

世界初の高純度キャップ化 mRNA ワクチン製造技術、 PureCap 法の確立

～Cap2型 mRNA が低免疫刺激・高翻訳能を有することを明らかに～

【本研究のポイント】

- ・疎水性タグを用いたmRNA の高純度製造
- ・低用量・低免疫刺激性を特徴とする PureCap 型mRNA
- ・PureCap法を基盤とする大学発ベンチャー「クラフトンバイオテクノロジー株式会社」の創業
- ・化学修飾型mRNA のための合成技術

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科の阿部 洋 教授、稲垣 雅仁 特任助教、阿部 奈保子 特任准教授らの研究グループは、東京医科歯科大学内田 智士 教授との共同研究で、高活性な mRNA ワクチンを高純度で製造できる PureCap 法を開発しました。この手法では、光で除去できる疎水性タグをキャップ化試薬に導入することで、キャップ化された目的 mRNA を単離精製することができます。また、Cap2 型構造^{注1)}を有する mRNA を高純度で製造することに世界で初めて成功しました。この Cap2 型 mRNA は、高いタンパク質生合成量および低い炎症作用を示すことが明らかになりました。

本手法は、安心・安全な純国産 mRNA ワクチンの製造に貢献すると期待されます。また、癌や遺伝性疾患に対する mRNA 治療薬の開発にも応用できる可能性があります。本研究は、mRNA 科学の基礎的な知見を深めるとともに、mRNA 医療の実用化に向けた重要な一歩となります。

本研究成果は、2023年5月11日午後6時(日本時間)付イギリス科学誌「Nature Communications」に掲載されました。

【研究背景と内容】

mRNA がコロナウイルスに対するワクチン療法として実用化され、今後、がんワクチンや遺伝性疾患等へのタンパク補充療法として応用が期待されます。しかし、現在のmRNAはコロナウイルスに迅速に対応するために緊急承認された経緯があり、一般的な疾患に適用するために、解決すべき様々な課題を有しています。例えば、現在の mRNA は不安定で分解されやすいことがあげられます。また、現在の mRNA ワクチンの純度は60~70%程度と推定され、不純物が免疫刺激を惹起し、炎症反応を起こす可能性があります。そこで、本研究では化学的な手法を用いて高純度な mRNA を製造する方法を開発することを目指しました。

mRNA ワクチンの構造は、5′末端からキャップ構造、5′非翻訳領域、タンパク質コード領域、3′非翻訳領域、ポリアデニン構造に大きく分けられます(図1)。この中でキャップ構造は、mRNA がタンパク質に翻訳されるために必要な構造で、かつ、この構造がない mRNA は、望まない免疫反応を起こすことが知られています。mRNA を製造するための方法は、世界中で報告されていますが、既存の方法を用いた製造では、キャップ構造を有する mRNA の純度は 60%~90%程度にとどまることが知られています。

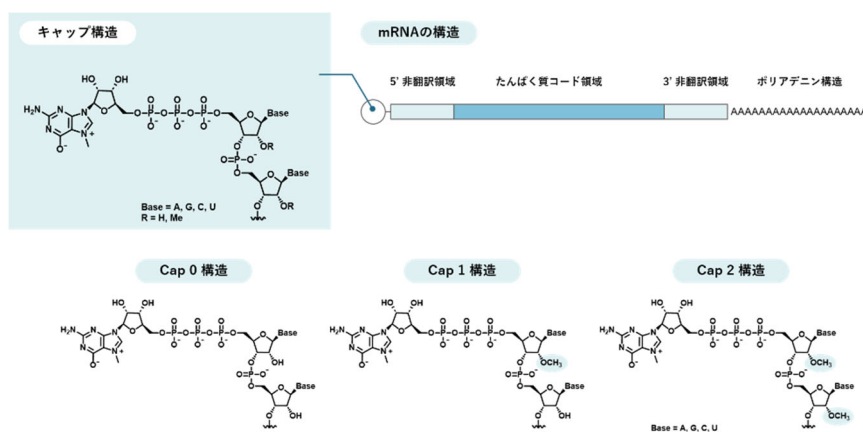


図1 mRNAの構造と mRNA に特徴的なキャップ構造

一般的なmRNA 製造法では、鋳型である DNA 二本鎖から RNA ポリメラーゼ(酵素)を用い、ヌクレオシド三リン酸(NTP)を基質としてRNAが転写合成されます(図2(a))。転写合成の際にキャップアナログ化合物を共存させることにより、キャップ構造を有する mRNA が一定の割合で生成します。例えば、広く用いられているアンチリバースキャップアナログ(ARCA)^{注2)}を用いると60~80%程度の割合で、望みのキャップ構造RNAが得られますが、不純物として末端にトリリン酸構造を有するRNA(pppRNA)が 20~40%程度得られます。この pppRNAは、望まない免疫刺激を起こすことから医薬品として除去されるべき副生成物です。しかしながら、大きな分子であるmRNAでは、目的物と副生成物を分離し、高純度mRNA を製造することは不可能でした。

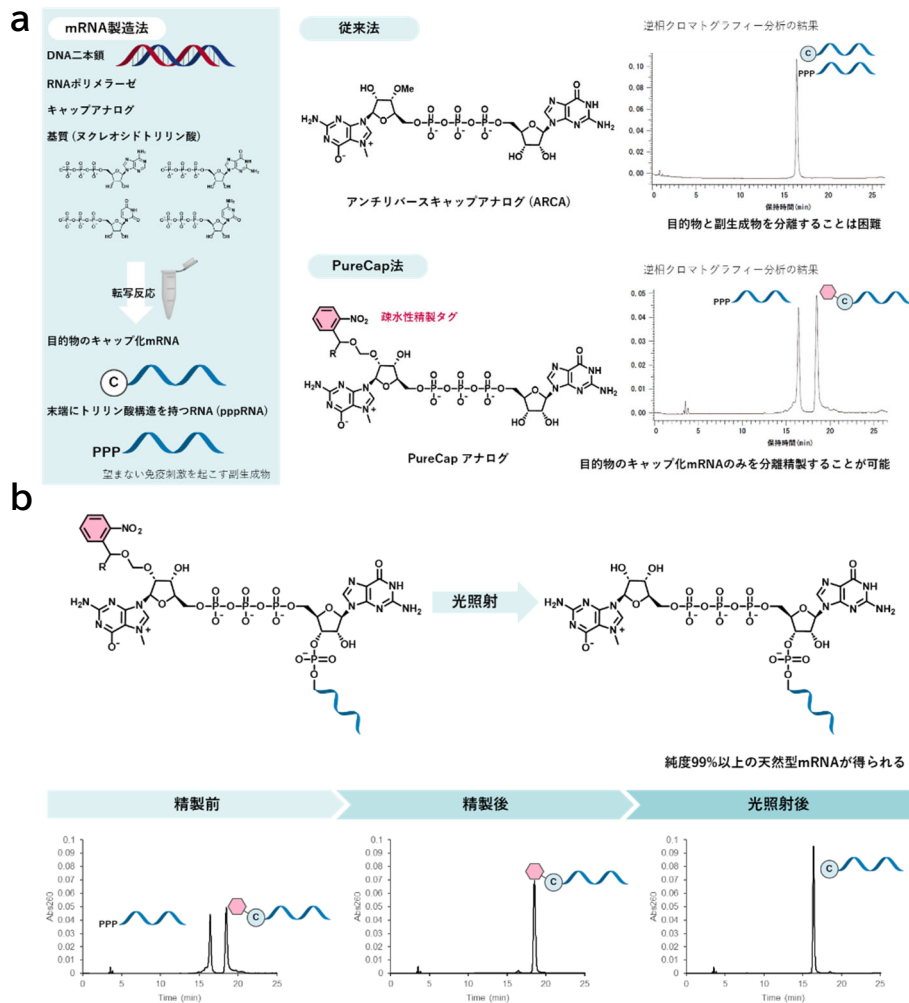


図2 PureCap法の概要。(a) 従来 mRNA 製造法と本研究で開発した PureCap 法の比較。(b) PureCap 法による精製の詳細。

本研究では、キャップ化mRNAのみを精製単離する独自の手法として、PureCap 法を開発しました(図2)。PureCap法では、光で除去できる疎水性精製タグをキャップアナログ(PureCapアナログ)として用います。PureCapアナログを用いてこれまでと同様に転写反応を行った後に、逆相クロマトグラフィー^{注3)}により望みのキャップ化 mRNAのみを分離精製することが可能になりました。その後、疎水性タグを光反応により除去することで、99%以上の純度でキャップ化 mRNA が製造できました。例えば、4247塩基^{注4)}の長さのコロナワクチンmRNA に対して、PureCap 法を用いることで、98%以上のキャップ化mRNA を製造することに成功しました。

真核生物は、種ごとに様々な異なるキャップ構造を有することが明らかになってきました。しかしながら、これまで高純度なキャップ化 mRNA を合成する手法が存在しなかったため、それぞれの構造が示す生物学的効果を解析することは不可能でした。本研究では、PureCap法を用いることで、様々なキャップ構造を有する mRNA を合成し、その生物活性を正確に評価することに成功しました。

本研究が今回特に注目したのは、Cap0、Cap1、Cap2と呼ばれるヒトに存在するキャップ構造群でした(図 1)。構造の違いは、5′末端の核酸の2′位にメチル基が導入されている数で命名されており、例えば、Cap2 は2つの部位にメチル基を持ちます。

2023年2月コーネル大学のサミー・ジャフリー教授らは、Nature 誌(Vol64, 358-366, 2023)に、ヒトの体において Cap2型 mRNA が、自己の mRNA と外来の mRNA を区別するために使われていると提唱しました。これは、ウイルス由来の mRNA が Cap1型 mRNA をヒト体内で合成することから、ヒトの体内では Cap2 型 mRNA を作ることで自己の mRNA を識別し、生体の免疫系などの防御システムは、ウイルス由来の mRNA を分解する対象として設定できることを意味します。一方、mRNA 医薬の観点から考えると、Cap2型構造を有する mRNA は、医薬品として有用であると考えられました。しかしながら、Cap2型構造を有する mRNA を高純度で製造することはこれまで不可能であったため、その生物学的効果の詳細は明らかではありませんでした。本研究では、Cap0、Cap1、Cap2型構造を有する PureCap アナログを用いて、それぞれの構造を有する mRNA の高純度製造に成功しました。それら mRNA を用いて生物活性を評価した結果、従来の ARCA を用いた mRNA と比較し、PureCap 法を用いて合成した高純度 Cap0、Cap1、Cap2型 mRNA は、いずれも低い免疫刺激性を示しました(図 3)。次に、マウスにおけるタンパク質合成能力を解析したところ、Cap1型 mRNA と比較し、Cap2型 mRNA は 4.9 倍のタンパク質を生成できることが明らかになりました。これまで、mRNA ワクチンに用いられている Cap 構造は、Cap0 および Cap1 型に限られており、本結果は PureCap 法で合成された Cap2 型 mRNA が医薬分子として有用であることを示しました。

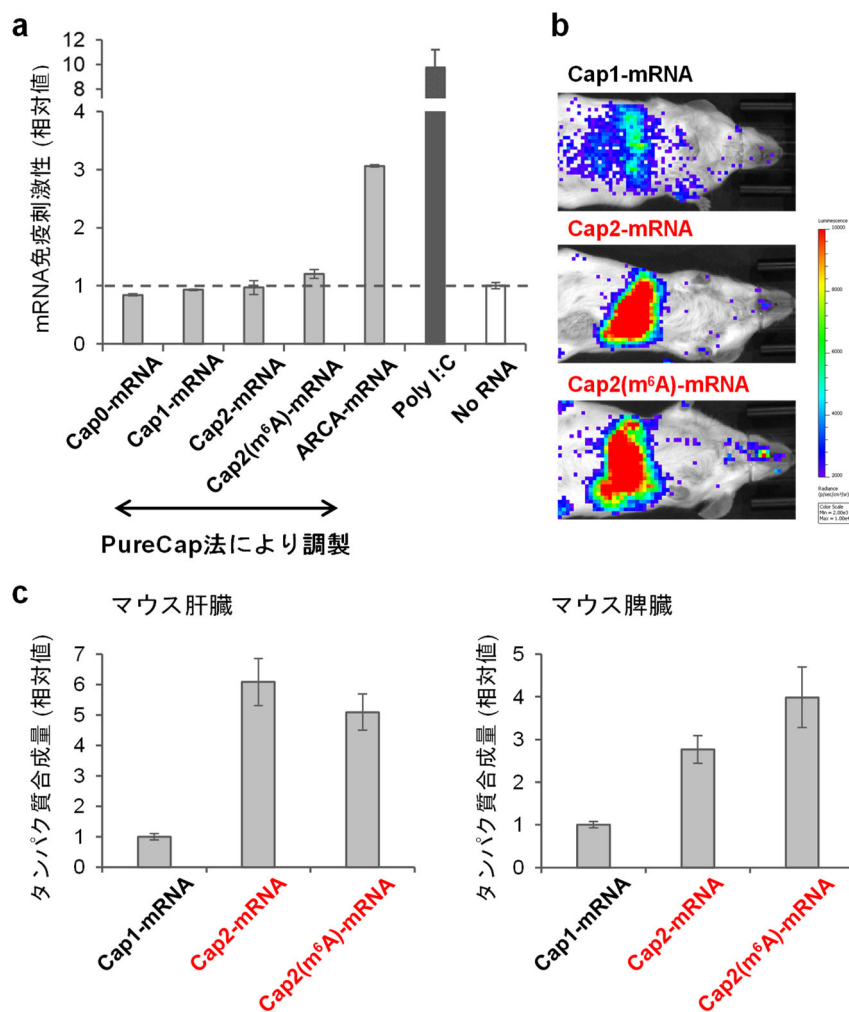


図 3. PureCap 法で作成した mRNA が低い免疫刺激性と高い翻訳活性を持つことを示す実験結果。(a) NF- κ B 情報伝達経路測定用培養細胞系を用いた mRNA の免疫刺激性を評価した。(b) Nluc ルシフェラーゼをコードした mRNA をマウスへ投与し、マウス体内での合成されたタンパク質を基質由来の化学発光でイメージングした。(c) Nluc mRNA をマウスに投与し、肝臓および脾臓でのタンパク質合成量を基質の化学発光を用いて評価した。

【成果の意義】

日本独自の製造技術であるPureCap法を用いることで、これまで不可能であった高純度 mRNA を製造することが可能になりました。これら高純度mRNAは、免疫刺激が低いことから、医療応用において望まない炎症作用を低減することが期待されます。また、高純度mRNAを用いて生物評価をすることで、初めて構造の違いにおける生物学的効果の違いが明らかになりました。本論文では、世界で初めてCap2型mRNAの高い翻訳活性を動物評価で明らかにしました。PureCap 法を用いたCap2型mRNAは、従来のmRNA分子とは差別化可能な次世代のmRNA医薬としての利用が期待されます。

PureCap 法を基盤技術として、大学発ベンチャーのクラフトンバイオテクノロジー株式会社が創業され、国産mRNA 医薬の開発が進んでいます。さらに、名古屋大学、クラフトンバイオテクノロジー、東京医科歯科大学、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合、ナノキ

キャリアなどの産学が協力して、AMED SCARDA のプログラムのもと、本技術を用いた mRNA 感染症ワクチンの開発が進んでいます。

本研究は、2021年度から始まった国立研究開発法人 日本医療研究開発機構『革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ(LEAP)』の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注 1)Cap2 型構造:

転写開始位置から2番目の塩基までの 2' 位の水酸基がメチル化されたキャップ構造。(図1参照)

注 2)アンチリバースキャップアナログ(ARCA):

mRNA を酵素的に合成する際に用いる試薬の1つ。mRNA に重要なキャップ構造を導入するために添加される。(図 2(a)参照)

注 3)逆相クロマトグラフィー:

物質の脂溶性に基づく分離精製方法。

注 4)塩基:

RNA の長さの単位。リボヌクレオシド1分子を1塩基として数える。

【論文情報】

雑誌名: Nature Communications

論文タイトル: Cap analogs with a hydrophobic photocleavable tag enable facile purification of fully capped mRNA with various cap structures

著者: Masahito Inagaki (稲垣 雅仁、特任助教), Naoko Abe (阿部 奈保子、特任准教授), Zhenmin Li (研究員), Yuko Nakashima (中嶋 裕子, 研究員), Susit Acharyya (研究員), Kazuya Ogawa (小川 和哉), Daisuke Kawaguchi (川口 大輔), Haruka Hiraoka (平岡 陽花、特任助教), Ayaka Banno (坂野 文香), Zheyu Meng, Mizuki Tada (多田 瑞紀), Tatsuma Ishida (石田 竜真) Pingxue Lyu, Kengo Kokubo (小久保 健吾), Hirotaka Murase (村瀬 裕貴、特任助教), Fumitaka Hashiya (橋谷 文貴、助教), Yasuaki Kimura (木村 康明、准教授), Satoshi Uchida (内田 智士), Hiroshi Abe (阿部 洋、教授)

DOI: 10.1038/s41467-023-38244-8

URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-38244-8>