

イメージングシステムを利用した低分子量キトサン-siRNA 複合体の 結合能と RNA 干渉評価

川口泰永, 奥田知将, 伴 竜典, 檀上和美, 岡本浩一*

Evaluation of the Binding Affinity and RNA Interference of Low-molecular-weight Chitosan/siRNA Complexes Using an Imaging System

Yasuhisa KAWAGUCHI, Tomoyuki OKUDA, Tatsunori BAN,
Kazumi DANJO, and Hirokazu OKAMOTO*

Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya, 468-8503, Japan

(Received December 3, 2008; Accepted December 17, 2008; Published online January 16, 2009)

Chitosan is one of the attractive non-viral carriers for gene delivery including siRNA. However, common chitosan, which has a relatively high molecular weight, is insoluble in water, which might make it difficult to apply clinically. In this study, we investigated the efficacy of low-molecular-weight chitosan (LMWC), which is soluble in water, as a carrier for siRNA delivery. To evaluate the binding affinity and RNA interference (RNAi) of LMWC/siRNA complexes, a multi-well imaging system (IVIS[®]) was adapted. CT26 cells stably expressing firefly luciferase (CT26/Luc cells) were established to evaluate RNAi. Evaluation of RNAi using lipofectamine[™] 2000 was carried out by employing a luminometer with cell lysis and IVIS[®] without cell lysis. The results were closely correlated, suggesting the advantages of the multi-well imaging system regarding screening, the visualization of results, and nondestructive evaluation. Fluorescence generated by ethidium bromide intercalated in the double strand of siRNA was markedly quenched at a higher ratio of LMWC to siRNA (N/P) and lower pH. Evaluation of the particle size and zeta potential of LMWC/siRNA complexes also indicated the higher binding affinity of LMWC with siRNA. At N/P=300 and pH 6.5, which satisfied the high-level binding affinity of LMWC with siRNA, significantly lower luminescence was detected in CT26/Luc cells treated with LMWC/siRNA compared with those treated with LMWC alone, suggesting the presence of RNAi. These results suggested that LMWC may be an effective carrier for siRNA delivery, and that the multi-well imaging system may be a powerful tool to evaluate the binding affinity and RNAi.

Key words—low-molecular-weight chitosan; small interfering RNA; gene delivery; non-viral carrier; cationic polymer; imaging system

緒 言

Fire と Mello らによる RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) の発見は様々な研究分野に対して大きなインパクトを与え, その功績により 2006 年にはノーベル賞が授与された. 特定の標的 mRNA に配列特異的な相同性のある二本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) が細胞内に導入されると dsRNA は RNase III ファミリーに属する Dicer と呼ばれる酵素によって分解され 21–25 塩基対の二本鎖 RNA (short interfering RNA 又は small interfering RNA; siRNA) となり, 複数のタンパク質で構成さ

れる複合体 RNA-induced Silencing Complex (RISC) に組み込まれ活性型 RISC となる. この活性型 RISC が, 組み込まれた RNA 配列を利用して標的 mRNA を配列特異的に認識し, 分解する. この RNA 干渉は, ショウジョウバエ, 線虫, 植物だけでなく哺乳類においても有用な遺伝子発現制御機構であることが明らかになり, 今日では, 医学・生物学・工学などの様々な分野において, 生命現象や疾患に係わる遺伝子の機能解析をするためのツールとして利用されている. また, 特定の遺伝子発現を抑制することを利用して, 疾患に係わる遺伝子の機能を抑制する治療薬としての期待も高まっている.

上記のメカニズムからも分かるように, RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は siRNA が存在する

名城大学薬学部

*e-mail: okamotoh@ccmfs.meijo-u.ac.jp

細胞に局限されて起こるものであり、RNA 干渉を治療手段として適用するためには siRNA を標的細胞内へデリバリーする手段が必要となる。しかし、siRNA のデリバリー方法はまだ開発段階のものが多く、より安全で効率的なデリバリー方法の開発が望まれている。遺伝子は負電荷を帯びた比較的高分子であるという物理化学的性質のため単独で細胞内へ導入することが困難であり、効率よくデリバリーするためには、細胞膜を突破し、細胞の中に遺伝子を運ぶことのできる優れたベクターが必要不可欠となる。ベクターとして今日開発されているものを大きく分類するとウイルス性ベクターと非ウイルス性ベクターの2種類に分類できる。¹⁾ ウイルス性ベクターは導入効率が高いという利点があり、臨床試験も既に行われている。^{2,3)} しかし、ウイルスの感染能力を用いて行うため、人体へのウイルス感染の問題等、安全性が十分に確保されていないのが現状である。非ウイルス性ベクターはウイルス性ベクターに比べ導入効率は低いという課題があるが、ウイルス感染の危険性がないという利点や、分子サイズや脂溶性などの物理化学的性質を変化させることにより様々な機能や性質を付加させ得るという利点がある。

カチオン性ポリマーやカチオン性脂質は非ウイルス性ベクターであり、有用なベクターとして期待されている。^{4,5)} カチオン性ポリマーは遺伝子と静電的に複合体を形成でき、例としてキトサン^{6,7)} やポリリジン、⁸⁾ ポリエチレンイミン^{1,9)} などが挙げられる。また、DNA とカチオン性ポリマーであるキトサンが静電的相互作用で複合体を形成することにより、DNA-キトサン複合体がリボヌクレアーゼなどの分解酵素に対し抵抗性を持つことが報告されている。^{10,11)} キトサンと遺伝子の結合には、一部疎水結合の寄与が示唆されているが、主に静電的相互作用による結合であるとされている。¹²⁾ この遺伝子-キトサン複合体の結合能を決める重要なパラメーターとしてキトサンの分子量、脱アセチル化度及び N/P (キトサン中の窒素と遺伝子中のリンのモル比) が挙げられ、これらのパラメーターの数値が大きいくほど遺伝子-キトサン複合体の結合能が強くなることが報告されている。^{13,14)} キトサンは生体適合性・生体内分解性が高く低毒性物質として知られており有用な非ウイルスベクターの候補の1つであるが、通常用いられているキトサンは高分子であり、中性

条件下では水にほとんど溶解しない。そのため酢酸などに溶解する必要がある。臨床応用の際に障害となるという問題点がある。しかしキトサンは低分子化することで中性条件下でも水に溶解するようになり、その問題点を解決することができる。

当研究室ではこれまでに、超臨界二酸化炭素晶析法によりプラスミド遺伝子 (pDNA) の微粒子製剤を調製している。この際低分子量キトサンを非ウイルス性ベクターとして用いることで調製過程及び保存中の pDNA の安定性が向上し、またマウス肺内に局所投与した際の肺組織中遺伝子発現効率が飛躍的に高まることを報告している。^{15,16)} 本研究では、siRNA のベクターとしての低分子量キトサンの有用性を評価することを目的に、評価系細胞作成から、遺伝子と非ウイルス性ベクターとの結合に関する検討、さらには、低分子量キトサンをベクターとして用いた場合の RNA 干渉への影響について検討した。

方 法

1. 試料 pDNA として用いた pCMV-Luc (7.1 kb)¹⁷⁾ は、京都大学大学院薬学研究所の橋田充教授よりご提供頂いた。pCMV-Luc は大腸菌 DH5 α 株 (TOYOBO) により大量複製し、illustra plasmidPrep mini Spin Kit [GE ヘルスケアバイオサイエンス(株)] を用いて精製した。pCMV-Luc 濃度は 260 nm における吸光度 (A_{260}) により測定した。

マウス結腸がん CT26 細胞は、京都大学大学院薬学研究所の高倉善信教授よりご提供頂いた。

非ウイルス性ベクターとして低分子量キトサン (LMWC, 分子量 2000-5000, 脱アセチル化度 40-50%, 水への溶解度約 5%, Chitosan Water Soluble, 和光純薬工業) 及び LipofectamineTM 2000 (Invitrogen Corporation, USA) を用いた。siRNA には GL3 Luciferase の遺伝子配列を認識する GL3 siRNA 及び Renilla Luciferase を認識する RL siRNA (Sumchully Pharm., Korea) を用いた。GL3 siRNA の遺伝子配列は 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3'並びに 3'-TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU-5', RL siRNA の遺伝子配列は 5'-AAACAUGCAGAA-AAUGCUGTT-3'並びに 3'-TTUUUGUACGUCU-UUUACGAC-5'である。siRNA の溶媒には Ultra-PureTM Distilled Water (DNase/RNase Free) (UPW,

Invitrogen Corporation, USA) を用いた。その他の試薬、溶媒には特級品を用いた。

2. GL3 siRNA と LMWC の結合能評価 (Ethidium bromide exclusion assay) pH 7.4 と 7.0 の緩衝液は HEPES (同仁化学研究所) を、pH 6.5, 6.0, 5.5 の緩衝液は MES hydrate (Sigma Aldrich Japan) を UPW で溶解し、1 mol/l NaOH を用いて pH を調整した。

10 μ M GL3 siRNA 3 μ l に各緩衝液を加え、全量を 50 μ l とした。siRNA に対して N/P=0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 となるように LMWC を各緩衝液に溶解し、全量 50 μ l とした。その後、両液を混合し、室温にて 20 min 放置した。さらに各緩衝液で作成した 10 μ g/ml ethidium bromide (EtBr, 和光純薬工業) 100 μ l を加えたものを GL3 siRNA-LMWC 混合サンプルとした。EtBr による蛍光確認を行うに当たり、Microtest™ 96-well Assay Plate, Black, FlatBottom, TC Surface, Sterile, With Lid (BD Falcon, USA) を使用した。

GL3 siRNA-LMWC 混合サンプルの蛍光強度をマルチウェルイメージングシステムにて測定した。測定機器には realtime *in vivo* imaging system IVIS® SPECTRUM (IVIS®, Xenogen, USA) を使用した。測定条件は、Excitation filter=535 nm, Emission filter=640 nm, Exposure time=30 sec, lump level=low とした。測定により得られた画像上で各サンプルを ROI ツールで範囲選択し、total flux 値を定量した。

3. GL3 siRNA-LMWC 混合サンプルのゼータ電位と粒子径の測定 siRNA 10 nmol に pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.4 の緩衝液 1 ml を加えて溶解した。同じ pH の 66.5 mg/ml LMWC を N/P が 10, 30, 100, 300 となるように混合し、ゼータ電位と粒子径を測定した。測定には Zetasizer Nano ZS (MALVERN INSTRUMENTAL, UK) を用いた。測定設定は 25 °C, dispersant: water, material: polystyrene latex, cell: clear disposable zeta cell とした。

4. 評価系細胞 (CT26/Luc) の作成 pCMV-Luc 4 μ g を Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Opti-MEM®, Invitrogen Corporation, USA) 96 μ l に溶解した。また Lipofectamine™ 2000 8 μ l と Opti-MEM® 92 μ l を混合し、室温にて 5 min 放置した。その後両液を軽く混合し、37°C で 20 min 放置

したものを pDNA-Lipofectamine™ 2000 混合溶液とした。

培地は RPMI-1640 medium (RPMI-1640, Sigma Aldrich Japan) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen Corporation, USA) と Penicillin-Streptomycin liquid (ペニシリン 10000 単位/ml, ストレプトマイシン 10000 μ g/ml, 0.85% 食塩水, Invitrogen Corporation, USA) を 1% 混合したものをを用い、37°C, 5% CO₂ 濃度に設定した CO₂ インキュベーター (NAPKO CO₂6000) 内で CT26 細胞を培養した。培養用ディッシュにはセルカルチャーディッシュ (BD Biosciences, USA) を用いた。

遺伝子導入前日、CT26 細胞を培養したディッシュに Trypsin, 0.25% (1X) with EDTA 4Na, liquid (Trypsin-EDTA, Invitrogen Corporation, USA) 1 ml を加えて細胞を剥離後、培地 9 ml を加えて懸濁した。1000×g, 4°C, 7 min の条件で遠心分離し、上清を 9 ml 除去した。培地を約 2 ml 加えて再懸濁し、35 mm ディッシュに 1 枚当たり 1.0×10⁶ cells となるように播種した。遺伝子導入当日、培地を除去しリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、Opti-MEM® 1 ml を添加した。pDNA-Lipofectamine™ 2000 混合溶液を細胞に添加し、37°C, 5% CO₂ 濃度に設定した CO₂ インキュベーター内で 6 時間培養した。その後 PBS で洗浄し、10% FBS 含有 RPMI-1640 に培地交換して一晩培養した。Trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離し、5×10⁵ cells/well となるように 35 mm ディッシュへ播種した。培地には選択用抗生剤として G-418 Solution, sterile-filtered (G-418, Roche Diagnostics K. K., Switzerland) を 500 μ g/ml となるように添加したものを使用し、2 週間培養した。増殖した細胞を剥離し、96 well plate に 0.5 cell/well となるように細胞懸濁液を分注した。一晩放置したのち、1 cell/well となった well の細胞 (CT26/Luc 細胞) を数週間培養した。

その後、培地を除去し、PBS で洗浄後、Opti-MEM® で希釈した 150 μ g/ml ルシフェリン溶液を 10 ml 添加し発光強度を IVIS® にて 1 min 測定し、遺伝子導入されていることを確認した。

5. RNAi 効果の評価における IVIS® 測定値とルミノメーター測定値の相関性の確認 siRNA-Lipofectamine™ 2000 混合溶液として、siRNA 溶液と Lipofectamine™ 2000 を Opti-MEM® と混合

し、それぞれ全量 50 μ l としたものを室温にて 5 min インキュベートしたのちに混合し、さらに 37 $^{\circ}$ C, 20 min インキュベートした。siRNA 使用量は 2 μ l (= 20 pmol) に固定し、LipofectamineTM 2000 使用量は 0, 0.3, 0.9, 3.0 μ l の 4 種類とした。LipofectamineTM 2000 溶液としては LipofectamineTM 2000 を Opti-MEM[®] に添加し、全量を 100 μ l とした。LipofectamineTM 2000 使用量は 0, 0.3, 0.9, 3.0 μ l の 4 種類とした。

培地に 10% FBS と 500 μ g/ml G-418 を添加した RPMI-1640 を用い、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 濃度に設定した CO₂ インキュベーター内で CT26/Luc 細胞を培養した。siRNA 導入前日に Trypsin-EDTA を使用して細胞を剥離し、24 well プレートに 5.0 \times 10⁴ cells/well となるように播種した。24 時間培養後、遺伝子導入直前に血清未添加の Opti-MEM[®] 500 μ l に培地交換した。上で作成した溶液を細胞へ添加し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 濃度に設定した CO₂ インキュベーター内で 4 h インキュベートした。細胞を 1 度 PBS で洗浄したのち 10% FBS と 500 μ g/ml G-418 を添加した RPMI-1640 を 500 μ l 加え、24 h 培養した。

細胞の培地を除去し、PBS で洗浄後、Opti-MEM[®] に溶解した 150 μ g/ml ルシフェリン溶液を 1 ml/well 加え、発光強度を IVIS[®] で 1 min 測定した。測定終了後、細胞を PBS 溶液で洗浄し、細胞溶解液 (0.05% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8) 150 μ l を加え、室温で 10 min インキュベートした。細胞溶解液を 12000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 2 min 遠心分離して回収した上清にピッカジーン [東洋インキ製造(株)] の発光基質を添加し、直ちにルミノメーター (Lumat LB9507, EG&G Berthold, Germany) で発光を測定した。

6. GL3 siRNA-LMWC の RNA 干渉効果の評価

LMWC を用いて GL3 siRNA を遺伝子導入した場合の RNA 干渉効果について、発光強度抑制の程度で評価を行った。遺伝子導入用培地には Opti-MEM[®] を使用した。また、弱酸性条件下での RNA 干渉効果への影響を調べるため、pH 6.5 に調整した Opti-MEM[®] を用いて実験を行った。Ethidium Bromide Exclusion Assay では pH 6.0, 5.5 条件下での物理的相互作用の評価も行ったが、これらは血液中あるいは組織中での生理条件から外れるため、*in vitro* での RNA 干渉効果の評価は pH 6.5 までに留

めた。

Opti-MEM[®] (pH 7.4) に MES hydrate を 20 mM となるように加え、1 mol/l NaOH を用いて pH 6.5 に調製した。GL3 siRNA 溶液 12 μ l, LMWC 溶液 24 μ l をそれぞれ Opti-MEM[®] と混合して各 100 μ l としたのち、5 min、室温にて放置した。そののち両者を混合した後、さらに 37 $^{\circ}$ C で 20 min 放置したものを GL3 siRNA-LMWC 混合サンプルとした。pH 6.5 に調製した Opti-MEM[®] についても、同様にサンプルを調製した。LMWC サンプルは、GL3 siRNA 溶液の代わりに UPW 12 μ l を用いたほかは GL3 siRNA-LMWC 混合サンプルと同様に調製した。

前項と同様の方法で CT26/Luc 細胞を培養し、siRNA 導入を行う前日、12 well プレートに 1.0 \times 10⁵ cells/well となるように細胞を播種した。siRNA 導入直前に血清未添加の Opti-MEM[®] 1 ml に培地交換し、上で調製したサンプルを混合し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 濃度に設定した CO₂ インキュベーター内で 4 h インキュベートした。その後細胞を PBS 溶液で洗浄し、10% FBS と 500 μ g/ml G-418 を添加した RPMI-1640 に培地交換した。

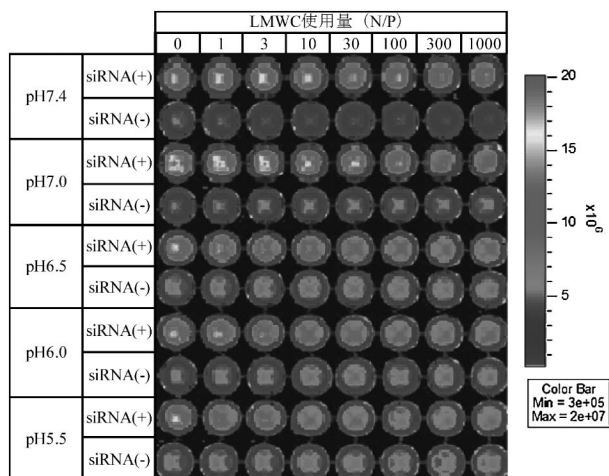
siRNA 導入 48 h に細胞を PBS で洗浄し、Opti-MEM[®] に溶解した 150 μ g/ml ルシフェリン溶液を 1 ml/well 加え、発光強度を IVIS[®] で 1 min 測定した。

7. 有意差検定 GL3 siRNA-LMWC 混合サンプル添加後の発光強度と LMWC サンプル添加後の発光強度を F 検定し、分散が等しいか判断した。等分散の場合には Student's 検定を、異分散の場合には Welch's 検定を適用し、危険率 5% で有意性を判定した。

結果・考察

1. GL3 siRNA と LMWC の結合能評価 (Ethidium Bromide Exclusion Assay) カチオン性ポリマーが遺伝子に結合することにより、電気泳動法による遺伝子確認時に遺伝子のバンドに変化がみられることが報告されている。^{11,18)} また DNA のみならず siRNA とカチオン性ポリマーの間においても複合体を形成することで EtBr による蛍光が消失することが知られており、¹⁹⁾ この現象は複合体形成時の結合強度の指標としてしばしば用いられている。そこで今回、N/P と pH が GL3 siRNA と LMWC の

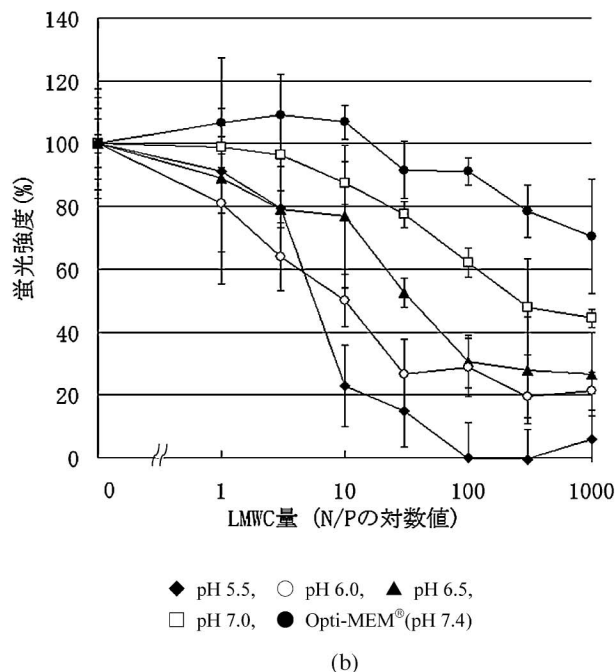
結合能に与える影響について EtBr exclusion assay による検討を行った。Figure 1(a)には IVIS®にて得られた写真を示す。また、Fig. 1(b)には N/P=0 のときの蛍光強度を 100%とした場合の蛍光強度を示した。



(a)

Fig. 1(a). Fluorescence Image of EtBr Exclusion Assay for GL3 siRNA-LMWC Complexes at Several N/P Ratios and pHs

The scale is in photons/s/cm²/sr.



(b)

Fig. 1(b). Quantitative Analysis of EtBr Exclusion Assay for GL3 siRNA-LMWC Complexes at Several N/P Ratios and pHs

Each value represents the mean \pm S.E. ($n=3$).

EtBr 添加に由来する蛍光強度は N/P が増加，すなわちキトサンの割合が増すにつれて減少するという傾向がみられた。この減少傾向は中性付近では緩やかであり，酸性側へ傾くにつれてより大きく減少した。また，同じ N/P のものを比較した場合，pH が酸性となるにつれて蛍光強度が減少する傾向がみられた。

酸性条件に傾くにつれてキトサンのアミノ基のカチオン性が増加し表面電荷が正電荷側にシフトするため，負電荷を持つ siRNA との結合能が強まり，より多くの siRNA が LMWC と複合体を形成したと推察される。また，N/P を大きくするにつれて LMWC と相互作用していない siRNA の量が減少すると予想される。これらの要因のため EtBr を添加しても siRNA にインターカレートされなくなり，蛍光強度が減少したと考えられる。

2. GL3 siRNA-LMWC のゼータ電位と粒子径の測定

ゼータ電位に関しては，N/P を大きくするほど，さらに緩衝液の pH を酸性側に傾けるほどゼータ電位が正に傾く傾向がみられた [Fig. 2(b)]. pH 6.5 と 7.4 の間にはそれほど顕著な差はみられず，N/P 増大に伴い緩やかにゼータ電位が正電荷側にシフトしていた。pH 6.0 以下の条件では N/P 増大に伴ってゼータ電位が大きく変化しており，粒子径変化と同じく pH 5.5 と 6.0 では N/P=10 から 30，pH 6.5 と 7.4 においては N/P=30 から 100 を境に急激に正へ値が変化していた。

粒子径に関しても同様であり，N/P を大きくするほど，また緩衝液の pH を酸性側に傾けるほど粒子径は大きくなるという傾向がみられた [Fig. 2(a)]. この傾向は N/P=30 以上において顕著であったが，N/P=10 では各 pH 間における差はほとんどみられなかった。また，pH 5.5 と 6.0 では N/P=10 から 30，pH 6.5 と 7.4 においては N/P=30 から 100 を境として急激に粒子径が増大していた。N/P=300 では，pH 5.5 と 6.0 において粒子径が約 6 μ m にまで増大したが，用いた Zetasizer Nano ZS の測定上限が 6 μ m であるので信頼性に欠ける可能性がある。N/P 増大に伴い複合粒子同士が結合し合うようになったために，このような粒子径変化が起こったものと考えられる。

以上の結果から，siRNA と LMWC は相互作用して複合体を形成することが示唆された。また，複

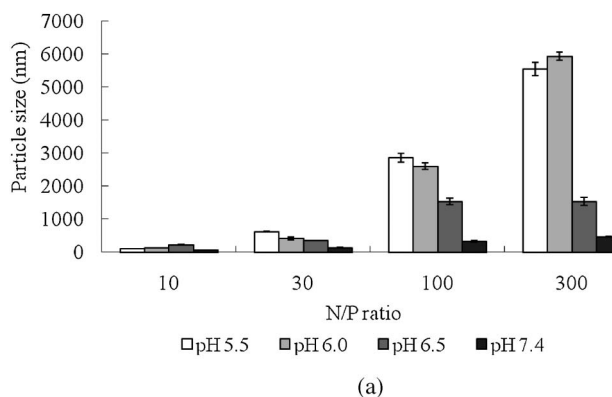


Fig. 2(a). Particle Size of siRNA-LMWC Complexes at Several N/P Ratios and pHs
Each value represents the mean \pm S.E. ($n=3$).

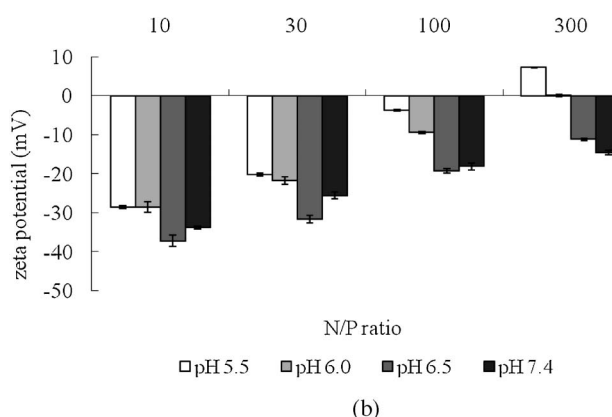


Fig. 2(b). Zeta Potential of siRNA-LMWC Complexes at Several N/P Ratios and pHs
Each value represents the mean \pm S.E. ($n=3$).

合体形成は N/P, pH の影響によるゼータ電位変化とある程度相関することが示唆された。この結果は先の EtBr を用いた siRNA と LMWC の結合性評価の結果と同様の傾向を示しており、EtBr 添加による蛍光減少は siRNA と LMWC の複合体形成に起因するという考察を支持するものである。

ゼータ電位の観点からは、より酸性かつ高 N/P 条件であるほど siRNA-LMWC 複合体の表面電荷が正電荷側にシフトするため、負電荷を持つ細胞表面との親和性が強くなることにつながり、細胞への取り込み効率が向上すると期待できる。しかし、粒子径の点からは pH 6.0 以下かつ N/P=100 以上の条件では複合粒子が巨大に成長し過ぎるために細胞が取り込める程度の大きさを持った複合体の割合が低下してしまい、細胞への取り込み効率は減少してしまうのではないかと予想される。細胞が取り込め

る粒子の大きさは取り込み経路により異なるが、一般的にエンドサイトーシスの場合は直径 100 nm 程度、ファゴサイトーシスやマクロピノサイトーシスの場合は数百 nm 又はそれ以上であり、特にファゴサイトーシスにおいては 2 μ m 以上に達することもあるとされている。²⁰⁻²²⁾

3. RNAi 効果の評価における IVIS[®]測定値とルミノメーター測定値の相関性の確認 Figure 3 (a)には siRNA-Lipofectamine[™] 2000 処理した細胞のルシフェリンによる発光強度を IVIS[®]またはルミノメーターにて測定した結果を示した。Lipofectamine[™] 2000 量を変更した結果、RL siRNA では発光強度の減少はみられなかったが、GL3 siRNA では発光強度減少がみられた。このことから、GL3 siRNA による RNA 干渉によって生じた発光強度減少であると示唆された。また、GL3 siRNA 100 nM と一定量であるのに対し、Lipofectamine[™] 2000 量を 0.3 μ l, 0.9 μ l, 3 μ l と増量したことによって発光強度の減少が強くなったことから、GL3 siRNA と Lipofectamine[™] 2000 の複合体がより細胞へ導入され易い形状・表面電荷へと変化したものと考えられる。なお、Lipofectamine[™] 2000 を 3 μ l とした場合、Lipofectamine[™] 2000 単独または RL siRNA との複合体では発光強度がコントロールの 300% 以上という非常に高い値を示した。Tagami らの報告によると、GFP を安定発現するヒト線維肉腫細胞 (HT1080 cells) に対して Lipofectamine[™] 2000 単独又は GFP 以外の様々な配列の siRNA との複合体を加えたところ、何も加えなかった場合と比較して GFP の発現量が高くなったと報告している。また、GFP のほかにも様々な遺伝子の発現がアップレギュレート又はダウンレギュレートを受けていたとされている。²³⁾ 今回のわれわれの結果も同様の現象に起因するものと考えられる。

Figure 3(b)には y 軸にルミノメーターの結果を、x 軸に IVIS[®]の結果をプロットしたグラフを示した。この結果から、IVIS[®]を用いた測定方法は従来のルミノメーターを用いた測定方法と高い相関性を持っているといえる。

4. GL3 siRNA-LMWC の RNA 干渉効果の評価

Opti-MEM[®]培地 (pH 7.4) 若しくは pH を 6.5 に調整した Opti-MEM[®]培地で培養した CT26/Luc 細胞を用い、GL3 siRNA-LMWC 複合体 (siRNA

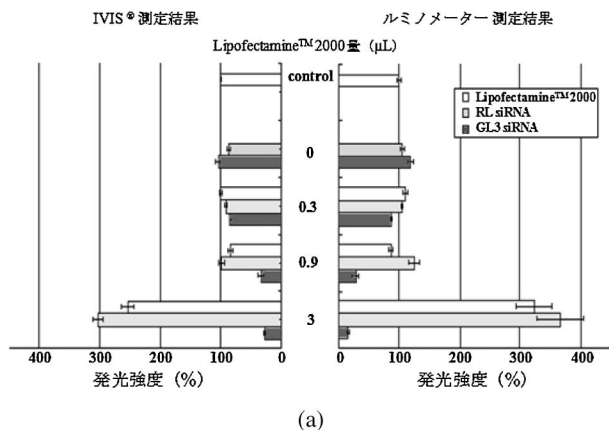


Fig. 3(a). Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with siRNA-Lipofectamine™2000 Complexes Measured by Using IVIS® and Luminometer
Each value represents the mean ±S.E. (n=3).

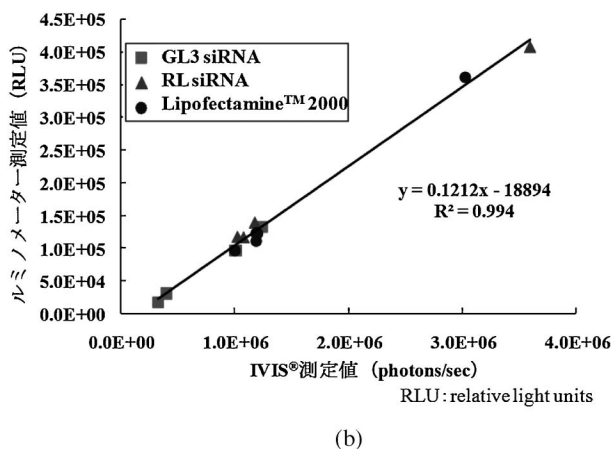


Fig. 3(b). Correlation of Luciferase Activities Measured by Using IVIS® and Luminometer

100 nM, N/P=10, 30, 100, 300) 若しくは LMWC サンプル添加 48 h 後の発光強度を測定した. GL3 siRNA による発光強度減少率は, LMWC 処理群の Total Flux を A, GL3 siRNA-LMWC 複合体処理群の Total Flux を B, control の Total Flux を C とし, $[(C-A)/C] \times 100(\%)$ 若しくは $[(C-B)/C] \times 100(\%)$ の式にて算出した.

Figure 4(a) 及び 5(a) には, pH 6.5 及び 7.4 における GL3 siRNA-LMWC 複合体での発光強度と LMWC 単独での発光強度の差を示した. pH 6.5 では, N/P=300 の GL3 siRNA-LMWC 複合体でのみ発光強度が有意に減少していたが, pH 7.4 ではいずれの N/P においても両者に有意な差がみられなかった. Figures 4(a) と 5(a) から得られた RNA

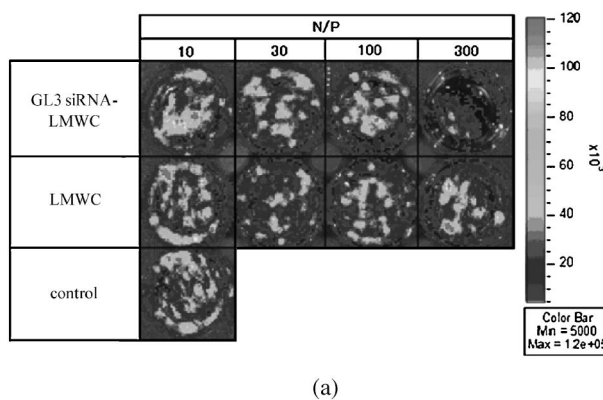


Fig. 4(a). Luminescence Image of Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with GL3 siRNA-LMWC Complexes at pH 6.5
The scale is in photons/s/cm²/sr.

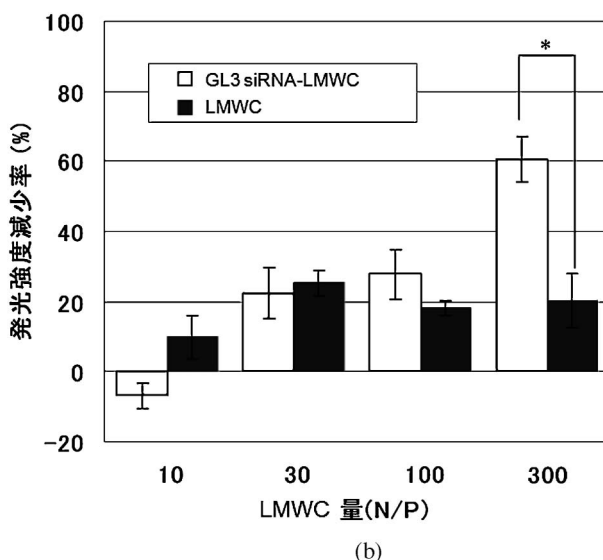
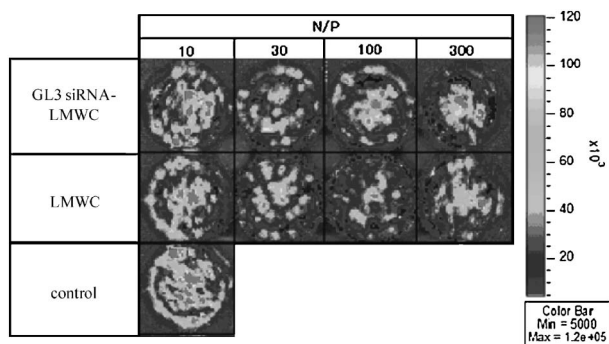


Fig. 4(b). Quantitative Analysis of Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with GL3 siRNA-LMWC Complexes at pH 6.5
Each value represents the mean ±S.E. (n=3). * Statistical difference was observed ($p < 0.05$).

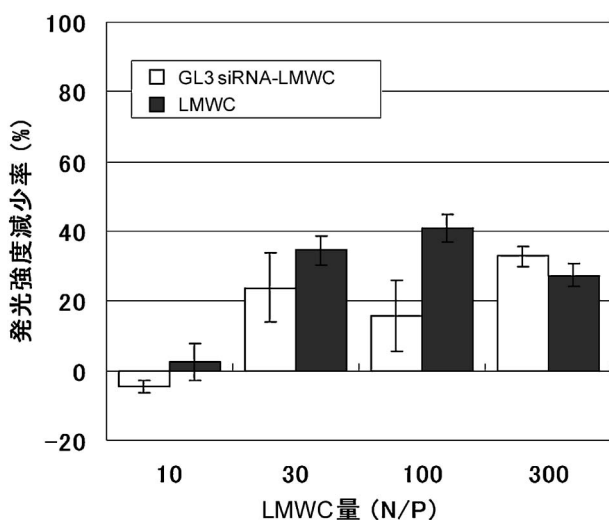
干渉効率と Fig. 1 (b) で得られた EtBr exclusion assay 結果を比較した結果を Fig. 6 に示す. pH 6.5 では N/P が大きく, 蛍光強度が低い値になるにつれ $[(A-B)/A] \times 100(\%)$ の式にて算出した発光強度の減少率が上がる傾向を示し, pH 7.4 では N/P によらず発光強度の減少率は低い値であった. 肺内の pH は 6.5 程度,²⁴⁾ またはそれ以下の弱酸性であると言われており, 腫瘍組織内の pH もしばしば弱酸性を示すことが知られている. siRNA-LMWC 複合体は経肺投与や腫瘍組織などの弱酸性の部位でのト



(a)

Fig. 5(a). Luminescence Image of Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with GL3 siRNA-LMWC Complexes in Opti-MEM®

The scale is in photons/s/cm²/sr.



(b)

Fig. 5(b). Quantitative Analysis in Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with GL3 siRNA-LMWC Complexes in Opti-MEM®.

Each value represents the mean \pm S.E. ($n=3$).

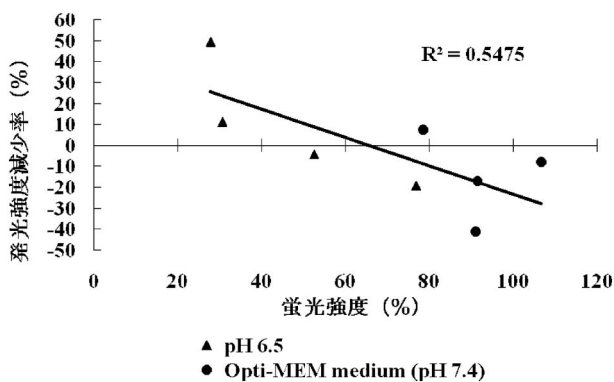


Fig. 6. Correlation of Ethidium Bromide Exclusion Assay and Quantitative Analysis in Luciferase Activity in CT26/Luc Cells Treated with GL3 siRNA-LMWC Complexes

ランスフェクションに適した性質を持つことが示唆された。

今回、RNA 干渉効率と EtBr exclusion assay 結果の間には有意な相関性 ($n=8$, $r^2=0.5475$, $p<0.05$) を確認することができた (Fig. 6). 一方、GL3 siRNA-LMWC 複合体のゼータ電位と RNA 干渉効率の間には有意な相関性がみられなかった. カチオン性ベクターを用いた遺伝子導入効率は EtBr Exclusion Assay と相関性を示すケースが報告されている. Kim らは分子量の異なるデオキシコール酸修飾キトサンとプラスミド DNA の複合体を調製し、EtBr 添加による蛍光強度の違いと細胞へのトランスフェクション効率の相関性を報告している.²⁵⁾ 使用したキトサンの分子量並びにその混合比率が大きいものほど EtBr による蛍光強度が減少するという結果が得られており、さらにトランスフェクション効率もキトサンの分子量が大きいほうがよくなる傾向がみられている。

また、Kearns らは DOPE を使用せず、両親媒性のコレステロール誘導体を添加してリポソームを作成し、プラスミド DNA と混合して得られた複合体を用いて遺伝子導入効率と EtBr Exclusion Assay を行っている.²⁶⁾ この報告でも EtBr Exclusion Assay の蛍光強度変化量が大きいものほどトランスフェクション効率が高いという傾向がみられている。さらに、この遺伝子導入効率はゼータ電位とは相関がなく、複合体が -30 mV 程度の負電荷を帯びていてもトランスフェクションは起こることが報告されている。

複合体のゼータ電位が正電荷であるほど細胞表面との親和性が高まると考えられるため遺伝子導入効率向上に有利と考えられるが、それ以外にも遺伝子導入効率にはベクターと遺伝子の複合体の安定性、複合体のサイズ、そして複合体が遺伝子を放出できなくなるほどには堅固に形成されていないことも重要ではないかと推察される。

脱アセチル化度はキトサン分子に含まれる全アミノ基中の脱アセチル化されたアミノ基の割合であり、この数値が高いほど遊離アミノ基の割合が多くなりキトサンの正電荷も高まるため遺伝子との静電的相互作用も強くなる傾向がある。今回用いた LMWC は脱アセチル化度が比較的 low 値 (40–50%) であることから、脱アセチル化度を高めることでよ

り効率的に siRNA 送達できる可能性がある。

総 括

今回、評価系細胞の作成、siRNA-LMWC 間の結合能の確認、さらには、作成した評価系細胞での RNA 干渉による細胞内への導入効率の検討を行った。EtBr Exclusion Assay、ゼータ電位と粒子径の測定結果から、今回調製した siRNA と LMWC 間の結合能を示唆することができた。中性付近では siRNA と LMWC は複合体を形成し難いものの、pH を酸性側へ傾けることによって両者の結合性がより高まることが示唆された。

このことから、酸性条件下で siRNA と LMWC の複合体を調製することで静電的相互作用を介してより強固に結合した製剤を調製でき、遺伝子導入効率を高め得る可能性を示すことができた。また、評価系細胞での RNA 干渉の結果と EtBr Exclusion Assay 結果の間に相関性を見出すことができた。

当研究室では既に、超臨界二酸化炭素晶析法により pDNA (pCMV-Luc) と LMWC を遺伝子含有微粒子製剤とすることで、遺伝子の保存安定性が改善でき、マウス肺内投与後の肺組織中遺伝子発現が増大することを報告している。今後は同様に超臨界二酸化炭素晶析法や噴霧急速凍結乾燥法などによる製剤化を検討したいと考えている。

謝辞 本研究を行うに当たり pCMV-Luc をご提供下さいました京都大学大学院薬学研究科の橋田充教授並びに CT26 細胞をご提供下さいました京都大学大学院薬学研究科の高倉善信教授に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Dow S. W., Schwarze J., Heath T. D., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1905–1914 (1999).
- 2) Albelda S. M., Wiewrodt R., Zuckerman J. B., *Ann. Intern. Med.*, **132**, 649–660 (2000).
- 3) Moon C., Oh Y., Roth J. A., *Clin. Cancer Res.*, **9**, 5055–5067 (2003).
- 4) Eastman J., Tousignant J. D., Lukason M. J., Murray H., Siegel C. S., Constantino P., Harris D. J., Cheng S. H., Scheule R. K., *Hum. Gene Ther.*, **8**, 313–322 (1997).
- 5) Birchall J. C., Kellaway I. W., Gumbleton M., *Int. J. Pharm.*, **197**, 221–231 (2000).
- 6) Richardson S. C., Kolbe H. V., Duncan R., *Int. J. Pharm.*, **178**, 231–243 (1999).
- 7) Lee K. Y., Kwon I. C., Kim Y. H., Jo W. H., Jeong S. Y., *J. Control. Release*, **51**, 213–220 (1998).
- 8) Choi Y. H., Liu F., Kim J. S., Choi Y. K., Park J. S., Kim S. W., *J. Control. Release*, **54**, 39–48 (1998).
- 9) Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G., *J. Control. Release*, **60**, 149–160 (1999).
- 10) MacLaughlin F. C., Mumper R. J., Wang J., Tagliaferri J. M., Gill I., Hinchcliffe M., Roland A. P., *J. Control. Release*, **56**, 259–272 (1998).
- 11) Messai I., Lamalle D., Munier S., Verrier B., Ataman-Önal Y., Delair T., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **255**, 65–72 (2005).
- 12) Lavertu M., Methot S., Tran-Khanh N., Buschmann M. D., *Biomaterials*, **27**, 4815–4824 (2006).
- 13) Kiang T., Wen J., Lim H. W., Leong K. W., *Biomaterials*, **25**, 5293–5301 (2004).
- 14) Liu W., Sun S., Cao Z., Zhanga X., Yao K., Lub W. W., *Biomaterials*, **26**, 2705–2711 (2005).
- 15) Okamoto H., Nishida S., Todo H., Sakakura Y., Iida K., Danjo K., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 371–380 (2003).
- 16) Okamoto H., Sakakura Y., Shiraki K., Oka K., Nishida S., Todo H., Iida K., Danjo K., *Int. J. Pharm.*, **290**, 73–81 (2005).
- 17) Sakurai F., Inoue R., Nishino Y., Okuda A., Matsumoto O., Taga T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., *J. Control. Release*, **69**, 219–220 (2000).
- 18) Kim W. J., Christensen L. V., Jo S., Yockman J. W., Jeong J. H., Kim Y.-H., Kim S. W., *Mol. Ther.*, **14**, 343–350 (2006).
- 19) Corsi K., Chellat F., Yahia L' H., Fernandes J. C., *Biomaterials*, **24**, 1255–1264 (2003).
- 20) Cardelli J., *Traffic*, **2**, 311–320 (2001).
- 21) Jones A. T., *J. Control. Release*, **122**, 246–251 (2007).
- 22) Darnell J. E., Lodish H., Baltimore D., “Molecular Cell Biology” Tokyo Kagaku Dojin, 1989, pp. 650–680.
- 23) Tagami T., Hirose K., Barichello J. M., Ishida

- T., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **25**, 2497–2504 (2008).
- 24) Schanker L. S., Less M. J., *Drug Metab. Dispos.*, **5**, 174–178 (1976).
- 25) Kim Y. H., Gihm S. H., Park C. R., Lee K. Y., Kim T. W., Kwon I. C., Chung H., Jeong S. Y., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 932–938 (2001).
- 26) Kearns M. D., Donkor A. M., Savva M., *Mol. Pharm.*, **5**, 128–139 (2008).