

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21591572

研究課題名（和文） 放射性同位体標識 siRNA を用いた生体内遺伝子発現イメージングに関する研究

研究課題名（英文） Study on gene expression imaging in the living body using radioilabelled siRNA

研究代表者

中神 佳宏（NAKAGAMI YOSHIHIRO）

横浜市立大学 医学研究科 客員研究員

研究者番号：80347301

研究成果の概要（和文）：培養細胞を用いた実験において、<sup>99m</sup>Tc標識siRNAが遺伝子特異的にmRNAに結合していることが証明された。また、PET製剤用のプローブの改良を試みたところ、<sup>68</sup>GaによるsiRNAの標識条件の最適化に成功した。更に、<sup>62</sup>Cuによる siRNAの標識にも成功した。興味深いことにこの標識siRNAは生体内での安定性をも獲得することができた。しかしながら、動物実験では、その標識siRNAの腫瘍に対する集積は、期待されたよりは低いものであった。

研究成果の概要（英文）：In the experiment using a cultured cell, it was proved that the <sup>99m</sup>Tc-labelled siRNA has combined with the specific mRNA about the gene target. Moreover, when improvement of new probe for a PET was tried, we succeeded in optimization of the <sup>68</sup>Ga-labelled conditions of siRNA. Furthermore, we succeeded also in labelling siRNA by <sup>62</sup>Cu. Interestingly, This radiolabelled siRNA was also able to acquire stability in vivo. However, in the animal experiment, the accumulation to the tumor of the radiolabelled siRNA was low.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：siRNA、PET

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析研究の結果、多くの病気と遺伝子との関連性が明らかになり、遺伝子を標的とした新しい治療および診断手法の開発が行われている。個体における遺伝子発現を非侵襲的にリアルタイムで画像診断することができれば、病気の分子診断法としても、あるいは治療効果の確認法としても、従来にない画期的なツールになるものと期待される。これまでの遺伝子発現イメージングは、(1)

核酸を標的とする方法、および(2)生産されるたんぱく質を標的とする方法、の2つのアプローチが行われてきた。たんぱく質を標的とする場合には従来の低分子放射性リガンドを用いる分子イメージング手法が利用できる利点があり、導入した遺伝子の発現評価法としての発展可能性がある。一方、核酸を標的とする手法は、おもにアンチセンス原理に基づいて mRNA 転写量の診断が検討され、遺伝子発現を直接観測できる点や、原理的に

は1塩基変異のようなわずかな違いも区別できるなどの利点がある。

標識アンチセンスによる癌遺伝子イメージングに関する最初の例が報告されてから15年が経過するが、これまでのところ大きな進展が得られていない。これは、アンチセンスイメージング剤が本質的にもっている諸問題が克服できなかったことが原因と考えられる(①標的 mRNA の分子数の少なさ、②ハイブリダイゼーションの速度、信頼性、③薬物動態学的問題点(体内での不安定性など)、④標的細胞への輸送の問題、⑤短寿命核種を用いた標識合成、⑥特異-非特異結合の区別化)。しかしながら、現在、様々な角度から検討が行われており、課題解決のための糸口が見えつつある。例えば、高比放射能の核種によるアンチセンス分子の効率的合成によって検出感度を向上させ、標的 mRNA 分子数が少ない問題の克服が検討されている。また、輸送と薬物動態学的な問題の解決のためにナノテクノロジーや膜透過性ペプチドなどを用いた新しい送達システムが盛んに検討されている。

一方、分子生物学の分野では、RNAi 現象がホットなテーマとなっており、現在遺伝子ノックダウンを生じさせるツールとして siRNA (二重らせんの小 RNA) が多用されている。また、siRNA を新たな臨床薬として応用しようとする試みが始まっており、ターゲット臓器に siRNA が到達しているか確認する手段の必要性が叫ばれている。

しかしながら、siRNA は非常に不安定な物質であり、強い条件下で標識等をするとその機能を失う可能性がある。我々は、1本鎖RNAにATPを器質としてA(アデニン)を付加重合させていく酵素である、Poly(A) Polymeraseに着目した。これは従来から<sup>32</sup>P-ATP を用いて1本鎖RNAを標識するツールとして用いられている。しかし、この酵素がsiRNAのような2本鎖RNAに作用するかどうかは疑わしかったが、我々は、<sup>32</sup>P-ATPを用いた予備実験で、siRNAが<sup>32</sup>P標識されることを見出した。また標識によりsiRNAの機能が失われないことも確認した。但し、<sup>32</sup>Pはイメージングに不向きであるため、イメージングに適した核種によるsiRNAの標識法を模索し始めた。

## 2. 研究の目的

まず、この標識 siRNA がどのように遺伝子発現特異的に集積するのかそのメカニズムを解明する。今までの培養細胞を用いた実験等によると、RISC 複合体 (siRNA が細胞内で種々のタンパクと結合して生ずる複合体) を形成する時点 (インキュベート後 30 分程度) で集積がピークとなることから、標識 siRNA と RISC 複合体との結合体は通常の siRNA の場合より安定であることが予想され、その精製を試みる。

また、様々な遺伝子に対し本当に遺伝子特異的にハイブリダイズするのかを確かめる。特に発癌遺伝子とのハイブリダイズは臨床応用する上で特に重要と思われ確認する。

当研究室では、<sup>68</sup>Ga (陽電子放出核種) での siRNA の標識も成功している。これは PET 製剤としての可能性を秘めており、SPECT 製剤とのイメージングの比較検討を行う。

更には、この標識 siRNA が、担癌動物 (マウスなど) の癌に対し、癌特異的に発現している遺伝子に対しイメージングが出来るかどうか、検証する。

現在までに<sup>99m</sup>Tcで標識したアンチセンスオリゴを用いた遺伝子イメージングの報告はあるが、いずれもDNAを用いるものであり、細胞内の安定性はあるものの、毒性等の問題が常に議論されてきた。また、思ったよりハイブリダイズ効率が悪く、また、最適なハイブリダイズ効率を呈するシーケンスを予測する手段がまだ確率されていない。一方、siRNAを応用した遺伝子イメージングに関する報告は国内外でわずかに散見されるのみである。siRNAの機能は生理的なメカニズムによるものであり、その点からもアンチセンス法よりは毒性が低く臨床応用に向いている。特にこの点は画像診断検査薬として最適である。あとは適切な修飾や適切なドラッグデリバリーシステムを確立することにより、不安定さを克服すれば良いと思われる。現在、当研究室では、siRNAの体内安定化のため市販のトランスフェクション試薬を用いているが、その一方アテロコラーゲン (高研社製) を用いて、siRNAを血清入り液体培地中で安定化させるのに成功している。この手法はin vivoでも応用できるし、安全性も高い。また、前述のように当教室では<sup>68</sup>Ga (陽電子放出核種) での標識にも成功しており、PET画像による遺伝子発現イメージングも可能である。

よって、本研究により、固体における非侵襲的な遺伝子発現イメージングが可能になり、遺伝子画像診断や遺伝子治療の効果判定など新しい分子イメージング分野が確立されることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 放射線同位体標識 siRNA がどのように遺伝子発現特異的に集積するのかそのメカニズムを分子生物学的手法を用いて解明する。また、様々な遺伝子 (特に発癌遺伝子) に対し本当に遺伝子特異的にハイブリダイズするのかを確かめる。

(2) <sup>68</sup>Ga (陽電子放出核種) ジェネレーターの改良、及び<sup>68</sup>Ga 標識 siRNA の標識法の改良をし、PET 製剤としての実用化及び PET カメラによる画像化を行い SPECT 製剤とのイメージングの比較検討を行う。また、放射線同位体標識 siRNA のドラッグデリバリーシステ

ムの改良を行い、生体内における安定性と安全性の向上を目指す。

(3) 前記標識 siRNA が、担癌動物（マウスなど）の癌に対し、癌特異的に発現している遺伝子に対しイメージングが出来るかどうか検証する。

#### 4. 研究成果

(1) siRNA を応用した遺伝子発現イメージングに関し、*in vitro* の条件における基礎的データを解析した。

まず、293T細胞を液体培地上で培養後、それぞれの細胞群の対数増殖期にLacZ遺伝子を強制発現させるベクターを用いてLacZ遺伝子を過剰発現する293T細胞を作成した。対照群として、そのベクターを用いていない細胞系列を用いた。一方、LacZ遺伝子を特異的にノックダウンするように設計したsiRNA合成を業者に委託しそのsiRNAに対し<sup>99m</sup>Tcを標識した。標識方法は当教室で開発した手法（poly-A-polymelaseを用いる方法）を用いることによりsiRNAの3'末端のみに特異的に標識した。そして、LacZ遺伝子高発現細胞群と低発現細胞群のそれぞれに等量の標識siRNAを加え一定時間（30分～6時間）37℃、5%CO<sub>2</sub>中でインキュベートした。

そして、それぞれの細胞群から培地を取り除き、PBSで3回wash、細胞溶解バッファを用いてwhole cell lysateを取り出し放射能カウントを測定した。またそれぞれの総タンパク濃度をBCA法により測定し、単位タンパク量（細胞数に比例）当りのカウントに換算し放射能を比較した。すると、LacZ遺伝子高発現細胞群の方が低発現細胞群に比べ放射能が高かった。この結果は、遺伝子特異的に<sup>99m</sup>Tc標識siRNAが結合していることを示唆している。

(2) 次に、PET製剤用のプローブの改良を試み、また、*in vivo* の条件におけるプローブの安定性と安全性の向上を目指した。

PET製剤として、我々は既に<sup>68</sup>GaによるsiRNAの標識には成功しているが、その標識率は70%程と<sup>99m</sup>Tcに比べて低い。その理由として、<sup>68</sup>Gaでは核種の抽出に塩酸を用いるため強酸性となりsiRNAのような生理的活性物質の標識には不向きであること、また、DTPAの<sup>68</sup>Gaとの親和性が<sup>99m</sup>Tcに比べて弱いこと、そして、<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Gaジェネレーターの減衰により<sup>68</sup>Gaの濃度が低下し他の陽イオンが夾雑することによるものと考えられる。よって現状では標識後、siRNA精製キットにより精製するというステップが必要でありかなり煩雑であるし、また、<sup>68</sup>Gaの半減期は68分と短く標識後のステップは出来る限り少ない方が望ましい。まず、我々は、<sup>68</sup>Ga標識時の強酸性条件を緩和するため、様々なバッファを用いてpH調整を試み、標識率の改善を目指した。その結果、バッファではAcetate

buffer (0.1N, pH7.5) が最適であること、また、<sup>68</sup>Ga抽出液とAcetate buffer (0.1N, pH7.5) 及び標識siRNA溶液とを全てほぼ同時に混和することにより標識率が向上することが判明した。

また、放射線同位体標識 siRNA の *in vivo* ドラッグデリバリーシステムとして、当初アテロコラーゲン法を想定していたが、マウス生体内で血栓が生じるなどの重篤な副作用が生じたためアテロコラーゲン法は不向きであると思われた。

(3) 更にPET製剤用のプローブの改良を試み、また、*in vivo* におけるプローブの安定性と安全性の向上を目指し、動物実験を施行した。

前述のようにPET製剤として、我々は既に<sup>68</sup>GaによるsiRNAの標識には成功しているが、その標識率は70%程と低い。よって、今回は陽電子放出核種として<sup>68</sup>Gaに代わり<sup>62</sup>Cu（放射線医学総合研究所の厚意により）を用いてsiRNAの標識を試みたところ、その標識率はほぼ100%となり標識後の精製も特に必要としなかった。更に興味深いことには、そのメカニズムは不明であるが、標識後にこのsiRNAはRNaseに対し抵抗性を示し、生体内での安定性を獲得した。よって、特にトランスフェクション試薬を用いることなくマウスに標識siRNAを投与することが可能となり、そのため、各種トランスフェクション試薬に伴う毒性を回避することも可能となった。

次に、HER2遺伝子をノックダウンするように設計したsiRNAに<sup>62</sup>Cuを標識した。HER2高発現のヒト乳癌MCF7-HER2を移植したヌードマウスにこの標識siRNAを尾静脈より静注し、一定時間の後、そのヌードマウスを解剖、各臓器や腫瘍ごとに放射能カウントと重量を測定し、標識siRNAの放射能体内分布を測定したところ、腫瘍に対するsiRNAの放射能カウントはバックグラウンドよりは高いものの、期待されたよりは低いものであった。その原因としてsiRNAのHER2ノックダウン効率が低いことが考えられ、現在siRNAを再設計し同様の実験を計画しているところである。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① Nakagami Y, Inoue T. Quantitative Measurement of GFR by the Gamma Camera Method. *Nephrology Frontier* 査読無 9巻、2010、36-40
- ② Kan Y, Nakagami Y. Proliferation of human lung cancer in an orthotopic transplantation mouse model. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*

査読有 1 卷、2010、471-475

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Yoshihiro Nakagami Posttreatment assessment of response using FDG-PET/CT for patients treated with proton therapy for head and neck melanoma. EANM 2011 October 15-19, 2011 Birmingham, UK
- ② 中神佳宏. 放射性同位体標識 siRNA の生体内安定性に関する検討. 第 50 回日本核医学会学術総会、2010 年 11 月 11 日、埼玉県さいたま市
- ③ 中神佳宏. 放射性同位体標識 siRNA による遺伝子発現イメージングの検討. 第 49 回日本核医学会学術総会、2009 年 10 月 1 日～3 日、北海道旭川市
- ④ Yoshihiro Nakagami. Radiolabeling small interfering RNA with gallium -67 or 68 might become a new method of gene imaging. SNM 2009 Annual Meeting June 13-17, 2009 Toronto, Canada
- ⑤ 中神佳宏. 分子イメージングと医薬品開発. 千葉大学薬学研究院分子イメージング研究シンポジウム、2009 年 5 月 1 日、千葉大学けやき会館 1 階大ホール

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中神 佳宏 (NAKAGAMI YOSHIHIRO)  
横浜市立大学 医学研究科 客員研究員  
研究者番号：8 0 3 4 7 3 0 1

### (2) 研究分担者

井上 登美夫 (INOUE TOMIO)  
横浜市立大学 医学研究科 教授  
研究者番号：8 0 1 3 4 2 9 5  
大村 素子 (OMURA MOTOKO)  
横浜市立大学 医学研究科 客員准教授  
研究者番号：7 0 2 4 4 5 0 6