

ウイルス粒子が構築される「場」を提供する、②ウイルス粒子に感染に必要な「付加的要因」を賦与する、③形成された感染性ウイルスに対して細胞内の運搬の役割を果たす、などが考えられる。これらの可能性の中で、①については、油滴の周りにウイルス様粒子が電顕的に観察されるので、粒子形成に油滴とその周辺環境が重要な働きをしている可能性がある。しかし、図5のモデルに示したように、筆者らは非感染性ウイルス粒子は油滴周辺以外からも放出されると考えているので、粒子形成自身には油滴が必須ではない可能性を考えている。②については、感染性粒子の浮遊密度は非感染性粒子に比べ0.03 小さいので、油滴の周りから産生される粒子は、何か油性に富む成分を取り込んでいる可能性が考えられよう。もちろん、ウイルス粒子中のタンパク質と核酸の含有割合に差があり、それが浮遊密度の違いに反映されている可能性も考えられる。あるいは、感染性粒子のパッケージング状態が非感染性粒子に比べ緩いために、浮遊密度が小さくなる可能性も考えられる。③の可能性については、油滴がマイクロチューブルと会合し細胞質内でダイナミックな運動をすることが知られているので、ウイルス粒子の輸送に油滴が積極的に関与している可能性は十分考えられるが、その詳細は不明である。

感染性 HCV が産生されるモデル

患者血流中の HCV を密度勾配遠心により解析すると、密度が異なるヘテロな集団として観察される。その原因としてはウイルスを構成するタンパク質あるいは核酸の組成の違いも考えられるが、むしろリポタンパク質やその他の血液成分と HCV が会合するためだろうと考

えられる。事実、HCV が VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein) などのリポタンパク質と会合して複合体として血流中に存在することが知られている。そのほかにも、ウイルス自身の抗体、リウマチ因子あるいは異常血漿タンパク質などと会合した粒子の存在が示されている。これらの血液成分との会合が HCV の複製サイクルにとってどれほど意味があるかについては、解明されなければならない点が多いが、最近になり VLDL との会合はウイルス粒子産生において粒子の分泌や感染性の賦与などに重要な働きをもつことが示されている⁽¹²⁻¹⁴⁾。

VLDL は脂質として主にトリグリセリドを脂質構成成分とし、それがアポリポタンパク質 A および B (ApoA, ApoB) に保持された形で存在する。VLDL の合成は、MTP (microsomal triglyceride transfer protein) により油滴からトリグリセリドが取り出され、小胞体ルーメン内で ApoB と会合し、まず VLDL 前駆体が形成される。その後、さらにトリグリセリドが追加され、同時に ApoE も取り込まれて成熟した VLDL がつくられる。HCV を産生する細胞では、この VLDL が同じく小胞体ルーメン内に存在する HCV と会合して細胞の外に放出されると考えられる。VLDL 合成に重要な MTP の阻害剤で HCV 感染細胞を処理すると感染性ウイルス粒子の産生が見られなくなることから、VLDL 産生が HCV の産生に重要であることが示された⁽¹³⁾。

油滴と小胞体膜との会合が感染性ウイルス粒子に重要であるという筆者らの観察結果を VLDL 産生と結びつけてみると、図6に示すモデルが考えられる。油滴が小胞体と会合することにより VLDL の産生の効率が増え

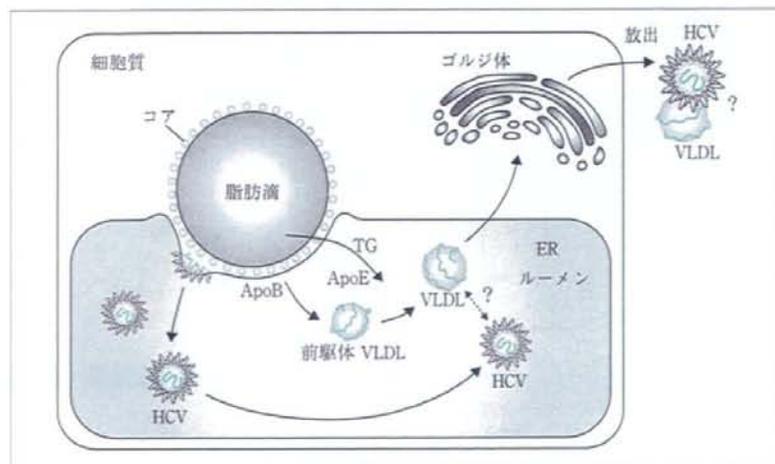


図6 ■ 感染性ウイルス粒子産生における油滴の役割 (モデル)
脂肪滴 (油滴) と接触している小胞体ルーメン内では VLDL が産生されやすくなっていると考えられる。前駆体 VLDL あるいは VLDL が小胞体内に出芽した HCV 粒子と会合して、複合状態で細胞の外に産生されると考えられる。

ると考えられる。おそらく油滴と会合している小胞体ルーメン内では、局所的にVLDLの密度が高くなっており、HCVとVLDLが出会う機会が増え、その結果LDL-HCV複合体を形成して細胞の外に放出されると考えられる。

HCVの感染はLDL受容体(LDLR)を介して行なわれるという報告がある⁽¹⁵⁾。LDL-HCV複合体が細胞表面のLDLRと会合して感染が成立する機構は、少なくともHCV感染機構のひとつであると考えられる。

HCV感染細胞における細胞の代謝異常と肝疾患との関連

HCV感染と慢性肝炎および肝硬変・肝がんの発症の関係について、その分子基盤には不明な点が多い。慢性肝炎は肝細胞の持続的な破壊と再生の結果であると考えられている。持続的な破壊に中心的に働くのは免疫監視に働く細胞障害性T細胞であると考えられる。一方、HCV感染者にはインシュリン伝達シグナルが阻害される結果、糖尿病を合併したり、脂肪が異常に蓄積しその結果脂肪肝などを呈するなど、代謝異常がよく見られ、これらの異常が肝疾患を増悪させるともいわれている⁽¹⁶⁾。HCVは自らが増殖するために宿主の脂質代謝を活性化させるが、そのことが宿主に代謝異常をもたらす肝疾患を誘発していると考えられる。

抗HCV剤の創薬研究に向けて

C型慢性肝炎患者にインターフェロンとリビリンの併用療法を行なうと、約半数の患者からウイルスを除くことができる。ヒトにがんをひき起こすウイルスを効率よく排除するのは困難であるが、HCVは例外的であるといえる。ウイルスタンパク質の酵素活性を標的とした薬剤が開発されているので、近い将来その中から効果の高い薬が出てくることが期待される。一方、HCVは複製するとき変異しやすいことを考えると、ウイルスタンパク質を標的とした薬では耐性ウイルスの出現が危惧され、事実そのような報告が出ている。その点、ウイルス複製に必須の宿主因子を標的とした薬は、耐性の問題は克服できる可能性が高い。

おわりに

HCVは持続感染して数十年にわたり慢性肝炎をひき起こし、その後、肝硬変、肝がんを発症させる。感染および疾患の進行を予防することは大変重要である。その

ためにはウイルス複製の分子機構を解明して、そこから得られる知見を予防策の確立に生かしてゆくことが大切である。

本稿ではHCVの生活環の中でどのようにして感染性粒子が産生されるかについて特に脂肪滴との関連で述べた。ウイルスは細胞内を自分が複製しやすい環境に変化させる。自然免疫機構を変化させ宿主からの攻撃を防ぐ機構もそのひとつである。また、RNAウイルスの多くはゲノムの複製を宿主の膜環境を利用して行なう。HCVの場合も同様で、ウイルスタンパク質による自然免疫からの逃避機構や、本稿で触れたようにHCVゲノム複製複合体の存在を生化学的に示した。さらに、HCVが油滴を利用して感染性ウイルスを産生するという、これまで知られていなかった新しいウイルス産生の機構を明らかにした。今後、さらに詳細な複製機構を明らかにすることにより、ウイルスと宿主の相互作用が浮かび上がってくると同時に、これまで不明であった細胞の仕組みが明らかにされるものと期待される。また、効果的な抗ウイルス薬の開発にも貢献すると思う。

文献

- 1) L. Cocquerel, C. Voisset & J. Dubuisson: *J. Gen. Virol.*, **87**, 1075 (2006).
- 2) H. Aizaki, K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko & M. M. Lai: *Virology*, **324**, 450 (2004).
- 3) D. Moradpour, M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach & C. M. Rice: *J. Virol.*, **78**, 7400 (2004).
- 4) Y. Miyazaki, M. Hijikata, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Takahashi & K. Shimotohno: *J. Biol. Chem.*, **278**, 50301 (2003).
- 5) V. Lohman, F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilann & R. Bartenchager: *Science*, **285**, 110 (1999).
- 6) R. Gosert, D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenchager, H. E. Blum, K. Bienz & D. Moradpour: *J. Virol.*, **77**, 5487 (2003).
- 7) D. Egger, B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour & K. Bienz: *J. Virol.*, **76**, 5974 (2002).
- 8) Y. Miyazaki, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenchager, T. Wakita, M. Hijikata & K. Shimotohno: *Nature Cell Biol.*, **9**, 1089 (2007).
- 9) G. Barba *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1200 (1997).
- 10) R. G. Hope & J. McLauchlan: *J. Gen. Virol.*, **81**, 1913 (2000).
- 11) T. Wakita *et al.*: *Nature Med.*, **11**, 791 (2005).
- 12) S. U. Nielsen, M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumeekochchai & G. L. Toms: *J. Virol.*, **80**, 2418 (2006).
- 13) H. Huang, F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr. & J. Ye: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5848 (2007).
- 14) P. Gastaminza, G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao & F. V. Chisari: *J. Virol.*, **82**, 2120 (2008).
- 15) S. Molina *et al.*: *J. Hepatol.*, **46**, 411 (2007).
- 16) V. Agnello, G. Åbel, M. Elfahal, G. B. Knight & Q.-X. Zhang: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **196**, 12766 (1999).

3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養

土方 誠^{*1,*2} アリ・ハッサン・フセイン^{*1} 下遠野 邦 忠^{*3,*4}

索引用語：C型肝炎ウイルス，不死化肝細胞，感染，自然免疫，立体培養

1 はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年に輸血後非A非B型慢性肝炎の主要な原因ウイルスとして発見された。それまで長い間輸血後非A非B型慢性肝炎の原因ウイルスを同定する努力がなされてきていたが、従来の古典的なウイルス学的手法では実現されなかった。そこでこのウイルスは分子生物学的手法によつてまずそのゲノムRNAに対するcDNAがクローニングされ、疫学的な検証によって疾患の原因ウイルスであることが確認された。cDNAを発現させたウイルス抗原を用いることにより輸血用血液に存在するウイルスに対する抗体の検査が可能になり、輸血による感染予防が可能になった。しかしながら、現在世界人口の約3%にも及ぶ既感染者が存在すると推定されており、感染者は慢性肝炎から肝硬変そして肝癌へと進行する可能性が高いので大きな社会問題となっている。インター

フェロンとリバビリンを用いた最新の治療法はインターフェロンによる治療が開始された初期のころに比較して格段に治療効果があがっているものの、著効率は50%程度でしかないために、新たな抗HCV治療薬の開発が切望されている。抗HCV薬剤開発が期待されたほど進まなかった理由のひとつは培養細胞を用いた効率の高いHCV増殖系が存在しなかったため、ウイルス学的な研究が困難であったことにある。しかしながら、近年多くの研究者の努力によって効率の高いHCV増殖系の開発が進み、それまで得られなかったHCVの生活環に関する情報が得られ始めている。本稿では培養細胞を用いたHCV増殖系を概説し、われわれが新たに開発を進めている患者血液由来のHCVが感染増殖する細胞培養系について紹介する。

2 培養細胞を用いたHCVの増殖系

先に述べたように、HCVはウイルス遺伝

Makoto HIJIKATA et al: Proliferation of blood-borne HCV in the 3D cell culture system

*¹ 京都大学ウイルス研究所 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53]

*² 京都大学大学院生命科学研究科 *³ 慶応義塾大学医学部総合医科学研究センター

*⁴ 千葉工業大学附属研究所

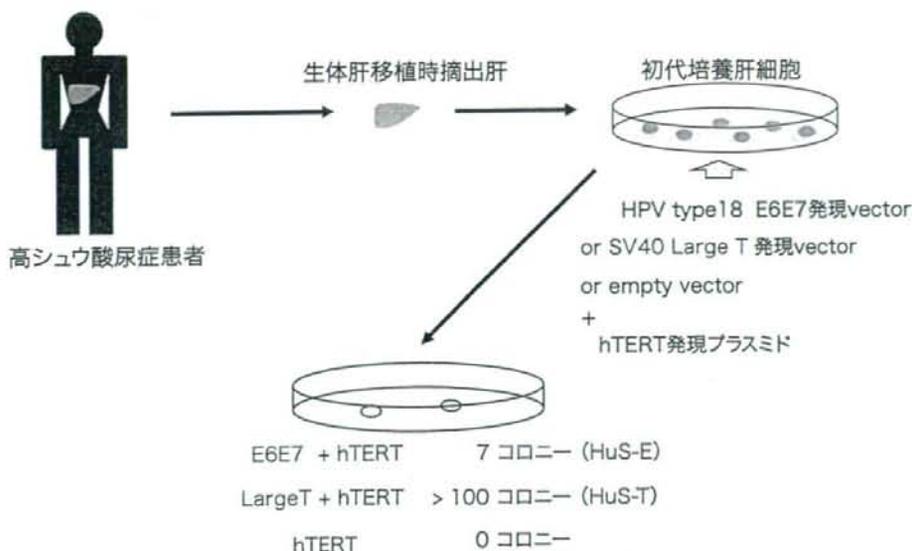


図1 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

生体肝移植患者からの摘出肝を用いて作成した初代培養肝細胞にヒトパピローマウイルス(HPV) E6E7 遺伝子あるいはシミアンウイルス 40 (SV40) T抗原遺伝子の発現ベクターをヒトテロメラーゼ(hTERT) 遺伝子発現ベクターと共に導入し、増殖しコロニーを形成する細胞株を得た。E6E7 あるいはSV40T 抗原導入によって得られた不死化細胞をそれぞれHuS-EそしてHuS-Tと命名した。

子のクローニングからみいだされたウイルスであったため、ウイルス学の研究に必須である培養細胞を用いた効率の良い感染増殖実験系が存在しなかった。多くの研究者によって培養細胞を用いたウイルス増殖系の樹立が試みられてきたが、最近になるまで効率の良い感染増殖系は得られなかった。しかし、1999年にドイツのグループによって培養細胞内で部分RNAゲノムが複製し、維持されるといういわゆる、レプリコン複製細胞実験系が開発されたことでウイルス増殖反応の一部であるRNAゲノム複製に関する実質的な研究が可能になった¹⁾。しかしながら、この実験系にゲノム長のRNAを用いた場合でも感染性の粒子産生がみられなかった。2005年に当時東京都神経科学総合研究所の脇田らによって、劇症肝炎患者由来の血液からクローン化されたHCV遺伝子(JFH-1)を用いて感染性組

換え体HCVの産生系が開発された²⁾。この実験系ではJFH-1ゲノムRNAを試験管内で合成し、これを肝癌由来細胞であるHuH-7細胞に導入することで、感染性を有するHCV粒子が産生されるというものである。この感染性粒子をHuH-7の亜株であるHuH-7.5細胞やHuH-7.5.1細胞に感染させると、これらの細胞への感染が認められる³⁾。この組換え体HCV産生系は感染と増殖、感染性粒子産生などの基礎研究に有用な実験系である。しかし、患者血液に由来するHCVを感染源として用いてHuH-7細胞に感染させても効率良く感染、複製することはなく、また感染性粒子の産生も認められない⁴⁾。

3 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

これまで患者血液に由来するHCVの感染増殖実験に用いられてきたのはヒト肝癌由来

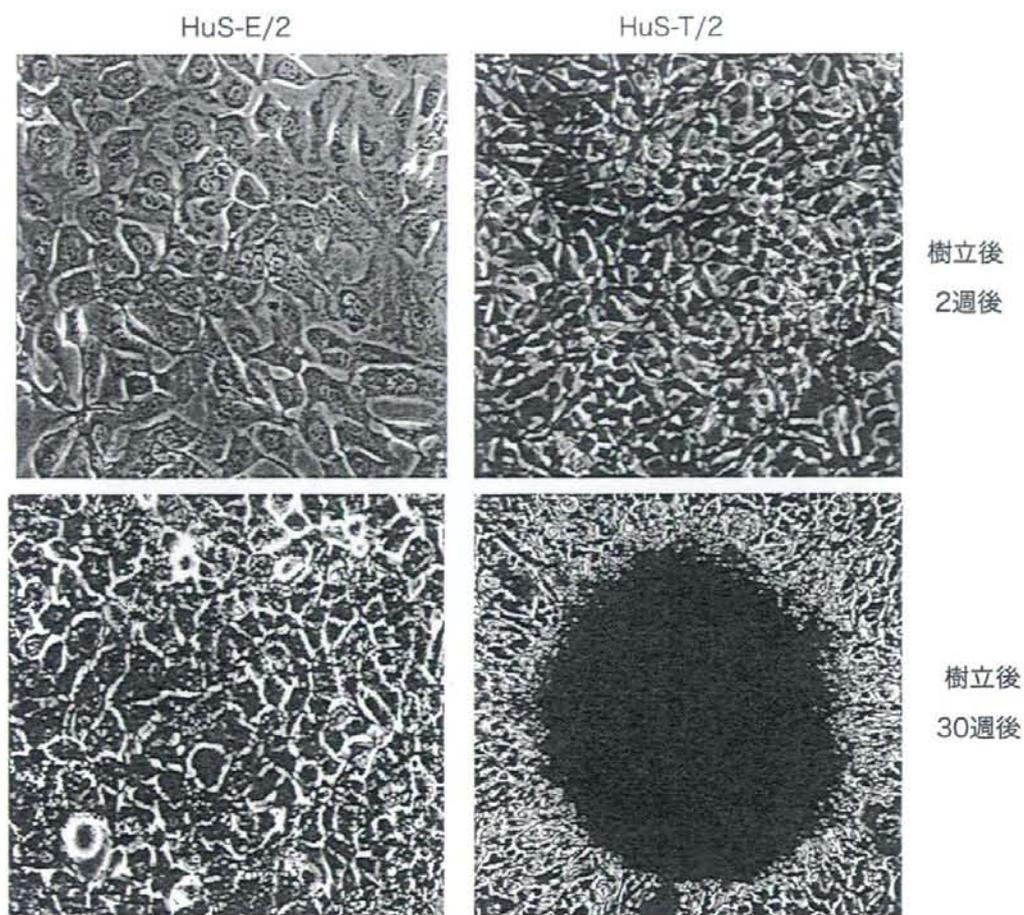


図2 新たなヒト不死化肝細胞の形態

細胞樹立2週後と30週後におけるHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した。HuS-T/2細胞は樹立後2週間で大きさが小型になり、30週後には細胞塊を形成することがわかる。HuS-E/2細胞はHuS-T/2細胞ほど大きな変化は認められない。

細胞あるいはヒト不死化肝細胞である。上記JFH-1の感染増殖実験にはこのような細胞が用いられている。日本に広く蔓延していて、感染後慢性化する確率が高く、またインターフェロン治療に抵抗性を示すことの多い遺伝子型1bに属するHCVはどのように肝細胞に感染し増殖するのか、また感染後に細胞内でどのようなウイルスと細胞の相互作用が起こるのか、上記組換え体HCVの実験系からは確実な情報を得ることはできない。そこで本

来HCVが感染し増殖する宿主細胞であるヒト肝細胞の性質をできるだけ維持しているヒト不死化肝細胞の作成を試みた。これまで多くのヒト不死化肝細胞株が樹立されているがそのほとんどはサルのウイルスであるシミアンウイルス40 (SV40)のT抗原を細胞の不死化させるために使用している。T抗原による細胞不死化機構についてはこれまでに良く研究されていて、癌抑制遺伝子であるretinoblastoma (RB) 遺伝子産物とp53 遺伝子産物

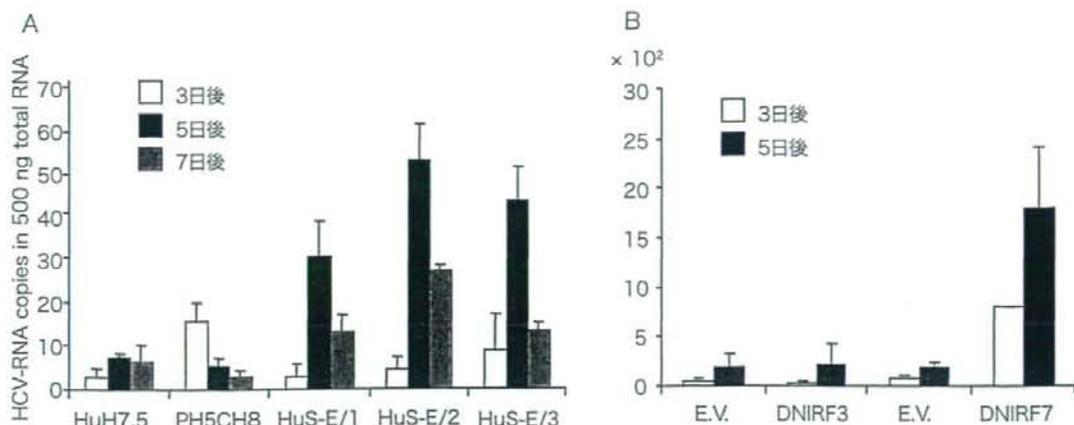


図3 HuS-E細胞の血清由来HCV (遺伝子型1b)の感染増殖性

HuS-E細胞の3種の細胞株と他の肝由来細胞PH5CH8細胞そしてHuH7.5細胞における血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。またHuS-E/2細胞にドミナントネガティブ変異体IRF3(DNIRF3)あるいはIRF7 (DNIRF7)発現プラスミドを導入したものにおける血清由来HCVの感染増殖性を比較した(B)。E.V.は空の発現ベクター導入細胞を示す。感染実験は細胞数 1×10^6 に対してHCVゲノムRNAコピー数が 1×10^5 コピー含む量の血清を培地に加えて行った。血清添加後、細胞を良く洗浄し、経時的に細胞から全RNAを単離し、HCV-RNAをリアルタイムRT-PCR法で定量した。

の機能抑制を引き起こすことが知られている。ただ染色体への結合による染色体不安定化の機能も報告されていることからこのT抗原によって不死化された細胞はその形質が不安定になる可能性が考えられた。そこでわれわれはT抗原の代わりにヒトパピローマウイルスのE6E7遺伝子をヒト肝細胞の不死化のために用いることにした。このE6E7遺伝子はT抗原同様にそれぞれp53とRBの機能を抑制するが、各種組織由来の細胞で比較的良く元の組織の形質を保存したまま不死化することが可能であると報告されていたからである^{5,6)}。そこでまず京都大学医学部付属病院の移植外科との共同研究を行い、生体肝移植患者からの摘出肝から初代培養肝細胞を得て、これにE6E7発現プラスミドならびにヒトテロメラーゼ遺伝子発現プラスミドを導入し、その不死化を試みた⁴⁾。図1に示すよう

に同時T抗原発現ベクターを用いた不死化実験も同時に行ったが、得られた不死化細胞のコロニー数はT抗原の100コロニー以上に比べて、E6E7では7コロニーとその効率は著しく低かった。しかしながら、1カ月ほど培養を続けるとT抗原で不死化した細胞は形態が一定でなく大きさも小さくなり、明らかに初代培養肝細胞とは異なり、形態的变化が明らかになった(図2)。一方、E6E7で不死化した細胞(HuS-E細胞と命名)は30日後でも初代培養肝細胞と同様の形態を示した。このことは肝細胞特異的発現を示すことが知られている遺伝子群に関してその発現を検証した場合でも同様だった。E6E7で不死化した細胞はT抗原で不死化した細胞(HuS-T細胞と命名)に比べて長期間の培養後にも初代培養肝細胞と同様の発現パターンを示していることが分かった⁴⁾。そこでこの細胞と患者血清

を用いたHCV感染実験を行い、そのHCV感染増殖性について検討した。図3Aに示すように血清を細胞の培養液に加えて1日後、細胞を洗浄後新たな培地で3日、5日、7日間培養した。その後、細胞から全RNAを回収してその中のHCV-RNA定量し、その経時変化を検討した。HuSE細胞は株間で多少の相違はあるが、他の肝由来細胞株と比較して数倍から5倍程度安定した感染増殖が認められた⁴⁾。その中でも一番感染増殖能が高かったHuSE/2細胞株をそれ以降主にHCV感染増殖研究のために使用することにした。

4

自然免疫系修飾によるHCVの感染増殖効率の改良

上記のようにHuSE/2細胞は初代培養肝細胞に比較的類似した形質をもつ細胞であることから、この細胞は自然免疫機能も正常に機能していると考えられる。そこで細胞内のインターフェロン(IFN)シグナリング経路の中で重要な機能を持つ転写因子であるインターフェロン調節因子(interferon regulatory factor, IRF) 3と7の機能を抑制した時にHCVの増殖が亢進するかどうかを検討した⁴⁾。そのためにまずそれぞれの転写因子に対するドミナント・ネガティブ型(DN)分子を作成し、これをHuSE/2細胞中で一過性に発現させてから血清由来HCVを感染させた。各DN分子はそれぞれの分子の転写活性化領域を欠失させたものを用いた。この分子を発現する細胞では内在性の野生型分子と二量体を形成し、その転写活性化能を抑制すると考えられる。図3Bに結果を示すようにIRF3のDN分子はHCV感染に対して期待した効果を示さなかったが、IRF7のDN分子を発現させると著しくHCVの感染増殖が亢進した。IRF7に対するsiRNAを用いて本タン

パク質の発現を抑制した場合にも、IRF7のDN分子を用いた時と同様の効果が観察された。以上から血清由来HCVの培養細胞への感染は自然免疫系を誘導し、それによってHCVの増殖が抑制されることがわかった。またその抑制機能にはIRF7が重要な役割を担っていることが示唆された。

5

3D細胞培養系によるHCV感染性粒子産生

HuSE/2細胞は別の細胞を用いて解析された血清由来HCVの感染増殖系に比べて、その効率は安定して高いことがわかった。しかしながら、培養上清中にはHCV RNAが全く検出されず、上清中に感染性HCVは認められなかった。HCVのヒトにおける主たる感染標的細胞はもちろん肝細胞であると考えられる。肝臓は他の組織と同様に極めて機能的に構成された組織であり、肝細胞はその中で立体的に整然と配置されている。したがって、そのように立体的に配置された肝細胞が本来の形質を持ち、そのことがHCVの感染、特に感染性粒子産生に極めて重要な役割を果たしていることが想像される。実際にRadial-Flow Bioreactor (RFB)と呼ばれる人口肝臓のモデルシステムに肝癌由来細胞であるFLC4細胞を充填し、これを3次元(3D)培養することで血しょう由来のHCVが感染増殖し、システムを循環する培養液中にHCV RNAが検出されることが報告されている⁷⁾。また、既にチンパンジーを用いて感染性HCV産生能が確認されている遺伝子型1aのHCV RNAゲノムをこのRFB培養した培養細胞に導入することによってその培養液中に、別に準備したRFB培養細胞へ2次感染することが可能な感染性粒子が産生されることが示されている⁷⁾。またRFBを用いた3D培養で

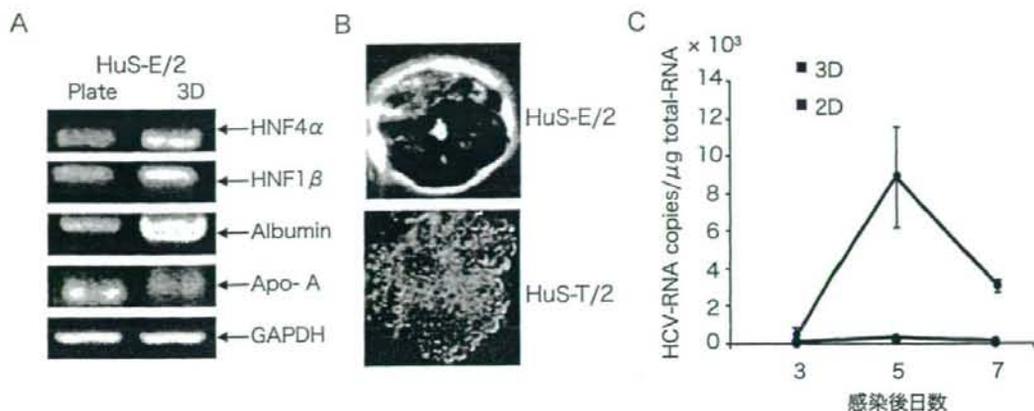


図4 TGPを用いた3D培養HuS-E/2細胞の血清由来HCV (遺伝子型1b)の感染増殖性
TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞における肝臓特異的発現遺伝子の発現を通常の2D培養したものと同様にRT-PCR法によって比較した(A)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した(B)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(C)。感染の解析は図3と同様に行った。

は感染性粒子産生が認められなかった上記ゲノム長のレプリコン複製細胞を培養することで感染性HCVの産生が認められるようになっている⁸⁾。同様の現象はRFBだけでなく温度可逆性ゲル化ポリマー (Thermoreversible gelation polymer; TGP) を用いてポリマーゲル中で細胞培養をした場合にも観察されている⁸⁾。これらの結果は3D培養が培養細胞からのHCV粒子産生に非常に有用であることを示している。

6 簡便な3D細胞培養系を用いた血清由来HCV感染増殖系の構築

われわれは上記のように通常の培養ディッシュを用いた2次元(2D)培養においても比較的効率の良い血清由来HCVの感染増殖が観察されたHuS-E/2細胞を3D培養することで感染性粒子の産生が可能になると考えた。まず特殊な装置を必要とせず、小規模の細胞培養系であり、ウイルスが感染した細胞の解析にも使用可能と考えられた上記TGP培養系

を用いて3D培養を行った。図4Aに示すように肝臓特異的に発現しているアルブミン遺伝子などの発現をRT-PCR法を用いて解析したところ、3D培養した場合に2D培養した時に比較して著しくその発現が誘導されることがわかった。また、HuS-E/2細胞はTGP培養系で培養していくと図4Bで示すようにシスト様の構造を形成し、ランダムに細胞増殖をして細胞塊を形成しているHuS-T2細胞(同じ初代培養肝細胞をSV40-T抗原で不死化して得た細胞)とは全くことなる形態を示した。そこでこの3D培養しているHuS-E2細胞に患者血清を加えて、その細胞内のHCV-RNA量の変化を経時的に追うことでその感染と増殖を検討した。図4Cに示すように同じ細胞を2D培養した場合に比較して感染5日後ではHCV-RNA量が100倍近く増加することがわかった。このことは3D培養によってこの細胞が血清由来HCVの感染増殖に適した状態に変化していることを示している。しかしながら、TGP培養系では以下の理由により

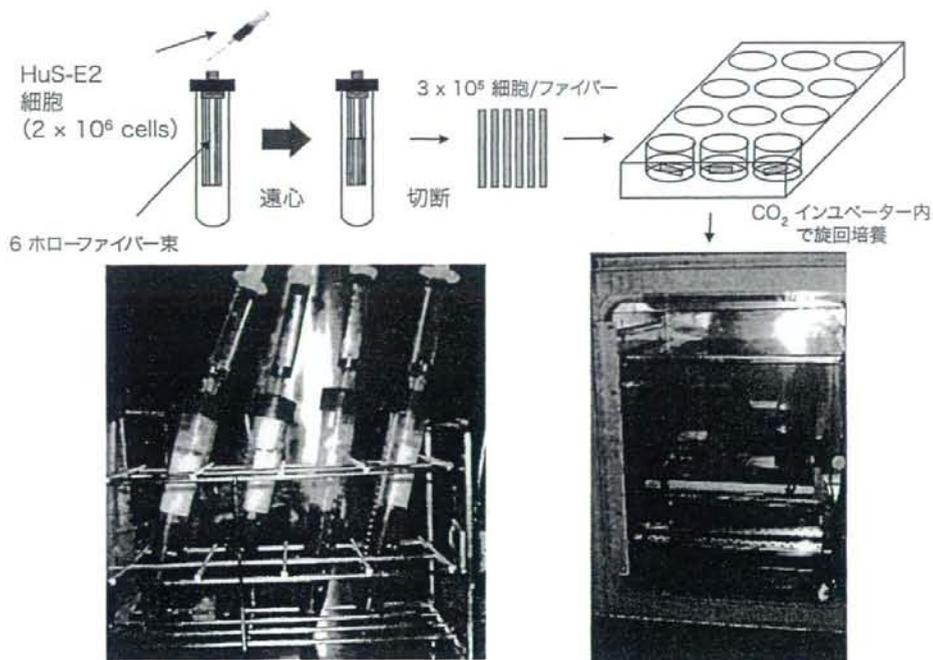


図5 ホローファイバーモジュール(東洋紡)を用いたHuSE/2細胞の3D培養系

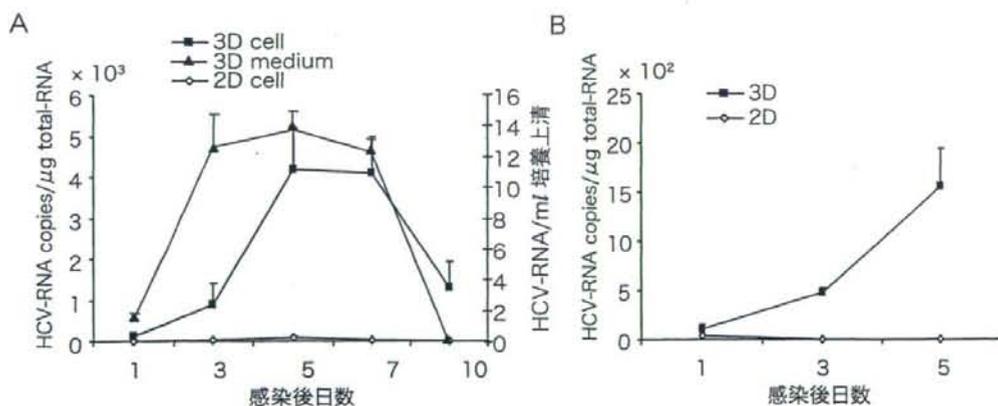


図6 HFを用いた3D培養HuSE/2細胞の血清由来HCV(遺伝子型1b)の感染増殖性
HFを用いて3D培養したHuSE/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。HCV感染後、経時的に細胞内(cell)と培養上清中(media)のHCV RNAを定量した。2D培養した細胞の培養上清にはHCV RNAは全く検出されなかった。(A)において2Dおよび3D培養したHuSE/2細胞に感染後5日と7日におけるそれぞれの培養上清を回収し濃縮して、別にHFを用いて3D培養したHuSE/2細胞の培地に添加し、その2次感染能を解析した(B)。

感染性粒子の解析が容易ではないためにこの系を用いたさらなる解析は困難であった。

TGPは培養状態ではゲル化していて4度以下の低温化ではゾル化する。しかしながらその

ゾルは粘稠であるため、細胞や培養液の回収は低温条件下でTGPを氷冷した緩衝液などで大幅に希釈してから行う必要がある。このように取り扱いがなかなか難しいため、感染性粒子が培地中に産生されているか否かを検討しようと試みたが単純な方法では再現性のある結果が得られなかったのである。

次に中空糸ホローファイバー (HF)による3D培養法をHuS-E/2細胞に応用した。このシステムは人工肝臓作成のため、開発されたシステムのひとつである⁹⁾。遠心チューブの中にセルロースアセテート製のHF束がセットされたモジュール構造をしており、培養細胞は懸濁液として遠心チューブ上部からモジュールへ注入する。そのうち、遠心力によりHF中に培養細胞を詰めることでHF内腔にオルガノイドを形成させる(図5)。そのうちHFを切断し、その断片を12ウェル培養用マルチプレートのウェル内でヒト肝細胞用無血清培地を用いて旋回させながら培養する(図5)。通常一つのウェルに2本で一束のHFが培養でき、細胞数は培養開始時には3×10の5乗程度である。そこでこの系で培養したHuS-E/2細胞を用いて血清由来HCVの感染増殖を検討した。図6Aに示してあるように血清で処理したのち、3日、5日、7日と細胞内のHCV-RNA量は著しく増加し、この細胞では効率良く血清由来HCVが感染し増殖することが明らかとなった。またHF培養系は無血清培地と細胞を含むHFが簡単に分離できるため、細胞のみならず培養上清の単離や解析が容易である。そこで培養液中に存在するHCV-RNA量を測定したところ、ほぼ細胞内のHCV RNAと同様のパターンで経時的に増加していることがわかった(図6A)。このことからこの培養系では患者血清由来の感染性HCV粒子が培養液中に産生されているこ

とが推定されたため、このHCV-RNAを含む培養上清を回収し濃縮したのち、新たに用意したHF培養HuS-E/2細胞の培地に加え、その感染性を検討した。上記同様に経時的に細胞内のHCV-RNA量を定量すると処理後3日、5日後に明らかな増加が認められた(図6B)。このことは用いた培養上清に感染性粒子が産生されていたことを強く示唆するものである。以上の結果からHFを用いたHuS-E/2細胞の3D培養系は患者血清由来のHCVが感染し、増殖し、感染性粒子を放出するというHCVの生活環を再現する簡便な3D細胞培養系として利用することが可能であると考えられた。

7 おわりに

現在、種々の条件で血清由来のHCVの感染増殖、そして感染性ウイルスの産生についてさらなる解析を進めている。この系が種々の患者血清由来のHCVの感染増殖を再現することができれば、これまで明らかになっていなかった多様な患者由来のHCVと細胞の相互作用に関する研究を進めることが可能になり、また、新たな抗HCV薬開発にも有用であることは間違いない。また将来的に出現が予想されている薬剤耐性株や異なるHCV株毎に適した治療法の選択などに利用されることが期待できる。

文 献

- 1) Lohmann V, Korner F, Koch J et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line, *Science* 285 : 110-113, 1999
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al : Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 : 791-796, 2005
- 3) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al : Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad*

- 4) Aly HH, Watashi K, Hijikata M et al : Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 46 : 26-36, 2007
- 5) Harms W, Rothamel T, Miller K et al : Characterization of human myocardial fibroblasts immortalized by HPV16 E6/E7 genes, *Exp. Cell Res* 268 : 252-261 2001
- 6) Hung SC, Yang DM, Chang CF et al : Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes, *Int J Cancer* 110 : 313-319, 2004
- 7) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M et al : Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314 : 16-25, 2003
- 8) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y et al : Production and infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351 : 381-392, 2006
- 9) Funatsu K, Ijima H, Nakazawa K et al : Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs* 25 : 194-200, 2001

*

*

*

Quantitative and Temporal Analysis of Gene Silencing in Tumor Cells Induced by Small Interfering RNA or Short Hairpin RNA Expressed from Plasmid Vectors

YUKI TAKAHASHI, KIYOSHI YAMAOKA, MAKIYA NISHIKAWA, YOSHINOBU TAKAKURA

Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

Received 25 January 2008; revised 28 February 2008; accepted 29 February 2008

Published online 1 May 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.21398

ABSTRACT: Vector-based RNA interference (RNAi) has attracted great interest, because of its more prolonged gene silencing effect compared with small interfering RNA (siRNA). However, the intensity and duration of vector-based RNAi effect has received little attention. In this study, the gene silencing kinetics of short hairpin RNA (shRNA)-expressing plasmid DNA (pDNA) driven by U6, H1 or tRNA promoter (pU6-shLuc, pH1-shLuc, and ptRNA-shLuc) was studied in melanoma cells expressing firefly luciferase. A bootstrap method-based moment analysis was performed to statistically and quantitatively evaluate the profile of gene silencing. The analysis showed that pU6-shLuc induced a significantly greater and longer gene silencing than that produced by other promoter-driven shRNA expression vectors. In addition, it was found that pU6-shLuc was at least 100-fold more potent in gene silencing than siRNA targeting the same gene on a numerical basis. These statistical considerations demonstrated that U6 promoter-driven shRNA expressing pDNA is the most effective in inducing gene silencing effect as far as the intensity and duration of RNAi effect is concerned. © 2008 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 98:74–80, 2009

Keywords: RNA interference; RNA polymerase III promoter; moment analysis; bootstrap method

INTRODUCTION

Small interfering RNA (siRNA) molecules are a powerful inducer of a sequence-specific gene silencing event called RNA interference (RNAi).^{1,2} siRNA is expected to be used as a new treatment for various diseases as well as an experimental tool, because its intensity of gene silencing is greater than that of other conventional molecules, such as antisense oligodeoxynucleotides and

ribozymes.^{3,4} The temporal nature of siRNA-mediated gene silencing has led to the development of methods to extend the duration of its action, such as chemical modification of siRNA and the use of vectors expressing siRNA or short hairpin RNA (shRNA). In the latter case, the promoter that drives shRNA is a major factor determining the intensity and duration of gene silencing.^{5,6}

The RNAi effect has often been evaluated using the maximum inhibition of the expression of target genes. Although this approach is effective for selecting the target sequence for effective induction of RNAi, it is not suitable for selecting suitable RNAi effectors. Instead, a kinetic analysis of the time-course of RNAi can be a useful

Correspondence to: Yoshinobu Takakura (Telephone: +81-75-753-4615; Fax: +81-75-753-4614; E-mail: takakura@pharm.kyoto-u.ac.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, 74–80 (2009)
© 2008 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

method to select a suitable molecule for gene silencing. We and other groups have already reported about quantitative analytical methods for the kinetics of siRNA-mediated RNAi.⁷⁻⁹ Although shRNA-expressing plasmid DNA (pDNA) shares the mRNA degradation pathway with siRNA, it requires additional steps, such as transcription of shRNA from pDNA in the nucleus, export of shRNA to the cytoplasm and the processing of shRNA into siRNA. More importantly, some of these processes are saturable ones and dependent on the concentration of pDNA, shRNA, or siRNA. Therefore, such model-dependent analyses as those of Bartlett et al.⁸ and Raab et al.⁹ are difficult to apply to the evaluation of the kinetics of shRNA-expressing vectors.

In our previous study, we solved this problem by applying a model-independent moment analysis, and succeeded in a quantitative evaluation of the kinetics of siRNA-mediated gene silencing.⁷ We defined the area under the concentration curve (AUC) and the mean residence time (MRT) of gene silencing after siRNA transfection as the indicators of the intensity and duration of gene silencing, respectively. Statistical comparisons were successfully performed by calculating the mean, standard deviation (SD) and standard error (SE) of the AUC and MRT, using a computer program MOMENT(BS).¹⁰

In the present study, this model-independent moment analysis was applied to the kinetics of shRNA-expressing pDNAs after transfection to cultured cells. Three types of frequently used RNA polymerase III promoters, human small nuclear RNA U6 (U6), human RNase P RNA H1 (H1), and human tRNA^{val} (tRNA) promoters, were selected and their activity was statistically compared in terms of the intensity and duration of gene silencing. A melanoma B16-BL6 clone that stably expresses firefly and renilla luciferases was used to evaluate the gene silencing effect by simply calculating the ratio of the firefly and renilla luciferase activities.¹¹

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

A murine melanoma cell line B16-BL6 and a murine colon carcinoma cell line Colon26 were obtained from the Cancer Chemotherapy Center of the Japanese Foundation for Cancer Research (Tokyo, Japan). B16-BL6/dual Luc, a cell line that

expresses both firefly and renilla luciferases, was constructed from B16-BL6 cells by genetically labeling with firefly and renilla luciferase genes as described previously.¹¹ B16-BL6/dual Luc cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin/L-glutamine (PSG) at 37°C and 5% CO₂. The firefly and renilla luciferase activities of B16-BL6/dual Luc cells were about 3 and 10 RLU/s/cell, respectively.

shRNA-Expressing pDNA and siRNA

pDNA expressing shRNA targeting firefly luciferase under the control of human U6 promoter (pU6-shLuc) was constructed from piGENE hU6 vector (iGENE Therapeutics, Tsukuba, Japan) according to the manufacturer's instructions as described previously.¹¹ pU6-shLuc transcribes a single-stranded RNA 5'-GUG CGU UGU UGG UGU UAA UCC UUC AAG AGA GGG UUG GCA CCA GCA GCG CAC UUU U-3', which forms stem-loop-structured shRNA, targeted to firefly luciferase mRNA (targeted sequence: GTG CGC TGC TGG TGC CAA CCC), with loop sequences of UUCAAGAGA. Plasmids expressing the same shRNA under the control of human H1 promoter (pH1-shLuc) or tRNA promoter (ptRNA-shLuc) were constructed by subcloning the shRNA sequence into the *Bam*H I/*Kpn* I site of pBAsi-hH1 DNA (Takara Bio, Otsu, Japan) or into the *Bam*H I/*Pst* I site of piGENE tRNA Hyg vector (iGENE Therapeutics), respectively. Empty piGENE hU6 vector was used as a control pDNA throughout the present study. Each pDNA was amplified in the DH5 α strain of *Escherichia coli* and purified using a QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Synthetic siRNA targeting the mRNA of firefly luciferase (target sequence: GTG CGC TGC TGG TGC CAA CCC) was purchased from Takara Bio.

Transfection

B16-BL6/dual Luc cells were plated on 24-well culture plates (at a density of 2×10^4 cells/well). After an overnight incubation, transfection of pDNA was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. In brief, 1 μ g pDNA

was mixed with 3 μg Lipofectamine 2000 at a final concentration of 2 μg pDNA/mL dissolved in OPTI-MEM I (Invitrogen). Control pDNA was used to adjust the amount of pDNA. The resulting complex was added to the cells and the cells were incubated with the complex for 4 h. Cells were washed with PBS and further incubated with the culture medium as described above for specified time periods.

Luciferase Assay

To determine luciferase activity, B16-BL6/dual Luc cells were lysed using the cell lysis buffer of an assay kit (PiccageneDual, Toyo Ink, Tokyo, Japan) at the indicated time points after transfection. Then, samples were mixed with the luciferase assay buffer of the kit, and the chemiluminescence produced was measured in a luminometer (Lumat LB9507, EG and G Berthold, Bad Wildbad, Germany).

Data Analysis

The firefly luciferase activity of a sample was divided by the renilla luciferase activity of the same sample, which was then normalized using the value of control cells to obtain the parameter R_{GE} , the ratio of gene expression. Differences in each pair of R_{GE} values were statistically evaluated by Student's t -test with a significance level at $p < 0.05$. The time-course of $(1 - R_{GE})$ was used to calculate the area under the curve of the inhibitory effect (AUC_{IE}) and the MRT of the inhibitory effect (MRT_{IE}) as described previously.⁷ For the calculation of AUC_{IE} and MRT_{IE} , R_{GE} values over 1 were assumed to be 1. The mean and SE of AUC_{IE} and MRT_{IE} were calculated using the bootstrap method.¹⁰

To detect any significant differences in AUC_{IE} and MRT_{IE} between different groups, the normal distribution test was performed using the following equation:

$$Z_0 = \frac{|\bar{\Phi}_1 - \bar{\Phi}_2|}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}} \quad (1)$$

where $\bar{\Phi}_1$ and $\bar{\Phi}_2$ are the means of a parameter, and SE_1 and SE_2 are the SEs in group 1 and 2, respectively. If $Z_0 > 1.96$ (confidence interval $p < 0.05$), the difference between groups 1 and 2 is assumed to be significant.

Taking shRNA-expressing pDNA as a drug and AUC or MRT as the response to the drug, we assumed that AUC_{IE} and MRT_{IE} versus the initial concentration of shRNA-expressing pDNA (C_0) could be expressed by the following linearized equation, which is known to describe the dose-response curves of drugs.

$$\frac{C_0}{AUC_{IE}} \text{ or } \frac{C_0}{MRT_{IE}} = \frac{C_0}{a} + \frac{b}{a} \quad (2)$$

The parameters a and b were estimated by linearizing the plots. The correlation constant a corresponds to the maximum response, that is, AUC_{max} and MRT_{max} . The correlation constant b corresponds to the required dose of RNAi effector to obtain the response half of AUC_{max} or MRT_{max} ; $C_{1/2}$. IC_{50} , a concentration required to obtain R_{GE} value of 0.5, was calculated by assuming that concentration- R_{GE} curves between the experimental values which across R_{GE} value of 0.5 were linear.

RESULTS

Time-Courses of Gene Silencing after Transfection of shRNA-Expressing pDNA

Figure 1 shows the time-courses of the ratio of gene expression (R_{GE}) in B16-BL6/dual Luc cells after transfection of shRNA-expressing pDNAs at an indicated initial concentration (C_0). When pH1-shLuc and pTRNA-shLuc were transfected at a C_0 of 0.01 or 0.1 nM, the R_{GE} decreased with time, and reached a minimum at 2 days after transfection. At the highest concentration of 1 nM for pH1-shLuc or 0.7 nM for pTRNA-shLuc, the R_{GE} exhibited an almost flat trough from days 1 to 5 for pH1-shLuc and from days 1 to 6 for pTRNA-shLuc, respectively. Because the plasmid size of pTRNA-shLuc was about 1.5-fold larger than those of pU6-shLuc and pH1-shLuc, the highest concentration of pTRNA-shLuc was set at 0.7 nM. In the case of pU6-shLuc, at a C_0 of 0.1 or 1 nM, the R_{GE} exhibited an almost flat trough from days 1 to 8 for 0.1 nM and from days 1 to 10 for 1 nM, respectively, indicating that almost all target mRNA was degraded under these conditions. In other words, a fraction of siRNA produced would not contribute to the gene silencing, so that the level of gene silencing does not reflect the amount of effective siRNA within cells. Therefore, AUC_{IE} may not be proportional to the initial concentration of shRNA-expressing pDNA. The suppression

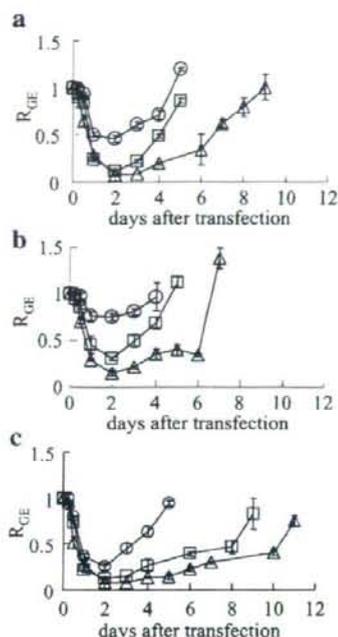


Figure 1. Time-courses of the ratio of gene expression (R_{GE}) following transfection of shRNA-expressing pDNAs. B16-BL6/dual Luc cells were transfected with pDNA expressing shRNA under the control of H1 (a), tRNA (b), or U6 (c) promoter at different initial concentrations: (circle symbols) 0.01 nM, (square symbols) 0.1 nM, and (triangle symbols) 0.7 nM (ptRNA-shLuc) or 1 nM (pH1-shLuc, pU6-shLuc). Luciferase activities were determined at the indicated times after transfection. The results are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

was significant ($p < 0.05$) until days 4, 4, and 3 for 0.01 nM, days 8, 4, and 4 for 0.1 nM, and days 10, 7, and 6 for the highest concentration of C_0 of pU6-shLuc, pH1-shLuc, and ptRNA-Luc, respectively.

Moment Parameters for the Kinetics of Gene Silencing by shRNA-Expressing pDNAs

Figure 2 shows the means and SE of AUC_{IE} and MRT_{IE} . All the shRNA-expressing pDNAs showed a C_0 -dependent increase in both AUC_{IE} and MRT_{IE} . Table 1 summarizes the significant differences ($p < 0.05$) between two groups. pU6-shLuc showed a greater AUC_{IE} and MRT_{IE} compared with the other shRNA-expressing pDNAs except for the MRT_{IE} at a C_0 of 0.01 nM. For all shRNA expressing pDNA, the AUC_{IE} and

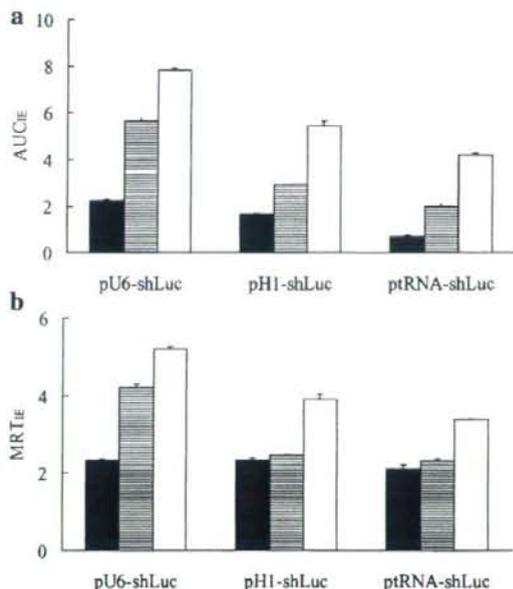


Figure 2. AUC_{IE} and MRT_{IE} of gene silencing by shRNA-expressing pDNAs. (a) AUC_{IE} and (b) MRT_{IE} of the gene silencing by shRNA-expressing pDNAs were calculated using MOMENT(BS), at different initial concentrations: (closed bars) 0.01 nM, (striped bars) 0.1 nM and (open bars) 0.7 nM (ptRNA-shLuc) or 1 nM (pU6-shLuc, pH1-shLuc). Results are expressed as the computer-calculated mean \pm SE.

MRT_{IE} increased with an increasing concentration of pDNA. pU6-shLuc showed the greatest values for both parameters, suggesting its superiority over the other vectors.

Linearized Plot of C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} Versus C_0

Figure 3 shows the plots of C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} against the C_0 of three different shRNA-expressing pDNAs. The correlation coefficients (r) of both C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} versus C_0 were more than 0.99 in all cases, indicating successful linearization of C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} versus C_0 by Eq. (2). The concentration-dependent increase in AUC_{IE} and MRT_{IE} was clearly represented in the inserts of Figure 3. Table 2 summarizes the parameters AUC_{max} , MRT_{max} , and $C_{1/2}$ calculated from the linearized plots. In all cases examined, $C_{1/2}$ values calculated were between 0.01 and 0.1 nM, two of the three initial concentrations used in the present study.

Table 1. Statistical Comparison of Two Groups by the Normal Distribution Test

Pairs for Comparison			
Promoter of pDNA	Concentration (nM)	AUC _{IE}	MRT _{IE}
U6 vs. H1	0.01	6.29*	0.0658
	0.1	18.2*	20.3*
	1	10.1*	7.66*
U6 vs. tRNA	0.01	15.9*	1.89
	0.1	20.6*	18.3*
	1 (0.7)	7.34*	4.91*
H1 vs. tRNA	0.01	10.9*	1.81
	0.1	8.81*	2.17*
	1 (0.7)	5.79*	3.32*
U6	0.1 vs. 0.01	20.7*	20.3*
	1 vs. 0.1	11.5*	9.07*
	0.1 vs. 0.01	18.7*	1.61
H1	1 vs. 0.1	12.4*	9.23*
	0.1 vs. 0.01	11.2*	1.54
tRNA	0.7 vs. 0.1	18*	16.0*

*The difference was assumed to be significant ($p < 0.05$) between the groups, based on the normal distribution test described in Eq. (1) ($Z_0 > 1.96$). The highest concentration was set at 0.7 nM for pRNA-siLuc and 1 nM for the others.

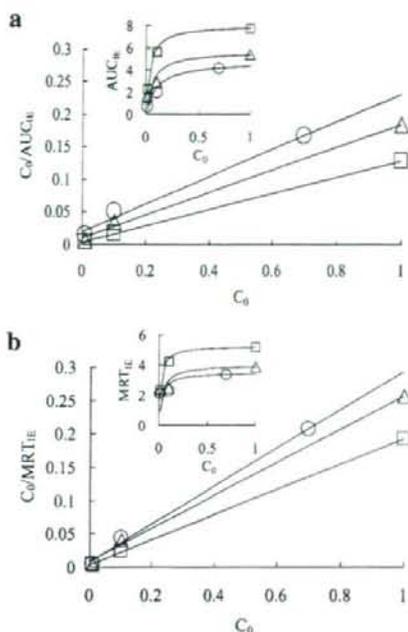
Therefore, the parameters obtained can be considered reliable to be used for the comparison of the gene silencing by various types of shRNA-expressing pDNA. pU6-shLuc showed a greater AUC_{max} and MRT_{max}, and a smaller $C_{1/2}$ for both AUC_{IE} and MRT_{IE} compared with the other shRNA-expressing pDNAs, suggesting that the U6 promoter generates a greater numbers of shRNA for a longer period of time compared with the other promoters.

These parameters of shRNA-expressing pDNA were compared with those of siRNA targeting firefly luciferase (siLuc). To this end, the parameters AUC_{max}, MRT_{max}, and $C_{1/2}$ of siLuc were

Table 2. Maximum Response and Concentration Required for Half of the Maximum Response Calculated from the Linearized Plots

RNAi Effector	AUC _{IE}			MRT _{IE}		
	a (AUC _{max})	b ($C_{1/2}$)	r	a (MRT _{max})	b ($C_{1/2}$)	r
pU6-shLuc	8.05	0.0341	0.999	5.3	0.0186	0.999
pH1-shLuc	5.74	0.0595	0.998	4.03	0.0343	0.999
ptRNA-shLuc	4.74	0.0959	0.995	3.51	0.0278	0.998
siLuc	6.73	4.35	0.999	4.21	3.2	0.999

a and b are parameters described in Eq. (2). r is the correlation coefficient of the linear plots.

**Figure 3.** Linear plots of C_0/AUC_{IE} or C_0/MRT_{IE} versus C_0 . (a) C_0/AUC_{IE} and (b) C_0/MRT_{IE} were plotted against the initial concentration: (square symbols) pU6-shLuc, (triangle symbols) pH1-shLuc, (circle symbols) ptRNA-shLuc. Coefficients a (AUC_{max}, MRT_{max}) and b ($C_{1/2}$), which were calculated from the straight regression lines, are shown in Table 2. In the inserts, (a) AUC_{IE} and (b) MRT_{IE} were plotted against the initial concentration of shRNA-expressing pDNA.

calculated using the experimental results reported in our previous paper.⁷ The AUC_{max} and MRT_{max} of siLuc were calculated to be 6.73 and 4.21, respectively, both of which lay between those of pU6-shLuc and pH1-shLuc (Table 2).

Gene Silencing after Transfection of siLuc and pU6-shLuc

To compare the gene silencing effects of siLuc and shRNA-expressing pDNA, R_{GE} in B16-BL6/dual Luc cells were determined after the transfection of siLuc or pU6-shLuc at various initial concentrations (Fig. 4). The sampling time was fixed to be 2 days after transfection because R_{GE} reaches minimum values at this time point in the both cases. IC_{50} of siLuc and pU6-shLuc were calculated to be 0.0625 and 0.00417 nM, respectively, indicating that the pU6-shLuc is about 15-fold more potent than siLuc as far as the IC_{50} values estimated using the RGE at 2 days after transfection were used for the calculation.

DISCUSSION

Because siRNA-mediated gene silencing is transient, vector-based RNAi attracts much interest as it may achieve prolonged gene silencing. The promoter that drives shRNA expression is a major factor determining the intensity and duration of gene silencing by shRNA-expressing pDNAs. RNA polymerase III (pol III) promoters are frequently used for plasmid-based RNAi, because these promoters are suitable to transcribe large amounts of short RNAs and their sites of transcription initiation and termination are well understood. There have been several literatures concerning about the effect of pol III promoters on the efficiency of gene silencing by shRNA-expressing pDNAs.^{5,6,12} Kawasaki et al.¹² reported

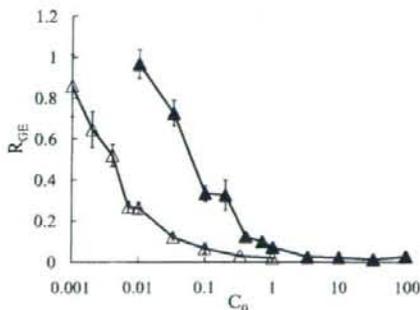


Figure 4. Ratio of gene silencing (R_{GE}) following transfection of siRNA or shRNA-expressing pDNA. B16-BL6/dual Luc cells were transfected with (solid triangles) siLuc or (empty triangles) pU6-shLuc at the indicated initial concentrations (C_0). Luciferase activities were determined at 2 days after transfection. The results are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

that tRNA promoter pDNA and U6 promoter pDNA could suppress target gene expression almost equally by using cell lines stably integrated with these pDNAs. Wooddell et al.⁵ compared the efficiency of shRNA-expressing pDNA driven by human H1, human U6, or murine U6 promoter, and found that shRNA-expressing pDNA containing the human H1 promoter was significantly less effective in mice than those containing any U6 promoter, although both types of promoter functioned equally in cultured cells. Boden et al.⁶ demonstrated that a modified tRNA^{met}-derived promoter could induce HIV-1 specific RNAi more efficiently than the other promoters used: U6, H1 and CMV promoters. However, these previous studies compared the promoter-dependent gene silencing effect at a single time point after transfection. Unlike these studies, we have investigated the time-course of gene silencing until the RNAi effect became undetectable with time after transfection. Moreover, we have successfully applied the bootstrap method-based moment analysis to statistically compare the importance and differences of the promoters as far as the intensity and duration of gene silencing is concerned. By calculating the means and SE of parameters for the intensity and duration of gene silencing, AUC_{TE} and MRT_{TE} , we have shown that gene silencing effect of U6 promoter-driven shRNA-expressing pDNA is more potent and durable than those of H1 and tRNA promoter-driven shRNA-expressing pDNA. This result is partly in agreement with previous studies reported by Wooddell et al. and Kawasaki et al., and different from that reported by Bodent et al. The modified tRNA^{met}-derived promoter used by Bodent et al. might be more potent than the tRNA^{val}-derived promoter used in the present study. In addition, the AUC_{max} , MRT_{max} , and $C_{1/2}$ values estimated also indicated that gene silencing by U6 promoter-driven shRNA-expressing pDNA is more potent than that by H1- or tRNA promoter-driven shRNA-expressing pDNA. Because these parameters are estimated based on the AUC_{TE} and MRT_{TE} values that were obtained after a single transfection of each shRNA-expressing pDNA to cells, AUC_{max} and MRT_{max} values could depend on the stability of pDNA, transcription activity of promoters, intracellular behavior of shRNA and target sequence of shRNA. These pharmacokinetic considerations of this current study suggest that U6 promoter generates more shRNA molecules than the other promoters under the same experimental conditions.

Calculation of the parameters AUC_{max} , MRT_{max} , and $C_{1/2}$ of siLuc revealed that AUC_{max} , MRT_{max} of siLuc was comparable to those of shRNA expressing pDNAs. These results indicate that vector-based RNAi does not always induce a prolonged gene silencing compared with siRNA-mediated RNAi. On the other hand, a large difference was detected in the $C_{1/2}$ of AUC_{IE} and MRT_{IE} between siRNA and shRNA-expressing pDNAs. The largest difference in $C_{1/2}$ was observed between siLuc and pU6-shLuc. The $C_{1/2}$ of AUC_{IE} and MRT_{IE} of siLuc were about 120- and 170-fold greater than those of pU6-shLuc, respectively. However, the IC_{50} of siLuc was calculated to be only about 15-fold greater than that of pU6-shLuc. This discrepancy would be explained by the fact that the $C_{1/2}$ of AUC_{IE} and MRT_{IE} were obtained from the total profile of gene silencing whereas the IC_{50} values were calculated using data at a single time point. Therefore, these results clearly indicated from the kinetic view point that comparison of gene silencing effect by different RNAi-effectors at one time-point is not suitable for the evaluation of the intensity and duration of gene silencing effect.

In conclusion, we have successfully applied the bootstrap method-based moment analysis to quantitatively compare the gene silencing by pDNA expressing shRNA under the control of different promoters. We found that the U6 promoter-driven shRNA-expressing pDNA showed a significantly greater and longer gene silencing effect than the H1- and tRNA promoter-driven ones. Moreover, moment analysis was proven to be useful for the quantitative comparison between siRNA and shRNA-expressing pDNA, and we clearly showed that the U6 promoter-driven shRNA-expressing pDNA possesses at least 100-fold greater gene silencing activity compared with siRNA on a numerical basis. Our statistical evaluations of gene silencing can be a powerful method to optimize RNAi effectors and other conditions that may affect the final output of gene silencing for pursuing effective application of RNAi-based gene silencing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan, by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and by a Grant-in-Aid for

Exploratory Research from the Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS).

REFERENCES

1. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9742-9747.
2. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
3. Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. 2003. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13:1-7.
4. de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. 2007. Interfering with disease: A progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:443-453.
5. Wooddell CI, Van Hout CV, Reppen T, Lewis DL, Herweijer H. 2005. Long-term RNA interference from optimized siRNA expression constructs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 117-127.
6. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank PR, Ramratnam B. 2003. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 31:5033-5038.
7. Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. 2006. Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnol Bioeng* 93: 816-819.
8. Bartlett DW, Davis ME. 2004. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34:322-333.
9. Raab RM, Stephanopoulos G. 2004. Dynamics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnol Bioeng* 88:121-132.
10. Takemoto S, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. 2006. Histogram analysis of pharmacokinetic parameters by bootstrap resampling from one-point sampling data in animal experiments. *Drug Metab Pharmacokin* 21:458-464.
11. Takahashi Y, Nishikawa M, Kobayashi N, Takakura Y. 2005. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: Quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. *J Control Release* 105:332-343.
12. Kawasaki H, Taira K. 2003. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* 31:700-707.

Gene silencing of β -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice

Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Tetsuya Suehara, Naomi Takiguchi and Yoshinobu Takakura*

Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

Altered expression of β -catenin, a key component of the Wnt signaling pathway, is involved in a variety of cancers because increased levels of β -catenin protein are frequently associated with enhanced cellular proliferation. Although our previous study demonstrated that gene silencing of β -catenin in melanoma B16-BL6 cells by plasmid DNA (pDNA) expressing short-hairpin RNA targeting the gene (psh β -catenin) markedly suppressed their growth *in vivo*, gene silencing of β -catenin could promote tumor metastasis by the rearranging cell adhesion complex. In this study, we investigated how silencing of β -catenin affects metastatic aspects of melanoma cells. Transfection of B16-BL6 cells with psh β -catenin significantly reduced the amount of cadherin protein, a cell adhesion molecule binding to β -catenin, with little change in its mRNA level. Cadherin-derived fragments were detected in culture media of B16-BL6 cells transfected with psh β -catenin, suggesting that cadherin is shed from the cell surface when the expression of β -catenin is reduced. The mobility of B16-BL6 cells transfected with psh β -catenin was greater than that of cells transfected with any of the control pDNAs. B16-BL6 cells stably transfected with psh β -catenin (B16/psh β -catenin) formed less or an equal number of tumor nodules in the lung than cells stably transfected with other plasmids when injected into mice *via* the tail vein. However, when subcutaneously inoculated, B16/psh β -catenin cells formed more nodules in the lung than the other stably transfected cells. These results raise concerns about the gene silencing of β -catenin for inhibiting tumor growth, because it promotes tumor metastasis by reducing the amount of cadherin in tumor cells.
© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: β -catenin; cadherin; RNA interference; pulmonary metastasis; melanoma

β -catenin is a key component of the Wnt signaling pathway, which transmits proliferative and survival signals to cells.¹ Aberrant Wnt signaling, including the stabilization and nuclear translocation of β -catenin, has been observed in various types of cancers, such as colon, lung, skin, breast, liver and pancreas cancers.² Nuclear translocation of β -catenin is followed by its cooperation with the T cell factor/lymphocyte-enhancer binding factor family and activation of the expression of genes related to cell proliferation and survival. Previous studies have shown that β -catenin plays an important role as an oncogene to promote tumor cell growth.^{2,3}

These lines of evidence support cancer therapy based on the suppression of β -catenin expression. In our previous study, we demonstrated that delivery of plasmid DNA (pDNA) expressing short-hairpin RNA (shRNA) targeting β -catenin (psh β -catenin) or hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α ; pshHIF-1 α) to a murine melanoma B16-BL6 (B16) tumor could suppress the corresponding target gene expression.⁴ Moreover, suppression of β -catenin expression in B16 tumor inhibited the tumor growth. To our surprise, however, we also noticed that the lungs of mice that had received intratumoral administration of psh β -catenin had more tumor nodules compared with those of the control mice despite the fact that the growth of primary tumor was suppressed by the administration of psh β -catenin. On the other hand, suppression of HIF-1 α expression in B16 tumors also inhibited tumor growth, but promoted hardly any pulmonary metastasis of tumor cells. These results strongly suggest the possibility that gene silencing of β -catenin in B16 cells not only suppresses primary tumor growth but also promotes tumor metastasis.

β -catenin links E-cadherin and the actin cytoskeleton through interaction with α -catenin.⁵ E-cadherin is the member of the cad-

herin family and plays a critical role in cell–cell adhesion.⁶ Therefore, β -catenin also plays an important role in cell–cell adhesion as a major structural element. Disruption of the cadherin–catenin complex has been observed in various types of cancers and its correlation with tumor malignancy has been reported, because such a disruption increases the amount of β -catenin in the cytosol and activates β -catenin-dependent transcription.^{7,8} Regarding the effect of β -catenin on E-cadherin function, Kawanishi *et al.* showed that the function of E-cadherin was abolished in a gastric cancer cell line, HSC-39 cells, because of the mutation in β -catenin, and that forced expression of wild type β -catenin led to the recovery of E-cadherin function in HSC-39 cells.⁹ Therefore, we hypothesized that a reduction in β -catenin expression affects the expression or function of cadherin and results in changes in cell adhesion and promotion of tumor cell dissociation from the primary tumor. In this study, we investigated whether gene silencing of β -catenin in B16 cells promotes their metastasis.

Material and methods

Plasmid DNA

pDNAs expressing shRNA (pshRNA) targeting green fluorescent protein (GFP), β -catenin or HIF-1 α were constructed from piGENE hU6 vector (iGENE Therapeutics, Tsukuba, Japan) as described previously.⁴ The target sites in GFP, murine HIF-1 α and murine β -catenin genes are as follows: GFP, 5'-GGCTACGTC CAGGAGCGCA-3'; HIF-1 α , 5'-GACACAGCCTCGATATGAA-3'; β -catenin, 5'-GAATGAGACTGCAGATCTT-3'. These pDNAs transcribe a stem-loop-type RNA with a loop sequence of ACG UGU GCU GUC CGU. In a previous study, we confirmed that pshHIF-1 α and psh β -catenin were effective in suppressing the mRNA expression of corresponding target genes in the primary tumor tissue of B16 cells in mice as well as in cultured B16 cells. piGENE hU6 vector, which transcribes a nonrelated sequence of RNA with partial duplex formation, was used as a control pDNA throughout the present study. pCMV-Luc encoding firefly luciferase and neomycin-resistant gene were constructed as described previously.¹⁰ Each pDNA was amplified in the DH5 α strain of *Escherichia coli* and purified using a QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

Cell culture

A murine melanoma cell line B16-BL6 (B16) was obtained from the Cancer Chemotherapy Center of the Japanese Foundation for Cancer Research.¹¹ A B16 cell line that stably expresses firefly luciferase and sea pansy luciferase (B16/dual Luc) was con-

Grant sponsors: Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan; Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO); Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS).

*Correspondence to: Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. Fax: +81-75-753-4614.

E-mail: takakura@pharm.kyoto-u.ac.jp

Received 13 April 2008; Accepted after revision 11 June 2008

DOI 10.1002/ijc.23812

Published online 26 August 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

structed as reported previously.¹² Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin/L-glutamine at 37°C and 5% CO₂.

Animals

Male C57/BL6 mice, purchased from Shizuoka Agricultural Cooperative Association (Shizuoka, Japan), were used for all experiments. All animal experiments were conducted in accordance with the principles and procedures outlined in the US National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocols for animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of Graduate School of Pharmaceutical Sciences of Kyoto University.

Pulmonary metastasis of subcutaneously inoculated B16 cells in mice

Primary tumor tissue of B16/dual Luc cells inoculated into the back of syngeneic C57/BL6 mice received intratumoral injections of control pDNA, pshHIF-1 α or psh β -catenin as described previously.⁴ In brief, tumor-bearing mice received intratumoral injections of 30 μ g pDNA followed by electroporation at day 7, 10 and 19 after tumor inoculation. Thirty-seven days after tumor inoculation, mice were euthanized by cervical dislocation and the lungs were excised and homogenized in a lysis buffer (0.1 M Tris (pH 7.8), 0.05% Triton X-100, 2 mM EDTA), and centrifuged at 13,000g for 20 min at 4°C. The supernatant was mixed with a luciferase assay buffer (Picagene, Toyo Ink, Tokyo, Japan), and the light produced was measured with a luminometer (Lumat LB 9507, EG and G Berthold, Bad Wildbad, Germany). The luciferase activity of the lung was converted to the number of B16/dual Luc cells using a regression line as previously reported.¹³

In vitro transfection

B16 cells were plated on culture plates. After an overnight incubation, transfection of pDNA was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. In brief, 0.1 μ g pCMV-Luc and 0.9 μ g pshRNA was mixed with 3 μ g Lipofectamine 2000 at a final concentration of 2 μ g pDNA/ml dissolved in OPTI-MEM 1 (Invitrogen). The resulting complex was added to the cells and the cells were incubated with the complex for 4 hr. Then, cells were washed with PBS and further incubated with the culture medium as described earlier. Twelve hours after transfection, the culture medium was supplemented with 1 mg/ml neomycin to select the cells that were transfected with pDNAs and cells were incubated for specified time periods up to 1 week after transfection.

Construction of cell lines stably expressing shRNA

B16 cells were transfected with pCMV-Luc and one of the pshRNAs as described earlier, and the cells were selected using 1 mg/ml neomycin for 14–20 days to obtain a clone stably transfected with pshRNAs. B16 cells stably transfected with control pDNA, pshGFP, pshHIF-1 α or psh β -catenin were named as B16/control, B16/pshGFP, B16/pshHIF-1 α or B16/psh β -catenin, respectively. The selected clone showed continuously suppressed protein expression of the corresponding target genes.

To evaluate the growth rate of the established cell lines, B16 and B16-derived cells were plated on 24-well culture plates at a density of 1×10^3 cells/well and cultured under the conditions described earlier for specified time periods up to 96 hr. The cell numbers at the indicated time points were determined by MTT assay as described previously.¹⁴

mRNA quantification

Total RNA was isolated using MagExtractor MFX-2100 and a MagExtractor RNA kit (TOYOBO, Osaka, Japan) following the manufacturer's protocol. To eliminate DNA contamination, the

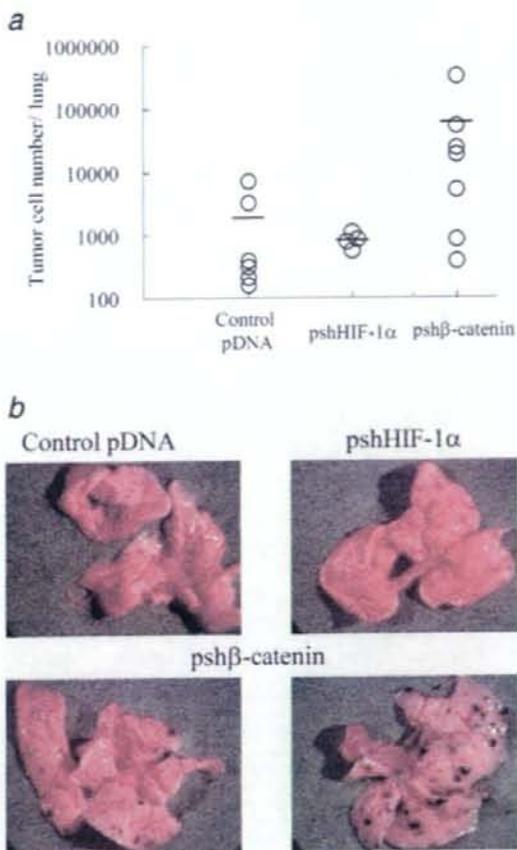


FIGURE 1 – Effect of intratumoral delivery of psh β -catenin on pulmonary metastasis from a subcutaneous B16 tumor. Mice bearing subcutaneous B16/dual Luc tumor received intratumoral injections of 30 μ g control pDNA, pshHIF-1 α or psh β -catenin followed by electroporation at day 7, 10 and 19 after tumor inoculation. Mice were euthanized on day 37, and the lungs were collected. (a) The number of tumor cells estimated by measuring the luciferase activities of mouse lungs. Open circles (\circ) indicate the tumor cell number in the lung of individual mice, and bars indicate the average of each group. (b) Typical examples of the lungs from tumor-bearing mice. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

total RNA was treated with DNase I (Takara Bio, Otsu, Japan) prior to reverse transcription. Reverse transcription was performed using a SuperScript II (Invitrogen) and dT-primer following the manufacturer's protocol. For quantitative mRNA expression analysis, real time PCR was carried out with total cDNA using a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The sequences of the primers used for amplification were as follows: GAPDH forward, 5'-CTGCCAAGTATGATGACATCAA GAA-3', reverse, 5'-ACCAGGAAATGAGCTTGACA-3'; β -catenin forward, 5'-CCTGCAGAAGTCCAGAAAAG-3', reverse, 5'-GTGGCAAAAACATCAACGTG-3'; E-cadherin forward, 5'-AAGGTGACAGAGCCTCTGGAT-3', reverse, 5'-ATTCCC TGGATGACACA-3'. Amplified products were detected on-line via intercalation of the fluorescent dye SYBR green (LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I kit, Roche Diagnostics). The cycling conditions were as follows: initial enzyme activation at 95°C for 10 min, followed by 55 cycles at 95°C for 10 sec.