

201209012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

small interfering RNA (siRNA)とリコンビナント Argonaute 2 の  
同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 25 年(2013 年)5 月

**厚生労働科学研究費補助金**

**創薬基盤推進研究事業**

**small interfering RNA (siRNA)とリコンビナント Argonaute 2 の  
同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発**

**平成 24 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 櫻井 文教**

**平成 25 年(2013 年)5 月**

## 目 次

I. 総括研究報告	
small interfering RNA (siRNA)とリコンビナント Argonaute 2 の同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発 (Argonaute 2 の過剰発現および細胞内導入によるノックダウン効率の向上に関する研究)	
櫻井 文教	----- 1
II. 分担研究報告	
1. バブルリポソームと超音波の併用による siRNA およびたん白質デリバリー特性の評価に関する研究	
鈴木 亮	-----11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----21

「small interfering RNA (siRNA)とリコンビナント Argonaute 2 の同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発」

総括研究報告書

Argonaute 2 の過剰発現および細胞内導入によるノックダウン効率の向上に関する研究

主任研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

Small Interfering RNA (siRNA)は、細胞質内で Argonaute 2 (Ago2)と RNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、高効率に標的遺伝子の発現を抑制する。現在、siRNA は癌や感染症をはじめとする各種疾患に対する革新的治療薬として期待されており、海外で臨床試験が積極的に進められるとともに、siRNA を細胞内に高効率に導入可能な Drug Delivery System (DDS) 技術も開発されつつある。しかし問題点として、①十分量の siRNA が導入できたとしても、細胞内の Ago2 量が足りず、十分な遺伝子発現抑制が得られない、②siRNA が Ago1 と相互作用することで、microRNA と同様の機構により標的以外の遺伝子の発現を抑制する (off-target 効果) ことが明らかとなってきた。

そこで本研究では、siRNA とともに、リコンビナント Ago2 を細胞内に導入することにより、off-target 効果が少なく、さらに高効率にノックダウン可能なシステムを開発することを試みる。昨年度は、まず siRNA の前駆体である shRNA とともに、Ago2 を過剰発現させることにより、高効率なノックダウンが可能か検討した。さらに、市販の各種タンパク質導入試薬を用いて培養細胞へのタンパク質導入効率について検討した。本年度は、リコンビナント Ago2 を siRNA とともに培養細胞に導入することで、ノックダウン効率が向上するか検討した。さらに Ago2 に改変を加えることで、細胞内小器官（核）に局在する RNA に対するノックダウン効率が向上するか検討した。

分担研究者

鈴木 亮 帝京大学薬学部  
講師

協力研究者

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科  
教授

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科  
助教

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科  
非常勤職員  
林 晃平 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
谷野 文仁 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生

#### A. 研究目的

siRNA は、標的遺伝子の発現を高効率かつ特異的に抑制可能であることから、次世代の革新的医薬品として大きな期待が寄せられており、現在欧米のベンチャー企業を中心に臨床開発が活発にすすめられている。siRNA は細胞内導入後、細胞質において Argonaute 2 (Ago2) と RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。RISC は、標的 mRNA に結合し切断することで、標的遺伝子の発現を抑制する (Fig.2)。従って、siRNA が標的遺伝子の発現を抑制するには Ago2 が必要不可欠であり、細胞質内の Ago2 量がノックダウン効率を左右する重要な要因であることが明らかとなってきた。

細胞室内の Ago2 量を増加させるには二つの手段があり、一つは Ago2 発現プラスミドを Transfection することで Ago2 を過剰発現させる方法と、リコンビナント Ago2 を細胞内に導入する方法が考えられる。Ago2 遺伝子を Transfection した場合には、細胞質 Ago2 量を大きく向上させることが可能であると考えられるが、一方で遺伝子導入による過剰発現は臨床では遺伝子治療に該当することとなり、応用面でハードルが高い。それに対し、リコンビナント Ago2 を細胞内導入する場合には遺伝子治療に該当せず、siRNA と同様に臨床応用に向けてハードルも低いと考えられる。そこで本研究では、siRNA とともにリコンビナント Ago2 を細胞内に導入することにより、高効率なノックダウンが可能か検討を行った。昨年度は、各種 RNA 干渉関連遺伝子の中でノックダウン効率を向上可能な遺伝子の同定、ならびに市販のタンパク質導入試薬を用いてモデルタンパク質である  $\beta$ -galactosidase の培養

細胞への導入効率を検討した。

一方で近年、タンパク質をコードしない数多くの非コード RNA が同定され、それらが様々な機構で遺伝子発現を制御することが明らかとなってきた。特に核に局在する長鎖非コード RNA は、種々の細胞側因子と複合体を形成し、エピジェネティックに遺伝子発現制御するとともに、その発現変動が癌の転移とも関与することが報告されている。すなわち、核に局在する長鎖非コード RNA も極めて重要な創薬標的であるとともに、それらをノックダウン可能な siRNA は極めて有用と考えられる。しかし、核内に局在する長鎖非コード RNA をノックダウンするには、RISC の基本構成分子であり Slicer 活性を有する Ago2 が核に局在する必要がある。これまでに Ago2 の細胞内局在については十分な検討がなされておらず、また Ago2 に変異を加えることでその核移行を促進させる試みをなされていない。そこで本研究では、Ago2 の細胞内局在について検討するとともに、野生型 Ago2 を過剰発現させることで核に局在する非コード RNA の高効率ノックダウンを試みた。さらに Ago2 に核移行シグナルを付与することで、さらなるノックダウン効率の向上を目指した。

#### B. 研究方法

##### 1. リコンビナント Ago2 および siRNA の Co-transfection による標的遺伝子ノックダウンに関する検討

ホタルルシフェラーゼ発現 A549 細胞 (A549-Luc) を 96 穴プレートに、 $1 \times 10^4$  cells/well で播種した。翌日、リコンビナント Ago2 (Sino Biological) および  $\beta$ -galactosidase (Invitrogen) を Bioporter (Genlantis) を用いて A549-Luc 細胞に  $0.25 \mu\text{g}/\text{well}$  で導入した。4 時間後、培地を取り除き、ホタルルシフェラーゼに対する siRNA (siLuc) および Control siRNA (Qiagen) を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。siLuc の標的配列は以下の通りである；5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA-3'。翌日、培地交換をし、リコンビナント Ago2 を導入してから 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活

性の測定には、LT2.0 (Toyooka)を用いた。さらに定量的 RT-PCR によって mRNA 量においても検討を行うとともに、p53 遺伝子を標的とした siRNA を用いても検討を行った。

## 2. 核移行シグナルを付与した変異型 Ago2 発現プラスミドの作製

ヒト Ago2 発現プラスミド p3xFLAG-CMV10-Ago2 の HindIII/EcoRI 認識部位に、SV40 の核移行シグナル (Nuclear Localization Signal; NLS) (GRPKKKRKVG for pCMV-NLS10-Ago2, RPKKKRKVG for pCMV-NLS9-Ago2)をコードしたオリゴヌクレオチドを挿入し、pCMV-NLS10-Ago2 および pCMV-NLS9-Ago2 を作製した (Fig.2)。

## 3. 変異型 Ago2 の発現解析

上記2で作成した pCMV-NLS10-Ago2 および pCMV-NLS9-Ago2 をヒト乳癌細胞株 MCF7 細胞に Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて導入した。遺伝子導入48時間後、細胞を回収し、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific)を用いて、細胞質画分と核画分とに分離した。各画分のタンパク濃度を測定したのち、Western blotting により各画分に含まれる変異型 Ago2 量を検討した。用いた抗体は以下の通りである。Mouse anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich), Mouse anti-Lamin antibody (Sigma-Aldrich), Rabbit anti-tubulin antibody (Sigma-Aldrich)。

## 4. 核移行シグナルを付与した変異型 Ago2 の共発現による核局在性非コード RNA の高効率ノックダウンに関する検討

MCF7 細胞に、Ago2 発現プラスミドを Lipofectamine2000 で、核局在性非コード RNA である HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA)に対する siRNA (siHOTAIR)を Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。siHOTAIR の標的配列は以下の通りである; 5'-GAACGGGAGTACAGAGAGA-3'。遺伝子導入48時間後、細胞から RNA を回収し、定量的

RT-PCR により HOTAIR 発現量を定量した。用いた Primer の配列は以下の通りである。HOTAIR-F; 5'-GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC-3', HOTAIR-R; 5'-ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC-3'。

## C. 研究結果

### 1. siRNA およびリコンビナント Ago2 の Co-transfection による高効率ノックダウンに関する検討

昨年度は種々のタンパク質導入試薬を比較したところ、Bioporterが高いタンパク質導入活性を有していることを明らかにした。そこで今年度は、Bioporter を用いてリコンビナント Ago2 を導入することで、ノックダウン効率が向上するか検討した (Fig.1)。まずホタルルシフェラーゼ発現細胞に対し、ホタルルシフェラーゼに対する siRNA とともに、コントロールである  $\beta$ -galactosidase を Co-transfection した群では約 33%のノックダウン効率を示したのに対し、リコンビナント Ago2 を Co-transfection した群では、約 19%のノックダウン効率を得られた。しかし一方で siRNA のみを Transfection した場合には、約 14%のノックダウン効率を得られ、最も高いノックダウン効率を示した。またコントロール siRNA を作用させた場合、リコンビナント Ago2 を作用させた群においてルシフェラーゼ活性の低下が観察された。実際にタンパク質を Co-transfection した細胞を観察すると毒性が見られたことから、siRNA 単独群と比較し、Co-transfection による毒性がノックダウン効率に影響したものと推察された。

### 2. 野生型 Ago2 および核移行シグナルを付与した変異型 Ago2 の細胞内局在に関する検討

まず野生型 Ago2 の核ならびに細胞質局在について検討した。核および細胞質画分を回収し、Western blotting にて Ago2 の局在を検討したところ、Ago2 は細胞質のみならず核内にも局在していた (Fig.3)。核内に存在する Ago2 量は、細胞質に局在するものと比較し、1/20~1/50 であった。

そこで次に Ago2 に核移行シグナルを付与して、核内の Ago2 量を増加させることを試みた。3xFLAG を N 末端に付与するとともに、その下流に SV40 large T antigen 由来の核移行シグナルを挿入した。これらの変異型 Ago2 を過剰発現させたところ、野生型 Ago2 と比較し、タンパク質レベルでその発現量は著しく低いものであった (Fig.4)。さらに核画分と細胞質画分に分離し、その細胞内局在について検討したところ、劇的ではないものの、Ago2 の核局在量が増加していた (Fig.5)。以上の結果より、その発現効率には問題を残すものの、Ago2 に核移行シグナルを付与することで、Ago2 の核移行を向上させることに成功した。

### 3. 核移行シグナルを付与した変異型 Ago2 の過剰発現による核局在性非コード RNA HOTAIR の高効率ノックダウンに関する検討

そこで次に核局在性非コード RNA である HOTAIR の高効率ノックダウンを試みた。HOTAIR は第12番染色体 HOXC locus から転写される約 2.2kb の非コード RNA で、Polycomb repressive complex 2 (PRC2) を標的配列 (例; HoxD) にリクルートすることで、ヒストンのメチル化等を誘導し、遺伝子発現を抑制する。これまでに乳癌細胞などで高発現していること、HOTAIR を過剰発現させることで癌の転移が促進することが明らかとなっている。また HOTAIR の発現量と癌患者の予後が負の相関を示すことも報告されている。

まず HOTAIR の細胞内局在について検討したところ、核内において細胞質内と比較し 10 倍以上の HOTAIR が検出された (Fig.6)。次に siRNA を用いて HOTAIR のノックダウンを試みたところ、siRNA 単独においても約 50% のノックダウン効率を得られた (Fig.7)。それに対し、野生型 Ago2 を過剰発現させたところ、ノックダウン効率は約 30% に上昇した。しかし NLS を付与した Ago2 を過剰発現させた場合 (野生型 Ago2 と発現量をそろえるため、野生型 Ago2 発現プラスミドの約 2.6 倍量の変異型 Ago2 発現プラスミドを Transfection)、NLS9-Ago2、NLS10-Ago2 とともに有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。なお、上記と同様に HOTAIR に対する siRNA の代わりに、

p53 に対する siRNA を用いて検討したところ、野生型 Ago2 のみならず、NLS を付与した Ago2 の過剰発現においても、ノックダウン効率が約 20% 向上したことから、NLS を付与したことで Ago2 が機能を喪失したわけではないと考えられる。

### D. 考察

本研究では、siRNA とともに RISC の主要構成成分である Ago2 を過剰発現させることにより、siRNA によるノックダウン効率の向上を試みた。これまでに Ago2 を遺伝子導入により過剰発現させることでノックダウン効率を向上させる試みは報告されているが、リコンビナント Ago2 を導入することによりノックダウン効率を向上させる研究は報告されていない。Ago2 遺伝子を導入することは遺伝子治療となり臨床応用に向けてハードルが高くなることから、タンパク質として導入することを試みた。リコンビナント Ago2 を Bioporter を用いて導入したところ、 $\beta$ -galactosidase を導入した場合と比較し、有意なノックダウン効率の向上が見られたことから、Ago2 の強制発現でなくとも、細胞質内の Ago2 量を増加させることで、ノックダウン効率が向上することが明らかとなった。しかし一方で、siRNA 単独群と比較すると有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。この原因としては細胞毒性が考えられる。本検討では、Bioporter を用いてタンパク質を導入したのち、4 時間後に Lipofectamine RNAiMAX を用いて siRNA を導入した。2 回 Transfection することで細胞に対するダメージが大きくなったのかもしれない。なお、siRNA とリコンビナント Ago2 の同時 Transfection においてもノックダウン効率の向上は見られなかった。今後は低毒性で高効率なタンパク質導入法の開発が求められるものと考えられた。

次に、Ago2 を過剰発現させることで、核局在性の非コード RNA である HOTAIR の高効率ノックダウンを試みた。まず野生型 Ago2 の細胞内局在を検討したところ、細胞質と比較すると少ないものの、核内にも Ago2 が存在することが明らかとなった。実際に野生型 Ago2 を過剰発現させると、HOTAIR のノックダウン効率が有意に向上した。Ago2 は分子量約 100kDa であ

ることから、能動輸送により核内に移行しているものと予想されるが、未だその移行メカニズムは明らかとなっていない。今後 Ago2 の核移行メカニズムを明らかにすることによって、Ago2 の核局在量を増加させることが可能になるものと期待される。

次に HOTAIR の高効率ノックダウンを目指して核移行シグナルを付与した変異型 Ago2 を過剰発現させることを試みた。しかし、変異型 Ago2 は野生型 Ago2 を比較するとその発現量は有意に低いものであった。核移行シグナルを付与することで、その Conformation が変化し、細胞内のタンパク質分解経路によって分解されやすくなった可能性がある。また Transfection する Ago2 発現プラスミド量を調整し、野生型 Ago2 と変異型 Ago2 との発現量をそろえた条件で siRNA との Co-transfection を行ったが、有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。この原因としては、近年 siRNA による高効率ノックダウンには Ago2 の他に TNRC6A などのタンパク質が重要であることが報告されている。従って、Ago2 だけ核に移行させても核局在性 RNA のノックダウン効率は向上しないのかもしれない。近年、多くの非コード RNA が同定されるとともに、それらの一部が核やミトコンドリアなどの細胞内小器官に局在することが報告されている。今後、Ago2 の細胞内局在の制御は、それら非コード RNA の制御に向けて極めて重要と期待される。

siRNA は今後の革新的医薬品として積極的に基礎研究のみならず臨床研究が行われている。しかし、in vitro と比較して in vivo におけるノックダウン効率はデリバリーの問題もあるが、総じて低いことが多く、医薬品としても開発に向けてはまだ多くの問題が残されている。また siRNA による RNA 干渉は、microRNA による post-transcriptional gene silencing と同様の機構を利用しているため、siRNA を細胞内に導入することで競合阻害が起こることが報告されている。本研究で試みたように、細胞内の RNA 干渉関連分子の発現量を増加させることができれば、そのような競合阻害を回避することが可能になることから、今後更なる発展が期待される。

## E. 結論

1. siRNA に加えて、リコンビナント Ago2 を細胞内に導入することにより、 $\beta$ -galactosidase を導入した場合と比較し、ノックダウン効率の向上が見られたことから、細胞内に導入した Ago2 は機能しているものと考えられる。しかし、タンパク質を何も導入しない群の方が高いノックダウン効率を示した。これは、遺伝子導入試薬による細胞毒性によるものと予想される。
2. 野生型 Ago2 を過剰発現させることにより、核に局在する非コード RNA である HOTAIR を高効率にノックダウンすることに成功した。しかし、Ago2 の N 末端に核移行シグナルを付与したところ、Ago2 の核移行は向上したものの、翻訳効率が大きく低下した。また HOTAIR のノックダウン効率も劇的には向上しなかった。以上の結果より、Ago2 への核移行シグナルの付与には注意が必要であることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

G-1 論文発表

該当なし

G-2 学会発表

櫻井文教、南條有紀、谷野文仁、後藤平、立花雅史、水口裕之。プロモーター領域を標的とした二本鎖 RNA による RECK 遺伝子の発現活性化に関する検討。第 28 回日本 DDS 学会 2012 年 7 月 4, 5 日

谷野文仁、櫻井文教、Ong Tyng Tyng、立花雅史、水口裕之。RNA induced silencing complex (RISC) の主要構成タンパク質である Argonaute 2 (Ago2) の核移行メカニズムの解明。第 62 回日本薬学会近畿支部総会 2012 年 10 月 20 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得



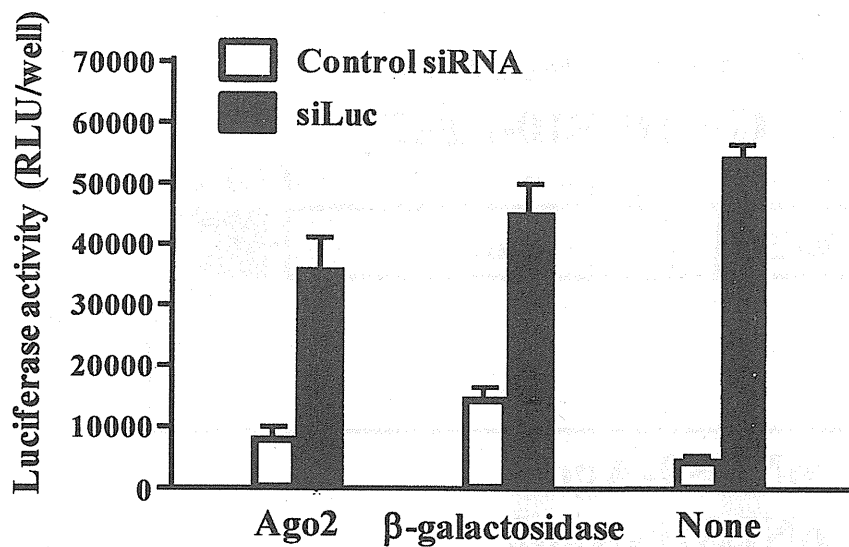
該当なし

H-2 実用新案登録

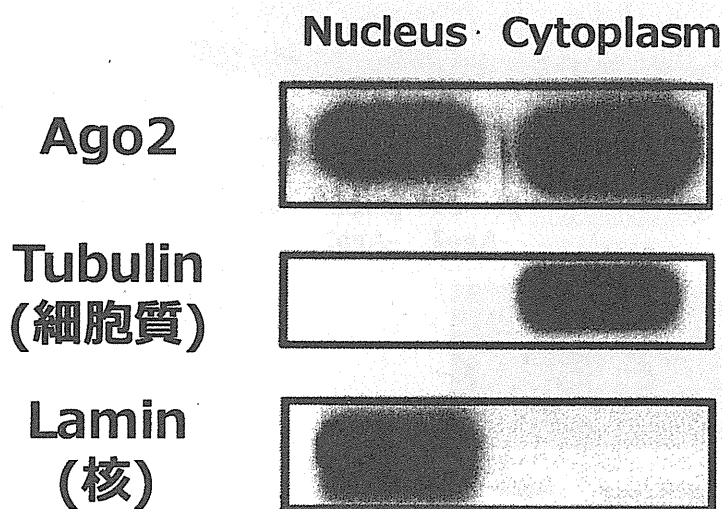
該当なし

H-3 その他

該当なし



**Fig.1 Knockdown of firefly luciferase gene by transfection with siRNA and recombinant Ago2.** A549 cells stably expressing firefly luciferase were transfected with recombinant Ago2 at 0.25 $\mu$ g/ml using Bioporter. The cells were then transfected with siRNA at 20 nM using Lipofectmine RNAiMAX 4 hr after transfection with recombinant Ago2. Firefly luciferase expression was determined following a 48 h-incubation.



**Fig.2 Intracellular localization of Ago2.** Cytoplasmic and nuclear fraction were prepared from HeLa cells. Amounts of Ago2 in the cytoplasmic and nuclear fractions were determined by Western blotting.

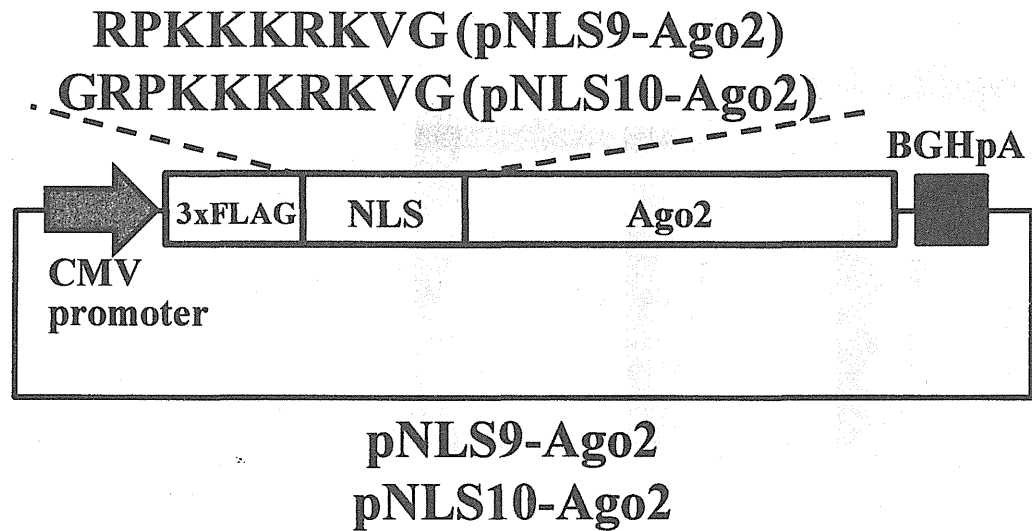


Fig.3 Schematic diagram of plasmids expressing mutant Ago2 containing NLS derived from SV40 large T antigen.

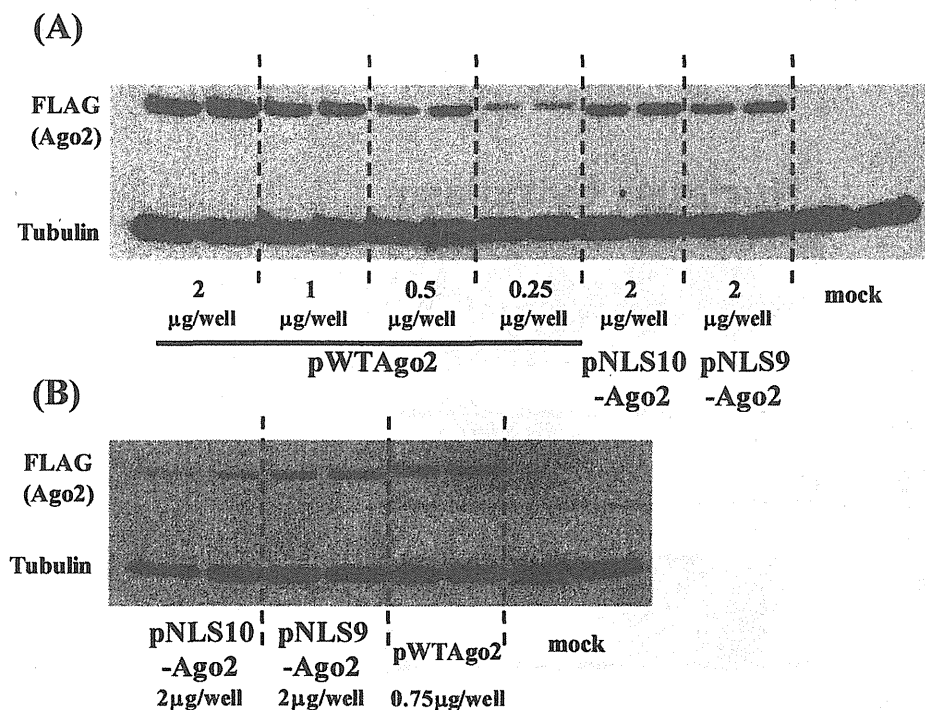
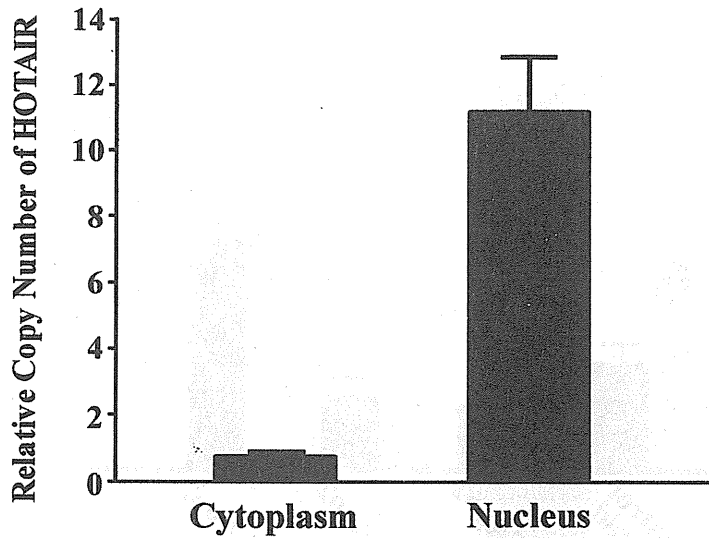
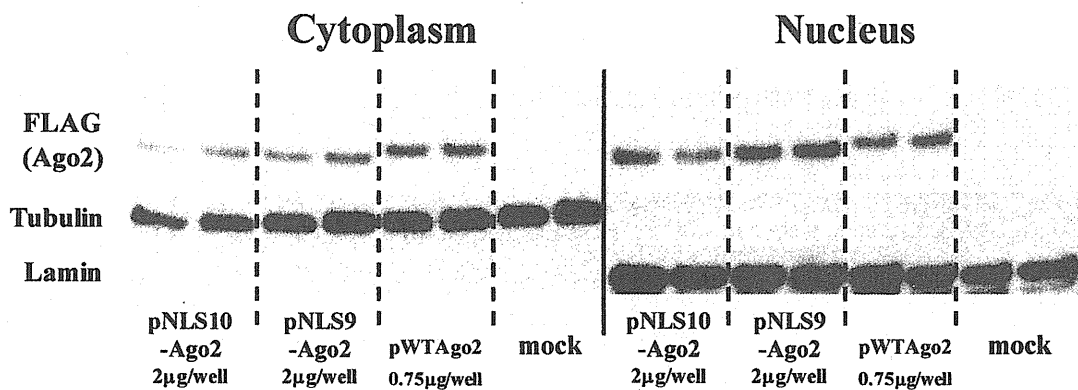


Fig.4 Expression of mutant Ago2 containing NLS following transfection with plasmids. MCF7 cells were transfected with mutant Ago2-expressing plasmids. Amounts of mutant Ago2 were evaluated by western blotting. (A) comparison of expression levels of wild-type and mutant Ago2. (B) almost comparable levels of Ago2 were found following transfection with Ago2-expressing plasmids.



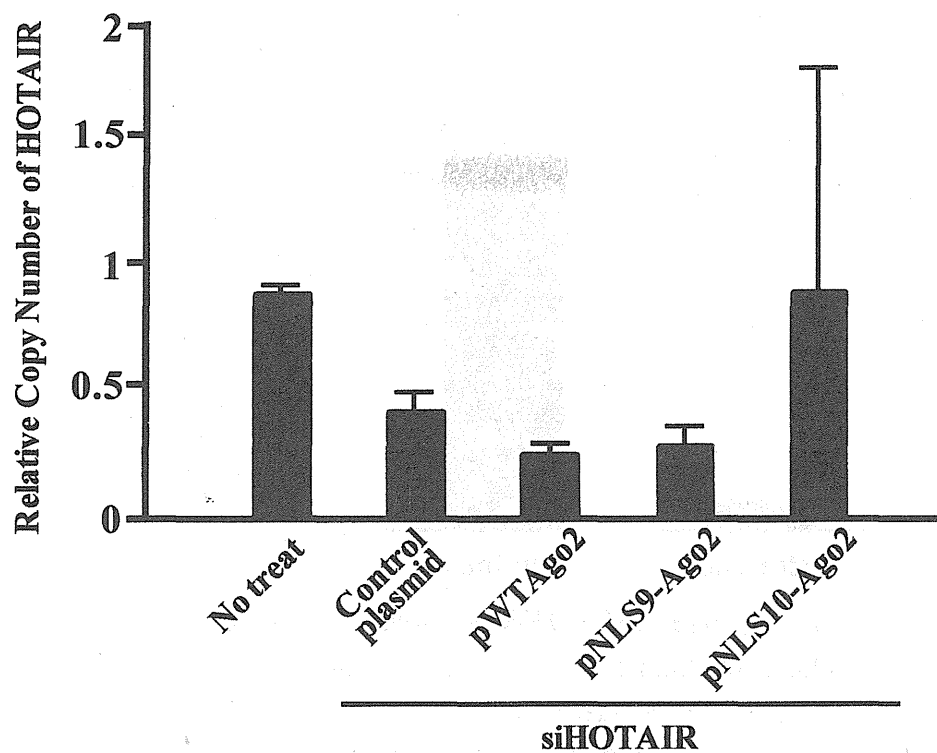
**Fig.5 Intracellular localization of HOTAIR in MCF7 cells.**

Total RNA in the cytoplasmic and Nuclear fractions were recovered from the cells. Relative copy numbers of HOTAIR were determined by real-time RT-PCR analysis. Copy numbers of HOTAIR in the cytoplasmic and nuclear fractions were normalized by those of U6 and 7SK, respectively.



**Fig.6 Intracellular localization of mutant Ago2 containing NLS in MCF7 cells.**

Cells were transfected with plasmids encoding mutant Ago2. Cytoplasmic and nuclear fractions were prepared following transfection. Amounts of Ago2 in each fraction was evaluated by western blotting.



**Fig.7** Knockdown of HOTAIR following co-transfection with siRNA and Ago2-expressing plasmids. Cells were transfected with siRNA against HOTAIR and Ago2-expressing plasmids. Copy numbers of HOTAIR was determined 48 h after transfection.

## バブルリポソームと超音波の併用による siRNA および たん白質デリバリー特性の評価に関する研究

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 准教授

### 研究要旨

バブルリポソームと超音波照射を併用した small interfering RNA (siRNA) および Argonaute2 (Ago2) の細胞質内デリバリーの可能性について評価した。今回の検討では、モデルたん白質として $\beta$ -galactosidase を用いて、バブルリポソームと超音波の併用によるデリバリー特性を評価した。その結果、バブルリポソームと超音波照射の併用により、 $\beta$ -galactosidase を細胞内に導入できることが明らかとなった。今後、siRNA と Ago2 の同時細胞質内デリバリーについて検討を行う。

### A. 研究目的

small interfering RNA (siRNA) は、標的たん白質の発現を抑制可能であることから、様々な疾患に対する副作用の少ない新たな治療法として期待されている。これに伴い、疾患に対する標的配列のスクリーニング、siRNA の安定性を向上させるための化学修飾 siRNA の開発や標的部位へのデリバリーシステムの開発が進められている。これらの背景の下、実際に臨床試験が進められている。しかし、細胞内に十分量の siRNA が導入できたとしても、siRNA 効果の発現に必要な Ago2 が枯渇し、十分な遺伝子発現抑制効果が得られない問題点が指摘されている。この問題を解決するためには、siRNA をデリバリーする際に同時に Ago2 を細胞質内に導入すればよいのではないかと考えられる。

これまでに siRNA デリバリーに関する研究は様々な行われているが、Ago2 デリバリーの研究はほとんどなされていない。それ以前にたん白質の細胞質内デリバリーの研究があまり進んでいないのが現状である。そのため、当該課題を遂行していくためには、効率よく細胞質内にたん白質をデリバリー可能なシステム開発が

必要であると考えられる。

さて、これまでに我々はリポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）への超音波照射による生じるジェット流を細胞質内への物質デリバリーの駆動力として利用する新たなデリバリーシステムを開発した。本デリバリーシステムは物理的なエネルギーを利用して細胞質内に直接外来性物質を導入することができるため、細胞種や導入したい物質の種類などに影響されないデリバリーシステムとして期待される。特に本研究課題にあるような siRNA と Ago2 の同時デリバリーに応用する上で、本方法が適しているものと考えられる。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波照射の併用による、siRNA と Ago2 の細胞内デリバリーについて検討を行う。なお、本年度はバブルリポソームと超音波照射の併用による細胞への物質導入特性を評価するため、モデルたん白質として Ago2 (106 kDa) と分子量の近い $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -gal) (116 kDa) を用い、細胞内へのデリバリー効率について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. バブルリポソームの調製方法

リポソームは逆相蒸発法により調製した。構成脂質

(total 100  $\mu\text{mol}$ )として Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) : (DSPE-PEG(2K)-OMe) = 94 : 6 (モル比) を秤取し、Chloroform: Isopropylether = 1:1 (total 8 mL) に溶解させ、PBS を 4 mL 加えた。次に、バス型ソニケーターで超音波処理し、w/o 型エマルジョンを生成し、約 60°C の水浴上でロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去した。その後、ドライアイスアセトン中で凍結融解を 3 回繰り返し、extrusion 法で平均粒子径を約 100 nm にした。このリポソーム懸濁液を脂質濃度 1 mg/mL になるよう PBS で希釈し、リポソーム 2 mL を乾熱滅菌済みのバイアル瓶に入れた。10 mL 用注射筒を用いてバイアル瓶内を 7.5 mL のパーフルオロプロパンガスで置換した。高圧蒸気滅菌したゴム栓とアルミキャップでシールし、10 mL 用シリンジと 27 G 注射針を用いて、同じガス 7.5 mL で加圧した。その後、バス型超音波照射装置で超音波照射し、バブルリポソームを調製した。

## 2. Lipofectamine2000 (LF2000) による $\beta$ -gal の細胞内への導入効率の評価

48 well plate に 4T1-Luc 細胞 (ルシフェラーゼ発現 4T1 細胞) (4T1: マウス乳癌細胞) を  $3 \times 10^4$  cells/well 播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一日培養した。その後、PBS で細胞を洗浄し、 $\beta$ -gal (0.25, 0.5, 1.0  $\mu\text{g}$ ) と LF2000 (0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{L}$ ) の複合体をそれぞれ添加した。4 時間培養後、細胞を洗浄し、過剰の $\beta$ -gal/LF2000 複合体を除去した。その後、 $\beta$ -galactosidase 活性、たん白量を測定した。

## 3. LF2000 による $\beta$ -gal 導入細胞の観察

スライドチャンパーガラスに 4T1-Luc 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well 播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一日培養した。その後、PBS で細胞を洗浄し、 $\beta$ -gal (1  $\mu\text{g}$ ) と LF2000 (2  $\mu\text{L}$ ) の複合体を添加し、4 時間培養した。細胞を洗浄し、過剰の $\beta$ -gal/LF2000 複合体を除去した。その後、X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside) 染色を行い、顕微鏡による観察を行った。

## 4. バブルリポソームと超音波照射の併用による $\beta$ -gal 細胞内導入効率の評価

2 mL チューブに懸濁状態の 4T1-Luc 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) とバブルリポソーム (総脂質量 : 60  $\mu\text{g}$ )、及び  $\beta$ -gal (50, 100  $\mu\text{g}$ ) を混合した。Opti-MEM で総量を 500  $\mu\text{L}$  にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 1.0, 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3 回) 照射した。超音波照射後、直ちに 500  $\times g$  で 2 分間遠心し細胞を沈殿させ洗浄し、余剰のバブルリポソーム、 $\beta$ -gal を除去した。この細胞を培地に再懸濁し、48 well plate に播種し、4 時間培養した。その後、 $\beta$ -galactosidase 活性、たん白量を測定した。

## 5. バブルリポソームと超音波の併用による $\beta$ -gal 導入細胞の観察

2 mL チューブに懸濁状態の 4T1-Luc 細胞 ( $2.5 \times 10^5$  cells) とバブルリポソーム (総脂質量 : 60  $\mu\text{g}$ )、及び  $\beta$ -gal (50, 100  $\mu\text{g}$ ) を混合した。Opti-MEM で総量を 500  $\mu\text{L}$  にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 1.0, 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3 回) 照射した。超音波照射後、直ちに 500  $\times g$  で 2 分間遠心し細胞を沈殿させ洗浄し、余剰のバブルリポソーム、 $\beta$ -gal を除去した。この細胞を培地に再懸濁し、スライドチャンパーガラスに播種し、4 時間培養した。その後、X-gal 染色を行い、顕微鏡による観察を行った。

## 6. LF2000 およびバブルリポソームと超音波の併用による $\beta$ -gal 導入細胞の観察

スライドチャンパーガラスに 4T1-Luc 細胞を  $1.5 \times 10^5$  cells/well 播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一日培養した。その後、PBS で細胞を洗浄し、 $\beta$ -gal (1  $\mu\text{g}$ ) と LF2000 (2  $\mu\text{L}$ ) の複合体を添加し、4 時間培養した。その後、バブルリポソーム (総脂質量 : 60  $\mu\text{g}$ ) を加え Opti-MEM で総量を 500  $\mu\text{L}$  にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 1.0, 2.0, 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 1, 3 回) 照射した。細胞を洗浄し余剰のバブルリポソームを除去し、培地を加え 1 時間培養した。その後、X-gal 染色を行い、顕微鏡による観察を行った。

## C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載。

## D. 考察

1. バブルリポソームと超音波照射の併用による細胞内への $\beta$ -gal 導入効率を評価するにあたり、ポジティブコントロールとして既存の遺伝子導入試薬であるLF2000による $\beta$ -galの細胞内への導入効率を検討した。その結果、 $\beta$ -gal/LF2000 複合体の添加量の増加に伴い、 $\beta$ -galactosidase 活性の上昇が認められた。このことから、LF2000 により $\beta$ -gal が細胞内に導入されていることが明らかとなった。

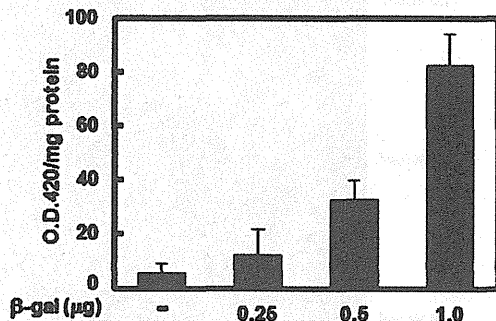


Fig.1. LF2000 による $\beta$ -gal 導入効率の検討  
 $\beta$ -gal (0.25, 0.5, 1.0  $\mu$ g) と LF2000 (0.5, 1.0, 2.0  $\mu$ L) を 4T1-Luc 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells/well) に添加し、4 時間培養した。その後、 $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

2. siRNA による効率的な遺伝子発現抑制効果を得るためには、多くの細胞に siRNA と Ago2 を導入することが必要となる。そこで、バブルリポソームと超音波照射の併用による $\beta$ -gal 導入細胞を評価するにあたり、ポジティブコントロールとして既存の遺伝子導入試薬であるLF2000による $\beta$ -gal 導入細胞の観察を行った。その結果、 $\beta$ -gal/LF2000 複合体添加群において、X-gal 染色により青く染まった細胞が

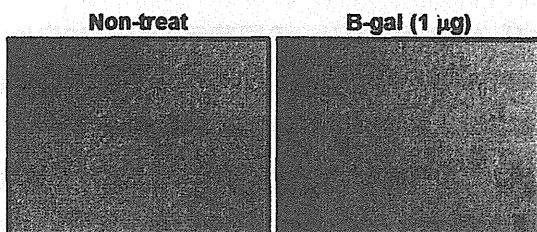


Fig.2. LF2000 による $\beta$ -gal 導入細胞の観察  
 $\beta$ -gal (1.0  $\mu$ g) と LF2000 (2.0  $\mu$ L) を 4T1-Luc 細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/well) に添加し、4 時間培養した。その後、X-gal 染色を行い顕微鏡による観察を行った。

観察されたが、その細胞は一部であった。このことから、LF2000 は一部の細胞に $\beta$ -gal を導入していることが明らかとなった。

3. バブルリポソームと超音波照射の併用による細胞内への $\beta$ -gal 導入効率について検討した。 $\beta$ -gal 添加量を 50  $\mu$ g もしくは 100  $\mu$ g とした。これまでの本研究室での研究において、超音波照射強度は遺伝子やたん白質の細胞内への導入効率に影響を与える重要なパラメーターであることを確認している。そのため、1.0 W/cm<sup>2</sup> および 2.0 W/cm<sup>2</sup> の超音波照射強度における $\beta$ -gal 導入効率を検討した。その結果、超音波照射強度の増大に伴い $\beta$ -galactosidase 活性の上昇が認められた。また、50  $\mu$ g の $\beta$ -gal を添加した群と比較し、100  $\mu$ g の $\beta$ -gal を添加した群でより高い $\beta$ -galactosidase 活性が認められた。これらの結果から、バブルリポソームと超音波照射による $\beta$ -gal の細胞内への導入効率は超音波照射強度および $\beta$ -gal 添加量依存적であることが明らかとなった。Ago2 の細胞内への導入においても、同様に超音波照射強度およびたん白質添加量が重要なパラメーターとなると考えられる。

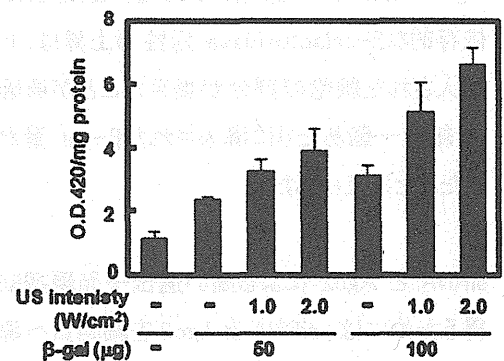


Fig.3. バブルリポソームと超音波による $\beta$ -gal 導入効率の検討  
4T1-Luc 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/tube) に $\beta$ -gal (50, 100  $\mu$ g) およびバブルリポソーム (60  $\mu$ g) を加え、超音波照射した。超音波照射条件は Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2.0 Hz, Intensity : 1.0, 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3 回で検討した。細胞を洗浄し、4 時間培養後、 $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

4. バブルリポソームと超音波照射による $\beta$ -gal 導入細胞を検討した。 $\beta$ -gal 添加量を 50  $\mu$ g もしくは 100  $\mu$ g とし、1.0 W/cm<sup>2</sup> および 2.0 W/cm<sup>2</sup> の超音波照射強度における $\beta$ -gal 導入細胞を評価した。その結果、



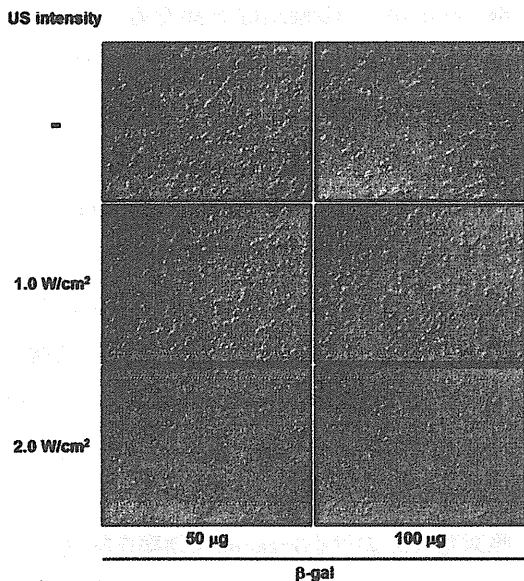


Fig.4. バブルリポソームと超音波によるβ-gal 導入細胞の観察

4T1-Luc 細胞 ( $2.5 \times 10^5$  cells/tube) にβ-gal (50, 100 μg) およびバブルリポソーム (60 μg) を加え、超音波照射した。超音波照射条件は Frequency : 2 MHz、Duty : 50%、Burst Rate : 2.0 Hz、Intensity : 1.0, 2.0 W/cm<sup>2</sup>、Time : 10 sec. 3回で検討した。細胞を洗浄し、培地で再懸濁しスライドチャンバーガラスに播種した。4時間培養した後、X-gal 染色を行い顕微鏡による観察を行った。

X-gal 染色により青く染まっている細胞が一部観察された。しかしながら、β-gal 添加量、超音波照射強度の増加に伴う、X-gal により染色された細胞の割合の増大は認められなかった。このことから、Fig.3 で観察されたβ-gal 添加量、超音波照射強度依存的なβ-galactosidase 活性の上昇は、β-gal が導入された細胞の割合が増えたことが原因ではなく、細胞一個あたりに導入されたβ-gal 量が増加したためと考えられた。

5. siRNA と Ago2 による高い遺伝子発現抑制効果を得るためには、siRNA と Ago2 を細胞質へ導入することが必要となる。一般的にエンドサイトーシス経路を介した核酸、たん白質デリバリーでは、エンドソームからリソソームに輸送され分解を受けるために、細胞質への移行量が減少してしまう。これまでに、バブルリポソームと超音波照射の併用は、遺伝子キャリアーのエンドソームエスケープを促進し、遺伝子発現効率を上昇させることを明らかとしている。そこで、LF2000 によりβ-gal を細胞内へ取り込ませた後に、バブルリポソームと超音波照射を併用した際のβ-gal 導入細胞について観察した。その

結果、LF2000 によりβ-gal を導入した群と比較し、バブルリポソームと超音波照射を併用した群での、X-gal 染色により青く染まった細胞の割合が若干増加した。このことから、β-gal を細胞内に取り込ませた後に、バブルリポソームと超音波を併用することで、リソソームによる分解を回避し、細胞質へ効率的にデリバリーできることが示唆された。

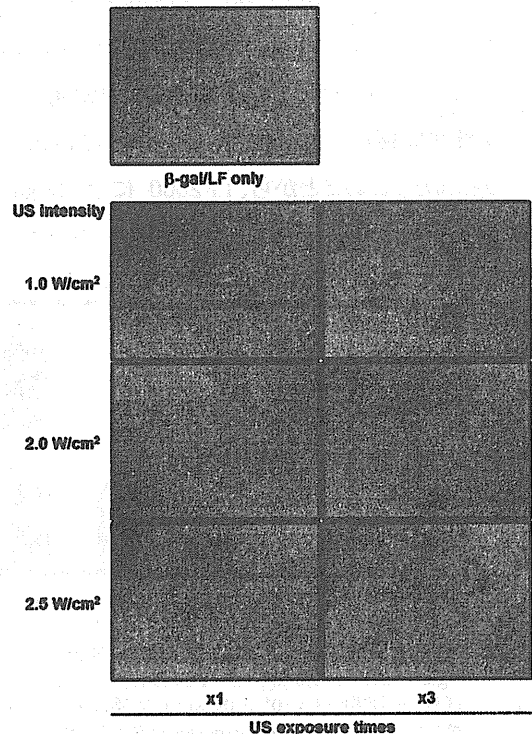


Fig.5. LF2000 およびバブルリポソームと超音波の併用によるβ-gal 導入細胞の観察

4T1-Luc 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) にβ-gal (1 μg) と LF2000 (1 μL) の複合体を添加し、4時間培養した。その後、バブルリポソーム (60 μg) を加え、超音波照射した。超音波照射条件は Frequency : 2 MHz、Duty : 50%、Burst Rate : 2.0 Hz、Intensity : 1.0, 2.0, 2.5 W/cm<sup>2</sup>、Time : 10 sec. 3回で検討した。細胞を洗浄し、培地で再懸濁しスライドチャンバーガラスに播種した。1時間培養した後、X-gal 染色を行い顕微鏡による観察を行った。

## E. 結論

バブルリポソームと超音波照射の併用による siRNA および Ago2 デリバリーの同時デリバリーに向けた基礎的な検討を行った。バブルリポソームと超音波照射の併用による細胞への物質導入特性を評価するため、モデルたん白質として Ago2 (106 kDa) と分子量の近いβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) (116 kDa) を用い、細胞内へのデリバリー効率について評価した。その結果、バブルリポソームと超音波により細胞内へβ-gal が導入可

能であることが明らかとなった。しかしながら、LF2000と比較し、バブルリポソームと超音波による  $\beta$ -gal 導入効率、 $\beta$ -gal 導入細胞の割合は低いことが確認された。今後、超音波照射条件の更なる最適化が必要と考えられ、LF2000 は *in vivo* ではその効果がほぼ得られないことが知られている。そのため、*in vivo* における効果を考えた場合には、LF2000 よりも本デリバリー法が有用である可能性がある。また、バブルリポソームと超音波照射により、 $\beta$ -gal のエンドソームエスケープを促進できる可能性が示された。

今回の検討から、バブルリポソームと超音波による siRNA と Ago2 たん白質の同時デリバリーも十分に可能であると考えられる。また、siRNA と Ago2 たん白質のエンドソームエスケープ促進に伴う遺伝子発現抑制効果の増強も期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G-1 論文発表

1. Negishi Y, Hamano N, Shiono H, Akiyama S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: The development of an ultrasound-mediated nucleic acid delivery system for treating muscular dystrophies. *Yakugaku Zasshi*, 132: 1383-1388 (2012)
2. Negishi Y, Hamano N, Tsunoda Y, Oda Y, Chojamts B, Endo-Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Emoto M, Aramaki Y.: AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature. *Biomaterials*, 34: 501-507 (2013)
3. Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Matsuki Y, Kato Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: Systemic delivery systems of angiogenic gene by novel bubble liposomes containing cationic lipid and ultrasound exposure. *Mol. Pharm.*, 9:1834-1840 (2012)
4. Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T.: Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation. *J. Ophthalmol.*, 2012: 412752 (2012)
5. Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Involvement of Ca<sup>2+</sup> and ATP in enhanced gene delivery by bubble liposomes and ultrasound exposure. *Mol. Pharm.*, 9: 1017-1023 (2012)
6. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: Enhanced gene delivery using Bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes. *J. Drug Target.*, 20: 355-363 (2012)
7. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Efficient suppression of murine intracellular adhesion molecule-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation. *Hepatology*, 56: 259-269 (2012)
8. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama k.: Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *J. Control. Release*, 160: 362-366 (2012)
9. Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Kato Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound. *Int. J. Pharm.* 422: 504-509 (2012)
10. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y.: Gene delivery system involving Bubble liposomes and ultrasound for the efficient *in vivo* delivery of genes into mouse tongue tissue. *Int. J. Pharm.* 422: 332-337 (2012)

## G-2 学会発表

1. 小俣大樹、鈴木 亮、小田雄介、澤口能一、生井栄佑、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波を利用した肝臓への低侵襲的遺伝子導入における特性評価、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
2. 小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、脳への遺伝子導入効率におよぼすバブルリポソーム構成脂質の影響、日本薬学会第 133 年会、横浜、3 月 27-30 日
3. 鈴木 亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、丸山一雄、ナノテクノロジーが拓く新たな超音波診断・治療技術、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日、招待講演
4. 澤口能一、小田雄介、小俣大樹、鈴木 亮、萩沢康介、丸山一雄、超音波、バブルリポソーム併用血栓溶解療法の基礎的検討、日本薬学会第 133 年会、横浜、3 月 27-30 日
5. 鈴木 亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、丸山一雄、樹状細胞がん免疫療法における超音波抗原デリバリー法の有用性評価、第4回超音波分子診断治療研究会、福岡、2013 年 3 月 2 日
6. 鈴木 亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用によるがん温熱療法と免疫系の関係、超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム、東京、2012 年 12 月 15 日
7. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Kazuo Maruyama, Toward “theranostics” with ultrasound technology、中華民国超音波医学会、台北(台湾)、2012 年 10 月 20-21 日、招待講演
8. 鈴木 亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、丸山一雄、ナノバブルを利用した超音波がん治療と免疫療法の併用による低侵襲的がん治療法の構築に関する基礎的検討、日本超音波治療学会、宮崎、2012 年 11 月 17 日
9. 鈴木 亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波を併用したがん組織への遺伝子デリバリー、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台、2012 年 9 月 24-26 日
10. 山村 翔、根岸洋一、濱野展人、小俣大樹、奥津大輔、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新槇幸彦、バブルリポソームと高密度焦点式超音波による骨格筋への遺伝子導入法の基礎的検討、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台、2012 年 9 月 24-26 日
11. 根井彰浩、根岸洋一、高橋佐慧子、小俣大樹、鈴木 亮、丸山一雄、野水基義、新槇幸彦、核移行シグナルペプチド内封 AG73 修飾リポソームによる新規遺伝子デリバリーツールの開発、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台、2012 年 9 月 24-26 日
12. 鈴木 亮、丸山一雄、ナノ気泡と超音波照射の併用による遺伝子送達法を利用したがん遺伝子治療、日本癌学会、横浜、2012 年 9 月 19-21 日
13. 小俣大樹、根岸洋一、鈴木 亮、丸山一雄、野水基義、新槇幸彦、超音波技術を利用した AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入法の開発、第 21 回 DDS カンファランス、静岡、2012 年 9 月 1 日
14. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Tomoyuki Naoi, Kazuo Maruyama, Assessment of antigen delivery directly into cytosol of dendritic cells by the combination of liposomal bubbles and ultrasound、WMIC2012、ダブリン(アイルランド)、2012 年 9 月 5-8 日
15. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Kazuo Maruyama, Enhancement of anti-tumor effect by the combination of ultrasound mediated mild hyperthermia and immunotherapy、ICHO&JCTM 2012、京都、2012 年 8 月 29-31 日

16. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Kazuo Maruyama, Enhancement of anti-tumor effect by the combination of ultrasound mediated mild hyperthermia and immunotherapy, ICHO&JCTM 2012、京都、2012年8月28-31日
17. 丸山一雄、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、鈴木 亮、バブルリポソームを用いた造影と治療、第28回日本DDS学会、札幌、2012年7月4-5日
18. 鈴木 亮、リポソーム技術を駆使した超音波DDSの開発、日本DDS学会、札幌、2012年7月4-5日、奨励賞受賞
19. 根井彰浩、根岸洋一、小俣大樹、山村 翔、高橋葉子、濱野展人、鈴木 亮、丸山一雄、新楨幸彦、バブルリポソームと超音波併用によるペプチド修飾リポソームの遺伝子導入増強効果、日本超音波医学会 第85回学術集会、2012年5月25-27日
20. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Effective gene delivery system with sonoporation for cancer gene therapy、ASGCT2012、Philadelphia(米国)、2012年5月16-19日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### H-1 特許取得

なし

##### H-2 実用新案登録

なし

##### H-3 その他

なし

#### I. 研究協力者

小田 雄介

平田 圭一

宇留賀 仁史

関 むつみ