定の標的タンパク質に应答して翻訳を制御するシステムの開発

光翻訳制御システムに続いて、細胞選択的な翻訳制御を可能にするシステムの開発に取り組んだ。標的細胞と非標的細胞を判別するためには、それらの細胞の間で異なっている部分を見つける必要がある。そこで本研究において着目したのが、各細胞が発現しているタンパク質である。ヒトの細胞はタンパク質をコードする遺伝子を約二万種類有しており、また、一つの遺伝子から複数のタンパク質バリエーションが作られる場合もある。このようにヒト細胞が発現するタンパク質には非常に多くの種類があるが、各細胞が全種類のタンパク質を発現しているというわけではなく、細胞の種類ごとに発現パターンが異なる。したがって、標的細胞において選択的に発現が高い（または低い）タンパク質を検知し、それに応じて翻訳を制御することができれば、細胞選択的な翻訳制御が可能となる。

特定のタンパク質に应答して翻訳を制御するシステムの構築にあたって、まずは光翻訳制御システムの場合と同様、CaVT を RNA 結合ドメインと VPg に分割したものを作製した。そしてこれらに対し、検知対象のタンパク質に対して特異的に結合するナノボディを融合させた。ナノボディは一本鎖抗体由来の抗原結合ドメインであり、ラクダ科動物を免疫することで検知したいタンパク質に結合するナノボディを取得することが可能である。また、光翻訳制御の際に作製した分割型 CaVT とは異なり、このタンパク質応答型 CaVT ではケージドインテインと呼ばれるタンパク質も融合させた。ケージドインテインは N-インテインと C-インテインの二つから成り、N-インテインと C-インテインが接近すると、N-インテインの N 末端側に融合させたタンパク質と C-インテインの C 末端側に融合させたタンパク質が直接ペプチド結合で繋がる（この際、N-インテインと C-インテインは切り離される）。つまり、RNA 結合ドメイン-N-インテイン-ナノボディという順番で融合されたタンパク質と、ナノボディ-C-インテイン-VPg という順番で融合されたタンパク質が接近すると、RNA 結合ドメイン-VPg、すなわち完全長の CaVT が再構成されるのである。検知対象のタンパク質を発現している細胞においては、このタンパク質とナノボディの結合を介して、RNA 結合ドメイン-N-インテイン-ナノボディとナノボディ-C-インテイン-VPg の二つのタンパク質が接近する。そしてこの接近により、CaVT の再構成が誘発されるというわけである。一方、検知対象のタンパク質を発現していない細胞においては、二つのタンパク質の接近が誘導されないため、CaVT の再構成も抑えられている。この RNA 結合ドメイン-N-インテイン-ナノボディとナノボディ-C-インテイン-VPg、ならびに制御対象の mRNA を細胞に導入したところ、検知対象のタンパク質を発現している細胞において、そうでない細胞の 4~5 倍に翻訳量を増大させることができた (H. Nakanishi, H. Saito, and K. Itaka, *ACS Synthetic Biology* 11(3), 1077-1085, 2022)。

しかしながら、光翻訳制御の場合もそうであったように、RNA 結合ドメインと VPg に分割する方式では、翻訳活性化の制御はできても翻訳抑制の制御はできない。そこで次に、CaVT を RNA 結合ドメインと VPg の間で分割するのではなく、RNA 結合ドメインの内部で分割することにした。従来の分割方式の場合は完全長の CaVT へと再構成される前の時点で RNA 結合ドメインだけでも翻訳抑制能を有しているが、この新しい分割方式であれば、再構成前の時点では RNA 結合ドメイン自体が機能せず、したがって再構成されるまでは翻訳抑制能も翻訳活性化能も持たないと考えられるからである。RNA 結合ドメインをどの位置で分割すれば良いかを検討したところ、46 残基目のシステインで分割した CaVT (C46 分割型 CaVT) であれば再構成前は翻訳制御能が無く、検知対象タンパク質に応じた再構成により翻訳抑制能を回復させられることが分かった。この C46 分割型 CaVT により、検知対象タンパク質を発現している細胞において選択的に翻訳を数倍活性化させることができ、また制御対象 mRNA の設計を変えることで逆に翻訳量を数分の一に抑制することもできた (図 2)。更に、ナノボディの部分別の別のタンパク質に結合するナノボディへと交換することで、検知対象を容易に変更することも可能であった (H. Nakanishi, H. Saito, and K. Itaka, *ACS Synthetic Biology* 11(3), 1077-1085, 2022)。

以上のように、細胞が発現している特定のタンパク質を検知し、それに応じて mRNA の翻訳を制御するシステムの開発に成功した。

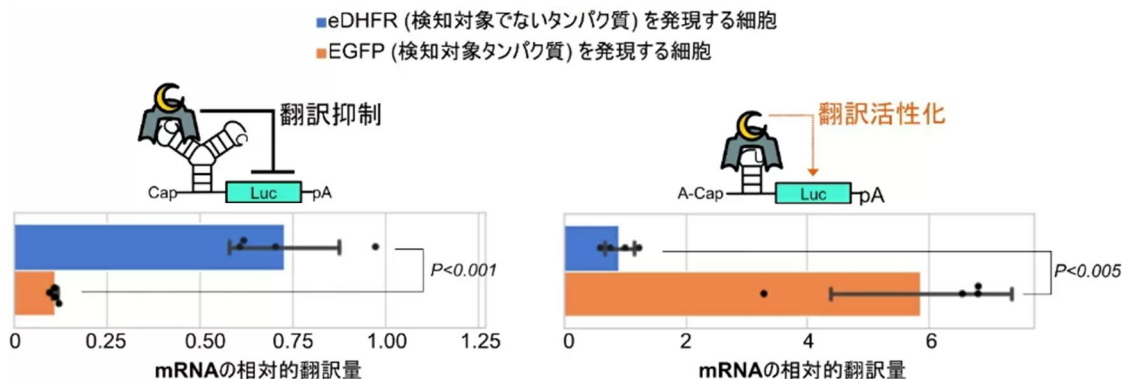


図 2 : C46 分割型 CaVT による翻訳抑制と翻訳活性化

(3) 特定の標的タンパク質に反応して翻訳後の制御を行うシステムの開発

理論的には、(1)の光翻訳制御システムと(2)のタンパク質応答翻訳制御システムを組み合わせることで、光応答性と細胞選択性を併せ持つ mRNA 翻訳制御システムを開発することが可能である(例えば、タンパク質応答性の C46 分割型 CaVT に対して、光制御可能な分解促進ドメインを融合させるなどすれば良い)。しかしながら本報告者は、mRNA 医薬への適用を考えた場合、両方の制御を翻訳段階で行うよりも、どちらか一方は翻訳後の段階で制御の方がより実用的ではないかと考えた。なぜなら、翻訳制御を多段階にすると投与してから翻訳制御が始まるまでのタイムラグがその分長くなるが、投与された mRNA 医薬の半減期は短いため、このタイムラグが長くなるほど制御前に体内から消失してしまう mRNA 医薬の割合が多くなると考えられるからである。一方で、既に翻訳されたタンパク質は mRNA の消失後もしばらくは残存するため、翻訳後の制御であればこの mRNA の短い半減期による影響を低減できると考えられる。

翻訳後制御の仕組みとしては、(2)で用いたのと同様の、検知対象タンパク質へのナノボディの結合を介して N-インテインと C-インテインを接近させ、分割タンパク質を完全長へと再構成させるというものを採用した。すなわち、(2)の翻訳制御システムでは、翻訳制御タンパク質である CaVT を検知対象タンパク質依存的に再構成させ、この再構成された CaVT により治療用タンパク質等の発現を制御するという使い方を想定しているのに対し、この翻訳後制御システムでは、治療用タンパク質自体を分割した状態で発現させ、検知対象タンパク質依存的に再構成させるのである。この翻訳後制御システムの有効性を実証するための治療用タンパク質としては、がん細胞を選択的に死滅させるといった使い方を想定し、細胞死誘導タンパク質である Barnase を採用した。この Barnase を分割したものにケージドインテインとナノボディを融合させたものを設計し、その融合タンパク質を発現する mRNA を作製した。また、この時、分割型 Barnase は分割位置が異なる 4 種類を設計した。これらの分割型 Barnase mRNA を細胞に導入したところ、4 種類のうち 3 種類において、検知対象タンパク質を発現している細胞に対する細胞死誘導効果がそうでない細胞に対するものよりも高かった(なお、残りの 1 種類は、検知対象タンパク質の発現の有無に関わらず、非常に高い細胞死誘導効果を示した)。しかしながら、これらの分割型 Barnase は検知対象タンパク質を発現していない細胞においても、発現している細胞に対するものよりは弱いながらも細胞死誘導効果を示した。このような非特異的細胞死誘導効果があると、正常細胞への影響を抑えつつがん細胞を死滅させるといった使い方はしづらい。そこで、Barnase に対する阻害効果を持つタンパク質である Barstar を発現する mRNA を少量同時に導入したところ、検知対象タンパク質を発現していない細胞の生存率を 100% 近くに保ちつつ、検知対象タンパク質を発現している細胞の約 90% を死滅させることに成功した。更に、(2)の翻訳制御システムの場合と同様、ナノボディ部分を他のタンパク質に結合するナノボディに交換することで、検知対象のタンパク質を容易に変更することができた(K. Free, H. Nakanishi, and K. Itaka, *Pharmaceutics* 15(1), 213, 2023)。

このタンパク質応答翻訳後制御システムを Barnase 以外のタンパク質にも適用可能であることについても、既にそれを実証するデータは得られており、今後、論文投稿を進める予定である。

以上のように、本研究にて開発した光やタンパク質に反応する翻訳制御システム、ならびに翻訳後制御システムは、必要に応じて治療用タンパク質の翻訳量を増減させたり、治療が必要な部位・細胞において選択的に治療用タンパク質を機能させたりすることを可能にするものであり、より安全な mRNA 医薬の実現に繋がるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kendall Free, Hideyuki Nakanishi, Keiji Itaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of Synthetic mRNAs Encoding Split Cytotoxic Proteins for Selective Cell Elimination Based on Specific Protein Detection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 213-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15010213	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 Hideyuki Nakanishi, Tatsuyuki Yoshii, Shinya Tsukiji, Hirohide Saito	4. 巻 3
2. 論文標題 A protocol to construct RNA-protein devices for photochemical translational regulation of synthetic mRNAs in mammalian cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101451-101451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101451	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 中西秀之, 位高啓史	4. 巻 285
2. 論文標題 mRNA医薬とmRNAワクチン	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 340-347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中西秀之, 位高啓史	4. 巻 37
2. 論文標題 指定された期間・細胞種において選択的に薬効を発揮するmRNA医薬のための翻訳制御技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 209-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中西秀之, 位高啓史	4. 巻 58
2. 論文標題 mRNAワクチン・mRNA医薬は何を可能にするのか	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 415-419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Nakanishi, Hirohide Saito	4. 巻 2312
2. 論文標題 Purification of Specific Cell Populations Differentiated from Stem Cells Using MicroRNA-Responsive Synthetic Messenger RNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1441-9_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Nakanishi	4. 巻 11
2. 論文標題 Protein-Based Systems for Translational Regulation of Synthetic mRNAs in Mammalian Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11111192	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 Nakanishi Hideyuki, Itaka Keiji	4. 巻 44
2. 論文標題 Synthetic mRNA for ex vivo therapeutic applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100447 ~ 100447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2022.100447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hideyuki, Saito Hirohide, Itaka Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Versatile Design of Intracellular Protein-Responsive Translational Regulation System for Synthetic mRNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.1c00567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中西秀之, 位高啓史	4. 巻 39
2. 論文標題 mRNA医薬・mRNAワクチンの基礎と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2693 ~ 2701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Nakanishi, Tatsuyuki Yoshii, Shunsuke Kawasaki, Karin Hayashi, Keita Tsutsui, Choji Oki, Shinya Tsukiji, Hirohide Saito	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Light-controllable RNA-protein devices for translational regulation of synthetic mRNAs in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 Undetermined
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hideyuki, Saito Hirohide	4. 巻 11
2. 論文標題 Caliciviral protein-based artificial translational activator for mammalian gene circuits with RNA-only delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15061-x	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 Nakanishi Hideyuki, Saito Hirohide	4. 巻 52
2. 論文標題 Mammalian gene circuits with biomolecule-responsive RNA devices	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 16~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2019.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 中西秀之, Kendall Free, 位高啓史
2. 発表標題 合成 mRNA を用いた細胞選別システム: 細胞内タンパク質を標的とする機能制御
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西秀之, 齊藤博英, 位高啓史
2. 発表標題 Intracellular protein-responsive translational regulation system based on the conditional reconstitution of an artificial translational regulator protein
3. 学会等名 10th International mRNA Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西秀之
2. 発表標題 翻訳を人為的にコントロール可能な“スマート mRNA 医薬”の開発
3. 学会等名 CBI学会2022年大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西秀之,位高啓史
2. 発表標題 タンパク質への翻訳を状況に応じて制御できる"スマートmRNA医薬"の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ケンドル・フリー,中西 秀之,位高 啓史
2. 発表標題 mRNAによる選択的細胞除去システム：細胞内タンパクに応答した細胞除去因子再構成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西秀之,Kendall Free,位高啓史
2. 発表標題 Synthetic mRNA-based selective cell elimination systems utilizing conditional reconstitution of split proteins
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西秀之,齊藤博英,位高啓史
2. 発表標題 細胞選択的なmRNA医薬翻訳制御のための、特定の細胞内タンパク質を検知できる人工翻訳制御因子の開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Free Kendall, Hideyuki Nakanishi, Keiji Itaka
2. 発表標題 mRNAs Encoding Split Cytotoxic Proteins for Selective Cell Elimination Based on Specific Protein Detection
3. 学会等名 9th International mRNA Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西秀之, 齊藤博英, 位高啓史
2. 発表標題 標的タンパク質を発現する細胞選択的にmRNAの翻訳を制御する技術の開発
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第20回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideyuki Nakanishi, Keiji Itaka, Hirohide Saito
2. 発表標題 Conditional translational regulation of synthetic mRNAs by caliciviral VPg protein-based translational activator (CaVT)
3. 学会等名 Virtual 8th International mRNA Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakanishi Hideyuki, Saito Hirohide
2. 発表標題 Artificial translational activator for regulation of synthetic mRNA-based mammalian gene circuits
3. 学会等名 19th Symposium for Gene・Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中西秀之、他72名	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 411
3. 書名 mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用	

1. 著者名 中西秀之、齊藤博英	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック（「第9章 医科学 9.1 細胞システム制御」を担当）	

1. 著者名 Nakanishi Hideyuki、Saito Hirohide	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 190
3. 書名 担当記事名: Endogenous Signal-Responsive Transgene Switch Systems for Visualization and Purification of Specific Cells, 書名: Medical Applications of iPS Cells	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 タンパク質の翻訳制御システム	発明者 中西秀之、位高啓史、 齊藤博英	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-139141	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 生細胞の選別システム	発明者 中西秀之、位高啓史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-139166	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質翻訳の制御システム	発明者 中西秀之、齊藤博英	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-122189	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

「合成メッセンジャーRNAからタンパク質への翻訳を制御する新システムの開発」【位高啓史 教授】
<https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220303-1/>
修飾塩基を含む合成メッセンジャーRNAからの遺伝子発現を 光により制御するシステムの開発に成功
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/210128-003000.html>
Flashing light on artificial RNA
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/pressrelease/news/210129-100000.html>
CiRAニュース
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200311-150000.html>
CiRA News (English)
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/pressrelease/news/200311-150000.html>

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
---------	---------