

メッセンジャー RNA (mRNA) 技術は、ワクチン学の新たな時代を切り開きました。このミニレビューでは、mRNA ワクチンおよび脂質ナノ粒子-mRNA 製剤により生じる自然免疫反応について、簡単にご紹介します。

### The rise of mRNA vaccines

mRNA ワクチンは、二つの mRNA ベース新型コロナウイルスワクチンが規制当局の承認を受けて以来、大きな注目を浴びています<sup>1</sup>。この最先端の mRNA 技術は研究努力の積み重ねにより築かれたものです。その初期の概念実証実験は、「むき出しの mRNA をマウス骨格筋に投与すると、翻訳されたタンパク質が発現される」という、30 年以上前の Wolff 氏による発見まで遡ることができます<sup>2</sup>。その後 1990 年代に、mRNA が液性および細胞性免疫反応を *in vitro* と *in vivo* の両方で引き起こすことが証明されました<sup>3</sup>。それにもかかわらず、mRNA それ自体は大変不安定で、*in vivo* アプリケーション後は容易に分解されます。mRNA による無制御の自然免疫活性化もまた、重大な問題となります<sup>3</sup>。そのため、長年にわたり mRNA の臨床応用は実現不可能だと考えられてきました。ここ数十年の科学の進歩が、mRNA 開発におけるこれらの障壁を乗り越える手助けとなりました。mRNA の免疫原性は、mRNA の化学修飾によってより良く調整することができます。ナノ粒子技術もまた、mRNA のデリバリー効率を著しく改善します。特に脂質ナノ粒子 (LNPs) は、mRNA ワクチンにおける最先端のデリバリー媒体です。この LNP-mRNA プラットフォームは現在、がん、感染症および遺伝性疾患を含む、様々な疾患の予防または治療用ワクチンの前臨床および臨床研究において、大規模に試験されています<sup>4</sup>。

### Overcoming the innate immune responses

mRNA は一本鎖 RNA (ssRNA) 分子の一つで、タンパク質合成に必要です。この mRNA ワクチンの主要成分は酵素を用いた *in vitro* 転写 (IVT) 工程で合成されます<sup>3</sup>。RNA の内在的な免疫賦活特性のため、外来性の IVT mRNA は細胞に入ると、我々の生体防御系の第一機構によって認識され、エンドソームの TLR7/8 のようなパターン認識受容体 (PRRs) を活性化します<sup>5</sup>。特に、IVT 工程は目的の mRNA だけでなく、副産物のフラクション、主に二本鎖 RNA (dsRNA) をもまた、生成します<sup>5</sup>。その dsRNA の残留物は TLR3 およびサイトゾリック RIG-I / MDA-5 によって認識されます。これら PRRs による RNA 感知は、I 型インターフェロン (IFN) および炎症性サイトカイン (Fig.1) の産生をもたらす、シグナル伝達カスケードを引き起こします<sup>5</sup>。しかし、そのような自然免疫活性化は、タンパク質合成の阻害および細胞死、究極的には mRNA ワクチンの免疫原性低下を含む、望ましくない影響をもたらします。

自然免疫による感知に対処するため、Karikó 氏は RNA シーケンスのウリジン塩基を、天然に存在するシュドウリジン ( $\psi$ ) に置換し、初の化学修飾 IVT mRNA を作成しました<sup>6</sup>。この修飾は内在性の mRNA を模倣、および宿主の TLR7/8 や他の免疫センサーとの結合を減少させ、I 型インターフェロンの過剰産生を制限し、mRNA の翻訳能力を高めることに成功しました<sup>6</sup>。タンパク質発現増強および TLR3 活性化回避において、N1-メチルシュドウリジン (m1 $\psi$ ) 含有 mRNA は  $\psi$  含有 mRNA よりも良好なパフォーマンスを示すことから、mRNA 最適化には  $\psi$  に加え、m1 $\psi$  の組み込みがよく用いられます<sup>7</sup>。加えて、混入 dsRNA を IVT 産物から除去することが、不要な自然免疫活性化の更なる回避に必須です。mRNA の精製はマイクロビーズベ-

スの沈降法、および高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) のようなクロマトグラフ法によって行われます<sup>4</sup>。

### Formulating mRNA with LNPs

修飾 IVT mRNA は、分解の回避、および細胞内運搬とエンドソーム脱出の補助のために、LNPs のようなキャリア媒体に依存しています<sup>3</sup>。重要なのは、キャリア分子はワクチンの免疫原性とも関係する可能性があるということです。LNPs は異なる割合のリン脂質、コレステロール、イオン性/カチオン性脂質、および PEG 脂質から構成されています<sup>4</sup>。リン脂質およびコレステロール成分は私達の細胞膜に自然に存在しており、著しい自然免疫認識を誘導しそうにはありませんが、いくつかのイオン性/カチオン性脂質は PRR 経路を活性化することにより、炎症を引き起こすことが報告されています<sup>8</sup>。例えば Loney 氏は、カチオン性脂質、diC14 アミジンは TLR4 の刺激効果があることを特定し<sup>9</sup>、一方で他のカチオン性脂質、RPR206252 は、TLR2 および NLRP3 経路を通して炎症カスケードを活性化することを証明しました<sup>10</sup>。加えて PEG 成分は、補体系を通して過敏性反応を引き起こすことが知られています<sup>11</sup>。LNPs の炎症性は、未だ完全に評価されておらず、宿主の自然免疫反応との相互作用を調節するために、LNPs デザインの更なる研究が必要です。

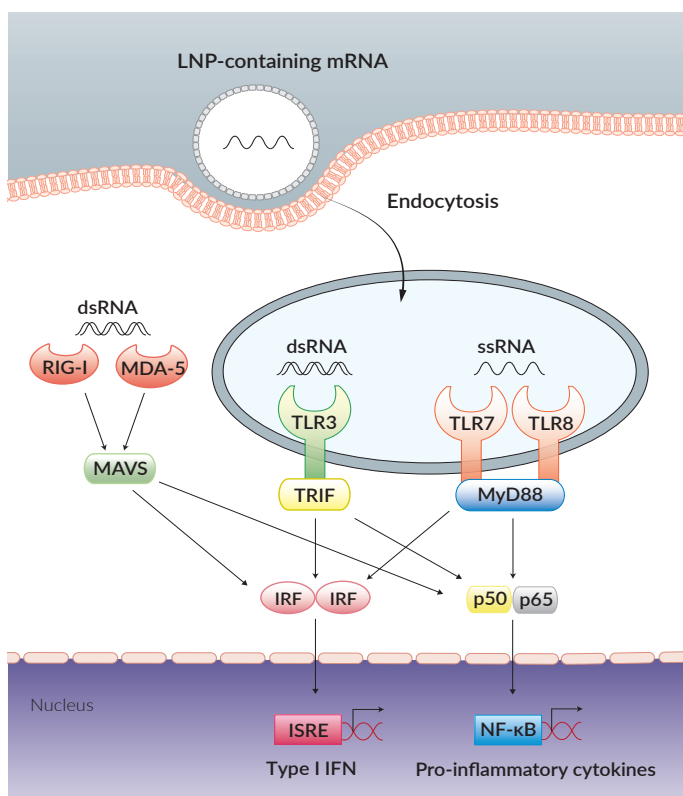


Fig. 1: IVT mRNA and dsRNA byproducts-induced immune activation

## Innate immune activation assessment

ナノ粒子-mRNA 製剤に対する自然免疫による感知は、「両刃の剣」になり得ます。既述の通り、タンパク質発現の阻害または過剰な炎症反応を引き起こす可能性があります。しかし、免疫予防ワクチンまたはいくつかの種類のがんワクチンは、ワクチン効果を強化する自己アジュバント効果の恩恵を受けることもあります<sup>12</sup>。マウスにおける Pfizer-BioNTech (BNT162b2) 新型コロナウイルス感染症ワクチンの MDA-5 による感知は、スパイク特異的 CD8+ T 細胞反応の誘導に関与しており<sup>13</sup>、新型コロナウイルスに対するより長期的な防御反応の提供に重要であることが報告されています。ワクチン製剤デザインの微調整は間違いなく必要です。さらに重要なのは、免疫原性を評価し、予備的な安全性を決定するための高感度かつ堅牢なプラットフォームが必要だということです。InvivoGen 社は、ナノマテリアルおよび mRNA 製剤の免疫賦活特性の試験と研究をサポートできる、PRR レポーター細胞の製品群を幅広く提供していま

す。例えば、同社のヒト TLR3 および TLR7 レポーター HEK293 細胞株は、二つの異なるナノ粒子を含む mRNA ワクチンの免疫活性化を比較するため、Coolen らにより使用されました<sup>14</sup>。Son らもまた、InvivoGen 社の TLR4 および TLR7 レポーター HEK293 細胞株を、異なる mRNA ナノキャリアにおける TLRs 関与の潜在性調査に採用しています<sup>15</sup> (製品は下記をご覧ください)。

## References

1. U.S. Food and Drug Administration, 2022. Regulatory information, FDA-2020-D-1137.
2. Wolff, J.A. et al. 1990. Science 190, 247, 1465-1468.
3. Rosa, S.S. et al. 2021. Vaccine, 39(16), 2190-2200.
4. Hou, X. et al. 2021. Nat Rev Mater 6, 1078-1094 (2021).
5. Vlatkovic, I. et al. 2021. Biomedicines, 9(5), 530.
6. Karikó, K. et al. 2008. Molecular therapy, 16(11), 1833-1840.
7. Andries, O. et al. 2015. Journal of Controlled Release, 217, 337-344.
8. Igyártó, B.Z. et al. 2021. Current opinion in virology, 48, 65-72.
9. Loney, C. et al. 2015. Cell Mol. Life Sci. 2015, 72, 3971-3982.
10. Loney, C. et al. 2014. Nanomedicine 2014, 10, 775-782.
11. Kozma, G.T. et al. 2019. ACS Nano 2019, 13, 9315-9324.
12. Pardoll, N. et al. 2018. Nature reviews Drug discovery, 17(4), 261-279.
13. Li, C. et al. 2022. Nature Immunology, 23(4), 543-555.
14. Coolen, A.L. et al. 2019. Biomaterials, 195, 23-37.
15. Son, S. et al. 2020. Nano letters, 20(3), 1499-1509.

# InvivoGen's solutions to accelerate your mRNA research

## PRR REPORTER CELL LINES

InvivoGen 社のヒトおよびマウスの PRR レポーター細胞株製品群は、一つの機能的な PRR 遺伝子を安定的に発現します。これらは mRNA 転写物およびデリバリー素材の免疫原性評価に適しています。下記リストの TLRs 発現細胞の例に加え、同社は研究のニーズに合わせ、CLRs、CDSs、STING、NLRs、RLRs、AhR またはインフラマソームを発現する細胞株を幅広く提供しています。これらの細胞株は、シグナル伝達経路を容易に観察するため、SEAP (分泌性胎盤アルカリホスファターゼ) および/または Lucia ルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んでいます。出力されるシグナルは、迅速で信頼性のある結果を提供するため、同社独自のレポーター検出アッセイを使用して観察できます。それぞれの細胞株は様々な方法、例えば PCR、DNA シーケンシング、ウェスタンブロット、FACS および機能アッセイにより、徹底的に検証済です。

CELL LINE	PRODUCT	PATHWAY STUDIED	REPORTER	CAT.CODE
HEK293 (Human)	HEK-Blue™ hTLR3	Human TLR3 / NF-κB	SEAP	hkb-hltr3
	HEK-Blue™ hTLR4	Human TLR4 / NF-κB	SEAP	hkb-hltr4
	HEK-Blue™ hTLR7	Human TLR7 / NF-κB	SEAP	hkb-hltr7
	HEK-Blue™ hTLR8	Human TLR8 / NF-κB	SEAP	hkb-hltr8



Check out our website for full collection: [www.invivogen.com/cell-lines](http://www.invivogen.com/cell-lines)

## PRR SCREENING SERVICE

また同社は、目的化合物の免疫プロファイル解明をサポートするため、改変 HEK293 細胞を使用した高品質なスクリーニングサービスを提供しています。スクリーニングパラメーターは、同社の TLRs、NOD1/2、RIG-I/MDA-5、Dectin-1、Mincle および STING を含む PRR リガンドの試験パネルから選択できます。サービスは二つのレベルで提供され、個別、または連続的に実施することができます。さらに、同社のスクリーニング所要時間はわずか3週間で、mRNA ワクチン研究のスピードアップをサポートします。

SERVICE	DESCRIPTION	CAT.CODE
Compound Profiling	Single dose testing on a set of PRRs	tlrl-test1
Compound Dose Response	Dose response on one or several PRRs	tlrl-test2



For more info, visit: [www.invivogen.com/custom-tilr-screening](http://www.invivogen.com/custom-tilr-screening)

### Example of Level 1 Compound Profiling

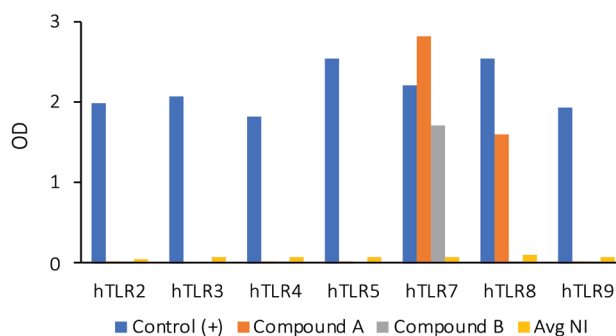


Fig 2: TLR Response Profile. HEK-Blue™ reporter cells were stimulated with 1/10 dilution of the sample solution provided and a fixed concentration of positive controls. After 24h incubation, TLR-induced NF-κB activation was assessed by measuring the SEAP levels in cell supernatants using QUANTI-Blue™.

INVIVOGEN ASIA

Email: [info.hk@invivogen.com](mailto:info.hk@invivogen.com) Tel: +852-36223480 Fax: +852-36223483

