



Title	アンチセンス核酸の細胞内取り込みと標的RNA分解機構に関する研究
Author(s)	堀, 真一郎
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/56181">https://doi.org/10.18910/56181</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

アンチセンス核酸の細胞内取り込みと  
標的RNA分解機構に関する研究

大阪大学大学院薬学研究科

創成薬学専攻 生物有機化学分野

堀 真一郎

## 略語一覽

AGO2	: argonaute 2
AIDS	: acquired immune deficiency syndrome
AP2M1	: adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
APOB	: apolipoprotein B
ASO	: antisense oligonucleotide
2',4'-BNA	: 2',4'-bridged nucleic acid
BSA	: bovine serum albumin
CEM	: Ca <sup>2+</sup> enrichment of medium
CMV	: cytomegalovirus
Ct	: cycle threshold
DDS	: drug delivery system
DIC	: differential interference contrast
DLS	: dynamic light scattering
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	: deoxyribonucleic acid
DTT	: dithiothreitol
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	: ethidium bromide
FACS	: fluorescence activated cell sorting
FBS	: fetal bovine serum
FDA	: food and drug administration
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HER3	: human epidermal growth factor receptor 3
HRP	: horseradish peroxidase
JCRB	: Japanese collection of research bioresources
KD	: knockdown
LNA	: locked nucleic acid
lncRNA	: long non-coding RNA
MOE	: 2'- <i>O</i> -methoxyethyl
MOI	: multiplicity of infection
mRNA	: messenger RNA
NMD	: nonsense-mediated mRNA decay
2'-OMe	: 2'- <i>O</i> -methyl

ORF	: open reading frame
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PdI	: polydispersity index
PMO	: phosphodiarnidate morpholino oligo
PNA	: peptide nucleic acid
pre-mRNA	: precursor messenger RNA
PS	: phosphorothioate
PTC	: premature termination codon
PVDF	: polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	: quantitative real-time PCR
5'RACE	: 5' rapid amplification of cDNA ends
RFP	: red fluorescent protein
RISC	: RNA-induced silencing complex
RIPA	: radio-immunoprecipitation assay
RNA	: ribonucleic acid
RNAi	: RNA interference
RNase H1	: ribonuclease H1
rRNA	: ribosomal RNA
RT-PCR	: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	: sodium dodecyl sulfate
sgRNA	: single guide RNA
shRNA	: small/short hairpin RNA
siRNA	: small interfering RNA
snoRNA	: small nucleolar RNA
SSO	: splice switching oligonucleotide
STAT3	: signal transducer and activator of transcription 3
SV40	: simian virus 40
TBE	: tris-borate-EDTA
TEM	: transmission electron microscope
TAT	: trans-activator of transcription
tRNA	: transfer RNA
VPS	: vacuolar protein sorting
XRN	: 5'-3' exoribonuclease

# 目 次

序論 .....	1
本論 .....	4
<b>第一章 Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium (CEM) 法の開発 .....</b>	<b>4</b>
第一節 蛍光タンパク質を利用した簡便なASO活性測定系の構築 .....	5
第二節 CaCl <sub>2</sub> 添加による ASO の <i>in vitro</i> 活性促進効果 .....	9
第三節 CEM 法を利用した ASO の <i>in vivo</i> 活性予測 .....	16
第四節 初代培養肝細胞での効果 .....	19
小括 .....	20
<b>第二章 CEM法を利用したASOの作用メカニズムの解析 .....</b>	<b>22</b>
第一節 CEM 法と各種導入法による ASO の細胞内局在解析 .....	22
第二節 ASO の細胞内取り込みに及ぼす影響 .....	24
第三節 CaCl <sub>2</sub> 添加培地における粒子形成能の評価 .....	26
第四節 核酸の骨格構造や電荷の影響 .....	29
第五節 CEM法とshRNAライブラリーを利用した分子スクリーニング .....	34
小括 .....	40
<b>第三章 ASOの標的RNA分解メカニズムの解析 .....</b>	<b>42</b>
第一節 ASO の標的 RNA 分解に対する RNase H1 の寄与 .....	42
第二節 ASOの標的RNA分解に対するXRN1,2の寄与 .....	45
第三節 XRN2による標的RNA分解機構の検証 .....	47
小括 .....	53
総括 .....	55
実験の部 .....	57
謝辞 .....	72
参考文献 .....	73

## 序 論

1978年、13 merの一本鎖DNA (deoxyribonucleic acid) を用いることで、ラウス肉腫ウイルスの複製やタンパク質の発現が阻害できることが初めて報告<sup>1,2)</sup>された。その後、細胞内の標的RNA (ribonucleic acid) に対して相補的な配列を持つ一本鎖の核酸はアンチセンス核酸 (antisense oligonucleotide, ASO) と定義され、特定の遺伝子発現のみを特異的に抑制できる基礎研究ツールとして幅広く利用されてきた<sup>3)</sup>。ASOは、標的のRNAと二重鎖を形成することで、RNase H1 (ribonuclease H1) を介した標的RNAの分解を誘導するか、もしくは、立体障害的に作用して、翻訳を特異的に阻害できることから、理論上、遺伝子の機能に関わらず、全ての遺伝子が標的候補となり得る。さらに、microRNAやlong non-coding RNAなどの機能性の転写物やウイルスゲノムなども標的とできることから、低分子創薬のターゲット枯渇が叫ばれる中、近年では基礎研究ツールとしての利用に留まらず、医薬品としての応用にも注目が集められている。

ASO を *in vivo* に投与する場合、天然のオリゴヌクレオチドでは分解酵素であるヌクレアーゼによって速やかに分解されてしまうことから、生体内で利用する上では、その安定性の改善が必須である。オリゴヌクレオチドのリン酸ジエステル部にホスホロチオエート (phosphorothioate, PS) 修飾を施すことによってヌクレアーゼ耐性が大きく向上<sup>4)</sup>したことで、1998年には、世界初のアンチセンス医薬品として、21 mer の PS 修飾 ASO である Vitravene® (一般名; fomivirsen) が AIDS (acquired immune deficiency syndrome) 患者の CMV (cytomegalovirus) 網膜炎に対する硝子体内投与薬として FDA (food and drug administration) に承認<sup>5)</sup>され、アンチセンス医薬品に対する期待が大きく高まった。しかしながら、PS 修飾だけでは、活性や持続性、体内動態の面で課題を残し、適応拡大が進まなかったことから、2000年には商業上の理由により販売が中止となった。その後、PS 修飾に加えて、核酸糖部の2'位に修飾を施した 2'-O-methyl (2'-OMe) 体<sup>6)</sup>や 2'-O-methoxyethyl (MOE) 体<sup>7)</sup>、および、当研究室で開発された架橋型人工核酸 2',4'-BNA/LNA (2',4'-bridged nucleic acid / locked nucleic acid)<sup>8,9)</sup>などを ASO の両末端に組み合わせた gapmer と呼ばれる構造<sup>10,11)</sup>を用いることにより、RNase H1 の誘導活性に加えて、標的 RNA に対する二重鎖安定性や酵素耐性が更に向上したことで、特別な DDS (drug delivery system) ツールが無くとも全身投与が可能となり<sup>12-17)</sup>、2013年には、全身投与による初めてのアンチセンス医薬品として 20 mer の MOE 修飾 gapmer 型 ASO である Kynamro® (一般名; mipomersen) がホモ接合型及び重篤なヘテロ接合性家族性高コレステロール血症を対象として FDA に承認されている<sup>18-21)</sup>。その他、臨床試験に進んでいるアンチセンス医薬品も多数<sup>17)</sup>あり、今後、ASO は従来の低分子医薬品や抗体医薬品とは全く異なる作用メカニズムを利用することで画期的な新薬となる可能性を秘めている。

しかしながら、現時点では、全身投与で有効性を示す投与量はまだまだ多く、高用量に伴う

治療費の増加や長期投与による肝毒性のリスク<sup>21)</sup>なども課題として懸念されてきている。今後、このような課題が解決され、アンチセンス医薬品の市場が開拓されるには、より少量で高い薬効を示すアンチセンス医薬品を効率良く取得できる基盤を構築すると共に、ASOの基本的な作用機序に関する理解も深めることが重要だと考えられる。しかしながら、臨床応用が益々注目される一方で、有効かつ安全なASOを効率良く取得する評価法の開発やASOの基本的な作用機序に関する理解は未だ遅れているのが現状である。先に述べたように、核酸修飾技術の発展に伴い、*in vivo*においては特別なDDSツールを利用しなくてもASOは全身投与で効果を示すようになってきているが、これまで、ASOの有効性を*in vitro*で評価する際には、その膜透過性の低さから、主にリポソームなどの導入試薬を用いた手法が汎用されてきた。このような導入試薬を用いた手法は、しばしば*in vitro*でのみ高い活性を示すASOが含まれており、*in vivo*で有効なASOを取得する上では偽陽性となる懸念が指摘されている<sup>3,22)</sup>。一方、2010年、Steinらは、PS修飾に加えて、2',4'-BNA/LNA修飾を施したgapmer型ASOは特別な導入試薬を用いなくても培地に添加するだけで細胞内に取り込まれ、活性を示すことを見出した<sup>23)</sup>。Free-uptake法、または、gymnosis法とも呼ばれる本手法は、興味深いことに、従来の導入試薬を用いた場合と比較して、*in vivo*における有効性の予測精度が高いことも示唆されている<sup>22-24)</sup>。しかしながら、free-uptake法には、このような明らかな利点がある一方で、活性を示すのに通常数 $\mu\text{M}$ と高いASO濃度が必要なこと、また、十分な活性を示すまでに長時間培地中でASOに曝露させる必要があること、さらに、細胞株によって取り込み効率や有効性が大きく異なることなど、*in vivo*での効果を完全に反映しているとは言い難く、実用面での課題も残されていた。

一方、より少量で有効なASOを開発する上では、膜透過性に乏しいASOがどのように細胞内へ取り込まれ、作用部位まで輸送されているのかを知ることも重要であるが、その分子レベルの理解は未だ遅れているのが現状である。すなわち、ASOは標的RNAと特異的な二重鎖を形成した後、RNase H1を介した標的RNAの切断を引き起こすことは広く知られているが<sup>25)</sup>、ASOがどのように細胞内へ取り込まれ、標的RNAに結合するまでにどのような分子と相互作用するのか、その詳細は未だ不明な点が多く残されている。先行研究において、ASOの細胞内取り込みは主にエンドサイトーシスを介しており<sup>26,27)</sup>、ASOが低濃度の条件では、主にクラスリン介在性のエンドサイトーシスが、一方、ASOが高濃度の条件では細胞外液を取り込む液相エンドサイトーシスが優位な経路となる事が報告されている<sup>28)</sup>。また、ASOの取り込みには、その大部分を占めるnon-productive経路と少数のproductive経路の2つがあることが提唱<sup>26,29,30)</sup>されており、クラスリン介在性エンドサイトーシスに関わるアダプタータンパクのサブユニットであるAP2M1(adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit)<sup>31,32)</sup>を発現抑制するとASO活性が低下することから、productive経路にはAP2M1が関与していることが示唆されている<sup>26)</sup>。ただし、同報告では、クラスリン自体を発現抑制してもASO活性は変化しておらず、先行研究と矛盾する点も見られている。さらに近年、PS修飾ASOに結合する細胞内タンパクが複数報告されたが<sup>33,34)</sup>、それらの中

に ASO の細胞内取り込みや輸送に関わる膜タンパクなどは含まれておらず、多くのタンパクは発現を抑制しても ASO の活性に変化を与えないか、影響しても微弱な変化を示す程度である上、細胞懸濁液を利用した実験であったため、生細胞内では ASO と相互作用していない可能性もあると考察されている<sup>34)</sup>。このように、ASO の細胞内取り込みや輸送、および、活性発現に関わる分子など、その作用機序の詳細は未だ不明な点が多く残されているのが現状である。

さらに、ASOによる毒性発現のメカニズムを明らかにする上では、まず、標的RNAの分解機構を正しく理解することが重要であるが、これまでにその分解機構の詳細は明らかにされていない。ASOの標的となったRNAはRNase H1を介して切断を受けた後、その切断産物は細胞内で直ぐに消失することから、それらは細胞内のヌクレアーゼによって急速に分解処理を受けていると考えられているが、具体的な関連分子は不明であった。加えて、RNase H1は主に細胞質よりも核に多く局在している<sup>35)</sup>ことから、mRNA (messenger RNA) と pre-mRNA (precursor mRNA) の両方がASOの標的となり得るが、両者が同じ分解経路によって処理されているのかといった点も不明なままであった。

以上のような背景から、今後、優れたアンチセンス医薬品が継続的に開発されていく上では、有効かつ安全なASOを効率的に取得する手法を開発すると共に、ASOの作用機序の詳細を明らかにしていくことが望まれる。そこで本研究では、まず、第一章にて生体内で有効なASOをより効率的に単離できる評価系の確立を目指し、新規の*in vitro*評価法であるCEM (Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium) 法を開発した。次に、第二章では、CEM法を利用した際の作用メカニズムを解析し、その有用性を検証した上で、ASOの細胞内取り込みや活性発現に関わる分子の探索を行った。さらに、第三章では、標的RNAがASOを介して分解されるメカニズムを明らかにするため、ASOの活性に対するRNase H1の寄与を検証すると共に、標的RNAの分解に必要な細胞内の5'エキソヌクレアーゼを明らかにした。

# 本 論

## 第一章 Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium (CEM) 法の開発

ASOをはじめとして、近年では、siRNA (small interfering RNA)<sup>36)</sup>やanti-miR<sup>37)</sup>、sgRNA (single guide RNA)<sup>38)</sup>などのオリゴヌクレオチドをベースとした技術は、配列依存的に標的を正確に認識できることから、機能が未知の転写産物やタンパク質の生物学的な役割を解析する研究ツールとして、幅広く利用されている。また、近年の核酸修飾化学の技術革新に伴い、これらの核酸技術は、*in vitro*にて遺伝子の発現量やタンパク質の活性を変化させるだけでなく、活性の向上や体内動態の改善に伴い、*in vivo*における検証ツールとしての利用もなされている<sup>17,39,40)</sup>。さらに、このような修飾を施すことで、特別なDDSキャリアーがなくともオリゴ核酸は全身性の活性を示すようになったことから、理想的には、このような基礎研究ツールをそのまま核酸医薬品として臨床応用することができれば、新薬開発の期間やコストの低減にも繋がるのが期待される。しかしながら、核酸創薬の探索や開発の段階で、オリゴヌクレオチドの*in vivo*活性や毒性を適切に予測できる*in vitro*評価系はまだ確立されていないのが現状であり、従来の導入試薬を用いた手法は、しばしば偽陽性を引き起こす原因となることも指摘されている<sup>3,22)</sup>。また、導入試薬を用いた手法では、しばしば、肉眼では観察できない複合体の調製や導入試薬に由来する細胞毒性の回避、オリゴ核酸の種類に応じた最適な試薬の選択など、実際に利用するまでに多段階の予備検討が必要であることが多い。このような課題を解決するべく、いくつかの*in vitro*評価系がこれまでに開発された例もある。例えば、初代培養細胞は裸のオリゴ核酸を効率的に取り込むことができるが、この取り込みは細胞を単離後24から36時間で消失してしまうことが知られていた<sup>3,41)</sup>。Kollerらは、SV40 (simian virus 40) ラージT抗原のトランスジェニックマウスから肝実質細胞を単離し、SV40ラージT抗原マウス肝臓細胞株を樹立することで、化学修飾したオリゴ核酸を遺伝子導入試薬無しで効率良く取り込むという初代培養細胞の能力を保持した細胞株を作製することに成功している<sup>26)</sup>。しかしながら、このようなトランスジェニック技術はヒトにおける妥当性を判断する目的では利用できないという欠点がある。一方、Steinらは、PS修飾に加えて、2',4'-BNA/LNA修飾を施したgapmer型ASOは、ヒト細胞株を含む様々な細胞株において遺伝子導入試薬を使わなくても活性を示すことができることを報告した<sup>23)</sup>。また、興味深いことに、このように遺伝子導入試薬を利用せずに評価した場合の*in vitro*における2',4'-BNA/LNA修飾ASOの活性は、リポフェクション法で導入した場合と比べて、より*in vivo*活性を反映することが示唆されている<sup>22-24)</sup>。しかしながら、このような明らかな利点があるにもかかわらず、活性を示すのに数 $\mu$ Mと高いASO濃度が必要であり、十分な活性を示すまでに培地中へ長期間曝露する必要があること、また、ASOの取り込み効率は細胞株に大きく依存することなど、実用面で課題が残されていた。

一方、 $\text{Ca}^{2+}$ は培地や血液中に一定濃度含まれる金属イオンであり、血液中では、アルブミンなどの血漿タンパク質と結合した状態、リン酸などと錯体を形成した状態、フリーのカルシウムイオンの状態のいずれかの様式を取って存在している<sup>42,43</sup>。また、 $\text{Ca}^{2+}$ は核酸導入とも関わりが深く、古くは、リン酸カルシウム法と呼ばれているように、プラスミドDNAとリン酸カルシウムの共沈殿を形成させることで、哺乳類細胞への遺伝子導入に広く利用されてきた<sup>44</sup>。しかしながら、本手法の導入効率は決して高くなく、オリゴ核酸の導入にはほとんど利用されていない上、共沈殿を形成させるために厳密なpH調節などの操作が必要となることが多い<sup>45</sup>。一方、そのメカニズムの詳細は不明であるが、培地中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上げることによって、ヒストンH1タンパクやポリリジンのようなポリカチオンとプラスミドDNAとの複合体、もしくは、TAT (trans-activator of transcription) やオリゴアルギニンのようなカチオニックペプチドを付加したPNA (peptide nucleic acid) の効果が促進されることが報告されていた<sup>46-48</sup>。このような先行の知見から、培地中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させることは、ASOのようなオリゴ核酸でもその細胞内取り込みや活性に影響する可能性があるのではないかと考えた。

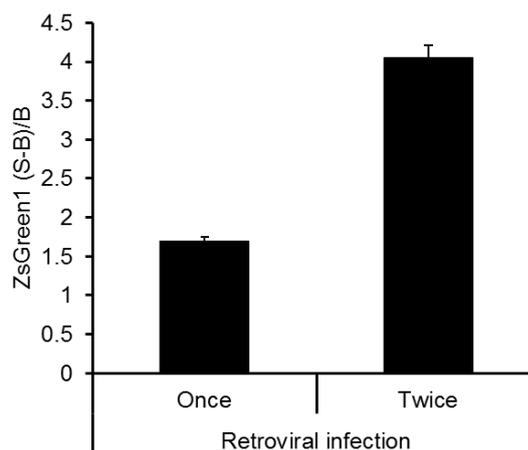
そこで本章では、まず、2',4'-BNA/LNA修飾ASOの活性を簡便に評価できる測定系を構築した上で、培地中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることによるASO活性への影響を検証した。その後、その汎用性、および細胞毒性に対する影響を解析した。さらに、既存の*in vitro*評価法によるASO活性との相関を解析すると共に、*in vivo*における各種ASOの活性と比較することで、配列スクリーニングにおける本手法の有用性についても検証を行った。また、最後に、生体内の肝実質細胞や種間を超えても同様のメカニズムを保持しているのかを検証するため、マウス初代培養肝細胞を用いた実験を行った。

## 第一節 蛍光タンパク質を利用した簡便なASO活性測定系の構築

2',4'-BNA/LNA修飾ASOの*in vitro*活性を評価するには、標的遺伝子の配列に相補的な配列を有するASOを設計・合成し、細胞内に導入した後、標的遺伝子のmRNA、もしくはタンパク質の発現量、またはタンパク質の活性を測定するという手法が一般的に利用されている。しかしながら、mRNAやタンパク質での発現量を測定する場合は、通常、細胞を溶解させた後、qRT-PCR (quantitative real-time PCR) やWestern blotting、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、酵素アッセイなどの分子生物学的、もしくは、生化学的手法によって解析がなされるが、経時的な変化を解析する際には、時点毎に並列した解析を行う必要がある。一方、標的遺伝子として外来の蛍光タンパク質を利用することができれば、その蛍光強度を定量することで、タンパク発現量に依存したレポーター活性としてASOの発現抑制 (knockdown, KD) 活性を生細胞のまま簡便に測定できるだけでなく、同一ウェル内で経時的な解析が可能である。また、外来遺伝子のため、細胞内在性の遺伝子発現変化やパスウェイの影響を受けにくく、非特異的な効果を低減させた評価ができる。さらに、第二

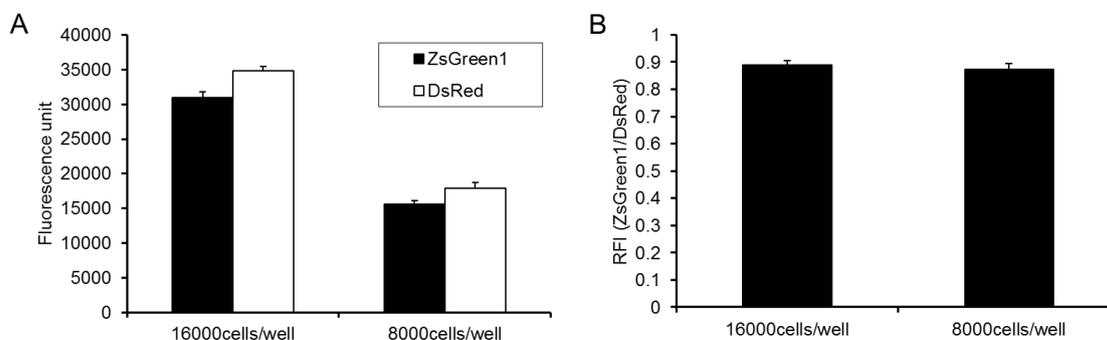
章で後述するように、ASOの細胞内取り込みや活性発現に関わる分子を探索する上で、スループットの高いスクリーニング系として利用できるというメリットも挙げられる。このような理由から、ASOの活性を指標にした簡便なレポーターアッセイ系を構築することを目的として、まず、十分な検出感度を有する蛍光タンパク質の安定発現細胞を作製した。蛍光タンパク質としては、細胞内で4量体を形成し、明るい緑色蛍光（励起極大波長；493 nm、蛍光極大波長；505 nm）を発するZsGreen1<sup>49)</sup>を選択した。ZsGreen1の全長を発現するレトロウイルスベクターを構築後、組換えレトロウイルスを作製し、ヒト肝臓がん由来HLE細胞に1回または2回感染させ、ネオマイシン存在下で数日培養後、ZsGreen1安定発現細胞を樹立した。

Fig.1-1は組換えレトロウイルスを1回または2回感染させて作製したZsGreen1安定発現細胞の蛍光強度を解析した結果である。重複感染により、ZsGreen1の蛍光強度が増加し、シグナル対バックグラウンド比が約4まで向上したことから、以降の解析には2回重複感染させた安定発現細胞 (ZsG-N1-2/HLE) を



**Fig.1-1 Signal to background ratio of ZsGreen1 in HLE cells stably expressing ZsGreen1.** S:Signal, B:Background. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

利用することとした。次に、細胞数の違いによる測定値のばらつきを抑える目的で、簡便に細胞数の補正が行えるように、赤色蛍光（励起極大波長；557 nm、蛍光極大波長；592 nm）を発するDsRed発現レトロウイルスを調製し、ZsG-N1-2/HLEへ感染後、ピューロマイシン存在下で3日間培養し、ZsGreen1とDsRedを共発現する安定発現細胞ZsG-N1-2R/HLEを樹立した。Fig.1-2は播種する細胞数を変えて測定したZsGreen1およびDsRedの蛍光強度と補正後の蛍光強度を示している。緑色および赤色蛍光単独では細胞数に依存した蛍光強度の増減が認められるが、緑色蛍光を赤色蛍光で補正することで、細胞数が異なっても同等の



**Fig.1-2 Fluorescence intensity in ZsG-N1-2R/HLE cells.** (A) Fluorescence intensity of ZsGreen1 or DsRed. (B) Relative fluorescence intensity (RFI) of ZsG-N1-2R/HLE seeded at different cell number. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

値を示したことから、赤色蛍光による補正を利用することで細胞数の違いによる測定値のばらつきを抑えることができた。

次に、ZsGreen1 に対して有効な 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO を取得するため、ZsG-N1-2R/HLE を用いた ASO スクリーニングを実施した。ZsGreen1 の ORF (open reading frame) 全長に対して設計した ASO を Table 1-1 に示す。いずれも全てのリン酸結合部位はホスホロチオアールト修飾を施し、RNase H1 による標的 RNA の切断を利用できるようにするため、9 塩基長の DNA ギャップ領域を含む 15 mer の 2',4'-BNA/LNA 修飾 gapmer 型 ASO とした。

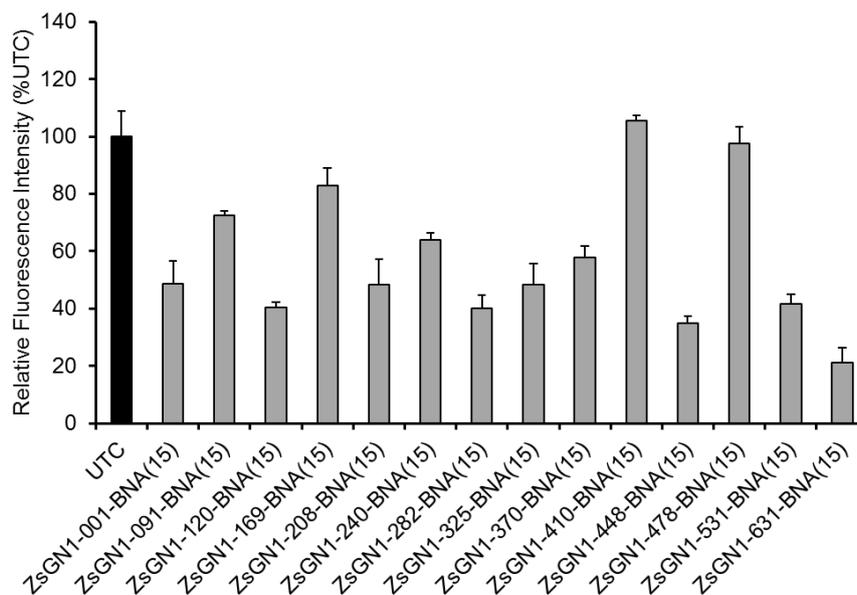
**Table 1-1 Sequences of 2',4'-BNA/LNA modified ASOs used in this section.**

ASO Name	Sequence
ZsGN1-001-BNA(15)	5' -CTTggactgggcCAt-3'
ZsGN1-091-BNA(15)	5' -GCCgatgccctcGCc-3'
ZsGN1-120-BNA(15)	5' -TTGatggcctgcTTg-3'
ZsGN1-169-BNA(15)	5' -CAAgatgtcctcGGc-3'
ZsGN1-208-BNA(15)	5' -CTCggtgaacacGCg-3'
ZsGN1-240-BNA(15)	5' -TTcTtgaagtagTCg-3'
ZsGN1-282-BNA(15)	5' -AACaggaaggagCGg-3'
ZsGN1-325-BNA(15)	5' -CACggtgatgtcGGc-3'
ZsGN1-370-BNA(15)	5' -GCCgtagaacttGGa-3'
ZsGN1-410-BNA(15)	5' -TCAtcttcttcaTCa-3'
ZsGN1-448-BNA(15)	5' -GGGgatgatcttCTc-3'
ZsGN1-478-BNA(15)	5' -GTCgcccttcaaGAt-3'
ZsGN1-531-BNA(15)	5' -TCGaaactggcagCGc-3'
ZsGN1-631-BNA(15)	5' -CTGgttcttggcGTc-3'

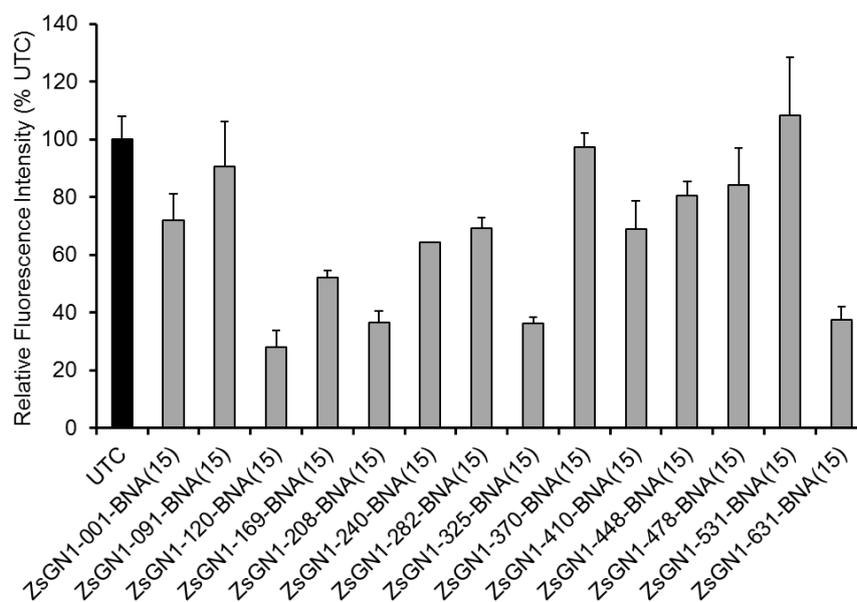
Uppercase: 2',4'-BNA/LNA, Lowercase: DNA, All linkages are phosphorothioated.

これらの ASO を ZsG-N1-2R/HLE へリポフェクション法で導入し、48 時間後の ZsGreen1 に対する KD 率を解析した結果を Fig.1-3 に示す。計 14 配列のうち、4 配列 (ZsGN1-120-BNA(15), ZsGN1-282-BNA(15), ZsGN1-448-BNA(15), ZsGN1-631-BNA(15)) で 60% 以上の KD 活性が認められた。次に、同じ ASO を ZsG-N1-2R/HLE へ遺伝子導入試薬なしの free-uptake 法で導入し、6 日後の ZsGreen1 に対する KD 率を解析した結果を Fig.1-4 に示す。こちらの結果からも、4 配列 (ZsGN1-120-BNA(15), ZsGN1-208-BNA(15), ZsGN1-325-BNA(15), ZsGN1-631-BNA(15)) で 60% 以上の KD 活性が認められた。ただし、ASO 配列間における KD 活性は導入法によって異なっていた。ASO による *in vitro* での KD 活性の優劣が導入法によって異なることは以前にも報告されているが<sup>20-22)</sup>、この原因として、ASO の内在活性

に加えて、リポフェクション法で導入した際には、リポソームとオリゴ核酸の複合体であるリポプレックスの調製、または細胞への導入時のばらつきなどが一因として考えられる。また、free-uptake 法では、オリゴ核酸の配列や高次構造によって生じるタンパク結合や細胞内動態の違いなども影響していることが予想される。以後の評価には、両導入法で共に 60% 以上の KD 活性が見られた ZsGN1-120-BNA(15) (lipofection: 60%, free-uptake: 72%)を主に利用することとした。



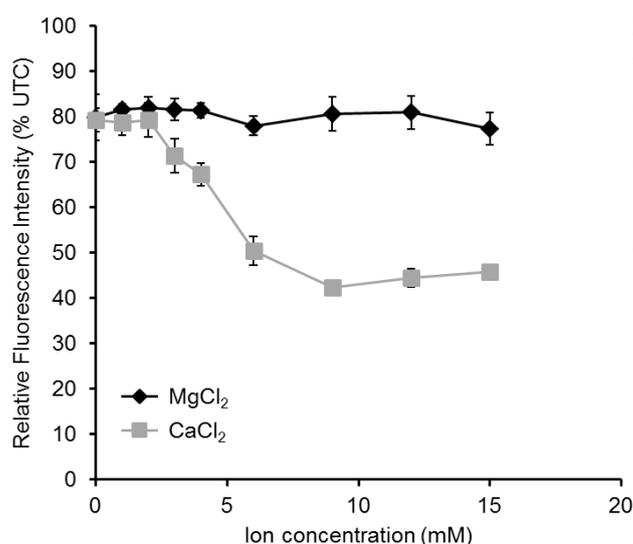
**Fig.1-3 Comparative activity of ZsGreen1-ASO using lipofection.** ZsG-N1-2R/HLE cells were lipofected with each respective ZsGreen1-ASO at 20 nM using RNAiMAX (Invitrogen). After 48 h of transfection, the fluorescence of ZsGreen1 and DsRed were measured and relative fluorescence intensity was presented as the percentage relative to the untreated control (UTC). Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



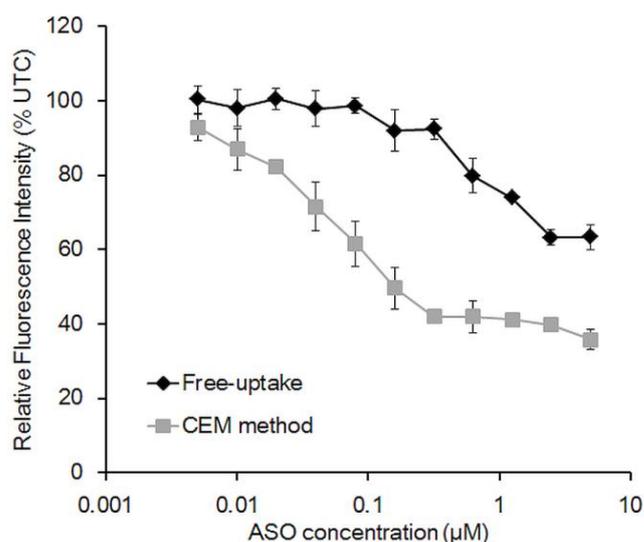
**Fig.1-4 Comparative activity of ZsGreen1-ASO delivered by free-uptake.** ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with each respective ZsGreen1-ASO at 5  $\mu$ M. After 6 days, the fluorescence of ZsGreen1 and DsRed were measured and knockdown activity was calculated. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## 第二節 CaCl<sub>2</sub>添加による ASO の *in vitro* 活性促進効果

CaCl<sub>2</sub>を培地に添加することで、正電荷を有するタンパク質とプラスミドの複合体による遺伝子発現を増強させるといった報告<sup>46,47)</sup>やカチオニックペプチドを結合させた PNA の細胞内取り込み、もしくは細胞内輸送を促進するといった報告<sup>48)</sup>がなされている。培地への CaCl<sub>2</sub>添加が、負電荷のみを有する 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO の活性にどのように影響するのか検証するため、前節で作製した ZsG-N1-2R/HLE 細胞とスクリーニングで単離した ZsGN1-120-BNA(15)を利用して、様々な濃度の CaCl<sub>2</sub> 存在下における KD 活性を評価した (Fig.1-5)。その結果、驚いたことに、ZsGN1-120-BNA(15)による KD 活性は、CaCl<sub>2</sub>未添加、すなわち、free-uptake 法の条件と比較して、CaCl<sub>2</sub>濃度依存的に向上し、9 mM 以上で最大活性を示すことが分かった。一方、比較対象と用いた MgCl<sub>2</sub>では、15 mM まで添加しても free-uptake 法と同等の約 20%の KD が見られるのみであった。この結果から、ASO の KD 活性の促進は CaCl<sub>2</sub>に特異的であることが示唆された。また、9 mM の CaCl<sub>2</sub>存在下では、



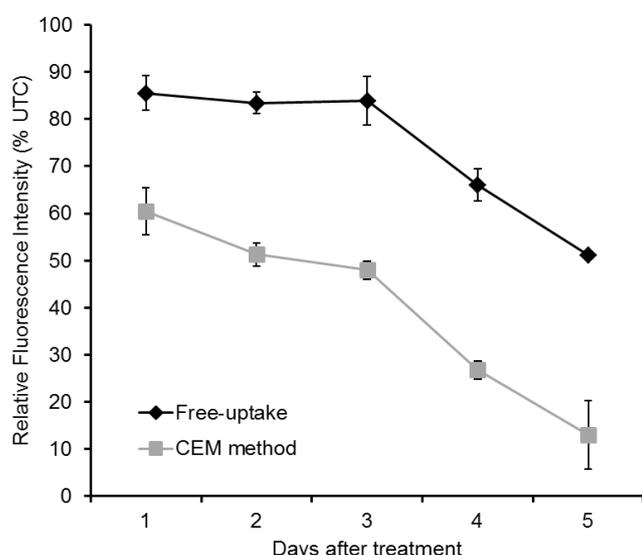
**Fig.1-5 Effect of ion concentration on the activity of ZsGreen1-ASO in ZsG-N1-2R/HLE cells.** ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with ZsGN1-120-BNA(15) at 300 nM for 4 days in the presence of MgCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub>. Relative fluorescence intensity was measured and is presented as the percentage relative to the untreated control (UTC). Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Fig.1-6 Effect of ASO concentration in ZsG-N1-2R/HLE cells.** ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with ZsGN1-120-BNA(15) at concentrations ranging from 5 nM to 5 μM for 4 days in the presence or absence of 9 mM CaCl<sub>2</sub>. Relative fluorescence intensity was measured and is presented as the percentage relative to the untreated control (UTC). Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

ASO濃度依存的なKD活性の向上も認められた (Fig.1-6)。これらの結果から、培地へのCaCl<sub>2</sub>添加によってASO活性を効率的に検出できることを発見し、本手法をCEM (Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium) 法と命名した。また、本検討の結果から、9 mMのCaCl<sub>2</sub>添加を標準的なCEM法の適用条件とした。

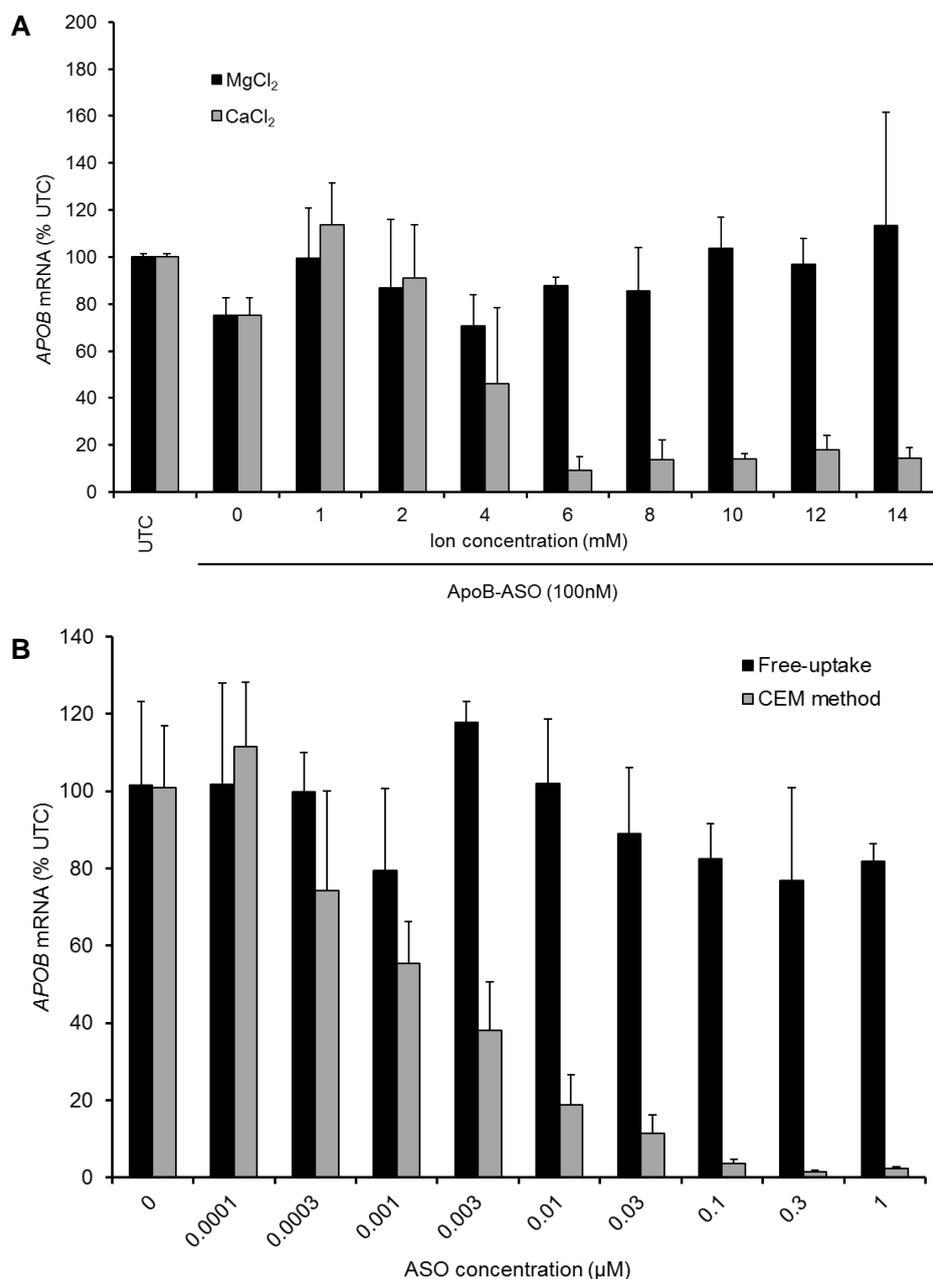
次に、CEM法を利用してZsGN1-120-BNA(15)によるKD活性の経時変化を解析した結果、興味深いことに、ASO添加24時間後と早期の段階からKD活性が有意に向上することが分かった (Fig.1-7)。Free-uptake法では、十分な活性を検出するのに通常、数μMと高いASO濃度が必要なこと、また、1週間程度の期間を要することから、より低濃度かつ早期の時点からKD活性を検出できることは、free-uptake法に対するメリットの一つだとも考えられる。



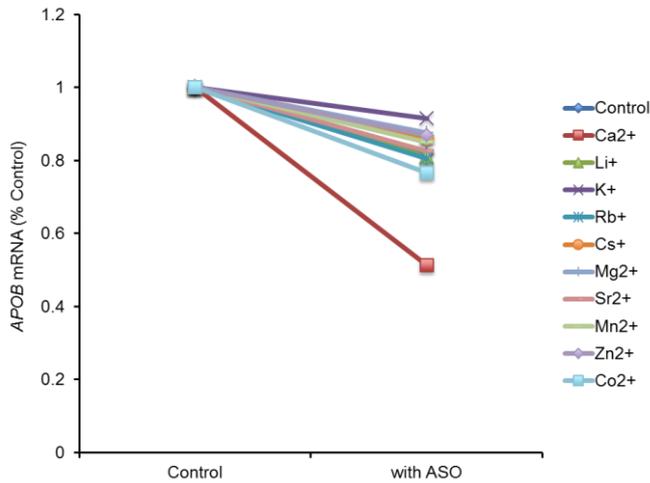
**Fig.1-7 Time course of change in the knockdown activity of ZsGreen1-ASO.** ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with ZsGN1-120-BNA(15) at 1 μM for 5 days in the presence or absence of CaCl<sub>2</sub>. Relative fluorescence intensity was measured every 24 h for 5 days. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

次に、2',4'-BNA/LNA修飾ASOの活性に対するCEM法の汎用性を検証するため、異なる細胞株を用いて、内在性に発現する遺伝子を標的とした検証を行った。標的遺伝子としては、ホモ接合型家族性高コレステロール血症に対する治療薬の標的として知られるAPOB (apolipoprotein B) を選択し、2',4'-BNA/LNA修飾ASOとしては、8塩基長のDNAギャップ領域を含み、全てのリン酸結合部位がホスホロチオアート修飾された13merのgapmerであるApoB-10177-BNA(13) (5'-GCattggtatTCA-3', N:2',4'-BNA/LNA, n:DNA) を利用した<sup>15)</sup>。ヒト肝臓がん由来Huh-7細胞に対し、様々な濃度のCaCl<sub>2</sub>存在下でApoB-10177-BNA(13) (ApoB-ASO) を作用させ、添加24時間後のAPOB mRNAに対するKD活性を評価した結果をFig.1-8Aに示す。期待した通り、Huh-7細胞に発現するAPOB mRNAに対してもCaCl<sub>2</sub>濃度依存的なASOのKD活性向上が認められた。また、ZsG-N1-2R/HLE細胞を用いた検証結果と同様、9 mMのCaCl<sub>2</sub>存在下において、ASO濃度依存的なKD活性の向上も確認された (Fig.1-8B)。さらに、CEM法によるASOのKD活性向上がCaCl<sub>2</sub>特異的に起こるのか、より詳細に検討するため、様々な金属塩化物を培地へ添加し、その影響を検証した。Fig.1-9は各種金属塩化物を最終濃度10 mMで培地に添加した際のApoB-ASOによるKD効果を解

析した結果である。ただし、Mn, Zn, Co については 10 mM では細胞毒性が強く出現したため、0.1 mM での結果を示している。各種金属塩化物を添加していない条件 (Control) と比べて、CaCl<sub>2</sub> 以外の各種金属塩化物では、ASO の KD 活性に大きな変化は見られなかったことから、やはり、この促進効果は CaCl<sub>2</sub> に特異的であることが明らかとなった。

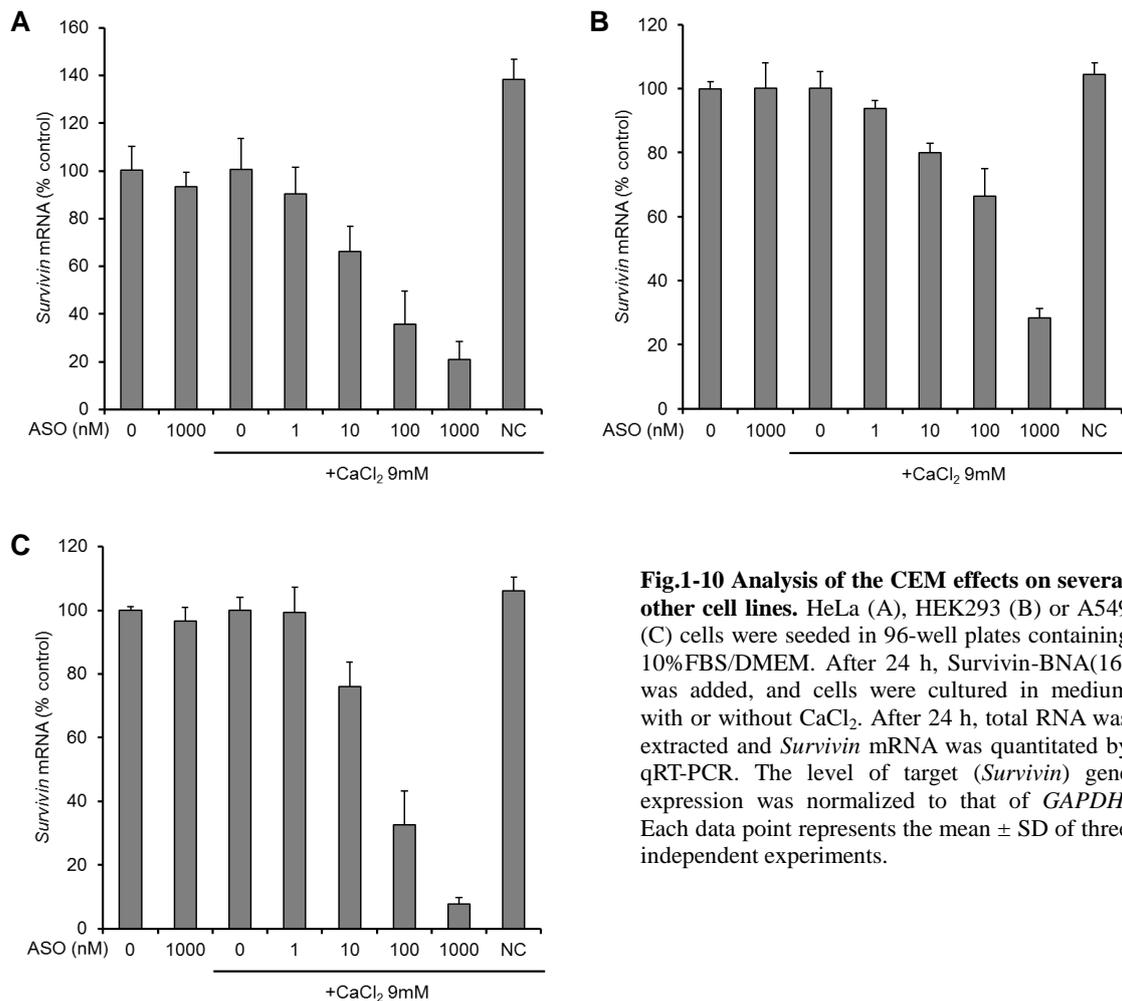


**Fig.1-8 CEM effect on the activity of 2',4'-BNA/LNA modified ApoB-ASO.** (A) Effect of ion concentration on the activity of ApoB-ASO in Huh-7 cells. Huh-7 cells were treated with ApoB-ASO at 100 nM for 24 h in the presence of MgCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub>. Total RNA was extracted and *APOB* mRNA was quantitated by qRT-PCR. The relative quantification of *APOB* mRNA was normalized against the expression of the *GAPDH* gene. (B) Dose dependency of ApoB-ASO. Huh-7 cells were treated with ApoB-ASO at concentrations ranging from 0.1 nM to 1 μM for 24 h in the presence or absence of 9 mM CaCl<sub>2</sub>. Total RNA was extracted and *APOB* mRNA was quantitated by qRT-PCR. The relative quantification of *APOB* mRNA was normalized against the expression of the *GAPDH* gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.



**Fig.1-9 Analysis of the effects of other metals on Huh-7 cells.** Huh-7 cells were seeded in 96-well plates in 10% FBS/DMEM. After 24 h, ApoB-10177-BNA(13) was added in the presence or absence of each metal chloride at 10 mM. However, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and CoCl<sub>2</sub> were added at 0.1 mM due to cell toxicity at higher concentrations. After 24 h, the knockdown activity of the ASO was analyzed.

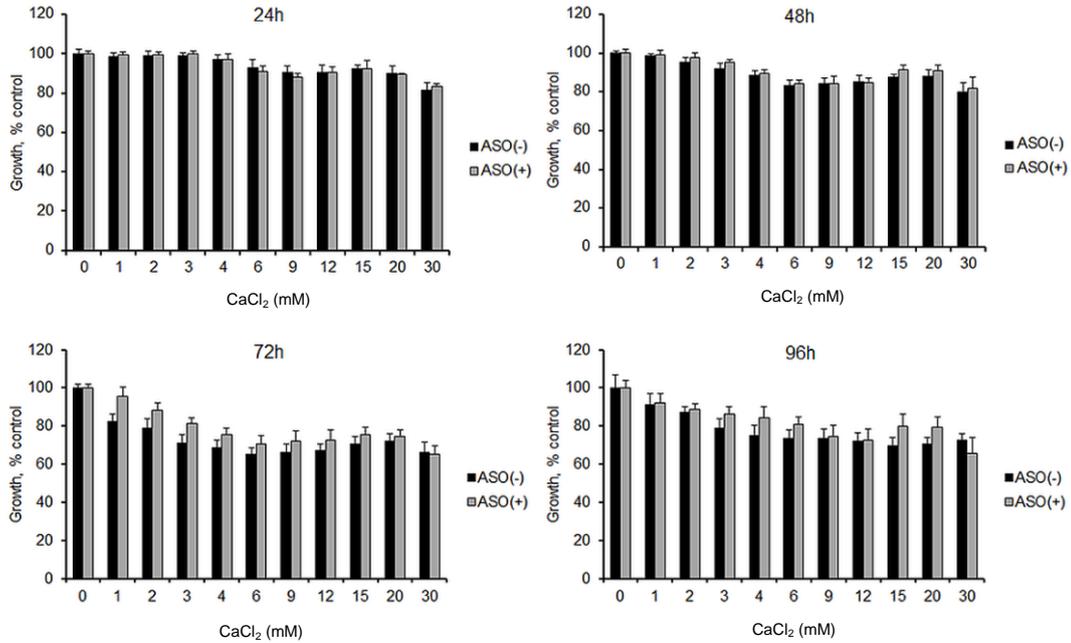
さらにCEM法の汎用性を証明する目的で、多くの癌細胞で発現していることが報告<sup>50)</sup>されている*Survivin*を標的として検証を行った。*Survivin*に対する2',4'-BNA/LNA修飾ASOである*Survivin*-BNA(16) (EZN-3042) (5'-CTCAatccatggCAGc-3', N:2',4'-BNA/LNA, n:DNA)<sup>51)</sup>を用



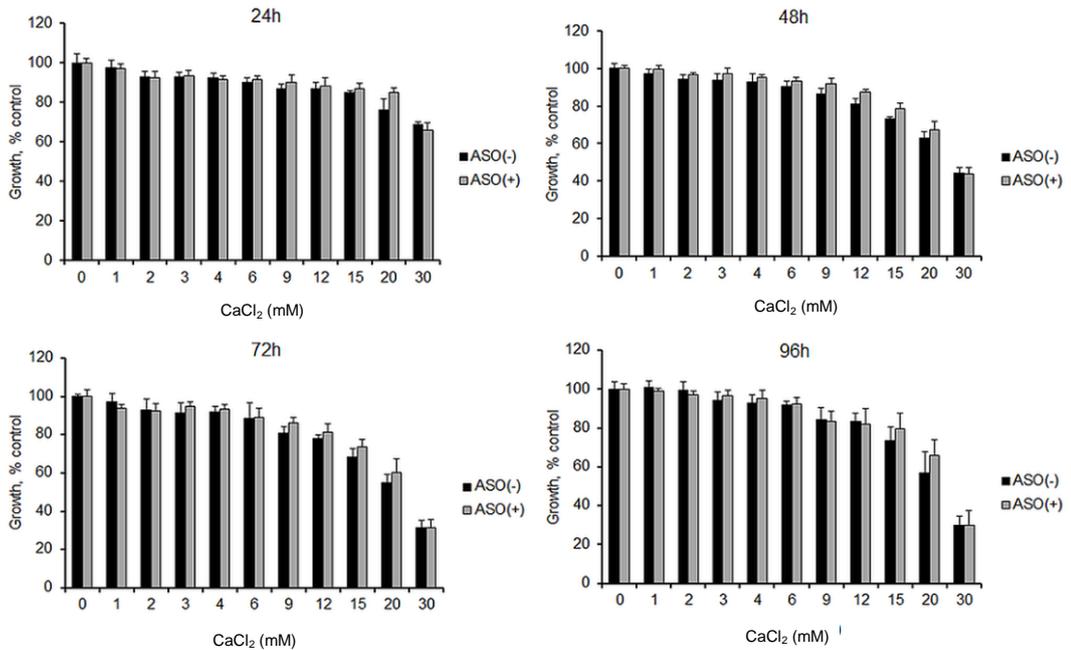
**Fig.1-10 Analysis of the CEM effects on several other cell lines.** HeLa (A), HEK293 (B) or A549 (C) cells were seeded in 96-well plates containing 10%FBS/DMEM. After 24 h, *Survivin*-BNA(16) was added, and cells were cultured in medium with or without CaCl<sub>2</sub>. After 24 h, total RNA was extracted and *Survivin* mRNA was quantitated by qRT-PCR. The level of target (*Survivin*) gene expression was normalized to that of *GAPDH*. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

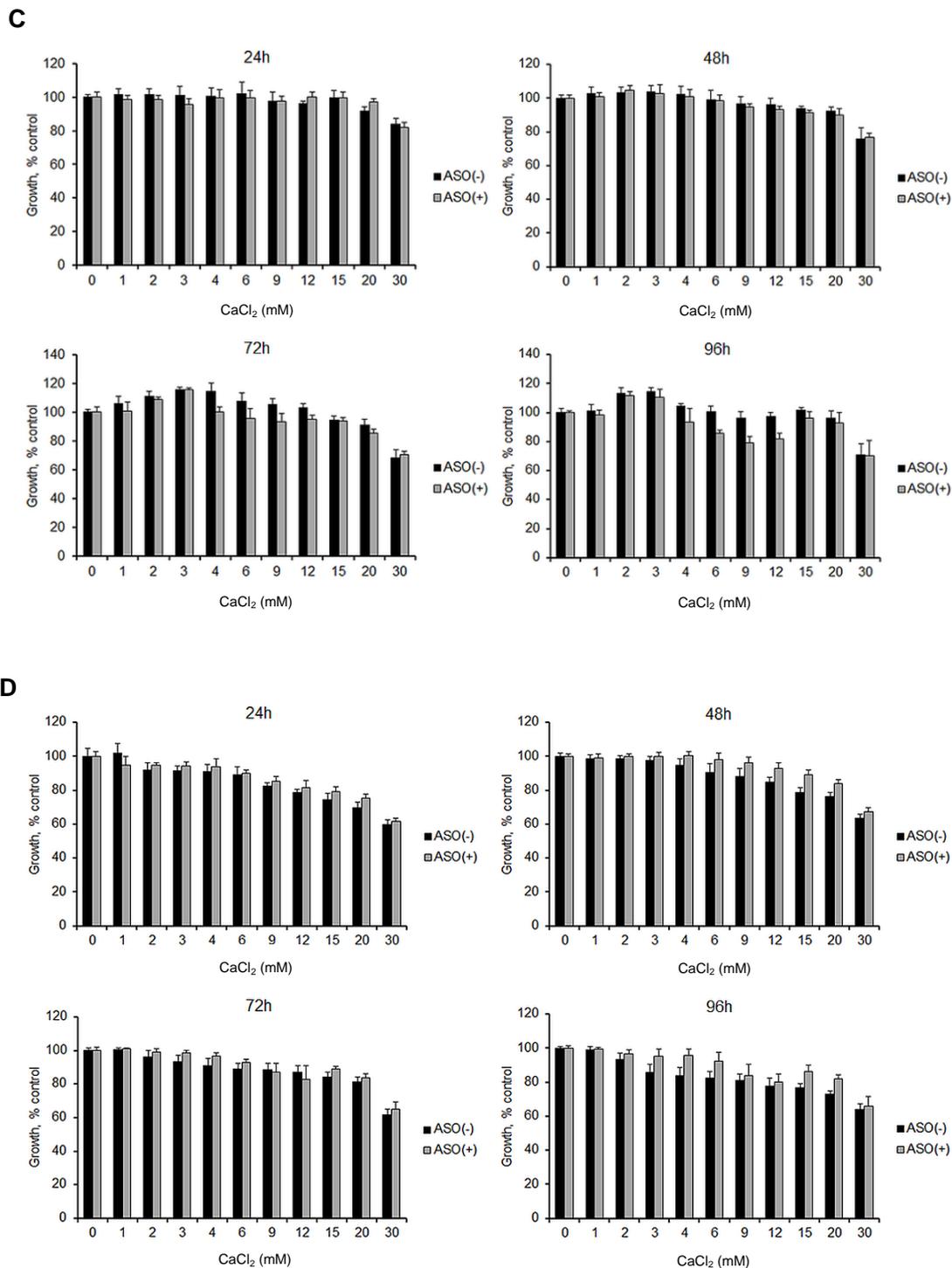
いて、3つの異なる細胞株（ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、ヒト肺胞基底上皮腺癌由来A549細胞）でその効果を検証した結果、いずれの細胞株においても、free-uptake法の条件では全くKDが見えないのに対し、9 mMのCaCl<sub>2</sub>存在下においては、ASO濃度依存的なKD活性の向上が認められた (Fig.1-10)。一方、CEM法では高濃度のCaCl<sub>2</sub>

**A**



**B**



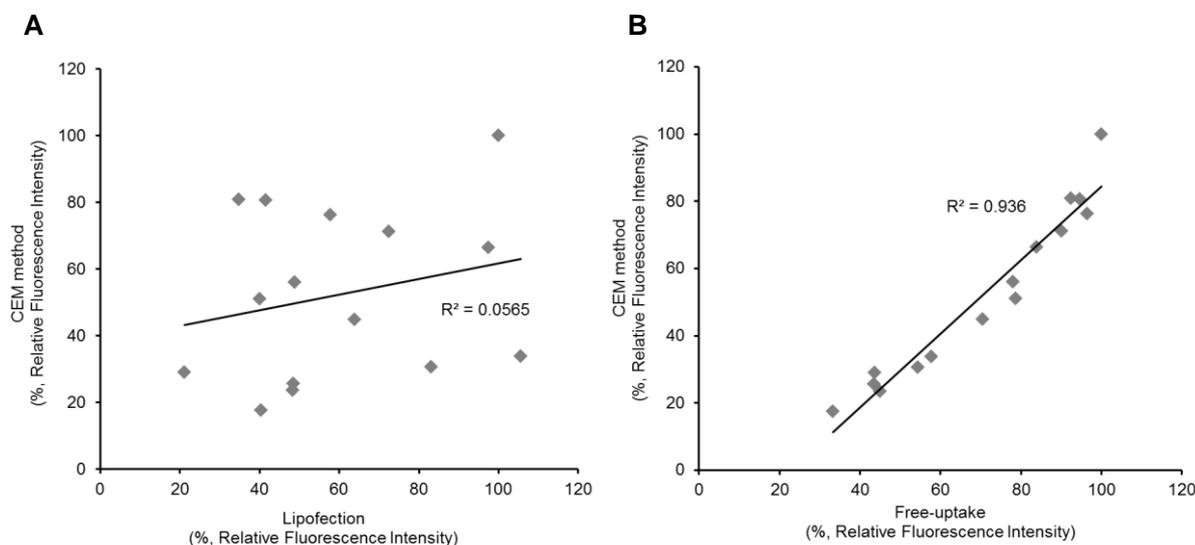


**Fig.1-11 Cellular toxicity of calcium chloride.** All of the cells were seeded in 96-well plates containing 10% FBS/DMEM (~50% confluence). After 24 h incubation at 37 °C, CaCl<sub>2</sub> was added to the medium at concentrations ranging from 0 to 30 mM in the presence or absence of 100 nM ApoB-10177-BNA(13). After 24, 48, 72 and 96 h incubation at 37 °C, the cell viability of Huh-7 (A), HeLa (B), HEK293 (C) or A549 (D) was assessed using WST-8 reagent (Kishida Chemicals, Osaka, Japan) according to manufacturer's protocol. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

を培地に添加することから、懸念点として、カルシウムの濃度上昇による細胞毒性が予想された。そこで、各種細胞株に対して、濃度を変えてCaCl<sub>2</sub>を添加し、添加4日後までの細胞増殖に対する影響を検証した (Fig.1-11)。その結果、ASO添加の有無にかかわらず、CaCl<sub>2</sub>を20 mMまで添加しても深刻な細胞毒性は見られず、CEM法の標準濃度である9 mMでは、評価系として十分に耐えうる範囲であることが分かった。以上の結果から、CEM法は、特定の細胞株や標的の遺伝子、およびASOの配列に依存せず、様々な2',4'-BNA/LNA修飾ASOのKD活性を低毒性で簡便に評価できる汎用性の高い手法であることが示された。

### 第三節 CEM 法を利用した ASO の *in vivo* 活性予測

前節での検討結果から、CEM法は、free-uptake法と比べて、より低濃度、かつ早期の時点からASOの活性を検出することができ、また、様々な細胞で利用できる汎用性の高い手法であることが証明された。一方で、ASOはその導入法によって、活性の高いASOが異なるということが指摘されていたことから<sup>22-24</sup>）、CEM法を用いた際のASOによるKD活性というのは、リポフェクション法とfree-uptake法のいずれにより近いのか、検証を行うこととした。そこで、第一節でスクリーニングに利用した計14配列のZsGreen1に対するASOを用いて、それぞれ、リポフェクション法、free-uptake法、CEM法でスクリーニングを実施したと想定し、各ASOのKD活性を比較した。Fig.1-12は、それぞれリポフェクション法とCEM法、free-uptake法とCEM法で評価した際の各ASOのKD活性をプロットした結果である。興味深いことに、CEM法で評価した時の各ASOのKD活性の優劣は、リポフェクション法で評価した際とは大きく異なり、両者の相関も低い値 ( $R^2 = 0.0565$ ) を示すことが分かった。一方、CEM法とfree-uptake法の間では、そのKD活性の優劣が非常に類似しており、全体としても高い相関 ( $R^2 = 0.936$ ) を示すことが分かった。また、これらの結果から、CEM法はfree-uptake法で利用されるASOの細胞内取り込みや輸送経路を促進することでASO活性を向上させている可能性が示唆された。



**Fig.1-12 CEM method reflects the activity of ASOs delivered by free-uptake more strictly than does lipofection.** (A) ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with different ZsGreen-ASOs at 2.5  $\mu$ M for 4 days by CEM method. To compare the activities to those obtained by lipofection, ZsG-N1-2R/HLE cells were lipofected using RNAiMAX. After 48 h, the fluorescence of ZsGreen was measured. (B) To compare the activity of each ASO with free-uptake, ZsG-N1-2R/HLE cells were treated with each ZsGreen-ASO at 5  $\mu$ M for 6 days. The mean value of relative fluorescence was plotted.

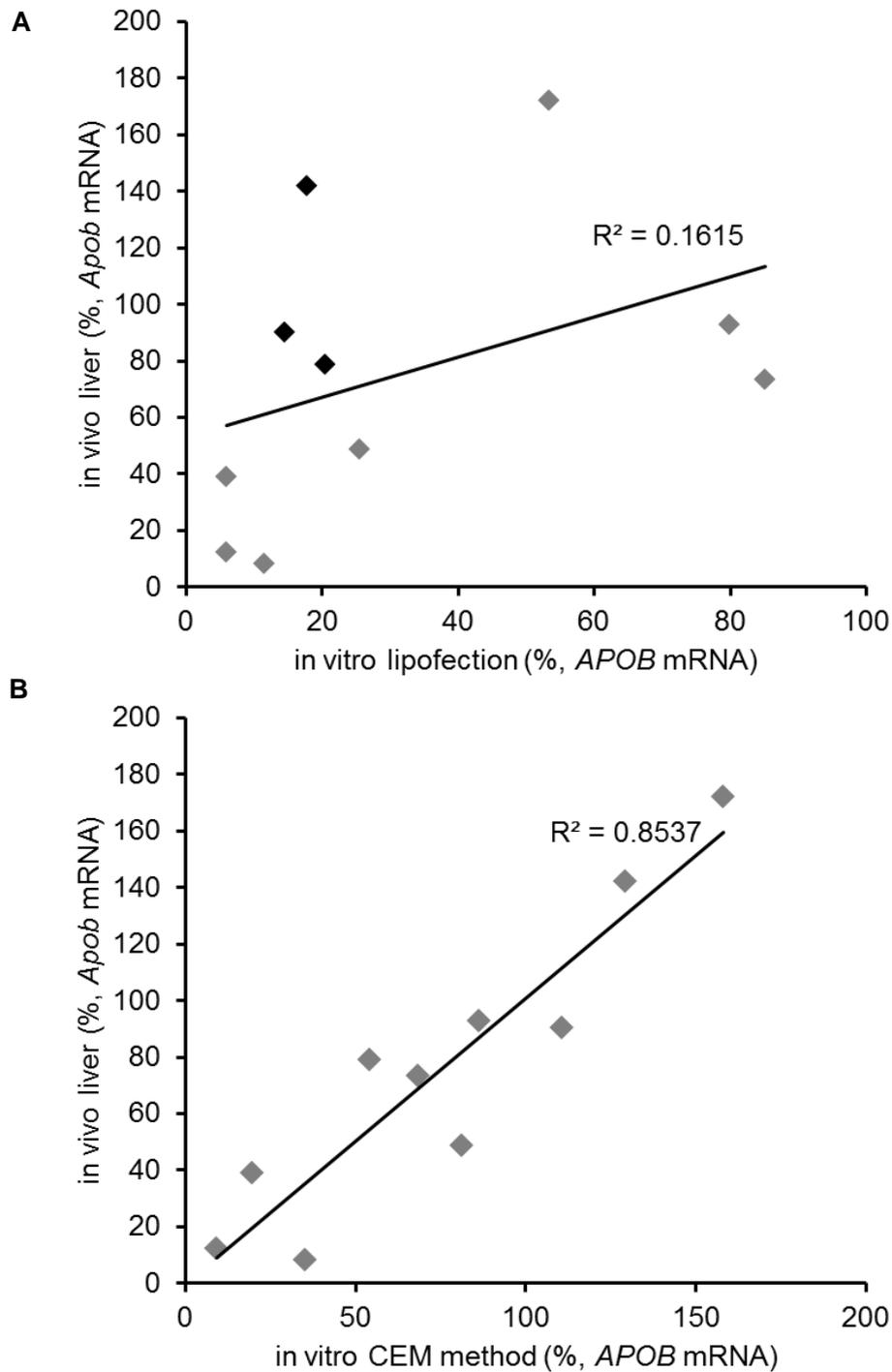
一方、free-uptake法はリポフェクション法と比べて*in vivo*における活性をより反映していること<sup>22-24,52)</sup>を考慮すると、free-uptake法と同様に、CEM法を利用した際も*in vivo*での活性を反映できると予想される。そこで、この仮説を検証するため、CEM法を利用した際の*in vitro*活性と*in vivo*における活性を直接比較することにした。標的遺伝子としては、肝臓で高発現していることが知られているAPOB (*Apob*) を利用し、ヒトとマウスの全長mRNAに対して、100%保存されている領域に対して10種類の異なる2',4'-BNA/LNA修飾ASOを設計した。用いたASOの配列をTable 1-2に示す。いずれも8塩基長のDNAギャップ領域を含み、全てのリン酸結合部位がホスホロチオアート修飾された13 merのgapmer型ASOとした。*in vitro*におけるKD活性は、これらのASOをCEM法、もしくは、リポフェクション法を利用してHuh-7細胞に導入し、24時間後のAPOB mRNA量を定量することで評価した。一方、*in vivo*における活性は、7週齢のマウスC57Bl/6J ♂ ( $n = 3$ ) へ10 mg/kgの投与量で単回皮下投与し、投与3日後の肝臓中*Apob* mRNAに対するKD活性を解析した。それぞれ、CEM法を利用した際の*in vitro*活性と*in vivo*肝臓における活性、リポフェクション法を用いた際の*in vitro*活性と*in vivo*肝臓における活性の相関を解析した結果をFig.1-13に示す。リポフェクション法で導入した場合には、遺伝子導入試薬を利用することによる偽陽性<sup>3,22)</sup>として考えられているように、*in vitro*でのみ高いKDを示すASO (図中の◆)が一部見られ、*in vivo*との相関は低い値 ( $R^2 = 0.162$ ) を示した。これに対し、CEM法を用いた場合には、*in vivo*との比較においても高い相関 ( $R^2 = 0.854$ ) が認められた。

これらの結果から、CEM法はやはり、ASOの自然な取り込み経路に作用していることが示唆されると共に、従来のリポフェクション法と比較して、*in vivo*における有効性をより高い予測精度で評価できることから、配列スクリーニングを行う上でも有用な手法であることが示された。

**Table 1-2 Sequences of 2',4'-BNA/LNA modified ASOs used in this section.**

ASO Name	Sequence
ApoB-00521-BNA(13)	5' -AAtggccagcTTG-3'
ApoB-01261-BNA(13)	5' -AAggcttgtaAAG-3'
ApoB-02101-BNA(13)	5' -TCaaatataaGAT-3'
ApoB-05141-BNA(13)	5' -AAgctctgcaTTC-3'
ApoB-05701-BNA(13)	5' -ACaccctgaaCCT-3'
ApoB-08701-BNA(13)	5' -GTgtgtaaacTTG-3'
ApoB-09621-BNA(13)	5' -ATgattgcttTGT-3'
ApoB-10461-BNA(13)	5' -TGgtatattccATT-3'
ApoB-11001-BNA(13)	5' -GGttcttagtGTT-3'
ApoB-12241-BNA(13)	5' -TCagtttttgaATA-3'

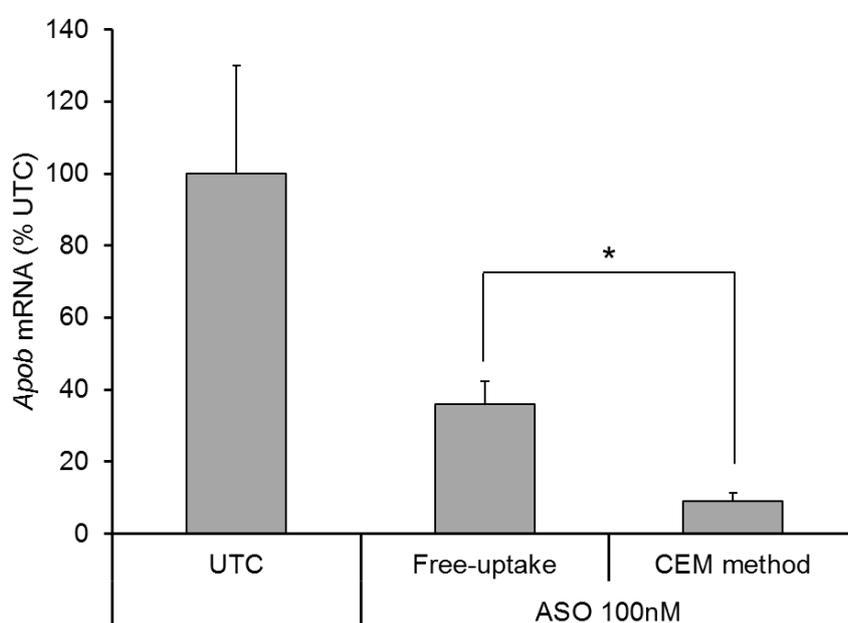
Uppercase: 2',4'-BNA/LNA, Lowercase: DNA, All linkages are phosphorothioated.



**Fig.1-13 CEM method reflects *in vivo* silencing activity more strictly than does lipofection.** To compare the *in vitro* activity of lipofection (A) and CEM (B) with *in vivo* activity, Huh-7 cells were treated with each of ten different ApoB-ASOs at 10 nM in the presence of 9 mM CaCl<sub>2</sub> in the medium or transfected using RNAiMAX. After 24 h, total RNA was extracted and APOB mRNA was quantitated by qRT-PCR. Mice (C57BL/6, n=3/group) were injected subcutaneously (at 10 mg/kg) with a single dose of each of ten ApoB-ASOs. Mice were sacrificed 72 h later, and livers were analyzed for reductions in Apob mRNA levels. The relative quantification of APOB (Apob) mRNA was normalized against the expression of the GAPDH (Gapdh) gene. Each data point represents the mean of three independent experiments. The mean value of knockdown activity was plotted in the two-dimensional space to analyze the correlation between transfection methods.

#### 第四節 初代培養肝細胞での効果

*in vitro*で見られたCEM法の効果が*in vivo*でも同様に保持されているかを検証することは、ASOの細胞内取り込みや活性発現のメカニズムを推測する上で興味深い知見となる。ただし、*in vivo*では、血中のCa濃度は約2.5 mMに維持されており、より低い濃度では低カルシウム血症を、また、高い濃度では高カルシウム血症をきたす<sup>42)</sup>。そのため、*in vitro*でCEM法の効果が認められた濃度のCaCl<sub>2</sub>をそのまま血中に投与すると、*in vivo*では重度の高カルシウム血症状態を模倣してしまい、*in vivo*で同様の検証を行うのは困難だと想定される。そこで、*in vitro*ではあるが、培養細胞株と比べて、生体により近い初代培養肝細胞を利用して、CEM法の効果が同様に見られるか検証を行った。コラゲナーゼ還流法<sup>53)</sup>により、オスのC57BL/6Jマウスの肝臓より採取した初代培養肝細胞を用いて、ASOのKD活性に対するCEM法の効果を検証した結果をFig.1-14に示す。初代培養細胞では既報<sup>3,41)</sup>の通り、CaCl<sub>2</sub>を添加しないfree-uptake法の条件でもKD活性が認められたが、CaCl<sub>2</sub>添加によって、ASOによるKD効果の増加が確認された。この結果から、*in vivo*肝臓における肝実質細胞でも同様の活性向上メカニズムを保持している可能性が示唆された。また、CEM法はヒト細胞に限らず、マウス細胞でも有効であり、種間を超えて利用可能な手法であることが示された。



**Fig.1-14 Evaluation of the effect of CEM method in mouse primary hepatocytes.** Hepatocytes were isolated from 7-week-old C57BL/6J male mice using collagenase perfusion. Isolated hepatocytes were plated on type I collagen-coated 96-well plates at  $3 \times 10^5$  cells/well. After 24 h, 9 mM CaCl<sub>2</sub> was added to the medium in the presence or absence of 100 nM ApoB-10177-BNA(13). After 24 h incubation at 37 °C, the knockdown activity of ASO was assessed. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Statistical comparisons of results were performed by Student's t-tests, \* $p < 0.005$ .

## 小括

本章では、先行の知見を元に、培地中のCa<sup>2+</sup>濃度変化が及ぼすASO活性への影響を検証し、ASOと共に培地へCaCl<sub>2</sub>を添加するだけで、ASOのKD活性を効率良く検出できることを発見し、本手法をCEM (Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium) 法と命名した。その後、その汎用性、および細胞毒性に対する影響を解析し、CEM法は、様々な細胞株において、従来のfree-uptake法よりも低濃度かつ短期間でASOの活性が評価できる汎用性の高い手法であることを示した。また、CEM法は、従来のリポフェクション法と比較して、free-uptake法や*in vivo*肝臓における活性と高い相関を示したことから、生体内で有効なASOを効率的に取得する配列スクリーニングとしても有効な手法になることを見出した。

従来の導入試薬を利用した手法は、オリゴ核酸の*in vitro*活性を効率的に検出できることから、現在、研究用途に広く利用されているが、通常は、利用するオリゴ核酸の脂溶性や電荷、サイズなどの物理化学的特性や細胞種に応じて適切な導入条件や細胞毒性を検討する必要がある。また、導入試薬を用いた場合には、しばしば*in vivo*におけるオリゴ核酸の活性を適切に予測できないことがあるが、その主な理由として、これらの試薬は*in vivo*における裸のオリゴ核酸の自然取り込み経路とは異なる経路で細胞内取り込みを促進するということが考えられる。実際、たいていの培養細胞ではオリゴ核酸の活性を検出するには、導入試薬の助けが必要である。しかしながら、生物学的に安定なオリゴ核酸はキャリアフリーで末梢組織に広く分布し、全身性の効果を示すことが可能になってきたことから<sup>54-57)</sup>、*in vitro*と*in vivo*における導入試薬の使用の有無は、その相関を低下させる要因となるだけでなく、研究ツールとしての利用から治療用のオリゴ核酸の開発へのスムーズな転換を妨げる要因にもなると考えられる。一方、free-uptake法では、先述したように、*in vivo*での有効性をより反映できると言われていたが、活性を示すのに通常数μMと高いASO濃度が必要であり、十分な活性を検出するまでに1週間程度の期間を要し、また、細胞株によって有効性が大きく異なることなどの課題も残されていた。CEM法は、安価で容易に入手可能なCaCl<sub>2</sub>を数百nM以下のASOと共に培地に添加するだけで、添加後24時間といった早期の段階から高いASO活性が検出でき、かつ、様々なヒト細胞株やマウス初代培養細胞などで幅広く有効であったことから、free-uptake法における上記の各課題を解決できると考えられる。また、CEM法は*in vivo*活性との相関を保持しながら評価ができるため、導入試薬による偽陽性という課題も解決できることを考えると、CEM法は、従来のリポフェクション法やfree-uptake法の弱みを相互に補うことができる簡便かつ安価なスクリーニング法として広く有効な手法になると期待される。

一方、以前の報告では、オリゴ核酸の肝臓類洞内皮細胞への取り込みにはスカベンジャー受容体が関与していることが示唆されているが<sup>58)</sup>、生体内におけるASOの取り込みメカニズムについては、未だ不明な点が多く、ほとんど明らかになっていないのが現状である。初代培養細胞は*in vivo*と類似の自然取り込みによって*in vitro*でも裸のオリゴ核酸を取り込

めるが、単離後24から36時間でその効果は失われてしまう<sup>3,41)</sup>。Kollerらは、SV40ラージT抗原のトランスジェニックマウスから単離した肝臓細胞から細胞株を樹立し、化学修飾したオリゴ核酸の効率的なfree-uptakeを維持させることに成功しており<sup>26)</sup>、このような細胞株を利用した解析によっても、生体内の取り込みメカニズムが明らかになる事が期待される。一方で、今回の検討から、初代培養肝細胞でもCEM法によるASO活性の向上が認められたことから、*in vivo*における肝臓実質細胞でも同様のメカニズムは保持されていることが示唆される。CEM法によってfree-uptakeによるASOの細胞内取り込み経路が促進されているとすれば、まだ明らかになっていないASOの細胞内取り込みや輸送に関わる分子機構の詳細を解明する上でも、CEM法は有用な手法になると期待される。

## 第二章 CEM法を利用したASOの作用メカニズムの解析

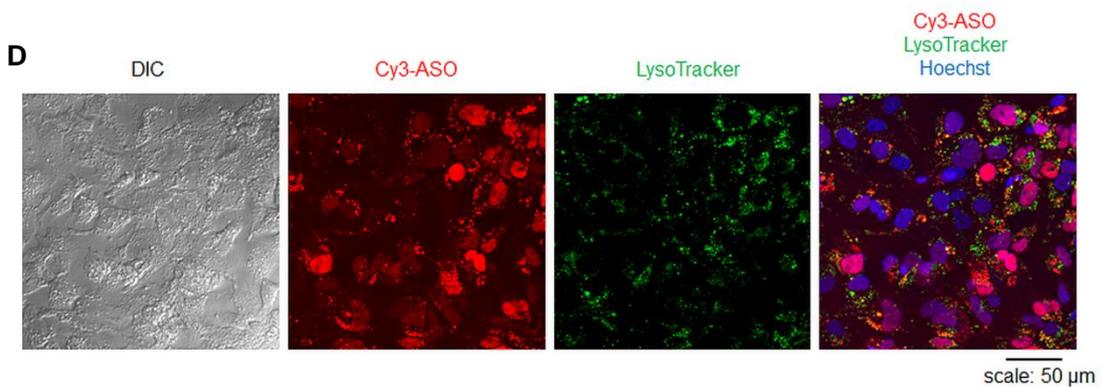
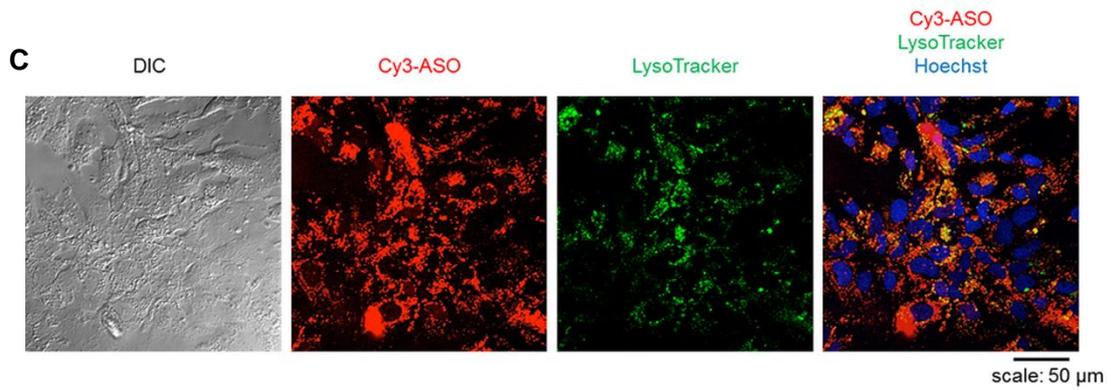
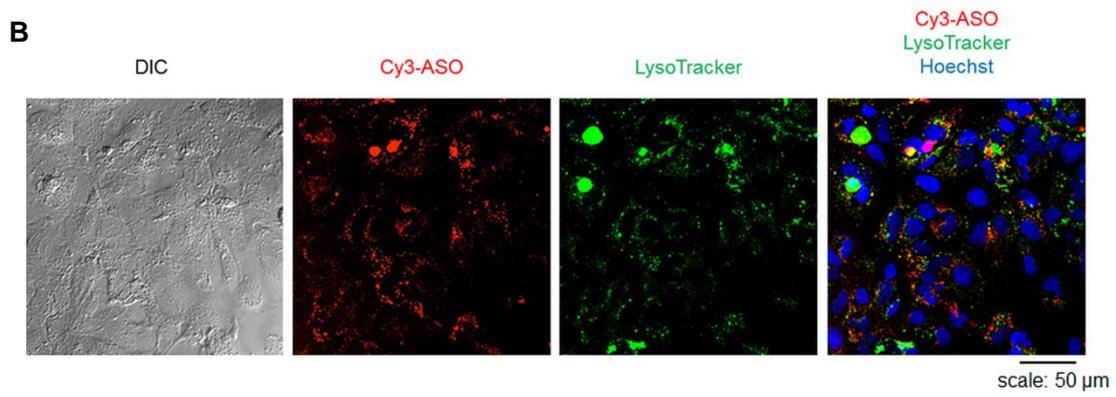
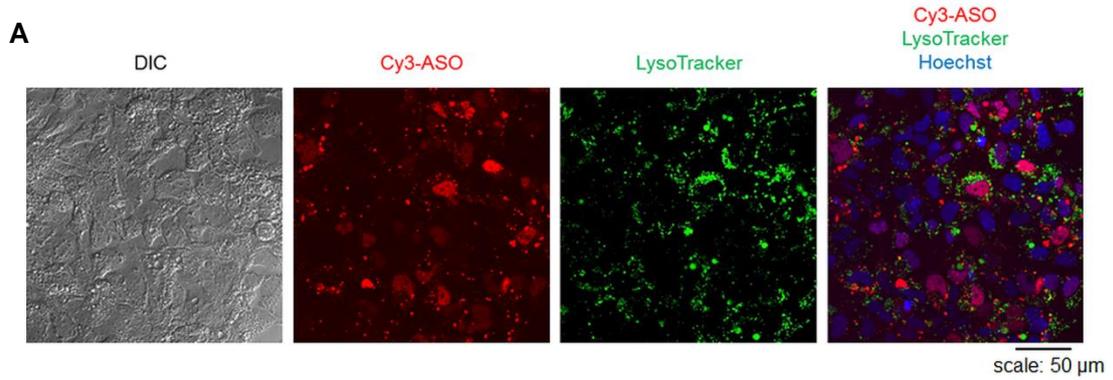
前章において、CEM法はASOの新規評価法として有用であることが示されたが、その活性はfree-uptake法や*in vivo*肝臓における活性と相関が高いことを考えると、その作用機序として、裸のオリゴ核酸の細胞内取り込みや細胞内輸送経路を促進している可能性が示唆される。また、初代培養肝細胞でもCEM法の効果が確認できたこと、実際に、生体内の血液中には一定濃度のカルシウムが存在し、アルブミンなどの血漿タンパク質と結合した状態、リン酸などと錯体を形成した状態、フリーのカルシウムイオンの状態のいずれかで存在していることから<sup>43)</sup>、いずれかの存在様式が*in vivo*肝臓におけるオリゴ核酸の活性発現に寄与している可能性も考えられる。

そこで、本章では、まず、CEM法を用いた際のASO活性の向上がどのようにして起こるのか、その作用機序を探るため、ASOの細胞内局在や細胞内取り込みへの影響を解析した。その後、CEM法が効果を示す培地中でどの様な変化が起きているのか、カルシウム濃度や血清の有無、ASO添加の有無による培地中の粒子形成能の変化を検証した。さらに、CEM法の作用機序の特徴を把握した上で、CEM法を利用し、ASOの細胞内取り込みや細胞内輸送、活性発現に関与する分子の探索を行った。

### 第一節 CEM法と各種導入法によるASOの細胞内局在解析

第一章におけるASO活性の相関解析により、CEM法で導入されたASOはリポフェクション法よりfree-uptake法と高い相関を示したことから、CEM法はfree-uptakeによる細胞内取り込みや細胞内輸送、エンドソーム脱出などの経路を促進していることが示唆される。そこで、まず、CEM法による効果がASOの細胞内取り込みや輸送に影響を与えているのか検証するため、各種導入法を利用し、ASOの細胞内局在を比較することとした。Cy3で蛍光標識したApoB-ASOを各種導入法でHuh-7細胞へ導入し、24時間後の細胞内局在を解析した結果をFig.2-1に示す。リポフェクション法で導入した場合、ASOの多くは核内に局在していた (Fig.2-1A)。対照的に、free-uptake法で取り込まれたASOの多くは、ほとんど核へは到達しておらず、核周辺やリソソームマーカーと共局在を示すものがほとんどであった (Fig.2-1B)。なお、これらの局在は先行の文献と類似した結果であった<sup>23,26)</sup>。一方、CEM法で導入されたASOはfree-uptake法で得られた細胞内局在と類似しており、核周辺やリソソームと共局在を示したが、その輝度はより強かったことから、ASOの取り込み量が増加していることが示唆された (Fig.2-1C)。さらに、古くから遺伝子導入に利用されているリン酸カルシウム法を利用してASOを導入した際の細胞内局在を解析した結果、CEM法の結果とは対照的に、リン酸カルシウム法では核に多くASOの蛍光が認められ、それはむしろリポフェクション法で見られた細胞内局在に類似するものであった (Fig.2-1D)。これらの結果から、同じようにカルシウムを用いる手法でも、その取り込み経路は全く異なることが予想されると共に、

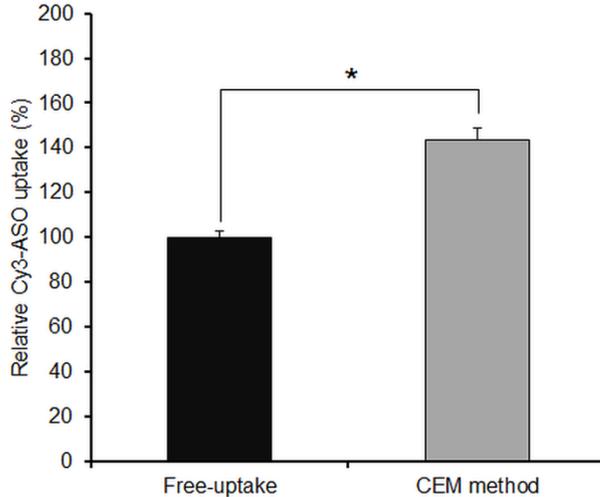
CEM法で導入されるASOは、free-uptake法で利用される細胞内取り込み経路に作用することでASO活性を促進していることが示唆された。



**Fig.2-1 CEM effect on subcellular localization of 2',4'-BNA/LNA modified ASO.** (A) Huh-7 cells were lipofected with Cy3-labeled ApoB-ASO at 100 nM using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). After 24 h of incubation, nuclei were stained with 0.5  $\mu$ M Hoechst 33342 (Life Technologies) for 30 min, following by staining of lysosomes with LysoTracker® Green DND-26 (Life Technologies) at 75 nM for 30 min at 37 °C. After staining, the medium was replaced with HBSS, and the cells were observed using a confocal laser scanning microscope (Leica, TCS SP5). (B and C) Huh-7 cells were treated with Cy3-labeled ApoB-ASO at 500 nM with or without 9 mM CaCl<sub>2</sub>. After 24 h of incubation, the subcellular localization of Cy3-labeled ApoB-ASO was visualized by confocal microscopy. (D) Huh-7 cells were transfected with the CalPhos™ Mammalian Transfection kit according to manufacturer's procedure. After 24 h of incubation, the subcellular localization of Cy3-labeled ApoB-ASO was visualized by confocal microscopy. DIC: differential interference contrast.

## 第二節 ASOの細胞内取り込みに及ぼす影響

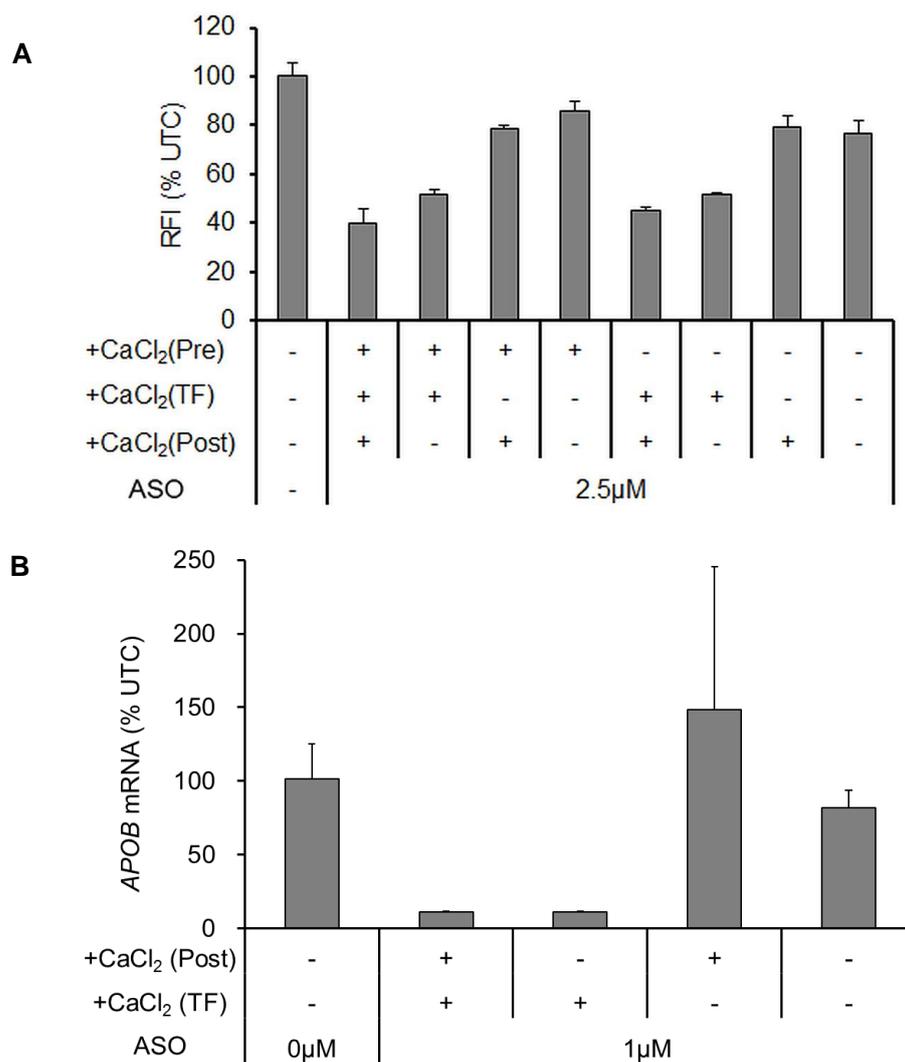
細胞内局在の解析結果から、CEM法によるASO活性の促進は、主にASOの細胞内取り込みの増加に起因していることが示唆された。そこで、実際にCEM法によってASOの細胞内取り込みが促進されているのか検証するため、まず、ASOの細胞内取り込み量の定量解析を行った。Free-uptake法もしくはCEM法の条件下において、Cy3で蛍光標識したApoB-ASOをHuh-7細胞に添加し、2時間後、フローサイトメトリーを利用して、Cy3の蛍光強度を解析した結果をFig.2-2に示す。わずか2時間という短時間にも関わらず、free-uptake法に対して、CEM法の条件下では平均蛍光強度の有意な増加が認められたことから、やはりCEM法はASOの細胞内取り込み自体を促進していることが明らかとなった。



**Fig.2-2 Flow cytometric analysis of ApoB-ASO delivery into Huh-7 cells.** Cells were treated with Cy3-labeled ApoB-ASO with or without CaCl<sub>2</sub> for 2 h in phenol red-free media, and washed twice with PBS. Cells (10,000 events) were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer, and the mean fluorescence intensity of Cy3 was calculated using CellQuest Pro software. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Statistical comparisons of results were performed by Student's t-tests, \* $p$ <0.0005.

次に、CEM法が、細胞内取り込みだけでなく、取り込み後の細胞内輸送などのステップにも影響を与えているのか検証するため、ZsGreen1-ASOとZsG-N1-2R/HLE細胞を利用して、CaCl<sub>2</sub>を添加するタイミングを変化させた際の効果を検証した。Fig.2-3Aは、ASOの添加前、添加と同時に、添加後、のいずれか、もしくはそれらの組み合わせでCaCl<sub>2</sub>を添加し、3日後のZsGreen1に対するASOのKD活性を評価した結果である。ASOと同時にCaCl<sub>2</sub>を添加した場合には、free-uptake法と比べてKD活性の向上が認められたが、ASO添加前、もしくは添加後にCaCl<sub>2</sub>を添加した場合にはKD活性はほぼ変化しなかったことから、CEM法は、やはりASO

が細胞内に取り込まれるステップを主に促進していると考えられた。また、ApoB-ASOとHuh-7細胞を用いて同様の実験を行った結果、やはり、ASOと同時にCaCl<sub>2</sub>を添加した場合にKD活性の向上が認められた (Fig.2-3B)。これらの結果から、CEM法はASOが取り込まれた後の細胞内輸送やエンドソーム脱出を促進させるというよりも、ASOの細胞内取り込みのステップを主に促進していることが明らかとなった。

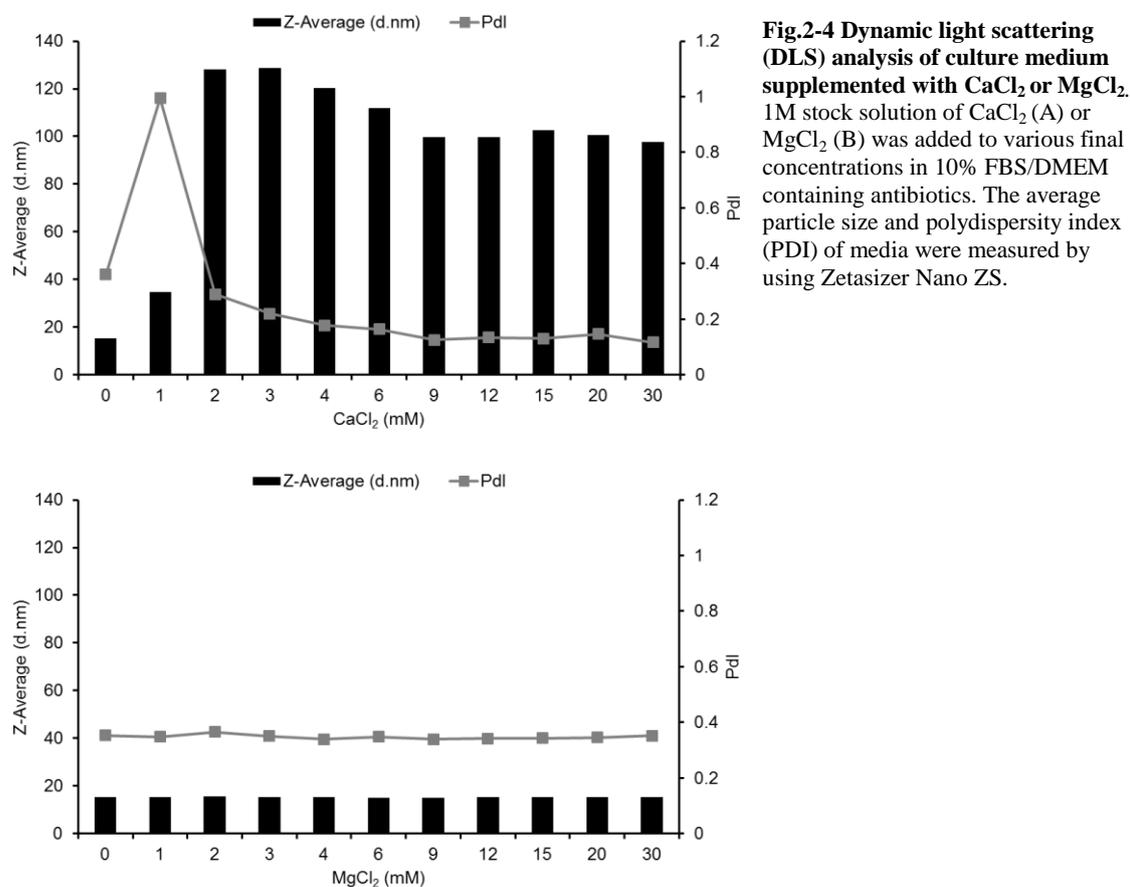


**Figure 2-3 Addition of CaCl<sub>2</sub> at different stages of cellular uptake or intracellular trafficking of ASO.** (A) ZsG-N1-2R/HLE cells were seeded in 96-well plates in 10% FBS/DMEM. After 24 h, CaCl<sub>2</sub> was added to the medium before addition of ZsGreen1-ASO (“Pre”), and/or together with addition of ASO for 7 h (“TF”), and/or after removal of ASO and washing of the cells (“Post”). At 72 h after ASO addition, the knockdown activity of the ASO was analyzed. Relative fluorescence intensity (RFI) was measured and is presented as the percentage relative to the untreated control (UTC). (B) Huh-7 cells were seeded in 96-well plates in 10% FBS/DMEM. After 24 h, CaCl<sub>2</sub> was added to the medium together with ApoB-10177-BNA(13) for 4 h (“TF”) and/or after removal of ASO and washing of the cells (“Post”). At 24 h after ASO addition, the knockdown activity of the ASO was analyzed. The relative quantification of *APOB* mRNA was normalized against expression of the *GAPDH* gene. The relative expression of *APOB* mRNA is presented as the percentage relative to the UTC. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

### 第三節 CaCl<sub>2</sub>添加培地における粒子形成能の評価

これまでの検討結果から、CEM法は、主にASOの細胞内取り込みを促進していることが明らかとなったが、その作用機序として、リン酸カルシウム法のようにCa<sup>2+</sup>が核酸のリン酸部と静電的な相互作用をし、粒子を形成することで、ASOの細胞内取り込みを促進している可能性が考えられる。そこで、まず、そもそもASOが無い条件では培地中に粒子形成などの変化が起きていないのか検証を行うこととした。

ASOの非存在下で、10% FBS (fetal bovine serum) 含有 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地に各種濃度のCaCl<sub>2</sub>を添加し、ゼータサイザーナノ ZS (マルバーン社) による動的光散乱法 (dynamic light scattering, DLS) を利用して、平均粒子径 (Z-Average) と多分散指数 (polydispersity index, PDI) を解析した結果を Fig.2-4 に示す。棒グラフが平均粒子径、折れ線グラフが多分散指数を示しており、多分散指数が小さいほど安定な単分散の粒子が形成していると予想される。この結果から、驚いたことに、ASOが存在しなくとも、培地にCaCl<sub>2</sub>を添加するだけで100 nm程度の粒子が形成され、かつ、9 mM以上の濃度ではほぼ安定な単分散の粒子が形成されていることが分かった。一方、MgCl<sub>2</sub>を添加してもそのような粒子の存在は全く確認されなかったことから、このような粒子の形成はCa<sup>2+</sup>に特異的な現象であると考えられる。



そこで、次に、このような粒子がどのような培地条件下で形成するのかについて、より詳細な解析を行った。Table 2-1 は CaCl<sub>2</sub> や FBS、ASO について、それぞれ添加、未添加の状態での平均粒子径と多分散指数を解析した結果である。CaCl<sub>2</sub> や FBS を添加していない条件では、明確な粒子形成は認められなかったが、血清を含む培地では 14 nm 程度の粒子が安定して認められたことから、これらは血清成分に由来すると考えられた。一方、血清非存在下で CaCl<sub>2</sub> を添加した場合には、2000 nm 近い巨大な凝集物が見られたことから、これらはリン酸カルシウムの塩が析出したと考えられた。これらに対し、血清の存在下で CaCl<sub>2</sub> を添加した場合にのみ、単分散の 100 nm 程度の粒子が認められた。また、興味深いことに、ASO 添加の有無にかかわらず、その平均粒子径に全く変化が見られなかったことから、CEM 法が効果を示す際に生成する 100 nm 程度の単分散の粒子は ASO とは独立して存在していることが示唆された。

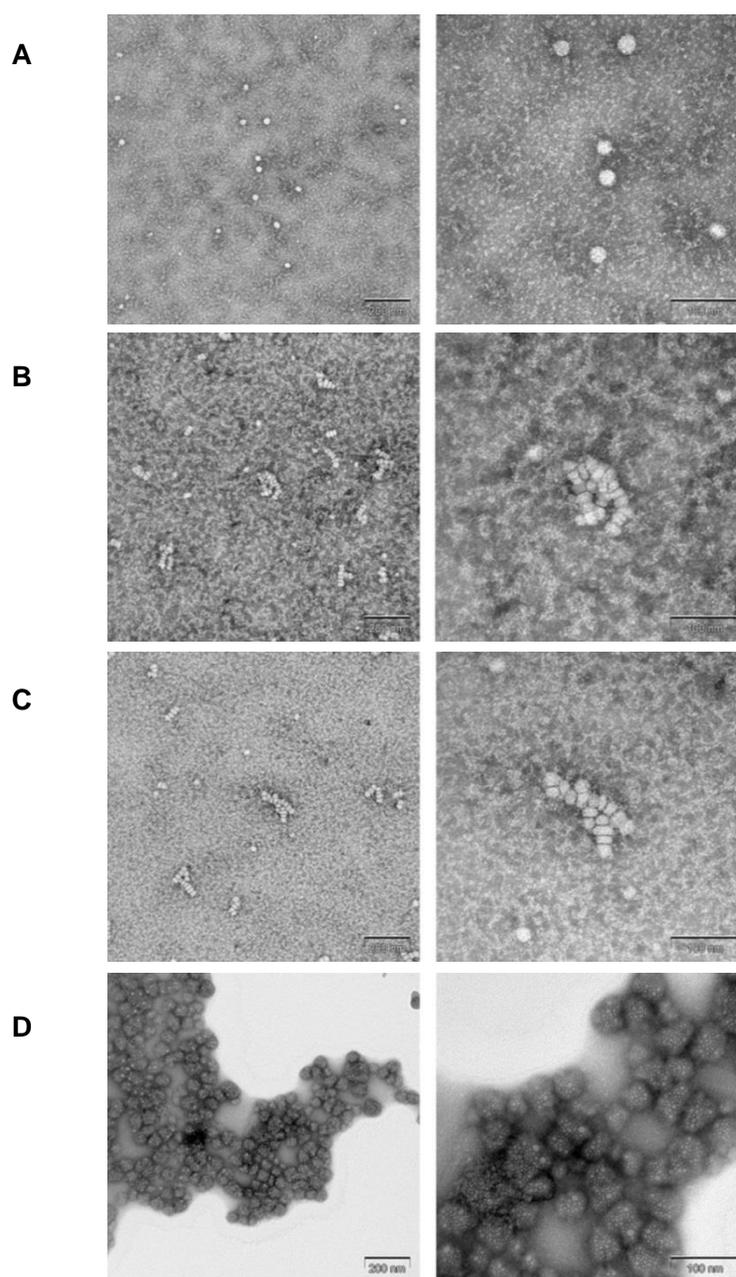
**Table 2-1 DLS analysis of culture medium supplemented with CaCl<sub>2</sub>, FBS or ASO.**

CaCl <sub>2</sub> (9 mM)	FBS (10%)	ASO (1 μM)	Z-Average (d.nm) mean ± SD (n=3)	Pdl mean ± SD (n=3)
-	-	-	26.0 ± 4.0	0.83 ± 0.17
-	-	+	43.9 ± 9.2	1.00 ± 0.00
-	+	-	14.4 ± 0.1	0.35 ± 0.01
-	+	+	14.4 ± 0.1	0.34 ± 0.00
+	-	-	1923.7 ± 163.5	0.06 ± 0.06
+	-	+	1848.3 ± 443.4	0.41 ± 0.23
+	+	-	107.3 ± 1.1	0.14 ± 0.01
+	+	+	106.8 ± 0.6	0.13 ± 0.00

そこで次に、これらの粒子を可視化するため、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) による解析を行った (Fig. 2-5)。まず、FBS と ASO を含む条件では、DLS での解析結果と同様、血清成分に由来すると思われる 15 nm 程度の粒子が観察された。また、血清の非存在下では、高い表面張力により、正確な解析はできなかったが、DLS の結果と同様、CaCl<sub>2</sub> の添加により巨大な凝集体が観察された。一方、CEM 法の条件下 (10% FBS + 9 mM CaCl<sub>2</sub>) ではやはり、ASO の有無に関わらず、100 nm 程度の粒子が確認された。ただし、興味深いことに、この TEM での解析結果から、100 nm の粒子は単一の大きな粒子ではなく、血清成分に由来する 15 nm 程度の粒子が集合したものであることが明らかになった。

これまでの KD 活性の解析結果と粒子形成のデータを合わせて考察すると、単分散の粒子形成が起きる 9 mM 以上の CaCl<sub>2</sub> 添加で KD 活性が安定的に確認できることから、CEM 法が効果を示すには、CaCl<sub>2</sub> 添加によって血清成分の粒子が集合し、100 nm 程度の粒子の集合体が形成されることが鍵になっていると示唆される。また、血清中には多くのタンパク質が存在するが、その約 50~65% は血清アルブミンが占めており、そのサイズは 4×4×14 nm の葉巻

型であることを考慮すると<sup>59)</sup>、血清アルブミンが凝集した粒子が形成している可能性が考えられる。CEM法が効果を示すには、培地中でこのような粒子の集合体が形成されることが重要であり、このような集合体が存在することで、エンドサイトーシスなどのASOの細胞内取り込みが促進されているのかもしれない。一方で、生体の血液中のカルシウム濃度は2.5 mM程度に維持されているが、血清は100%の条件となるため、そのような条件下においても類似の粒子の集合体が存在しているのか、また、*in vivo*においてもオリゴ核酸の細胞内取り込みに血清アルブミンやカルシウムが関与しているのか、興味深いところである。



**Fig.2-5 Analysis of culture medium supplemented with  $\text{CaCl}_2$  by negative stain transmission electron microscopy.** (A) 10% FBS/DMEM + ASO (B) the CEM condition (10% FBS/DMEM + 9 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (C) the CEM condition + ASO (D) DMEM without FBS + 9 mM  $\text{CaCl}_2$  + ASO. Bars in left pictures represent 200 nm and the bars in right pictures represent 100 nm.

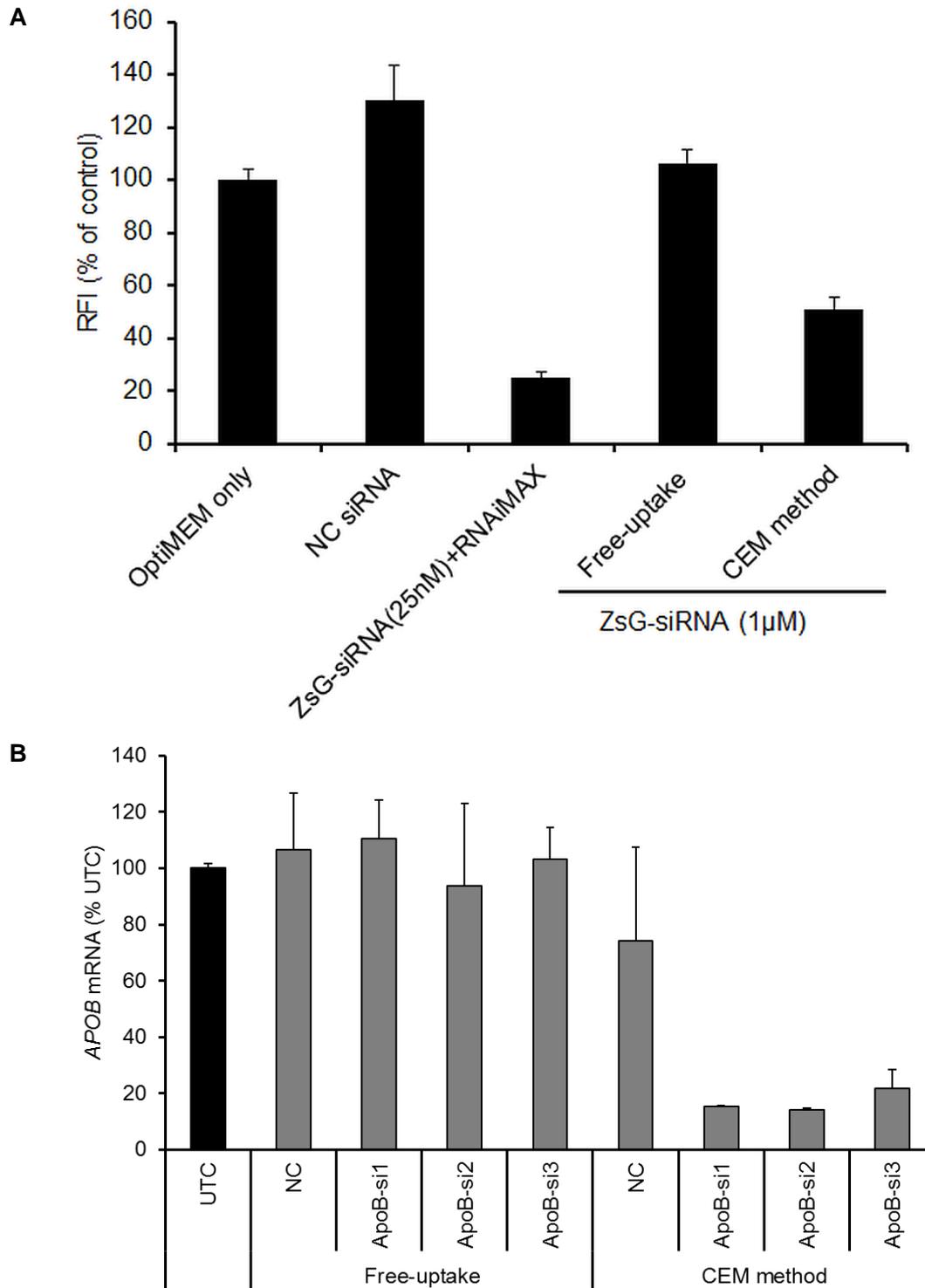
#### 第四節 核酸の骨格構造や電荷の影響

これまでの解析結果から、CEM法の条件下で生成する粒子の集合体はASOとは独立して存在し、細胞へ作用していることが示唆された。また、培地へのCaCl<sub>2</sub>の添加は、正電荷を有するタンパク質とプラスミドの複合体による遺伝子発現<sup>46,47)</sup>やカチオンニックペプチドを結合させたPNAの効果が促進されるという報告<sup>48)</sup>もなされていることから、CEM法は核酸の骨格構造や電荷に依存せず、ASO以外のオリゴ核酸にも効果を示すのではないかと考えられる。そこで、CEM法は2',4'-BNA/LNA修飾ASO以外のどのような核酸に効果を示すのか、その他の核酸に対する汎用性を検証すると共に、骨格構造や電荷の異なる核酸を利用することで、CEM法の作用メカニズムを類推する上で更なる知見を得ることを目的として、各種検討を行った。

siRNAは2重鎖で構成され、主に細胞質において配列特異的に標的mRNAの発現を抑制できることから、ASOと同様に広く利用されているオリゴ核酸の1種であるが、通常、siRNAは主に天然のRNAで構成され、一部に修飾を施しても安定性が課題となり、培地に添加しただけではfree-uptake法による効果は確認できない。そのため、siRNAを細胞内へ導入し、その効果を検証するには、Lipofectamine® 2000やRNAiMAXなどの市販の導入試薬が一般的に利用されている。ただし、siRNAの活性を効率良く評価するには、通常、使用する試薬や導入条件を細胞株によって最適化する必要がある。CEM法がASOだけでなく、siRNAにも広く適用可能か検証するため、ASOの代わりにTable 2-2に示すZsGreen1やAPOBに対するsiRNAを用いて、そのKD活性に対する影響を解析した。Fig.2-6Aは、ZsG-N1-2R/HLE細胞を用いて、ZsG-siRNAのKD活性に対するCEM法の効果を、また、Fig.2-6Bは、Huh-7細胞を用いて、各種ApoB-siRNAのKD活性に対するCEM法の効果を検証した結果である。siRNA添加24時間後の時点において、CaCl<sub>2</sub>を添加しないfree-uptake法の条件では、1 μMのsiRNAを添加してもいずれも全くKD活性は認められなかったが、驚いたことに、CEM法の条件下では両細胞株においてsiRNAによるKD活性が認められた。これらの結果から、CEM法は2',4'-BNA/LNA修飾ASOだけでなく、安定性が低いオリゴ核酸であるsiRNAに対しても広く有効な手法であることが明らかとなった。

Table 2-2 Sequences of siRNAs used in this section.

siRNA Name	Sequence
ZsG-siRNA	5' -GAGAACUGCAUGUACCACGAGUCCA-3' 3' -CUCUUGACGUACAUGGUGCUCAGGU-5'
ApoB-si1	5' -CCUGAAGUUUGUAACUCAAGCAGAA-3' 3' -GGACUUCAAACAUGAGUUCGUCUU-5'
ApoB-si2	5' -GGACCACAGAUGCUGCUUCAGUU-3' 3' -CCCUGGUGUCUACAGACGAAGUCA-5'
ApoB-si3	5' -CCAAUACAAGUUGAAGGAGACUAUU-3' 3' -GGUUAUGUUCAACUCCUCUGAUAA-5'

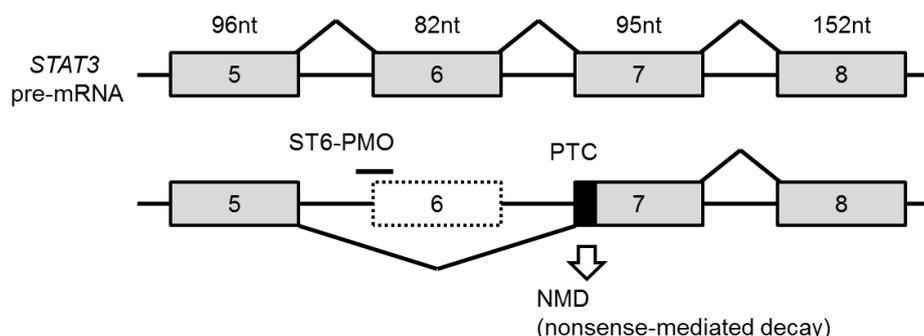


**Fig.2-6 CEM effect on the knockdown activity of siRNA.** (A) ZsG-N1-2R/HLE cells were seeded in 96-well black plates in 10% FBS/DMEM. After 24 h, ZsG-siRNA was added at 1 µM in the presence or absence of 9 mM CaCl<sub>2</sub> in the medium. After 4 days, the fluorescence of ZsGreen1 and DsRed were measured. RNAiMAX (Invitrogen) was used as the positive control for siRNA transfection. (B) Huh-7 cells were treated with 1 µM ApoB-siRNAs with or without 9 mM CaCl<sub>2</sub> for 24 h. *APOB* mRNA levels were analyzed using qRT-PCR. The relative quantification of *APOB* mRNA was normalized against expression of the *GAPDH* gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

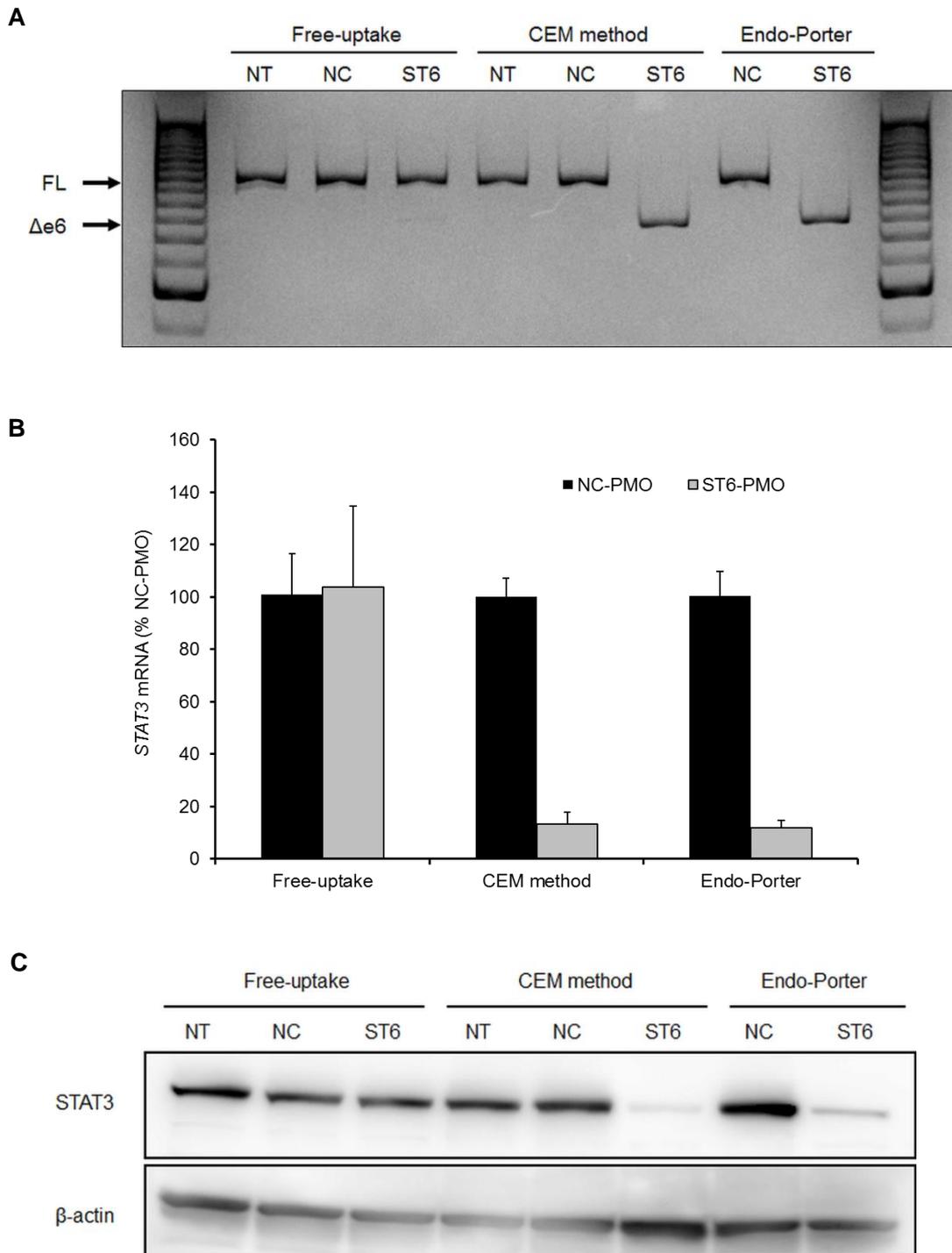
一方、CaCl<sub>2</sub>の培地への添加によって、電離したCa<sup>2+</sup>と核酸のリン酸結合部の負電荷による静電的な相互作用によって、もしくは、血清タンパクと非特異的に結合することでASOが粒子となって取り込まれているのであれば、電荷を持たず、タンパクとの相互作用もほぼ見られないことが知られている<sup>3,60-62</sup>。モルフォリノオリゴ核酸 (phosphodiamidate morpholino oligo, PMO) ではCEM法による効果は認められないことが予想される。そこで、Table 2-3に示す配列を利用してPMOに対するCEM法の効果の有無を検証することとした。Fig.2-7に示すようにST6-PMOは、*STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3) のpre-mRNAに作用し、Exon 6をスキッピングさせることで、フレームシフトを誘発し、Exon 7内にPTC (premature termination codon) を出現させる。その結果、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) によるmRNA分解を促進することで、結果的に*STAT3*の発現量を低下させることができる<sup>63</sup>。Fig.2-8Aは、Huh-7細胞を用いてST6-PMOによるExon 6のスキッピングの有無をRT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) で解析した結果である。CaCl<sub>2</sub>を添加しないfree-uptake法の条件では、Exon 6のスキッピングはほぼ認められなかったのに対し、CEM法の条件下では、陽性コントロールとして利用したEndo-Porter (Gene Tools 社)と同様に、ほぼ100%の効率でExon 6のスキッピングが確認された。また、Fig.2-8Bはその際の*STAT3* mRNA発現量を、Fig.2-8Cは*STAT3*タンパク発現量を解析した結果である。いずれにおいても陽性コントロールのEndo-Porterに匹敵する高いKD活性が認められた。これらの結果から、CEM法は、中性電荷のPMOに対しても有効な手法であることが明らかとなった。また、それと同時に、CEM法によるオリゴ核酸の活性促進は、やはり、CaCl<sub>2</sub>の培地への添加によって電離したCa<sup>2+</sup>と核酸のリン酸結合部の負電荷による静電的な相互作用や血清タンパクと非特異的に結合したASOが粒子となって取り込まれているのではなく、粒子の集合体はオリゴ核酸と独立して存在し、オリゴ核酸の細胞内取り込み経路を促進していることが示唆された。

**Table 2-3 Sequences of PMOs used in this section.**

PMO Name	Sequence
ST6-PMO	5' -CATTTTCTGTTCTAGATCCTGTT-3'
NC-PMO	5' -GGATGTCTTGCTGGACGTCGTTA-3'



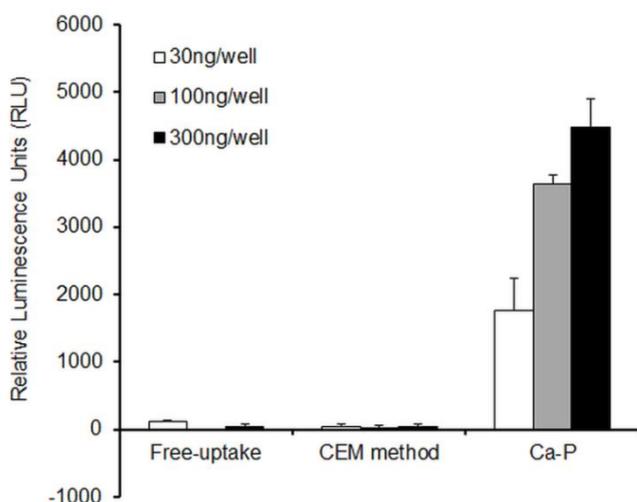
**Fig.2-7 Knockdown of *STAT3* by exon skipping and nonsense-mediated decay.** ST6-PMO targeting the boundary region of intron 5 and exon 6 in the human *STAT3* pre-mRNA provides exon 6 skipping, and induces RNA degradation by nonsense-mediated mRNA decay. PTC: premature termination codon.



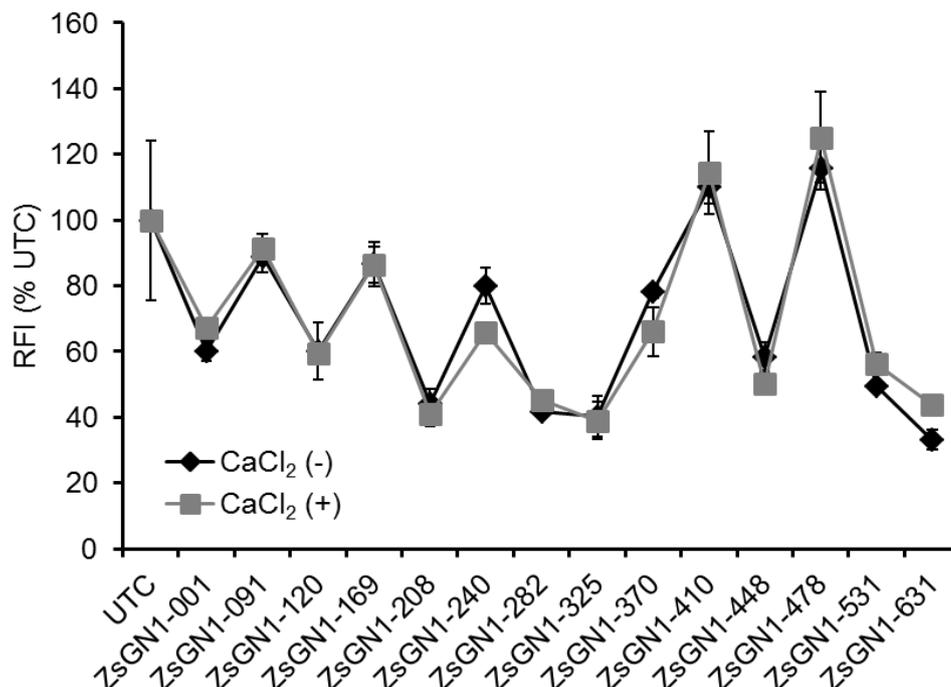
**Fig.2-8 CEM effect on the activity of PMO** (A) RT-PCR analysis for *STAT3* pre-mRNA splicing. Huh-7 cells were treated with ST6-PMO with or without 9 mM  $\text{CaCl}_2$ . After 48 h, *STAT3* pre-mRNA splicing was visualized by polyacrylamide gel separation of RT-PCR products. FL: full-length,  $\Delta e6$ : exon 6 skipping, NT: non-treatment, NC: negative control. (B and C) qRT-PCR and western blot analysis of *STAT3* expression. Huh-7 cells were treated with ST6-PMO with or without 9 mM  $\text{CaCl}_2$ . After 48 h, *STAT3* mRNA was analyzed using qRT-PCR (B) and *STAT3* protein was analyzed by western blot (C). For qRT-PCR, the relative quantification of *STAT3* mRNA was normalized against expression of the *GAPDH* gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $\beta$ -actin was the loading control for western blot. Endo-Porter was used as the positive control for PMO transfection.

一方、前述したように、正電荷を有するタンパク質とプラスミドの複合体やカチオンニックペプチドを付加したPNAの細胞内取り込み、もしくは細胞内輸送は、CaCl<sub>2</sub>を培地に添加することで促進されるという報告もなされていることから、単なる発現プラスミドのみを培地に添加した際の遺伝子発現やリポソームと複合体を形成したASOの活性に対してもCEM法は効果を示すのか検証を行った。Huh-7細胞を播種した翌日、9 mM CaCl<sub>2</sub>の添加、もしくは未添加の状態で、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミドであるpGL4.50 (Promega社)を培地へ添加し、48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した結果をFig.2-9に示す。9 mM CaCl<sub>2</sub>添加の有無にかかわらず、培地へプラスミドDNAを添加しただけでは、その遺伝子発現は全く確認できなかった。一方、比較対象として実施したリン酸カルシウム法では、添加したプラスミドDNA量に依存したルシフェラーゼ活性の増加が認められた。このことから、やはりCEM法は従来のリン酸カルシウム法とは異なるメカニズムを有することが示唆された。一方、遺伝子導入試薬であるRNAiMAXを用いてZsGreen1に対する各種ASOをリポプレックス法で導入した際のKD活性に対し、CEM法の効果を検証した結果をFig.2-10に示す。いずれのASOもCaCl<sub>2</sub>添加の有無でKD活性に変化は見られなかったことから、リポプレックスを形成したASOの細胞内取り込みや活性にはCEM法は効果を示さないことが分かった。

これらの検討結果から、CEM法は骨格構造や電荷に依存せず、様々なオリゴ核酸に広く利用できる手法であるが、プラスミドDNAやリポプレックスを形成したASOの細胞内取り込みには効果を示さないことが分かった。また、負電荷の2',4'-BNA/LNA修飾ASOやsiRNAだけでなく、中性電荷のPMOにも効果を示したことから、CEM法による活性促進のメカニズムは、Ca<sup>2+</sup>と核酸のリン酸結合部の負電荷が直接相互作用し、粒子を形成するというよりも、CaCl<sub>2</sub>添加によって形成される粒子の集合体がオリゴ核酸とは独立して細胞内取り込みや細胞内輸送などを促進していることが示唆された。



**Fig.2-9 CEM effect on the transfection of plasmid DNA.** Twenty-four hours after seeding of Huh-7 cells, firefly luciferase expression plasmid, pGL4.50 was added with or without 9 mM CaCl<sub>2</sub> in the medium. CalPhos Mammalian Transfection kit was used as a positive control for plasmid transfection by the calcium phosphate method (Ca-P). At 48 h after transfection, firefly luciferase activity was measured using ONE-Glo Luciferase Assay system and is presented as relative luminescence units (RLU). Each value is presented as the mean ± SD of three independent experiments.

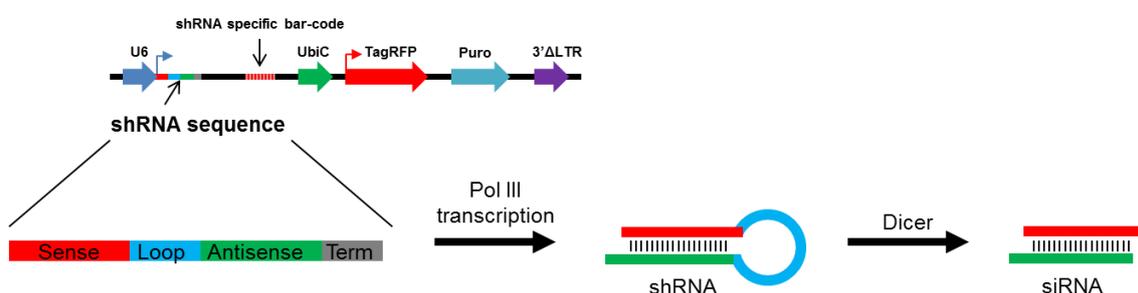


**Fig.2-10 CEM effect on the transfection efficiency of cationic lipid/ASO complexes.** ZsG-N1-2R/HLE cells were transfected with ZsGreen1-ASOs using the cationic lipid transfection reagent Lipofectamine RNAiMAX with or without addition of calcium chloride. After 48 h, the fluorescence of ZsGreen1 and DsRed were measured and knockdown efficiency of each ASO was calculated by dividing the fluorescence of ZsGreen1 by that of DsRed. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## 第五節 CEM法とshRNAライブラリーを利用した分子スクリーニング

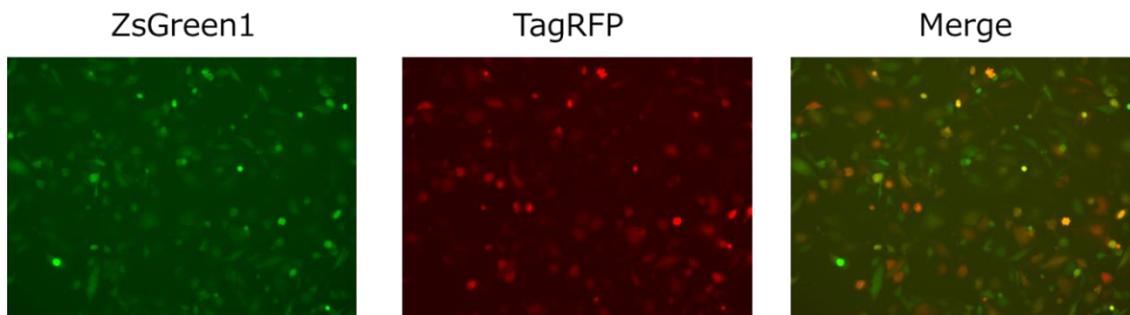
2',4'-BNA/LNA修飾のような核酸修飾技術の開発に伴い、ASOは特別なDDSキャリアーがなくとも*in vivo*において高いKD効果を示すようになったが、実際にどのようにして細胞内に取り込まれ、作用部位まで輸送されているのか、その基本的な作用機序は未だ理解が遅れているのが現状である。ただし、2',4'-BNA/LNA修飾ASOは*in vitro*においても導入試薬無しで細胞内へ取り込まれ、かつ、その活性は、*in vivo*での効果を反映できることから、free-uptake法による細胞内取り込みは、*in vivo*と同様の取り込み経路が関与していることが予想される。しかしながら、free-uptake法では、十分な活性を示すのに数 $\mu$ M以上の高いASO濃度で長期間曝露する必要があり、細胞株によって有効性も大きく異なることから、機能解析を行う上で実用面の課題が残されていた。一方、これまでの検討結果から、CEM法はその作用機序として、free-uptake法と同様の取り込み経路を促進している可能性が示唆された。そこで、CEM法を利用することで、ASOの細胞内取り込みや細胞内輸送、活性発現などに関わる分子を効率的に探索できるのではないかと考え、CEM法とshRNA (small/short hairpin RNA) による遺伝子発現抑制ライブラリーを利用した関連分子のスクリーニングを

実施することとした。shRNAライブラリーにはCell Surface, Extracellular, DNA Bindingというキーワードに関連する4922遺伝子を標的とした計27500配列のshRNAで構成されるCollecta社のDecipher Library (Human Module 3) を使用した。Decipher Libraryは、プール型のshRNAライブラリーであり、レンチウイルスベクターに搭載されていることから、組換えレンチウイルスシステムを利用することで、プール型ライブラリーを効率良く導入可能なこと、また、宿主ゲノムへ組み込まれるので長期安定発現が期待できること、さらに、各shRNAに特異的なバーコード配列を次世代シーケンサーで検出することにより、目的の表現型に関与するshRNAをハイスループットかつ効率的に同定できるというメリットが挙げられる<sup>64)</sup> (Fig.2-11)。

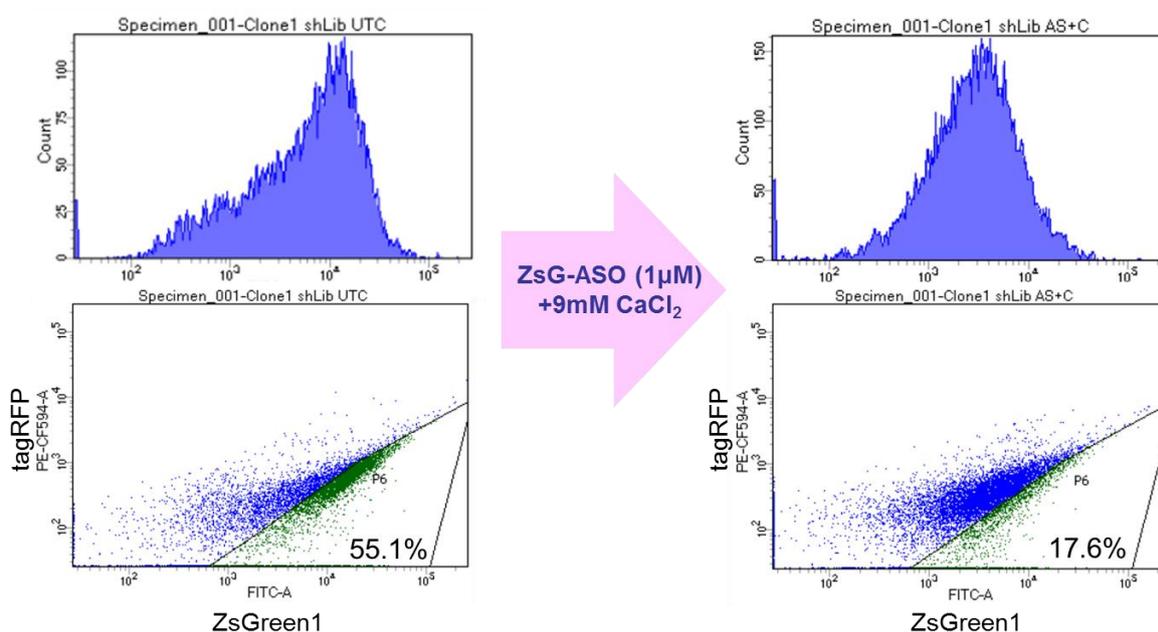


**Fig.2-11 Decipher shRNA library.** Decipher shRNA expression vector is based on lentiviral system. The lentiviral vector expresses shRNA from a constitutive U6 promoter and contains shRNA specific bar-code, puromycin antibiotic selection and a red fluorescent protein marker.

一方、shRNAを導入する細胞としては、第一章 第一節で構築したZsGreen1安定発現細胞であるZsG-N1-2/HLE細胞を選択した。ただし、ASOのKD効率や蛍光強度のばらつきをより抑えるため、まず、構築したZsG-N1-2/HLE細胞の集団からシングルクローンを単離し、ZsGreen1の蛍光強度とZsGreen1-ASOのKD効果を保持するクローンZsG-N1-2/HLE-s1細胞を選抜した。その後、ZsG-N1-2/HLE-s1細胞にMOI (multiplicity of infection) が1以下となるようにshRNAライブラリー発現レンチウイルスを感染させ、ピューロマイシン存在下で3日間培養し、ZsGreen1とshRNAを共発現する安定発現細胞集団を作製した。なお、shRNA発現ベクターにはウイルス感染細胞のマーカとして、赤色蛍光タンパクであるTagRFP (red fluorescent protein) の発現ユニットが搭載されており、ZsGreen1由来の緑色とTagREP由来の赤色の蛍光が共に確認できたことから、shRNAを共発現するZsG-N1-2/HLE-s1細胞の集団が樹立できたと判断した (Fig.2-12)。その後、これらの細胞集団をFACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて解析し、ASO未添加で約50%の細胞が含まれる領域にゲートを設定した。これらの集団は、CEM法を用いてZsGN1-120-BNA(15)を導入することで、全体的にZsGreen1の蛍光が低下し、左へシフトしたが、ASO存在下でもゲート内に残る細胞集団 (約18%) をソーティングにより分取した (Fig.2-13)。



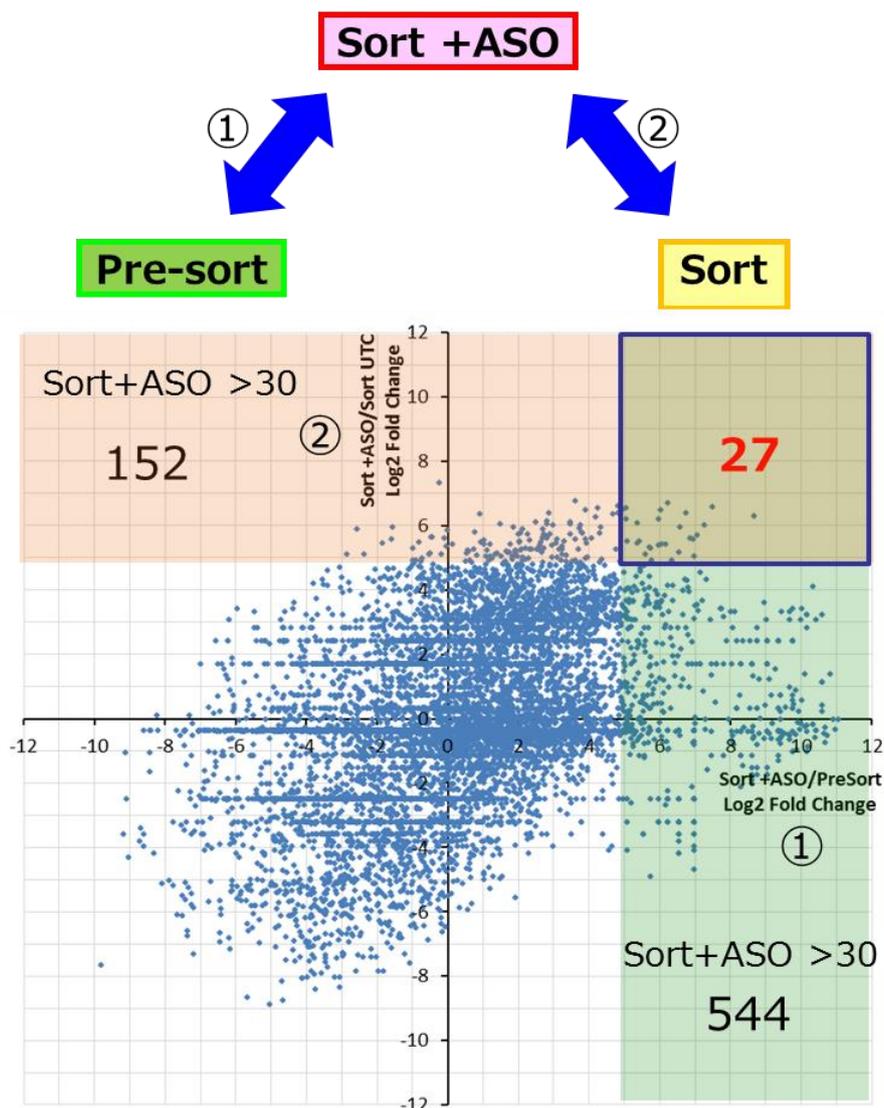
**Fig.2-12 Establishment of human hepatoma HLE cells stably expressing ZsGreen1 and shRNA library.** TagRFP was used as a marker of lentiviral infection to establish ZsG-N1-2/HLE-s1 cells stably expressing shRNA library.



**Fig.2-13 FACS sorting of ZsG-N1-2/HLE-s1 cells stably expressing shRNA library.** ZsG-N1-2/HLE-s1 cells stably expressing shRNA were sorted on the FACS by using ZsGreen positive gate in the presence or absence of ZsGreen1-ASO and 9 mM CaCl<sub>2</sub>.

その後、分取した細胞を拡大培養し、再度、同様の操作を繰り返した後、濃縮した細胞のペレットを「① Sort +ASO」群として凍結保存した。ただし、本操作で濃縮される細胞は、偶発的にASOの導入効率が低かった細胞やshRNAの発現で非特異的に蛍光が増加した細胞なども多く含まれると予想されたため、ASOを添加せずに培養した細胞集団についても同様のソーティング操作を2度繰り返し、拡大培養した細胞のペレットを「② Sort」群として凍結保存した。さらに、これら2種類のサンプルに加えて、FACSソーティング前の濃縮されていない細胞集団のペレットを「③ Pre-sort」とし、これら計3サンプルについて、凍結細胞のペレットからゲノムDNAを抽出後、次世代シーケンサーにて濃縮された細胞集団が保持するshRNAの配列解析を行った (Fig.2-14)。各サンプルで同定されたshRNAの中から、

サンプル②や③に対し、サンプル①で30倍以上濃縮されたshRNAを抽出したところ、それぞれ544、152配列が見つかり、いずれの比較においても30倍以上濃縮されたshRNAを抽出した結果、計27配列が同定された。これらのshRNAが標的とする遺伝子のリストをTable 2-4に示す。これらの遺伝子の中には、発現が低下したことでASOのKD効果を減弱させた分子、すなわち、裏を返せば、ASOの細胞内取り込みや輸送、活性発現に重要な分子が含まれていると予想される。



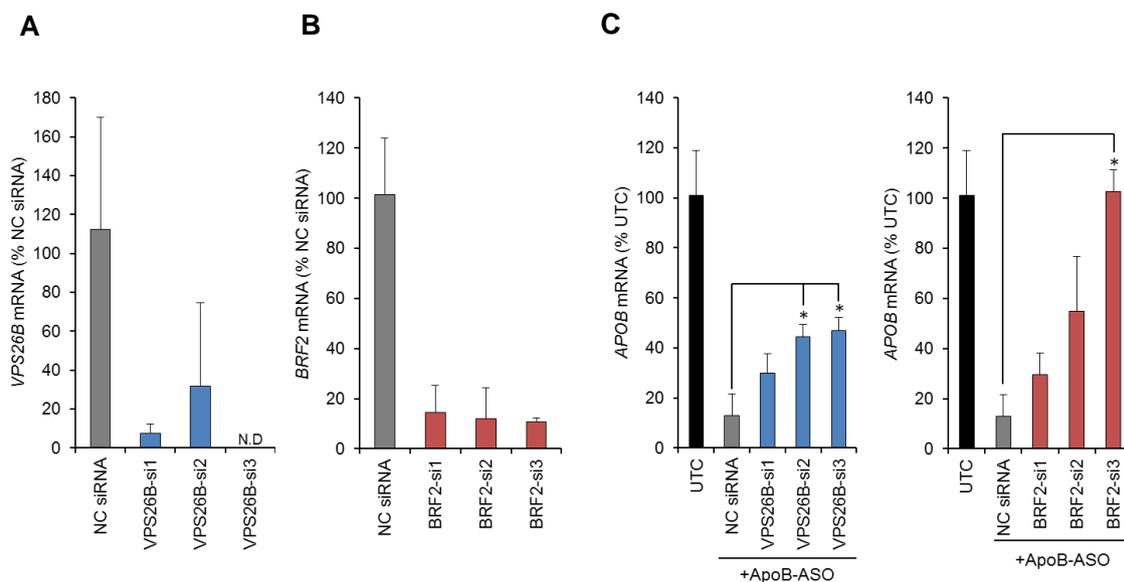
**Fig.2-14 Selection of shRNA concentrated in the sorted cells.** The sequence of shRNA was analyzed by next-generation sequencing. The shRNA lists were compared between the sorted cells in CEM condition and pre-sorted cells, or between the sorted cells in CEM condition and sorted cells without ZsGreen1-ASO. The fold change of concentrated shRNA was plotted in the two-dimensional space. 27 sequences were identified as a shRNA that were concentrated more than 30 times in the CEM condition.

Table 2-4 Gene lists generated by fold change ranking between sorting sample with and without ASO.

Refseq	Symbol	Fold Change	
		Sort +ASO/Pre-sort	Sort +ASO/Sort
NM_005866.2	<i>SIGMAR1</i>	75	104
NM_032808.5	<i>LINGO1</i>	182	96
NM_001168322.1	<i>CD300LG</i>	33	93
NM_015378.2	<i>VPS13D</i>	32	92
NM_052875.3	<i>VPS26B</i>	66	89
NM_020147.2	<i>THAP10</i>	107	83
NM_001318.2	<i>CSHL1</i>	405	79
NM_001007249.1	<i>OR8G2</i>	33	73
NM_017495.4	<i>RBM38</i>	63	73
NM_020848.2	<i>KIAA1462</i>	42	67
NM_018310.2	<i>BRF2</i>	154	65
NM_001161580.1	<i>POC1A</i>	96	62
NM_001134422.1	<i>CDV3</i>	135	52
NM_032301.2	<i>FBXW9</i>	116	48
NM_022779.7	<i>DDX31</i>	125	47
NM_020894.2	<i>KIAA1530</i>	34	45
NM_024837.2	<i>ATP8B4</i>	43	45
NM_025232.2	<i>REEP4</i>	42	44
NM_017742.4	<i>ZCCHC2</i>	67	43
NM_001081550.1	<i>THOC2</i>	72	43
NM_020319.1	<i>ANKMY2</i>	63	42
NM_001009991.2	<i>SYTL3</i>	52	40
NM_001143824.1	<i>SLC38A4</i>	53	39
NM_001012728.1	<i>DPRX</i>	94	36
NM_020827.1	<i>KIAA1430</i>	49	34
NM_001170790.1	<i>MFSD5</i>	126	33
NM_018967.2	<i>SNTG1</i>	82	30

さらに、これらの候補遺伝子の中から、細胞株やASOの種類が変わっても普遍的にASOの細胞内取り込みや活性発現に関わっている分子を同定するため、Huh-7細胞とApoB-ASO

を用いた2次スクリーニングを実施した。具体的には、27の候補遺伝子に対して、3配列ずつのsiRNAを設計し、それぞれをHuh-7細胞に導入後、CEM法を利用してApoB-ASOを導入した。その後、siRNA導入による各標的遺伝子自身の発現量を確認すると共に、ApoB-ASOによるKD率を解析することで、ASOのKDを減弱させる遺伝子を選定した。その結果、少なくとも2つ以上のsiRNAによって、標的遺伝子の発現低下が確認され、かつ、ApoB-ASOによるKDを減弱させた遺伝子としてVPS26B (*vacuolar protein sorting 26 homolog B (S. pombe)*) とBRF2 (*BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor, BRF1-like*) の2つを同定した (Fig.2-15)。VPS26Bは、細胞内の液胞輸送に関わるvacuolar protein sorting 遺伝子の一つであり<sup>65)</sup>、エンドソームからトランスゴルジ網への積荷タンパクの逆行膜輸送に重要な役割を果たすretromer (VPS29, VPS35, VPS26の複合体) の構成因子の一つである<sup>66)</sup>。Mingらは、逆行膜輸送に作用する低分子化合物Retro-1がSSO (splice switching oligonucleotide) やASO、siRNAの活性に影響を与えることを報告している<sup>67)</sup>。この事から、VPS26Bを発現抑制したことで逆行膜輸送の経路が影響を受け、ASOがリソソームで分解を受ける前の段階でエンドソームから遊離するステップに影響した可能性が考えられる。一方、BRF2はRNAポリメラーゼIIIの転写開始に関与する複合体のサブユニットである<sup>68)</sup>。ASOの活性発現との関連は不明であるが、近年報告されたPS修飾ASOに結合する細胞内タンパクの一つとして、RNAポリメラーゼIIIの転写終結因子であるLaが同定されており、その発現を抑制することで、ASO活性の低減も認められている<sup>30)</sup>。核内においてASOと標的RNAが結合し、RNase H1が作用する際にこれらの分子も相互作用している可能性も考えられ、ASOの活性発現との関連性が興味深いところである。



**Fig.2-15 Effects of target siRNA on the potency of ApoB-ASO in Huh-7 cells.** Huh-7 cells were transfected with VPS26B, BRF2 or NC siRNA. Following siRNA treatment, cells were transfected with ApoB-ASO for 24 h. The expression level of VPS26B (A), BRF2 (B) or APOB mRNA (C) was analyzed by qRT-PCR. These values were set to 100% in the NC siRNA (A and B) or untreated control (UTC) (C). The bar graph shows mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0.05$ , as determined by Tukey's test.

## 小括

本章では、まず、CEM法によるASOのKD活性向上の作用メカニズムを探るため、蛍光標識ASOを用いた細胞内局在解析やフローサイトメトリーを用いたASOの定量解析、および、細胞内取り込みや細胞内輸送のどのステップに影響を与えているのかについて解析を行った。これらの解析結果から、CEM法は主にASOのfree-uptake法による取り込みのステップを促進することで結果的にASOの活性を促進していることが示唆された。Free-uptake法の細胞内局在観察で見られたように、大抵の哺乳類細胞ではASOを簡単に取り込み、細胞内に蓄積するが、実際に機能を発揮できるのはそれらのほんの一部である。Gearyらは、肝細胞におけるASOの取り込みにはその大部分を占めるnon-productive経路と少数のproductivve経路の2つがあると提唱している<sup>69)</sup>。このモデルから推測するのであれば、CEM法はnon-productive経路を飽和させることで細胞内に蓄積したASOの利用能を促進したか、もしくは、productivve経路を特異的に促進した可能性が示唆される。

一方、DLSによる粒子径の解析やTEMによる観察の結果、CEM法が効果を示す培地中では、血清由来の15 nm程度の粒子で構成される100 nm程度の粒子の集合体が形成されていることを見出した。この構成粒子は、そのサイズとFBS中のタンパク含有量<sup>59)</sup>から推測すると、主にアルブミンであると予想される。また、カルシウムは血漿中の存在様式の一つとして、アルブミンなどのタンパクと結合していること<sup>42,43)</sup>、培地中に10% FBSと9 mM CaCl<sub>2</sub>が共存した場合のみ100 nm程度の粒子の集合体が確認されたことから、Ca<sup>2+</sup>がアルブミンと思われる粒子同士の結合を促進し、集合体を形成しているのかもしれない。今回、粒子の構成成分やCEM法の作用機序の詳細までは明らかにすることはできなかったが、この100 nm程度の粒子の集合体の存在がCEM法の鍵となり、ASOの細胞内取り込みを促進している可能性が考えられる。作用機序の仮説として、PS修飾したASOもアルブミンと結合すること<sup>70)</sup>を考えると、ASOが結合したアルブミンがCa<sup>2+</sup>で凝集し、粒子の集合体を形成することで、マクロピノサイトーシスなどの液相エンドサイトーシス経路が活性化され、結果的にASOの取り込み量が増加しているのかもしれない。一方で、ASOの有無に関わらず、粒子の集合体の平均粒子径にほぼ変化が見られなかったこと、中性電荷のPMOや安定性の低いsiRNAにも効果を示したことを考えると、電荷による静電作用や物理化学的な性質で直接相互作用しているのではなく、オリゴ核酸と独立して、粒子の集合体が細胞内取り込みを促進している可能性も考えられる。さらに、Ca<sup>2+</sup>は通常培地や生体内の血液中にも存在していることから、*in vivo*におけるASOの取り込み自体にも関与している可能性もあり、その関連性が興味深いところである。

また、これまでの検討結果から、CEM法はその作用機序として、free-uptake法と同様の取り込み経路に作用していることが示唆された。そこで、shRNAによる遺伝子発現抑制ライブラリーを利用し、ZsGreen1-ASOをCEM法で導入後、ASO存在下でも蛍光強度を保持する細胞を濃縮することで、ASOの取り込みや細胞内輸送に関わる分子を効率的に絞り込むこ

とができると考え、分子スクリーニングを行った。その結果、発現抑制によってASOの効果を減弱させたと思われる遺伝子群を効率良く選抜することができた。さらに、細胞株やASOの種類によらず、普遍的にASOの作用機序に関わっていると思われる2つの分子、VPS26BとBRF2を同定した。これらは、それぞれ液胞蛋白の逆行性膜輸送に関わる複合体、および、RNAポリメラーゼIIIによる転写開始に関わる複合体のコンポーネントとして知られる分子であるが、ASOの細胞内輸送や活性発現に直接関与が示された例はなく、その関連性が興味深いところである。

なお、近年、PS修飾を施したASOと結合する細胞内タンパクが複数同定されたが<sup>33,34</sup>、それらの中には、ASOの細胞内取り込みや輸送に関わる膜タンパクなどは含まれておらず、多くのタンパクは発現を抑制してもASOの活性に変化を与えないか、影響しても微弱な変化を示す程度である上、細胞懸濁液を利用した実験であったため、生細胞内ではASOと相互作用していない懸念もあるという考察もなされている<sup>34</sup>。一方、今回実施したshRNAによる分子スクリーニングは、shRNAによる遺伝子の発現抑制とASOのKD活性を指標にスクリーニングしたことで、生細胞内でASOの作用発現に関与する分子をより直接的に同定できるため、単に結合するだけの分子や懸濁液を用いた場合の偽陽性などを排除することができ、ASOの活性発現に大きく影響を与える分子が含まれていると期待される。

### 第三章 ASOの標的RNA分解メカニズムの解析

ASOが細胞内に取り込まれた後、ワトソンクリック型の相補的な塩基対を形成して、標的RNAにハイブリダイゼーションすると、そこにRNase H1がリクルートされ、エンドヌクレアーゼ活性によってRNA/DNA2重鎖のRNA鎖は加水分解により切断される<sup>71)</sup>。RNase H1による切断を受けた後、標的RNAの切断産物は細胞内で直ぐに消失することから、それらは細胞内のヌクレアーゼによって急速に分解処理を受けていると考えられているが、これまでにその分解メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。加えて、RNase H1は主に核やミトコンドリアに存在している<sup>35)</sup>ことから、pre-mRNAとmRNAの両方がASOの標的となり得るが、両者が同じ分解経路によって処理されているのかも明らかとされていない。

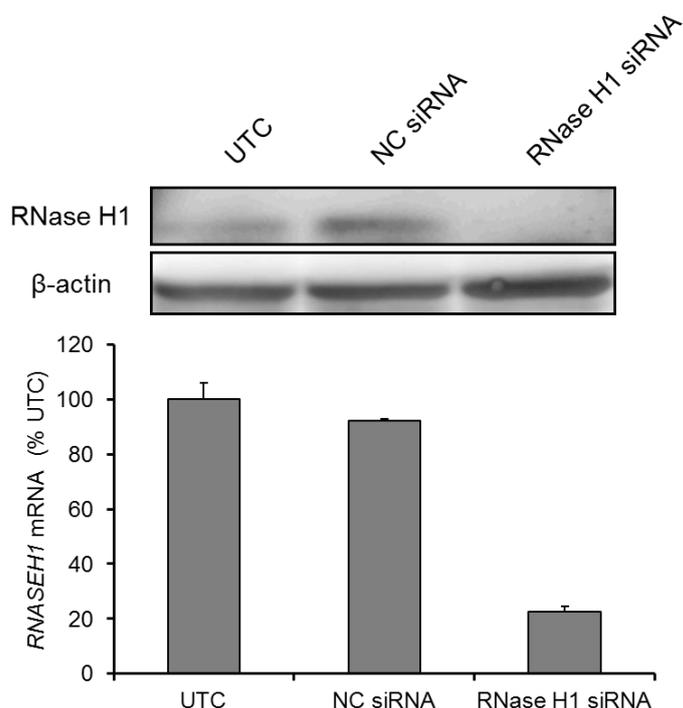
一方、真核生物には主な5'→3'エキソリボヌクレアーゼ (5'-3' exoribonuclease, XRN) としてXRN1, XRN2の2つが知られている。XRN1は主に細胞質に存在し、5'キャップが脱離したmRNAを分解することにより、mRNAの代謝回転や分解に重要な役割を果たしている。また、long non-coding RNA (lncRNA) やsmall nucleolar RNA (snoRNA)、異常なtransfer RNA (tRNA) などの転写物もXRN1による分解を受けることが報告されている<sup>72)</sup>。さらに、ショウジョウバエの細胞では、siRNAの標的となるmRNAは、RISC (RNA-induced silencing complex) の主要コンポーネントであるAGO2 (argonaute 2) による切断を受けた後、生成した標的mRNAの3'切断産物はXRN1によって分解されることも報告されている<sup>73)</sup>。一方、XRN2は、進化的に保存されたXRN1と関連のあるエキソリボヌクレアーゼであるが、主に核内に局在しており、mRNAの転写終結に重要な役割を果たしている。すなわち、RNAポリメラーゼIIがポリAシグナルを転写した後、転写物は切断され、5'切断産物はポリA付加による安定化を受けるが、ポリAシグナルを超えて転写された3'切断産物はXRN2により認識され、分解されることでRNAポリメラーゼIIがDNAの鋳型から解離する。また、XRN2はribosomal RNA (rRNA) やsnoRNA、pre-mRNAのようないくつかのクラスのRNAの成熟化や品質管理にも重要な役割を果たしている<sup>72,74)</sup>。

本章では、未だ明らかになっていなかったASOによる標的RNAの分解機構の詳細に迫るべく、哺乳類細胞の主要な2つのXRNであるXRN1とXRN2に注目し、それらの発現を抑制することで、ASOの標的RNAの3'切断産物量がどのように変化するか検証を行った。また、ASOと類似のモダリティであるsiRNAによる分解メカニズムと比較するため、哺乳類細胞におけるsiRNAの標的RNA分解に関与するXRNについても解析を進めた。

#### 第一節 ASOの標的RNA分解に対するRNase H1の寄与

ASOによる標的RNAの分解機構を解析する上で、標的遺伝子のKDが、本当にRNase H1による切断を介していることを確かめるため、まず、細胞内のRNase H1の発現量を低下させた場合に、ASOによるKD効率が影響を受けるのか検証を行った。RNASEH1に対する

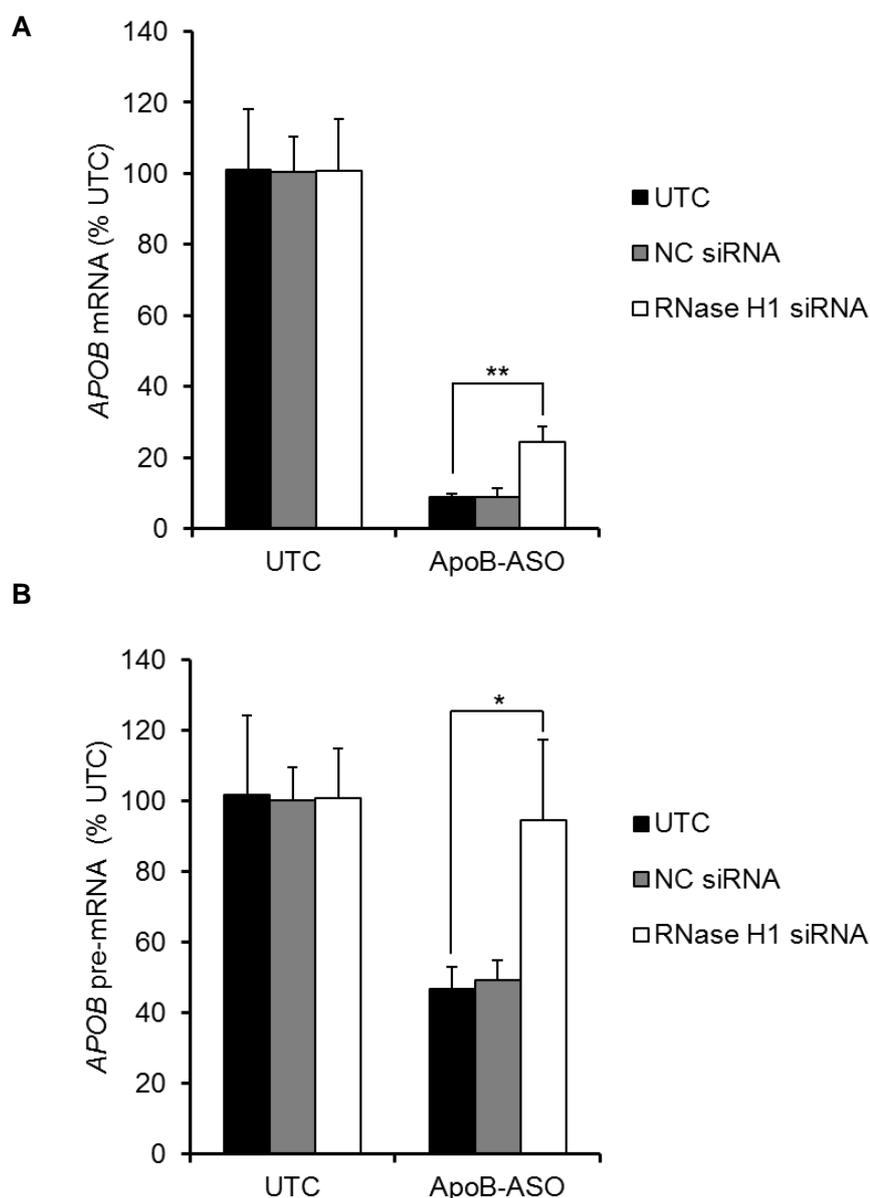
siRNA を Huh-7 細胞に導入し、48 時間後に *APOB* に対する 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO (ApoB-ASO) を導入した。ApoB-ASO としては、第一章、第二章で用いたのと同様に、8 塩基長の DNA ギャップ領域を含み、全てのリン酸結合部位がホスホロチオアート修飾された 13 mer の gapmer である ApoB-10177-BNA(13) (5'-GCattggtatTCA-3', N:2',4'-BNA/LNA, n:DNA) を利用した<sup>15)</sup>。ASO の導入 24 時間後、RNase H1 の発現量と共に、*APOB* mRNA や pre-mRNA に対する KD 率を解析した。まず、RNase H1 の発現量を解析した結果、siRNA の導入によって mRNA、タンパクレベルで共に 80%程度抑制されていることを確認した (Fig.3-1)。



**Fig.3-1 Knockdown effect of RNase H1 siRNA in Huh-7 cells.** Huh-7 cells were transfected with RNase H1 or NC siRNA and the expression level of cellular RNase H1 was assessed by western blot and qRT-PCR.  $\beta$ -actin was used as a loading control for western blot. The level of *RNASEH1* mRNA was quantitated and normalized to that of *GAPDH* mRNA. These values were set to 100% in the untreated control (UTC).

次に、ApoB-ASO による効果を検証するため、まず、*APOB* mRNA の発現量を解析した。その結果、RNase H1 の発現を抑制しない条件では、約 90%KD されていたのに対し、RNase H1 を発現抑制することで、その KD 率は約 75%と有意な低下が認められた (Fig.3-2A)。一方、RNase H1 は主に核内やミトコンドリアに存在すること<sup>35)</sup>、また、イントロンを標的とした gapmer でも標的遺伝子の発現を低下できること<sup>75)</sup>から、pre-mRNA も RNase H1 の標的となり、核内で切断されていると考えられる。そこで、上記の解析で用いたものと同じ細胞抽出液を用いて、*APOB* pre-mRNA の発現量を解析した。RNase H1 の発現を抑制しない条件では、*APOB* pre-mRNA は約 60%KD されていたのに対し、RNase H1 を発現抑制することで、KD 効果はほぼ完全に消失することが分かった (Fig.3-2B)。これらの結果から、ASO による標的 RNA の KD は確かに RNase H1 による切断を介していることが確認された。特に、pre-mRNA の KD は、ほぼ全て RNase H1 による切断後、分解処理を受けることで起き

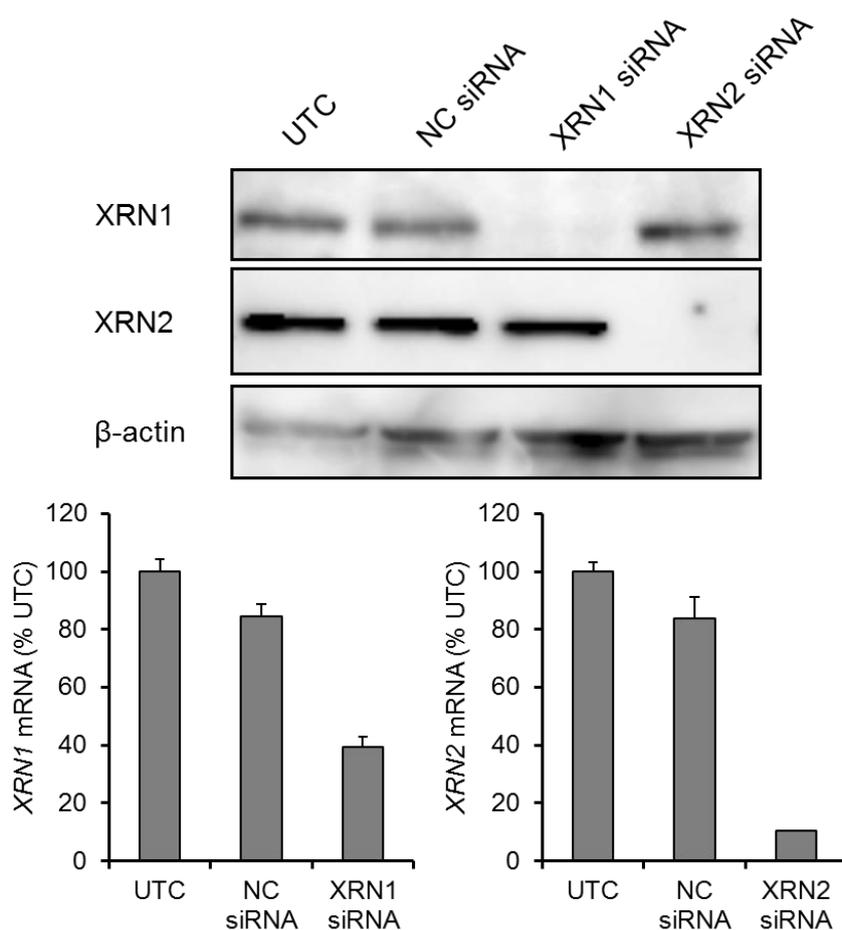
ていると考えられる。一方、*APOB* mRNA の KD が pre-mRNA と比べて高いのは、RNase H1 による直接の切断に加えて、上流の pre-mRNA が切断されたことにより、スプライシングされる成熟 mRNA の量自体が低下したことに起因すると考えられるが、RNase H1 の発現が 80% も低下し、pre-mRNA の KD 効果もほぼ完全に消失したにもかかわらず、*APOB* mRNA の KD は約 75% も保持されていたことを考えると、*APOB* mRNA は RNase H1 以外の経路によっても分解処理を受けている可能性が示唆される。



**Fig.3-2 Effects of RNase H1 siRNA on the potency of ApoB-ASO.** Huh-7 cells were transfected with RNase H1 or NC siRNA Following siRNA treatment, cells were transfected with ApoB-ASO for 24 h. The expression level of *APOB* mature mRNA (A) and pre-mRNA (B) was analyzed by qRT-PCR. These values were set to 100% in the untreated control (UTC). The bar graph shows mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  determined by Student's t-test compared to the siRNA untreated control.

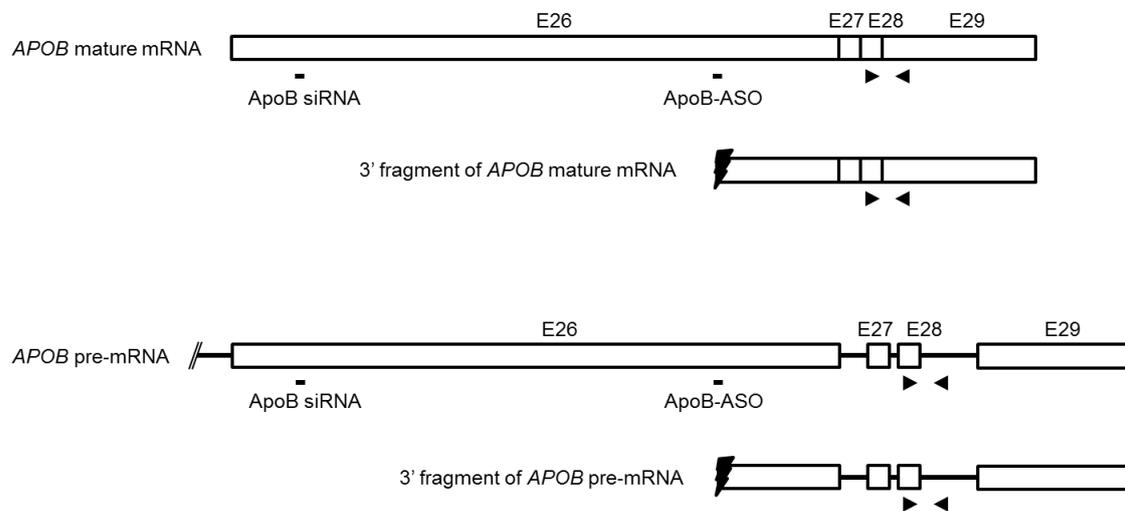
## 第二節 ASOの標的RNA分解に対するXRN1,2の寄与

前節において、ApoB-ASOによる標的RNAのKDにはRNase H1が介在していることが確認できたことから、標的RNAがRNase H1によって切断された後、5'や3'の切断産物が生成していることが予想される。RNase H1による切断に続いて起こる標的RNAの分解メカニズムはほとんど明らかにはなっていないが、哺乳類細胞におけるRNA分解処理に関わる主要な2つの5'→3'エキソリボヌクレアーゼとして、XRN1とXRN2が知られている。そこで、これらのヌクレアーゼがRNase H1切断によって生じるASOの標的RNAの3'切断産物の分解に寄与しているのかを検証するため、まず、siRNAを利用して、Huh-7細胞におけるこれらの5'→3'エキソヌクレアーゼの発現を抑制した。XRN1、もしくは、XRN2に対するsiRNAを導入することにより、それぞれのmRNAやタンパク質の発現が特異的に抑制されていることを確認した (Fig.3-3)。

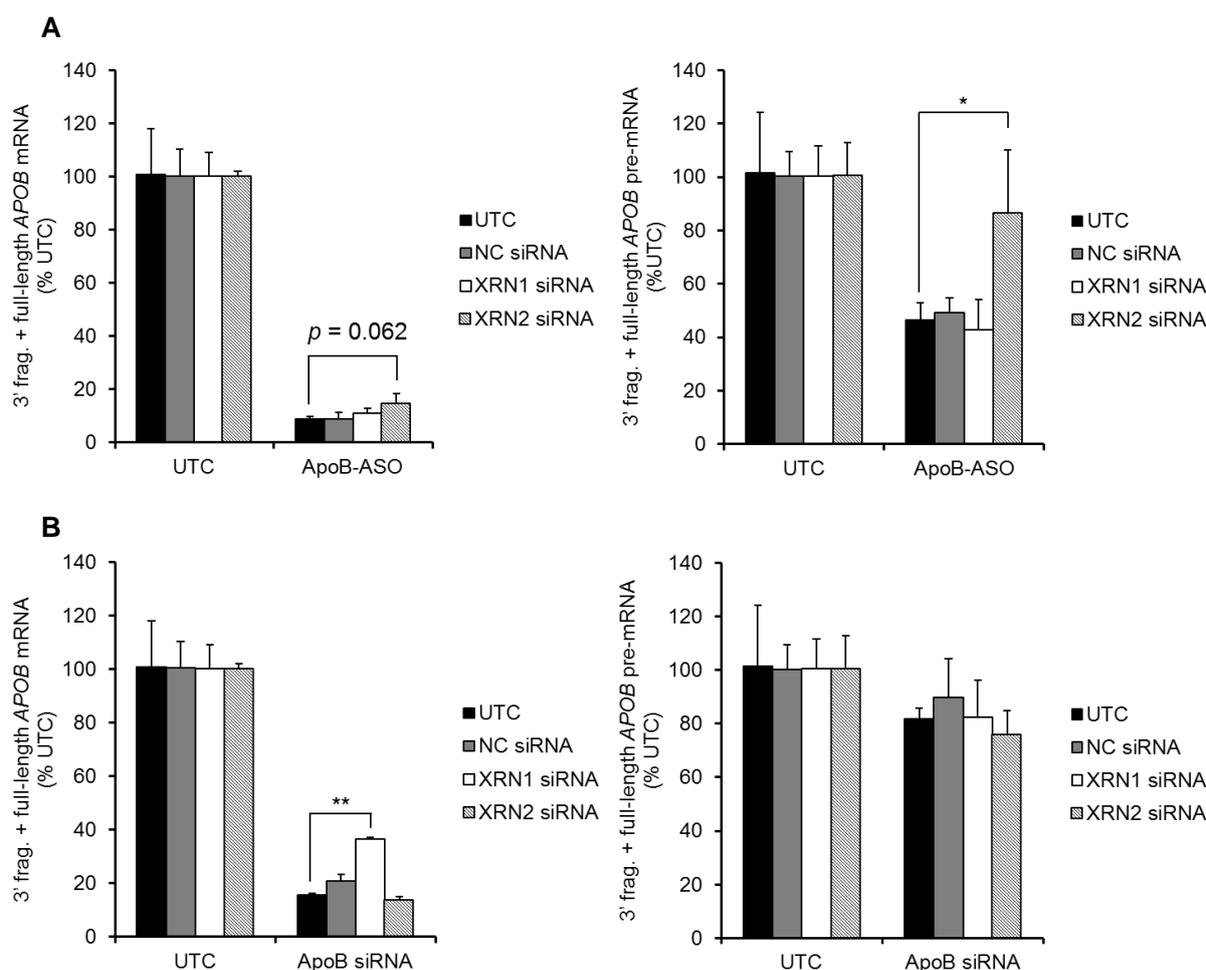


**Fig.3-3 Knockdown effect of XRN1 or XRN2 siRNA in Huh-7 cells.** Huh-7 cells were transfected with XRN1 or XRN2 siRNA and the expression levels of cellular XRN1 and XRN2 were assessed by western blot and qRT-PCR. The level of XRN1 and XRN2 mRNA was quantitated and normalized to that of GAPDH mRNA. These values were set to 100% in the untreated control (UTC).

次に、siRNAで処理した48時間後にApoB-ASOを導入し、24時間後の*APOB* mRNA、もしくは、pre-mRNAの3'切断断片の量を解析した。また、ASOとsiRNAによる標的RNAの分解機構を比較するため、ApoB-ASOの代わりにApoB siRNAを用いて、同様の解析を行った。なお、qRT-PCRに利用するプライマーセットはFig.3-4に示すように、ApoB-ASO、もしくは、ApoB siRNAの標的配列より3'下流に設計したため、これらのプライマーセットは切断を受けていない全長の標的RNAだけでなく、RNase H1による切断後、分解されずに残存している標的RNAの3'切断産物も同時に増幅し、検出することができる。qRT-PCRによる解析の結果、XRN1をKDさせたHuh-7細胞にApoB-ASOを導入した場合には、*APOB* mRNA、pre-mRNA共にその3'切断産物の量に変化は見られなかったが、XRN2をKDさせた細胞では、*APOB* mRNAの3'切断産物の量が、わずかに蓄積する傾向が見られた( $p = 0.062$ ) (Fig.3-5A)。一方、興味深いことに、XRN2をKDさせた細胞では、*APOB* pre-mRNAの3'切断産物量は有意に蓄積することが分かった。これらの結果に対して、ApoB siRNAを導入した場合は、*APOB* mRNAに対してのみKDが認められ、さらに、XRN1の発現を抑制しておくことで、*APOB* mRNAの3'切断産物の有意な蓄積が認められた (Fig.3-5B)。これらの結果から、siRNAの標的となるmRNAは哺乳類細胞においても細胞質のXRN1で分解処理されているが、ASOの標的となるpre-mRNA、および、mRNAの一部は核内のXRN2で分解処理されていることが示唆された。



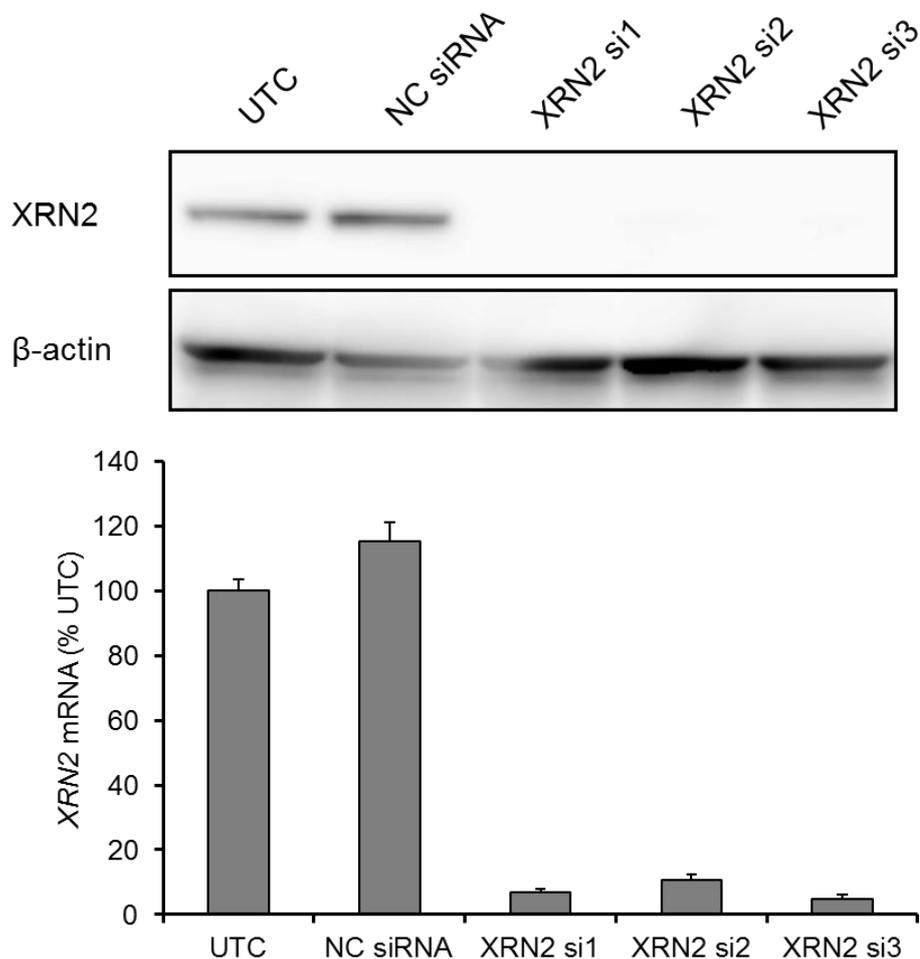
**Fig.3-4 Schematic representation of *APOB* transcripts, oligonucleotides and primer sets for qRT-PCR analysis.** ApoB-ASO or ApoB siRNA is shown as a line and primer sets are shown as arrowheads. Exon 26 is targeted by ApoB-ASO and ApoB siRNA. The forward primer was designed on exon 28 and the reverse primer was designed on exon 29 to detect intact *APOB* mature mRNA and 3' cleavage product. The forward primer was designed on exon 28 and the reverse primer was designed on intron 28 to detect the intact *APOB* pre-mRNA and 3' cleavage product. Each primer set amplified a single product of the expected size.



**Fig.3-5 Effects of XRN depletion on the degradation of the 3' fragments of *APOB* mature mRNA or pre-mRNA.** (A) Following XRN1 or XRN2 siRNA treatment, cells were transfected with ApoB-ASO for 24 h. The levels of 3' fragment (3' frag.) and full-length *APOB* mature mRNA (left panel) and pre-mRNA (right panel) generated by ApoB-ASO were assessed by qRT-PCR. (B) Following XRN1 or XRN2 siRNA treatment, cells were transfected with ApoB siRNA for 24 h. The levels of 3' fragment (3' frag.) and full-length *APOB* mature mRNA (left panel) and pre-mRNA (right panel) generated by ApoB siRNA were assessed by qRT-PCR. These values were set to 100% in the untreated control (UTC). The bar graph shows mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  determined by Student's t-test compared to the siRNA untreated control.

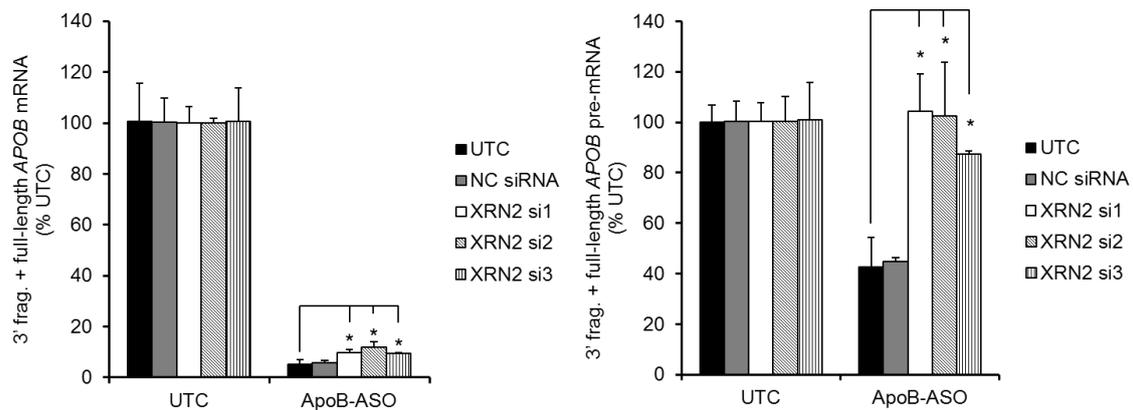
### 第三節 XRN2による標的RNA分解機構の検証

これまでの検討結果から、ASOによるRNase H1を介した標的RNAの分解には核内のXRN2が関与していることが示唆された。この発見を追加で検証するため、さらに2つの実験を行った。まず、XRN2を発現抑制することによるオンターゲット効果であることを裏付けるため、先行のXRN2 siRNAを含めて、計3つの異なる配列のXRN2 siRNAをそれぞれHuh-7細胞へ導入した。XRN2の発現量を解析した結果、いずれのsiRNAでもXRN2のmRNAやタンパクの発現は90%以上抑制されていることを確認した (Fig.3-6)。



**Fig.3-6 Knockdown effect of XRN2 siRNAs in Huh-7 cells.** Huh-7 cells were transfected with each XRN2 siRNA or NC siRNA. The expression level of cellular XRN2 was assessed by western blot and qRT-PCR. The level of XRN2 mRNA was quantitated and normalized to that of GAPDH mRNA. These values were set to 100% in the untreated control (UTC).

次に、ApoB-ASOを導入後、APOB mRNAの3'切断産物量を解析した結果、わずかではあるが、いずれのXRN2 siRNAで処理した場合でも3'切断産物の有意な蓄積が認められた (Fig.3-7)。また、同じ細胞抽出液を用いて、APOB pre-mRNAの3'切断産物量を解析した結果、いずれのXRN2 siRNAで処理した場合でも有意な蓄積が認められた。これらの結果から、3'切断産物の蓄積は特定のXRN2 siRNAの配列によるオフターゲット効果ではなく、XRN2をKDしたことによるオンターゲット効果であることが証明された。すなわち、ASOの標的となったpre-mRNAのほぼ全て、および、少なくとも一部のmRNAの3'切断産物は共にXRN2によって分解処理されていると考えられる。また、XRN2を発現抑制していない条件において、APOB mRNAのKD率がpre-mRNAと比べてやはり高かったことから、成熟



**Fig.3-7 Effects of XRN2 depletion on the degradation of the 3' fragments of *APOB* mature mRNA or pre-mRNA.** Following XRN2 siRNA treatment, cells were transfected with ApoB-ASO for 24 h. The levels of 3' fragment (3' frag.) and full-length *APOB* mature mRNA (left panel) and pre-mRNA (right panel) generated by ApoB-ASO were assessed by qRT-PCR. These values were set to 100% in the untreated control (UTC). The bar graph shows mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0.05$ , as determined by Tukey's test.

mRNA の KD 率には、pre-mRNA の分解によってスプライシングされた mRNA 量自体が低下したことに加え、RNase H1 による直接切断や RNase H1 以外の経路によって分解された効果も含まれている可能性が示唆される。

さらに、XRN2 による分解機構が、特定の標的遺伝子や細胞株に依存せず、RNase H1 を介した ASO による標的 RNA の一般的な経路であることを確かめるため、異なる標的遺伝子として *HER3* を、異なる細胞株として HepG2 細胞を選択し、Huh-7 細胞における *APOB* と同様の検証を行った。*HER3* に対する 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO としては、10 塩基長の DNA ギャップ領域を含み、全てのリン酸結合部位がホスホロチオアート修飾された 16 mer の gapmer である Her3-ASO

(5'-TAGcctgtcacttCTC-3',

N:2',4'-BNA/LNA, n:DNA) を

利用した<sup>22)</sup>。qRT-PCR に利用

するプライマーセットは

Her3-ASO の標的領域の 3' 下流

に設計したため、これらのプライ

マーセットは切断を受けて

いない全長の標的 RNA だけで

なく、RNase H1 による切断後、

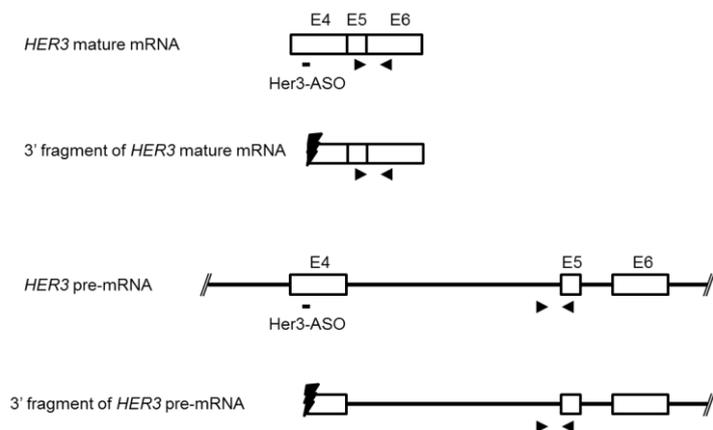
分解されずに残存している標

的 RNA の 3' 切断産物も同時に

増幅し、検出することができる

(Fig.3-8)。HepG2 細胞を XRN2

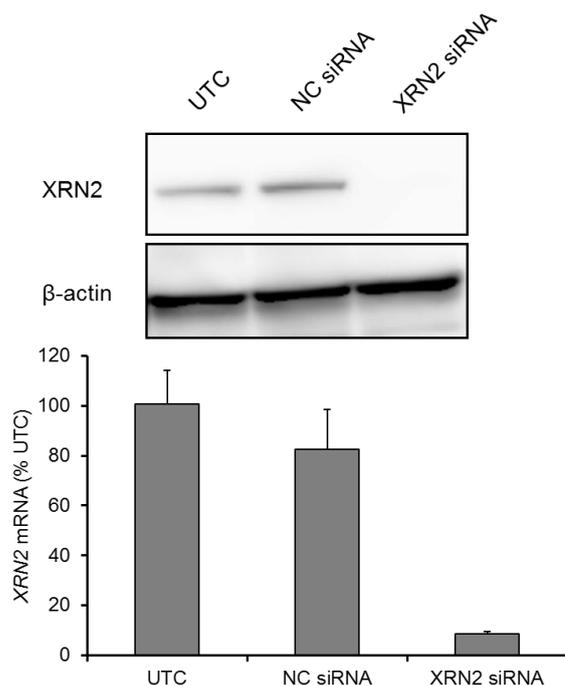
siRNA で処理した結果、mRNA



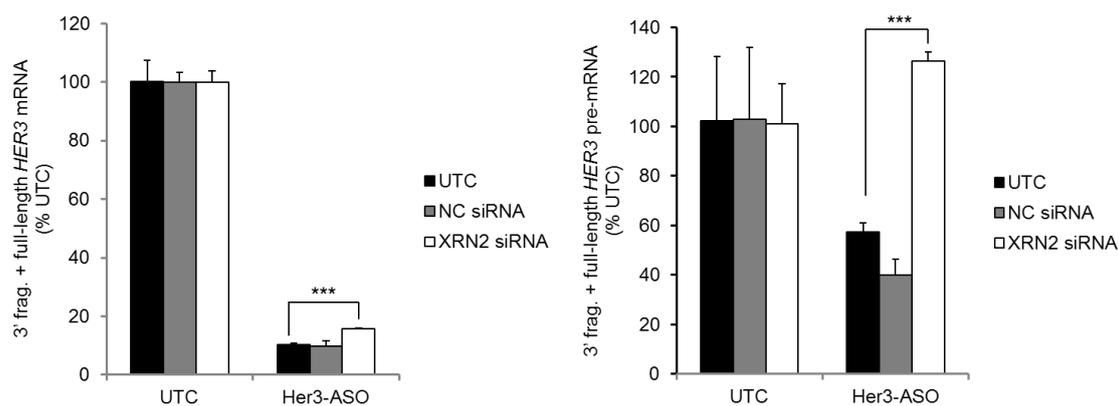
**Fig.3-8 Schematic representation of *HER3* transcripts, Her3-ASO, and primer sets for qRT-PCR analysis.** Her3-ASO is shown as a line and primer sets are shown as arrowheads. Exon 4 is targeted by Her3-ASO. The forward primer was designed on exon 5 and the reverse primer was designed on exon 6 to detect the intact *HER3* mature mRNA and 3' cleavage product. The forward primer was designed on intron 4 and the reverse primer was designed on exon 5 to detect the intact *HER3* pre-mRNA and 3' cleavage product. Each primer set amplified a single product of the expected size.

とタンパクレベルで共に XRN2 の発現は 90%以上 KD されていることを確認した (Fig.3-9)。Her3-ASO を導入後、*HER3* mRNA および pre-mRNA の発現量を qRT-PCR で解析したところ、いずれも XRN2 の KD によって、3'切断産物の量が有意に蓄積していた (Fig.3-10)。

これらの結果から、XRN2 は特定の標的遺伝子や細胞株に依存せず、ASO の標的 pre-mRNA の 3'切断産物の分解をほぼ完全に担っていること、また、ASO の標的 mRNA についても少なくとも一部の分解を担っていることが明らかとなった。

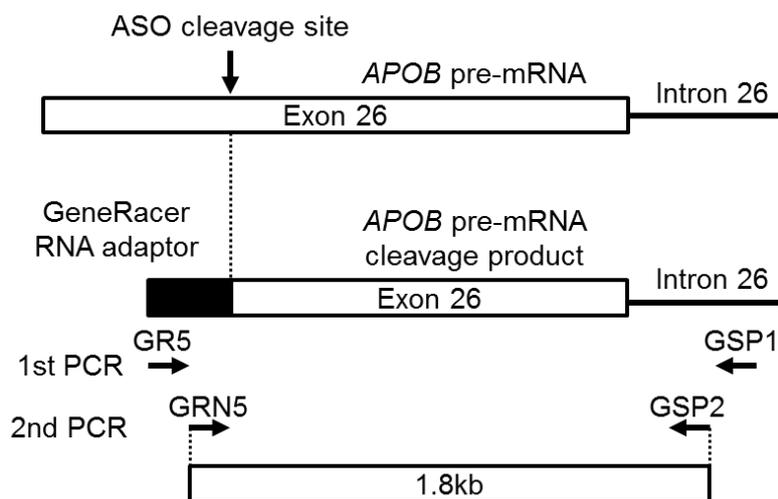


**Fig.3-9 Knockdown effect of XRN2 siRNAs in HepG2 cells.** HepG2 cells were transfected with XRN2 siRNA or NC siRNA and the expression level of cellular XRN2 was assessed by western blot and qRT-PCR. The level of XRN2 mRNA was quantitated and normalized to that of *GAPDH* mRNA. These values were set to 100% in the untreated control (UTC).



**Fig.3-10 Effects of XRN2 depletion on the degradation of the 3' fragments of *HER3* mature mRNA or pre-mRNA.** Following siRNA treatment, cells were transfected with Her3-ASO for 24 h. The levels of 3' fragment (3' frag.) and full-length *HER3* mature mRNA (left panel) and pre-mRNA (right panel) generated by Her3-ASO were assessed by qRT-PCR with primer sets downstream of the ASO binding site. These values were set to 100% in the untreated control (UTC). The bar graph shows mean  $\pm$  SD (n=3). \*\*\* $p < 0.005$  determined by Student's t-test compared to the siRNA untreated control.

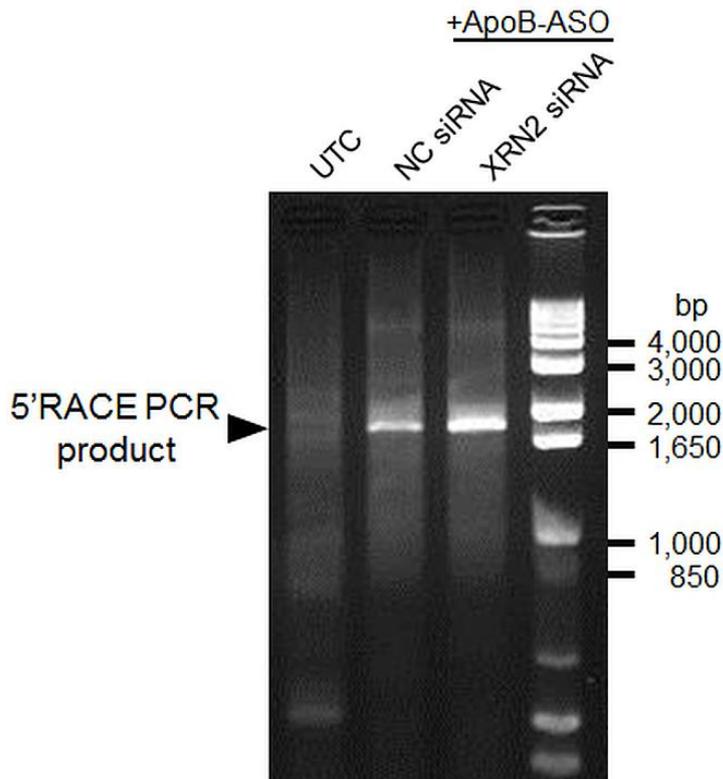
最後に、ASOを導入することでRNase H1を介して切断された標的RNAの3'切断断片が実際に生成していることを証明するため、5'RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 法による解析を行った。5'RACEは、ApoB-ASOを導入したHuh-7細胞からtotal RNAを抽出した後、3'切断断片の5'末端にRNA adaptorを結合させ、*APOB* pre-mRNAのIntron 26に特異的なプライマーを利用して、PCRを2度行うことで実施した (Fig.3-11)。



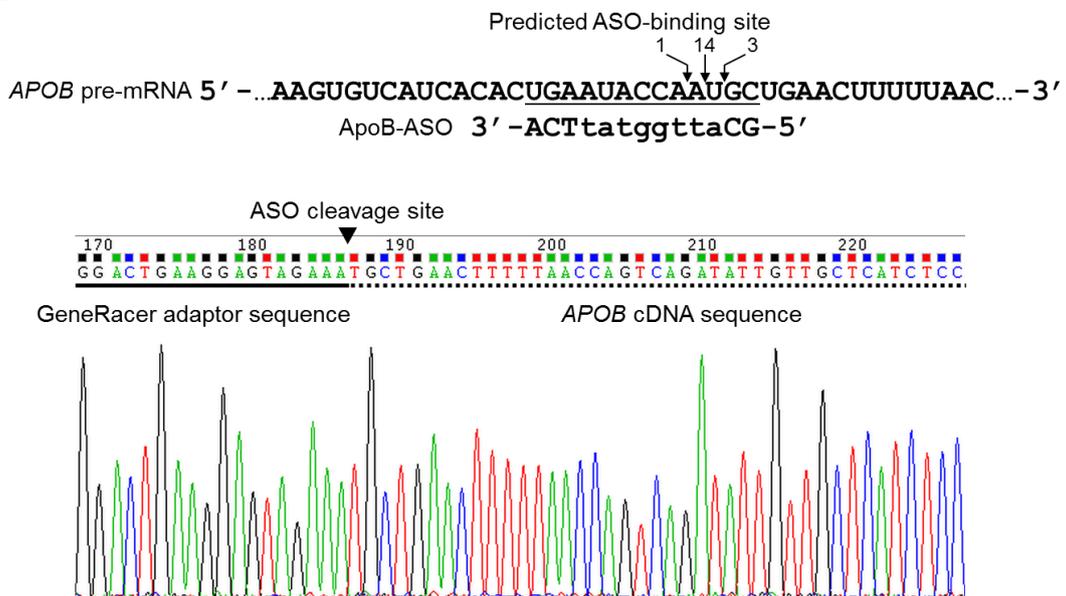
**Fig.3-11 Schematic representation of *APOB* pre-mRNA, illustrating the location of the ASO cleavage site and the primers used for 5' RACE analysis.** GR5; GeneRacer 5' primer; GRN5; GeneRacer 5' nested primer; GSP1; *APOB* pre-mRNA specific reverse primer; GSP2; *APOB* pre-mRNA specific nested primer.

2nd PCRを実施後の増幅産物を電気泳動した結果をFig.3-12Aに示す。未処理サンプルでは増幅産物が見られないのに対し、ApoB-ASOを導入した細胞において5'RACEによる増幅産物が検出された。さらに、NC siRNAを導入した細胞に対して、XRN2 siRNAを導入した細胞では、5'RACE増幅産物のバンド強度に増加が認められた。その後、XRN2 siRNAを導入した細胞由来の5'RACE増幅産物を抽出し、クローニングした後、計18クローンの配列を解析した。その結果、いずれのクローンにおいても*APOB* pre-mRNAの3'切断断片にアダプター配列が結合していることが確認され、また、3'切断産物における5'末端位置はいずれもApoB-ASOの結合配列内に位置していることが分かった (Fig.3-12B)。ヒトのRNase H1はRNA/DNAのヘテロ二重鎖中のRNAの5'末端から主に7-12番目のヌクレオチド間を切断することが知られている<sup>76-78)</sup>。XRN2をKDした細胞において、RNase H1による切断部位がそのまま保存されていたと考えられることから、RNase H1で切断された後、XRN2が主な5'エキソリボヌクレアーゼとして、ASOの標的RNA分解に寄与していることが明らかとなった。

A



B



**Fig.3-12 5' RACE analysis of the 3' fragments generated by RNase H1-mediated cleavage.** (A) Agarose gel visualizing 5' RACE PCR amplification products after siRNA and ASO treatment using the primer set GRN5 and GSP2. (B) The sequence of *APOB* pre-mRNA containing the ApoB-ASO binding site (underlined) is illustrated. The arrows indicate the 5' ends as determined by sequencing of individual clones from 5' RACE derived from XRN2-depleted cells. The numbers above the arrows indicate the number of clones sequenced with that cleavage site. The sequence chromatogram containing the main cleavage site is illustrated in the lower panel.

## 小括

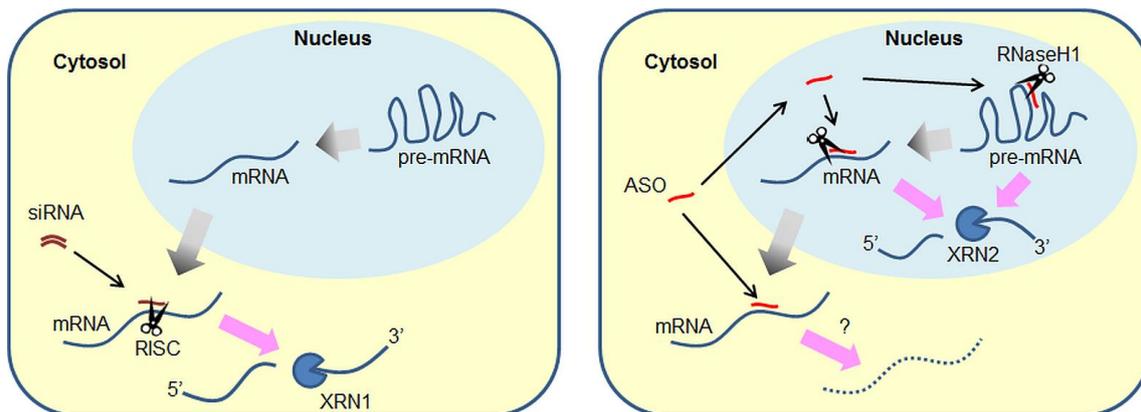
siRNAは細胞内のエンドヌクレアーゼであるAGO2を介して標的RNAを分解する。Orbanらは、ショウジョウバエ細胞において、siRNAの標的RNAはAGO2による切断後、3'切断産物は細胞質に局在する5'エキソヌクレアーゼXRN1によって分解されることを見出ししていたが<sup>73)</sup>、今回、哺乳類細胞においても同様に、siRNAによる標的RNAの3'切断断片はXRN1のKDによって蓄積することが分かった。これらの結果は、siRNAがAGO2を含むRISCに取り込まれ、主に細胞質で作用することと一致する。一方、ASOの標的RNAの分解については、主に2つの経路が考えられた。1つは、核内のRNase H1によって切断された後、標的RNAの切断産物が細胞質に輸送され、siRNAと同様の経路によって分解されるという可能性である。もう一つは、RNase H1で切断された後、核内でそのまま処理されているという可能性である。本研究では、細胞質のXRN1と核内のXRN2の2つの5'→3'エキソヌクレアーゼに着目することで、これら2つの可能性について検証を行った。その結果、RNase H1依存的なASOによって生成した標的RNAの3'切断産物はXRN2のKDによって特異的に蓄積していたことから、RNase H1依存的なASOによる標的RNAの分解は核内のXRN2で処理されていることが示された。この知見は、今までに知られていなかったXRN2の新たな機能としても追加することができる。

また、今回の解析結果から、pre-mRNAの切断や分解はRNase H1やXRN2のKDによってほぼ完全に消失したことから、ASOによるpre-mRNAのKDは、ほぼ全てRNase H1による切断とXRN2による分解に起因していると考えられる。この結果は、実際にASOが核内のpre-mRNAを標的としてエキソンスキッピングを誘導できること、また、イントロンを標的とするASOが核内のRNase H1を介してpre-mRNAを切断するという事実とも矛盾しない<sup>79,80)</sup>。一方、mRNAの切断や分解は、RNase H1やXRN2のKDによってわずかに抑制されたことから、ASOとRNase H1はmRNAも標的とし、少なくとも一部はXRN2によって分解処理されることを示している。ただし、RNase H1の発現が80%も低下し、pre-mRNAのKD効果もほぼ完全に消失していたにもかかわらず、APOB mRNAのKDは約75%も保持されていたことを考えると、mRNAはRNase H1とXRN2以外の経路によっても分解処理を受けている可能性が示唆される。今回の研究によって明らかになった点を踏まえて、想定されるsiRNAとASOの標的RNAの分解経路をFig.3-13に示す。

以前、Wuらは、ASOのKD活性にはその他のRNase Hが関与していることを示唆する報告を行っている<sup>25)</sup>。さらに近年、free-uptakeで導入されたASOは細胞質でAGO2に結合し、GW-bodiesに移行して標的mRNAのKDを引き起こせることが報告された<sup>81)</sup>。mRNAは核内と細胞質の両方に存在していると考えられることから、mRNAの細胞内局在によって異なる分解経路が関与していることが示唆され、ASOの基本的な作用メカニズムを知るうえで大変興味深い知見である。

また、本章では、RNase H1依存的なASOによって生成する標的RNAの3'切断断片に着目

した解析を進めたが、siRNAの標的RNAの5'切断断片は、細胞質のexosome複合体によって分解処理されていることがショウジョウバエの研究で明らかになっている<sup>73)</sup>。また、exosome複合体は核内にも存在することが報告されている<sup>82)</sup>。RNase H1依存的なASOによって切断された標的RNAの5'切断産物が、哺乳類細胞においてどのように分解処理されているのか、ASOによる標的RNAの分解機構の詳細を明らかにする上では、その点も興味深いところである。



**Fig.3-13** A schematic diagram for the degradation pathway of 3' fragments of target RNA generated by siRNA (left panel) and ASO (right panel).

## 総 括

ASO は、理論上、全ての遺伝子だけでなく、microRNA やウイルスゲノムなども標的にできること、また、PS 修飾に加えて、架橋型人工核酸 2',4'-BNA/LNA のような核酸糖部の修飾を組み合わせることで、特別なデリバリーツールを利用しなくても全身投与が可能となったことから、研究ツールとしての利用に留まらず、画期的な核酸医薬品として、その臨床応用にも注目が集められている。しかしながら、臨床応用が注目される一方で、ASO の基本的な作用機序に関する理解は遅れており、その分子メカニズムの詳細は未だ解明されていない点が多いのが現状である。また、*in vitro* と *in vivo* における細胞内取り込み効率の違いなどが要因となり、有効かつ安全な ASO を効率的に取得する手法にも課題が残されていた。

そこで、本研究では、生体内においてより少量で有効な ASO を効率的に取得できる *in vitro* 評価法を開発すると共に、ASO の細胞内取り込みや活性発現に関わる分子の探索や標的 RNA の分解機構に関する解析を進めた。

第一章では、*in vivo* で有効な ASO をより効率的に取得できる *in vitro* 評価系の確立を目指し、以下の成果を得た。

- [1] 培地に  $\text{CaCl}_2$  を添加するだけで ASO の活性を効率良く検出できることを発見し、本手法を CEM ( $\text{Ca}^{2+}$  enrichment of medium) 法と命名した。
- [2] CEM 法は、様々な細胞株において、従来の free-uptake 法よりも低濃度かつ短時間で ASO の活性が評価できる汎用性の高い手法であることを明らかにした。
- [3] CEM 法は、従来のリポフェクション法と比較して、free-uptake 法で導入した際の活性や *in vivo* 活性と高い相関を示したことから、*in vivo* で有効な ASO を効率的に取得するためのスクリーニング法としても有用であることを見い出した。

第二章では、CEM 法の作用メカニズムを解析し、生物学的な有用性を検証した上で、CEM 法を用いた ASO の細胞内取り込みや活性発現に関わる分子の探索を行い、以下の成果を得た。

- [1] CEM法は、リポフェクション法やリン酸カルシウム法とは異なり、主にfree-uptake法と類似した細胞内取り込みを促進することでASOのKD活性を向上させていることを明らかにした。
- [2] CEM法が効果を示す培地中では、血清成分に由来する粒子が集合した100 nm程度の粒子が形成されており、この粒子の集合体はオリゴ核酸とは独立して存在し、CEM法が効果を示す鍵となっている可能性を示した。
- [3] CEM法は核酸の骨格構造や電荷に依存せず、PMOやsiRNAなど様々なオリゴ核酸にも

適用できる汎用性の高い手法であることを見出した。

- [4] CEM法とshRNAライブラリーを利用した分子スクリーニングにより、ASOの細胞内輸送や活性発現に関与が示唆される遺伝子群を選定した。

第三章では、ASOによる標的RNAの分解機構の詳細を明らかにするため、ASOの活性に対するRNase H1の寄与を検証すると共に、標的RNAの分解に必要な細胞内の5'エキソヌクレアーゼに着目した解析を行い、以下の成果を得た。

- [1] 哺乳類細胞においてsiRNAはmRNAのみを標的とし、切断された3'断片は細胞質のXRN1で分解処理されることを明らかにした。
- [2] 哺乳類細胞において、pre-mRNAはASOの標的となり、RNase H1を介して切断された後、その3'断片は核内のXRN2によって分解処理されていること、また、mRNAの3'切断断片も少なくとも一部は核内のXRN2で分解処理されることを明らかにした。
- [3] RNase H1やXRN2の発現が大幅に低下しているにもかかわらず、mRNAに対するKDや切断断片量の変化はわずかであったことから、mRNAを標的とした分解経路は複数存在する可能性が示唆された。

以上述べたように、本研究において、生体内でより少量で有効なASOを効率的に取得できる*in vitro*評価系を開発すると共に、ASOが細胞内に取り込まれ、活性を発現するための作用機序に関して新たな知見を得ることができた。さらに、ASOによる標的RNAの分解に重要なヌクレアーゼを明らかにすると共に、RNase H1以外の未知の分解機構を示唆する知見を得ることができた。今後、ASOによる標的遺伝子の分解機構の詳細がさらに明らかになることで、ひいては、より高い有効性と安全性を兼ね備えたASO医薬品が継続して開発され、既存の創薬技術では治療が困難であった様々な疾患に対して画期的な新薬が生み出されることを期待したい。また、本研究で開発した新規評価法やASOの作用機序に関する知見が、将来そのような画期的な新薬が開発される上で少しでも貢献できるのであれば、著者として本望である。

## 実験の部

### 第一章

#### オリゴ核酸

全ての2',4'-BNA/LNA修飾ASOは株式会社ジーンデザインで合成、精製したものを入手した。利用したASOの塩基配列を以下に示す。

ASO Name	Sequence
ZsGN1-001-BNA(15)	5'-CTTggactgggcCAt-3'
ZsGN1-091-BNA(15)	5'-GCCgatgccttcGCc-3'
ZsGN1-120-BNA(15)	5'-TTGatggcctgcTTg-3'
ZsGN1-169-BNA(15)	5'-CAAgatgtccttcGGc-3'
ZsGN1-208-BNA(15)	5'-CTCggtgaacacGCg-3'
ZsGN1-240-BNA(15)	5'-TTCttgaagtagTCg-3'
ZsGN1-282-BNA(15)	5'-AACaggaaggagCGg-3'
ZsGN1-325-BNA(15)	5'-CACggtgatgtcGGc-3'
ZsGN1-370-BNA(15)	5'-GCCgtagaacttGGa-3'
ZsGN1-410-BNA(15)	5'-TCAtcttcttcaTca-3'
ZsGN1-448-BNA(15)	5'-GGGgatgatcttCTc-3'
ZsGN1-478-BNA(15)	5'-GTCgcccttcaaGAt-3'
ZsGN1-531-BNA(15)	5'-TCGaaactggcagCGc-3'
ZsGN1-631-BNA(15)	5'-CTGgttcttggcGTc-3'
ApoB-00521-BNA(13)	5'-AAtgccagcTTG-3'
ApoB-01261-BNA(13)	5'-AaggcttgtaAAG-3'
ApoB-02101-BNA(13)	5'-TCaaatataaGAT-3'
ApoB-05141-BNA(13)	5'-AAgctctgcaTTC-3'
ApoB-05701-BNA(13)	5'-ACaccctgaaCCT-3'
ApoB-08701-BNA(13)	5'-GTgtgtaaactTTG-3'
ApoB-09621-BNA(13)	5'-ATgattgcttTGT-3'
ApoB-10177-BNA(13)	5'-GCattggtatTCA-3'
ApoB-10461-BNA(13)	5'-TGgtatttccATT-3'
ApoB-11001-BNA(13)	5'-GGttcttagtGTT-3'
ApoB-12241-BNA(13)	5'-TCagttttgaATA-3'

Survivin-BNA(16) (EZN-3042)

5'-CTCAatccatggCAGc-3'

NC-BNA(16)

5'-TAGcttgtcccatCTC-3'

Uppercase: 2',4'-BNA/LNA, Lowercase: DNA, All linkages are phosphorothioated.

## 細胞培養

ヒト肝細胞癌由来HLE細胞およびHuh-7細胞、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、ヒト肺胞基底上皮腺癌由来A549細胞は、いずれもJCRB (Japanese collection of research bioresources) 細胞バンク (独立行政法人 医薬基盤研究所) より入手した。また、レトロウイルスパッケージング細胞であるPlat-GP細胞 (Cell Biolabs Inc) は、コスモバイオ社より入手した。いずれの細胞株も非動化したFBSを10% (v/v) とペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL)、Fungizone® (0.25 µg/mL) を含むDMEM培地で、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで培養した。

## ZsGreen1 発現レトロウイルスベクターの構築

pZsGreen1-N1 (クロンテック社) を制限酵素 BamHI と NotI で処理することでZsGreen1のORF全長を切り出し、Bam HI と Not I で処理済みの pENTR2B (Invitrogen 社) へ連結することで、エントリーベクターである ZsGreen1/pENTR を作製した。その後、Gateway® テクノロジーによる LR 組換え反応を利用して、attR を持つデスティネーションベクターpQCXIN (クロンテック社) へZsGreen1を導入し、ZsGreen1 発現レトロウイルスベクターであるZsGreen1/pQCXIN を作製した。

## ZsGreen1 安定発現細胞および ZsGreen1 と DsRed の共安定発現細胞の作製

ZsGreen1発現レトロウイルスは、ZsGreen1/pQCXINとパッケージングベクター pCMV-VSV-G (Cell Biolabs Inc) を、DsRed発現レトロウイルスは、pRetroQ-DsRed-N1 (クロンテック社) とpCMV-VSV-GをPlat-GP細胞へco-transfectionすることで作製した。遺伝子導入試薬FuGENE6 (Promega社) の添付マニュアルに従って、Plat-GP2細胞へ一過的に導入し、約48時間培養後、ウイルス含有培養上清を回収した。その後、0.45 µmフィルターで浮遊細胞等を除去し、超遠心 (50,000 ×g, 4°C, 2 hr) によって、濃縮レトロウイルスを得た。濃縮したZsGreen1発現レトロウイルスを新鮮なDMEM培地 (ポリブレン10 µg/mL含有) へ添加し、HLE細胞へ2回感染させた後、ネオマイシン400 µg/mL含有培地で数日間培養することで、ZsGreen1安定発現細胞であるZsG-N1-2/HLEを樹立した。その後、ZsG-N1-2/HLEにDsRed発現レトロウイルスを1回感染させ、ピューロマイシン1 µg/mL含有培地で数日間培養することで、ZsGreen1とDsRedの共安定発現細胞であるZsG-N1-2R/HLEを樹立した。

## ZsGreen1 ASO のスクリーニング

ZsGreen1 の ORF 全長に対して設計した計 14 配列の 2',4'-BNA/LNA 修飾 gapmer 型 ASO

(ZsGN1-001-BNA(15), ZsGN1-091-BNA(15), ZsGN1-120-BNA(15), ZsGN1-169-BNA(15), ZsGN1-208-BNA(15), ZsGN1-240-BNA(15), ZsGN1-282-BNA(15), ZsGN1-325-BNA(15), ZsGN1-370-BNA(15), ZsGN1-410-BNA(15), ZsGN1-448-BNA(15), ZsGN1-478-BNA(15), ZsGN1-531-BNA(15), ZsGN1-631-BNA(15)) を使用し、配列スクリーニングを実施した。リポフェクション法による導入には RNAiMAX (Invitrogen 社) を利用し、添付のマニュアルに従って最終濃度 20nM となるように ASO を含むリポプレックスを調製した。ZsG-N1-2R/HLE 細胞を黒色クリアボトム の 96 ウェルプレート (Corning 社) へ播種 (8,000cells/well) すると共に、リポプレックスを添加し、2 日後にマイクロプレート蛍光光度計 Gemini EM (Molecular Devices) を利用して ZsGreen1 (励起波長 ; 485 nm、蛍光波長 ; 535 nm) と DsRed (励起波長 ; 535 nm、蛍光波長 ; 590 nm) の蛍光値を測定し、ZsGreen1 の蛍光値を DsRed の蛍光値で補正することで、各 ASO による KD 活性を算出した。一方、free-uptake 法では ZsG-N1-2R/HLE 細胞を播種 (500cells/well) した翌日に、最終濃度 5  $\mu$ M となるように ASO を添加し、6 日後に ZsGreen1 と DsRed の蛍光値を測定し、各 ASO による KD 活性を算出した。

#### **ZsG-N1-2R/HLE 細胞を用いた ASO の KD 活性評価**

ZsG-N1-2R/HLE 細胞を黒色クリアボトム の 96 ウェルプレート (Corning 社) へ播種 (8,000cells/well) し、24 時間後、1M の  $\text{CaCl}_2$  または  $\text{MgCl}_2$  を各最終濃度になるように添加すると共に、ZsGN1-120-BNA(15)を 300 nM となるように添加した。4 日後にマイクロプレート蛍光光度計 Gemini EM (Molecular Devices) を利用して ZsGreen1 (励起波長 ; 485 nm、蛍光波長 ; 535 nm) と DsRed (励起波長 ; 535 nm、蛍光波長 ; 590 nm) の蛍光値を測定し、ZsGreen1 の蛍光値を DsRed の蛍光値で補正することで、各 ASO による KD 活性を算出した。また、ASO 濃度依存性の評価では、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、もしくは未存在下で、ZsGN1-120-BNA(15)を 5 nM から 5  $\mu$ M となるように添加し、4 日後に上記と同様、蛍光値の測定と KD 活性の算出を行った。さらに、経時変化の評価では、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、もしくは未存在下で、ZsGN1-120-BNA(15)を 1  $\mu$ M となるように添加し、5 日間、蛍光値を測定後、KD 活性の算出を行った。

また、複数の ZsGreen1-ASO に対して、導入法の違いによる相関を解析した実験では、ZsG-N1-2R/HLE 細胞を播種し、24 時間後、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、14 種類の ASO について、それぞれ 2.5  $\mu$ M となるように添加し、4 日後に蛍光値の測定と KD 活性を算出した。

#### **各種培養細胞を利用した qRT-PCR による KD 活性評価**

Huh-7 細胞での検討では、96 ウェルプレートへ播種 (8,000cells/well) し、24 時間後、1M の  $\text{CaCl}_2$  または  $\text{MgCl}_2$  を各最終濃度になるように添加すると共に、APOB に対する 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO である ApoB-10177-BNA(13)を 100 nM となるように添加した。その 24 時間後、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa) で細胞を溶解し、One Step

SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) を使用して、*APOB* mRNA の発現量を StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した。ヒト *APOB* の解析には hApoB-F: 5'-TTCTCAAGAGTTACAGCAGATCCA-3' と hApoB-R: 5'-TGGAAGTCCTTAAGAGCAACTAACA-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてヒト *GAPDH* の解析には hGAPDH-F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' と hGAPDH-R: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct (cycle threshold) 値の差を発現レベルの差に換算する  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>83)</sup>を用いて、相対発現量による KD 活性を算出した。

また、ASO 濃度依存性の評価では、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、もしくは未存在下で、ApoB-10177-BNA(13)を 0.1 nM から 1  $\mu\text{M}$  となるように添加し、24 時間後、上記と同様に qRT-PCR による解析を行った。

各種金属塩化物による評価では、 $\text{CaCl}_2$  の代わりにそれぞれの金属塩化物を最終濃度 10 mM となるように添加した。ただし、Mn, Zn, Co については細胞毒性が強く出現したため、最終濃度 0.1 mM とした。ASO の添加 24 時間後、上記と同様に qRT-PCR により KD 活性を解析した。

CEM 法、もしくはリポフェクション法と *in vivo* 活性の相関を解析した実験では、ヒト *APOB* mRNA とマウスの *Apob* mRNA の全長配列のうち、100%保存されている領域に対して計 10 種類の異なる 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO (ApoB-00521-BNA(13), ApoB-01261-BNA(13), ApoB-02101-BNA(13), ApoB-05141-BNA(13), ApoB-05701-BNA(13), ApoB-08701-BNA(13), ApoB-09621-BNA(13), ApoB-10461-BNA(13), ApoB-11001-BNA(13), ApoB-12241-BNA(13)) を設計した。Huh-7 細胞を播種し、24 時間後、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、10 種類の ASO について、それぞれ 10 nM となるように添加した。または、RNAiMAX を使用し、添付のプロトコールに従って最終濃度 10 nM となるようにトランスフェクションを行った。ASO の導入 24 時間後、上記と同様に qRT-PCR により KD 活性を解析した。

CEM 法の汎用性を検証するため、*Survivin* に対する ASO を用いた実験では、HeLa や HEK293、もしくは、A549 細胞を 96 ウェルプレートへ播種(8,000cells/well)し、24 時間後、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、もしくは、非存在下で *Survivin*-BNA(16)を最大 1  $\mu\text{M}$  となるように添加した。その 24 時間後、*APOB* での検討と同様に細胞を溶解し、qRT-PCR により KD 活性を解析した。なお、ヒト *Survivin* の解析には hSurvivin-F: 5'-AGTCTGGCGTAAGATGATGGATTTG-3' と hSurvivin-R: 5'-CACAGCAGTGTTTCAAATGACAGG-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてヒト *GAPDH* の解析には上記と同様の hGAPDH-F と hGAPDH-R のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct 値の差を発現レベルの差に換算した相対発現量による KD 活性を算出した。

## 細胞毒性評価

細胞毒性評価には WST-8 (キシダ化学) を使用し、マイクロプレート吸光度計

SpectraMax M5 (Molecular Devices) にて OD450 nm を測定後、CaCl<sub>2</sub> の未添加細胞の値を 100% とし、相対的な細胞生存率を算出した。具体的には、Huh-7、HeLa、HEK293、A549 細胞をそれぞれ 50% 以下のコンフルエントになるように 96 ウェルプレートに播種し、24 時間培養後、最終濃度が 0~30 mM となるように CaCl<sub>2</sub> を添加した。また、ASO の存在下、非存在下の影響を調べるため、ASO (+) として 100 nM の ApoB-10177-BNA(13) を添加した。その後、24 時間おきに最長 96 時間までの時点で WST-8 を添加し、1~1.5 時間 37°C でインキュベーションした後の OD450 nm を測定し、相対的な細胞生存率を算出した。

### マウス肝臓における ASO の KD 活性測定

全ての動物実験のプロトコールは、大阪大学の動物実験委員会で承認を得て実施した。7 週齢の C57Bl/6J ♂ (日本クレア) に対して、*Apob* を標的とした 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO を 10 mg/kg の投与量で皮下へ単回投与を行った。投与 72 時間後にイソフルラン吸入麻酔下にて全血を採取後、肝臓を採取した。肝臓は液体窒素で瞬間凍結後、解析まで -80°C にて保存した。肝臓 total RNA は QuickGene RNA tissue kit SII (富士フィルム社) を使用し、添付のマニュアルに従って抽出した。抽出した total RNA を鋳型とし、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies 社) を使用して逆転写した後、*Apob* mRNA の発現量を StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した。マウス *Apob* の解析には mApoB-F: 5'- TCCTCGGTGAGTTCAATGACTTTC-3' と mApoB-R: 5'- TGGACCTGCTGTAGCTTGTAGGA-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてマウス *Gapdh* の解析には mGAPDH-F: 5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' と mGAPDH-R: 5'- TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct 値の差を発現レベルの差に換算した相対発現量による KD 活性を算出した。

### 初代培養肝細胞での評価

7 週齢の C57Bl/6J ♂ (日本クレア) をコラゲナーゼ肝還流処理し、初代培養肝細胞を採取した。単離した初代培養肝細胞をタイプ I コラーゲンコートした 96 ウェルプレートに  $3 \times 10^5$  cells/well で播種し、翌日、9 mM の CaCl<sub>2</sub> 存在下、または非存在下で、ApoB-10177-BNA(13) を最終濃度 100 nM となるように培地へ添加した。24 時間後に *Apob* mRNA の定量解析を行った。qRT-PCR には上記の *in vivo* 実験と同様のプライマーセットを使用し、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa) で細胞を溶解後、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) を使用して、StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した。

### 統計解析

解析結果の統計比較はスチューデントの t 検定を用いて行った。

## 第二章

### オリゴ核酸

本章で用いた 2',4'-BNA/LNA 修飾 ASO (Cy3 標識 ApoB-10177-BNA(13)、ApoB-10177-BNA(13)、ZsGN1-120-BNA(15)) は全て株式会社ジーンデザインで合成、精製したものを入手した。siRNAは、いずれもInvitrogen社からStealth RNAi siRNAとして、PMOは、いずれもGene-Tools社から購入した。これらのsiRNA、および、PMOの塩基配列を以下に示す。

siRNA Name	Sequence
ZsG-siRNA	5' -GAGAACUGCAUGUACCACGAGUCCA-3' 3' -CUCUUGACGUACAUGGUGCUCAGGU-5'
ApoB-si1	5' -CCUGAAGUUUGUAAUCUCAAGCAGAA-3' 3' -GGACUUCAAAACAUUGAGUUCGUCUU-5'
ApoB-si2	5' -GGGACCACAGAUGUCUGCUUCAGUU-3' 3' -CCCUGGUGUCUACAGACGAAGUCA-5'
ApoB-si3	5' -CCAAUACAAGUUGAAGGAGACUAUU-3' 3' -GGUUAUGUUCAACUCCUCUGAUAA-5'
VPS26B-si1	5' -GGGCAGAAUGUGAAGCUACGCUAUU-3' 3' -CCCGUCUUACACUUCGAUGCGAUAA-5'
VPS26B-si2	5' -GCGUGGAGGUGGAAAUCCUUCUGAA-3' 3' -CGCACCUCACCUUUAGGAAGACUU-5'
VPS26B-si3	5' -GGAUUGAGGACUGUCUGCACAUUGA-3' 3' -CCUAAUCUCUGACAGACGUGUAACU-5'
BRF2-si1	5' -GGUGGGAAAUAUUCCUUAGGUUUUA-3' 3' -CCACCCUUUAUUAAAGGAUCCAAAU-5'
BRF2-si2	5' -CCUCAGGAAGUUAGGGACUUUCAGA-3' 3' -GGAGUCCUCAAUCCUGAAAGUCU-5'
BRF2-si3	5' -GAGCUGGUGGAAGACUCGCACUAUU-3' 3' -CUCGACCACCUUCUGAGCGUGAUAA-5'
PMO Name	Sequence
ST6-PMO	5' -CATTTTCTGTTCTAGATCCTGTT-3'
NC-PMO	5' -GGATGTCTTGCTGGACGTCGTTA-3'

### 細胞培養

ヒト肝細胞癌由来HLE細胞およびHuh-7細胞はJCRB細胞バンク (独立行政法人 医薬基盤研究所) より入手したものを使用した。ZsG-N1-2/HLEとZsG-N1-2R/HLE細胞は、第一章で作製したものを使用した。また、レンチウイルスパッケージング細胞である293LTV細胞 (Cell Biolabs Inc) は、コスモバイオより入手した。いずれの細胞株も10%FBS (v/v) とペニシ

リン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL)、Fungizone® (0.25 µg/mL) を含む DMEM培地で、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで培養した。

#### 共焦点顕微鏡による ASO の細胞内局在解析

Huh-7細胞をフェノールレッド不含の10%FBS/DMEM培地にて、8ウェルのガラスボトムプレート (SCC-038; マツナミガラス社) に $4.5 \times 10^4$  cells/wellで播種した。播種24時間後、9 mM CaCl<sub>2</sub>の存在下、もしくは非存在下で、500 nMのCy3標識ApoB-10177-BNA(13)を培地に添加した。なお、既存のトランスフェクション法と比較するため、リポフェクション法はLipofectamine2000 (Invitrogen社) を、リン酸カルシウム法はCalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech社) を使用し、添付のマニュアルに従って複合体を調製後、100 nMのCy3標識ApoB-10177-BNA(13)を導入した。その後、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で 24時間培養した後、0.5 µMのHoechst 33342 (Life Technologies) で30分間核染色を行い、75 nMのLysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes) で30分間リソソームを染色した。その後、HBSS (Hank's balanced salt solution) 置換した後、共焦点顕微鏡 (TCS SP5; Leica) 下にてASOの細胞内局在を観察した。なお、検出には以下の条件を用いた。

対物レンズ: 40×/Oil, HCX PL APO, Cy3 検出: Ex 543-nm laser (50% power), PMT range 555-700 nm, LysoTracker 検出: Ex 488-nm laser (40% power), PMT range 500-535 nm, Hoechst 33342 検出: Ex 405-nm laser (70% power), PMT range 413-429 nm, DIC (Differential Interference Contrast) : Ex 488-nm (7% power).

全ての画像は 100 Hz のスキャンスピードで取得し、6つの画像を平均化した。画像は、ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で解析を行った。

#### フローサイトメトリー解析による ASO 取り込み量の解析

フェノールレッド不含の 10%FBS/DMEM 培地を用いて、Huh-7 細胞を 24well plate (collagen-coated) に $2 \times 10^5$  cells/well で播種した。播種 24 時間後、9 mM CaCl<sub>2</sub> の存在下、もしくは非存在下で、200 nM の Cy3 標識 ApoB-10177-BNA(13) を培地に添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間培養した後、PBS (phosphate buffered saline) にて 2 回洗浄を行い、余分な Cy3 標識 ASO を除去した後、37°C で 5 分間トリプシン処理を行った。その後、10%FBS 含有 DMEM (フェノールレッド不含) で細胞懸濁液を調製し、セルストレーナー (BD Falcon 社) にて細胞塊をほぐした後、FACSCalibur (Becton Dickinson) にて、細胞に取り込まれた Cy3 の蛍光強度を測定した。得られたデータは、Cell Quest software (Becton Dickinson) にて定量解析を行った。

#### CEM 法が効果を示すタイミングの検討

ZsG-N1-2R/HLE 細胞を黒色クリアボトムの 96 ウェルプレートへ播種 (12,000 cells/well) すると同時に 9 mM の CaCl<sub>2</sub> を添加した場合を「Pre」、細胞播種の翌日に ZsGN1-120-BNA(15)

(最終濃度 2.5  $\mu\text{M}$ ) を添加すると同時に 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加した場合を「TF」、その 7 時間後に ASO を含む培地を除去し、PBS で洗浄後に新鮮培地とともに 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加した場合を「Post」とした。ASO 添加から 72 時間培養後、ZsGreen1 と DsRed の蛍光値を測定し、ASO による KD 活性を算出した。

一方、Huh-7 細胞での検討では、96 ウェルプレートへ播種 (8,000cells/well) した翌日、ApoB-10177-BNA(13) (最終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) を添加すると同時に 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加した場合を「TF」、その 4 時間後に ASO を含む培地を除去し、PBS で洗浄後に新鮮培地とともに 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加した場合を「Post」とした。ASO 添加から 24 時間後に CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa) で細胞を溶解し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) を使用して、APOB mRNA の発現量を StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した。ヒト APOB の解析には hApoB-F: 5'-TTCTCAAGAGTTACAGCAGATCCA-3' と hApoB-R: 5'-TGGAAGTCCTTAAGAGCAACTAACA-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてヒト GAPDH の解析には hGAPDH-F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' と hGAPDH-R: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct 値の差を発現レベルの差に換算する  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>83)</sup>を用いて、相対発現量による KD 活性を算出した。

#### 動的光散乱 (DLS) 法による粒子形成能の評価

1% の antibiotics/antimycotics (Sigma-Aldrich) と 10% FBS を含む DMEM 培地を準備し、1M の  $\text{CaCl}_2$  または  $\text{MgCl}_2$  のストック溶液を最終濃度 0~30 mM となるように添加した後、ゼータサイザーナノ ZS (マルバーン社) を用いて、平均粒子径の測定と多分散指数の算出を行った。また、10% の FBS、9 mM の  $\text{CaCl}_2$ 、1  $\mu\text{M}$  の ApoB-10177-BNA(13) をそれぞれ含む培地、含まない培地を準備し、上記と同様に平均粒子径の測定と多分散指数の算出を行った。

#### 透過型電子顕微鏡 (TEM) による粒子の解析

1  $\mu\text{M}$  の ApoB-10177-BNA(13) を含む 10%FBS/DMEM、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含む 10%FBS/DMEM、1  $\mu\text{M}$  の ApoB-10177-BNA(13) と 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含む 10%FBS/DMEM、1  $\mu\text{M}$  の ApoB-10177-BNA(13) と 9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含む FBS 不含 DMEM の計 4 サンプルを準備した。各サンプルをカーボンコートした銅膜に吸着させ、2% リンタングステン酸 (pH 7.0) で 10 秒間ネガティブ染色を行った。その後、JEM-1400Plus 透過型電子顕微鏡 (JEOL Ltd.) を用い、80 kV の加速電圧で観察を行った。デジタル画像 (2048 x 2048 pixels) は CCD カメラ (VELETA; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) で取得した。なお、TEM に関する実験は全て 株式会社東海電子顕微鏡解析にて実施した。

#### ZsG-N1-2R/HLE 細胞を用いた ZsGreen1 siRNA の KD 活性評価

ZsG-N1-2R/HLE 細胞を用いた siRNA に対する CEM 法の検証には、ASO の代わりに Stelth

RNAi siRNA (Invitrogen 社) である ZsG-siRNA を使用した。ZsG-N1-2R/HLE 細胞を黒色クリアボトムの 96 ウェルプレート (Corning 社) へ播種(8,000cells/well) し、24 時間後、24 時間後、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、ZsG-siRNA を 1  $\mu\text{M}$  となるように添加した。また、siRNA 導入の陽性コントロールとして、RNAiMAX を使用し、添付のプロトコールに従って最終濃度 25 nM となるように ZsG-siRNA を添加した。siRNA の導入 4 日後、マイクロプレート蛍光光度計 Gemini EM (Molecular Devices) を利用して ZsGreen1 (励起波長 ; 485 nm、蛍光波長 ; 535 nm) と DsRed (励起波長 ; 535 nm、蛍光波長 ; 590 nm) の蛍光値を測定し、ZsGreen1 の蛍光値を DsRed の蛍光値で補正することで、各 siRNA による KD 活性を算出した。一方、リポフェクション導入時の KD 活性に対する CEM 効果の検証実験では、9 mM  $\text{CaCl}_2$  添加または未添加で RNAiMAX によるリポフェクション導入を実施した。RNAiMAX を使用し、添付のプロトコールに従って最終濃度 20 nM となるように各種 ZsGreen1-ASO を添加した。ASO 導入 2 日後、上記と同様の方法で蛍光値を測定し、KD 活性を算出した。

#### Huh-7 細胞を用いた ApoB siRNA の KD 活性評価

Huh-7 細胞を用いた siRNA に対する CEM 法の検証には、ASO の代わりに Stealth RNAi siRNA (Invitrogen 社) である ApoB-si1,2,3 を使用した。Huh-7 細胞を 96 ウェルプレートへ播種 (8,000cells/well) し、24 時間後、9 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下、もしくは、非存在下でいずれかの ApoB-siRNA を 1  $\mu\text{M}$  となるように添加した。siRNA の添加 24 時間後、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa) で細胞を溶解し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) を使用して、APOB mRNA の発現量を StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した。ヒト APOB の解析には hApoB-F: 5'-TTCTCAAGAGTTACAGCAGATCCA-3' と hApoB-R: 5'-TGGAAGTCCTTAAGAGCAACTAACA-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてヒト GAPDH の解析には hGAPDH-F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' と hGAPDH-R: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct (cycle threshold) 値の差を発現レベルの差に換算する  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>83)</sup>を用いて、相対発現量による KD 活性を算出した。

#### PMO に対する CEM 効果の検証

PMO はいずれも Gene Tools 社にて委託合成を行った。Huh-7 細胞を 96 ウェルプレートへ播種 (12,000cells/well) し、翌日、ST6-PMO または NC-PMO を最終濃度 20  $\mu\text{M}$  となるように添加した。また、同時に  $\text{CaCl}_2$  は最終濃度 9 mM、Endo-Porter (Gene Tools 社) は最終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように培地へ添加した。48 時間培養後、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa) を用いて細胞溶解液を調製した。その後、RT-PCR によるエキソンスキッピング活性の解析には、それぞれエキソン 5 と 7 に設計した hSTAT3-E5-F: 5'-TGGTGACGGAGAAGCAGCAGAT-3' と hSTAT3-E7-R: 5'-

TGCACGTACTCCATCGCTGACAAA -3'のプライマーセットを使用し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) にて特異的配列を増幅後、10% TBE (tris-borate-EDTA) ゲルで電気泳動を行い、EtBr (ethidium bromide) で染色後、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にて増幅断片を検出した。一方、qRT-PCRによる *STAT3* mRNA 発現量は、エキソン 24 に設計した hSTAT3-E24-F: 5'- GGAATCCCGTGGGTTGCTTAC-3' と hSTAT3-E24-R: 5'- TTGAATGCAGTGGCCAGGAC-3'のプライマーセットを使用し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) と StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて相対発現量による KD 活性を算出した。

また、STAT3 タンパク発現量は Western blotting にて解析を行った。Huh-7 細胞を 12 ウェルプレートへ播種 (95,000cells/well) した翌日に、上記と同様、ST6-PMO または NC-PMO は最終濃度 20  $\mu$ M、CaCl<sub>2</sub> は最終濃度 9 mM、Endo-Porter は最終濃度 10  $\mu$ M となるように培地へ添加した。48 時間培養後、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を含む RIPA (radio-immunoprecipitation assay) バッファー (Sigma) で細胞溶解液を調製し、BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific) でタンパク定量を行った後、DTT (dithiothreitol) 含有サンプルバッファー (Thermo Scientific) を加えて、100°C、5 分加熱処理した。10  $\mu$ g 分のタンパクを 5-20%のポリアクリルアミドゲルにアプライし、SDS (sodium dodecyl sulfate) – PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) にて分離後、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜にトランスファーした。その後、Blocking One (ナカライテスク) で室温 1 時間ブロッキングした後、抗 STAT3 抗体 (1:1000, Cell Signaling 社) を含む 5% BSA (bovine serum albumin) 含有 TBS-T で 4°C、終夜 1 次抗体反応を行った。また、内在コントロールとして、抗  $\beta$ -Actin 抗体 (1:1000, Sigma) を含む Blocking One で室温、1 時間反応させた。その後、TBS-T にて数回洗浄した後、2 次抗体として HRP (horseradish peroxidase) 標識抗ウサギまたはマウス IgG 抗体 (1:3000, GE Healthcare) で室温、1 時間反応させ、TBS-T にて数回洗浄した後、ECL Prime Kit (GE Healthcare) と ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にてタンパク発現量を解析した。

### ルシフェラーゼアッセイ

Huh-7 細胞を白色クリアボトムの 96 ウェルプレート (Corning 社) へ播種 (8,000cells/well) した翌日、9 mM の CaCl<sub>2</sub> 存在下、または非存在下で、pGL4.50 Luc plasmid (Promega 社) を培地へ添加した。また、発現プラスミド導入の陽性コントロールとして、CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech 社) を使用し、添付のマニュアルに従ってリン酸カルシウム法による導入を行った。48 時間培養後、ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega 社) とマイクロプレートルミノメーター Gemini EM (Molecular Devices) を利用して、ルシフェラーゼレポーター活性を測定した。

### shRNA スクリーニング

ZsGreen1 の蛍光値のばらつきをより抑えるため、ZsG-N1-2/HLE 細胞を 150 mm dish へ 100

～1,000cells/well の濃度で播種し、約 2 週間培養後、シングルクローンを単離した。計 9 クローンの中から、ZsGreen1 の蛍光強度と ZsGN1-120-BNA(15)による KD 活性を保持しつつ、細胞増殖速度や生存率の良好なクローン (ZsG-N1-2/HLE-s1) を選択した。次に、shRNA 発現レンチウイルスを作製するため、レンチウイルスパッケージング細胞である 293LTV 細胞を 10 枚の 150 mm dish に  $1.25 \times 10^7$  cells/dish で播種した。翌日、添付マニュアルに従って遺伝子導入試薬である Fugene 6 (Promega 社) を用いて Packaging plasmid mix (Collecta, Inc.) と共に shRNA ライブラリーを co-transfection した。なお、shRNA ライブラリーには、Cell Surface, Extracellular, DNA Binding というキーワードに関連した計 4,922 遺伝子に対する 27,500 配列の shRNA ライブラリーである Decipher プール型レンチウイルス shRNA ライブラリー-Human Module 3 (Collecta, Inc.) を用いた。約 48 時間培養後、ウイルス含有培養上清を回収し、1,000 prm で 15 分遠心後、0.45 $\mu$ m フィルターで浮遊細胞等を除去し、レンチウイルスライブラリーのストックとして-80 $^{\circ}$ Cに保存した。その後、MOI が 1 以下になるようにウイルスストックを 12 倍希釈し、ポリブレン 10  $\mu$ g/mL の存在下、10%FBS/DMEM 中で培養した ZsG-N1-2/HLE-s1 に感染させた。その後、ピューロマイシン 1  $\mu$ g/mL 含有培地で数日間培養することで、ZsGreen1 と shRNA の共安定発現細胞集団を樹立した。その後、半数の細胞をペレットとして回収し、ソーティング前のサンプルとして-80 $^{\circ}$ C保存した。また、樹立した細胞集団に対して CEM 法を利用して 1  $\mu$ M の ZsGN1-120-BNA(15)を添加し、5 日後に BD FACSAria II (BD Biosciences) にて、ZsGreen1 の蛍光強度を保持している細胞集団をソーティングした。その後、細胞を拡大培養し、再度 CEM 法を利用した ZsGN1-120-BNA(15)の導入と FACS ソーティングを実施し、細胞を拡大培養後、ペレットを-80 $^{\circ}$ C保存した。一方、偶発的に ASO の導入効率が低かったために傾向が低下しなかった細胞や shRNA ライブラリーの感染によって非特異的に蛍光強度が増加した細胞のような偽陽性を差し引くために、ASO 未添加で培養した細胞集団についても同様の FACS ソーティングを 2 度実施し、細胞を拡大培養後、ペレットを-80 $^{\circ}$ C保存した。その後、これら 3 種類の凍結細胞ペレットからゲノム抽出後、次世代シーケンサーにて各 shRNA に特異的なバーコードを解析し、濃縮された細胞集団が保持する shRNA の配列を解析した。なお、ゲノム抽出から次世代シーケンサーを用いた配列解析については、Collecta 社にて実施した。

### siRNA による 2 次スクリーニング

Huh-7 細胞を 7,500cells/well で 96 ウェルプレートへ播種すると共に、20 nM で siRNA をリバース導入した。導入試薬には、Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコールに従って調製を行った。siRNA の導入 24 時間後、新鮮培地に交換し、さらに 24 時間後、500 ~1000 nM の ApoB-10177-BNA(13)と 9 mM の CaCl<sub>2</sub> を培地に添加した。その 24 時間後、SuperPrep<sup>®</sup> Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO) を用いて細胞を溶解し、cDNA への逆転写を行った。その後、Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用して、APOB mRNA の発現量を StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて

解析した。ヒト *APOB* の解析には hApoB-F: 5'-TTCTCAAGAGTTACAGCAGATCCA-3' と hApoB-R: 5'-TGGAAGTCCTTAAGAGCAACTAACA-3' を、ハウスキーピング遺伝子としてヒト *GAPDH* の解析には hGAPDH-F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' と hGAPDH-R: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、Ct 値の差を発現レベルの差に換算する  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>83)</sup>を用いて、相対発現量による KD 活性を算出した。また、同じ cDNA を用いて、同様に各標的遺伝子の発現量を解析した。ヒト *VPS26B* の解析には hVPS26B-F: 5'-CAGGGCATCAAGATCGAGTTCA-3' と hVPS26B-R: 5'-GGGACACAAACTCATGGTGGTTC-3' を、ヒト *BRF2* の解析には hBRF2-F: 5'-TGCTTGGCAGAACTGGTGAA-3' と hBRF2-R: 5'-ACGTATTTGGCTGGCACAGAA-3' のプライマーセットをそれぞれ使用し、相対発現量による KD 活性を算出した。

### 統計解析

解析結果の統計比較はスチューデントの t 検定またはテューキー検定を用いて行った。

### 第三章

#### オリゴ核酸

ApoB-ASO と Her3-ASO はそれぞれ既報の配列を参考にホスホロチオアート化され、2',4'-BNA/LNA で修飾されたものをジーンデザイン社で合成、精製した。また、XRN1 siRNA、XRN2 siRNA, RNase H1 siRNA、ApoB siRNA、ネガティブコントロール siRNA はいずれも Stealth RNAi siRNA として Invitrogen 社から入手した。利用した ASO、および siRNA の塩基配列を以下に示す。

ASO Name	Sequence
ApoB-ASO	5' -GCattggtatTCA-3'
Her3-ASO	5' -TAGcctgtcacttCTC-3'

Uppercase: 2',4'-BNA/LNA, Lowercase: DNA, All linkages are phosphorothioated.

siRNA Name	Sequence
RNase H1 siRNA	5' -GACCGGUUCCUGCUGCCAGAUUUA-3' 3' -CUGGCCAAAGGACGACGGUCUAAAU-5'
ApoB siRNA	5' -GGGACCACAGAUGUCUGCUUCAGUU-3' 3' -CCCUGGUGUCUACAGACGAAGUCA-5'
XRN1 siRNA	5' -UCUGGCUGAUC AAGCUGCAUGUUUAU-3' 3' -AGACCGACUAGUUCGACGUACAAUA-5'
XRN2 siRNA (si1)	5' -GAGAGGAGCAUUGAUGACUGGGUUU-3' 3' -CUCUCCUCGUAACUACUGACCCAAA-5'
XRN2 si2	5' -CAGAACACUGUAGUCAGUAUUAAAU-3' 3' -GUCUUGUGACAUCAGUCAUAAAUA-5'
XRN2 si3	5' -UCGCUAUUACAUCGUGAUCGUUUA-3' 3' -AGCGAUAAUGUAUCGACUAGCAAUA-5'

#### 細胞培養

ヒト肝細胞癌由来Huh-7細胞およびHepG2細胞はJCRB細胞バンク (独立行政法人 医薬基盤研究所) より入手したものをを使用した。いずれの細胞株も非動化した10%FBS (v/v) とペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL)、Fungizone® (0.25 µg/mL) を含むDMEM培地で、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで培養した。

#### オリゴ核酸の細胞導入

Huh-7 と HepG2 細胞は 96 ウェルプレートへ播種し、オリゴ核酸の導入を行った。Huh-7

細胞は7,500cells/well、HepG2細胞は15,000cells/wellで播種すると共に、Huh-7細胞は20 nM、HepG2細胞は40 nMでsiRNAをリバース導入した。導入試薬には、Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いて、添付のプロトコールに従って調製を行った。siRNAの導入24時間後、新鮮培地に交換し、さらに24時間後、100 nMのASOまたは、20 nMのsiRNAをフォワード導入した。導入試薬には、Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いて、添付のプロトコールに従って調製を行った。

## qRT-PCR

2回目のオリゴ核酸導入の24時間後、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (TaKaRa)で細胞を溶解し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa)とStepOneリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems)を使用してqRT-PCRによる標的RNAの定量を行った。標的RNAの発現量は、*GAPDH*に対するCt値の差を発現レベルの差に換算する $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>83)</sup>法を用いて、相対発現量を算出した。解析に用いたプライマーを以下に示す。

Target	Amplification Position	Forward Sequence Reverse Sequence
<i>RNASEH1</i>	Exon 3/4	5' -CGTGAGCCACTGGATGGAGA-3' 5' -CCATCAGTGTAGACGACGACGAA-3'
<i>XRN1</i>	Exon 37/38	5' -TGTTGGAATGCCACAACCTGA-3' 5' -TGGCACTGTGGCCCATGTA-3'
<i>XRN2</i>	Exon 9/10/11	5' -CCCAAACCATGTGGTCTTTGTAATC-3' 5' -TGGTAGGCTGGCCATTGTGA-3'
<i>APOB</i> pre-mRNA	Exon 28/Intron 28	5' -ATCTCCATCTGCGCTACCAGAA-3' 5' -GGCGTGTCACCTCATTAGGTGGTAT-3'
<i>APOB</i> mRNA	Exon 28/29	5' -AGGCACCGTGGGCATGGATATG-3' 5' -TTCCTCATCAGATTCCCGGACCCT-3'
<i>HER3</i> pre-mRNA	Intron 4/Exon 5	5' -CGGCCCTTAACCCGTGTCACT-3' 5' -TCCCTCACGATGTCCCTCCA-3'
<i>HER3</i> mRNA	Exon 5/6	5' -ATCGTGAGGGACCGAGATGC-3' 5' -CGCCCCCTTGCAAACCTCATG-3'
<i>GAPDH</i>	Exon 4/5	5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' 5' -TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'

## ウェスタンブロット

細胞溶解液は、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)を含むRIPAバッファー (Sigma)で調製した。BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific)を用いて添付のマニュアルに従って、タンパク濃度を算出した後、DTT含有サンプルバッファー (Thermo Scientific)を加えて、100°C、5分加熱処理した。6 µg分のタンパクを5-20%のポリアクリルアミドゲルにアプライし、SDS-PAGEにて分離後、PVDF膜にトランスファーした。その後、Blocking One (ナカライテスク)で室温1時間ブロッキングした後、マウス抗*XRN1*抗体 (1:100, Santa Cruz Biotechnology社)、または、ウサギ抗*XRN2*抗体 (1:1000, Cell Signaling

Technology 社)、または、ウサギ抗 RNase H1 抗体 (1:1000, ProteinTech 社) を含む 5%BSA 含有 TBS-T で 4°C、終夜 1 次抗体反応を行った。また、内在コントロールとして、マウス抗  $\beta$ -Actin 抗体 (1:1000, Sigma) を含む Blocking One で室温、1 時間反応させた。その後、TBS-T にて数回洗浄した後、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギまたはマウス IgG 抗体 (1:3000, GE Healthcare) で室温、1 時間反応させ、TBS-T にて数回洗浄した後、ECL Prime Kit (GE Healthcare) と ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にてタンパク発現量を解析した。

## 5'RACE

RNase H1 を介した切断により生成した標的 RNA の 3' 切断断片を同定するため、5'RACE を実施した。5'RACE は、添付のマニュアルに従って GeneRacer kit (Invitrogen) を使用した。具体的には、T4 リガーゼを用いて 3' 切断断片の 5' 末端に GeneRacer RNA オリゴを結合させた後 SuperScript III と ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。その後、5'RACE cDNA を増幅するため、1st PCR はタッチダウン PCR を行った。1st PCR は GeneRacer 5' プライマーと *APOB* pre-mRNA 特異的プライマー (5' -ACTGGGAGAATTCTATCCTAACCAGAT-3') を用いて、98°C、5 分熱変性させた後、72°C から 66°C まで各 3 サイクル、60°C で 20 サイクルのアニーリング反応を実施した。各アニーリング反応の後には、72°C、2 分のプライマー伸長反応と 98°C、10 秒の変性反応を行った。なお、最後のプライマー伸長反応は 72°C、7 分とした。続けて、2nd PCR は GeneRacer 5' nested プライマーと 2nd *APOB* pre-mRNA 特異的プライマー (5' -TCTAGGAGAGGAGGCAGGATATTTCT-3') を用いて、追加の 25 サイクルを実施した。2nd PCR で増幅した 5'RACE 産物は 1% アガロースゲル電気泳動後、EtBr 染色で可視化した。その後、増幅産物を切り出し、精製後、p-GEM T easy ベクター (Promega 社) にクローニングし、シーケンス解析を行った。

## 統計解析

解析結果の統計比較はスチューデントの t 検定またはテューキー検定を用いて行った。

## 謝 辞

本研究の遂行ならびに本稿の執筆にあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授に心より御礼を申し上げます。

本研究の遂行に際し、有益な御助言と御指導、ならびに、終始絶え間ない議論を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 山本 剛史 助教に深く感謝の意を表します。

本論文の審査をしていただきました大阪大学大学院薬学研究科 土井 健史 教授、ならびに、八木 清仁 教授に深く感謝いたします。

本研究にあたり、多大な御協力と御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 脇 玲子 研究員に深く感謝致します。

本研究の実験に際し、多大な御尽力を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 和田 俊輔 博士、和田 郁人 修士、野田 弥央 学士に深謝致します。

本研究を進めるにあたり、活発な議論を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学分野の皆様感謝致します。

最後に、常日頃より支えて頂きました妻と長女に心より感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 280-284.
- [2] Stephenson, M.L. and Zamecnik, P.C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 285-288.
- [3] Crooke, T.S. (2007) *Antisense Drug Technologies: Principles, Strategies, and Applications*. 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [4] Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J.C. and Broder, S. (1987) Phosphorothiate analogs of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 7706-7710.
- [5] Marwick, C. (1998) First “antisense” drug will treat CMV retinitis. *J. Am. Med. Assoc.*, **280**, 871.
- [6] Cummins, L.L., Owens, S.R., Risen, L.M., Lesnik, E.A., Freier, S.M., McGee, D., Guinosso, C.J. and Cook, P.D. (1995) Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2019-2024.
- [7] Teplova, M., Minasov, G., Tereshko, V., Inamati, G.B., Cook, P.D., Manoharan, M. and Egli, M. (1999) Crystal structure and improved antisense properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 535-539.
- [8] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T. and Imanishi, T. (1997) Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C-3'-endo sugar puckering. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735-8738.
- [9] Singh, S.K., Nielsen, P., Koshkin, A.A. and Wengel, J. (1998) LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.*, **4**, 455-456.
- [10] Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C. and Erdmann, V.A. (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1911-1918.
- [11] Frieden, M., Christensen, S.M., Mikkelsen, N.D., Rosenbohm, C., Thruue, C.A., Westergaard, M., Hansen, H.F., Ørum, H. and Koch, T. (2003) Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6365-6372.
- [12] Zhang, H., Cook, J., Nickel, J., Yu, R., Stecker, K., Myers, K. and Dean, N.M. (2000)

Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Biotech.*, **18**, 862-867.

- [13] Graham, M.J., Lemonidis, K.M., Whipple, C.P., Subramaniam, A., Monia, B.P., Crooke, S.T. and Crooke, R.M. (2007) Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.*, **48**, 763-767.
- [14] Gupta, N., Fisker, N., Asselin, M.C., Lindholm, M., Rosenbohm, C., Ørum, H., Elmén, J., Seidah, N.G. and Straarup, E.M. (2010) A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, **5**, e10682.
- [15] Straarup, E.M., Fisker, N., Hedtjärn, M., Lindholm, M.W., Rosenbohm, C., Aarup, V., Hansen, H.F., Ørum, H., Hansen, J.B. and Koch, T. (2010) Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potentially reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7100-7111.
- [16] Yamamoto, T., Harada-Shiba, M., Nakatani, M., Wada, S., Yasuhara, H., Narukawa, K., Sasaki, K., Shibata, M.A., Torigoe, H., Yamaoka, T., Imanishi, T. and Obika, S. (2012) Cholesterol-lowering action of BNA-based antisense oligonucleotides targeting PCSK9 in atherogenic diet-induced hypercholesterolemic mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **1**, e22.
- [17] Yamamoto, T., Nakatani, M., Narukawa, K. and Obika, S. (2011) Antisense drug discovery and development. *Future Med. Chem.*, **3**, 339-365.
- [18] Yu, R.Z., Kim, T., Hong, A., Watanabe, T.A., Gaus, H.J. and Geary R.S. (2007) Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metabol. Dis.*, **35**, 460-468
- [19] Kastelein, J.J., Wedel, M.K., Baker, B.F., Su, J., Bradley, J.D., Yu, R.Z., Chuang, E., Graham, M.J. and Crooke, R.M. (2006) Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*, **114**, 1729-1735.
- [20] Hovingh, K., Besseling, J. and Kastelein, J. (2013) Efficacy and safety of mipomersen sodium (Kynamro). *Expert Opin. Drug Saf.*, **12**, 569-579.
- [21] FDA Briefing Document, Mipomersen Sodium Injection 200 mg/mL (2012) NDA 203568
- [22] Zhang, Y., Qu, Z., Kim, S., Shi, V., Liao, B., Kraft, P., Bandaru, R., Wu, Y., Greenberger, L.M. and Horak, I.D. (2011) Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid

(LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection. *Gene Ther.*, **18**, 326-333.

- [23] Stein, C.A., Hansen, J.B., Lai, J., Wu, S., Voskresenskiy, A., Hog, A., Worm, J., Hedtjarn, M., Souleimanian, N., Miller, P. et al. (2010) Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e3.
- [24] Souleimanian, N., Deleavey, G.F., Soifer, H., Wang, S., Tiemann, K., Damha, M.J. and Stein, C.A. (2012) Antisense 2'-deoxy, 2'-fluoroarabino nucleic acids (2'-F-ANAs) oligonucleotides: in vitro gymnotic silencers of gene expression whose potency is enhanced by fatty acids. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **1**, e43.
- [25] Wu, H., Lima, W.F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H., and Crooke, S.T. (2004) Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J. Biol. Chem.*, **279**, 17181-17189.
- [26] Koller, E., Vincent, T.M., Chappell, A., De, S., Manoharan, M. and Bennett, C.F. (2011) Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 4795-4807.
- [27] Marcusson, E.G., Bhat, B., Manoharan, M., Bennett, C.F. and Dean, N.M. (1998) Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2016-2023.
- [28] Beltinger, C., Saragovi, H.U., Smith, R.M., LeSauter, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L. and Gewirtz, A.M. (1995) Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.*, **95**, 1814-1823.
- [29] Juliano, R.L., Ming, X. and Nakagawa, O. (2012) Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.*, **23**, 147-157.
- [30] Juliano, R.L., Carver, K., Cao, C. and Ming, X. (2013) Receptors, endocytosis, and trafficking: the biological basis of targeted delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *J. Drug Targ.*, **21**, 27-43.
- [31] Schmid, E.M. and McMahon, H.T. (2007) Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature*, **448**, 883-888.
- [32] Wieffer, M., Maritzen, T. and Haucke, V. (2009) SnapShot: endocytic trafficking. *Cell*, **137**, 382e381-e383.

- [33] Liang, X.H., Shen, W., Sun, H., Prakash, T.P. and Crooke, S.T. (2014) TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co-localize in oligonucleotide-induced nuclear bodies in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7819-7832.
- [34] Liang, X.H., Sun, H., Shen, W. and Crooke, S.T. (2015) Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2927-2945.
- [35] Suzuki, Y., Holmes, J.B., Cerritelli, S.M., Sakhujia, K., Minczuk, M., Holt, I.J. and Crouch, R.J. (2010) An upstream open reading frame and the context of the two AUG codons affect the abundance of mitochondrial and nuclear RNase H1. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 5123-5134.
- [36] Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- [37] Elmen, J., Lindow, M., Silaharoglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjarn, M., Hansen, J.B., Hansen, H.F., Straarup, E.M., McCullagh, K., Kearney, P. and Kauppinen, S. (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1153-1162.
- [38] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816-821.
- [39] Lima, W.F., Prakash, T.P., Murray, H.M., Kinberger, G.A., Li, W., Chappell, A.E., Li, C.S., Murray, S.F., Gaus, H., Seth, P.P. et al. (2012) Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell*, **150**, 883-894.
- [40] Obad, S., dos Santos, C.O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C.X., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E.M. et al. (2011) Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*, **43**, 371-378.
- [41] Nestle, F.O., Mitra, R.S., Bennett, C.F., Chan, H. and Nickoloff, B.J. (1994) Cationic lipid is not required for uptake and selective inhibitory activity of ICAM-1 phosphorothioate antisense oligonucleotides in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **103**, 569-575.
- [42] 第2章 血清P, Ca濃度の管理, 慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン. (2012) 透析会誌, **45**, 301-356.
- [43] Maeda, Y. and Shiigai, T. (2005) Blood ionized calcium fraction in various serum albumin

- levels surveyed in non-dialysis patients. *Jpn J. Nephrol.*, **47**, 821-827.
- [44] Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
- [45] Classic Protocol. (2005) Calcium phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells. *Nat. Methods*, **2**, 319-320.
- [46] Haberland, A., Knaus, T., Zaitsev, S.V., Stahn, R., Mistry, A.R., Coutelle, C., Haller, H. and Bottger, M. (1999) Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 21-30.
- [47] Haberland, A., Cartier, R., Heuer, D., Zaitsev, S., Paulke, B.R., Schafer-Korting, M. and Bottger, M. (2005) Structural aspects of histone H1-DNA complexes and their relation to transfection efficiency. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **42**, 107-117.
- [48] Shiraiishi, T., Pankratova, S. and Nielsen, P.E. (2005) Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. *Chem. Biol.*, **12**, 923-929.
- [49] Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. and Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotech.*, **17**, 969-73.
- [50] Ikeguchi, M., Liu, J. and Kaibara, N. (2002) Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis*, **7**, 23-29.
- [51] Lamers, F., van der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M.E., Koster, J., Hansen, B.R., Koch, T., Versteeg, R., Caron, H.N. and Molenaar, J.J. (2011) Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr. Relat. Cancer*, **18**, 657-668.
- [52] Stanton, R., Sciabola, S., Salatto, C., Weng, Y., Moshinsky, D., Little, J., Walters, E., Kreeger, J., DiMattia, D., Chen, T. et al. (2012) Chemical modification study of antisense gapmers. *Nucleic Acid Ther.*, **22**, 344-359.
- [53] Neufeld, D.S. (1997) Isolation of rat liver hepatocytes. *Methods Mol. Biol.*, **75**, 145-151.
- [54] Yu, R.Z., Geary, R.S., Leeds, J.M., Watanabe, T., Moore, M., Fitchett, J., Matson, J., Burckin, T., Templin, M.V. and Levin, A.A. (2001) Comparison of pharmacokinetics and tissue disposition of an antisense phosphorothioate oligonucleotide targeting human Ha-ras mRNA in mouse and monkey. *J. Pharm. Sci.*, **90**, 182-193.

- [55] Lendvai, G., Velikyan, I., Estrada, S., Eriksson, B., Langstrom, B. and Bergstrom, M. (2008) Biodistribution of <sup>68</sup>Ga-labeled LNA-DNA mixmer antisense oligonucleotides for rat chromogranin-A. *Oligonucleotides*, **18**, 33-49.
- [56] Yu, R.Z., Geary, R.S., Monteith, D.K., Matson, J., Truong, L., Fitchett, J. and Levin, A.A. (2004) Tissue disposition of 2'-O-(2-methoxy) ethyl modified antisense oligonucleotides in monkeys. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 48-59.
- [57] Kuboyama, T., Nakahara, M., Yoshino, M., Cui, Y.L., Sako, T., Wada, Y., Imanishi, T., Obika, S., Watanabe, Y., Suzuki, M. et al. (2011) Stoichiometry-focused F-18-labeling of alkyne-substituted oligodeoxynucleotides using azido([F-18]fluoromethyl)benzenes by Cu-catalyzed Huisgen reaction. *Bioorgan. Med. Chem.*, **19**, 249-255.
- [58] Bijsterbosch, M.K., Manoharan, M., Rump, E.T., De Vreeh, R.L., van Veghel, R., Tivel, K.L., Biessen, E.A., Bennett, C.F., Cook, P.D. and van Berkel, T.J. (1997) In vivo fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3290-3296.
- [59] Kandori, K., Kuroda, T., Togashi, S. and Katayama, E. (2011) Preparation of calcium hydroxyapatite nanoparticles using microreactor and their characteristics of protein adsorption. *J. Phys. Chem. B.*, **115**, 653-659.
- [60] Stein, C.A. and Cheng, Y.C. (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science*, **261**, 1004-1012.
- [61] Stein, C.A. (1995) Does antisense exist? *Nat. Med.*, **1**, 1119-1121.
- [62] Shoeman, R.L., Hartig, R., Huang, Y., Grüb, S. and Traub, P. (1997) Fluorescence microscopic comparison of the binding of phosphodiester and phosphorothioate (antisense) oligodeoxyribonucleotides to subcellular structures, including intermediate filaments, the endoplasmic reticulum, and the nuclear interior. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7**, 291-308.
- [63] Zammarchi, F., de Stanchina, E., Bournazou, E., Supakorndej, T., Martires, K., Riedel, E., Corben, A.D., Bromberg, J.F. and Cartegni, L. (2011) Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 17779-17784.
- [64] Collecta社HP  
<https://www.collecta.com/products-services/collecta-pooled-lentiviral-libraries/decipher-shrna-libraries/>
- [65] Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C. and Becker, S.

- (2009) Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J. Virol.*, **83**, 2327-2337.
- [66] Bonifacino, J.S. and Hurley, J.H. (2008) Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 427-436.
- [67] Ming, X., Carver, K., Fisher, M., Noel, R., Cintrat, J.C., Gillet, D., Barbier, J., Cao, C., Bauman, J. and Juliano, R.L. (2013) The small molecule Retro-1 enhances the pharmacological actions of antisense and splice switching oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3673-3687.
- [68] Cabart, P. and Murphy, S. (2001) BRFU, a TFIIB-like factor, is directly recruited to the TATA-box of polymerase III small nuclear RNA gene promoters through its interaction with TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43056-43064.
- [69] Geary, R.S., Wancewicz, E., Matson, J., Pearce, M., Siwkowski, A., Swayze, E. and Bennett, F. (2009) Effect of dose and plasma concentration on liver uptake and pharmacologic activity of a 2'-methoxyethyl modified chimeric antisense oligonucleotide targeting PTEN. *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 284-291.
- [70] Brown, D.A., Kang, S.H., Gryaznov, S.M., DeDionisio, L., Heidenreich, O., Sullivan, S., Xu, X. and Nerenberg, M.I. (1994) Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26801-26805.
- [71] Walder, R.Y. and Walder, J.A. (1988) Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 5011-5015.
- [72] Nagarajan, V.K., Jones, C.I., Newbury, S.F. and Green, P.J. (2013) XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 590-603.
- [73] Orban, T.I. and Izaurralde, E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, **11**, 459-469.
- [74] Miki, T.S. and Grosshans, H. (2013) The multifunctional RNase XRN2. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 825-830.
- [75] Vickers, T.A. and Crooke, S.T. (2014) Antisense oligonucleotides capable of promoting specific target mRNA reduction via competing RNase H1-dependent and independent mechanisms. *PLoS One*, **9**, e108625.
- [76] Wu, H., Lima, W.F. and Crooke, S.T. (1999) Properties of cloned and expressed human RNase H1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28270-28278.

- [77] Wu, H., Lima, W.F. and Crooke, S.T. (2001) Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23547-23553.
- [78] Lima, W.F., Wu, H., Nichols, J.G., Prakash, T.P., Ravikumar, V. and Crooke, S.T. (2003) Human RNase H1 uses one tryptophan and two lysines to position the enzyme at the 3'-DNA/5'-RNA terminus of the heteroduplex substrate. *J. Biol. Chem.*, **278**, 49860-49867.
- [79] Pramono, Z.A., Takeshima, Y., Alimsardjono, H., Ishii, A., Takeda, S. and Matsuo, M. (1996) Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 445-449.
- [80] Ward, A.J., Norrbom, M., Chun, S., Bennett, C.F. and Rigo, F. (2014) Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5871-5879.
- [81] Castanotto, D., Lin, M., Kowolik, C., Wang, L., Ren, X.Q., Soifer, H.S., Koch, T., Hansen, B.R., Oerum, H., Armstrong, B. et al. (2015) A cytoplasmic pathway for gapmer antisense oligonucleotide-mediated gene silencing in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9350-9361.
- [82] Raijmakers, R., Schilders, G. and Pruijn, G.J. (2004) The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 175-183.
- [83] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods*, **25**, 402-408.