

ヒト肝細胞株におけるPfizerBioNTech COVID-19 mRNA ワクチンBNT162b2のIn Vitro細胞内逆転写

Markus Aldén¹, Francisko Olofsson Falla¹, Daowei Yang¹, Mohammad Barghouth¹, Cheng Luan¹, Magnus Rasmussen², Yang De Marinis^{1*}

¹ Department of Clinical Sciences, Lund University, 20502 Malmö, Sweden

² Infection Medicine, Department of Clinical Sciences, Lund University, 22362 Lund, Sweden

* Correspondence: yang.de_marinis@med.lu.se

【要 約】

ファイザー社／ビオンテック社が開発したCOVID-19 mRNA ワクチンBNT162b2の前臨床試験では、BNT162b2を接種された動物の肝臓に対し可逆的な影響が見られた。また、最近の研究では、SARS-CoV-2のRNAが逆転写されヒト細胞のゲノムにインテグレートされ(組み込まれ)得ることが示された。本研究では、BNT162b2がヒト肝細胞株Huh7に及ぼす影響をin vitro (試験管内)で検討した。Huh7細胞の培養系にBNT162b2を添加し、細胞から抽出したRNAに対して定量PCRを行った。Huh7細胞において高レベルのBNT162b2が検出され、Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1)の遺伝子発現に変化が見られた(LINE-1はヒトに内在する逆転写酵素である)。LINE-1オープン・リーディング・フレーム-1RNA結合タンパク質(ORFp1)に結合する抗体を用いて、BNT162b2で処理したHuh7細胞に対し免疫組織染色を行ったところ、LINE-1の核内分布に増加が見られた。BNT162b2が添加されたHuh7細胞のゲノムDNAに対しPCRを行ったところ、BNT162b2に特異的なDNA配列が増幅された。本研究の結果、BNT162b2がヒト肝細胞株Huh7に短時間で取り込まれ、それによりLINE-1の発現と分布が変化することが示された。更には、本研究により、Huh7細胞にBNT162b2が添加された後、6時間という短時間で、BNT162b2のmRNAが細胞内でDNAに逆転写されることが示された。

キーワード: COVID-19 mRNA ワクチン; BNT162b2; 肝臓; 逆転写; LINE-1; Huh7

1. 緒 言

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2型(SARS-CoV-2)によるコロナウイルス病2019 (COVID-19)は、2020年3月11日、世界保健機関(WHO)により地球規模のパンデミックとして告知され、壊滅的な衛生危機をもたらした。2022年2月現在、COVID-19により世界で4億3千万を超える感染症例が報告され、死亡例の数は590万を超える[1]。COVID-19に関連する罹患率および死亡率を減少させるため、効果的かつ安全なワクチンが早急に求められている。

COVID-19に対するワクチンは複数開発されており、主な例として、mRNA ワクチン(Pfizer-BioNTech; Moderna)、複製欠損型の組換えアデノウイルスベクターワクチン(Janssen-Johnson and Johnson; Astra-Zeneca; Sputnik-V; CanSino)、不活化ワクチン(Sinopharm; Bharat Biotech; Sinovac)がある。mRNA ワクチンには、免疫原を設計する際や製造の際の柔軟性ないし効率性という利点があり、現在、多くのワクチン候補が様々な開発の段階や応用の段階にある。具体例として、ファイザー社／BioNTech社が開発したCOVID-19 mRNA ワクチンBNT162b2は、臨床試験で高く評価されており[2-4]、世界各国におけるCOVID-19予防接種の政策の下で投与されている[5-8]。

BNT162b2は、脂質ナノ粒子(LNP)によりカプセル化されたヌクレオシド修飾RNAワクチン(modRNA)であり、SARS-CoV-2のスパイク(S)タンパク質の全長をコードし、抗原に関し最適な融合前のコンフォメーションを確保するために2つのプロリン変異で修飾されている。これにより、ウイルス自体を模倣してウイルス中和抗体を誘発する[3]。無作為化臨床試験と同様、市販後(リアルワールド)においても、BNT162b2は、COVID-19に起因する様々な事態に対し高い有効性を示した[5]。一方、ワクチンの長期的な安全性や有効性のモニタリングなど、課題も多く残っており、継続的な評価と調査が求められる。現在のBNT162b2の安全性プロファイルは、短期的な臨床試験から得られたものに限定されている。BNT162b2の稀な副作用として、心膜炎、不整脈、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、頭蓋内出血、血小板減少症などが報告されている[4, 9-20]。他の種類のワクチンに関しても、ワクチンについて観察された副作用を報告する研究がある[21-24]。ワクチンに関連する副作用の種々のメカニズムをより的確に把握するためには、臨床研究に加え、細胞レベルや分子レベルでの解析が求められる。

最近の研究において、SARS-CoV-2のRNAが逆転写され、ヒトの細胞のゲノムにインテグレートされ得ることが示された[25]。このことから、SARS-CoV-2の部分的なRNAをコードするBNT162b2についても同様のことが起こり得るのではないかと疑問が生じる。ファイザー社が欧州医薬品庁(EMA)に提供した薬物動態データでは、放射標識したLNPおよびリシフェラーゼmodRNAをマウスやラットに筋肉注射することでBNT162b2の生体内分布を調査した。調査結果によれば、第一の時点(0.25時間)からほとんどの組織で放射能が検出さ

れ、主な分布箇所は注射部位および肝臓であり、投与後8-48時間で最大の濃度が観察された[26]。さらに、BNT162b2が接種された動物では、肝臓の肥大、肝細胞の空胞化、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ GT)値の上昇、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)およびアルカリホスファターゼ(ALP)の値の上昇など、肝臓への可逆的な影響が観察された[26]。LNP 送達システムによって引き起こされる肝臓への一過性の影響が、過去に報告されている[27-30]。一方、modRNA を含まない空のLNP だけでは、重大な肝障害をもたらさないことも示されている[27]。そこで、本研究の一課題は、BNT162b2によるヒト肝細胞株への影響をin vitroで調べ、内在性のメカニズムによりBNT162b2がDNAに逆転写され得るかを調査することである。

2. マテリアルおよび方法

2-1. 細胞培養

10%(v/v)のウシ胎児血清(Sigma-Aldrich、F7524-500ML、Burlington、MA、USA)および1%(v/v)のペニシリン-ストレプトマイシン(HyClone、SV30010、Logan、UT、USA)を添加したDMEM培地(HyClone、HYCLSH30243.01)において、37℃および5% CO₂の条件下で、Huh7細胞(JCRB細胞バンク(日本、大阪))を培養した。BNT162b2を用いてHuh7細胞を処理するために、Huh7細胞を、200,000細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種した。BNT162b2 mRNAワクチン(Pfizer BioNTech、New York、NY、USA)を、メーカーのガイドラインに従い[31]、無菌の0.9%塩化ナトリウム注射液 USPを用いて、最終濃度100 μ g/mLに希釈した。その後、BNT162b2懸濁液を細胞培養液に添加し、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mLの各最終濃度を得た。Huh7細胞を、BNT162b2を添加した状態および添加していない状態で、それぞれ6、24、48時間培養した。細胞は、PBSで十分に洗浄し、トリプシン処理によって採取し、以後の使用まで-80℃で保存した。

2-2. リアルタイム RT-QPCR

RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen、74134、Hilden、Germany)を用いて、メーカーのプロトコルに従い、細胞からRNAを抽出した。RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit(Thermo Fisher Scientific、K1622、Waltham、MA、USA)を用いて、メーカーのプロトコルに従い、RT-PCRを行った。リアルタイム qPCRは、BNT162b2に対するプライマー、LINE-1に対するプライマー、およびハウスキーピング遺伝子 ACTB、GAPDHに対するプライマーを用いて、Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific、K0222、Waltham、MA、USA)により行った(表1)。

表 1. RT-qPCR と PCR のプライマー配列

ターゲット	配 列
<i>ACTB</i> forward	CCTCGCCTTTGCCGATCC
<i>ACTB</i> reverse	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC
<i>GAPDH</i> forward	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
<i>GAPDH</i> reverse	TTAAAGCAGCCCTGGTGAC
<i>LINE-1</i> forward	TAACCAATACAGAGAAGTGC
<i>LINE-1</i> reverse	GATAATATCCTGCAGAGTGT
BNT162b2 forward	CGAGGTGGCCAAGAATCTGA
BNT162b2 reverse	TAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG

2-3. 免疫蛍光染色および共焦点イメージング

Huh7細胞を、BNT162b2(0.5、1、2 μ g/mL)を添加した状態および無添加の状態において、40,000細胞/ウェルの密度で、8チャンネルスライド(LAB-TEK、154534、Santa Cruz、CA、USA)において6時間培養した。一次抗体としてanti-LINE-1 ORF1p mouse monoclonal antibody(Merck、3574308、Kenilworth、NJ、USA)を用い、二次抗体としてCy3 Donkey anti-mouse(Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、USA)を用い、Hoechst(Life technologies、34850、Carlsbad、CA、USA)を用いて、Thermo Fisher社(Waltham、MA、USA)によるプロトコルに従い免疫組織染色を実施した。Zeiss LSM 800および63X油浸対物レンズを用いて各条件につき2枚ずつ画像を撮像し、各画像において15個の細胞に関しImageJ 1.53cを用いて個々の細胞全体の領域および核領域の染色強度を定量化した。細胞質に対するLINE-1染色強度は、細胞全体の染色強度から核の染色強度を減算することにより算出した。バイアスを防止するため、すべての細胞画像に乱数を割り当てた。核(Hoechst染色により特定)および細胞全体(LINE-1蛍光の

境界により特定)をマーキングするために、フリーハンド選択ツールを用いた。そして、これらの領域を測定し、平均強度を用いて各群を比較した。

2-4. ゲノム DNA の精製、PCR 増幅、アガロースゲル精製、サンガーシーケンシング

PBNDバッファ(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20)を用いて、既知のプロトコルに従い[32]、細胞ペレットからゲノムDNAを抽出した。DNA調製物から残留RNAを除去するために、DNA調製物にRNase(100μg/mL, Qiagen, Hilden, Germany)を加え、37℃で3時間保温し、その後95℃で5分間保温した。その後、BNT162b2をターゲットとするプライマー(配列を表1に示す)を用いて、以下のプログラムによりPCRを行った: 95℃で5分; 95℃で30秒、58℃で30秒、72℃で1分のサイクルを35サイクル; 最後に72℃で5分および12℃で5分。PCRによる生成物に対し1.4%(w/v)アガロースゲルで電気泳動を行った。予測されるサイズ(444bps)のアンプリコンに対応するバンドを切り出し、QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen, 28104, Hilden, Germany)を用いて、メーカーの説明書に従いDNAを抽出した。DNAアンプリコンの配列は、サンガーシーケンシング(Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany)により確認した。

統計

スチューデントの両側t検定およびANOVAを用いて統計的比較を行った。データは、平均値±SEMまたは±SDで表す。p<0.05の差は有意差とみなす。

2-5. 倫理的声明

Huh7細胞株は、Japanese Collection of Research Bioresources(JCRB)細胞バンクから得た。

3. 結果

3-1. BNT162b2 は高い効率でヒト肝細胞株 Huh7 細胞に侵入する

BNT162b2がヒト肝細胞に侵入するか否かを確認するため、ヒト肝細胞株Huh7の培養系にBNT162b2を添加した。LNPがHuh7細胞に到達する際の取り込み動態に関する過去の研究において、LNPによる最大の生物学的効果が観察されたのは4時間から7時間の間だった[33]。これに応じて、本研究では、BNT162b2の濃度を0(無添加)、あるいは0.5から1.0、2.0μg/mLに増加させて設定し、Huh7細胞を6、24、48時間培養した。細胞からRNAを抽出し、BNT162b2配列をターゲットとしたプライマーを用いてリアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)を実行した(図1)。BNT162b2の全配列は公開されており[34]、以下を含む: ジヌクレオチドキャップ; ヒトα-グロビン遺伝子の5'-非翻訳領域(UTR)を組み込む5'-UTR; 2箇所のプロリン変異を含むSARS-CoV-2のSタンパク質の全長; 2箇所のC→U変異が導入されたヒトAES/TLE5遺伝子セグメントおよびヒトミトコンドリア12S rRNA(mtRNRI)セグメントを組み込む3'-UTR; ポリ(A)テール。BNT162b2のSタンパク質配列を詳細に解析した結果、ヒトゲノム配列と100%同一の配列が124個あり、19~26ヌクレオチド(nt)につき1ntのみミスマッチのある配列が3個あった(表S1、補足資料参照)。BNT162b2のRNAのレベルを検出するため、SARS-CoV-2のSタンパク質領域にフォワードプライマーを、3'-UTRにリバースプライマーを配置したプライマーを設計した。これにより、プライマーがヒトゲノム領域と非特異的に結合するのを避け、BNT162b2に特異的なPCRアンプリコンを検出できるようにした。

BNT162b2 sequence (4284 bases)

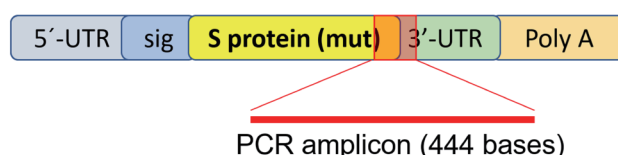


図 1. BNT162b2 の mRNA レベルおよび逆転写の検出に用いた PCR プライマーセット。
BNT162b2 の図は過去の文献から引用した [34]。

RT-qPCRの結果、6、24、48hの各時点において、BNT162b2で処理したHuh7細胞はハウスキーピング遺伝子よりも高レベルのBNT162b2 mRNAを有していた(図2: レベルが非常に高いため、対数 $2^{-\Delta\Delta CT}$ で表示した)。各時点において、細胞内で、上記3種のBNT162b2濃度により同等のBNT162b2 mRNAのレベルが得られた。ただし、48hの時点では、1.0μg/mLと2.0μg/mLの間で有意差が見られた。BNT162b2 mRNAの各レベルは、6hと比較して24hで有意な減少を見せたが、48hで再び増加した。

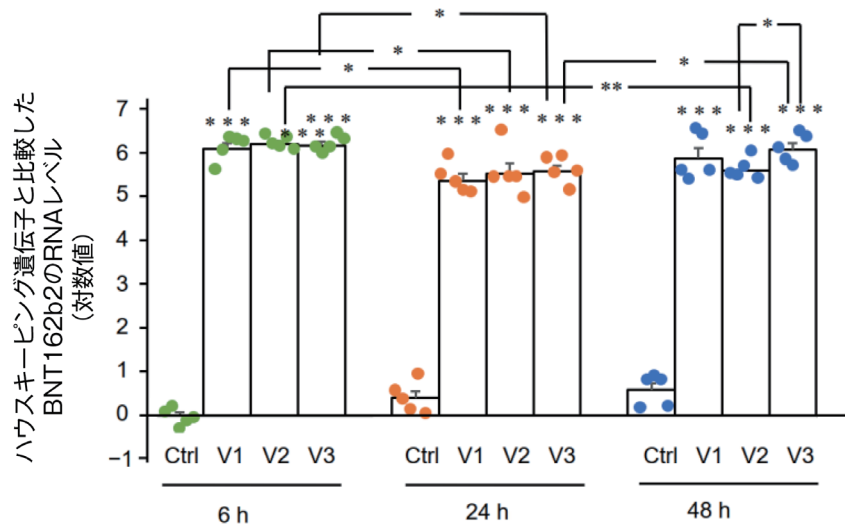


図 2. BNT162b2 で処理した Huh7 細胞における BNT162b2 mRNA のレベル。Huh7 細胞を、BNT162b2 を添加しない状態 (Ctrl)、また BNT162b2 を添加した状態 (0.5 μ g/mL (V1)、1 μ g/mL (V2)、2 μ g/mL (V3)) で、6 時間 (緑点)、24 時間 (オレンジ点)、48 時間 (青点) 培養した。RNA を精製し、BNT162b2 をターゲットとしたプライマーを用いて qPCR を実施した。BNT162b2 の RNA レベルは、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH および ACTB に対し、対数 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 値として示す。結果は 5 つの独立した実験から得たものである (n = 5)。各グループ間の差を、スチューデントの両側 t-検定を用いて分析した。データを、平均 $\pm$ SEM として表す。(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. 各時点におけるコントロール、或いは記載の通り)。

3-2. ヒト内在性逆転写酵素 Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1) に対する BNT162b2 の影響

ここで、LINE-1 遺伝子の発現に対する BNT162b2 の影響を検討した。BNT162b2 (0、0.5、1.0、2.0 μ g/mL) で 6、24、48 時間処理した Huh7 細胞から精製した RNA について、LINE-1 をターゲットとするプライマーを用いて RT-qPCR を実施した。6h の時点で、コントロールと比較して 2.0 μ g/mL の BNT162b26 により LINE-1 発現に有意な増加が観察されたが、より低い濃度の BNT162b2 では、すべての時点で LINE-1 発現に減少が観察された (図 3)。

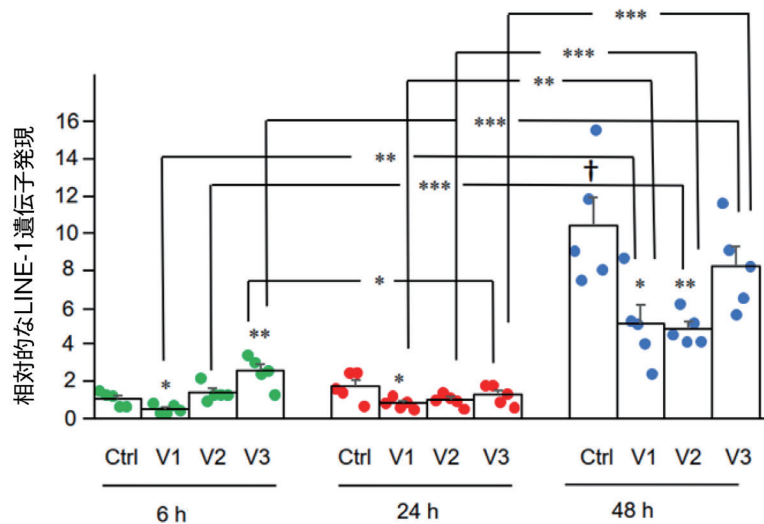


図 3. BNT162b2 で処理した Huh7 細胞における LINE-1 mRNA のレベル。Huh7 細胞を、BNT162b2 を添加しない状態 (Ctrl)、また BNT162b2 を添加した状態 (0.5 μ g/mL (V1)、1 μ g/mL (V2)、2 μ g/mL (V3)) で、6 時間 (緑点)、24 時間 (オレンジ点)、48 時間 (青点) 培養した。RNA を精製し、LINE-1 をターゲットとしたプライマーを用いて qPCR を実施した。LINE-1 の RNA レベルは、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH および ACTB に対し $2^{-\Delta\Delta CT}$ 値として示す。結果は、5 つの独立した実験から得たものである (n = 5)。各グループ間の差は、スチューデントの両側 t-検定を用いて分析した。データを、平均 $\pm$ SEM として表す。(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. 各時点におけるそれぞれのコントロール、或いは記載の通り; † p < 0.05 vs. 6 h-Ctrl)

次に、BNT162b2 が LINE-1 タンパク質のレベルに及ぼす影響を検討した。LINE-1 の全長は、5' 非翻訳領域 (UTR)、オープンリーディングフレーム (ORF) 1 および ORF2 からなる 2 つの ORF、並びに 3' UTR から構成される。このうち、ORF1 は、シャペロン活性を有する

RNA結合タンパク質である。LINE-1のレトロトランスポジション活性はORF1の核内移行に関与しているとの知見がある[35]。BNT162b2 (0.5、1.0、2.0 μ g/mL)を添加した状態および添加していない状態で6時間処理したHuh7細胞を固定し、LINE-1 ORF1pに結合する抗体、および細胞核を可視化するためのDNA特異的プローブHoechstで染色した(図4a)。免疫蛍光染色強度を定量化した結果、検討した全濃度において、BNT162b2が細胞全体の領域および核の双方でLINE-1 ORF1pタンパク質のレベルを増加させたことが示された(図4b-d)。

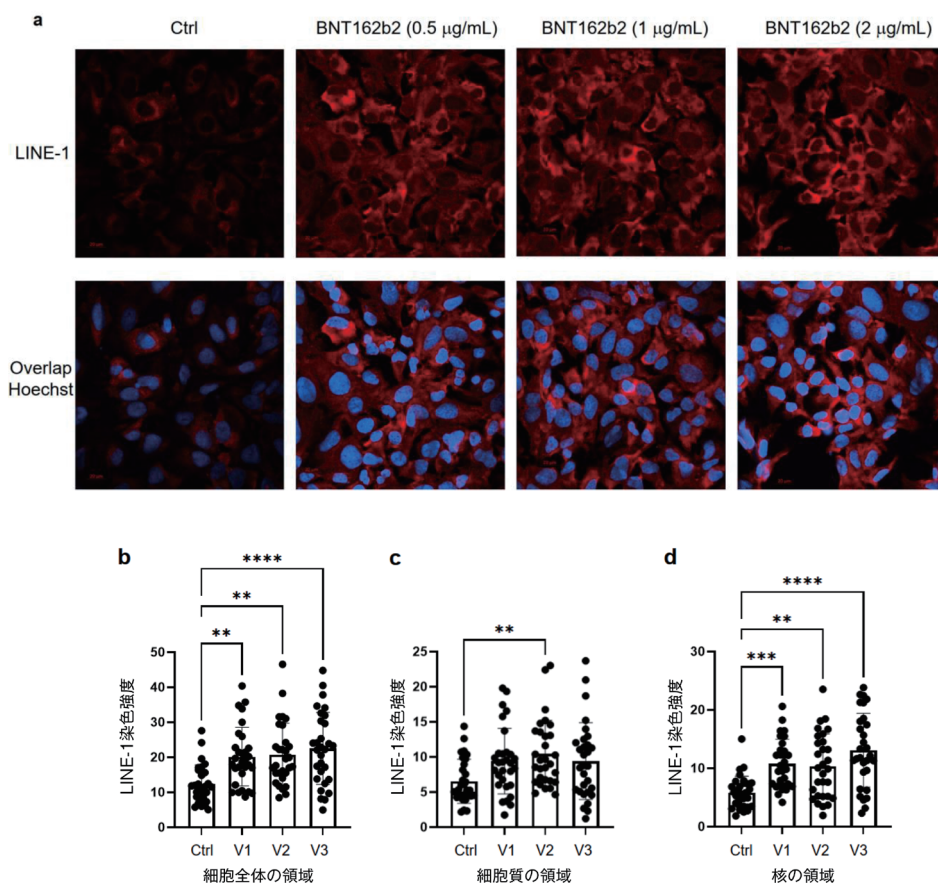


図4. LINE-1 タンパク質の分布を示す、BNT162b2 で処理した Huh7 細胞の免疫組織染色。BNT162b2 (0.5、1.0、2.0 μ g/mL) を添加した状態および添加していない状態で Huh7 細胞を 6 時間処理した。細胞を固定し、LINE-1 ORF1p に結合する抗体 (赤色) および細胞核を可視化するための DNA 特異的プローブ Hoechst (青色) で染色した。(a) は、BNT162b2 を添加した状態および添加していない状態で処理した Huh7 細胞における LINE-1 発現を示す代表的な画像である。(b-d) は、細胞全体の領域 (b)、細胞質 (c)、および核 (d) における LINE-1 タンパク質を定量化した結果を示す。すべてのデータは、One-Way ANOVA を用いて分析し、グラフは、GraphPad Prism V 9.2 を用いて作成した。すべてのデータを平均値 $\pm$ SD で示す (** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 (記載の通り))

3-3. Huh7 細胞における逆転写 BNT162b2 DNA の検出

LINE-1タンパク質の核内への侵入がレトロトランスポジションと関連していることを示す過去の研究がある[35]。上記の免疫蛍光染色実験では、最低濃度(0.5 μ g/mL)のBNT162b2により、既に、核内でのLINE-1レベルの増加が観察された。LINE-1の増加とともにBNT162b2がDNAに逆転写するか否かを調べるため、0.5 μ g/mLのBNT162b2で6、24、48時間処理したHuh7細胞からゲノムDNAを精製した。精製したDNAをRNaseで処理してRNAを除去し、BNT162b2をターゲットとするプライマーを用いてPCRを行った(図1)。その後、増幅されたDNA断片を電気泳動により可視化し、ゲル精製を行った(図5)。3つの時点(6h、24h、48h)のいずれにおいても、BNT162b2のDNAアンプリコンが検出された。これらのDNAアンプリコンが、プライマーに挟まれたBNT162b2の配列と同一であることを、サンガーシーケンスにより確認した(表2)。また、これらのDNAアンプリコンがBNT162b2のRNAではなくDNAに由来することを確認するため、RNase処理を行った状態と行わなかった状態(図5のCtrl5、Ctrl6)において、0.5 μ g/mLのBNT162b2で6時間処理したHuh7細胞から精製したRNAに対しPCRを行った。その結果、PCRを行ったRNA試料からアンプリコンは検出されなかった。

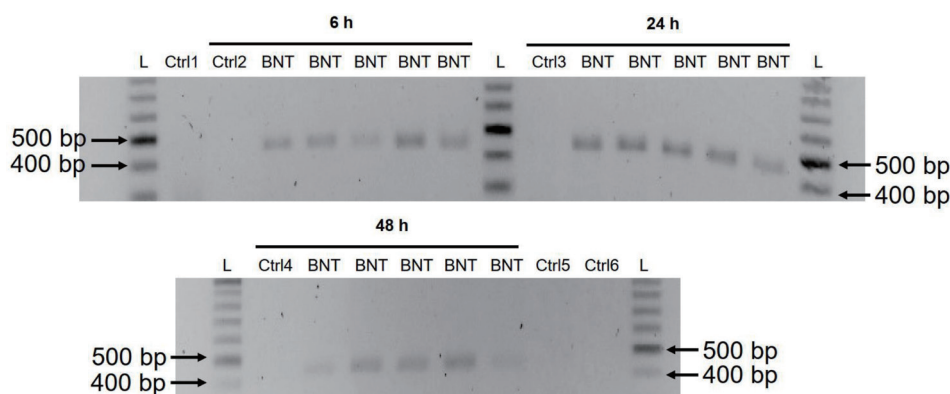


図 5. BNT162b2 で処理した Huh7 細胞における、BNT162b2 DNA アンプリコンの検出。Huh7 細胞は、BNT162b2 を添加していない状態 (Ctrl) および添加した状態 (0.5 μ g/mL) で 6、24、48 時間処理した。ゲノム DNA は、精製し、100 μ g/mL の RNase で分解した。図 1 および表 1 に示すように、BNT162b2 をターゲットとするプライマーを用いて、すべてのサンプルに対し PCR を行った。DNA アンプリコン (444 bps) をアガロースゲルで可視化した。BNT : BNT162b2。L : DNA ladder。Ctrl1 : 培養 Huh7 細胞。Ctrl2 : BNT162b2 で処理せず 6h の時点で回収した Huh7 細胞。Ctrl3 : BNT162b2 で処理せず 24h の時点で回収した Huh7 細胞。Ctrl4 : BNT162b2 で処理せず 48h の時点で回収した Huh7 細胞。Ctrl5 : 0.5 μ g/mL の BNT162b2 で 6 時間処理した Huh7 細胞の RNA。Ctrl6 : 0.5 μ g/mL の BNT162b2 で 6 時間処理し、RNase で分解した Huh7 細胞の RNA。

表 2. BNT162b2 アンプリコンに対しサンガーシーケンシングを行った結果。

```
CGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGGAAGT
ACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTG
CCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGG
GCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGA
AGGGCGTGAAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTA
GCTGCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGC
TCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCAGACACCTCCCAAGCACGC AGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTA
```

4. 考 察

本研究は、COVID-19 mRNA ワクチン BNT162b2 が *in vitro* でヒト肝細胞株 Huh7 に侵入し得るとのエビデンスを示した。Huh7 に BNT162b2 が添加された後 6 時間という速さで、BNT162b2 の mRNA は細胞内で DNA に逆転写される。逆転写が起こりうるメカニズムの一つとして、内在性逆転写酵素 LINE-1 を介しての逆転写がある。そして、BNT162b2 は、核内における LINE-1 タンパク質の分布を増加させる。

in vivo における肝細胞内での LNP の蓄積が報告されている [36]。BNT162b2 がヒト細胞株 HEK293T 細胞に侵入することにより BNT162b2 抗原が強く発現することを示す、BNT162b2 に関する前臨床研究がある [37]。これに鑑み、本研究では、BNT162b2 のヒト肝細胞株 Huh7 細胞への進入を先ず検討した。本研究で用いた BNT162b2 の濃度をどのように選択したかについて、説明する。BNT162b2 は 3 週間の間隔を置いて 2 回連続投与され、各投与は 0.3 mL に 30 μ g の BNT162b2 を含む。よって、注射部位での局所濃度は最高で 100 μ g/mL となる [31]。同様の LNP 配送システムを用いた、インフルエンザウイルス H10N8、H7N9 に対する mRNA ワクチンの過去の研究によれば、mRNA ワクチンは、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺、脳などのいくつかの臓器に非特異的に分布する傾向があり、肝臓での濃度は筋肉内注射部位での濃度よりも約 100 倍低い [38]。ファイザー社が EMA に提出した BNT162b2 の評価報告書によれば、ラットの薬物動態学的分布試験において、投与量全体のうち、比較的大きな割合 (最大 18%) の分布が肝臓にみられた [26]。そこで、肝細胞に関する本実験では、0.5、1、2 μ g/mL のワクチン濃度を使用することにした。ただし、今後の研究において、濃度の範囲を広げ、より低濃度あるいは高濃度の BNT162b2 の影響についても検証する必要がある。

本研究においては、ヒト肝細胞株を用いて *in vitro* の調査を行った。ワクチン由来の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が肝細胞にも発現するか否かは、検証に値する。発現が見られる場合、以前に抗原刺激を受けてスパイクタンパク質に反応するようになった細胞傷害性 T 細胞が、肝細胞をターゲットとする可能性がある。BNT162b2 の接種後に自己免疫性肝炎を発症した人の症例報告がある [39]。BNT162b2 が肝機能に及ぼし得る影響をより明確に把握するため、今後 *in vivo* モデルを用いた研究が望まれる。

BNT162b2 の毒性報告書には、遺伝毒性や発がん性に関する検討が含まれていない [26]。本研究により、BNT162b2 が肝細胞株 Huh7

においてDNAに逆転写され得ることが示された。これによれば、BNT162b2由来のDNAが宿主ゲノムにインテグレートされゲノムDNAに損傷を与えるのではないかと、との懸念が生じる。ゲノムDNAに傷がつけば、遺伝毒性の副作用が生じる可能性がある。BNT162b2から逆転写されたDNAが細胞ゲノムにインテグレートされるか否かは、現段階では定かでない。BNT162b2がゲノムに損傷を与えるか否かを検証するためには、BNT162b2が添加された細胞の全ゲノム解析や、BNT162b2の接種を受けた被験者の組織の全ゲノム解析など、さらなる研究が必要である。

ヒトの自律性レトロトランスポゾンであるLINE-1は、細胞内の内在性逆転写酵素であって、ヒトに現存する唯一の活性型トランスポゾンである。LINE-1には、自身や他の非自律性要素を逆転写させる能力があり[40,41]、ヒトゲノムの約17%はLINE-1配列で構成されている[42]。非自律性のAlu要素、short, interspersed nucleotide elements (SINEs)、variable-number-of-tandem-repeats (VNTR)、或いは細胞型のmRNAプロセス型偽遺伝子は、トランスに機能するLINE-1のレトロトランスポジション・タンパクによって逆転写される[43, 44]。最近の研究によれば、内在性のLINE-1は、SARS-CoV-2配列の逆転写およびヒト感染細胞のゲノムへのインテグレーションを媒介する[25]。また、SARS-CoV-2感染といったウイルス感染の際、内因性LINE-1の発現の増加が観察されることが少なくない[45-47]。過去の研究によれば、LINE-1のレトロトランスポジション能は、RNA代謝[48,49]、DNA損傷応答[50]、オートファジー[51]によって制御される。LINE-1の効率的なレトロトランスポジションは、細胞周期あるいは有糸分裂時の核膜崩壊や[52, 53]、外来レトロウイルス[54, 55]としばしば関連し、これによりLINE-1の核への侵入が促進される。本研究においては、試験を行ったすべての濃度(0.5、1、2 $\mu\text{g/mL}$)について、BNT162b2による核内でのLINE-1 ORF1p分布の増加が確認され(分布の増加は免疫組織染色により特定した)、一方、LINE-1遺伝子の発現の上昇は、最高濃度(2 $\mu\text{g/mL}$)によってのみ検出された。なお、遺伝子の転写はクロマチン修飾、転写因子制御、およびRNA分解の速度によって制御され、一方、タンパク質の翻訳制御には、開始コドン上でのリボソームリクルート、ペプチド伸長の調節、タンパク質合成の終了、或いはリボソームの生合成が関与する。これらの2つのプロセスは異なるメカニズムにより制御されているため、外部からの影響に対し常に同じ変化のパターンを示すとは限らない。BNT162b2に対するLINE-1活性の制御の詳細については、さらなる研究が望まれる。

本研究で使用した細胞モデルは、DNA複製が活発な癌細胞株であり、非分裂性の体細胞とは異なる。また、RNA代謝に関与するタンパク質の上方制御など、Huh7細胞は、通常の細胞とは大きく異なる遺伝子やタンパク質の発現を示すとの報告もある[56]。一方、活発な細胞増殖は、骨髄や上皮基底層などのヒトの組織や、胚発生期にも見られるため、そのような条件においてBNT162b2がゲノムに損傷を与えないかを調べる必要がある。また、ヒトのニューロンのような、分裂が起きていない終末分化細胞においても、LINE-1のレトロトランスポジションが高い効能を示すことが報告されている[57,58]。

EMAによるファイザー評価レポートでは、BNT162b2の脾臓(1.1%未満)および副腎(0.1%未満)への分布が示され、低値ではあるが測定可能なレベルの放射線活性により、卵巣や精巣(0.1%未満)への分布も示された[26]。なお、EMAによるファイザー評価レポートでは、BNT162b2の胎盤への移行に関するデータが得られていない。本研究の結果によれば、BNT162b2のmRNAは、注射部位濃度の0.5%に相当する濃度(0.5 $\mu\text{g/mL}$)で容易にHuh7細胞に侵入し、LINE-1の遺伝子およびタンパク質の発現に変化を誘導し、6時間以内にBNT162b2の逆転写が検出された。したがって、他の種類の細胞や組織に対するBNT162b2の影響についても、in vitroおよびin vivoの双方で更なる調査を行うことが重要である。

5. 結論

本研究は、COVID-19 mRNA ワクチンBNT162b2がヒト肝細胞株に与える影響に関する、初のin vitro研究である。本研究により、BNT162b2の細胞への急速な侵入、またそれに続くBNT162b2 mRNAのDNAへの細胞内逆転写に関するエビデンスが示された。

補足資料

下記サポート情報は以下からダウンロード可能: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb44030073/s1>.

著者による寄稿

M.A., F.O.F., D.Y., M.B., C.L.はin vitroの実験を実施した。M.A.とF.O.F.はデータ解析を行った。M.R.とY.D.M.は研究の実施に貢献し、研究を設計、監督した。Y.D.M.は全著者の意見に基づき論文を執筆した。すべての著者は、公開された原稿を読み同意している。

資金調達

この研究は、Swedish Research Council, Strategic Research Area Exodiab, Dnr 2009-1039, Swedish Government Fund for Clinical Research (ALF)およびSkåne University Hospital財団の支援を受けた。

治験審査委員会によるステートメント: 該当事項なし。

インフォームド・コンセントに関するステートメント: 該当事項なし。

データ利用可能性ステートメント：本研究の発見を裏付けるすべてのデータは、論文およびサポート情報において公開されている。

謝辞

本研究のサポートに関し、Sven Haidl, Maria Josephson, Enming Zhang, Jia-Yi Li, Caroline Haikal, Pradeep Bompadaに感謝する。

利益相反

本稿に関し著者に利益相反関係はない。

参考文献

1. World Health Organization. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 22 February 2022).
2. Mulligan, M.J.; Lyke, K.E.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Raabe, V.; Bailey, R.; Swanson, K.A.; et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 2020, 586, 589–593. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Walsh, E.E.; Frenck, R.W., Jr.; Falsey, A.R.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Mulligan, M.J.; Bailey, R.; et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based COVID-19 Vaccine Candidates. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 2439–2450. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Perez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 2603–2615. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Harris, R.J.; Hall, J.A.; Zaidi, A.; Andrews, N.J.; Dunbar, J.K.; Dabrera, G. Effect of Vaccination on Household Transmission of SARS-CoV-2 in England. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 759–760. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Butt, A.A.; Omer, S.B.; Yan, P.; Shaikh, O.S.; Mayr, F.B. SARS-CoV-2 Vaccine Effectiveness in a High-Risk National Population in a Real-World Setting. *Ann. Intern. Med.* 2021, 174, 1404–1408. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Dagan, N.; Barda, N.; Kepten, E.; Miron, O.; Perchik, S.; Katz, M.A.; Hernan, M.A.; Lipsitch, M.; Reis, B.; Balicer, R.D. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 1412–1423. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Rossman, H.; Shilo, S.; Meir, T.; Gorfine, M.; Shalit, U.; Segal, E. COVID-19 dynamics after a national immunization program in Israel. *Nat. Med.* 2021, 27, 1055–1061. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Fan, B.E.; Shen, J.Y.; Lim, X.R.; Tu, T.M.; Chang, C.C.R.; Khin, H.S.W.; Koh, J.S.; Rao, J.P.; Lau, S.L.; Tan, G.B.; et al. Cerebral venous thrombosis post BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccination: A black swan event. *Am. J. Hematol.* 2021, 96, E357–E361. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Larson, K.F.; Ammirati, E.; Adler, E.D.; Cooper, L.T., Jr.; Hong, K.N.; Saponara, G.; Couri, D.; Cereda, A.; Procopio, A.; Cavalotti, C.; et al. Myocarditis After BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccination. *Circulation* 2021, 144, 506–508. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Menni, C.; Klaser, K.; May, A.; Polidori, L.; Capdevila, J.; Louca, P.; Sudre, C.H.; Nguyen, L.H.; Drew, D.A.; Merino, J.; et al. Vaccine side-effects and SARS-CoV-2 infection after vaccination in users of the COVID Symptom Study app in the UK: A prospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* 2021, 21, 939–949. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Hansen, T.; Titze, U.; Kulamadayil-Heidenreich, N.S.A.; Glombitza, S.; Tebbe, J.J.; Rocken, C.; Schulz, B.; Weise, M.; Wilkens, L. First case of postmortem study in a patient vaccinated against SARS-CoV-2. *Int. J. Infect. Dis.* 2021, 107, 172–175. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kadali, R.A.K.; Janagama, R.; Peruru, S.; Malayala, S.V. Side effects of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: A randomized, cross-sectional study with detailed self-reported symptoms from healthcare workers. *Int. J. Infect. Dis.* 2021, 106, 376–381. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Parkash, O.; Sharko, A.; Farooqi, A.; Ying, G.W.; Sura, P. Acute Pancreatitis: A Possible Side Effect of COVID-19 Vaccine. *Cureus* 2021, 13, e14741. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mazzatenta, C.; Piccolo, V.; Pace, G.; Romano, I.; Argenziano, G.; Bassi, A. Purpuric lesions on the eyelids developed after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: Another piece of SARS-CoV-2 skin puzzle? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2021, 35, e543–e545. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Lee, E.J.; Cines, D.B.; Gernsheimer, T.; Kessler, C.; Michel, M.; Tarantino, M.D.; Semple, J.W.; Arnold, D.M.; Godeau, B.; Lambert, M.P.; et al. Thrombocytopenia following Pfizer and Moderna SARS-CoV-2 vaccination. *Am. J. Hematol.* 2021, 96, 534–537. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Ishay, Y.; Kenig, A.; Tsemach-Toren, T.; Amer, R.; Rubin, L.; HersHKovitz, Y.; Kharouf, F. Autoimmune phenomena following SARS-CoV-2 vaccination. *Int. Immunopharmacol.* 2021, 99, 107970. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Das, B.B.; Kohli, U.; Ramachandran, P.; Nguyen, H.H.; Greil, G.; Hussain, T.; Tandon, A.; Kane, C.; Avula, S.; Duru, C.; et al. Myopericarditis following mRNA COVID-19 Vaccination in Adolescents 12 through 18 Years of Age. *J. Pediatr.* 2021, 238, 26–32.e1. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. McLaurin-Jiang, S.; Garner, C.D.; Krutsch, K.; Hale, T.W. Maternal and Child Symptoms Following COVID-19 Vaccination Among Breastfeeding Mothers. *Breastfeed. Med.* 2021, 16, 702–709. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Barda, N.; Dagan, N.; Ben-Shlomo, Y.; Kepten, E.; Waxman, J.; Ohana, R.; Hernan, M.A.; Lipsitch, M.; Kohane, I.; Netzer, D.; et al. Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 1078–1090. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 403–416. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

22. Sadoff, J.; Gray, G.; Vandebosch, A.; Cardenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, P.A.; Truyers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021, *384*, 2187–2201. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eichinger, S.; Warkentin, T.E.; Greinacher, A. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. Reply. *N. Engl. J. Med.* 2021, *385*, e11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Doroftei, B.; Ciobica, A.; Ilie, O.D.; Maftei, R.; Ilea, C. Mini-Review Discussing the Reliability and Efficiency of COVID-19 Vaccines. *Diagnostics* 2021, *11*, 579. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Zhang, L.; Richards, A.; Barrasa, M.I.; Hughes, S.H.; Young, R.A.; Jaenisch, R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2021, *118*, e2105968118. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 24 February 2022).
27. Tanaka, H.; Takata, N.; Sakurai, Y.; Yoshida, T.; Inoue, T.; Tamagawa, S.; Nakai, Y.; Tange, K.; Yoshioka, H.; Maeki, M.; et al. Delivery of Oligonucleotides Using a Self-Degradable Lipid-Like Material. *Pharmaceutics* 2021, *13*, 544. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Sedic, M.; Senn, J.J.; Lynn, A.; Laska, M.; Smith, M.; Platz, S.J.; Bolen, J.; Hoge, S.; Bulychev, A.; Jacquinet, E.; et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet. Pathol.* 2018, *55*, 341–354. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Sato, Y.; Matsui, H.; Yamamoto, N.; Sato, R.; Munakata, T.; Kohara, M.; Harashima, H. Highly specific delivery of siRNA to hepatocytes circumvents endothelial cell-mediated lipid nanoparticle-associated toxicity leading to the safe and efficacious decrease in the hepatitis B virus. *J. Control. Release* 2017, *266*, 216–225. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Heidel, J.D.; Yu, Z.; Liu, J.Y.; Rele, S.M.; Liang, Y.; Zeidan, R.K.; Kornbrust, D.J.; Davis, M.E. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, *104*, 5715–5721. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Available online: <https://www.cvdvaccine-us.com/> (accessed on 24 February 2022).
32. Available online: [http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_\(for_Genotyping\)](http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_(for_Genotyping)) (accessed on 24 February 2022).
33. Gallud, A.; Munson, M.J.; Liu, K.; Idstrom, A.; Barriga, H.M.; Tabaei, S.; Aliakbarinodehi, N.; Ojansivu, M.; Lubart, Q.; Douth, J.J.; et al. Time evolution of PEG-shedding and serum protein coronation determines the cell uptake kinetics and delivery of lipid nanoparticle. *bioRxiv* 2021. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. World Health Organization Messenger RNA Encoding the Full-Length SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. 2020. Available online: <https://web.archive.org/web/20210105162941/https://mednet-communities.net/inn/db/media/docs/11889.doc> (accessed on 24 February 2022).
35. Mita, P.; Wudzinska, A.; Sun, X.; Andrade, J.; Nayak, S.; Kahler, D.J.; Badri, S.; LaCava, J.; Ueberheide, B.; Yun, C.Y.; et al. LINE-1 protein localization and functional dynamics during the cell cycle. *Elife* 2018, *7*, e30058. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Sato, Y.; Kinami, Y.; Hashiba, K.; Harashima, H. Different kinetics for the hepatic uptake of lipid nanoparticles between the apolipoprotein E/low density lipoprotein receptor and the N-acetyl-d-galactosamine/asialoglycoprotein receptor pathway. *J. Control. Release* 2020, *322*, 217–226. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Vogel, A.B.; Kanevsky, I.; Che, Y.; Swanson, K.A.; Muik, A.; Vormehr, M.; Kranz, L.M.; Walzer, K.C.; Hein, S.; Guler, A.; et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature* 2021, *592*, 283–289. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bahl, K.; Senn, J.J.; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, L.A.; Hassett, K.J.; Laska, M.E.; Smith, M.; Almarsson, O.; Thompson, J.; et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol. Ther.* 2017, *25*, 1316–1327. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bril, F.; Al Diffalha, S.; Dean, M.; Fettig, D.M. Autoimmune hepatitis developing after coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine: Causality or casualty? *J. Hepatol.* 2021, *75*, 222–224. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Kazazian, H.H., Jr.; Moran, J.V. Mobile DNA in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 2017, *377*, 361–370. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Coffin, J.M.; Fan, H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu. Rev. Virol.* 2016, *3*, 29–51. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, *409*, 860–921. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Ostertag, E.M.; Goodier, J.L.; Zhang, Y.; Kazazian, H.H., Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, *73*, 1444–1451. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Hanks, D.C.; Kazazian, H.H., Jr. Active human retrotransposons: Variation and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012, *22*, 191–203. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Jones, R.B.; Song, H.; Xu, Y.; Garrison, K.E.; Buzdin, A.A.; Anwar, N.; Hunter, D.V.; Mujib, S.; Mihajlovic, V.; Martin, E.; et al. LINE-1 retrotransposable element DNA accumulates in HIV-1-infected cells. *J. Virol.* 2013, *87*, 13307–13320. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Macchietto, M.G.; Langlois, R.A.; Shen, S.S. Virus-induced transposable element expression up-regulation in human and mouse host cells. *Life*

- Sci. Alliance* 2020, 3, e201900536. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yin, Y.; Liu, X.Z.; He, X.; Zhou, L.Q. Exogenous Coronavirus Interacts With Endogenous Retrotransposon in Human Cells. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2021, 11, 609160. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Belancio, V.P.; Roy-Engel, A.M.; Deininger, P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene* 2008, 411, 38–45. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Dai, L.; Taylor, M.S.; O'Donnell, K.A.; Boeke, J.D. Poly(A) binding protein C1 is essential for efficient L1 retrotransposition and affects L1 RNP formation. *Mol. Cell Biol.* 2012, 32, 4323–4336. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Servant, G.; Strevia, V.A.; Derbes, R.S.; Wijetunge, M.I.; Neeland, M.; White, T.B.; Belancio, V.P.; Roy-Engel, A.M.; Deininger, P.L. The Nucleotide Excision Repair Pathway Limits L1 Retrotransposition. *Genetics* 2017, 205, 139–153. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Guo, H.; Chitiprolu, M.; Gagnon, D.; Meng, L.; Perez-Iratxeta, C.; Lagace, D.; Gibbings, D. Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat. Commun.* 2014, 5, 5276. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Xie, Y.; Mates, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Martin, S.L.; An, W. Cell division promotes efficient retrotransposition in a stable L1 reporter cell line. *Mob. DNA* 2013, 4, 10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Shi, X.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Mol. Cell Biol.* 2007, 27, 1264–1270. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Goff, S.P. Host factors exploited by retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 253–263. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
55. Suzuki, Y.; Craigie, R. The road to chromatin—Nuclear entry of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 187–196. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Shi, J.; Wang, X.; Lyu, L.; Jiang, H.; Zhu, H.J. Comparison of protein expression between human livers and the hepatic cell lines HepG2, Hep3B, and Huh7 using SWATH and MRM-HR proteomics: Focusing on drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2018, 33, 133–140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kubo, S.; Seleme, M.C.; Soifer, H.S.; Perez, J.L.; Moran, J.V.; Kazazian, H.H., Jr.; Kasahara, N. L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 8036–8041. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Macia, A.; Widmann, T.J.; Heras, S.R.; Ayllon, V.; Sanchez, L.; Benkaddour-Boumzaouad, M.; Munoz-Lopez, M.; Rubio, A.; Amador-Cubero, S.; Blanco-Jimenez, E.; et al. Engineered LINE-1 retrotransposition in nondividing human neurons. *Genome Res.* 2017, 27, 335–348. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

