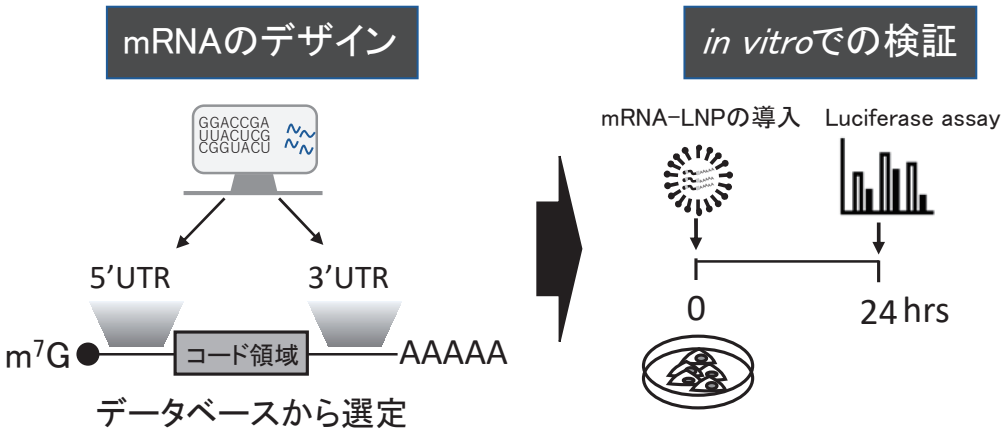
135　mRNAワクチン効果の最大化を目指した非翻訳領域の探索	野木森　拓人

【目的】DNA や mRNA などといった核酸を細胞に導入し、目的タンパク質を発現させる手法は 1990 年に登場し、遺伝子導入に核酸を用いるという概念が生まれた。当初、mRNA は細胞内において不安定であり、その発現が一過性のものであることから、DNA を用いた遺伝子導入法が主流となった。しかし DNA を用いた遺伝子導入には宿主ゲノムへの DNA 挿入による遺伝子変異および癌化の危険性が伴うという問題が浮上してきた。そこで近年、DNA を用いる方法に代わって細胞外で人工的に合成した mRNA を用いる方法が注目を集め、mRNA 医薬や mRNA ワクチンとして使用されている。他方、mRNA は副反応発現等の問題があるため、いかに細胞内での mRNA のタンパク質発現を効率化し、投与量を減らすことができるかが課題である。以上の背景を踏まえて、本研究では mRNA ワクチンの発現効率化を介して、より有効で安全なワクチン開発基盤の構築を目的とした。この目的を達成するために、まずは mRNA ワクチンに最適な非翻訳領域（UTR）を選定した。その後、培養細胞株を用いた *in vitro* 実験により、選択した UTR を搭載した mRNA ワクチンの発現量を検証した。

【方法】まず初めに、mRNA ワクチンが実際に導入されタンパク質を発現する骨格筋細胞において、翻訳効率の高い遺伝子を選定するため、公共データベースにアップロードされているデータを用いた。具体的には、ヒト骨格筋細胞と HeLa 細胞を用いた Ribosome profiling のデータを用い、各遺伝子の翻訳効率を算出した。選定した遺伝子の UTR を搭載した Luciferase mRNA を *in vitro* 合成した。これら合成した mRNA を HEK293A 細胞または C2CL12 細胞に 導入し、翻訳効率を測定した。

【結果】Ribosome profiling のデータベースに登録されているものの中から、ヒト骨格筋細胞および HeLa 細胞を用いたデータを使用し、すべての遺伝子の翻訳効率をそれぞれ算出した結果、骨格筋細胞で特異的に翻訳効率の高い遺伝子を同定した。得られた遺伝子の 5'UTR、3'UTR の両方を搭載する mRNA、片方ずつを搭載する mRNA を *in vitro* 合成し、HEK293A 細胞および C2C12 細胞に導入し、Luciferase の発光量を測定した結果、高い発現を示す UTR を複数種同定した。今後、*in vitro* 実験より選定した UTR 候補について、マウスを用いた *in vivo* イメージングによる二次スクリーニングを行う予定である。

実験の概略図



135. mRNA ワクチン効果の最大化を目指した非翻訳領域の探索

野木森　拓人

医薬基盤・健康・栄養研究所 免疫老化プロジェクト

Key words：mRNA ワクチン，翻訳制御，非翻訳領域

緒　言

DNA や mRNA などといった核酸を細胞に導入し、目的タンパク質を発現させる手法は 1990 年に登場し（Wolff et al., Science 1990）、遺伝子導入に核酸を用いるという概念が生まれた。当初、mRNA は細胞内において不安定であり、その発現が一過性のものであることから、DNA を用いた遺伝子導入法が主流となった。しかし DNA を用いた遺伝子導入には宿主ゲノムへの DNA 挿入による遺伝子変異および癌化の危険性が伴うという問題が浮上してきた。そこで近年、DNA を用いる方法に代わって細胞外で人工的に合成した mRNA を用いる方法が注目を集めている。実際に、COVID-19 に対するワクチンでは、ファイザー社やモデルナ社が新規モダリティとして mRNA ワクチンを開発し、世界中で使用されるようになった［1，2］。以上のように、ワクチンとして mRNA の使用が認められつつあるが、依然としてその副反応が問題となっている。副反応の発現頻度は mRNA ワクチンの投与量と相関していることから［3］、いかに細胞内でのワクチン抗原の発現を効率化し、投与量を減らすことができるかが課題である。

mRNA ワクチンの発現効率を最適化するための手法として、第一に mRNA を安定化させる方法、第二に mRNA の翻訳量を増大させる方法が考えられる。まず mRNA を安定化させる方法として、核酸の塩基部分に修飾を施す方法が主流である［4］。別の方法として、我々は人工 mRNA の細胞内分解機構を解明し［5，6］、その分解に関わる因子を阻害することで mRNA ワクチンを安定化させる方法論を提唱した。つまり、mRNA を安定化させる方法についてはすでに種々存在する。一方で、翻訳効率を増大させる方法については未だ改善の余地がある。mRNA の翻訳においては、遺伝子をコードする領域ではない非翻訳領域（UTR）が大きく寄与している［7］。一般的に、UTR に様々な RNA-binding protein（RBP）が相互作用することで、mRNA の翻訳が転写後レベルで調節される。これまでのところ、この UTR を改変し、人工 mRNA の翻訳量を増大させようとする試みは多々ある。しかしながらワクチン開発という観点に立つと、その多くが HeLa 細胞や A549 細胞などといった一般的な培養細胞株を用いた検証にとどまっており、実際にワクチンが作動する細胞とは異なる細胞種で行われている点で、依然として課題も多い［8］。事実、転写後調節機構は組織や細胞種によって異なるため、mRNA ワクチンが翻訳される筋肉細胞やマクロファージ、樹状細胞を用いてその翻訳効率を検証する必要があると考えられる。

以上の背景を踏まえて、本研究では mRNA ワクチンの発現効率化を介して、より有効で安全なワクチン開発基盤の構築を目的とする。

方　法

1．公共データベースを利用した翻訳効率の測定

RNA-seq による mRNA 発現量および Ribosome profiling によるリボソームフットプリントの情報を保管しているデータベースである TranslatomeDB［9］からヒト骨格筋細胞と HeLa 細胞のデータをダウンロードした。

2. プラスミドの作製

人工遺伝子合成により得られた T7 プロモータ配列、各種 UTR 配列は polyA 鎖を 100 塩基含むプラスミドの SalI／BamHI サイトに挿入された。polyA 鎖の直下に BsmBI サイトを挿入した。

3. mRNA の *in vitro* 合成

各種 mRNA は BsmBI 処理により直線化されたプラスミドを鋳型として、TriLink 社のプロトコール［10］に従って *in vitro* 転写により得られた。転写後、DNase I により鋳型プラスミドを消化し、RNA cleanup kit により mRNA を精製した。得られた mRNA の濃度は Nanodrop One（Thermo Fisher Scientific）により測定された。また、Tapestation （Agilent）による mRNA のサイズ確認を行った。

4. 細胞培養および Luciferase assay

HEK293A 細胞株および C2C12 細胞は 10% fetal bovine serum およびペニシリン・ストレプトマイシンを加えた DMEM 培地にて 37℃、5% CO_2 下で培養した。合成した mRNA の細胞への導入は Lipofectamine MessengerMAX （Thermo Fisher Scientific）を用いた。翻訳量の測定は Dual-Glo Luciferase Assay System（Promega）を用いた。

結果および考察

1. ヒト骨格筋細胞で翻訳効率の高い遺伝子の選定

ヒト骨格筋細胞で翻訳効率の高い遺伝子を探索するため、公共データベースを用いてヒト骨格筋細胞と HeLa 細胞由来のデータの比較検討を行った（図 1）。翻訳効率は Ribosome-profiling のデータから得られたリボソームフットプリント量と RNA-seq により得られたリード数から算出した。その結果、ヒト骨格筋細胞で翻訳効率の高い遺伝子を複数種同定した。

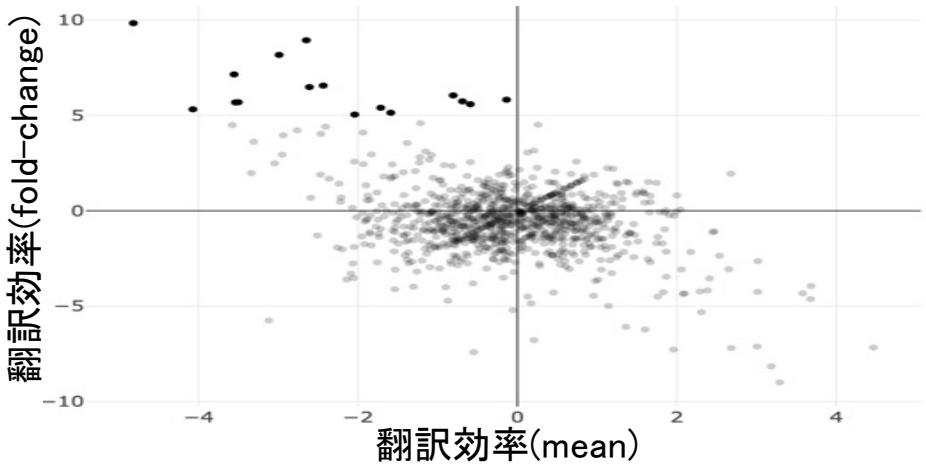


図 1. ヒト骨格筋細胞と HeLa 細胞における各遺伝子の翻訳効率の比較
横軸は HeLa 細胞および骨格筋細胞の翻訳効率の平均値の常用対数、縦軸は商の常用対数。黒点は骨格筋で翻訳効率の高い遺伝子を示す。

2. 培養細胞を用いた翻訳量の算出

図 1 により得られた遺伝子の UTR 配列を Ensembl genome Database から入手し、人工遺伝子合成を行った。T7 ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により各種 UTR を搭載した Luciferase mRNA を合成し、HEK293A 細胞（図 2A）および C2C12 細胞（図 2B）にトランスフェクションした。24 時間および 48 時間後の翻訳量を測定した結果、5'UTR／3'UTR の両者を搭載した場合では Gene B、Gene E、Gene G で翻訳量が高いことが明らかとなった。5' UTR のみを搭載した場合、Gene G のみが高い翻訳量を示し、3' UTR のみを搭載した場合は Gene B、Gene D、Gene F、Gene G、Gene H が高い翻訳量を示した。

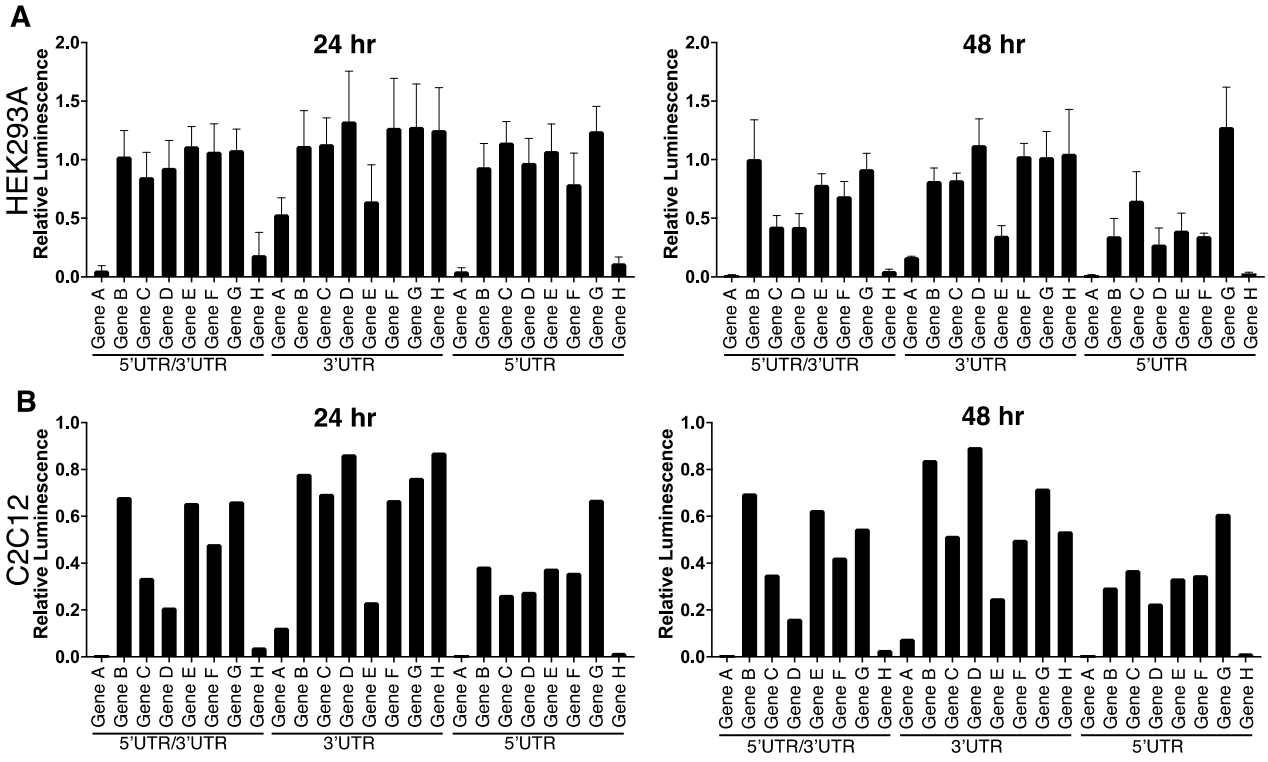


図 2. 各種 UTR を搭載した人工合成 mRNA の翻訳量測定

A） MessengerMAX を用いて HEK293A 細胞に人工合成 mRNA をトランスフェクションし、その 24 時間後（左図）および 48 時間後（右図）の時点での Luciferase assay。5'UTR／3'UTR は両方の UTR を搭載した mRNA を、5'UTR、3'UTR はそれぞれ片方の UTR を搭載したものを表す。

B） MessengerMAX を用いて C2C12 細胞に人工合成 mRNA をトランスフェクションし、その 24 時間後（左図）および 48 時間後（右図）の時点での Luciferase assay。5'UTR／3'UTR は両方の UTR を搭載した mRNA を、5'UTR、3'UTR はそれぞれ片方の UTR を 搭載したものを表す。

以上の結果から、公共データベースから入手した情報をもとに、培養細胞において翻訳効率の高い UTR を同定することを達成した。また、同じ遺伝子由来でも 5'UTR と 3'UTR 配列では、翻訳効率に与える影響に違いがあることを見出した。5'UTR 配列に関しては、今回同定したもののうち Gene G のみが翻訳効率化を達成していたことから、今後は 5'UTR 配列を Gene G に固定し、3' UTR を各遺伝子に置き換えたコンストラクトを設計し翻訳効率の検証を行う予定である。

また、本研究では筋肉細胞で翻訳効率の高い遺伝子に着目したが、今後はマクロファージや樹状細胞といった、筋肉細胞以外で mRNA ワクチンが作動する細胞について検証し、マウスでの *in vivo* 実験を行う予定である。

謝　辞

本研究は医薬基盤・健康・栄養研究所、免疫老化プロジェクトのメンバーのサポートのもと行われた。

文　献

1) Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina WV, Cooper D, Frenck RW Jr, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Şahin U, Jansen KU, Gruber WC; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med. 2020 Dec 31;383(27):2603-2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33301246; PMCID: PMC7745181.

2) Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, Janes H, Follmann D, Marovich M, Mascola J, Polakowski L, Ledgerwood J, Graham BS, Bennett H, Pajon R, Knightly C, Leav B, Deng W, Zhou H, Han S, Ivarsson M, Miller J, Zaks T; COVE Study Group. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. N Engl J Med. 2021 Feb 4;384(5):403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33378609; PMCID: PMC7787219.

3) Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Neuzil K, Raabe V, Bailey R, Swanson KA, Li P, Koury K, Kalina W, Cooper D, Fontes-Garfias C, Shi PY, Türeci Ö, Tompkins KR, Walsh EE, Frenck R, Falsey AR, Dormitzer PR, Gruber WC, Şahin U, Jansen KU. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. Nature. 2020 Oct;586(7830):589-593. doi: 10.1038/s41586-020-2639-4. Epub 2020 Aug 12. Erratum in: Nature. 2021 Feb;590(7844):E26. PMID: 32785213.

4) Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40. doi: 10.1038/mt.2008.200. Epub 2008 Sep 16. PMID: 18797453; PMCID: PMC2775451.

5) Nogimori T, Nishiura K, Kawashima S, Nagai T, Oishi Y, Hosoda N, Imataka H, Kitamura Y, Kitade Y, Hoshino SI. Dom34 mediates targeting of exogenous RNA in the antiviral OAS/RNase L pathway. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 10;47(1):432-449. doi: 10.1093/nar/gky1087. PMID: 30395302; PMCID: PMC6326797.

6) Nogimori T, Ogami K, Oishi Y, Goda R, Hosoda N, Kitamura Y, Kitade Y, Hoshino SI. ABCE1 Acts as a Positive Regulator of Exogenous RNA Decay. Viruses. 2020 Feb 4;12(2):174. doi: 10.3390/v12020174. PMID: 32033097; PMCID: PMC7077301.

7) Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Oct;5(10):827-35. doi: 10.1038/nrm1488. PMID: 15459663; PMCID: PMC7097087.

8) Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, Brown JM. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. RNA Biol. 2018;15(6):756-762. doi: 10.1080/15476286.2018.1450054. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29578372; PMCID: PMC6152433.

9) Liu W, Xiang L, Zheng T, Jin J, Zhang G. TranslatomeDB: a comprehensive database and cloud-based analysis platform for translatome sequencing data. Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D206-D212. doi: 10.1093/nar/gkx1034. PMID: 29106630; PMCID: PMC5753366.

10) Henderson JM, Ujita A, Hill E, Yousif-Rosales S, Smith C, Ko N, McReynolds T, Cabral CR, Escamilla-Powers JR, Houston ME. Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription. Curr Protoc. 2021 Feb;1(2):e39. doi: 10.1002/cpz1.39. Erratum in: Curr Protoc. 2022 Aug;2(8):e551. PMID: 33524237.