

具体的な研究成果

1. 細胞内・核内における遺伝子動態可視化によるキャリア開発へのフィードバック

1.1 D-MEND による siRNA デリバリー最適化

siRNA の効率的なデリバリーシステムを構築する上で、細胞質への輸送システムの構築が非常に重要である。これまで我々は、遺伝子のエンドソームや核などへのオルガネラ分布を Z 軸方向に断続的に取得した共焦点レーザー顕微鏡画像を元に定量化する confocal image-assisted three-dimensionally integrated quantification(CIDIQ)法を確立してきた。本方法を siRNA に応用し、細胞内動態素過程の定量的評価系を確立し、本定量情報をもとに、効率化をおこなった。多機能性エンベロープ型ナノ構造体はプラスミド DNA のみでなく、ポリカチオンの一つであるステアリル化オクタアルギニン (STR - R8) によって複合体を形成させることで効率的に封入可能であることが示されている。脂質組成としては、エンドソーム脱出効率の高い phosphatidic acid (PA) と dioleoylphosphoethanolamine (DOPE) (2:7) の組成を用いて単純水和法を用いて調製を行った結果、本 R8-MEND は、通常トランスフェクションで使用する dose において 80 % 以上もの RNAi 効果を示し、また持続性の面においても非常に優れているものであった。しかしながら、Dose を減らすと、siRNA 効果の減弱が認められ、1/10 にした場合にはほとんど RNAi 効果が得られなかった。In vivo への応用を達成するには、siRNA 位コピーあたりの遺伝子ノックダウン効率を最大にし、低 dose で高い効率を示すキャリアの構築が必須である。そこで、本プロトタイプ

の MEND の細胞内律速段階を同定すべく、CIDIQ 法を用いた siRNA の細胞内動態評価を行った。その結果、siRNA はエンドソーム脱出を効率的に脱出していることが明らかとなった。しかしながら、細胞内における脱被覆化効率をイメージングにより定量化するために、蛍光ラベルした siRNA を別の蛍光によりラベルした脂質エンベロープに封入した二重ラベル化 MEND を調製し、HeLa 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、共焦点レーザー顕微鏡により Z 軸方向に断続的に画像取得を行った。脱被覆化効率は約 55% であることが示され、律速段階の一つであることが示された。本定

量結果に基づき脱凝縮過程を上昇させるために、MEND の脂質膜枚数を制御可能な SUV 膜融合法を開発した。本方法は、遺伝子とポリカチオン(STR-R8)複合体を SUV (Single unilamellar vesicle) とインキュベーションするものであり、正電荷を有するコアの周辺に負電荷を有する SUV が静電的に集まる結果、互いに隣接する SUV 間で膜融合が起こり 2 枚膜の MEND の形成が可能となる。これら MEND の細胞内における脱被覆化過程をイメージングにより評価した結果、細胞内ではほぼすべてのクラスターが赤色で

