

京都大学	博士（医科学）	氏名	亀田 重賢
論文題目	Synthetic circular RNA switches and circuits that control protein expression in mammalian cells (哺乳類細胞における遺伝子発現制御を可能とする人工環状RNAスイッチ及び回路の開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>新型コロナウイルスに対するワクチンでの成功を受けて、メッセンジャーRNA (mRNA) 医薬は新たな創薬モダリティとしてますます期待が高まっている。理論上、mRNA は配列の変更のみであらゆる遺伝子を搭載することが可能であるため、その応用は感染症に対するワクチンのみならず、がんワクチン・遺伝子補充療法・細胞リプログラミングなど多岐にわたる。しかし、mRNA は細胞内において非常に不安定であるため、その遺伝子発現の持続性は、現在汎用的に用いられている、DNA を用いた遺伝子導入ベクターに比べて低いことが知られている。また、遺伝子導入後にターゲットの細胞・臓器以外でタンパク質が発現してしまう、オフターゲットによる副作用が懸念されている。このような背景から、mRNA 医薬の実用化範囲の拡大に向けて、遺伝子発現の持続性と特異性の向上が必要とされている。</p> <p>本研究では、細胞内において従来の線状RNA (linear RNA) よりも高い安定性を示すことが知られている、環状RNA (circRNA) を模倣した人工circRNA のエンジニアリングというアプローチでこれらの課題解決を試みた。</p> <p>最初に、circRNA のデザインを行った。遺伝子コード領域 (ORF) の両端に転写と共役して自身の配列をスプライシングする自己スプライシングリボザイムの分割断片を、ORF 上流に翻訳開始を担う配列内リボソーム侵入部位 (IRES) を持つ鋳型 DNA を合成し、試験管内転写反応を行うことでcircRNA を合成した。</p> <p>次に、細胞種を特徴づける生体分子として、内在性のmRNA の翻訳制御を行っているマイクロRNA (miRNA) や、RNA 結合タンパク質 (RBP) に着目した。内在性のcircRNA はこれらの生体分子との相互作用を介して、細胞内における遺伝子発現を制御している。そこで、内在性circRNA とmiRNA またはRBP の相互作用の機構を模倣・改変することで、circRNA からの遺伝子発現を制御できると考え、これらの結合配列をcircRNA に組み込み、標的となる生体分子をマーカーとして細胞種特異的に遺伝子発現をON/OFF 制御可能な“circRNA スイッチ”を開発した。</p> <p>miRNA 応答性スイッチについては、非翻訳領域 (UTR) 中へ標的miRNA の完全相補配列を挿入することで、標的miRNA 存在下において、mRNA がコードする外来遺伝子の発現抑制 (OFF 制御) を行うことに成功した。タンパク質応答スイッチについては、IRES 内にRBP 結合モチーフを挿入することで、標的タンパク質存在下において遺伝子発現のOFF 制御を行うことに成功した。また、開発した2種類のOFF スイッチを組み合わせ、miRNA に応答して遺伝子発現を活性化できる人工RNA 回路 (ON 回路) を構築し、その持続性を評価したところ、従来の線状mRNA を用いたON 回路よりも優れた持続性を示した。</p> <p>本研究では、これまで報告がなかった生体分子応答型の人工circRNA を開発した。従来の人工circRNA に関する研究はcircRNA の合成・翻訳手法や免疫原性に関する内容に限定されていたため、circRNA の翻訳制御手法を確立した本研究は、従来の人工circRNA 研究とは一線を画すものである。</p> <p>本研究により、高い安定性と遺伝子発現の持続性、細胞種特異的な遺伝子発現制御機構を併せ持つ人工circRNA が確立され、人工mRNA 導入時のオフターゲットの低減や、投与頻度の減少によるコスト削減が期待できる。このことは、mRNA 医薬の実用化範囲の拡大に寄与できると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

近年、世界中でメッセンジャーRNA (mRNA) を医薬品として用いる研究が注目を集めている。しかし、mRNA による遺伝子発現の持続性と、その特異性には課題が残されている。

本研究では、細胞内において高い安定性を示すことが知られている、環状RNA (circRNA) のエンジニアリングというアプローチでこれらの課題解決を試みた。

細胞種を特徴づける生体分子として、内在性のmRNA の翻訳制御を行っているマイクロRNA (miRNA) や、RNA 結合タンパク質 (RBP) に着目し、生体分子特異的な遺伝子発現制御が可能な“circRNA スイッチ”を開発した。

miRNA 応答性スイッチについては、非翻訳領域 (UTR) 中へ標的miRNA の完全相補配列を挿入することで、標的miRNA 存在下において、mRNA がコードする外来遺伝子の発現抑制 (OFF 制御) を行うことに成功した。タンパク質応答スイッチについては、IRES 内にRBP 結合モチーフを挿入することで、標的タンパク質存在下において遺伝子発現のOFF 制御を行うことに成功した。また、開発した2種類のOFF スイッチを組み合わせ、miRNA に応答性のON 回路を構築し、その持続性を評価したところ、線状mRNA を用いたON 回路よりも優れた持続性を示した。

以上の研究は、生体分子応答性の人工circRNA の設計原理を提供するものであり、次世代型のmRNA 医薬研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年12月12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。