

201209012B

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 23 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 25(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 23 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 25(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 .....15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....30

「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

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は黄斑網膜変性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、以下の成果を得た。①siRNA 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を誘導することに成功した。②市販の各種タンパク質導入試薬の中で、Bioporter がタンパク質導入効率に優れていた。③siRNA とリコンビナント Ago2 を細胞内導入したが、ノックダウン効率の大きな改善は観察されなかった。④Ago2 を過剰発現させることで、核局在性の非コード RNA も高効率にノックダウン可能であったが、Ago2 に核移行シグナルを付与しても大きな効果は見られなかった。

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  
後藤 平 大阪大学大学院薬学研究科  
大学院生  
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.1)。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 発現プラスミドを 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、一方でプラスミド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。

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. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターの作製

ヒト Ago2、Exportin-5、および TRBP 遺伝子のクローニングは、以下の通り行った。HeLa 細胞もしくは 293 細胞より回収した RNA を用いて逆転写反応を行うことにより、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、RT-PCR を行うことにより、各遺伝子を回収した。Ago1、Ago2 および TRBP 遺伝子に関しては、pcDNA3.1-hygro(+) にクローニングした。その後、Ago1、Ago2 および TRBP 遺伝子を pcDNA3.1-hygro(+) より切り出し、pHM15-CMV にライゲーションした (pHM15-CMV-Ago1、pHM15-CMV-Ago2 および pHM15-CMV-TRBP)。Exportin-5 遺伝子については、pHM15-CMV に直接クローニングした (pHM15-CMV-Exp5)。

各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターに関しては、以下のように作製した。まず、pAdHM23 を XbaI で消化したのち (プラスミドの backbone に XbaI サイト有り)、Klenow で処理すること

によりXbaIサイトを欠損させた。その後、E3 遺伝子欠損領域に存在するCsp45IサイトをXbaIサイトに変更することにより、pAdHM23XbaIを作製した。pAdHM23XbaIをXbaIで消化したのち、AvrIIで消化したpHM15-CMV-Ago1, pHM15-CMV-Ago2, -Exp5, -TRBPとそれぞれライゲーションすることにより、pAdHM23-Ago1, -Ago2, -Exp5, -TRBPを作製した。さらに作製したプラスミドを、I-CeuI/PI-SceIで消化したのち、同じくI-CeuI/PI-SceIで消化したpHM5-hU6-siL(ホタルルシフェラーゼに対するshRNA発現プラスミド)とライゲーションすることにより、pAdHM23-siL-Ago1, -Ago2, -Exp5, -TRBPを作製した(Fig.2)。

作製した上記Adベクタープラスミドを、PacIで消化したのち、293細胞にトランスフェクションすることにより、Adベクターを回収した。Adベクターの増幅・精製・タイター測定については、定法に従った。

## 2. 上記AdベクターによるRNA干渉誘導に関する

96wellプレートにホタルルシフェラーゼ安定発現A549細胞を $1 \times 10^4$  cells/wellで播種した。翌日、各種shRNA発現Adベクターを1000 vector particle (VP)/cellで1.5時間作用させた。Adベクター作用より48時間後、LT2.0(東洋インキ社より購入)を用いて、ルシフェラーゼ発現量を測定した。

## 3. 各種タンパク質導入試薬のタンパク質導入効率の比較検討

24穴プレートにA549細胞を $5 \times 10^4$  cells/wellで播種した。翌日、市販の各種タンパク質導入試薬(Lipofectamine2000, SAINT-PhD, X-fect protein, Bioporter)を用いて、 $\beta$ -galactosidase(分子量約116kDa)をTransfectionした。Transfectionより24もしくは48時間後、X-gal stainingにより、細胞内導入された $\beta$ -galactosidase量を評価した。

## 4. 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。

## 5. 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.3)。

## 6. 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)。

## 7. 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. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターの作製による RNA 干渉誘導に関する検討

shRNA による RNA 干渉においては、まず核内において shRNA が転写されたのち、Exportin-5 を介して細胞質に輸送される。細胞質に輸送された shRNA は、細胞質内で Dicer で分解を受けたのち、Ago2 とともに RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。最終的に、RISC が標的 mRNA に結合することにより、mRNA を分解し遺伝子発現を抑制する (Fig.1)。まず本研究では、shRNA による遺伝子発現抑制に関与する分子のなかで、どの分子がノックダウン効率向上に向けて重要か検討した。具体的には、shRNA とともに RNA 干渉に関与する分子を過剰発現させ、ノックダウン効率を検討した。

ホタルルシフェラーゼを安定に発現する A549 細胞に対し、作製した Ad ベクターを種々の MOI で作用し、ノックダウン効率を検討した。その結果、従来の shRNA 発現 Ad ベクター (shRNA 以外は発現しない)

では、1000 VP/cell で約 46% のノックダウン効率を示した (Fig.4)。それに対し、Ago2 を発現する Ad ベクターでは、60% のノックダウン効率と、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し、優れたノックダウン効率を示した。なお、TRBP もしくは Exportin-5 を過剰発現させた場合においては、有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。

Ago2 を過剰発現させることによりノックダウン効率の向上が得られたことから、さらに Ago1 と Ago2 において過剰発現によるノックダウン効率の向上について検討を加えた (Fig.5)。その結果、上述のように Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率の向上が観察されたが、一方で Ago1 を過剰発現させた場合においてはむしろノックダウン効率が低下する結果が得られた。これは、過剰発現により細胞内 Ago1 量が増加したことにより、Ago1 に取り込まれた siRNA が増加し、Ago2 と結合した siRNA が減少したためと考えられた。

### 2. 各種タンパク質導入試薬のタンパク質導入効率の比較検討

次にリコンビナント Ago2 の細胞内導入に向けて、どのタンパク質導入試薬が最も高効率に導入可能か検討するため、Ago2 とほぼ分子量が同じである  $\beta$ -galactosidase を用いて、市販のタンパク質導入試薬の細胞内導入効率を検討した (Fig.6)。タンパク質導入 24 時間後ならびに 48 時間後における  $\beta$ -galactosidase 活性を X-gal 染色で検討したところ、24 時間後では X-*fect* protein および Bioporter の群で顕著な X-gal 陽性細胞が観察された。しかし、48 時間後では Bioporter 群では 24 時間後と同様に多くの X-gal 陽性細胞が観察されたものの、X-*fect* protein 群では X-gal 陽性細胞群は見られなかった。そこで以後の検討では、Bioporter をリコンビナント Ago2 の導入試薬として使用することとした。

### 3. 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.7)。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。

#### 4. 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.8)。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.9)。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.10)。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。

#### 5. 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.11)。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.12)。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

siRNA は次世代の革新的医薬品として期待されているが、その実用化に向けては克服すべき多くの問題点が残されている。それら問題点の中で最も克服



すべきは、そのノックダウン効率である。siRNA は培養細胞においては高いノックダウン効率を示すが、*in vivo* においては様々な要因から、総じてノックダウン効率は *in vitro* と比較すると低くなる。これを克服する方策としては、DDS 技術を活用して高効率に siRNA を導入する必要性が以前より提唱されているが、依然として画期的な DDS 技術は開発されていない。もう一つの方策としては siRNA の細胞内導入量が少なくても、高いノックダウン効率を得られるように siRNA の活性を上げることが挙げられる。siRNA の活性を上げる手段としては、siRNA を化学修飾もしくは構造を改良することにより、ノックダウン効率を改善させる方法と、RNA 干渉に関与する分子を過剰発現させることによりノックダウン効率を改善する方法とが考えられる。特に近年、RNA 干渉に関与する分子が数多く同定されるとともに、それらの分子を過剰発現させることで実際にノックダウン効率が改善することが報告されてきた。そこで本研究では、まず RNA 干渉に関与する分子のうち、どの分子を過剰発現させることが最も効果的か検討した。さらに、その分子のリコンビナントタンパク質を導入することにより、ノックダウン効率の向上が可能かどうか検討した。

まず RNA 干渉に関与する分子のうち、どの分子がノックダウン効率向上に向けて重要か検討するために、アデノウイルスベクターゲノムに siRNA の前駆体である shRNA 発現カセットと各種 RNA 干渉関連分子発現カセットを、それぞれ E1 および E3 欠損領域に搭載し、そのノックダウン効率を検討した。その結果、Ago2 を共発現させた場合、最も高いノックダウン効率を得られた。同様の結果は他のグループからも報告されており、細胞内 Ago2 量がノックダウン効率を決定する最も大きな因子と考えられる。Ago2 は哺乳類で 4 種存在する Ago タンパク質の中で唯一 Slicer 活性 (RNA 切断活性) を有する Ago タンパク質であることから、Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率が向上したものと考えられる。

次に過剰発現させることでノックダウン効率の向上が見られた Ago2 のリコンビナントタンパク質を導入することで、ノックダウン効率の向上が可能かどうか検

討した。リコンビナント Ago2 の導入に先立ち、どのタンパク質導入試薬が最も導入効率が良いか、リコンビナント  $\beta$ -galactosidase を用いて検討した。 $\beta$ -galactosidase は分子量 116KDa と、Ago2 (分子量 100KDa) と分子量が近いことから使用することとした。その結果、Bioporter が最も高い導入効率を示した。そこで以後の実験は Bioporter を用いることとした。X-fect protein reagent では 24 時間後では多くの X-gal 陽性細胞が観察されたものの、48 時間後ではほとんど観察されなかった。これは X-fect protein reagent の場合、 $\beta$ -galactosidase が細胞表面に吸着するものの、48 時間後では内在化されずに失活してしまったものと考えられる。

上記の検討より細胞内の 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

る、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 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、ノックダウン効率を向上させることに成功した。
2. 市販のタンパク質導入試薬の中で、Bioporter が最も Ago2 の細胞内導入に適していることが示唆された。
3. 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。
4. 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

南條有紀、櫻井文教、谷野文仁、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 第11回アンチセンス・遺伝子・デリバリー  
シンポジウム 2011 2011年9月1, 2日

南條有紀、櫻井文教、谷野文仁、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。第 61 回日本薬学会近畿支部総会 2011 年 10 月 22 日

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

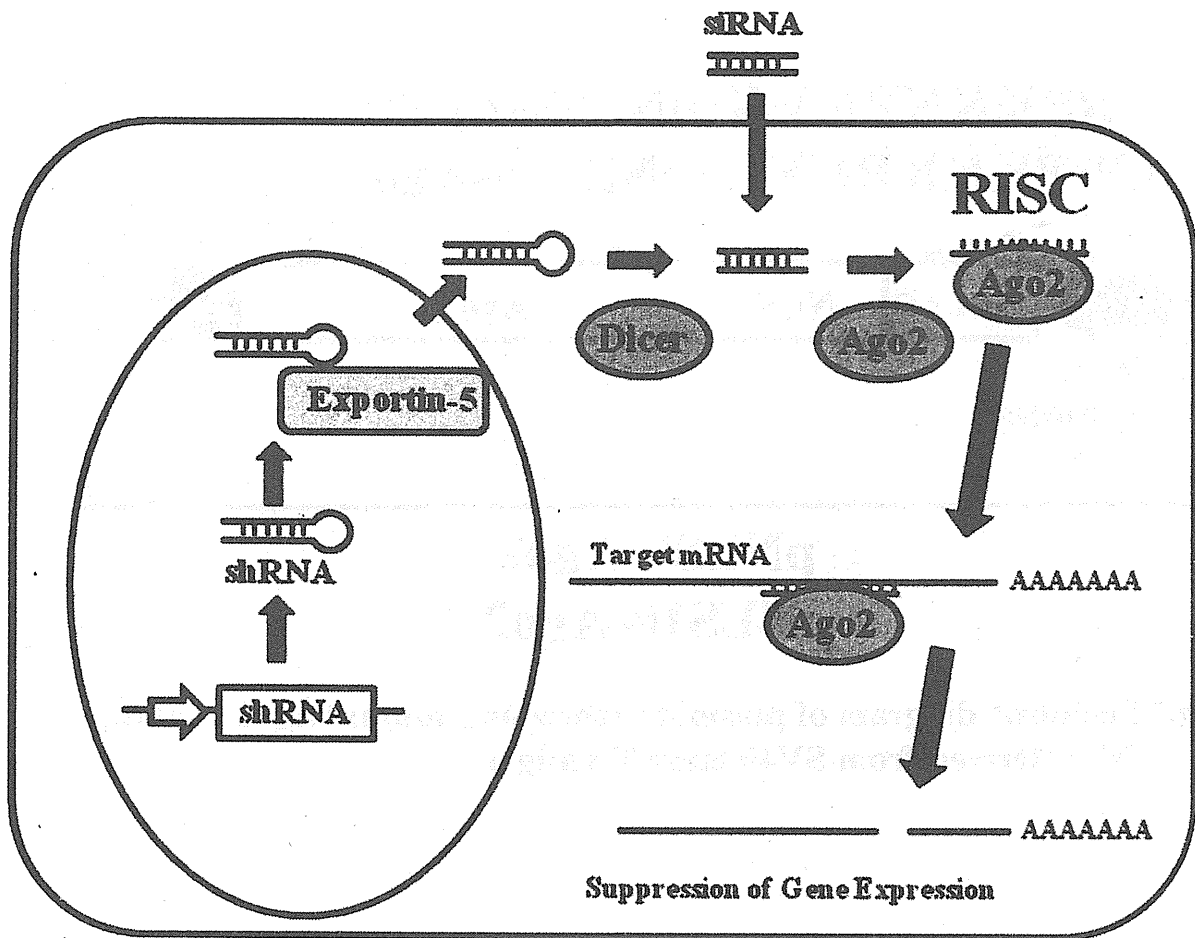
該当なし

##### H-2 実用新案登録

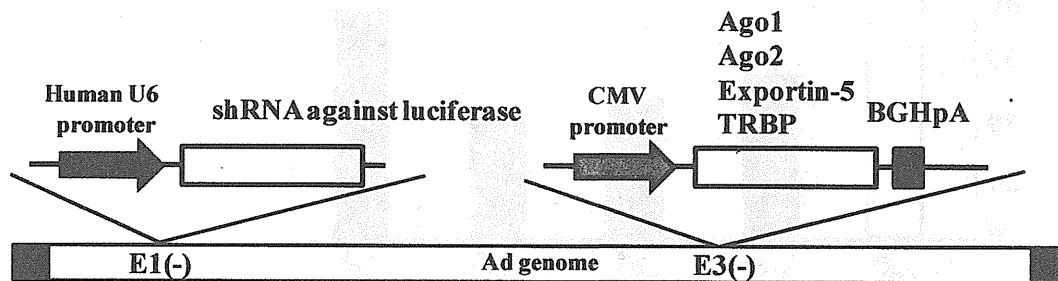
該当なし

##### H-3 その他

該当なし

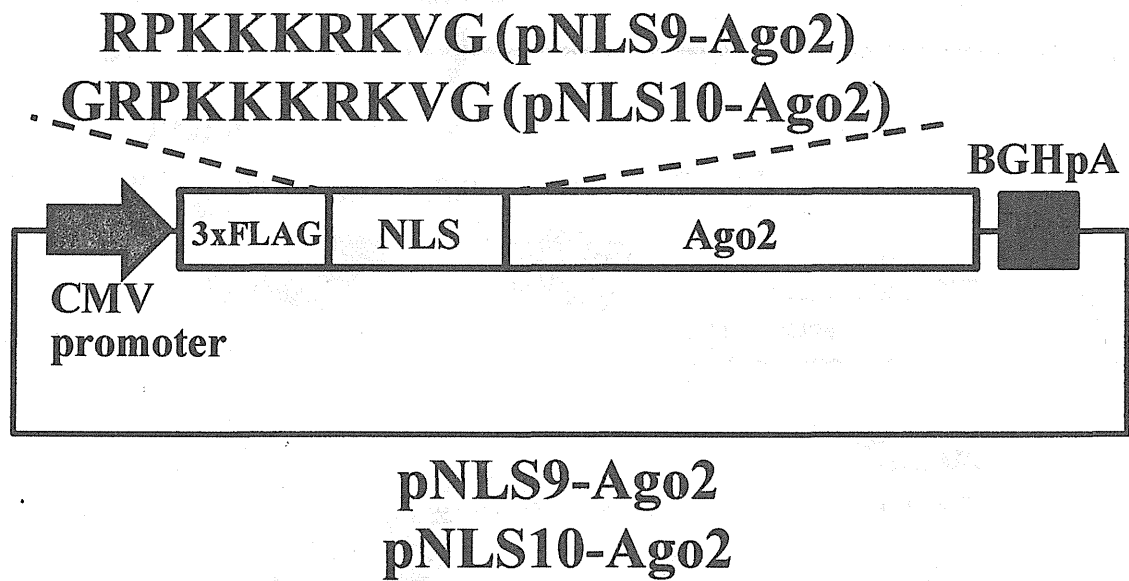


**Fig.1 Mechanism of RNA interference.**

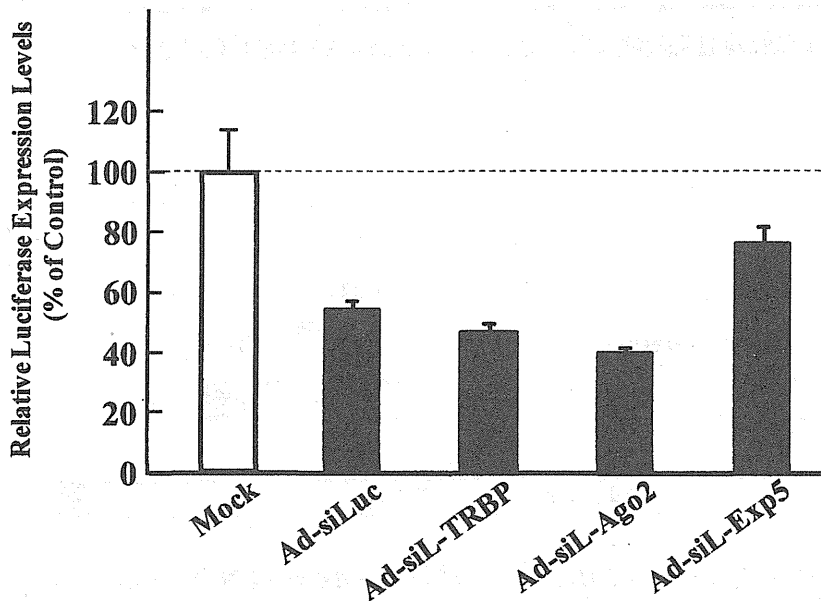


**Fig.2 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.**

Ago; Argonaute.

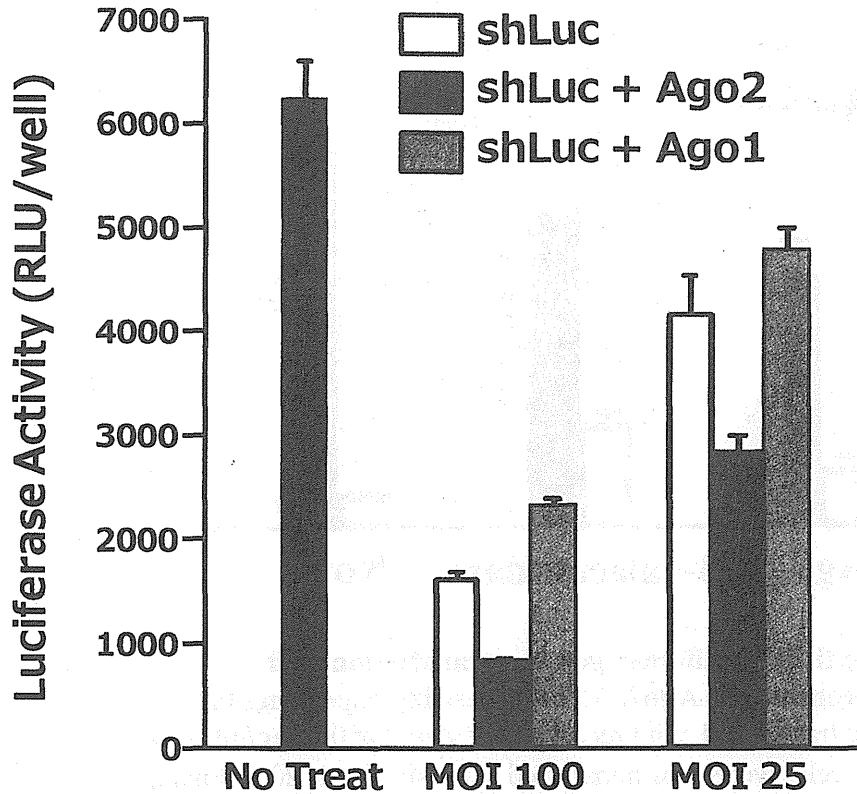


**Fig.3** Schematic diagram of plasmids expressing mutant Ago2 containing NLS derived from SV40 large T antigen.

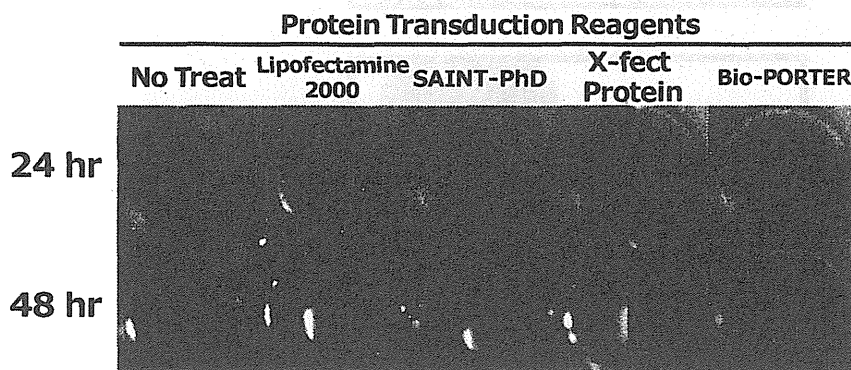


**Fig.4** shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase expression following transduction with the Ad vectors expressing shRNA and RNAi-related proteins.

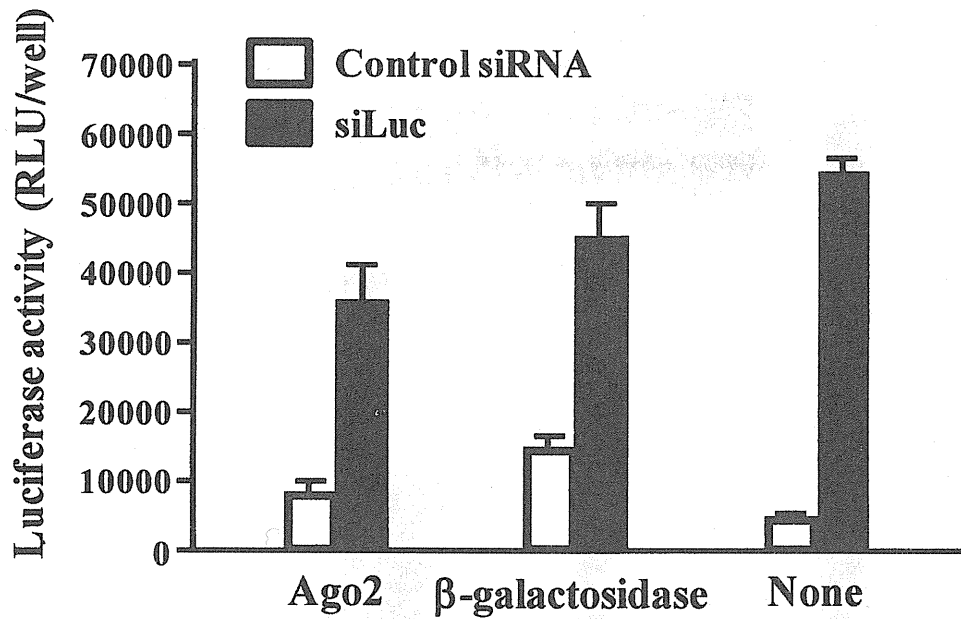
Firefly luciferase-expressing A549 cells were transduced with the Ad vectors at 1000 VP/cell. Firefly luciferase expression was determined 48 h after transduction.



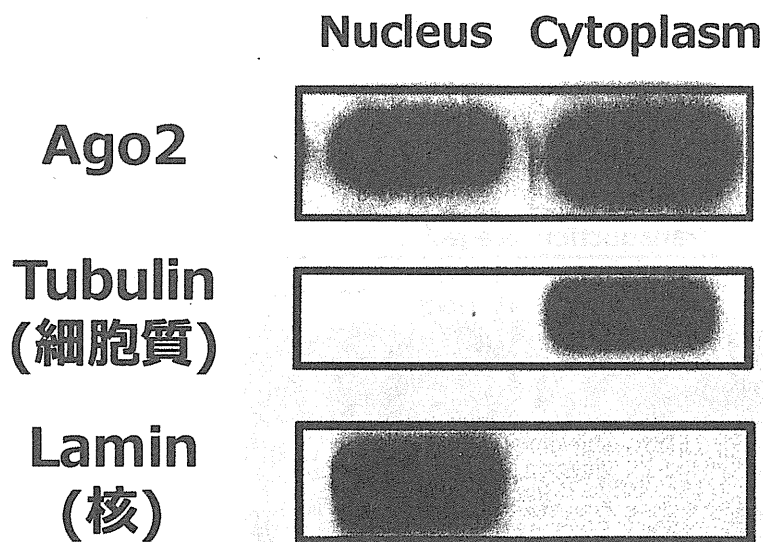
**Fig.5** shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase following transduction with an Ad vectors expressing shRNA against firefly luciferase and Ago1 or Ago2. Firefly luciferase-expressing A549 cells were transduced with an Ad vector at MOI 25 and 100. Luciferase expression was determined 48 hr after transduction.



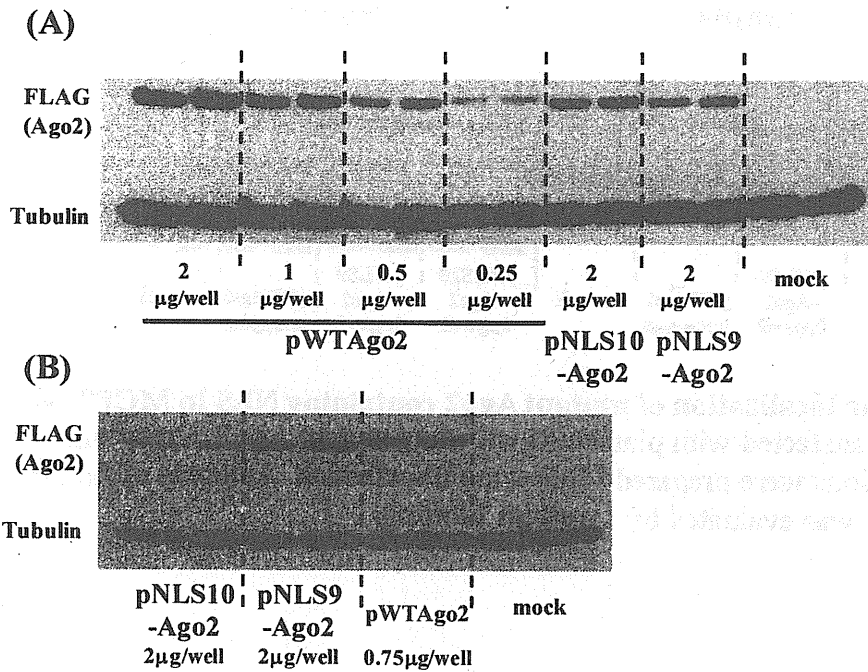
**Fig.6** Comparison of transfection efficiencies of protein-transfection reagents following transfection into A549 cells. A549 cells were transfected with recombinant  $\beta$ -galactosidase (2.4  $\mu$ g/well). X-gal staining was carried out 24 and 48 hr after transfection.



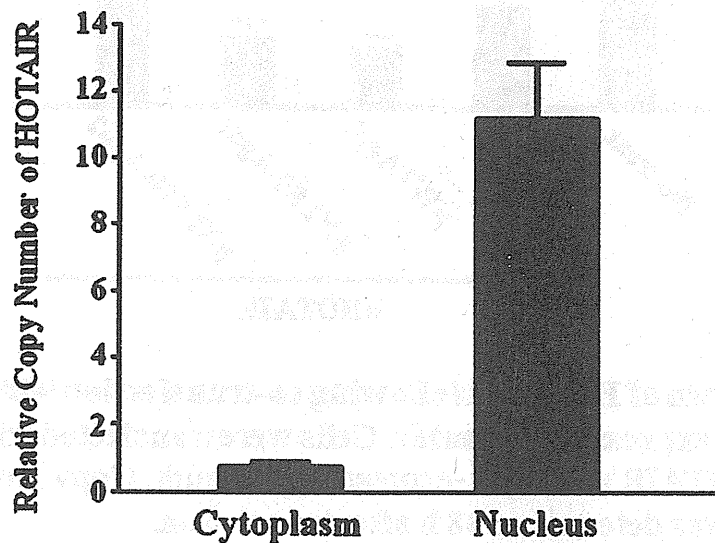
**Fig.7** Knockdown of firefly luciferase gene by transfection with siRNA and recombinant Ago2. A549 cells stably expressing firefly luciferase were transfected with recombinant Ago2 at 0.25 $\mu$ g/ml using Bioporter. The cells were then transfected with siRNA at 20 nM using Lipofectmine RNAiMAX 4 hr after transfection with recombinant Ago2. Firefly luciferase expression was determined following a 48 h-incubation.



**Fig.8** 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.

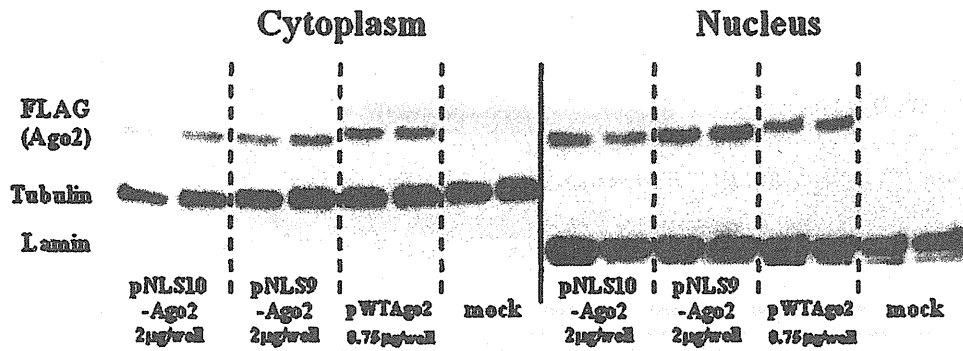


**Fig.9** Expression of mutant Ago2 containing NLS following transfection with plasmids. MCF7 cells were transfected with mutant Ago2-expressing plasmids. Amounts of mutant Ago2 were evaluated by western blotting. (A) comparison of expression levels of wild-type and mutant Ago2. (B) almost comparable levels of Ago2 were found following transfection with Ago2-expressing plasmids.

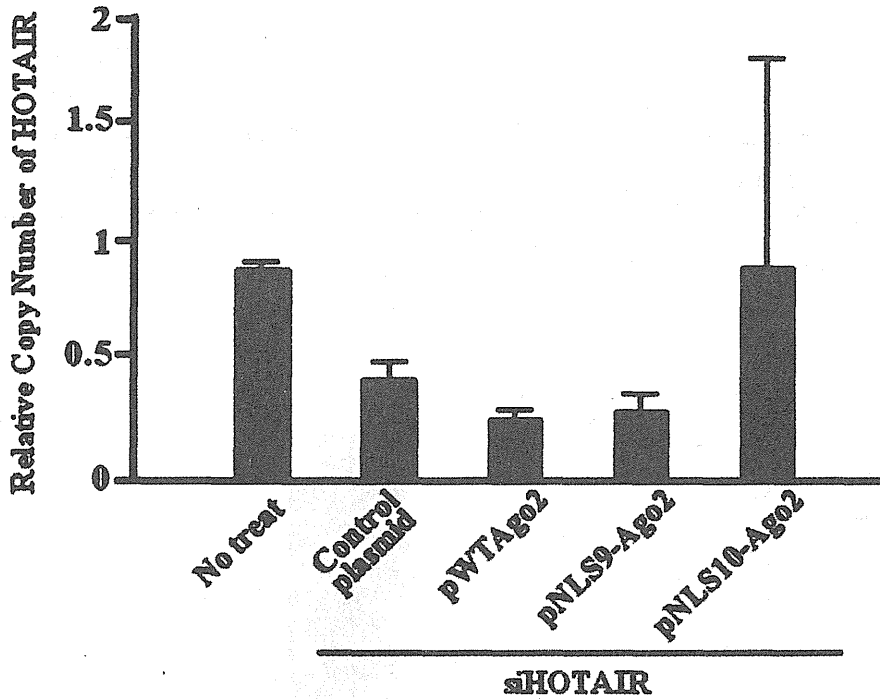


**Fig.10** Intracellular localization of HOTAIR in MCF7 cells. Total RNA in the cytoplasmic and Nuclear fractions were recovered from the cells. Relative copy numbers of HOTAIR were determined by real-time RT-PCR analysis. Copy numbers of HOTAIR in the cytoplasmic and nuclear fractions were normalized by those of U6 and 7SK, respectively.





**Fig.11** 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.12** 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、siRNA およびモデルたん白質を用いて、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、siRNA デリバリーにおいて配列特異的なノックダウン効果を得ることができた。また、たん白質デリバリーではエンドサイトーシス経路を介すことなく細胞質内に活性を維持したままたん白質をデリバリーできることを見出した。

### 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った。

### 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 型エマルションを生成し、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. キャピテーションのおよぼす siRNA への影響評価

2 mL チューブに Luciferase GL2 Duplex (150 nM) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 µg) を混合し、Opti MEM で総量を 500 µL にした。その後、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、フェノール/クロロホルム抽出によりバブルリポソームを除去した。さらにエタノール沈殿し、siRNA を TE buffer で溶解した。溶解した siRNA を 0.7% アガロースゲルにて電気泳動し、そのバンドを確認した。

## 3. プラスミドと siRNA の共導入方法

2 mL チューブに懸濁状態の COS-7 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 µg)、GL2 promoter vector (5 µg)、および Luciferase GL2 Duplex (5 pmol, 12.5 pmol) を混合した。Opti MEM で総量を 500 µL にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心し細胞を沈殿させた。この細胞を培地にて洗浄し、培地に再懸濁した。この細胞を 48 穴プレートに播種し、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。なお、本検討では、細胞に対する傷害性を評価するため、別途 MTT 法による細胞生存率も検討

した。

## 4. ルシフェラーゼ恒常発現細胞へのルシフェラーゼ siRNA の導入方法

2 mL チューブに懸濁状態のルシフェラーゼ発現 Colon-26 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 µg)、および control siRNA duplex, ホタルルシフェラーゼ GL3 (100 pmol) を混合した。Opti MEM で総量を 500 µL にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心し細胞を沈殿させた。この細胞を培地にて洗浄し、培地に再懸濁した。この細胞を 48 穴プレートに播種し、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。

## 5. ニワトリ卵白アルブミン (OVA) への Alexa488 修飾

2 mL チューブに 5 mg の OVA を 500 µL の 50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で溶解させた。別に Alexa Fluor 488 succinimidyl ester を N,N-Dimethylformamide (DMF) で溶解し、濃度を 10 mg/mL とした。OVA 溶液に Alexa Fluor 488 succinimidyl ester を 50 µL 加え、室温で 2 時間振とうした。その後、1.5 M の glycine を 100 µL 加え、1 時間振とうすることで反応を終了させた。次に、この溶液を Sephadex G-25 カラムを通し、Alexa Fluor 488 が結合した OVA (Alexa 488-OVA) を回収した。

## 6. バブルリポソームと超音波照射の併用による OVA の細胞内導入方法

マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) ( $1 \times 10^6$  cells/mL) を glass bottom dish に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 晩培養した。その後、その細胞を 10 mM NaN<sub>3</sub> で処理しエンドサイトーシスを阻害した。この細胞に対し、氷浴上にて Alexa-OVA を 200 µg 加え、脂質濃度として 2 mg/mL のバブルリポソームを 240 µL 添加し、10 mM NaN<sub>3</sub> 添加 OptiMEM で全量を 4 mL とした。その後、速やかに超音波照射 (Frequency : 2

MHz, Duty : 10 %, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3回)した。次に10 mM の NaN<sub>3</sub> を添加した PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内に送達された Alexa-OVA を観察した。

#### 7. バブルリポソームと超音波の併用による外来性物質の細胞内デリバリー効率の評価

NaN<sub>3</sub> でエンドサイトーシスを阻害したマウス骨髄由来 DC (2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL) に、脂質濃度として 120 μg、Alexa-OVA (25 μg) または FITC-デキストランを添加した。10 mM の NaN<sub>3</sub> を添加した OptiMEM で総量を 500 μL とし、速やかに超音波照射 (Frequency : 2 MHz, Duty : 10 %, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3回)した。超音波照射後、直ちに遠心し、上清を取り除き、培地にて細胞を洗浄した。その後、PBS で細胞を再懸濁し、フローサイトメトリーにて Alexa-OVA の細胞へのデリバリー効率を評価した。なお、今回の検討では 20 μg/mL のヨウ化プロピジウムで死細胞を染色し、生細胞 (1 × 10<sup>4</sup> cells) について解析した。

#### 8. バブルリポソームと超音波の併用による FITC-デキストランのデリバリー効率の評価

2 mL チューブに、1 × 10<sup>6</sup> cells/mL に調製したマウス骨髄由来 DC を 250 μL 加え、脂質濃度として 2 mg/mL のバブルリポソームを 60 μL、FITC-デキストラン (Mw = 4,000, 20,000, 70,000) 溶液を添加した。10 mM の NaN<sub>3</sub> を添加した OptiMEM で総量を 500 μL とし、速やかに超音波照射 (Frequency : 2 MHz, Duty : 10 %, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time : 10 sec. 3回)した。超音波照射後、直ちに遠心し、上清を取り除き、培地で再度細胞の洗浄を行った。その後、PBS で細胞を再懸濁し、フローサイトメトリーにて FITC-デキストランの細胞へのデリバリー効率を評価した。なお、今回の検討では 20 μg/mL のヨウ化プロピジウムで死細胞を染色し、生細胞 (1 × 10<sup>4</sup> cells) について解析した。

#### 9. Lipofectamine2000 (LF2000) によるβ-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 × 10<sup>4</sup> 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、β-gal (0.25, 0.5, 1.0 μg) と LF2000 (0.5, 1.0, 2.0 μL) 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β-gal/LF2000 複合体を除去した。その後、β-galactosidase 活性、たん白量を測定した。

#### 10. LF2000 によるβ-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 × 10<sup>4</sup> 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、β-gal (1 μg) と LF2000 (2 μL) の複合体を添加し、4 時間培養した。細胞を洗浄し、過剰のβ-gal/LF2000 複合体を除去した。その後、X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 染色を行い、顕微鏡による観察を行った。

#### 11. バブルリポソームと超音波照射の併用によるβ-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 × 10<sup>5</sup> cells) とバブルリポソーム (総脂質量 : 60 μg)、及び β-gal (50, 100 μg) を混合した。Opti-MEM で総量を 500 μL 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 × 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、β-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、β-galactosidase 活性、たん白量を測定した。

#### 12. 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

2 mL チューブに懸濁状態の 4T1-Luc 細胞 (2.5 × 10<sup>5</sup> cells) とバブルリポソーム (総脂質量 : 60 μg)、及び β-gal (50, 100 μg) を混合した。Opti-MEM で総量を 500 μL 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 × g で 2 分間遠心し細胞を沈殿させ洗浄し、余剰のバブル