

28U-am06

siRNA 搭載脂質ナノキャリアを用いた樹状細胞における遺伝子ノックダウンの律速段階の解明

○藤原 優希¹, 中村 孝司¹, 藁科 翔太¹, 原島 秀吉¹ (¹北大院薬)

【目的】樹状細胞 (DC) は免疫応答開始に重要な抗原提示細胞であることから、siRNA による DC の機能制御は免疫療法において有用である。しかしながら、培養細胞と比較して DC への siRNA 導入は困難である。DC への siRNA 導入効率の低さの原因は明らかになっていないことから、本研究では DC と培養細胞における siRNA 導入後の細胞内動態を比較することで、DC における siRNA 導入の律速段階を明らかにすることを目的とした。

【方法】DC はマウス骨髄細胞から誘導し、培養細胞は Hepalclc7 と B16F1 を用いた。トランスフェクション試薬は Lipofectamine 2000 (LFA) を用いた。各細胞における標的遺伝子のノックダウンはリアルタイム RT-PCR 法により評価した。また蛍光標識した LFA を用いて、細胞への取り込み及び顕微鏡による細胞内動態の評価を行った。さらに細胞内の siRNA 量とノックダウン活性の相関を調べた。

【結果および考察】LFA を用いて siRNA を導入した結果、培養細胞では用量依存的な遺伝子ノックダウンが認められたが、DC では高用量においても 50%ほどのノックダウン効率であった。一方で、DC は培養細胞と比較して、細胞への取り込み、エンドソーム脱出、細胞内 siRNA 量の全てにおいて有利であることが明らかになった。また、細胞内 siRNA 量の AUC を算出してノックダウンとの相関性を評価したところ、培養細胞では二者の関係に相関性が得られ、AUC が高値であるほどノックダウンも効率的であることが示されたが、DC では AUC とノックダウン効率が相関しなかった。以上より、DC における遺伝子ノックダウンの律速段階は、細胞内の siRNA 量ではなく、細胞内へ siRNA が放出された後の過程にあることが示唆された。