

28L-pm06

siRNA リポプレックスのエンドソーム脱出ならびにキャリアからの siRNA 解離過程の評価

○城 慎二¹, 田上 辰秋¹, 清水 径¹, 石田 竜弘¹, 際田 弘志¹(¹徳大院薬)

【目的】 siRNA を細胞内に導入し、機能させるためには、取り込み過程、エンドソーム脱出のみならず、siRNA のキャリアからの解離過程を改良することが重要である。しかし、エンドソーム脱出やキャリアからの解離を実際に観察した報告は少ない。そこで、本検討では共焦点顕微鏡観察下、siRNA リポプレックス(LPX)の細胞内での時間変化を解析し、エンドソーム脱出ならびにキャリアからの解離過程について検討を行った。

【方法】 Rhodamine で蛍光標識したカチオニックリポソーム(組成; DOPE:Chol:DC-6-14=0.75:0.75:1(mol/mol))(CL)と Alexa Fluor 488 で蛍光標識した siRNA を電荷比(+/- = 3.8)の割合で混合し、10 分間攪拌処理を加えることで LPX を調製した。ライソゾームは LysoTracker により染色し、トランスフェクション 4、8、12 時間後に共焦点顕微鏡下、観察を行った。

【結果・考察】 トランスフェクション 4 時間後では多くの siRNA は CL と重なって存在し、siRNA は CL と複合体を形成した状態で細胞内に存在することが示された。一方、8、12 時間後では、CL の周囲に楕円状に拡散した siRNA が観察された。拡散した siRNA は、ライソゾームとは異なる位置に観察されたことから、細胞質に放出された siRNA である可能性が高いと考えられる。これまでの検討から、本 LPX を用いた場合、導入した siRNA による mRNA ノックダウンはトランスフェクション約 8 時間後から起こり始めることが示されており、siRNA の拡散が始まる時間と一致する。よって、本研究で観察された蛍光標識 siRNA の拡散を指標とすることで、細胞内に導入した siRNA がいつ、どの程度エンドソームから脱出し、キャリアから解離するかを評価することが可能になると期待される。