

2025 年 7 月 7 日

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

東京大学定量生命科学研究所

単一の mRNA で発現制御の精度を改良した 「ハイブリッド mRNA スイッチ」の開発

ポイント

- メッセンジャーRNA (mRNA) ^{注1)}から遺伝子発現を誘導する ON 型スイッチと、発現を抑制する OFF 型スイッチを単一の mRNA に統合した「ハイブリッド mRNA スイッチ」を開発した。
- ハイブリッド mRNA スイッチは、2 種類の異なるマイクロ RNA (miRNA) ^{注2)} を認識して、遺伝子発現を制御する。
- ハイブリッド mRNA スイッチは、従来技術の課題となっていた非標的細胞でタンパク質が合成されてしまう「翻訳漏洩」を大きく抑えることができた。
- マウスの実験により、ハイブリッド mRNA スイッチが標的とする臓器の細胞で特異的にタンパク質の合成を誘導する発現選択性をもつことを実証した。

1. 要旨

齊藤博英 教授 (京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)、東京大学定量生命科学研究所)、正木魁人 大学院生 (京都大学大学院医学研究科) らの研究グループは、細胞の種類に応じて遺伝子発現を精密に制御できる単一の mRNA 分子からなるハイブリッド mRNA スイッチを開発し、マウスの生体内でも機能することを示しました。

本研究では、細胞内のマイクロ RNA (miRNA) を認識し遺伝子発現を制御する mRNA スイッチの ON 型と OFF 型それぞれの機能モジュールを単一の mRNA 配列に組み込んだハイブリッド型の mRNA スイッチを設計しました。ON 型と OFF 型の機能モジュールは、どちらも細胞内の miRNA を認識する部位を含みます。そのため、ハイブリッド型では一つの mRNA スイッチで二種の異なる miRNA を同時に検出することが可能です。

実験の結果、ハイブリッド型により mRNA スイッチ上のタンパク質合成を二重に制御することで、従来の ON 型スイッチと比較して非標的細胞でタンパク質が合成されてしまう「翻訳漏洩」を大幅に抑制できることがわかりました。さらに、従来の単独型と比べて、ハイブリッド型はマウスの生体内でも標的細胞から構成される組織をより高精度に選択してタンパク質合成を制御できることを確認しました。研究グループが開発した RNA スイッチの機能をマウスの体内で確認したのは本研究が初めてです。単一の mRNA による遺伝子発現制御の精度の向上を実現するハイブリッド型の技術は、今後、高い安全性や製造性が求められる mRNA 医薬の開発に役立つことが期待されます。

この研究成果の校正済み論文（最終版）が、2025 年 7 月 1 日に、国際学術誌「*Molecular Therapy Nucleic Acids*」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

mRNA は細胞内のゲノムに組み込まれる可能性が低く、細胞の中で目的のタンパク質の発現を誘導できるため、ワクチン開発を皮切りにさらなる医薬応用が期待されています。mRNA 医薬の安全性を高め、より多くの病気の治療に応用するためには、標的の細胞や組織でのみ mRNA を機能させる制御技術が必要です。

研究グループは、これまでに標的の細胞で特異的に発現している miRNA やタンパク質などの生体分子を検知して、タンパク質を合成する mRNA スイッチの技術開発を進めてきました。細胞によって存在する miRNA の種類が異なります。標的細胞に存在する miRNA が認識して切断する配列を mRNA に組み込むことで、標的細胞で遺伝子発現を誘導する miRNA 応答性 mRNA スイッチが構築できます。しかし、mRNA スイッチに特異的に作用する miRNA が存在しない非標的細胞でも、mRNA スイッチからタンパク質が合成される「翻訳漏洩」が課題となっていました。標的細胞でのみ遺伝子発現を誘導できる精密な発現制御を実現するため、研究グループでは複数のスイッチ mRNA の同時利用による解決策を開発してきました（[CiRA ニュース 2022 年 1 月 6 日](#)、[CiRA ニュース 2025 年 7 月 1 日](#)）。

本研究では、翻訳漏洩の課題に対して、複数の mRNA の組み合わせではなく、単一の mRNA によって性能改善を実現する方法を新たに開発しました。また、研究グループはこれまでの研究では主に細胞培養によって RNA スイッチの性能を評価していましたが、今回初めて、マウスを用いて mRNA 医薬としての利用可能性を検証し、ハイブリッド mRNA スイッチによって臓器間での発現制御ができることを示しました。

3. 研究結果

1) ON 型および OFF 型スイッチのハイブリッド化による発現選択性の向上

5'非翻訳領域（5'UTR）^{注3)}に存在する既存の OFF 型スイッチの機能モジュールである miRNA 結合部位（図 1A 中：黄色）と、ポリ A 配列に隣接する ON 型スイッチの機能モジュールである miRNA 結合部位および余剰配列カセット（図 1A 中：青色）を 1 本の mRNA 分子に統合した「ハイブリッド mRNA スイッチ」（以下、ハイブリッドスイッチ）を設計しました（図 1A）。

ハイブリッドスイッチは、2 箇所の miRNA 結合部位でそれぞれ異なる miRNA を検出することができます。非標的細胞で高発現する miRNA（miRNA^{OFF}）を 5'非翻訳領域にある OFF 型スイッチの miRNA 結合部位で検出し、標的細胞で高発現する miRNA（miRNA^{ON}）をポリ A 配列の 3'末端側に隣接する miRNA 結合部位で検出するように設計しました。これにより、非標的細胞では OFF 型と ON 型の機能モジュールの相乗効果により、翻訳漏洩を抑える効果が期待できます（図 1B）。

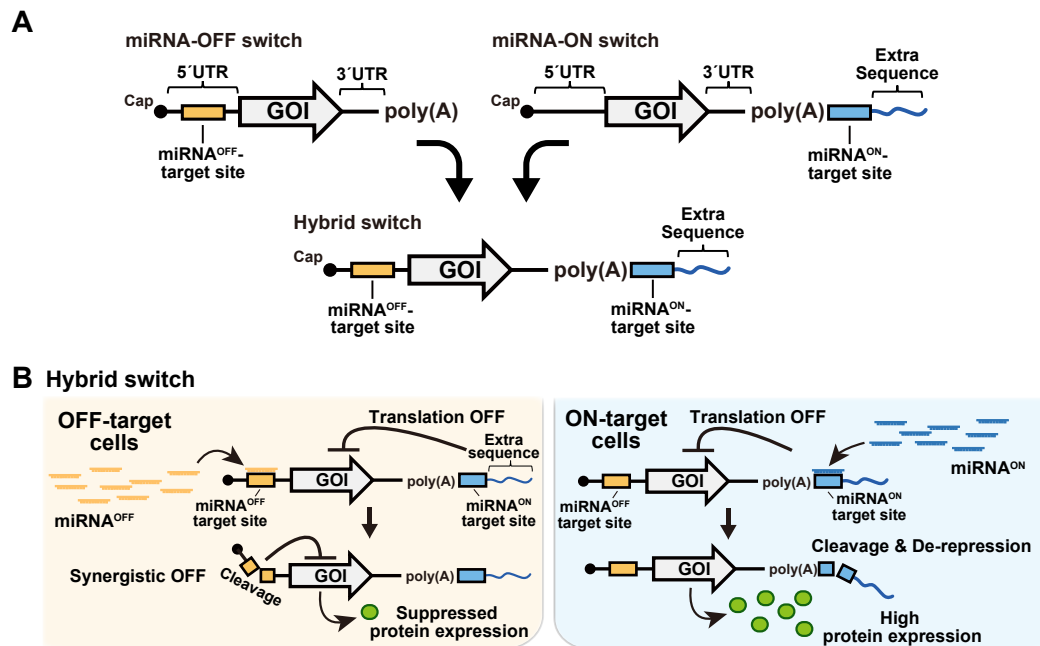


図 1. ハイブリッドスイッチの概略図

- A: OFF 型と ON 型スイッチの両方の機能モジュール (OFF 型：黄色、ON 型：青色) を 1 本の mRNA 配列に組み込んだハイブリッドスイッチの設計。
- B: 非標的細胞 (左：miRNA^{OFF} 高発現) と標的細胞 (右：miRNA^{ON} 高発現) におけるハイブリッドスイッチからのタンパク質合成の制御。非標的細胞では、高発現する miRNA^{OFF} による mRNA の 5'非翻訳領域の切断と、余剰配列 (Extra sequence) による翻訳抑制の二重の抑制機構が作動する。標的細胞では、miRNA^{ON} によって mRNA のポリ A 配列の 3'末端側にある miRNA 結合部位が切断され、余剰配列による翻訳抑制が解除されることで、タンパク質合成が誘導される。

次に、HeLa 細胞を非標的細胞、iPS 細胞を標的細胞として、ハイブリッドスイッチの性能を評価しました。HeLa 細胞で高発現している miRNA (let-7b-5p, miRNA-27a-3p, miRNA-98-5p) の結合部位をもつ OFF 型スイッチ (単独型)、および iPS 細胞で高発現している miRNA (miRNA-302a-5p) の結合部位をもつ ON 型スイッチ (単独型)、両方の機能モジュールをもつハイブリッドスイッチを設計しました。各 mRNA スイッチを 2 種類の細胞に導入して、スイッチから産生される緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の発現レベルを比較しました。

その結果、OFF 型および ON 型のスイッチは非標的細胞 (HeLa) で EGFP 発現 (翻訳漏洩) がみられた一方で、ハイブリッド型では、非標的細胞での翻訳漏洩を大きく抑制できることがわかりました (図 2A-C)。これらの結果から、ハイブリッド型により標的細胞と非標的細胞の EGFP 発現比で表される発現選択性 (図中：ON/OFF Ratio(iPSC/HeLa)) を大幅に向上させたことを示しました (図 2A 下)。

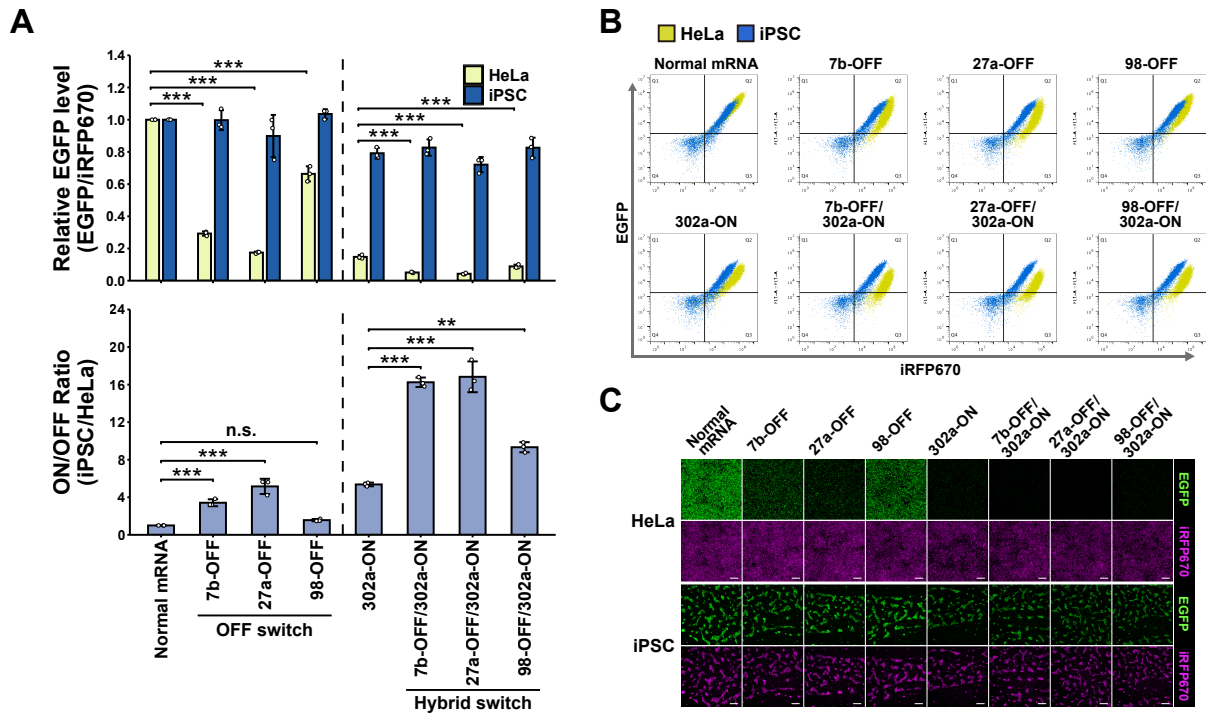


図 2. 培養細胞における各種スイッチのタンパク質発現制御性能の評価

- A: HeLa 細胞および iPS 細胞におけるタンパク質 (EGFP) 発現レベル (上) と ON 状態 (iPS 細胞) と OFF 状態 (HeLa) の発現比 (下)。
- B: 図 2A で示す実験のフローサイトメトリー解析におけるプロット図。各点が一つの細胞のタンパク質発現レベルを示す。
- C: 図 2A で示す実験の蛍光画像。

2) マウス個体における組織選択的なタンパク質発現の制御

次に、マウス体内で特定の臓器を標的とした発現制御が可能かを検証しました。脂質ナノ粒子^{注4)}に封入した mRNA を尾静脈投与したところ、肝臓および脾臓でタンパク質の合成が誘導されました。そこで、肝臓を標的臓器、脾臓を非標的臓器として各種スイッチの発現選択性を評価しました。肝臓で高発現している miRNA-122-5p あるいは、脾臓構成細胞で高発現している miRNA-142-3p の結合部位をもち、発光タンパク質の遺伝子 Fluc の配列をもつ ON 型、OFF 型、そしてそれらを統合したハイブリッド型のスイッチを設計しました (図 3A)。

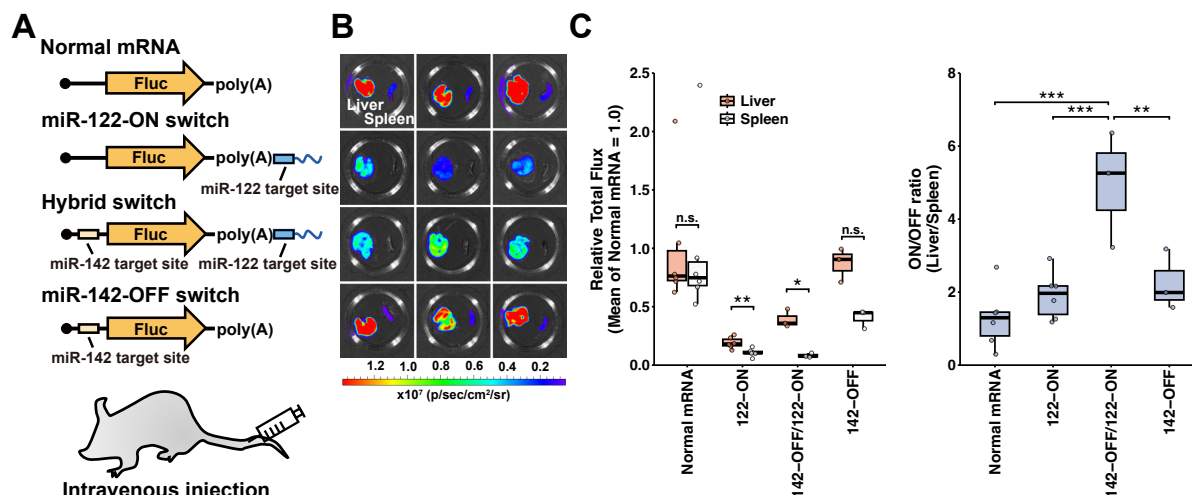


図 3. 肝臓と脾臓での発現制御性能の評価

- A: 設計した mRNA スイッチとマウスへの投与の概略図。Fluc 遺伝子配列をもつ各種スイッチをマウスの尾静脈から投与した。
- B: 投与して 6 時間後の肝臓と脾臓での Fluc 活性シグナル。
- C: 図 3B で示す実験の normal mRNA で標準化したシグナル平均値（左）と標的臓器（肝臓）と非標的臓器（脾臓）の活性比（右）。

これらの mRNA スイッチをマウスに投与した結果、ON 型、OFF 型のどちらも、非標的の脾臓と比べて、標的である肝臓で高いタンパク質発現を示すことがわかりました。この結果から、これまでに研究グループが開発してきた従来の miRNA 応答性スイッチが生体内でも適切に標的 miRNA に応答し、発現制御が可能であることを初めて確認することができました（図 3B, 3C）。

さらに、ハイブリッドスイッチが最も高い発現選択性を示したことから、個体を用いた臓器間の評価においてもハイブリッド化により発現制御の精度を高めることができることがわかりました（図 3C 右）。このことは、単独型のスイッチで標的の選択性が不十分な場合に、ハイブリッド化が有用な戦略であることを示しています。

4. まとめ・展望

ON 型および OFF 型の mRNA スイッチの要素を単一の mRNA に統合し、2 種の異なる miRNA の検出が可能なハイブリッド mRNA スイッチを開発しました。ハイブリッドスイッチは、従来型のスイッチと比較して培養細胞だけでなく、マウス生体内でも高い発現選択性をもつことを示しました。

ハイブリッドスイッチは単一分子の mRNA であるため、低い設計コストで精密な発現制御を可能とする RNA 技術であり、安全性と製造性を兼ね備えた RNA 医薬開発のための有力な設計戦略となることが考えられます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

MicroRNA-Responsive ON-OFF Hybrid mRNA Switch for Precise Protein Expression Control

○ ジャーナル名

Molecular Therapy Nucleic Acids

○ 著者

Kaito Masaki^{1,2}, Yoshihiko Fujita¹, Hirohide Saito^{1,3*}

*: 責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 京都大学大学院医学研究科
3. 東京大学定量生命科学研究所

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会 (JSPS)
 - ー 科研費 (22KJ1892, JP20H05626)
- 日本医療研究開発機構 (AMED)
 - ー 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム「次世代医療を目指した再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発拠点」「次世代 mRNA テクノロジーを活用した細胞・遺伝子治療技術の開発」
- 科学技術振興機構 (JST)
 - ー 戦略的創造研究推進事業 (JPMJCR23B3)
- iPS 細胞研究基金

7. 用語説明

注1) メッセンジャーRNA (mRNA)

細胞内でタンパク質が合成される際にアミノ酸配列を指定する役割をもつ。DNA 上の遺伝子情報はメッセンジャーRNA に転写された後メッセンジャーRNA からタンパク質へと翻訳され、細胞内で機能する。

注2) マイクロ RNA (miRNA)

20~30 塩基長の短鎖ノンコーディング (タンパク質をコードしていない) RNA。細胞内タンパク質と協調することで、相補的な配列をもつ mRNA と結合し、その mRNA からのタンパク質発現を抑制する。

注3) 5' 非翻訳領域 (5'UTR)

タンパク質コード領域の上流にある mRNA の非翻訳部分。その mRNA の翻訳活性に重要な影響を与える。

注4) 脂質ナノ粒子

イオン化脂質、コレステロール、リン脂質、PEG 化脂質で構成されたナノスケールのキャリアで、mRNA を保護しつつ細胞内へ効率的に輸送する。