

RNA オリゴマーを用いた mRNA 修飾法の開発と mRNA 送達、ワクチンへの展開

内田智士 a),b) (京都府立医科大学大学院医学研究科 a)、川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンターb))

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対して、mRNA ワクチンが実用化され、mRNA 医薬の有用性が示された(1)。今後、感染症予防だけでなく、がん治療ワクチン、がん免疫治療、希少遺伝性疾患治療、ゲノム編集治療、再生医療といった様々な分野への mRNA 医薬の応用が検討されるであろう(2, 3)。一方で、COVID-19 ワクチンは、供給不足が明らかであり、効果を向上させ低用量化することが望まれる。がん治療ワクチンでは、より抗原性の低い標的に対して免疫を誘導する必要がある。その他の適応では、標的組織、細胞に効率的に mRNA を送達する手法が求められる。このような mRNA バイオアベイラビリティの向上に向けて、世界中で、脂質性ナノ粒子や、リポポリプレックス、高分子ミセルといった多種多様な mRNA 送達キャリアの開発が行われている(4, 5)。その中で著者らはこのような送達キャリアと独立直接的に機能し、相乗的に mRNA バイオアベイラビリティを向上させる戦略として mRNA 自体の設計に着目した。本稿では、相補鎖 RNA オリゴマーを用いて mRNA を修飾することで、その送達効率やワクチンとしての機能を向上させた研究を紹介する。

2. mRNA の修飾

a. 塩基の化学修飾

mRNA のバイオアベイラビリティを向上させる手法として、塩基の化学修飾が以前より検討されてきた。シュードウリジン、5 メチルシチジン等の修飾により、Toll 様受容体、RIG-I 様受容体といった mRNA の自然免疫受容体に対する認識が回避され、mRNA の免疫原性が軽減されること、結果として mRNA からのタンパク質発現効率が向上することが報告された(6, 7)。近年、N1 メチルシュードウリジンが、mRNA の免疫原性を低下させるとともに、翻訳活性を大幅に向上させる修飾として、幅広く用いられている(8)。一方、著者らは様々な化学修飾塩基を含む mRNA の機能を調べたところ、修飾により mRNA の免疫原性は低下したものの、しばしば翻訳活性も同時に低下した(9)。その後、他のグループからも同様の報告がなされた(10)。また、mRNA を生体に投与する場合に問題となる酵素分解に対する耐性は、化学修飾後もあまり改善しなかった。siRNA やアンチセンス核酸では、糖リン酸主鎖も含めて、多種多様な修飾が行われることで、酵素分解耐性が大幅に向上し、核酸医薬のバイオアベイラビリティ向上に繋がっている。一方で、

mRNA では翻訳活性を維持する必要があるため修飾法が限られ、まだ化学修飾による酵素分解制御には至っていない。

b. 相補鎖 RNA を用いた mRNA 修飾

近年、細胞内での RNA の 2 次構造を評価する手法が進歩し、内因性 mRNA の 2 次構造が可逆的に結合、解離していることが明らかとなってきた(11, 12)。そこで、化学修飾した相補鎖 RNA を mRNA にハイブリダイズすることを着想した。すなわち、mRNA に結合した化学修飾相補鎖 RNA も、内因性 mRNA の 2 次構造と同様に細胞内で解離するため、mRNA からのタンパク質効率が保たれるのではないかと期待した。一方で、2 本鎖 RNA 形成による RNA 干渉や免疫原性が懸念された。そこで、様々な鎖長の未修飾相補鎖 RNA を、レポーター mRNA のタンパク質コード配列にハイブリダイズした際に、相補鎖が mRNA からのタンパク質翻訳や mRNA の免疫原性に与える影響を評価した(13)。培養免疫細胞への導入において、23 塩基以上の RNA をハイブリダイズした際、タンパク質翻訳活性の低下や、炎症性サイトカイン分泌の上昇がみられたが、17 塩基の相補鎖を用いた場合、その影響はみられなかった。そこで、17 塩基の相補鎖を持つ RNA を用いた mRNA の化学修飾を検討した。

3. 相補鎖 RNA を用いた mRNA 修飾

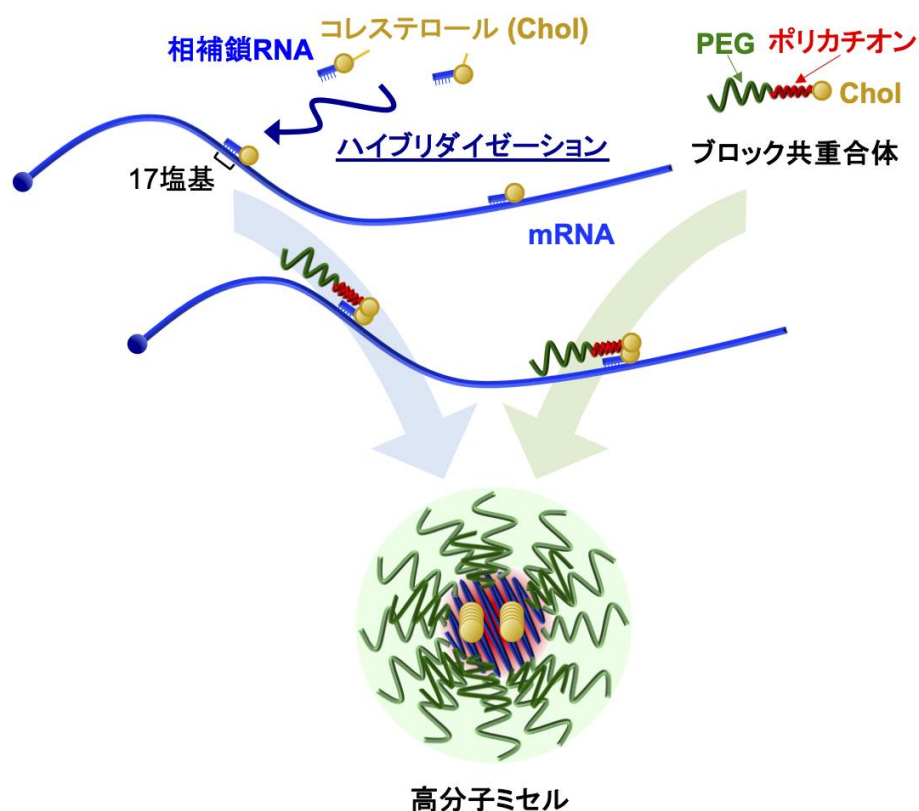


Figure 1. mRNA への Chol 基修飾による高分子ミセルの安定化。文献(13)より許可を得て改変。© 2019 Elsevier Ltd.

まず、コレステロール(Chol)基を修飾した相補鎖 RNA を mRNA にハイブリダイズすることで、mRNA 送達キャリアの安定化を試みた。ここでは、Chol 修飾 mRNA を、 ω 末端に Chol 基を修飾したポリエチレングリコール(PEG)-ポリカチオンブロック共重合体と混合することで、PEG で覆われた高分子ミセル(以下、ミセルと記載)に搭載した(13) (Figure 1)。その際、それぞれの Chol 基が stacking することで、より安定に mRNA を内包できると期待した。実際に、約 800 塩基の mRNA に Chol 基を 1 つ修飾するだけで、ミセルに内包した mRNA の血清培養中の酵素分解が抑制され、アニオン性高分子を添加した際の mRNA との置き換わりに対する耐性も向上した。ミセルの安定性は mRNA 中の Chol 基数に依存して増加した。また、mRNA とブロック共重合体の両方に Chol 基を導入した場合にのみ、ミセル中での mRNA の凝縮が強くなったことから、mRNA 上の Chol 基とブロック共重合体上の Chol 基の相互作用がミセルの安定化に寄与したと想定される。安全性評価において、Chol 基修飾 RNA をハイブリダイズすることによる炎症反応の惹起、相補配列を持つ内因性遺伝子の発現に対する影響はほとんどみられなかった。このミセルをマウスに対して経気道肺投与したところ、mRNA の Chol 基修飾により、肺への mRNA 導入効率が向上できることも見出した。

一方で、このシステムを mRNA の全身投与へ応用するためには更なるミセルの安定化が必要であった。そこで、ブロック共重合体のカチオン部分の間をフェニルボロン酸エステルで架橋した。この架橋は、細胞内取り込み後、細胞質内の高アデノシン三リン酸(ATP)濃度に応答して開裂し、ミセルに内包した mRNA の細胞質内での放出が促進される(14)。まず、側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数の異なるポリアスパラギン酸を用い、カチオン部分の構造及び架橋の導入率のスクリーニングを行ったところ、十分な安定性と、細胞質内での速やかな mRNA 放出に伴う効率的なタンパク質翻訳を両立するミセル設計を見出した。続いて、その最適なミセル設計に対して、mRNA 及びブロック共重合体への Chol 基修飾を行った(15)。すると、架橋と Chol 基修飾が相乗的に作用することで、ミセルが安定化され、マウスへの静脈内投与後の血中滞留性が向上した。このように、mRNA への修飾は、送達キャリアを構成する高分子の設計と独立直交的に作用して、キャリア機能を相乗的に向上できる方法である。この方法を、様々な高分子設計技術と融合することで、mRNA バイオアベイラビリティのさらなる向上が期待される。

また、mRNA の修飾と脂質性 mRNA キャリアとの融合にも取り組んでいる。脂質性 mRNA キャリアでは、凝集を防ぐため煩雑な調製法が必要になる。ここで、簡便に凝集を防ぐ方法として、mRNA の PEG 修飾を行った(16)。驚くべきことに、約 800 塩基の mRNA に 20 本の PEG 鎖を修飾しても、無細胞翻訳系にてほとんどタンパク質翻訳効率が低下しなかった。この PEG 化 mRNA を、リポフェクタミンや 1,2-bis(dioleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane (DOTAP)/Chol リポソームと混合したところ、平均粒径 100 nm 以下で電氣的にほぼ中性な脂質性 mRNA キャリアが調製された。一方で、PEG 修飾を行っていない場合、数百から数千 nm の凝集体が形成されたことから、PEG

修飾による凝集抑制効果が確認された。PEG 化 mRNA を搭載した脂質性キャリアは、マウスへの静脈内投与後の血液循環中에서도凝集することなく、安定に存在した。このように化学修飾相補鎖を用いた mRNA 修飾は、様々な種類の mRNA キャリアの機能を高められる汎用的な方法論である。

4. 複数の mRNA 鎖を束ねた mRNA ナノ集合体

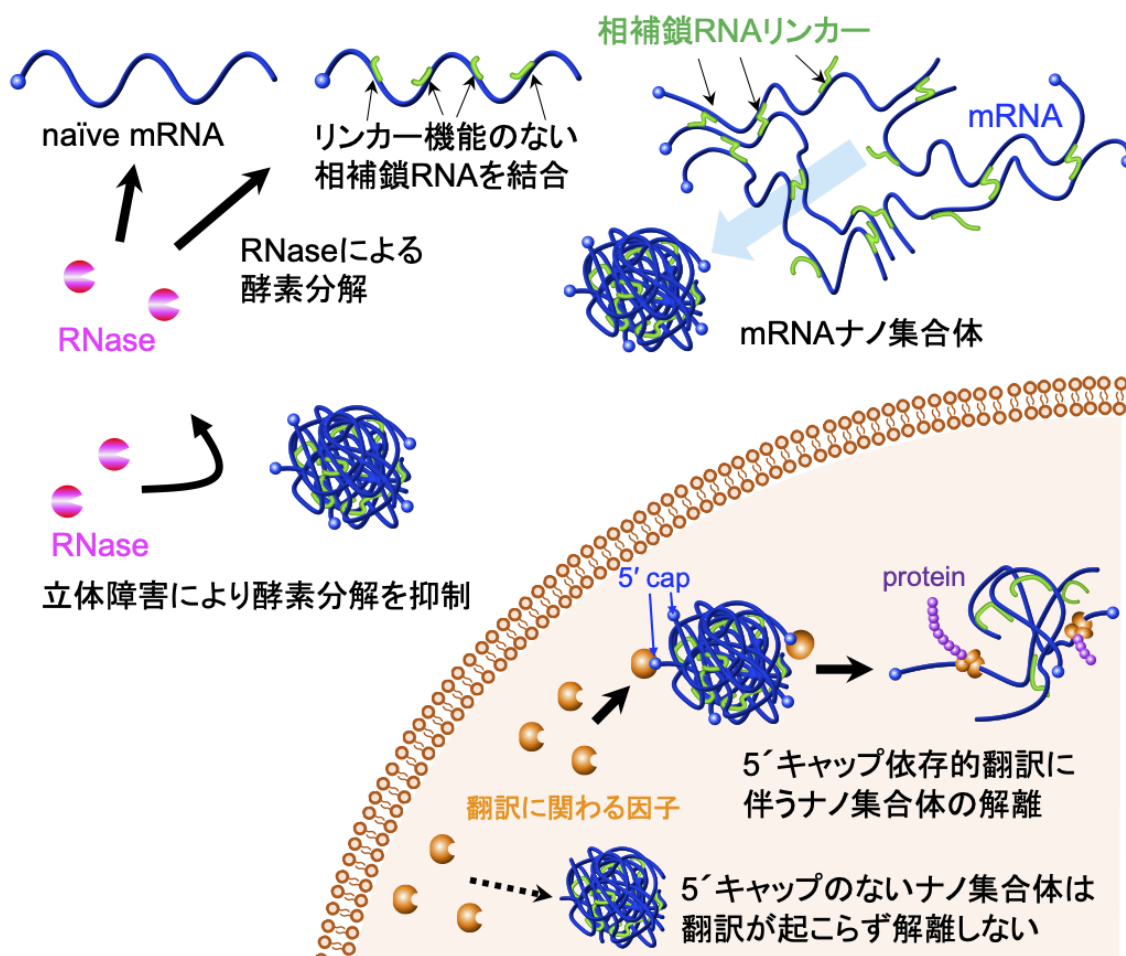


Figure 2. mRNA ナノ集合体。文献より許可を得て改変。© 2019 Wiley-VCH

次に、mRNA の立体構造に着目した酵素分解抑制に取り組んだ。近年 RNA ナノテクノロジーの分野で、RNA に立体構造をとらせることで RNA の酵素分解耐性が向上することが明らかとなり、高次構造を付与した RNA を用いた siRNA 送達などが検討されている (17)。この方法では精密な配列設計が必要となる一方で、mRNA ではアミノ酸配列を変えずに自由に配列を設計することができないため、RNA ナノテクノロジーの mRNA への応用は行われてこなかった。ここで、上述のように 17 塩基の相補鎖 RNA をハイブリダイズしても mRNA からの翻訳活性が変わらないことを踏まえ、複数の mRNA 鎖を、相補配列を持つ RNA リンカーを用いて束ね mRNA ナノ集合体を調製することで、mRNA に立体

構造を付与した(Figure 2) (18)。すると、平均粒径 100 nm 以下で、平均 7.7 本の mRNA 鎖からなるナノ集合体が調製された。まず、送達キャリアを用いない場合の機能評価を行った。すると、このナノ集合体は、集合体を形成していない naïve mRNA と比べて、酵素分解耐性が 100 倍程度向上していた。興味深いことに、mRNA にハイブリダイズするもののリンカーとして機能しない相補鎖 RNA をハイブリダイズしても酵素耐性向上効果はほとんど得られなかった。すなわち、mRNA の 2 次構造だけでなく高次構造が、ナノ集合体における酵素分解耐性の向上に大きく寄与したことが想定された。また、ナノ集合体からのタンパク質翻訳活性は保たれており、培養細胞やマウスへ導入したところ、ナノ集合体では、集合体を形成していない naïve mRNA と比べて mRNA 導入効率が向上した。

これらの結果は、ナノ集合体では、立体障害により分解酵素からの認識が回避されている一方で、タンパク質翻訳に関わる酵素の認識を受けていることを示唆する。この一見相反する結果を説明するために、翻訳に重要とされる 5' キャップに着目し、ナノ集合体の解離挙動を、Cy3 標識リンカーと Cy5 標識 mRNA の間の Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) により評価した。5' キャップを有する mRNA ナノ集合体は、PBS 中で解離しなかった一方で、細胞溶解液中で解離し、細胞内環境依存的な翻訳が示唆された。一方で、5' キャップを持たない mRNA ナノ集合体を調製し同様の観察を行ったところ、細胞内環境中でも解離しなかった(Figure 2)。すなわち、mRNA ナノ集合体は、細胞内環境で、5' キャップ依存的に解離していることが示唆された。翻訳開始因子がナノ集合体中の 5' キャップを認識し翻訳が起こると、翻訳酵素の持つヘリカーゼ活性により(19)、ナノ集合体が解離し、それが更なる翻訳に繋がったのではないかと想定している。また、上述の Chol 基や PEG を修飾した相補鎖 RNA も同様のメカニズムで、細胞内にて mRNA から解離している可能性がある。

このナノ集合体のキャリアを用いた送達にも取り組んだ(20)。ここで、用いた naïve mRNA は 0.8 kb であるのに対して、ナノ集合体を構成する RNA は合計で 7.4 kb であった。このような RNA の総塩基数の違いから、mRNA 構造の違いを区別して評価するため、コントロールとして、7.6 kb の長鎖 naïve mRNA も用いた。これら 3 種類の mRNA を、ブロック共重合体と混合することで高分子ミセルを調製したところ、いずれも平均粒径 100 nm 以下で電氣的にはほぼ中性であった。血清中での分解酵素耐性試験やポリアニオンとの置き換え耐性試験、静脈内投与後の血中滞留性評価において、ナノ集合体を内包したミセルは、0.8 kb 及び 7.6 kb の naïve mRNA を内包したミセルと比べて、安定性が飛躍的に向上していた。ポリプレックス内の RNA 立体構造の制御により、ポリプレックスを安定化させた世界に先駆けた報告である。また、ナノ集合体を内包したミセルは、培養細胞やマウス脳への mRNA 導入において、優れたタンパク質翻訳活性を示した。

5. 部分 2 本鎖 mRNA を用いた mRNA ワクチン

これまでの例では、mRNA のタンパク質コード配列に対して 17 塩基の相補鎖をハイブリダイズしてもその翻訳活性や免疫原性に影響しないことを利用した修飾を検討した。

一方、mRNA のポリ A 鎖を標的とした場合、120 塩基のポリ U 鎖をハイブリダイズしても、タンパク質翻訳活性に影響しなかったが、mRNA の免疫賦活化作用が向上した(21)。そこで、この設計(mRNA:pU)を mRNA ワクチンに用いた(Figure 3)。すなわち、mRNA:pU は、ワクチンにおいて効率的に抗原タンパク質を発現する一方で、2 本鎖部分が免疫賦活化アジュバントとして機能することを期待した。ここで、ポリ U 鎖は *in vitro* 転写によって合成したが、その際 5'末端はトリリン酸化される。一方で、2 本鎖 RNA の 5'末端トリリン酸は、自然免疫受容体 retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)の基質である。実際に、RIG-I ノックアウト細胞を用いた解析から、mRNA:pU は主に RIG-I を介して免疫賦活化作用を示していることが明らかとなった。なお、ポリ A に対して相補鎖を結合した場合、長い 2 本鎖構造を付与しても mRNA 翻訳活性が維持されたメカニズムは不明であるが、A と U の結合が弱いことや、ポリ U が細胞質内で別の mRNA のポリ A 鎖に置き換わった可能性が想定される。

抗原タンパク質の発現

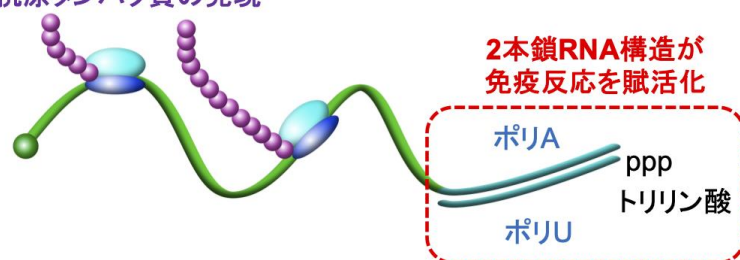


Figure 3. 部分 2 本鎖 mRNA ワクチン。

この mRNA:pU を用いたワクチン実験に取り組んだ。ここで、mRNA 構造の影響を直接評価するため、naked 状態での投与を検討したが、その際、naked mRNA 投与で高いワクチン効果が得られるリンパ節への投与を行った。モデル抗原オボアルブミン(OVA)を用いた評価で、mRNA:pU は naïve mRNA と比べ、細胞性免疫、液性免疫の誘導効果が向上した(21)。一方、その効果はまだ医療応用には十分ではなく、またリンパ節内投与の臨床応用は手技が煩雑となることから、現在、キャリアを用いた送達に取り組んでおり、有望な成果が得られている。

現在、mRNA ワクチンでは主に脂質性キャリアを用いた送達が行われており、その際、脂質に免疫賦活化活性が付与されている(22)。この場合、mRNA から遊離した脂質が全身性に炎症反応を惹起する危険性がある。一方、mRNA にアジュバント活性を付与した場合、抗原タンパク質を発現した細胞でのみ効率的に免疫を賦活化するほか、mRNA は脂質より分子量が大きく、その体内動態の制御が容易であるといった利点がある。さらに RNA は体内で速やかに分解されるため、アジュバントが体内に蓄積する可能性がなく、また体内に存在する物質である点は臨床応用において承認を得る上でも極めて重要である。

6. 様々な mRNA エンジニアリング技術

我々の相補鎖を用いた mRNA 修飾以外にも、mRNA の機能向上を目指した様々な試みが行われている。まず、mRNA 分子に化学修飾を行うものに関して、2.a.に述べた塩基の化学修飾以外にも様々な試みがある。例えば、5'キャップのホスホロチオエート修飾や、locked nucleic acid 構造付与により、細胞内の酵素によるキャップ除去を防ぎ、また翻訳開始効率を高めることが出来る(23, 24)。ワクチンへの応用を視野に入れ、5'キャップ修飾により、免疫賦活化作用を高めた報告もある(25)。また、ホスホロチオエート修飾を5'非翻訳領域に行うことで、翻訳の律速である開始の段階を効率化され(26)、ポリ A 部分に行うことで、細胞内でのデアデニラーゼによる分解が抑制されること(27)も知られている。mRNA の構造に関して、スプライシング過程を模倣した方法で、RNA を環状化させることで、エキソヌクレアーゼ分解が抑制され、mRNA からのタンパク質発現が長寿命化し、さらに mRNA の5'構造に起因する mRNA 免疫原性が軽減できる(28, 29)。また、環状化した上で、ストップコドンを除くと、翻訳の律速である開始、停止の過程が回避され、タンパク質発現量が飛躍的に向上する(30, 31)。

また、mRNA にはプロモーター、エンハンサーがなく、細胞種や環境に応答した翻訳制御が困難であるが、特定の配列を mRNA に組み込むことで、この課題に取り組んでいる報告もある。例えば、5'非翻訳領域に RNA アプタマーをハイブリダイズし、翻訳を抑制した上で、特定の分子が結合するとそのアプタマーが脱離し、翻訳が開始されるシステムが報告されている(32)。また、5', 3'非翻訳領域にマイクロ RNA (miRNA)の標的配列を組み込むと、その miRNA を発現する特定の細胞で、mRNA が分解され翻訳が抑制される。この方法は、分化させた iPS 細胞から特定の細胞を単離するために用いられているほか(33)、*in vivo* で心筋細胞特異的に mRNA を発現させた報告もある(34)。

アルファウイルス由来の RNA 複製機構を組み込むことで、mRNA に自己増殖機能を付与し、タンパク質発現を持続させる試みもある。長期発現できることから、少ない投与回数で iPS 細胞を効率的に樹立できるほか(35)、低用量で優れたワクチン効果が得られ、COVID-19 ワクチンにも応用されている(36)。ワクチン効果には、RNA の自己増殖過程で形成される 2 本鎖 RNA 構造によるアジュバント活性も寄与していると考えられている。一方で、mRNA ワクチン接種による局所反応が問題となる中、この方法では、その制御が困難であること、さらにアルファウイルス由来タンパク質に対する免疫応答が懸念されること、長鎖 RNA を効率的の送達する方法論が必要になるなど課題も多い。

7. おわりに

mRNA ワクチンの承認、全世界での接種を受け、今後 mRNA 医薬の開発がますます盛んになることが想定されるが、その際、最大限の効果を得るための mRNA バイオアベイラビリティ向上は必須である。この課題に対して、主に mRNA 送達キャリアを構成する

脂質、高分子の設計が注目されてきたが、我々は、視点を変え、mRNA の設計に注目した。相補鎖 RNA を用いた mRNA 修飾を試みたところ、mRNA キャリア設計と相乗的に作用することで、mRNA 医薬の最大の課題である生体内酵素分解の克服に大きく寄与した。さらに、mRNA に免疫賦活化作用を付与することで、mRNA ワクチンの効果を向上した。本戦略は、mRNA 医薬の様々な応用の場面で、様々な送達キャリアとの融合が可能であり、今後の更なる発展が期待される。

8. 謝辞

本研究の遂行にあたりまして、片岡一則先生(東大、iCONM)、Horacio Cabral 先生(東大)、位高啓史先生(東医歯大)ほか様々な先生方、大学院生方々にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

9. 利益相反開示

本論文に関わる研究は、ナノキャリア(株)、アキュルナ(株)からの研究費等の提供を受けている。

10. 参考文献

1. R. Verbeke, I. Lentacker, S. C. De Smedt, H. Dewitte, The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J. Control. Release* 10.1016/j.jconrel.2021.03.043, (2021).
2. U. Sahin, K. Kariko, O. Tureci, mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 759-780 (2014).
3. S. Uchida, F. Perche, C. Pichon, H. Cabral, Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery. *Mol. Pharm.* **17**, 3654-3684 (2020).
4. Z. Zhong *et al.*, mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today* **23**, 16-39 (2018).
5. S. Uchida, K. Kataoka, Design concepts of polyplex micelles for in vivo therapeutic delivery of plasmid DNA and messenger RNA. *J. Biomed. Mater. Res. A* **107**, 978-990 (2019).
6. K. Kariko, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**, 165-175 (2005).
7. M. S. Kormann *et al.*, Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnol.* **29**, 154-157 (2011).
8. O. Andries *et al.*, N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression

- and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control. Release* **217**, 337-344 (2015).
9. S. Uchida, K. Kataoka, K. Itaka, Screening of mRNA Chemical Modification to Maximize Protein Expression with Reduced Immunogenicity. *Pharmaceutics* **7**, 137-151 (2015).
 10. B. Li, X. Luo, Y. Dong, Effects of Chemically Modified Messenger RNA on Protein Expression. *Bioconjug. Chem.* **27**, 849-853 (2016).
 11. R. C. Spitale *et al.*, Structural imprints in vivo decode RNA regulatory mechanisms. *Nature* **519**, 486-490 (2015).
 12. S. Rouskin, M. Zubradt, S. Washietl, M. Kellis, J. S. Weissman, Genome-wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures in vivo. *Nature* **505**, 701-705 (2014).
 13. N. Yoshinaga *et al.*, Induced packaging of mRNA into polyplex micelles by regulated hybridization with a small number of cholesteryl RNA oligonucleotides directed enhanced in vivo transfection. *Biomaterials* **197**, 255-267 (2019).
 14. N. Yoshinaga *et al.*, Polyplex Micelles with Phenylboronate/Gluconamide Cross-Linking in the Core Exerting Promoted Gene Transfection through Spatiotemporal Responsivity to Intracellular pH and ATP Concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18567-18575 (2017).
 15. N. Yoshinaga *et al.*, mRNA loading into ATP-responsive polyplex micelles with optimal density of phenylboronate ester crosslinking to balance robustness in the biological milieu and intracellular translational efficiency. *J. Control. Release* **330**, 317-328 (2021).
 16. S. Kurimoto *et al.*, PEG-OligoRNA Hybridization of mRNA for Developing Sterically Stable Lipid Nanoparticles toward In Vivo Administration. *Molecules* **24**, 1303 (2019).
 17. J. B. Lee, J. Hong, D. K. Bonner, Z. Poon, P. T. Hammond, Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery. *Nature Mater.* **11**, 316-322 (2012).
 18. N. Yoshinaga *et al.*, Bundling mRNA Strands to Prepare Nano-Assemblies with Enhanced Stability Towards RNase for In Vivo Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 11360-11363 (2019).
 19. X. Qu *et al.*, The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. *Nature* **475**, 118-121 (2011).
 20. K. Koji *et al.*, Bundling of mRNA strands inside polyion complexes improves mRNA delivery efficiency in vitro and in vivo. *Biomaterials* **261**, 120332 (2020).

21. S. Uchida *et al.*, Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination. *Biomaterials* **150**, 162-170 (2018).
22. L. Miao *et al.*, Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nature Biotechnol.* **37**, 1174-1185 (2019).
23. E. Grudzien-Nogalska, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *RNA* **13**, 1745-1755 (2007).
24. A. R. Kore, M. Shanmugasundaram, I. Charles, A. V. Vlassov, T. J. Barta, Locked Nucleic Acid (LNA)-Modified Dinucleotide mRNA Cap Analogue: Synthesis, Enzymatic Incorporation, and Utilization. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 6364-6365 (2009).
25. M. van Dülmen, N. Muthmann, A. Rentmeister, Chemo-enzymatic modification of the 5' cap maintains translation and increases immunogenic properties of mRNA. *Angew Chem Int Ed Engl* DOI: 10.1002/anie.202100352, (2021).
26. D. Kawaguchi *et al.*, Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **59**, 17403-17407 (2020).
27. D. Strzelecka *et al.*, Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. *RNA* **26**, 1815-1837 (2020).
28. R. A. Wesselhoeft, P. S. Kowalski, D. G. Anderson, Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nature Commun.* **9**, 2629 (2018).
29. R. A. Wesselhoeft *et al.*, RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. *Mol. Cell* **74**, 508-520 e504 (2019).
30. N. Abe *et al.*, Rolling Circle Amplification in a Prokaryotic Translation System Using Small Circular RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 7004-7008 (2013).
31. N. Abe *et al.*, Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells. *Sci. Rep.* **5**, 16435 (2015).
32. T. S. Bayer, C. D. Smolke, Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nature Biotechnol.* **23**, 337-343 (2005).
33. K. Miki *et al.*, Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches. *Cell Stem Cell* **16**, 699-711 (2015).
34. A. Magadum *et al.*, Pkm2 Regulates Cardiomyocyte Cell Cycle and Promotes

- Cardiac Regeneration. *Circulation* **141**, 1249-1265 (2020).
35. N. Yoshioka *et al.*, Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* **13**, 246-254 (2013).
 36. K. Bloom, F. van den Berg, P. Arbuthnot, Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther.* DOI: 10.1038/s41434-020-00204-y, (2020).