

『活用方法』がよくわかる!

Dharmacon導入事例集

CRISPR-Cas9ゲノム編集 / siRNA / RNAi ライブラリー



Contents

CRISPR-Cas9ゲノム編集

お客様の声	簡単に遺伝子ノックアウトできるツール! ……………	3
お客様の声	細胞が死なないguide RNAのクオリティを求めて ……………	4
製品情報	免疫反応誘導性や細胞毒性の低いEdit-R Predesigned crRNA ……………	5
製品情報	Cas9ヌクレアーゼ発現用レンチウイルスなら、構成的発現と誘導的発現から選択可能 ……………	6
製品情報	Edit-R Pooled Lentiviral sgRNA Libraryが、網羅的な遺伝子ノックアウトスクリーニングを実現 ……………	7

siRNA

お客様の声	トランスフェクション試薬を使わないsiRNAだからこそできた遺伝子ノックダウン後の薬剤処理実験……………	8
ワークフロー	Accell テクノロジー：トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入……………	10
アプリケーションノート	トランスフェクション試薬でのsiRNA導入が難しい神経細胞におけるRNAi実験 ……………	11
アプリケーションノート	Accell siRNAを用いた小脳スライス培養におけるRNAi実験 ……………	18
アプリケーションノート	Accell siRNAを用いた長期遺伝子サイレンシング実験……………	21
文献情報	Accell siRNA文献情報 ……………	25
お客様の声	まさか、こんな簡単に <i>in vivo</i> でsiRNAを神経細胞へ導入できるとは!……………	30
文献情報	Dharmacon siRNA <i>in vivo</i> 使用事例の文献情報 ……………	32
お客様の声	siRNA実験で、オフターゲット効果がほとんどなくなり、フェノタイプもはっきり出るように ……………	33
製品情報	ON-TARGET ^{plus} siRNAがオフターゲット効果の低減を実現 ……………	34

RNAi ライブラリー

お客様の声	SMARTpoolとCherry-pickライブラリーの組合せは標的遺伝子スクリーニングのファーストチョイスにおすすめ……………	35
製品情報	デザイン済みsiRNA製品フォーマット……………	36
文献情報	Dharmacon siRNAライブラリー文献情報……………	37
文献情報	Dharmacon microRNAライブラリー文献情報……………	41

製品検索・注文のご案内……………	43
------------------	----



簡単に遺伝子ノックアウトできるツール!

荻原 秀明 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ ゲノム生物学研究分野

遺伝子変異に基づく合成致死性を利用したがん治療法の開発を行っている荻原先生にDharmaconのゲノム編集 Edit-R CRISPR-Cas9プラットフォームを導入いただいた理由をお伺いしました。最大の理由はその簡便さ。どのあたりが簡便なのか、についても伺いました。

ターゲットごとに ベクターを作る必要なし!

がん細胞において、変異頻度の高い遺伝子に着目し、合成致死遺伝子の探索をするという仕事をしています。そこで、変異頻度の高い遺伝子を人工的にノックアウトして、スクリーニングをかけることにしました。そこで、今回はじめてゲノム編集の技術を採用することとなりました。製品選定の際、他社のゲノム編集製品では、一つ一つベクターを、ターゲットごとに作らなければいけないところが、価格面でも、作業量の上でもネックになっていました。その矢先にDharmaconの営業担当者よりDharmaconのゲノム編集製品の紹介がタイムリーにありました。DharmaconのEdit-R CRISPR-Cas9プラットフォームは、ガイドRNA発現ベクターをクローニングする必要がありません。すぐにトランスフェクション可能なDNAおよびRNAコンポーネントが含まれており、トランスフェクション操作だけでノックアウトできるところがポイントとのことでした。他社と比較すると価格もリーズナブルであるということ、Webで簡単に設計できると聞き、魅力的な製品であると感じ、採用しました。

おかげで、紹介いただいてから1ヶ月もしないうちに実験に入ることができました。また、実験をすすめるうち、Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease Particles **→P.6** を使い、Cas9をステイブルに発現させたほうが、ゲノム編集効率が高いという傾向にあることが分かってきました。



写真は荻原様(左から2番目)

引き続き、作成したノックアウト細胞を利用し実験を進めているところです。

荻原先生、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客様の使用経験に基づく記載です。

参考文献

Ogiwara H, *et al.* Targeting p300 addiction in CBP-deficient cancers causes synthetic lethality via apoptotic cell death due to abrogation of MYC expression. *CANCER DISCOVERY*: 2016 Apr;6(4):430-45. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0754. Epub 2015 Nov 24

国立がん研究センター研究所
分子診断・個別化医療開発グループ ゲノム生物学研究分野のHPはこちら

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/genome_biology/index.html



細胞が死なないguide RNAのクオリティを求めて

服部 奈緒子 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ エピゲノム解析分野

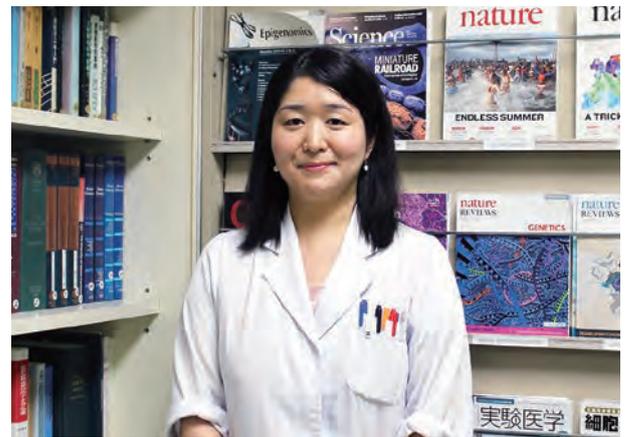
服部先生は、がんの発生や予防、治療に関する研究を、エピジェネティクスの観点から進められていらっしゃいます。短期間の薬剤処理実験にはAccell siRNAによるノックダウンが有効な手段であるものの（詳しくは本誌
→P.8~P.9 掲載 お客様の声「トランスフェクション試薬を使わないsiRNAだからこそできた遺伝子ノックダウン後の薬剤処理実験」参照）、薬剤処理が長期間におよぶ実験にはCRISPR-Cas9によるノックアウト法が適切と考えた服部先生は、ゲノム編集実験にも取り組まれてこられました。そこで、これまでの経験から大事と考えるポイントや、探し求めていたInducibleタイプ（Tet-On発現誘導タイプ）レンチウイルスCas9ヌクレアーゼのメリットについて服部先生に伺いました。

大事なポイントその①

guide RNAのクオリティ

当時実施していたゲノム編集実験では、オリゴヌクレオチドから *in vitro* 転写でguide RNA（以下gRNA）を作り、精製カラムを通し、トランスフェクションしていました。最初に使用した細胞株では問題は生じなかったのですが、その後の実験で使用した細胞株が、gRNAのトランスフェクションのみで死んでしまいました。精製カラムで取り除ききれない夾雑物が原因と分かり、手法を変える必要に迫られました。

“細胞を死なせない”gRNAのクオリティはDharmacon Edit-R CRISPR Cas9のシステムを導入することでクリアしました。化学合成のため、細胞の生育を阻害するような夾雑物が少ないですし、何よりcrRNAとtracrRNAを混ぜるだけで実験できるので簡便です。



大事なポイントその②

gRNA配列デザインのアルゴリズム

ターゲット遺伝子に対するgRNAの配列デザインに取り組んだ際、デザインしたどの配列もオフターゲット効果が出てしまう可能性が高く、困っていました。「この遺伝子に対するgRNA設計は無理なのかな」と思いながらも、ゲノム編集に詳しい方に相談したところ、その先生が独自に開発したアルゴリズムでは配列設計ができました。また、Dharmaconのアルゴリズムでも適切な設計ができていました。つまり、失敗要因は遺伝子にあった訳ではなく、配列設計のアルゴリズムにあったのです。今後さまざまな遺伝子に対するゲノム編集実験が増えてくることを考えると、一つ一つ自分たちで配列を設計することは難しく、デザイン済みのgRNAを購入できることが望ましいと考えています。どんなgRNA配列デザインのアルゴリズムを持っているか、はメーカーを選ぶポイントの一つです。「信頼のDharmacon」ということですかね（笑）。

大事なポイントその③

Cas9発現システムの選択

(ポイント①で指摘された) gRNAのクオリティにそれまでの系の限界を感じていたのと同時に、Cas9の発現系についても、より適したシステムにしたいと思っていました。それまでは、Cas9 mRNAを細胞に導入して発現させていたのですが、条件検討を繰り返すと予想以上にコストがかかってしまうので、各種細胞株でCas9定常発現株を作っておいた方がよいかも、と考えていました。さらに先日、学会でTet-OnタイプのCas9ベクターを作った人がいたのです。これが欲しい!と思っていた矢先、Dharmaconの営業担当者から、「先生出ました!」と紹介されたのがEdit-R Inducible Lentiviral hEF1 α -Blast-Cas9 Nuclease Particle **→P.6** でした。現在、この製品を使って細胞株を作っている最中です。

Inducibleタイプ (Tet-On発現誘導タイプ) のCas9を使うメリットは、“任意の時期までゲノム編集を起こさせない”、

ということです。たとえば細胞増殖の調節に関わる遺伝子をゲノム編集でノックアウトする場合、ゲノム編集された細胞が増えなくなり、様々なアッセイのために必要な細胞数まで増幅している過程で淘汰されてしまうリスクがあります。InducibleタイプのCas9であれば、アッセイに必要な細胞数まで増やしてからTet-Onでゲノム編集を起こさせ、その遺伝子の機能を解析することができます。Inducibleタイプ (Tet-On発現誘導タイプ) レンチウイルスCas9ヌクレアーゼを探し求めた理由はここにあります。

服部先生、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客さまの使用経験に基づく記載です。

国立がん研究センター研究所
分子診断・個別化医療開発グループ エピゲノム解析分野のHPはこちら

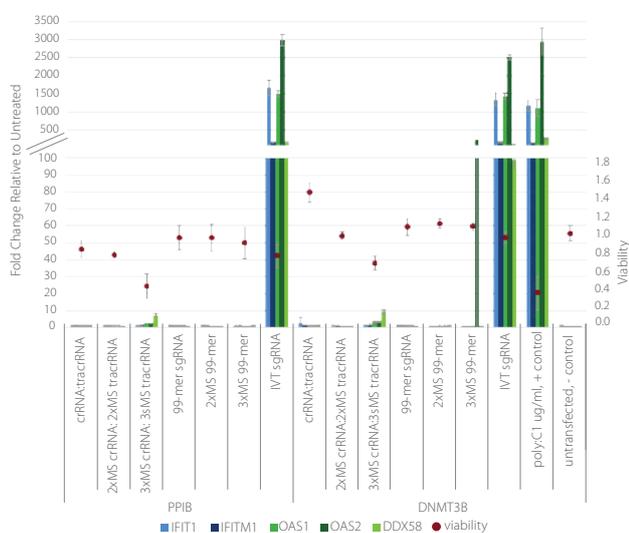
<https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/epigenomics/index.html>

製品情報



免疫反応誘導性や細胞毒性の低いEdit-R Predesigned crRNA

Edit-R Predesigned crRNAは化学合成のため夾雑物の心配がなく、免疫反応誘導や細胞毒性を抑えます



MS=2'-O-methyl nucleotides and phosphorothioate backbone linkages.

安定的にCas9ヌクレアーゼを発現しているHEK293T細胞に、PPIBまたはDNMT3Bを標的とするguide RNAをトランスフェクションしました。未変更のEdit-R製品 (crRNA : tracrRNA) と、分解に耐性をもつよう変更したguide RNA (2xMS crRNA : 2xMS tracrRNA) の両方で細胞生存率に変化はなく、免疫反応の誘導もみられませんでした。3xMS変更crRNA : tracrRNA試薬には細胞毒性がみられました。レサズリン代謝アッセイで細胞生存率 (赤いドット) を評価し、5つの免疫応答遺伝子の発現レベルについてqRT-PCRで定量しました。

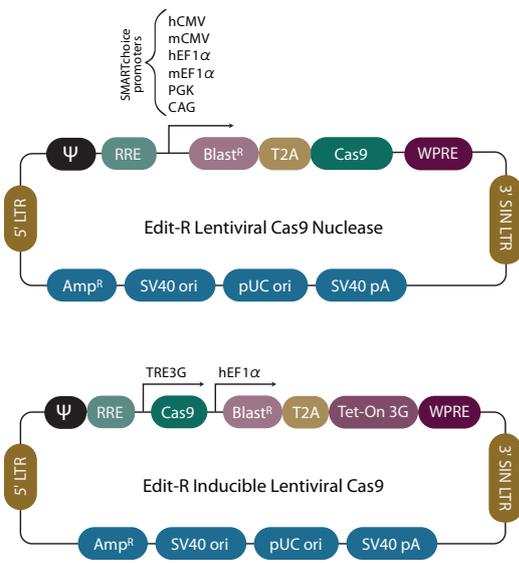
上記より、化学合成のEdit-R Predesigned crRNAは、*in vitro* 転写で調製したguide RNAと比較して免疫反応誘導や細胞毒性が低く抑えられていることがわかります。

製品情報



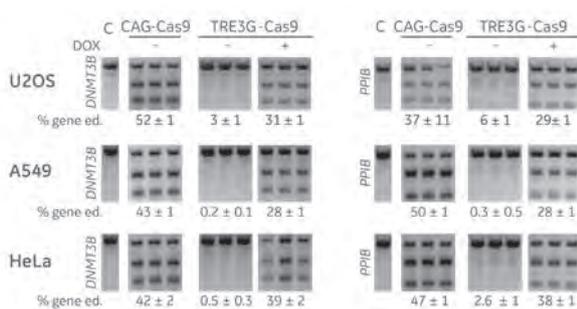
Cas9ヌクレアーゼ発現用レンチウイルスなら、 構成的発現と誘導的発現から選択可能

Edit-R Lentiviral Cas9 Nucleaseは、Cas9ヌクレアーゼを定常的に発現するプロモーターを、使用する細胞に合わせて6種類から選択可能です。Edit-R Inducible Lentiviral Cas9は、テトラサイクリン誘導系であるTet-On 3Gシステムを採用しており、より厳密に制御された誘導的ゲノム編集が可能です。いずれの製品も、初代培養細胞や神経細胞といったトランスフェクションの困難な細胞を用いてゲノム編集を行う場合に最適です。



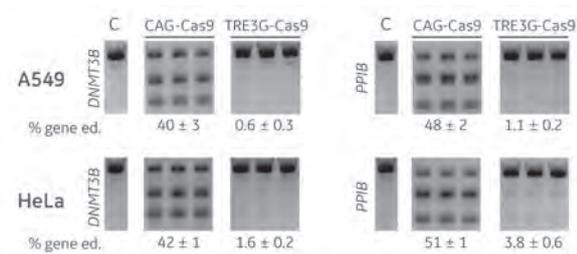
ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
hCMV	Human cytomegalovirus immediate early promoter
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
PGK	Mouse phosphoglycerate kinase promoter
CAG	Human cytomegalovirus, chicken β-actin hybrid promoter
TRE3G	Dexycycling inducible promoter
Blast ^R	Blasticidin耐性遺伝子 (遺伝子形質導入細胞の選択マーカー)
T2A	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。mKate2/Puromycin耐性遺伝子産物およびCas9ヌクレアーゼタンパク質の同時発現を実現)
Tet-On 3G	Doxycyclineによって制御されるアクチベータータンパク質 (Doxycycline存在下でTRE3Gプロモーターに結合)
Cas9	<i>S. pyogenes</i> Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self-inactivating) long terminal repeat
SV40 pA	Simian virus 40 ポリアデニル化シグナル
pUC ori	pUC 複製起点
SV40 ori	Simian virus 40 複製起点
Amp ^R	アンピシリン耐性遺伝子

Edit-R Inducible Lentiviral Cas9はTet-On発現誘導タイプのゲノム編集を実現



Cas9発現用レンチウイルス粒子 (定常的発現タイプ: CAG-Cas9あるいは誘導的発現タイプ: TRE3G-Cas9) を各種細胞にMOI 0.3で形質導入し、10 μg/ml blasticidin入りのテトラサイクリンフリー培地で10日間培養しました。Cas9遺伝子を導入した細胞に、DNMT3B-または PPIB-sgRNAレンチウイルス粒子を形質導入し (MOI 0.3)、2 μg/ml puromycin入りのテトラサイクリンフリー培地で2日間培養後、2群に分け、一方は非誘導 (DOX-), もう一方は500 ng/ml doxycyclineで発現誘導 (DOX+) しました (7日間)。細胞を溶解後、T7エンドヌクレアーゼIIによるDNAミスマッチ検出アッセイで挿入欠損を検出しました。

Edit-R Inducible Lentiviral Cas9は非誘導時のCas9発現 (漏出) を最小限に抑制



Cas9発現用レンチウイルス粒子 (定常的発現タイプ: CAG-Cas9あるいは誘導的発現タイプ: TRE3G-Cas9) を各種細胞にMOI 0.3で形質導入し、10 μg/ml blasticidin入りのテトラサイクリンフリー培地で10日間培養しました。Cas9遺伝子を導入した細胞に、DNMT3B-または PPIB-sgRNAレンチウイルス粒子を形質導入し (MOI 0.3)、2 μg/ml puromycin 入りのテトラサイクリンフリー培地 (doxycycline非添加) で21日間培養しました。細胞を溶解後、T7エンドヌクレアーゼIIによるDNAミスマッチ検出アッセイで挿入欠損を検出しました。



Edit-R Pooled Lentiviral sgRNA Libraryが、 網羅的な遺伝子ノックアウトスクリーニングを実現

ヒト・マウス用のEdit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNAレンチウイルス粒子を、遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類してプールした製品です（マイクロチューブに分注してお届けします）。分注機などの高価な装置は不要であるため、スクリーニングにかかるトータルコストの削減が可能です。本ライブラリーは、Illumina DNAシーケンサーにのみ対応した製品です。

■ 特長

- 5×10^8 TU/mL 以上の高力価
- 遺伝子当たり5~10種類のsgRNA
- ヒット標準化用の100種類のネガティブコントロールsgRNA
- 最大340種類のポジティブコントロールsgRNA (ACTB、GAPDH等)

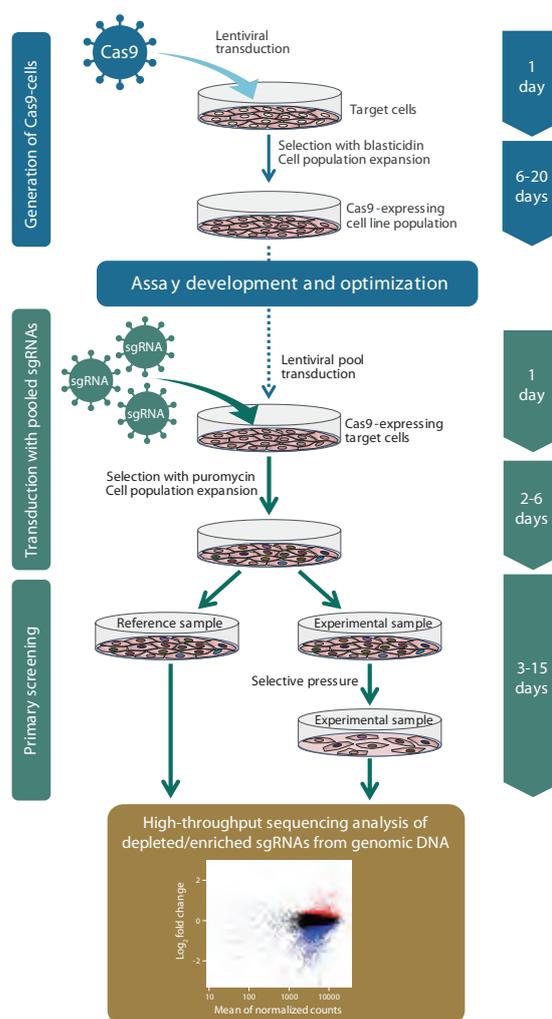
■ 実験の流れ

Edit-R Lentiviral Cas9 Nucleaseを導入した細胞に本ライブラリーを感染させます。試験したい表現型への応答性をもとにスクリーニングを行います。

スクリーニング結果の読み出し方法としては、細胞死（致死性のノックアウトとなった細胞は細胞プール内で割合が減る）、薬剤耐性（添加薬剤に対して耐性のある細胞は薬剤処理後に細胞プール内で割合が増える）、レポーターアッセイ（GFPなどの蛍光レポーター強度の増減を評価し、細胞をソーティングする）などがあります。

結果の読み出しを行った後、細胞からゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にしてsgRNA配列をPCR増幅します。そして、次世代シーケンシングを行い、スクリーニングにより細胞プール内で増減したsgRNA配列を同定します。

ゲノムDNAを鋳型としたsgRNA配列のPCR増幅および次世代DNAシーケンシング用プライマーは、Edit-R Pooled sgRNA Indexing PCR and Sequencing Primer Kit A/Bを別途ご用意ください。



スクリーニングワークフロー

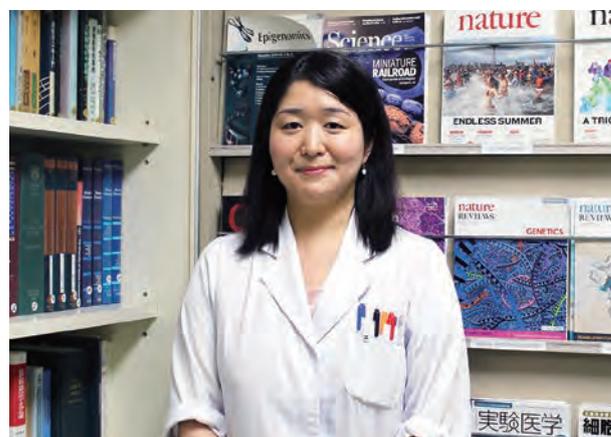


トランスフェクション試薬を使わないsiRNAだからこそできた 遺伝子ノックダウン後の薬剤処理実験

服部 奈緒子 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ エピゲノム解析分野

ヒストン修飾の組合せが持つがん発生や幹細胞の万能性維持など、重要な生物学的役割について研究されている服部先生は、リポフェクション法によるsiRNA導入が与える細胞へのダメージに、実験系の限界を感じておられました。そんな時に目にとまったのが、トランスフェクション試薬を使わないDharmacon Accell siRNA **→P.10** でした。「本当にすごいノックダウン効率」とおっしゃる服部先生に、どのような実験にお使いなのか、本製品を導入して何が良かったのか、苦労されたことはどんなことか、について伺いました。



トランスフェクション試薬で細胞が ダメージを受けてしまう

乳がんが発現が高いエピジェネティクス関連因子を研究テーマの一つとしていて、これらの因子のノックダウンによるがん幹細胞の変化の解析に取り組んでいます。実験に用いた4種類の細胞の中には、siRNA導入効率が低い細胞があるうえ、トランスフェクション試薬が細胞にダメージを与える問題に突き当たりました。トランスフェクション試薬だけを添加しても幹細胞マーカーの発現に変化が見られたりもしました。

“これは使える”トランスフェクション 試薬を使わないから細胞への ダメージを抑えられる

トランスフェクション試薬を使わず細胞にsiRNAを導入できるAccell siRNAを試してみることにしました。まずは試薬自体の細胞への影響を確認するため、通常の培地とAccell siRNA delivery mediumのみで培養したところ、細

胞は元気で、形態にも違いは見られませんでした。次に、ノックダウン効率を検討しました。正直なところ「トランスフェクション試薬なしでノックダウンできるのだろうか?」と半信半疑だったのですが、結果を見てびっくり。本当にすごいノックダウン効率でした。リポフェクション法に比べて試薬が細胞へ与える影響が少ない、細胞が死にくい、ノックダウン効率がよい、「これは使える」と思いました。

ノックダウン後の細胞に 薬剤処理をする実験も可能に

Accell siRNAを使って、もう一つ別の実験にも取り組みました。ノックダウン後の細胞の薬剤感受性の変化の解析です。リポフェクション法で行うと、ノックダウン処理後の細胞はトランスフェクション試薬によるダメージを受けます。さらに薬剤を添加すると、細胞はボロボロになります。「この状態で評価して正しい結果が得られるのだろうか?」と考えてしまいました。薬剤処理のプロトコールや薬剤濃

度は今までの実験で既に決定しているので変えたくありませんでした。

しかし、Accell siRNAなら、リポフェクション法に比べて細胞の状態がよく、同じ薬剤処理のプロトコールが使えました。薬剤耐性に関わる遺伝子や調節機構の解析においてもAccell siRNAは有用だと思います。

低血清濃度 vs ノックダウン効率

ノックダウンした細胞に薬剤処理をする実験は、培養が8日間におよびます。DharmaconがAccell siRNAを使用する場合に推奨する低血清濃度条件で8日間も培養すると細胞の生存率が下がります。かといって血清濃度を上げるとノックダウン効率が下がります。条件検討に苦労しました。最終的にはAccell siRNAを添加して培養後、2日毎に薬剤入り培地を交換するというプロトコールを基本に、短期間でノックダウンし、短期間で薬剤処理する、という方法に落ち着きました。

1ヶ月以上かかる実験が 2週間で結果が出せる

もしAccell siRNAがなかったら、shRNAを使うことになったと思います。当研究室ではもともとウイルスを用いた遺伝子導入の系は動いているので、できなくはありません。が、コンストラクトの作成、ウイルスのパッケージング、

細胞への感染、薬剤耐性株のセレクションなど、Accell siRNAに比べ手間、時間がかかります。加えて、薬剤耐性株のセレクション中に特定の細胞集団だけが増えてしまうリスクがあります。だいたい1ヶ月ぐらいかけて作った細胞で、ノックダウン効率が低いと分かった時にはがっかりです。Accell siRNAなら2週間ほどでノックダウンできているかの確認も含めて結果を出すことができることもよい点の一つだと思います。

服部先生は左記以外にも、より長期間の薬剤処理を含む実験に取り組んでおられ、その系にはCRISPR-Cas9による遺伝子ノックアウトを活用されています。服部先生が失敗も経験されたからこそ大事と考えるゲノム編集実験のポイントや、探し求めたInducibleタイプ (Tet-On発現誘導タイプ) レンチウイルスCas9ヌクレアーゼのメリットについてもお聞きしました。ご興味ある方は本誌 **⇒P.4~P.5** 掲載 お客さまの声「細胞が死なないguide RNAのクオリティを求めて」もぜひご覧ください。

服部先生、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客さまの使用経験に基づく記載です。

国立がん研究センター研究所
分子診断・個別化医療開発グループ エピゲノム解析分野のHPはこちら

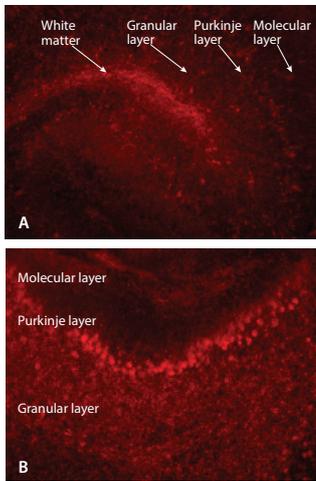
<https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/epigenomics/index.html>



Accell テクノロジー： トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入

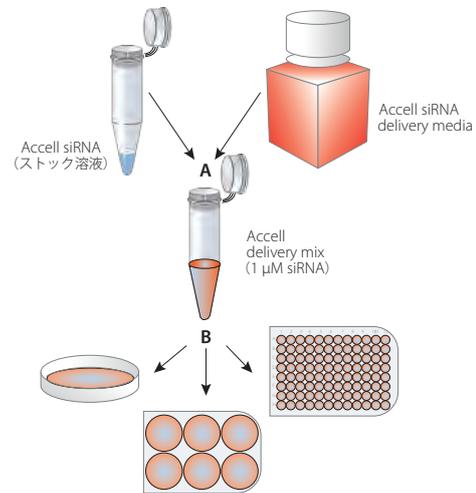
独自の化学修飾により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できる新しいタイプのsiRNAです。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地 (Accell siRNA delivery media) と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でもRNAi実験を可能としました*。また、トランスフェクション試薬に起因する細胞毒性を回避することができます。

* Accell siRNAは、トランスフェクション試薬によるsiRNA導入の困難な細胞においても導入が確認されています。



小脳切片におけるAccell siRNAの導入確認

マウス小脳切片へAccell Red Non-targeting siRNA導入3時間後 (A) および72時間後 (B) に蛍光顕微鏡により観察しました (シャッター時間は150 ms)。Accell siRNAの取り込みは、投与から3時間後に確認されました。最も強い蛍光シグナルは、プルキンエ細胞および顆粒細胞層において観察されました。72時間の培養により小脳切片における蛍光シグナルはより強くなったことから、培養時間の延長はAccell siRNA導入効率を上げることが分かりました。



Accell siRNAの使用方法

- A Accell siRNAとAccell siRNA delivery mediaを混合
- B 培地をAccell delivery mixと置き換え72時間培養

従来、導入が難しかった初代培養細胞、神経細胞、免疫細胞などでも遺伝子発現のノックダウンができます。

70 報以上の論文で
ノックダウンが
報告されています。

Accell siRNA によるノックダウン適用例が論文に掲載された細胞一覧

ARPE-19 (human retinal epithelial cells)	β-islet cells
BxPC3 (pancreatic tumor cell lines)	Bone marrow cells
C1 tumor derived cells	Bronchial smooth muscle cells (BSMC)
Caco-2 (colon colorectal adenocarcinoma)	Cardiomyocytes
CD4+ primary human T cells	Cerebellar granule neurons (CGN)
CD14+ primary monocytes	Cortical neurons
GH3 (rat somatotrophs pituitary cell line)	Endometrial cells
H9 stem cell lines	Endothelial cells
HCT-116 (colorectal carcinoma)	Extravillous trophoblasts (EVT)
HUVEC	Hepatocytes
JJN3 (plasma cell leukemia)	Immortalized B cells
MEC1 (human chronic B cell leukemia)	Keratinocytes
MN-1	Lymphocytes
MS1 (mouse pancreatic islet endothelia cells)	Macrophages
NOD CD4+CD25- splenic cells	Mantle cell lymphoma cells (MCL)
NOKA	Monocytes
OVCA 420 (ovarian carcinoma)	Mouse embryonic fibroblasts (MEF)
PGA-1 (lymphocytic leukemia B cell line)	Natural killer (NK) cell line
RAW264.7 macrophages	Neurons (primary rat)
SHSY5Y (neuroblastoma)	Oligodendrocyte precursors
SNB19 glioma cells	Pancreatic tumor cell lines
T47D (ductal breast epithelial tumor cell line)	Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)
T98 glioma cells	Vascular smooth muscle cells (VSMC)
THP-1 monocytes	
U266 (peripheral blood B lymphocyte myeloma)	
U937 (leukemic monocyte lymphoma)	



トランスフェクション試薬でのsiRNA導入が難しい 神経細胞におけるRNAi 実験

■ はじめに

神経芽腫細胞や初代神経細胞は、がんや神経発達に関する基礎研究用あるいは神経変性病研究用のモデル細胞系として広く使用されています。しかし、神経芽腫細胞や初代神経細胞の多くについて、リピッドベースのトランスフェクション試薬による核酸導入効率が低いという問題があり、siRNAを用いたRNAi実験が困難です。

Dharmacon Accell siRNA (以下、Accell siRNA) は、トランスフェクション試薬を用いずに細胞に導入できるsiRNAです。Accell siRNAには特殊な化学修飾が施されたヌクレオチドを導入しており、結果として、さまざまな細胞に受動的に取り込まれます。従来のトランスフェクション試薬による導入が困難であった細胞での実験例も増えつつあります。

本アプリケーションノートでは、Accell siRNAの神経細胞への導入事例として、神経芽腫細胞IMR-32および初代神経細胞におけるAccell siRNAを用いたp53遺伝子の発現抑制をご紹介します。p53はDNA損傷やストレスに対する細胞応答を制御するがん抑制タンパク質です。p53は転写因子として働き、細胞周期・DNA修復の制御や、DNAが修復不可能な損傷を受けた場合のアポトーシス誘導など多彩な機能を担います [→図1](#)。

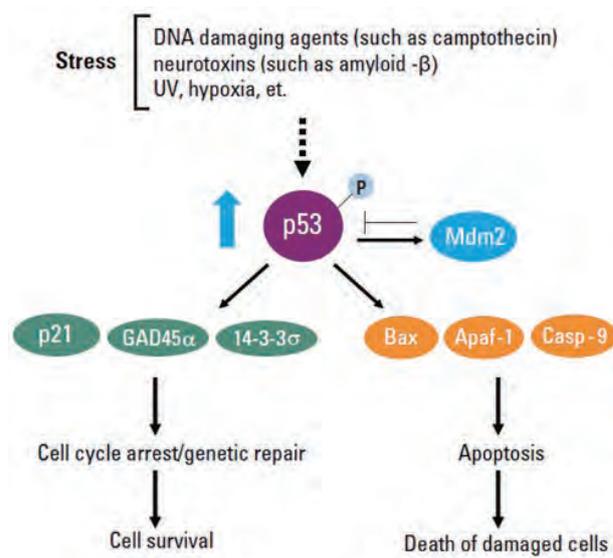


図1 さまざまなストレスに対する細胞応答を仲介するp53

細胞に各種ストレスを与えると、核内のp53タンパク質量が急増し、細胞周期停止・DNA修復を制御する遺伝子 (p21Waf1/Cip1、GAD45α、14-3-3α) やアポトーシスを制御する遺伝子 (Bax、Apaf1、Casp-9) の発現が制御されます。

■ 神経芽腫細胞におけるターゲットmRNAの効率的なノックダウンを実現

神経芽腫細胞IMR-32へAccell siRNAを導入可能か調べるために、Accell siRNAを細胞に投与した際のGAPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) およびp53遺伝子の発現抑制の効率と細胞生存率を評価しました [→図2](#)。IMR-32では野生型のp53が発現しており、p53遺伝子をノックダウンした場合にDNA損傷応答への影響が解析できます。

Accell GAPD Control Pool (図中でGAPDと略記)、Accell Non-targeting Pool (図中でNTCと略記)、p53 mRNAをターゲットとするAccell siRNAを、Accell siRNA delivery media (AM) 中でIMR-32細胞に導入しました。導入72時間後にターゲットmRNAのノックダウン効率および細胞生存率を評価しました。Accell GAPD Control Poolおよびp53 mRNAをターゲットとするAccell siRNAが、細胞生存率を下げることなくターゲットmRNAを効率的にノックダウンすることを確認しました。

■ p53遺伝子の発現抑制による、DNA損傷薬処理後のIMR-32細胞生存率の上昇

p53は、DNAの損傷に反応してG1/Sチェックポイントを誘導したり、アポトーシスを誘導したりして細胞周期を停止させる機能を持ちます (1, 2)。カンプトテシン (Camptothecin) といったDNA損傷薬を化学的感受性のあるヒト神経芽腫細胞株に投与すると、急速かつ激しいアポトーシスが起きます。また、ヒトパピローマウイルスtype16 E6タンパク質あるいはドミナントネガティブ型変異体p53 (R175H) を用いたp53の機能抑制によって、野生型p53を持つ細胞株において薬剤誘導性のアポトーシスが阻害されます (3)。

Accell siRNAを用いたp53遺伝子の発現抑制によって同様の阻害が起こるのか調べるために、AccellコントロールsiRNA Poolおよびp53 mRNAをターゲットとするAccell siRNAをIMR-32細胞に導入しました。導入48時間後にDNA損傷薬であるカンプトテシンをさまざまな濃度で添加し、さらに24時間培養したあとに細胞生存率を評価しました (→図3)。p53 mRNAをターゲットとするAccell siRNAの導入によってカンプトテシン誘導性の細胞死が阻害されることを確認しました。

■ カンプトテシン処理によるp53およびその下流ターゲットp21の誘導に関するハイコンテンツ分析

細胞内におけるp53タンパク質の蓄積量は、ユビキチン化およびそれに引き続いて起こる26Sプロテアソームによる分解によって、通常は低く抑えられています。しかし、細胞がストレスにさらされると、p53のユビキチン化は抑制され、p53は核に蓄積し活性化と安定化が起こります (4)。活性化されたp53は転写因子として機能し、細胞周期停止・DNA修復を制御する遺伝子やアポトーシスを制御する遺伝子の発現を制御します (→図1) (5)。

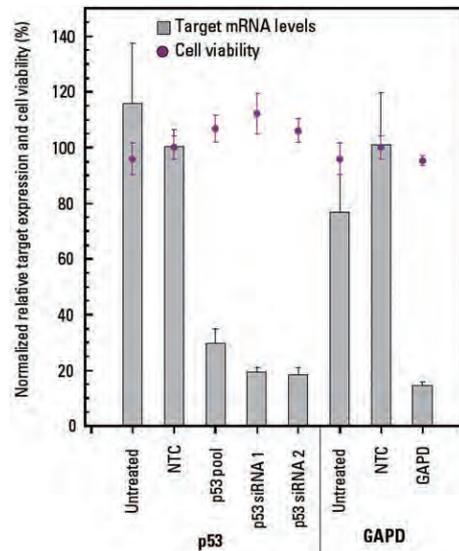


図2 IMR-32細胞におけるAccell siRNAを用いたターゲットmRNAの効率的なノックダウン

1 μMのAccellコントロールsiRNA Pool (GAPD、NTC) およびp53 mRNAをターゲットとするAccell SMARTpool siRNA (p53 pool) あるいはAccell individual siRNA (p53 siRNA1、p53 siRNA2) を、Accell siRNA delivery media中でIMR-32細胞に導入しました。導入72時間後に、p53およびGAPDのノックダウンおよび細胞生存率を評価しました。全てのサンプルについて3回の導入実験を行いました。

Cellomics Multiplexed p53 and p21 Detection Kit (Thermo Scientific) を用いてAccell siRNAによるp53遺伝子の発現抑制の影響を調べました。具体的には、p53およびその下流ターゲットp21タンパク質の核への蓄積量をモニターしました。この結果、IMR-32細胞は培養プレートへの接着が不十分であり、ハイコンテンツ分析を行うためには緩やかな固定が必要であることがわかりました。IMR-32細胞の接着性は、通常のAccell siRNAの導入条件では低いことがわかりました。

高濃度の血清はAccell siRNAの導入を阻害するため、Accell siRNA delivery media (AM) は血清を含みません。したがって、長時間の無血清条件に感受的な細胞株あるいはアッセイにお

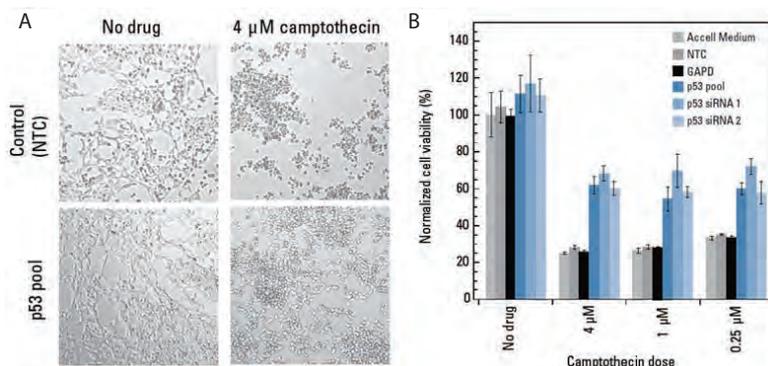


図3 カンプトテシン処理後のIMR-32細胞生存率のp53ノックダウンによる上昇

1 μMのAccellコントロールsiRNA Pool (GAPD、NTC) およびp53 mRNAをターゲットとするAccell SMARTpool siRNA (p53 pool) あるいはAccell individual siRNA (p53 siRNA1、p53 siRNA2) を、Accell siRNA delivery media中でIMR-32細胞に導入しました。導入48時間後にDNA損傷薬であるカンプトテシンをさまざまな濃度で添加しました。導入72時間後に、位相差顕微鏡による細胞観察 (A) およびresazurinアッセイ (B) によって細胞生存率を評価しました。

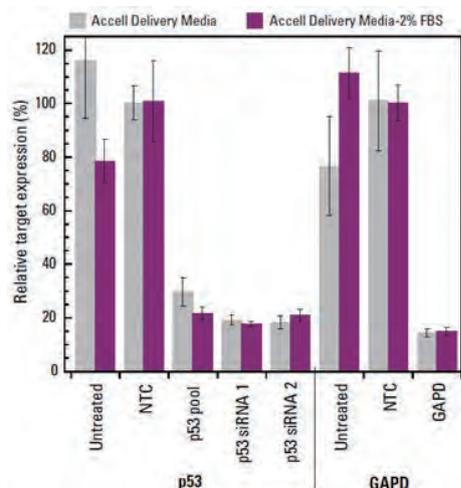


図4 低濃度の血清を含むAccell siRNA delivery media (AM) とAccell siRNAを用いた、IMR-32細胞におけるターゲット mRNAの効率的なノックダウン

1 μMのAccell コントロールsiRNA Pool (GAPD、NTC) およびp53 mRNAをターゲットとするAccell SMARTpool siRNA (p53 pool) あるいはAccell individual siRNA (p53 siRNA1、p53 siRNA2) を、AMあるいは2%のウシ胎児血清を含むAM中でIMR-32細胞に導入しました。導入72時間後に、p53およびGAPDのノックダウンを評価しました。

いては、細胞生存率の低下などの問題が生じるおそれがあります。そのような場合、3%までの濃度の血清をAMに添加することで、Accell siRNAの導入効率を下げることなく問題を解決できる場合があります。IMR-32細胞の場合は、2%の血清をAMに添加することによって、ターゲットmRNAのノックダウン効率を下げることなく **→図4** 細胞の接着性と固定を著しく改善することができました。

続いて、カンプトテシンによるp53およびp21タンパク質の誘導が、Accell siRNAによるp53遺伝子の発現抑制によってどのような影響を受けるかを調べました。予備実験から、4 μMのカンプトテシンによる18~22時間の処理が、IMR-32細胞におけるp53およびp21タンパク質の誘導に最適であることが分かりました。Accell GAPD Control Pool (図中でGAPDと略記)、Accell Non-targeting Pool (図中でNTCと略記)、p53 mRNAをターゲットとするAccell siRNA (SMARTpoolあるいはindividual siRNA) をIMR-32細胞に導入しました。Accell siRNAの導入52時間後に4 μMのカンプトテシンを添加し、さらに20時間培養しました。Accell siRNAの導入72時間後に細胞を固定し、Cellomics Multiplexed p53 and p21 Detection Kit (Thermo Scientific) を用いてp53およびp21タンパク質を染色しました。イメージングサイトメーターを用いて、細胞核に局在するp53およびp21タンパク質の蛍光強度の平均値を測定しました **→図5A**。カンプトテシン処理によるp53およびp21タンパク質の誘導は、p53遺伝子の発現抑制によって阻害されることが分かりました。

カンプトテシン処理によるp53およびp21タンパク質の誘導にp53遺伝子の発現抑制が与える影響をより詳細に解析するために、Accell Non-targeting pool (図中でNTCと略記) あるいはp53 mRNAをターゲットとするAccell SMARTpool siRNAを導入した500個の細胞について、核のHoechst染色強度をp21およびp53タンパク質の染色強度に対してプロットしました **→図5B**。Accell siRNAによるp53遺伝子の発現抑制によってp53およびp21タンパク質の染色強度が著しく低下したことから、p53遺伝子の発現抑制によって、カンプトテシン処理をしても細胞周期が停止しなくなることが示唆されました。以上の実験から、神経芽腫細胞IMR-32において、Accell siRNAを用いたp53遺伝子の発現抑制によってカンプトテシン処理によるp53依存性のDNA損傷応答が阻害されることを明らかにしました。

■ 初代培養皮質ニューロンへの Accell siRNA導入時の培養培地の検討

初代培養皮質ニューロンは培養条件に対して極めて感受的です。そこで、Accell siRNA導入時の培養条件がニューロンのviabilityに与える影響を調べました。発生18日目のラット胎仔から取り出した初代培養皮質ニューロン (6) を *in vitro* で4日間培養したのち、以下①~④のいずれかの培地で48時間さらに培養しました。

- 培地① Neurobasal media (以下、NB)
- 培地② Accell siRNA delivery media (以下、AM)
- 培地③ B27 (サプリメント) を添加したAccell siRNA delivery media (以下、AM+B27)
- 培地④ Neurobasal mediaとAccell siRNA delivery mediaとの50:50の混合培地 (以下、NB+AM)

その後、ニューロンのviabilityをMTTアッセイにより評価しました **→図6**。培地②AM、および培地③AM+B27においては、培地①NBで培養した場合と比べてviabilityが低下しました。しかし、培地④NB+AMで培養したニューロンのviabilityはそれほど低下しませんでした。そこで、NBとAMの混合比を変えて培養条件をさらに検討しました。発生18日目のラット胎仔から取り出し *in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、NBとAMを異なる比率で混合した培地中で、1 μMのAccell Non-targeting pool (図中でNTCと略記) を導入しました。48時間後、NTCで処理したニューロンのviabilityを顕微鏡観察 **→図7A~D** およびMTTアッセイ **→図7E** により評価しました。初代培養皮質ニューロンを培地②AMで培養した場合、viabilityは著しく低下しました **→図7A、E**。NBとAMを異なる比率で混合した培地中で培養した場合、NBのみで培養した場合と比べて、細胞の形態に大きな変化は観察されませんでした **→図7B~D**。AMの混合量が多いほどニューロンのviabilityは低下しましたが、50%までであればviabilityはそれほど低下しませんでした。

アプリケーションノート

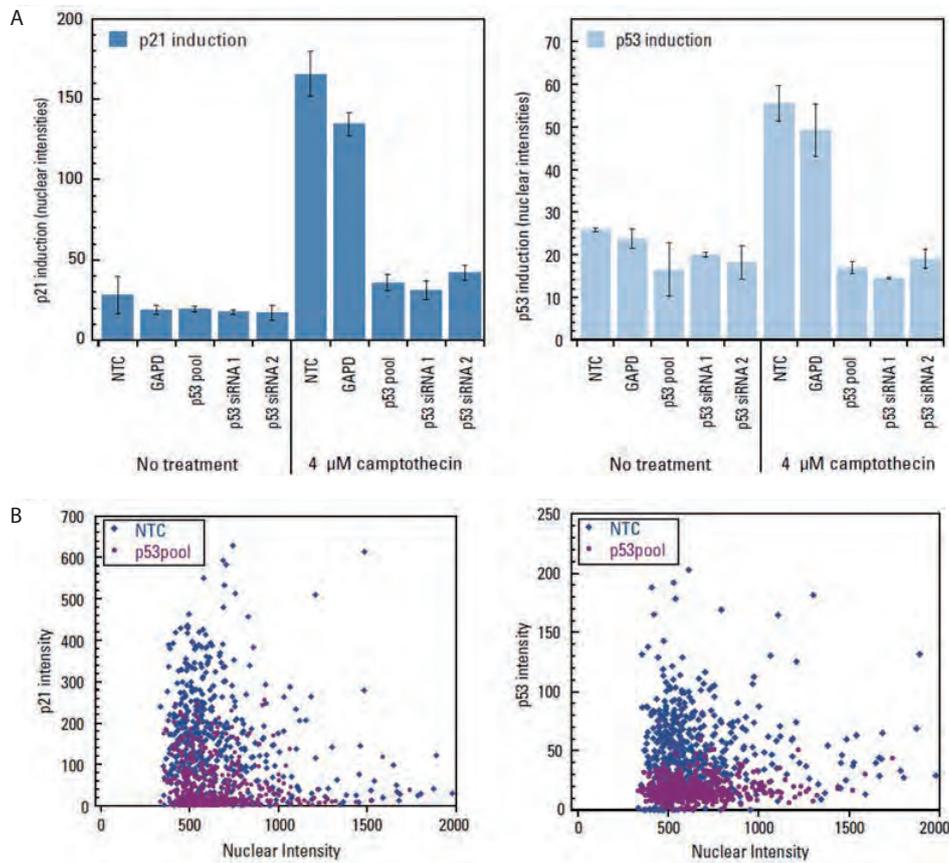


図5 ハイコンテント分析：カンプトテシン処理後のp53遺伝子の発現抑制によるp21およびp53タンパク質発現量の低下

MR-32細胞へのAccell siRNAの導入52時間後に4 μMのカンプトテシンを添加しました。カンプトテシン処理20時間後（Accell siRNAの導入72時間後）に細胞を固定し、Cellomics Multiplexed p53 and p21 Detection Kitを用いてp53およびp21タンパク質を染色しました。(A)はAccell siRNAを導入した細胞の核に局在するp53およびp21タンパク質の蛍光強度の平均値を、(B)はAccell Non-targeting pool (NTC) およびp53をターゲットとするAccell SMARTpool siRNA (p53 pool) を導入後カンプトテシン処理した細胞 (500個) におけるHoechst染色強度をp53およびp21タンパク質の染色強度に対してプロットした結果です。

次に、NBとAMを異なる比率で混合した培地が、Accell siRNA 導入に与える影響を調べました (図7F)。Accell GAPD Control Poolの導入によって、全ての培地条件においてGAPD mRNAの発現量が著しく低下しました。AMの混合量が多いほどノックダウン効率は高くなりました。以上の培養条件の検討結果に基づき、以降のAccell siRNA導入実験はNBとAMとの50:50の混合培地 (至適培地) を用いて行いました。Dy547で標識したAccell GAPD siRNA (1 μM) を、至適培地中で初代培養皮質ニューロンに導入し、48時間培養しました。細胞を固定後、共焦点顕微鏡で観察しました。ほとんど全てのニューロン細胞へのAccell siRNA導入が確認できました (図8A、B)。また、神経細胞体の細胞質および神経突起へのsiRNAの局在が観察されました (図8C、D)。

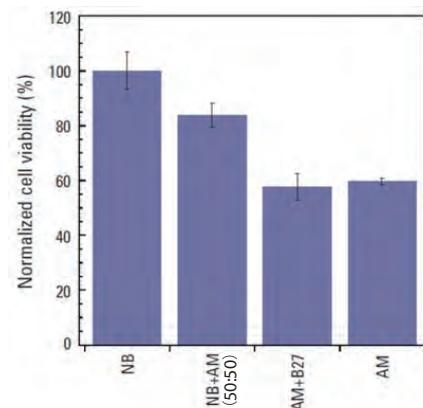


図6 初代培養皮質ニューロンへのAccell siRNA導入時の培養培地の検討 (その1)

発生18日目のラット胎仔から取り出した初代培養皮質ニューロンを*in vitro*で4日間培養したのち、異なる4種類の培地で48時間培養しました。MTTアッセイによりニューロンのviabilityを評価しました。

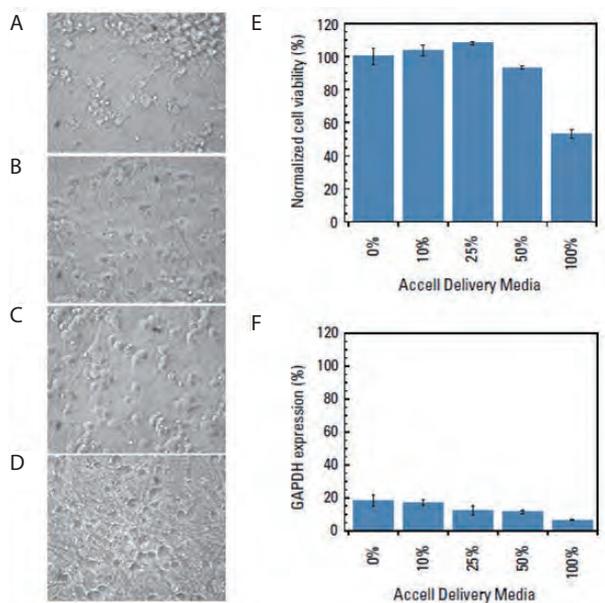


図7 初代培養皮質ニューロンへのAccell siRNA導入時の培養培地の検討 (その2)

発生18日目のラット胎仔から取り出し *in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、Neurobasal media (NB) とAccell siRNA delivery media (AM) を異なる比率で混合した培地中で、1 μ MのAccell Non-targeting pool (NTC) あるいはAccell GAPD Control Poolを導入し、48時間培養しました。NTCで処理した細胞の位相差顕微鏡観察像：AM中 (A)、NBとAMとの50:50の混合培地中 (B)、NBとAMとの75:25の混合培地中 (C)、NB中 (D)。細胞のviabilityはMTTアッセイにより (E)、ノックダウン効率はGAPD mRNAの発現量を測定することにより評価しました (F)。

培地成分	Accell siRNA delivery media	Neurobasal media
A	100 %	0 %
B	50 %	50 %
C	25 %	75 %
D	0 %	100 %

■ p53遺伝子の発現抑制による β アミロイドペプチドの神経毒性の抑制

アルツハイマー病の主な原因物質である β アミロイドペプチドは、神経細胞のアポトーシスを引き起こします。またp53は、 β アミロイドペプチドによる神経毒性発現のメディエーターとして知られています (7)。そこで、初代培養皮質ニューロンにAccell siRNAを導入しp53遺伝子の発現を抑制することによって β アミロイドペプチドの神経毒性を抑制できるかを調べました。

p53 mRNAをターゲットとするAccell siRNAの導入により、p53 mRNAの発現レベルが60%以上低下しました (→図9A)。Accell siRNA導入開始から48時間後に、さまざまな濃度の β アミロイドペプチドをニューロンに添加し、48時間後 (→図9B)、72時間後 (→図9C) のviabilityをMTTアッセイにより評価しました。NTC siRNAを導入した場合と比べて、p53遺伝子の発現を抑制した初代培養皮質ニューロンのviabilityは有意に向上しました。 β アミロイドペプチドの添加濃度が高くなるにつれ、p53遺伝子の発現抑制による β アミロイドペプチドの神経毒性の抑制効果は低下しました。最も高い抑制効果を得られたのは、5 μ Mの β アミロイドペプチドを添加した場合でした。以上の実験から、Accell siRNAを用いたp53遺伝子の発現抑制によって、 β アミロイドペプチドの神経毒性が抑制されることを、初代培養皮質ニューロンにおいて明らかにすることができました。

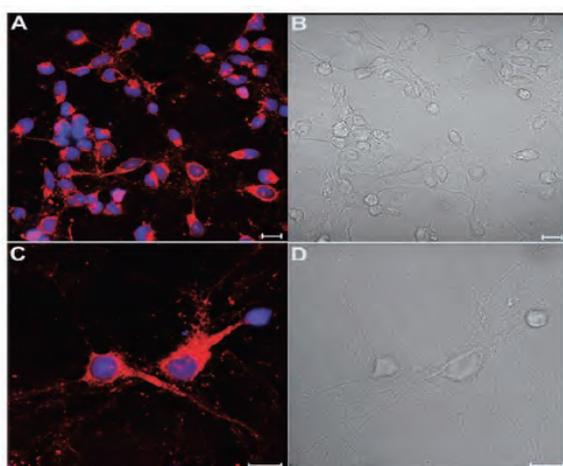


図8 初代培養皮質ニューロンへのAccell siRNA導入の確認

発生18日目のラット胎仔から取り出し *in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、Neurobasal media (NB) とAccell siRNA delivery media (AM) との50:50の混合培地中で、Dy547で標識したAccell GAPD siRNA (1 μ M) を導入し、48時間培養しました。細胞を固定後、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM510) で観察しました。siRNAが神経細胞体および神経突起に局在することが確認できました。赤色：Dy547で標識したAccell GAPD siRNA (1 μ M)、青色：Hoechst染色された核、スケールバー：10 μ m

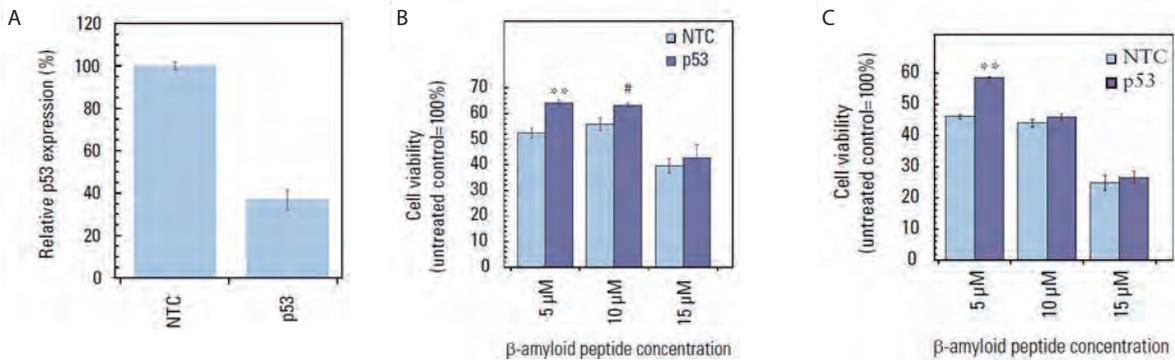


図9 p53遺伝子の発現抑制による、βアミロイドペプチド添加後の初代培養皮質ニューロンのviabilityの向上

発生18日目のラット胎仔から取り出し *in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、Neurobasal media (NB) とAccell siRNA delivery media (AM) との50:50の混合培地中で、1 μMのAccell Non-targeting pool (NTC) あるいはp53 mRNAをターゲットとするAccell SMARTpool siRNAを導入しました。導入開始から48時間後にp53 mRNAのノックダウン効率を評価しました (A)。Accell siRNA導入開始から48時間後に、さまざまな濃度のβアミロイドペプチドをニューロンに添加し、48時間後 (B)、72時間後 (C) のviabilityをMTTアッセイにより評価しました。**p* < 0.01、#*p* < 0.05、t-test

■ まとめ

リピッドベースのトランスフェクション試薬によるsiRNA導入効率が低いといわれる神経細胞においても、至適化された条件でAccell siRNAを用いることによってRNAi実験が十分可能であることが明らかになりました。

■ 実験材料および方法

細胞培養

IMR-32細胞はATCCから入手し、推奨された培地条件で培養しました。ハイコンテンツ分析用に細胞の固定を改善するために、細胞はCollagenIVでコートした96ウェルプレートに播きました。ラット皮質ニューロンは、BankerおよびGoslin、Brewerの改良プロトコールに従って、発生18日目のラット胎仔から取り出しました。ニューロンは、B27を添加したNeurobasal media (NB) 中で4日間培養後に、siRNAを導入しました。

IMR-32細胞へのAccell siRNAの導入

IMR-32細胞を96ウェルプレートの各ウェルに20,000個播き、一昼夜接着させました。IMR-32細胞に投与したAccell siRNAは以下の通りです：Accell Non-targeting pool (コード番号：D-001910-10)、Accell GAPD Control Pool (コード番号：D-001930-10)、ヒトp53遺伝子 (Accession #NM_000546) をターゲットとするAccell siRNA SMARTpool (コード番号：E-003329-00) およびAccell individual siRNA (コード番号：A-003329-22、

A-003329-23)。Accell siRNAは、Accell siRNA Delivery Media (コード番号：B-005000-100、AM) 中で終濃度1 μMにて使用しました。細胞から培地を取り除き、100 μlのdelivery mix (Accell siRNAとAMの混合液) を各ウェルに加えました。ハイコンテンツ分析用に細胞の固定を改善するために、AMに2%の血清を添加しました。細胞は37℃、二酸化炭素5%にて72時間培養後、ターゲットmRNAのノックダウンや細胞生存率の評価に使用するか、ハイコンテンツ分析用に固定を行いました。

初代培養ラット皮質ニューロンへのAccell siRNAの導入

発生18日目のラット胎仔から取り出し *in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、NBとAMを異なる比率で混合した培地中で、1 μMのAccell siRNAを導入し、48時間培養しました。初代培養ラット皮質ニューロンに投与したAccell siRNAは以下の通りです：Accell GAPD Control siRNA (コード番号：D-001930-03)、Accell Non-targeting siRNA #1 (コード番号：D-001910-01)、Accell Non-targeting pool (コード番号：D-001910-10)、ラットp53遺伝子 (Accession #NM_030989) をターゲットとするAccell siRNA SMARTpool (コード番号：E-080060-00-0020)。Accell siRNA導入48時間後 (推奨プロトコールでは72時間後) に、ターゲットmRNAのノックダウンを評価しました。細胞への取り込みの検討実験には、Dy547標識したAccell GAPD Control siRNAおよびAccell Non-targeting siRNAを使用しました。表現型の解析には、*in vitro* で4日間培養した初代培養皮質ニューロンに、NBとAMを50:50の比率で混合した培地中で、1 μMのsiRNAを導入しました。48時間後、さまざまな濃度のβ

アミロイドペプチド1~42 (Californian peptides) を添加し、さらに48~72時間培養しました。処理後の細胞のviabilityをMTTアッセイにより評価しました。 β アミロイドペプチド1~42は先に記載の方法で調製しました (8)。

Cell viabilityアッセイ

IMR-32細胞のviabilityはresazurinアッセイにより評価しました。Resazurinは、Accell siRNAの導入から72時間後に終濃度25 μ g/mlにて細胞に添加しました。細胞をインキュベーターに戻し、1~3時間培養しました。プレートはWallac VICTOR 2プレートリーダー (Perkin Elmer Life Sciences) で分析しました (励起 530 nm、蛍光 590 nm、露光1秒)。皮質ニューロンのviabilityは、先に記載の方法により、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイにより評価しました (9)。

ハイコンテント分析

Accell siRNAの導入52時間後に4 μ Mのカンプトテシンを添加し、さらに20時間培養しました。Accell siRNAの導入72時間後に細胞を4%パラフォルムアルデヒドで固定し、Cellomics Multiplexed p53 and p21 Detection Kitを用いてp53およびp21タンパク質を染色しました。イメージングサイトメーターを用いて細胞を解析しました。細胞核に局在するp21およびp53タンパク質の蛍光強度を、各siRNAにつき3連 (ウェル) で測定しました。各ウェルについて8つのフィールド (フィールドあたり100細胞以上) を分析しました。分析に用いたパラメーターはチャンネル1のMean Object Average Intensityおよびチャンネル2および3のMean Average Intensityです。ArrayScan VTI HCS Readerによって算出された数値データはvHCS Discovery Toolboxを用いて評価しました。

共焦点顕微鏡観察

共焦点顕微鏡観察のために、Hoechst nuclear dyeを添加した4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定しました。LSM510 confocal microscope (Zeiss) を用いて画像を取得しました。

参考文献

1. K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 594-604 (2002).
2. E.S. Helton, X. Chen, p53 modulation of the DNA damage response. *J. Cell. Biochem.* **100**, 883-896 (2007).
3. H. Cui, A. Schroering, p53 Mediates DNA Damaging Drug-induced Apoptosis through a Caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 679-686 (2002).
4. M.F. Lavin, N. Gueven, The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* **13**, 941-950 (2006).
5. T. Riley, E. Sontag, Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 402-412 (2008).
6. K. Goslin, G. Banker, Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**, 1507-1516 (1989).
7. M.P. Fogarty, E.J. Downer, A role for c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), but not JNK2, in the beta-amyloid mediated stabilization of protein p53 and induction of the apoptotic cascade in cultured cortical neurons. *Biochem. J.* **371**, 789-798 (2003).
8. W.B. Stine, Jr., K.N. Dahlgren, In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid-beta Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 11612-11622 (2003).
9. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63 (1983).



Accell siRNAを用いた小脳スライス培養におけるRNAi実験

Louise Baskin and Stephanie Urschel, Dharmacon, A Horizon Discovery Group Company, Lafayette, CO, USA
Britta Eiberger, Institute of Anatomy, Anatomy and Cell Biology, University of Bonn, Germany

■ はじめに

世界中には、アルツハイマー病・パーキンソン病・ハンチントン病などの神経性疾患の患者さんがたくさんいらっしゃいます。現在のところ、このような神経性疾患の発症メカニズムの多くが未解明のままです。RNAi技術を用いて、神経性疾患を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることは、効果的な治療法の開発につながる可能性があります。

神経細胞内の分子パスウェイの解析には、脳切片培養が有用です。脳切片培養では、神経細胞とグリア細胞などの支持細胞の*in vivo*の環境に極めて近い状態での研究が可能となります。また、脳切片中の単一細胞における電気生理学的解析や、記録電極を用いた細胞内部への薬物投与もできるので、より詳細な神経生理学的・薬理学的な実験も可能になります。

■ 神経細胞におけるRNAi

従来、神経細胞へのsiRNAの効率的な導入は、*in vitro*・*in vivo*を問わず困難であるとされてきました。リピッド系トランスフェクション試薬を用いて神経細胞へのsiRNA導入を行った場合、至適化されたトランスフェクション条件であっても、30%程度の導入効率しか得られないことが多いです。また、リピッドの影響による細胞毒性も問題とされてきました。細胞生存率を上げるためにリピッド濃度を下げると、十分にsiRNAが導入できなくなります。また、エレクトロポレーション法によるsiRNAの導入には特別な機器が必要とされ、十分な導入効率や細胞生存率を得ることができない場合があります。

Dharmacon Accell siRNAは、トランスフェクション試薬や特別な機器を用いずに細胞に導入することのできる全く新しいタイプのsiRNAです。Accell siRNAには特殊な化学修飾が導入されているため、さまざまな細胞に受動的に取り込ま

れます。また、トランスフェクション試薬を用いないため、細胞毒性や炎症応答を最小限に抑えることができます。その結果として、従来法による神経細胞へのsiRNA導入時に起こる細胞生存率の低下を回避できます。

マウス脳切片にAccell siRNAを導入することにより、トランスフェクション試薬やエレクトロポレーション法によるsiRNA導入時に引き起こされる非特異的な影響を回避でき、*in vivo*に近い状態の神経細胞における遺伝子ノックダウンが可能になります。また、Accell siRNAを繰り返し脳切片へ投与することにより、脳切片組織の構造や生理へ悪影響を及ぼすことなく、細胞分化などの長期的な変化をモニターできます。

■ 培養した脳切片への Accell siRNAの導入手順

C57/BL6マウスの17日胚および生後8日目の個体から取り出した小脳を、冷却Hanks溶液 (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 5 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 4.17 mM NaHCO₃, pH7.2) に、髄膜が剥がれないように注意深く浸しました。すべての小脳を取り出した後、次にHanks溶液に溶解したゼラチン溶液5 ml (20 % wt/vol; porcine skin由来, type A) に、それらの小脳を37°CのCO₂インキュベーター中で20分浸透しました。その後、滅菌したspecimen discに小脳をマウントし、McIlwain tissue chopperを用いて切片 (厚さ250 μm) を作成しました。スライスした小脳を、あらかじめ冷却したAccell delivery mediaに穏やかに浸し、実体顕微鏡 (Zeiss, Stemi 2000 C) 下で個々の切片に分離しました。24ウェルディッシュの各ウェルに300 μLのAccell delivery mix (1x B-27 [Gibco]を添加したAccell delivery mediaと1 μM Accell siRNAとの混合溶液) を加え、そこに入れた細胞培養用インサート (Millicell-CM, Millipore, Bedford, MA; 12 μm, pore size 0.4 μm) のメンブ

レン上に、Accell delivery mediaから取り出した切片を移しました。メンブレン下部から溶液が浸みこむことにより、メンブレンへの切片の付着が促進されました。培養に使用しないウェルには滅菌水を加え、ディッシュ内の湿度を高く維持しました。切片培養はスタンダードな条件 (37°C, 5% CO₂, 湿度95%) で行い、培養開始から48・72・96時間後に切片をサンプリングしました。あらかじめ冷却したPBSにて各々の切片を2回洗浄後、1x プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete, Roche) を添加したRIPAバッファー (40 µL) 中に集め、1分の超音波処理により細胞抽出液を調製しました。サンプルあたり 50 µgのタンパク質を用いてウェスタンブロットティング解析を行いました。1次抗体はanti-Cyclophilin B (Abcam, 1:2000) を、また2次抗体はgoat-anti-rabbit-HRP (Dako, 1:30000) を用い、検出は化学発光系 (基質: Super Signal West Femto, Thermo Fisher Scientific) により行いました。

■ 神経細胞へのAccell siRNAの導入確認

Accell siRNAの神経細胞への取り込みを確認するため、上述の手順にしたがって小脳の切片 (厚さ250 µm) を作成し、培養しました。Accell Red Non-targeting siRNAとともに切片を3時間および72時間培養後、蛍光顕微鏡 (Leica DM IRE2, filter TX2) により観察しました。Accell siRNAの取込みは、投与から3時間後に確認されました (→図1)。最も強い蛍光シグナルは、プルキンエ細胞および顆粒細胞層において観察されました。72時間の培養により小脳切片における蛍光シグナルはより強くなったことから、培養時間の延長はAccell siRNA導入効率を上げることが分かりました。なお、Accell delivery media にB-27 neuronal media (Gibco) を添加することにより、Accell siRNAの取込みが阻害されることなく細胞生存率が高まることを確認しました。

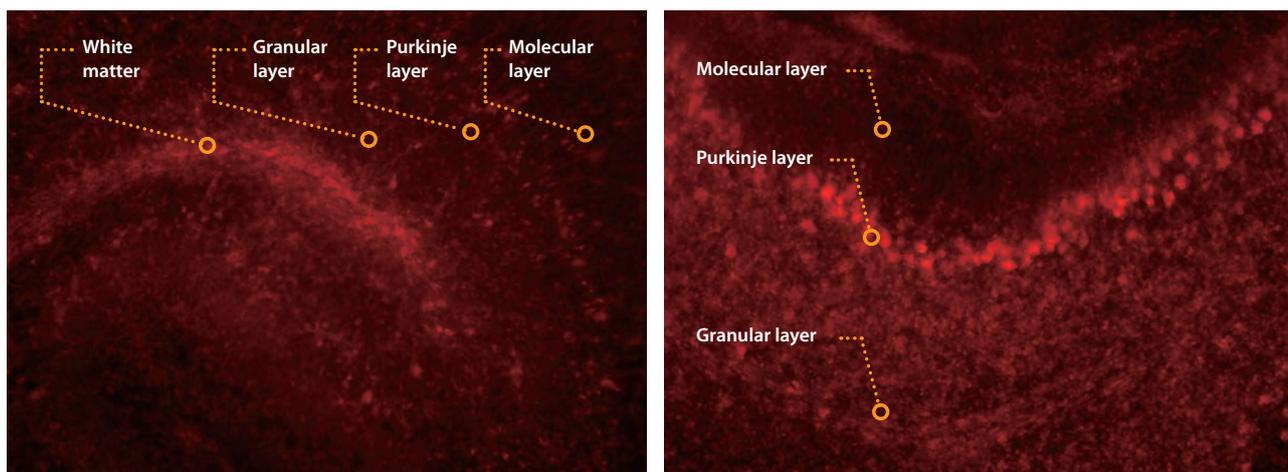


図1 小脳切片におけるAccell siRNAの導入確認

小脳切片へAccell Red Non-targeting siRNA導入3時間後に蛍光顕微鏡により観察しました。シャッター時間は150 ms。



■ Accell siRNAを用いた Cyclophilin B遺伝子の ノックダウンの確認

Accell siRNAの投与による小脳切片におけるターゲット遺伝子の発現抑制を確認するため、上述の手順にしたがって、ハウスキーピング遺伝子であるPPIB (Cyclophilin B, NM_01149) の発現抑制を解析しました。小脳切片をAccell siRNAとともに培養し、siRNA導入48・72・96時間後のタンパク質発現レベルをウェスタンブロットティング解析しました。→図2 に示すように、Cyclophilin Bタンパク質レベルの十分な減少が確認されました。

■ まとめ

以上の実験結果から、Accell siRNAを脳切片に投与することにより、神経細胞において十分な遺伝子ノックダウン実験が可能であることが分かりました。脳切片へのAccell siRNAの投与実験は簡便であるため、神経細胞における分子パスウェイの解析や神経性疾患の原因の解明などのさまざまな研究に威力を発揮することが期待されます。具体的には、以下のようなアプリケーションが考えられます。

- ミディアムスループットからハイスループットまでのRNAiスクリーニング
- ターゲット遺伝子のノックダウンと、引き起こされる表現型の観察によって、それと同一遺伝子のノックアウトマウスを用いた実験系の事前評価
- 培養細胞系での結果と *in vivo*モデル系での結果との相違の解明

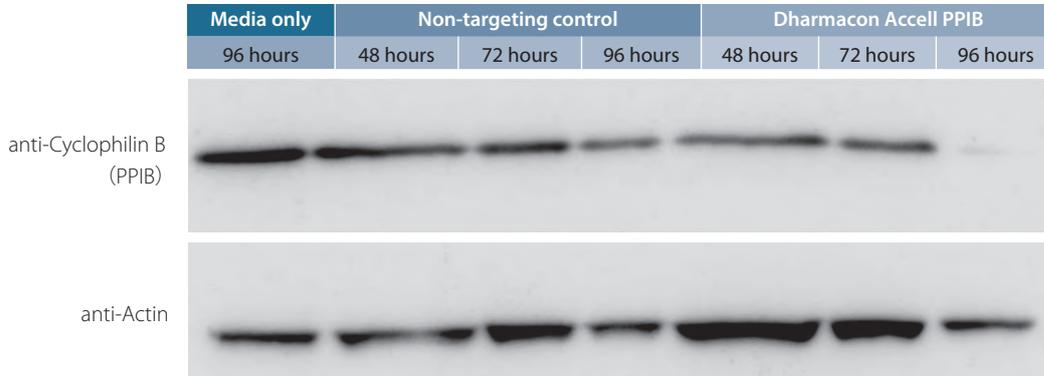


図2 小脳切片におけるターゲット遺伝子の発現抑制

P8マウスの新鮮な小脳切片 (厚さ250 μm) を、Cyclophilin Bをターゲットとする1 μMのAccell siRNA (Accell PPIB; cat# D-001920-02) あるいは1 μMのAccell Non-targeting siRNA #1 (NTC; cat# D-001910-01) とともに、Gibco B-27 serum-free supplement を添加したAccell delivery media (cat# B-005000) 中で培養しました。Accell siRNA導入48・72・96時間後に切片をサンプリングしました。小脳切片からRIPAバッファーを用いて細胞抽出液を調製しました。サンプルあたり50 μgのタンパク質を用いてウェスタンブロットティング解析を行いました。



Accell siRNAを用いた長期遺伝子サイレンシング実験

Zaklina Strezoska and Christina Yamada, Dharmacon, A Horizon Discovery Group Company, Lafayette, CO, USA

■ はじめに

siRNAを細胞に導入する方法としては、カチオン性のリピッド系トランスフェクション試薬を用いる方法が一般的です。しかし、リピッド系トランスフェクション試薬ではsiRNAの導入が困難な細胞があることが知られています。また、リピッドにより細胞に悪影響が生じることもあります。

Dharmacon Accell siRNA (以下Accell siRNA) は、トランスフェクション試薬を用いずに細胞に導入することのできる新しいタイプのsiRNAです。Accell siRNAには、特殊な化学修飾が施されたヌクレオチドを導入しており、結果として、さまざまな細胞に受動的に取り込まれます。従来トランスフェクション試薬による導入が困難であった細胞 (初代培養細胞・神経細胞・免疫細胞など) での実験例も増えつつあります。

Accell siRNAは、配列デザインおよび化学修飾によりオフターゲット効果も同時に低減しており、ターゲット遺伝子の発現を特異的にノックダウンします。また、トランスフェクション試薬を使わないため、細胞毒性や炎症応答を最小限に抑えることができます。これらの特長からAccell siRNAを繰り返し細胞へ投与することにより、長期的な遺伝子ノックダウンが可能になりました。

本アプリケーションノートでは、Accell siRNAの繰り返し投与による、長期遺伝子サイレンシング実験をご紹介します。

■ 長期的な遺伝子ノックダウンを簡便に実現するAccell siRNA

ターゲット遺伝子がコードするタンパク質の機能を正確に評価するため、以下の理由から長時間にわたる遺伝子ノックダウンが必要な場合があります。

- ターゲット遺伝子のコードするタンパク質が細胞内に豊富に存在する。

- タンパク質の半減期が長く、細胞内に安定して存在する。
- ターゲット遺伝子を発現抑制しても、目的の表現型が現れるまでに時間がかかる。

このような場合、リピッド系トランスフェクション試薬を用いて連続的に複数回のトランスフェクションを行うと、多くの場合細胞毒性や炎症応答を引き起こす可能性があります。また、ウイルスベクターを用いた長期的な遺伝子ノックダウンもよく利用される手法ですが、コストや時間がかかるというデメリットがあります。これらの問題点を簡便に解決して、長期のサイレンシング実験を可能にしたAccell siRNAを用いた実験の流れを紹介します。

■ 長期的な遺伝子ノックダウンのワークフロー

Accell siRNAを用いて長期的な遺伝子ノックダウンを実現する方法の概略を  図1 に示しました。

細胞をトリプシン処理し、細胞数をカウント後、通常の培地 (血清やサプリメント、抗生物質を含む) で24時間培養します。次に、培地をAccell siRNAとAccell delivery mediaとの混合溶液 (Accell delivery mix) に代えてさらに培養します。この24~48時間の培養過程において、細胞内への受動的なトランスフェクション (トランスポート) が進行します。

その後Accell delivery mixを通常の培地と置換し、24~48時間培養を続けます。細胞がコンフルエントになる前に細胞を分け、前述のAccell siRNAの導入プロトコルを繰り返します。細胞がコンフルエントになるまでに時間を要する場合には、細胞を分けずにAccell delivery mixを添加することも可能です。

また、通常の培地とAccell delivery mixとを繰り返し交換して培養しても、細胞への悪影響は最小限に抑えられます。

アプリケーションノート

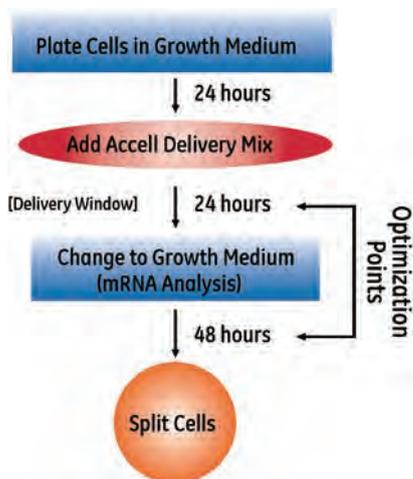


図1 繰り返し導入による長期的な遺伝子ノックダウンの概略

■ PPIBをターゲットとする 長期的な遺伝子ノックダウン

Accell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウンの実証実験として、ハウスキーピング遺伝子であるPPIB (Cyclophilin B, NM_000942) をターゲットとするAccell siRNA (Accell PPIB siRNA) を、トランスフェクションが難しいとされる神経芽細胞腫SH-SY5Y 細胞に繰り返し導入しました。

Accell PPIB siRNAは、3種類の濃度 (100 nM、500 nM、1 μ M) にて導入し、3、7、11、15、19日後のmRNA発現レベルをbranched DNA (bDNA: Panomics) を用いて調べました。実験ではAccell Non-targeting Control siRNA #1をネガティブコントロールとして用いました。

また、siRNAを導入せず培地の交換や継代操作のみを行った細胞に、GAPDHをターゲットとするAccell siRNAを継代ごとに使い、細胞のAccell siRNA導入に関するコントロールとしました。

→図2-a に示すように、Accell siRNAを用いることによって、長期にわたる遺伝子ノックダウンを効率よく実現することができました。Accell PPIB siRNAによる遺伝子ノックダウンは濃度依存的で、1 μ Mにおいて70%以上のノックダウン効果が見られました。5回の継代 (19日間) を通して細胞の生存率は80%程度でした。

また、HeLa細胞を用いて同様の実験を行い、30日間にわたる遺伝子ノックダウンを実現することができました

→図3。

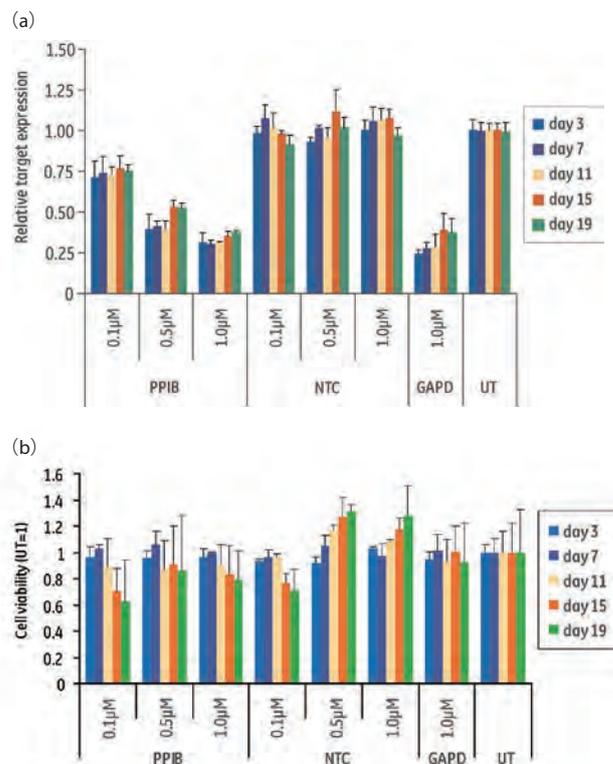


図2 神経芽細胞での19日間にわたる遺伝子ノックダウン

96ウェルプレートに、1ウェルあたり5,000個のSH-SY5Y 細胞をプレATINGし、通常の培地中で24時間インキュベートしました。血清、サプリメント、抗生物質を含む通常の培地で培養後、培地をAccell PPIB siRNA (100 nM、500 nM、1 μ M) あるいはAccell GAPDH (1 μ M) と Accell delivery mediaとの混合溶液 (Accell delivery mix) に置き換えてさらに培養しました。

Accell Nontargeting Control siRNA #1 (NTC; 100 nM、500 nM、1 μ M) をネガティブコントロールとして用いました。48時間後、Accell delivery mixを通常の培地と置換し培養を続けました。以降、上述のAccell siRNAの導入のプロトコルを繰り返しました。

導入3、7、11、15、19 日後のターゲット遺伝子のノックダウン効率 (a) と細胞生存率 (b) について、それぞれbranched DNA (bDNA: Panomics) と alamarBlue (BioSource) を用いて調べました。Accell siRNAを導入せず培地の交換操作のみを行った細胞をコントロールとしました (UT)。

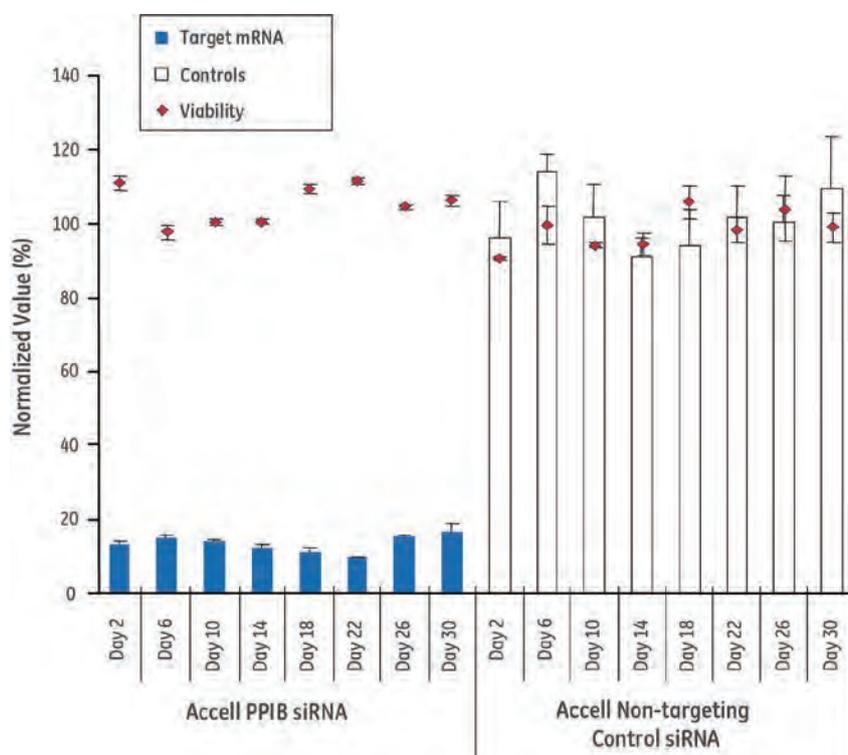


図3 HeLa細胞での30日間にわたる遺伝子ノックダウン

96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000個のHeLa細胞をプレーティングし、通常の培地中で24時間インキュベートしました。血清、サプリメント、抗生物質を含む通常の培地で培養後、培地をAccell PPIB siRNA (1 μ M) とAccell delivery mediaとの混合溶液 (Accell delivery mix) に置き換えてさらに培養しました。

Accell Non-targeting Control siRNA #1 (NTC; 1 μ M) をネガティブコントロールとして用いました。24時間後、Accell delivery mixを通常の培地と置換し培養を続けました。以降、上述のAccell siRNAの導入のプロトコールを繰り返しました。



■ Accell テクノロジーと リポフェクション法の併用

Accell siRNAを用いて長期的な遺伝子ノックダウンを行った細胞に、リポド系トランスフェクション試薬を用いてsiRNAを導入できるかどうか調べました。Accell PPIB siRNAで10日間にわたって処理したHeLa細胞に、GAPDHをターゲットとするsiGENOME siRNA (siGENOME GAPDH siRNA) をトランスフェクションしました。

→図4 より、Accell PPIB siRNAとsiGENOME GAPDH siRNAの両方を導入した細胞では、各遺伝子のmRNAレベルが少なくとも80 %以上抑制されていました。この結果はAccell テクノロジーとスタンダードなリポフェクション法が併用可能であることを示しています。Accell siRNAテクノロジーを用いた実験デザインは柔軟に変更でき、また、Accell siRNAとリポフェクション法を併用することにより、複数の遺伝子を同時にノックダウンすることができます。

■ まとめ

Accell siRNAを用いることで、従来トランスフェクション試薬による導入が困難であった初代培養細胞・神経細胞・免疫細胞などの細胞に導入できる可能性が広がります。また、リポフェクション法では難しかった1ヶ月近い長期間にわたる遺伝子ノックダウン実験を行うことができます。比較的短時間の遺伝子ノックダウンを目的とするときは、Accell siRNA実験条件の至適化はほとんど不要ですが、長期的な遺伝子ノックダウンを行うときは、細胞にあわせてプロトコルを至適化する必要があります。また、適切なコントロールを用いて細胞の生存率や生理状態をモニターし、Accell delivery mix中で繰り返し細胞を培養することによる細胞への影響を確認することが大切です。

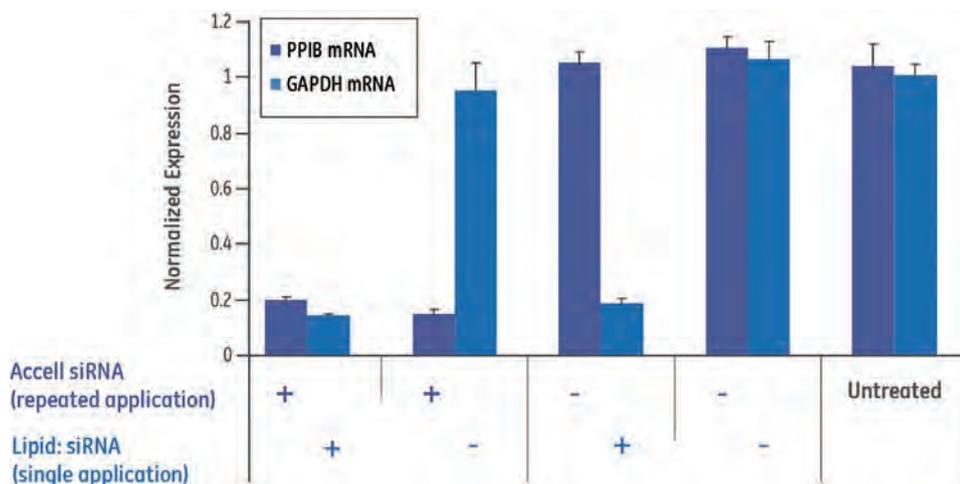


図4 Accell siRNAとリポフェクション法の併用

HeLa細胞を10日間 (3回の継代) にわたってAccell PPIB siRNA (1 μM) で処理しました。10日後に細胞を分配、再プレートングした後に、GAPDHをターゲットとするsiGENOME siRNA (100 nM) を、DharmaFECT 1を用いてトランスフェクションしました。その24時間後に、PPIBとGAPDHのmRNAレベルをbranched DNA (bdNA: Panomics) を用いて調べました。



Accell siRNA文献情報

Dharmacon Accell siRNAは、世界中の主要な研究機関で活用され、貴重な成果を収めています。

Accell siRNAの *in vivo* 実験に関する文献情報は本誌 **➡P.32** をご参照ください。

※ 細胞名に続いて記載されている数字 (青字) は本誌 **➡P.26~P.29** の文献番号を示します。

株化細胞

- ARPE-19 (human retinal epithelial cells、ヒト網膜上皮細胞) - 39
- BxPC3 (pancreatic tumor cell lines、ヒト膵腫瘍細胞株) - 9
- C1 tumor derived cells、C1腫瘍由来細胞 - 52
- Caco-2 (colon colorectal adenocarcinoma、ヒト結腸がん由来細胞) - 27
- CD4+ primary human T cells、CD4+ ヒト初代T細胞 - 4, 71
- CD14+ primary monocytes、CD14+ 初代単核細胞 - 21, 36
- DG-75 human B lymphocytes、DG-75ヒトBリンパ細胞 - 78
- GH3 (rat somatotrophs pituitary cell line、ラット下垂体ソマトラクチン分泌細胞) - 62
- H9 stem cell lines、H9幹細胞株 - 49
- HCT-116 (colorectal carcinoma、結腸直腸がん) - 28
- HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) - 29
- JLN3 (plasma cell leukemia、プラズマ細胞白血病) - 44
- KG1 (human acute myelogenous leukemia (AML) macrophage cell line、ヒト急性骨髄性白血病 (AML) マクロファージ細胞株) - 68
- LUHMES (Lund human mesencephalic cells、Lundヒト中脳細胞) - 69
- MEC1 (human chronic B cell leukemia、ヒト慢性B細胞性白血病) - 14
- MN-1 (ヒト卵巣粘液性嚢胞腺がん細胞株) - 35
- MS1 (mouse pancreatic islet endothelia cells、マウス膵臓ランゲルハンス島血管内細胞) - 22
- NOD CD4+CD25⁻ splenic cells (NODマウスCD4+CD25⁻ 脾臓T細胞) - 41
- NOXA (ミエローマ細胞株: RPMI 8226およびU266細胞株におけるJLN3 NOXA) - 44
- OVCA 420 (ovarian carcinoma、卵巣がん) - 58
- PGA-1 (lymphocytic leukemia B cell line、リンパ性白血病B細胞株) - 67
- RAW264.7 macrophages、RAW264.7マクロファージ - 55
- SHSY5Y (neuroblastoma、神経芽細胞腫) - 12, 25, 66
- SKBR3 (ER-/PR-/HER2+ breast cancer cell line、ER-/PR-/HER2+ 乳がん細胞株) - 72
- SNB19 glioma cells、SNB19 グリオーマ細胞 - 13
- T47D (ductal breast epithelial tumor cell line、ヒト乳がん由来細胞株) - 23
- T98 glioma cells、T98グリオーマ細胞 - 13
- THP-1 monocytes (ヒト単核細胞白血病細胞) - 11, 26, 46, 51, 63
- U266 (peripheral blood B lymphocyte myeloma、末梢血Bリンパ球骨髄腫)
- U937 (leukemic monocyte lymphoma、白血病単核球リンパ腫) - 54

初代細胞 & *in vivo*

- β -islet cells、ランゲルハンス島 β 細胞 - 15
- Bone marrow cells、骨髓細胞 - 10, 17
- Bronchial smooth muscle cells (BSMC)、気管支平滑筋細胞 - 30, 31
- Cardiomyocytes、心筋細胞 - 5
- Cerebellar granule neurons (CGN)、小脳顆粒ニューロン - 8, 70
- Colon stem/progenitor cells、結腸幹/前駆細胞 - 76
- Corneal endothelial cells (adult human CECs)、and *ex vivo* human corneal endothelium、角膜内皮細胞 (ヒト成人)、および生体外角膜内皮 - 75
- Cortical neurons、皮質ニューロン - 1, 8, 45, 59, 69
- Endometrial cells、子宮内膜細胞 - 16
- Endothelial cells、血管内皮細胞 - 7, 37
- Extravillous trophoblasts (EVT)、絨毛外栄養膜 - 32
- Fibroblasts (primary)、繊維芽細胞 (初代) - 73
- Hepatocytes、肝細胞 - 40, 42, 50
- Immortalized B cells、不死化B細胞 - 65
- Keratinocytes、ケラチノサイト - 57
- Lung epithelial cells、肺上皮細胞 - 80
- Lymphocytes、リンパ球 - 47
- Macrophages、マクロファージ - 3, 38, 53
- Mantle cell lymphoma cells (MCL)、マンテル細胞リンパ腫細胞 - 48
- Monocytes、単核球 - 19
- Mouse embryonic fibroblasts (MEF)、マウス胎仔線維芽細胞 - 24
- Naïve fetal T cells、胎仔ナイーブT細胞 - 82
- Natural killer (NK) cell line、ナチュラルキラー細胞株 - 61
- Neonatal mouse ovary、新生仔マウス卵巣 - 81
- Neurons (primary rat)、神経細胞 (初代ラット) - 20
- Neurons derived from iPS cells、iPS細胞由来ニューロン - 74
- Oligodendrocyte precursors、オリゴデンドロサイト前駆体 - 80
- Pancreatic tumor cell lines、膵臓腫瘍細胞株 - 9
- Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)、末梢血単核球 - 6, 34, 85
- Regulatory T cells、制御性T細胞 - 83
- Stem cell-derived peripheral neurons、幹細胞由来末梢ニューロン - 79
- Vascular smooth muscle cells (VSMC)、血管平滑筋細胞 - 2, 64
- *In vivo* skin delivery、*In vivo* 経皮デリバリー - 18
- *In vivo* rat periodontal model、*In vivo* ラット歯周モデル - 33
- *In vivo* mouse intradermal injection、*In vivo* マウス皮内投与 - 43
- *In vivo* mouse model、*In vivo* マウスモデル - 56, 84
- *In vivo* mouse brain、*In vivo* マウス脳 - 69
- *In vivo* rat brain、*In vivo* ラット脳 - 86, 87, 88

References:

1. H. Mortiboys, J. Aasly, *et al.* Ursocholic acid rescues mitochondrial function in common forms of familial Parkinson's disease. *Brain* **136**, 3038-3050 (2013). [[Mouse primary cortical neurons](#)]
2. D. Gomez, K. Kessler, *et al.* Modifications of Chromatin Dynamics Control Smad2 Pathway Activation in Aneurysmal Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **113**, 881 – 890 (2013). [[Human vascular smooth muscle cells \(VSMC\)](#)]
3. S. Jiang, D. Part, *et al.* Mitochondria and AMP-activated Protein Kinase-dependent Mechanism of Efferocytosis. *J. Biol. Chem.* **288**, 26013 - 26026 (2013). [[mouse primary perinatal macrophages](#)]
4. S. Sumitomo, K. Fujio, *et al.* Transcription Factor Early Growth Response 3 Is Associated with the TGF- β 1 Expression and the Regulatory Activity of CD4-Positive T Cells *In vivo*. *J. Immunol.* **191**, 2351 - 2359 (2013). [[CD4+ primary human T cells](#)]
5. F. Beig, J. Schmeckpeper, *et al.* C3orf58, a Novel Paracrine Protein, Stimulates Cardiomyocyte Cell-Cycle Progression Through the PI3K-AKT-CDK7 Pathway. *Circ. Research* **113**, 372 – 380 (2013). [[neonatal cardiomyocytes](#)]
6. T. J. Mulrooney, P. E. Posch, *et al.* DAP12 impacts trafficking and surface stability of killer immunoglobulin-like receptors on natural killer cells. *J. Leukoc. Biology* **94**, 301 – 313 (2013). [[PMBCs](#)]
7. R. Arita, S. Nakao, *et al.* A Key Role for ROCK in TNF- α -Mediated Diabetic Microvascular Damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Science* **54**, 2373 – 2383 (2013). [[cultured microvascular endothelial cells](#)]
8. S. Hannila, M. Siddiq, *et al.* Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Reverses Inhibition by CNS Myelin, Promotes Regeneration in the Optic Nerve, and Suppresses Expression of the Transforming Growth Factor- β Signaling Protein Smad2. *J. Neuroscience* **33**, 5138 – 5151 (2013). [[P6 CGNs and P1 rat cortical neurons](#)]
9. K. E. Johnson, S. Mitra, *et al.* Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **24**, 715 – 733 (2013). [[human pancreatic tumor cell lines BxPC3](#)]
10. S. Yasunaga, M. Ohtsubo *et al.* Scmh1 Has E3 Ubiquitin Ligase Activity for Geminin and Histone H2A and Regulates Geminin Stability Directly or Indirectly via Transcriptional Repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol. Cell. Biology* **33**, 644 – 660 (2013). [[mouse BM cells](#)]
11. G. Lopez-Castejon, N. M. Luheshi, *et al.* Deubiquitinases Regulate the Activity of Caspase-1 and Interleukin-1 β Secretion via Assembly of the Inflammasome. *J. Biol. Chem* **288**, 2721 – 2733 (2103). [[THP-1](#)]
12. G. R. Tundo, D. Sbardella, *et al.* Insulin-degrading Enzyme (IDE): A NOVEL HEAT SHOCK-LIKE PROTEIN. *J. Biol. Chemistry* **288**, 2281 – 2289 (2013). [[SHSY5Y cells](#)]
13. H. J. Seol, J. H. Chang, *et al.* Overexpression of CD99 Increases the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells. *Genes & Cancer* **3**, 535 – 549 (2012). [[T98 and SNB19 glioma cells](#)]
14. A. G. Ramsay, A. J. Clear, *et al.* Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* **120**, 1412 – 1421 (2012). [[MEC1 cells – Human chronic B cell leukemia](#)]
15. M.R. Metukuri, P. Zhang, *et al.* ChREBP Mediates Glucose-Stimulated Pancreatic β -Cell Proliferation. *Diabetes* **61**, 2004 – 2015 (2012). [[human and rat islet cells](#)]
16. E. M. De La Garza, P. A. Binkley, *et al.* Raf-1, a Potential Therapeutic Target, Mediates Early Steps in Endometriosis Lesion Development by Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Endocrinology* **153**, 3911 – 3921 (2012). [[primary endometrial cells](#)]
17. X. Qu, G. Zhuang, *et al.* Induction of Bv8 Expression by Granulocyte Colony-stimulating Factor in CD11b+Gr1+ Cells. *J. Biol. Chemistry* **287**, 19574-19584 (2012). [[primary mouse bone marrow cells](#)]
18. R. P. Hickerson, M. A. Flores, *et al.* Use of self-delivery siRNAs to inhibit gene expression in an organotypic pachyonychia congenita model. *J. Invest. Dermatol* **131(5)**, 1037-44 (2011) [[In vivo skin delivery](#)]
19. A. Nijnik, J. Pistolic, *et al.* The role of the Src family kinase Lyn in the immunomodulatory activities of cathelicidin peptide LL-37 on monocytic cells. *J. Leukoc. Biology* **91**, 599-607 (2012) [[monocytes](#)]
20. A. Vagnoni, M. S. Perkinton, *et al.* Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates A β production. *Human Molecular Genetics* **21(13)**, 2845-54 (2012). [[Rat E18 primary neurons](#)]
21. P. Kuo, M. Huang, *et al.* Lung Cancer-derived Galectin-1 Enhances Tumorigenic Potentiation of Tumor-associated Dendritic Cells by Expressing Heparin-binding EGF-like Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **287**, 9753-9764 (2012). [[CD14+ primary monocytes](#)]
22. M. Franco, P. Roswall, *et al.* Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* **118**, 2906 – 2917 (2011). [[MS1 cells; Mouse pancreatic islet endothelia](#)]

23. A. A. Fiorillo, T. R. Medler, *et al.* HMG2 Inducibly Binds a Novel Transactivation Domain in Nuclear PRLr to Coordinate Stat5a-Mediated Transcription. *Molecular Endocrinology* **25**, 1550 – 1564 (2011). [T47D cells]
24. C. X. George and C. E. Samuel, Host Response to Polyomavirus Infection Is Modulated by RNA Adenosine Deaminase ADAR1 but Not by ADAR2. *Journal of Virology* **85**, 8338 – 8347 (2011). [MEF cells]
25. M. Meguro-Horike, D. H. Yasui, *et al.* Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome. *Human Molecular Genetics* **20(19)**, 3798-810 (2011). [SH-SY5Y]
26. Emily Turner-Brannen, Ka-Yee Grace Choi, *et al.* Inflammatory Cytokines IL-32 and IL-17 Have Common Signaling Intermediates despite Differential Dependence on TNF-Receptor 1. *J. Immunology* **186**, 7127 – 7135 (2011). [THP-1 monocytes]
27. R. Al-Sadi, K. Khatib, *et al.* Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiology* **300**, G1054 - G1064 (2011). [Caco-2 cells]
28. R. J. Boohaker, G. Zhang, *et al.* BAX supports the mitochondrial network, promoting bioenergetics in nonapoptotic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiology* **300**, C1466-C1478 (2011). [HCT-116]
29. K. He, G. Sui, *et al.* Feedback Regulation of Endothelial Cell Surface Plasmin Generation by PKC-dependent Phosphorylation of Annexin A2. *J. Biol. Chemistry* **286**, 15428-15439 (2011). [HUVEC cells]
30. P. L. Kuo, M. S. Huang, *et al.* Signaling pathway of isophorone diisocyanate-responsive interleukin-8 in airway smooth muscle cells. *Eur. Respir. J* **37**, 1226 – 1236 (2011). [BSMCs]
31. P. Kuo, Y. Hsu, *et al.* Bronchial Epithelium-Derived IL-8 and RANTES Increased Bronchial Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation by Krüppel-like Factor 5 in Areca Nut-Mediated Airway Remodeling. *Toxicol. Sci.* **121**, 177-190 (2011). [BSMCs]
32. K. Biadasiewicz, S. Sonderegger, *et al.* Transcription Factor AP-2 α Promotes EGF-Dependent Invasion of Human Trophoblast. *Endocrinology* **152**, 1458 – 1469 (2011). [primary EVT]
33. Q. Li, H. Yu, *et al.* Silencing Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase-2 Arrests Inflammatory Bone Loss. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**, 633 – 642 (2011). [ex vivo and In vivo rat periodontal model]
34. K. Billot, J. Soeur, *et al.* Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* **117**, 1917 – 1927 (2011). [PBMCs]
35. L. Hubers, H. Valderrama-Carvajal, *et al.* HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum. Mol. Genetics* **20**, 553 – 579 (2011). [MN-1 cells]
36. P. Kuo, J. Hung, Lung, *et al.* Cancer-Derived Galectin-1 Mediates Dendritic Cell Anergy through Inhibitor of DNA Binding 3/IL-10 Signaling Pathway. *Journal of Immunology* **186**, 1521 – 1530 (2011). [Monocytes]
37. S. F. Leicht, T. M. Schwarz, *et al.* Adiponectin Pretreatment Counteracts the Detrimental Effect of a Diabetic Environment on Endothelial Progenitors. *Diabetes* **60**, 652 – 661 (2011). [endothelial colony-forming cells (ECFC)]
38. D. N. Petrusca, Y. Gu, *et al.* Sphingolipid-mediated Inhibition of Apoptotic Cell Clearance by Alveolar Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 40322 – 40332 (2010). [Rat alveolar macrophages (AM)]
39. A. Giddabasappa, M. Bauler, *et al.* 17- β Estradiol Protects ARPE-19 Cells from Oxidative Stress through Estrogen Receptor- β . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 5278 – 5287 (2010). [Human retinal epithelial cells ARPE-19 cells]
40. E. Murakami *et al.* Mechanism of Activation of PSI-7851 and its Diastereoisomer PSI-7977. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 34337-34347 (2010). [primary human hepatocytes]
41. J. Zhang *et al.* MEK3 Overexpression Contributes to the Hyperresponsiveness of IL-12-Overproducing Cells and CD4+ T Conventional Cells in Nonobese Diabetic Mice. *Journal of Immunology* **185**, 3554 – 3563 (2010). [NOD CD4+CD25⁻ splenic cells]
42. M. Liao *et al.* Inhibition of Hepatic Organic Anion-transporting Polypeptide by RNA Interference in Sandwich-cultured Human Hepatocytes: An *in vitro* Model to Assess Transporter-mediated Drug-drug Interactions. *Drug Metabolism and Disposition* **38(9)** 1612-1622 (2010). [freshly isolated human hepatocytes]
43. E. Gonzalez-Gonzalez *et al.* Silencing of Reporter Gene Expression in Skin Using siRNAs and Expression of Plasmid DNA Delivered by a Soluble Protrusion Array Device (PAD). *Molecular Therapy* **18(9)**, 1667-74 (2010). [mouse intradermal injection]
44. B. Tunquist *et al.* Mcl-1 Stability Determines Mitotic Cell Fate of Human Multiple Myeloma Tumor Cells Treated with the Kinesin Spindle Protein Inhibitor ARRY-520. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 2046 – 2056 (2010). [multiple myeloma cell lines: JJN3 NOXA in RPMI 8226 and U266]
45. S. Suzuki *et al.* Differential Roles of Epac in Regulating Cell Death in Neuronal and Myocardial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 24248 – 24259 (2010). [primary mouse cortical neurons (E15-17)]

文献情報 

46. S. Winning *et al.* Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B. *Journal of Immunology* **185**, 1786-1793 (2010). [THP-1 monocytes]
47. M. Chetane *et al.* Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C1560 - C1571 (2010). [lymphocytes]
48. S. Desai *et al.* PRDM1 Is Required for Mantle Cell Lymphoma Response to Bortezomib. *Molecular Cancer Research* **8**, 907 - 918 (2010). [mantle cell lymphoma (MCL) cells]
49. S. Byas *et al.* Human Embryonic Stem Cells Maintain Pluripotency after E-Cadherin Expression Knockdown. *FASEB J* **24**, 1b172 (2010). [H9 stem cell lines]
50. B. Mukhopadhyay *et al.* Transcriptional Regulation of Cannabinoid Receptor-1 Expression in the Liver by Retinoic Acid Acting via Retinoic Acid Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 19002-19011 (2010). [cultured mouse hepatocytes]
51. V. Saini *et al.* CXC Chemokine Receptor 4 Is a Cell Surface Receptor for Extracellular Ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 15566 - 15576 (2010). [THP-1 monocytes]
52. I. Barbieri *et al.* Constitutively Active Stat3 Enhances Neu-Mediated Migration and Metastasis in Mammary Tumors via Upregulation of Cten. *Cancer Research* **70**, 2558 - 2567 (2010). [C1 tumor derived cells]
53. J. W. Pery *et al.* Endocytosis of Murine Norovirus 1 into Murine Macrophages Is Dependent on Dynamin II and Cholesterol. *Journal of Virology* **84**, 6163-6176 (2010). [murine macrophages]
54. Z-H. Xue *et al.*, Integrin α M β 2 Clustering Triggers Phosphorylation and Activation of Protein Kinase C δ that Regulates Transcription Factor Foxp1 Expression in Monocytes. *Journal of Immunology* **184**, 3697-3709 (2010). [U937 cells; human leukemic monocyte lymphoma]
55. M. Steenport *et al.*, Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Induce Macrophage MMP-9: Evidence for the Role of TNF- α and Cyclooxygenase-2. *Journal of Immunology* **183**(12), 8119-27 (2009). [RAW264.7 macrophages]
56. A. DiFeo *et al.* KLF6-SV1 Is a Novel Antiapoptotic Protein That Targets the BH3-Only Protein NOXA for Degradation and Whose Inhibition Extends Survival in an Ovarian Cancer Model. *Cancer Research*. **69**, 4733-41 (2009). [In vivo mouse model]
57. A. Kovalenko *et al.* Caspase-8 Deficiency in Epidermal Keratinocytes Triggers an Inflammatory Skin Disease. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 2161 - 2177 (2009). [Keratinocytes]
58. C. Bartholomeusz *et al.* PEA-15 Induces Autophagy in Human Ovarian Cancer Cells and is Associated with Prolonged Overall Survival. *Cancer Research* **68**, 9302-9310 (2008). [OVCA 420; ovarian carcinoma]
59. A.M. Dolga *et al.* TNF- α -mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF- κ B-dependent up-regulation of K2.2 channels. *Journal of Neurochemistry* **107**, 1158-1167 (2008). [mouse primary cortical neurons]
60. F. Mir and G.C. Le Breton. A Novel Nuclear Signaling Pathway for Thromboxane A2 Receptors in Oligodendrocytes: Evidence for Signaling Compartmentalization during Differentiation. *Mol. Cell. Biology* **28**, 6329-6341 (2008). [oligodendrocyte precursors]
61. C.B. Lai, Y.Zhang, *et al.* Creation of the two isoforms of rodent NKG2D was driven by a B1 retrotransposon insertion. *Nucleic Acids Research* **37**(9), 3032-43 (2009). [mouse NK cell line]
62. G. A. Peters *et al.* The double-strand RNA-binding protein, PACT, is required for postnatal anterior pituitary proliferation. *PNAS* **106**(26), 10696-10701 (2009). [GH3; rat somatotrophs (pituitary cell line) and L β T2 gonadotrophs]
63. N. Mookherjee *et al.* Intracellular Receptor for Human Host Defense Peptide LL-37 in Monocytes. *J. Immunol.* 2009, **183**. 2688-2696 [THP-1; human monocytes]
64. B. Zheng *et al.* Krüppel-like Factor 4 Inhibits Proliferation by Platelet-derived Growth Factor Receptor β -mediated, Not by Retinoic Acid Receptor α -mediated, Phosphatidylinositol 3-Kinase and ERK Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* **284** (34), 22773-22785 (2009). [VUMC; primary rat vascular smooth muscle cells]
65. D. Smirnov *et al.* Genetic Analysis of Radiation-induced Changes in Human Gene Expression. *Nature* **459**, 587-591 (2009). [immortalized B cells]
66. U. Dreses-Werringloer *et al.* A Polymorphism in CALHM1 Influences Ca²⁺ Homeostasis, Ab Levels, and Alzheimer's Disease Risk. *Cell* **133**, 1149-1161 (2008). [SHSY-5Y; human neuroblastoma]
67. A.M. McElligott *et al.* The Novel Tubulin-Targeting Agent Pyrrolo-1,5-Benzoxazepine-15 Induces Apoptosis in Poor Prognostic Subgroups of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer* **69**(21), 8366-75 (2009). [PGA-1; EBV-transformed chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cell line]
68. Z. Guo *et al.* PIM inhibitors target CD25-positive AML cells through concomitant suppression of STAT5 activation and degradation of MYC oncogene. *Blood* **124**, 1777-1789 (2014) [KG1; human AML macrophage cell line]

69. H. Xu *et al.* Tau Silencing by siRNA in the P301S Mouse Model of Tauopathy. *Current Gene Therapy* **14**, 343-351 (2014) [[mouse E15 cortical neurons, LUHMES cells, In vivo mouse brain injection](#)]
70. A. Collado-Alsina *et al.* The Regulation of Synaptic Vesicle Recycling by cGMP-Dependent Protein Kinase Type II in Cerebellar Granule Cells under Strong and Sustained Stimulation. *J. Neuroscience*. 2014; **34**, 8788-8799. [[cerebellar granule cells](#)]
71. M. Freeley *et al.* RNAi Screening with Self-Delivering Synthetic siRNAs for Identification of Genes That Regulate Primary Human T Cell Migration. *J. Biomolecular Screening*. 2015; DOI: [10.1177/1087057115588288](#) [[Primary human T-cells](#)]
72. S. Das, G. Sondarva, *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Impedes MLK3 Kinase Activity to Support Breast Cancer Cell Survival. *J. Biol. Chemistry* **290(35)**, 21705–21712 (2015). [[SKBR3 \(ER-/PR-/HER2+ breast cancer cell line\)](#)]
73. J. Bruban, G. Voloudakis, *et al.* Presenilin 1 is necessary for neuronal, but not glial, EGFR expression and neuroprotection via gamma-secretase-independent transcriptional mechanisms. *FASEB J.* **29**, 3702-3712 (2015) [[murine primary cortical neurons \(E15.5\) and primary fibroblasts](#)]
74. M. Komatsu, H. E. Wheeler, *et al.* Pharmacogenetic in Paclitaxel-Induced Sensory Peripheral Neuropathy. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4337 – 4346 (2015) [[Neurons derived from iPS cells](#)]
75. J. G. Lee and M. Heur. WNT10B Enhances Proliferation through β -Catenin and RAC1 GTPase in Human Corneal Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 26752-26764 (2015) [[Adult human corneal endothelial cells \(CECs\) and ex vivo human corneal endothelium](#)]
76. I. Nasri, D. Bonnet, *et al.* PAR2-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **311**, G221 - G236 (2016) [[colon stem/progenitor cells](#)]
77. H. Lee, J.W. Lee, *et al.* Inflammation and Inflammatory Mediators in Kidney Disease: Cln 3-requiring 9 is a negative regulator of Th17 pathway-driven inflammation in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **311**, F505-F519 (2016)
78. T. Tagawa, M. Albanese, *et al.* Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *J. Exp. Med.* **213(10)**, 2065-2080 (2016) [[human B cells, DG-75](#)]
79. D.L. Hertz, K. Owzar, *et al.* Pharmacogenetic Discovery in CALGB (Alliance) 90401 and Mechanistic Validation of a VAC14 Polymorphism that Increases Risk of Docetaxel-Induced Neuropathy. *Clin. Cancer Res.* **22**, 4890-4900 (2016). [[stem cell-derived peripheral neuronal cells](#)]
80. S. Das, M. Miller, *et al.* GSDMB induces an asthma phenotype characterized by increased airway responsiveness and remodeling without lung inflammation. *PNAS*. **113(46)** 13132–13137 (2016) [[human lung epithelial cells](#)]
81. I.B. Sharum, S. Granados-Aparici, *et al.* Serine threonine kinase receptor associated protein regulates early follicle development in the mouse ovary. *Reproduction*, **153**, 221 - 231. [[neonatal mouse ovary](#)]
82. T. D. Burt, J.M. McCune *et al.* Lin28b Regulates Fetal Regulatory T Cell Differentiation through Modulation of TGF- β Signaling. *J. Immunol.*, **197**, 4344 - 4350. [[naïve fetal T cells](#)]
83. K. Morita, T. Okamura, *et al.* Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- β 3 production. *PNAS*, **10**.1073/pnas.1611286114. [[regulatory T cells](#)]
84. N.K. Banda, S. Acharya, *et al.* Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease 1/3 Cleavage of Pro-Factor D into Factor D *In vivo* and Attenuation of Collagen Antibody-Induced Arthritis through Their Targeted Inhibition by RNA Interference-Mediated Gene Silencing. *J. Immunol.*, **197**, 3680 - 3694. [[In vivo mouse injection; liver and adipose tissue knockdown](#)]
85. Y. Deng, J. Zhao, *et al.* Decreased SMG7 expression associates with lupus-risk variants and elevated antinuclear antibody production. *Ann. Rheum. Dis.*, **75**, 2007 - 2013. [[PBMCs](#)]
86. K. A. Mitchnick, S. Creighton, *et al.* Differential contributions of de novo and maintenance DNA methyltransferases to object memory processing in the rat hippocampus and perirhinal cortex - a double dissociation. *European Journal of Neuroscience*, **41(6)**, 773-786. [[infusion via intracranial cannula \(rat\)](#)]
87. L. Huang *et al.* Phosphoinositide 3- Kinase Gamma Contributes to Neuroinflammation in a Rat model of Surgical Brain Injury. *The Journal of Neuroscience*, **35(29)**, 10390-10401 [[rat brain, intracerebroventricular administration](#)]
88. H. Nakajima *et al.* Nuclear-translocated Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Activation during Oxidative/Nitrosative Stress in Stroke. *Journal of Biological Chemistry*, **290(23)**, 14493-14503. [[rat brain – intracerebroventricular injection](#)]



まさか、こんなに簡単に *in vivo* で siRNAを神経細胞へ導入できるとは!

中嶋 秀満 様、久保 岳也 様、板倉 正典 様

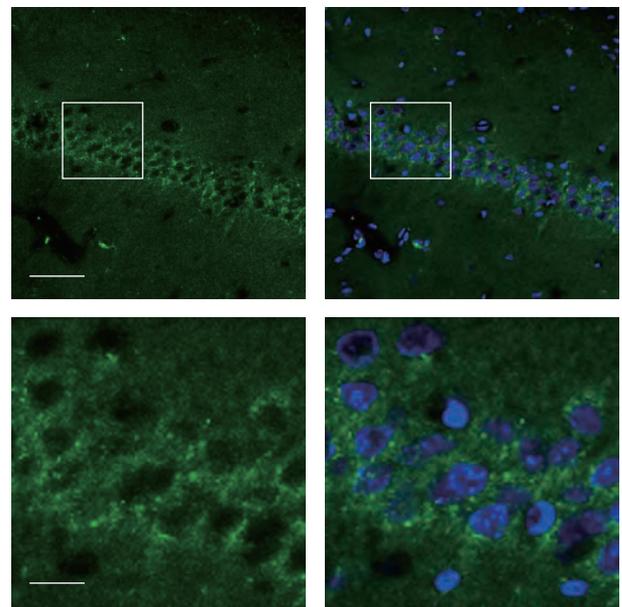
大阪府立大学大学院 生命環境科学域 獣医学類 動物構造機能学分野 (応用薬理学教室)

siRNAのトランスフェクションが難しいとされている神経細胞。「培養細胞での導入実験では、siRNAの導入がうまくいかず結果が得られなかったので、*in vivo*での導入実験がうまくいくはずがないと思っていました。」と当時をふりかえり、お話しくださった大阪府立大学の中嶋先生と久保様 (当時大学院3年生) に、実験期間わずか3ヶ月で、*in vivo*でのトランスフェクションにおいて驚きの結果をもたらした理由をお伺いしました。

*in vivo*での トランスフェクション試薬の選定

当研究室では、アルツハイマーやパーキンソン病などの細胞の凝集に起因するとされている神経変性疾患の病態解明と創薬研究を中軸に研究を進めています。そのため、ターゲットとなる遺伝子をラットやマウスの神経細胞内でノックアウトした時の細胞の挙動やシグナル伝達経路を、*in vivo*で詳細に観察したいと考えていました。当時、論文等で *in vivo*でのトランスフェクションの方法を調査しましたが、神経細胞が未発達な胎生動物での報告しかなく、トランスフェクション試薬とのコンジュゲートで行う方法が一般的でした。また我々は成熟動物での遺伝子ノックダウンを企図していましたので、ノックダウン効率が満足に出るのだろうかという懸念もありましたし、さらに導入試薬を使用することで、細胞毒性や脳に与える影響、特に炎症の心配がありました。そんな折、「トランスフェクション試薬いらず」と銘打った Dharmacon Accellのフライヤーを入手しました。そこには、遺伝子導入試薬なしでsiRNAの導入ができること、さらに Accellをトランスフェクションした海馬をスライスしたデータが掲載されていました。そのデータを拝見し、これは *in vivo*の系でも使えるのではないかと物は試しに使用してみることにしました。

※ Accell siRNAは独自の化学修飾により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できるsiRNAです。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地 (Accell siRNA delivery media) と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でも



上段：マウス海馬 CA1領域錐体細胞における FAM-labeled control siRNAの取り込み
右図：核染色 (DAPI) とのマージ像、Scale Bar = 100 μm
下段：上段の白枠の拡大像
Scale Bar = 10 μm

RNAi実験を可能としました。トランスフェクション試薬による細胞毒性を回避でき、配列デザインと化学修飾によりオフターゲット効果を最大限抑えているため、目的の遺伝子をより特異的にノックダウンします。

*in vivo*でのトランスフェクション方法

当時、siRNAをダイレクトに脳内微量投与で導入するという事例はなかったため、とにかく試してみようという感覚でした。研究対象の遺伝子がちょうどAccellのコントロールキットに含まれるGAPDHだったため、まずコントロールキットを試しに購入しました。ICV (intracerebroventricular) でラットの側脳室内に直接投与し、3日間飼育後、4日目に脳切片を作成し、蛍光顕微鏡観察しました。

※ コントロールキットには、Accell Cyclophilin B Control siRNA (ポジティブコントロール)、Accell GAPD Control siRNA (ポジティブコントロール)、Accell Non-Targeting siRNA (ネガティブコントロール)、Accell (GreenまたはRed) Non-Targeting siRNA (蛍光標識ネガティブコントロール)、5x siRNA buffer (1.5 ml)、Accell siRNA delivery media (100 ml) が含まれています。

先生、光ってます!

下の階の共焦点顕微鏡室にいた久保君から、興奮気味の電話がかかってきました。「先生、光ってます!」その声を聞いて、私も慌てて暗室に向かいました。

顕微鏡を覗くと、蛍光標識されたネガティブコントロールが細胞内に導入されたことを示す、強い蛍光発光が見られました。

siRNAが非特異的に全体的に拡散しているのかと疑いましたが、よく見ると間違いなく神経細胞の形態に取り込まれていました。海馬は、錐体型の神経細胞が層状に配列しており、観察が容易なのですが、特にその部位で見事なほど綺麗に染まっていました。

さらに、大脳皮質、線条体、中脳、驚いたことに小脳にまでも、軒並み導入されていました。大型の小脳プルキンエ細胞への導入も見事でした。中でも、特に興味深かったことは神経細胞に特異的にトランスフェクションされていたことです。グリア細胞、オリゴデンドロサイト、マイクログリアなどには導入がほとんど観察されませんでした(各マーカー抗体と神経細胞のマーカー抗体NeuN二重蛍光染色: 参考文献3参照)。Accellの脳室内投与によって非常に手軽に、アダルトラットの神経細胞に特異的にトランスフェクションして目的の遺伝子をノックダウンできることがわかりました。

このファーストトライアルで遺伝子導入、免疫染色とウェスタンブロットングで遺伝子のノックダウン結果を確認し、実験自体は3ヶ月という短期間で終了しました。もし、他のトランスフェクション試薬を使用していたら、トランスフェクション効率の至適化の条件検討に時間を要するため、このような短期間で行うことは不可能だったでしょう。

長期ノックダウンの可能性も

今回の検証では脳室投与から4日目でのノックダウンを確認しましたが、さらに延長して10日間までフォローしています(1)。確認した結果、1週間後までノックダウンが継続できていることがわかりました。現在、さらに長期ノックダウンを検証中です。

※ 海馬の初代培養でAccellを投与して16日間ノックダウンが継続したというデータがあります。

また、Accellを導入して、経時変化を観察したところ面白い知見も得られました。導入されたsiRNAは、はじめは樹状突起、軸索等を含む神経細胞全体に拡散していたのですが、時間



写真は久保様(左)、中嶋様(中央)、板倉様(右)

が経つにつれ、細胞体に集まってきたということです。

最後に

Accellを用いて、*in vivo*でマウス、ラット等の実験動物の神経細胞に特異的に、siRNAをトランスフェクションすることができました。しかも、脳室投与するだけという簡単な作業だけであるところが非常に助かっています。今後もAccellを使用して、実験を継続していく予定です。

中嶋先生、久保様、板倉様、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客さまの使用経験に基づく記載です。

参考文献

1. Itakura, Masanori. & Nakajima, Hidemitsu. & Kubo, Takeya. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Aggregates Accelerate Amyloid- β Amyloidogenesis in Alzheimer Disease. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **290**,26072-26087(2015)
2. Nakajima, Hidemitsu. & Kubo, Takeya. & Itakura, Masanori. *et al.* Nuclear-translocated Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Activation during Oxidative/Nitrosative Stress in Stroke. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **290**,14493-14503(2015)
3. Nakajima, Hidemitsu. & Kubo, Takeya. & Itakura, Masanori. *et al.* A rapid, targeted, neuron-selective, *in vivo* knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *Journal of Biotechnology* **157**,326-333(2012)

大阪府立大学大学院
生命環境科学域 獣医学類 動物構造機能学分野
(応用薬理学教室)のHPはこちら

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pham/>



Dharmacon siRNA *in vivo* 使用事例の文献情報

A selection of publications demonstrating Dharmacon siRNA for *in vivo* applications:

1. R.H.E. Chong, E. Gonzalez-Gonzalez, *et al.* Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: *In vitro* and *in vivo* proof-of-concept. *Journal of Controlled Release* **166**(3), 211-219 (2013).
 - **Dharmacon™ Accell™ siRNA delivered by microneedle treatment to paws (mouse)**
2. C. Cheng, R. Haasdijk, *et al.* Endothelial cell-specific FGD5 involvement in vascular pruning defines neovessel fate in mice. *Circulation* **125**(25), 3142-3158 (2012).
 - **Accell siRNA delivered by intravitreal injections into the eye (mouse)**
3. H. Nakajima, T. Kubo, *et al.* A rapid, targeted, neuron-selective, *in vivo* knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J. Biotechnol.* **157**(2), 326-333 (2012).
 - **Accell siRNA delivered by injection into the cortical region of the brain (rat)**
4. P.A. Singleton, T. Mirzapoiazova, *et al.* High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **299**, L639-L651 (2010).
 - **Dharmacon™ siSTABLE™ siRNA delivered by intrajugular ACE antibody-conjugated liposomal delivery (mouse)**
5. M. Snapyan, M. Lemasson, *et al.* Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neuroscience* **29**(13), 4172-4188 (2009).
 - **siSTABLE siRNA using 7s osmotic pump into carotid artery (mouse)**
6. H. Watanabe, H. Saito, *et al.* Activation of phosphatidylinositol-3 kinase regulates pancreatic duodenal Homeobox-1 in duct cells during pancreatic regeneration. *Pancreas* **36**(2):153-159 (2008).
 - **siSTABLE siRNA delivered by hydrodynamic tail vein injection (mouse)**
7. S.D. Larson, L.N. Jackson, *et al.* Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. *Surgery* **142**(2), 262-269 (2007).
 - **Fluorescent-labeled siRNA; a comparison of delivery by hydrodynamic IV injection, standard IV injection, intraperitoneal administration and rectal administration (mouse)**
8. N.C. Henderson, A.C. Mackinson, *et al.* Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**(13), 5060-5065 (2006).
 - **siSTABLE siRNA delivered by hydrodynamic tail vein injection (mouse)**
9. A. DiFeo, F. Huang *et al.* KLF6-SV1 Is a Novel Antiapoptotic Protein That Targets the BH3-Only Protein NOXA for Degradation and Whose Inhibition Extends Survival in an Ovarian Cancer Model. *Cancer Research* **69**, 4733-41 (2009)
 - **Accell siRNA delivered to tumor via intraperitoneal injection (mouse)**
10. MP Zafra, C. Mazzeo *et al.* Gene Silencing of SOCS3 by siRNA Intranasal Delivery Inhibits Asthma Phenotype in Mice. *PLOS ONE* **9**(8), e105924, doi:10.1371/journal.pone.0105924 (2014)
 - **Accell siRNA delivered intranasally to lungs (mouse)**
11. H. Xu, TW. Rosler *et al.* Tau Silencing by siRNA in the P301S Mouse Model of Tauopathy. *Current Gene Therapy* **14**, 343-351 (2014)
 - **Accell siRNA delivered via intracerebral stereotactic injection to brain (mouse)**
12. K.A. Mitchnick, S. Creighton, *et al.* Differential contributions of *de novo* and maintenance DNA methyltransferases to object memory processing in the rat hippocampus and perirhinal cortex - a double dissociation. *European Journal of Neuroscience* **41**(6), 773-786 (2014)
 - **Accell siRNA delivered via intracranial cannula infusion (rat)**
13. Lei Huang *et al.* Phosphoinositide 3- Kinase Gamma Contributes to Neuroinflammation in a Rat model of Surgical Brain Injury. *The Journal of Neuroscience* **35**(29): 10390-10401 (2015) [[rat brain, intracerebroventricular administration](#)]
14. Hidemitsu Nakajima *et al.* Nuclear-translocated Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Activation during Oxidative/Nitrosative Stress in Stroke. *The Journal of Biological Chemistry* **290**(23), 14493-14503 (2015) [[rat brain – intracerebroventricular injection](#)]



siRNA実験で、オフターゲット効果がほとんどなくなり、フェノタイプもはっきり出るように

荻原 秀明 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ ゲノム生物学研究分野

siRNA実験においてオフターゲット効果と考えられる細胞死が起こり、それ以上実験が進められず、ご苦労されていた荻原先生にどう乗り越えて結果を出されたのか、お伺いしました。

オフターゲット効果を抑えたい

私たちの研究室では、肺がんの中でも悪性度が高い肺小細胞がんや悪性リンパ腫などさまざまながんで、遺伝子同士相互に補い合い機能し、両方の遺伝子が機能しなくなるとがん細胞が死滅する「合成致死」の関係にある遺伝子を探索しています。

中でも変異頻度の高い遺伝子に着目し、人工的にノックダウンしてそのフェノタイプを解析するため、数種類のがん細胞に対してsiRNAを用いた遺伝子ノックダウン実験を行っていました。すると、ある条件では細胞死が起こり、フェノタイプの解析ができなくなりました。解決するためにいくつかのメーカーのsiRNAを検討し、トランスフェクション試薬を変え、条件を最適化しましたが、状況が変わらないことからsiRNA自体のオフターゲット効果の可能性を考えました。

そんな時に目に留まったのが、特殊な修飾*によりオフターゲット効果を抑えるDharmaconのON-TARGET^{plus} siRNAでした。

* ON-TARGET^{plus}修飾は、センス鎖とアンチセンス鎖の両鎖に対する独自の化学修飾です。オフターゲット効果を抑えるとともに、ターゲット遺伝子に対する特異性を高めます。

使ってみたところ、細胞死が起こらなくなり、フェノタイプもはっきり出るようでした。それ以来、ON-TARGET^{plus} siRNAを使い続けています。



写真は荻原様（左から2番目）

荻原先生、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客様の使用経験に基づく記載です。

参考文献

Ogiwara H, *et al.* Targeting p300 addiction in CBP-deficient cancers causes synthetic lethality via apoptotic cell death due to abrogation of MYC expression. *CANCER DISCOVERY*: 2016 Apr;6(4):430-45. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0754. Epub 2015 Nov 24

国立がん研究センター研究所
分子診断・個別化医療開発グループ ゲノム生物学研究分野のHPはこちら

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/genome_biology/index.html

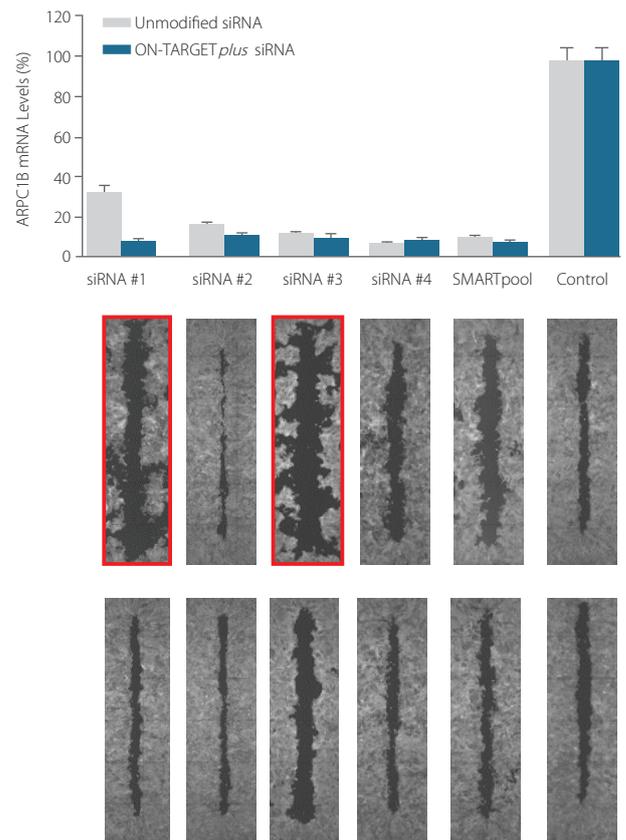


製品情報

ON-TARGET^{plus} siRNAが オフターゲット効果の低減を実現

siRNA実験では、標的とは無関係な遺伝子の発現を抑制してしまうオフターゲット効果を常に意識する必要があります。このオフターゲット効果によって、「siRNAの配列によって異なる結果が出る」ことがあります。オフターゲット効果を抑えるには配列デザインをユニークな配列にする、使用するsiRNA量を減らすなど対策がありますが、実はそもそもオフターゲット効果が少ないsiRNAもあります。それが、DharmaconのON-TARGET^{plus} siRNAです。センス鎖、アンチセンス鎖両方に異なる修飾を施し、オフターゲット効果を抑えてターゲット遺伝子に対する特異性を向上させたsiGENOME siRNAのアップグレード版です。では、オフターゲット効果を抑えることで、どれだけの影響がでるかHarvard Medical SchoolのJoan Brugge博士の実験例を見てみましょう。

乳がん細胞株を用いてARPC1Bの抑制による細胞遊走への影響をUnmodified siRNAとON-TARGET^{plus} siRNAで比較したものです。ARPC1B mRNAに対する4つの配列を設計したUnmodified siRNAおよびON-TARGET^{plus} siRNAを導入した細胞をスクラッチし、細胞遊走によるスクラッチ部分の面積が小さくなる様子を評価しました。UnmodifiedでもON-TARGET^{plus}でも、ARPC1B mRNAレベルは4配列全て抑制されました。しかし、未修飾のsiRNAを使用した場合、siRNAによっては他のsiRNAを投与した場合とは異なる表現型が観察されました（#1、3）。その原因はオフターゲット効果と推察されます。一方、ON-TARGET^{plus} siRNAを投与した場合は、4種類のsiRNA全てにおいて同様の表現型が観察されました。これは、ON-TARGET^{plus} siRNAのオフターゲット効果が低減されているためと考えられます。このようにON-TARGET^{plus} siRNAには、オフターゲット効果を抑制するためさまざまな工夫が凝らされています。





SMARTpoolとCherry-pickライブラリーの組合せは 標的遺伝子スクリーニングのファーストチョイスにおすすめ

国政 和宏 様

公益財団法人 がん研究会 がん化学療法センター ゲノム研究部

新たながん分子標的の探索・同定を目指し、siRNAを用いて実験されているがん研究会の国政和宏様に、スクリーニング実験の際にご使用されているsiRNAライブラリーについて伺いました。

るので、スループット高く測定が行えることに加え、IN Cell Analyzer のソフトウェアによってその後の数値化も容易に行うことができました。



SMARTpool →P.36 なら 1遺伝子1本で実験が済みます

我々の研究室では、がん微小環境におけるがん細胞の適応応答に着目し、新規制御分子の探索・同定から、がん微小環境選択的な治療法の開発に向け、研究に取り組んでいます。その中で、siRNA実験は、標的候補分子のタンパク質量をおさえたときに、がん細胞の微小環境ストレスに対する適応応答がどのように変化するかなどを評価するために行っています。

以前は、1遺伝子に対して配列の異なる複数のsiRNAが“別々に”提供される他社のsiRNAを使用していましたが、数種類から最大40種類ぐらいのがん細胞を用いて標的の評価を行う際には、配列種類分の作業量が発生しますので、とても労力がかかっていました。また、配列によって異なる結果が出た場合はどちらを信じていいのか判別が難しくなり、その検証に更なる労力が必要となってしまう、円滑なスクリーニングの妨げになっておりました。

そこで現在は、siRNAスクリーニングに、1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAが“1本のチューブ”に入って提供されるDharmaconのON-TARGETplus SMARTpool siRNAを使用するようにしています。SMARTpool siRNAを導入後は、1遺伝子に対して1配列分の作業で済むので、作業の大幅な効率化が図れました。また、確実にノックダウンできるように設計されているので、結果の判断もスムーズに行えています。さらに、このようなsiRNAスクリーニングにより得られた結果の一部を他社のsiRNAを用いて検証することで、結果の妥当性を確認するという流れで研究を進めております。

実際にこの流れを適用した事例では、ある遺伝子をsiRNAによりノックダウンした細胞を用い、その下流にあるタンパク質の挙動をイメージングサイトメーター（GE Healthcare IN Cell Analyzer 6000）を使用して確認しております。数百種類におよぶサンプルをウェスタンブロットングすることくらべ、イメージングサイトメーターでは、抗体染色したサンプルをプレートのまま測定でき

Cherry-pickライブラリーは 遺伝子が自由に選べて配置も自由。 最低発注数も20種から

DharmaconのCherry-pickライブラリーでは自由に遺伝子が選べて、96ウェルまたは384ウェルプレートの好きな位置にsiRNAを配置できます →P.42。量も遺伝子ごとに自由に変えることができます。さらに0.1~2 nmolの小容量から購入できて、価格も1遺伝子あたり数万円程度からと、とてもリーズナブルです。

スクリーニングの際には関連遺伝子や関連パスウェイなどであっという間に20種類ぐらいになりますので、最低発注数が20種類以上というのも、多すぎるということはないと思います。スクリーニングにはとても使いやすいフォーマットだと思っています。Web上で遺伝子を選択して、フォーマットを選ぶと、見積りもすぐに表示され、そのまま注文もできるので使い勝手もよいです。

参考文献

Nagasawa I, Kunimasa K *et al* BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem Biophys Res Commun* 22; 482(4):1491-1497 (2017)

国政様、お忙しい中貴重なお時間とご意見をありがとうございました。

※ お客様の使用経験に基づく記載です。

公益財団法人 がん研究会
がん化学療法センター ゲノム研究部のHPはこちら

[www.jfcr.or.jp/chemotherapy/
department/genome/index.html](http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/genome/index.html)

製品情報



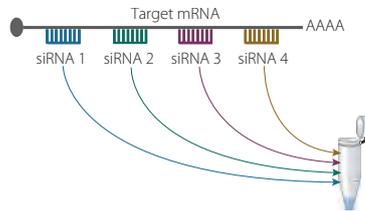
デザイン済みsiRNA製品フォーマット

あらかじめ配列がデザインされたsiRNA製品は、遺伝子1種類に対して、ノックダウン効果と特異性の高い4種類のsiRNAをデザインしています。これらのsiRNAは、4種類のプール、4種類のセット、1種類ごとの製品フォーマットにより提供しています。siRNAを使う実験の全体的な実験計画を考慮して選択します。各種フォーマットの製品を組み合わせる例を下記に示します。



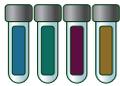
SMARTpool

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAを、Pool（混合物）として1本のチューブに入れた製品です。ノックダウン効率の向上と、オフターゲット効果の低減に効果があります。



ステップ 1

実験のはじめの段階ではSMARTpoolを用いて表現型を確認します。SMARTpoolは4種類のsiRNAからなるため、高確率で高効率にノックダウンでき、siRNAを用いる実験操作・時間を抑えられる製品です。



Set of 4

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAをそれぞれ個別のチューブに入れ、チューブ4本で1セットとした製品です。

ステップ 2

Step 1で観察された表現型について、SMARTpoolに含まれる個々のsiRNAで確認します。配列の異なる複数のsiRNAを用いて確認することにより、実験結果の信頼性が向上します（研究内容によりオプション）。

Set of 4 Upgrade

Set of 4と同じ内容の製品です。同一のターゲット遺伝子に対するSMARTpoolを購入した方のための、価格を抑えたアップグレード用製品です。

※ SMARTpoolを購入せずに4種類のsiRNAの効果を個別に検討する場合は **Set of 4** をお使いください。



Individual

Set of 4フォーマットの4種類のsiRNAを、1種類（チューブ1本）ごとの個別包装とした製品です。

ステップ 3

特定のsiRNAを用いて、スケールアップまたは継続的な実験を行う場合は、Step 2で確認された個別のsiRNAを用いて実験を進めます（研究内容によりオプション）。



Dharmacon siRNAライブラリー文献情報

DharmaconのsiRNAライブラリー製品は、世界中の主要な研究機関で活用され、貴重な成果を収めています。

■ 全ゲノムライブラリー

真正細菌の感染に関与する遺伝子の探索

Kuhbacher A *et al.* Genome-Wide siRNA Screen Identifies Complementary Signaling Pathways Involved Infection and Reveals Different Actin Nucleation Mechanisms during *Listeria* Cell Invasion and Actin Formation. *mBio* **6**(3), e00598-15. (2015)

使用ライブラリー：Human ON-TARGET \plus siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGET \plus Individual siRNAおよび他社製のsiRNA

クローン病感受性遺伝子であるNOD2の活性化によるインターロイキン8の分泌を制御する遺伝子の探索

Warner N *et al.* A Genome-wide Small Interfering RNA (siRNA) Screen Reveals Nuclear Factor- κ B (NF-independent Regulators of NOD2-induced Interleukin-8 (IL-8) Secretion. *J. Biol. Chem.* **289**, 28213-28224

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGET \plus SMARTpool siRNA

クローン病感受性遺伝子であるNOD2の関与するシグナル伝達系を制御する遺伝子の探索

Warner N *et al.* A Genome-wide siRNA screen reveals positive and negative regulators of the NOD2 and signaling pathways. *Science Signaling* **6**, 258 (2013).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGET \plus SMARTpool siRNA

クラスリンでコートされた被覆小胞の原形質膜における形成を制御する遺伝子の探索

Kozik P *et al.* A human genome-wide screen for regulators of clathrin-coated vesicle formation reveals role for the V-ATPase. *Nat. Cell Biol.* **15**, 50-60 (2013).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGET \plus SMARTpool siRNA

ヒトES細胞において自己複製および多様性の特性を制御する遺伝子の探索

Chia NY *et al.* A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* **468**, 316-320 (2010)

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

mTORC1シグナル伝達系の阻害に関与する遺伝子の探索

Hoffman GR *et al.* A high-throughput, cell-based screening method for siRNA and small molecule signaling using the In Cell Western technique. *Assay Drug Development Technologies* **8**(2), 186-199

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

マウスES細胞において自己複製に必要な遺伝子の探索

Hu G *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required self renewal. *Genes Dev.* **23**(7), 2837-2848 (2009).

使用ライブラリー：Mouse siGENOME siRNA Library – Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Mouse siGENOME Set of 4 siRNA

文献情報 

Kinesin-5 inhibitorの活性化あるいは抑制に関与する遺伝子の探索

Tsui M *et al.* An intermittent live cell imaging screen for siRNA enhancers and suppressors of a kinesin-5inhibitor. *PLoS ONE* **4**(10), e7339 (2009).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

HIV感染に関わる宿主細胞の遺伝子の探索

Brass A *et al.* Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* **319**, 921-926 (2008)

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

西ナイルウイルス感染に影響するヒト遺伝子の探索

Krishnan MN *et al.* RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* **455**, 243-247 (2008).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

抗がん剤に対する細胞の応答性に関与する遺伝子の探索

Whitehurst AW *et al.* Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* **446**, 815-819 (2007).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library - Genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNAおよび、それとは別配列の4種類のsiRNAのpool

■ **コレクションライブラリー**

TRIM5a抗ウイルス活性に必要なユビキチン結合酵素 (E2) 遺伝子の探索

Fletcher *et al.* TRIM5a requires Ube2W to anchor Lys63-linked ubiquitin chains and restrict reverse transcription. *The EMBO J.* **34**, 2078–2095 (2015).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Ubiquitin conjugation subset – SMARTpool

DNA損傷に対するES細胞のアポトーシス応答を調節するユビキチン結合酵素遺伝子の探索

von Stechow *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase ARIH1 Protects against Genotoxic Stress by Initiating a 4EHP-Mediated mRNA Translation Arrest. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1254-1268 (2015).

使用ライブラリー：Mouse siGENOME siRNA Library – Ubiquitin conjugation subset #1 – 3 – SMARTpool

ヒットの検証：Mouse siGENOME Set of 4 siRNA

KRAS遺伝子に変異のあるヒト結腸がん細胞の生存や増殖に関与する遺伝子の探索

Steckel M *et al.* Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. *Cell Research* **22**, 1227-1245 (2012).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Protein kinase, GPCR, およびDruggable genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGETplus SMARTpool siRNAおよび Human siGENOME Set of 4 siRNA

ハンチントン病原タンパク質huntingtonのN末端の分解に関与するプロテアーゼ遺伝子の探索

Ratovitsk T. *et al.* Cysteine Proteases Bleomycin Hydrolase and Cathepsin Z Mediate N-terminal Proteolysis and Toxicity of Mutant Huntingtin. *J. Biol. Chem.* **286**, 12578 - 12589 (2011).

使用ライブラリー：Human ON-TARGETplus siRNA Library – Protease – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGETplus SMARTpool siRNA

抗がん剤シスプラチン感受性の制御に関与する遺伝子の探索

Nijwening JH *et al.* Screening for modulators of cisplatin sensitivity: unbiased screens reveal common themes. *Cell Cycle* **10**(3), 380-386 (2011).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Protein kinaseおよびDruggable genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNAおよびHuman ON-TARGETplus Set of 4 siRNA

神経芽細胞腫の増殖に関与するプロテインキナーゼ遺伝子の探索

Cole KA *et al.* RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *PNAS*. **108**(8), 3336-41 (2011).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Protein kinase – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGETplus SMARTpool siRNA

トランスフェクションの困難なHUVEC細胞におけるsiRNAスクリーニング

Zumbasen M *et al.* First siRNA library screening in hard-to-transfect HUVEC cells. *Journal of RNAi and Gene Silencing* **6**, 354-360 (2010).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Protein kinaseおよびCell cycle regulation – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNAおよびHuman ON-TARGETplus siRNA

デングウイルスの感染に関与する膜輸送遺伝子の探索

Ang F *et al.* Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *J. Virol.* **7**, 1-17 (2010).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Membrane trafficking – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME SMARTpool siRNA

IgEを介したマスト細胞の活性化に関与するホスファターゼ遺伝子の探索

Zhang J *et al.* Small Interfering RNA Screen for Phosphatases Involved in IgE-Mediated Mast Cell Degranulation. *J. Immunol.* **184**, 7178-7185 (2010).

使用ライブラリー：Mouse siGENOME siRNA Library – Phosphatase – SMARTpool

ヒットの検証：Mouse siGENOME SMARTpool siRNA

がん細胞ごとのviabilityに関与するプロテインキナーゼ遺伝子の探索

Iorns E *et al.* Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets. *PLoS ONE* **4**(4), e5120 (2009).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Protein kinase – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGETplus SMARTpool siRNA

肝細胞増殖因子 (HGF) に依存した細胞分散を制御する脱ユビキチン化関連遺伝子の探索

Buus R *et al.* Deubiquitinase activities required for hepatocyte growth factor-induced scattering of epithelial cells. *Current Biol.* **19**, 1463-1466 (2009).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Deubiquitinating enzyme – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNAおよびHuman ON-TARGETplus Set of 4 siRNA

ErbB2タンパク質レベルを制御する脱ユビキチン化関連遺伝子の探索

Liu H *et al.* Regulation of ErbB2 receptor status by the proteasomal DUB POH1. *PLoS One* **4** e5544 (2009).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Deubiquitinating enzyme – SMARTpool

ヒットの検証：Human ON-TARGETplus Set of 4 siRNA

Stress granuleおよびProcessing bodyの形成を抑制する遺伝子の探索

Ohn T *et al.* A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1224-1231 (2008).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Druggable genome – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

がん細胞の増殖やviabilityに関与するチロシンキナーゼ遺伝子の探索

Tyner JW *et al.* RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Blood* **15**, 2238-2245 (2008).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Tyrosine kinase – SMARTpool

文献情報 

IAP阻害化合物LBW242を投与した細胞のviabilityに関与するアポトーシス関連遺伝子の探索

Gaither A *et al.* A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-A signaling. *Cancer Res.* **67**, 11493-11498 (2007).

使用ライブラリー：Human siGENOME siRNA Library – Apotosis – SMARTpool

ヒットの検証：Human siGENOME SMARTpool およびSet of 4 siRNA

■ **カスタムライブラリー**

ミトコンドリアダイナミクスを制御する遺伝子の同定

Park SJ *et al.* Down-regulation of Mortalin Exacerbates A β -mediated Mitochondrial Fragmentation and Dysfunction. *J. Biol. Chem.* **289**, 2195-2204 (2014).

使用ライブラリー：Human siGENOME SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した約500種類のミトコンドリア遺伝子

ゴルジ装置の構築を制御する遺伝子の探索

Chia J *et al.* RNAi screening reveals a large signaling network controlling the Golgi apparatus in human cells. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 629 (2012).

使用ライブラリー：SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した膜輸送調節に関する遺伝子

ヒットの検証：Set of 4 siRNA

タンパク質の構成的な分泌に必要なSNARE遺伝子の同定

Gordon DE *et al.* A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic.* **11**(9), 1191-204 (2010).

使用ライブラリー：Human ON-TARGET $plus$ SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した38種類のSNARE遺伝子、4種類のSNARE様遺伝子および7種類のSec1/Munc18タンパク質遺伝子

ヒットの検証：Human ON-TARGET $plus$ Set of 4 siRNA

がん細胞の放射線感受性に関与するDNA損傷修復関連遺伝子の探索

Higgins G *et al.* A small interfering RNA screen of genes involved in DNA repair identifies tumor-specific radiosensitization by POLQ knockdown. *Cancer Res.* **70**(7), 2984-93 (2010).

使用ライブラリー：Human siGENOME SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した200種類のDNA損傷修復関連遺伝子

ヒットの検証：Human ON-TARGET $plus$ SMARTpool siRNAおよびHuman ON-TARGET $plus$ Set of 4 siRNA

US2を介したMHC Iのユビキチン化に関与する遺伝子の探索

Stagg HR *et al.* The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER. *J. Cell. Biol.* **186**(5), 685-92 (2009).

使用ライブラリー：Human ON-TARGET $plus$ SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した373種類のE3 ubiquitin ligase遺伝子

ヒットの検証：Human ON-TARGET $plus$ Set of 4 siRNA

EGFRタンパク質レベルを制御するユビキチン関連遺伝子の探索

Deux JE and Sorkin A. RNA interference screen identifies Usp18 as a regulator of epidermal growth factor receptor synthesis. *Mol. Biol. Cell.* **20**, 1833-1844 (2009).

使用ライブラリー：Human siGENOME SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択したユビキチン化関連遺伝子

ヒットの検証：Human siGENOME Set of 4 siRNA

上皮細胞の遊走を制御する遺伝子の探索

Simpson KJ *et al.* Identification of genes that regulate epithelial cell migration using a siRNA screening approach. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1027-1038 (2008).

使用ライブラリー：Human siGENOME SMARTpool siRNA custom Library – お客様が選択した1,081種類の遺伝子 (phosphatases, kinasesおよび、細胞の移動や接着に影響を与えると予測されたタンパク質)

ヒットの検証：Human ON-TARGET $plus$ SMARTpool siRNA



Dharmacon microRNAライブラリー文献情報

DharmaconのmicroRNAライブラリー製品は、世界中の主要な研究機関で活用され、貴重な成果を収めています。

■ 全ゲノムライブラリー

上皮性卵巣がんのviabilityに影響を与えるmicroRNAの探索

Shields BB *et al.* A genome-scale screen reveals context-dependent ovarian cancer sensitivity to miRNA overexpression. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 842-859 (2015).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

p53の発現を制御するmicroRNAの探索

Wang E *et al.* p53 Is Positively Regulated by miR-542-3p. *Cancer Res.* **74**(12), 3218-3227 (2014).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

乳がん細胞の増殖に関するmicroRNAの探索

Tahiri *et al.* Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors. *Carcinogenesis* **35**, 76-85 (2014).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

電離放射線に応答したRAD51フォーカス形成を低減するmicroRNAの探索

Huang JW *et al.* Systematic Screen Identifies miRNAs That Target RAD51 and RAD51D to Enhance Chemosensitivity *Mol Cancer Res.* **11**, 1564-1573. (2013)

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

MEK1/2阻害剤selumetinib (AZD6244) と共働してMDA-MB-231細胞のviabilityを低下させるmicroRNAの探索

Zawistowski JS *et al.* MicroRNA 9-3p Targets β 1 Integrin To Sensitize Claudin-Low Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2260-2274 (2013).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

EGFRによる細胞周期制御機構に関するmicroRNAの探索

Uhlmann S *et al.* Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 570. (2012)

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

乳がん細胞においてNF- κ Bシグナル伝達系を制御するmicroRNAの探索

Keklikoglou I *et al.* MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* **31**, 4150-4163 (2012).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

電離放射線により誘導されるリン酸化ヒストン2AXフォーカス形成を阻害するmicroRNAの探索

Wang Y *et al.* MicroRNA-138 Modulates DNA Damage Response by Repressing Histone H2AX Expression. *Mol Cancer Res.* **9**(8), 1100-1111 (2011).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

ヒト前立腺がん細胞においてアンドロゲンレセプターの発現に影響を与えるmicroRNAの探索

Ostling P *et al.* Systematic Analysis of MicroRNAs Targeting the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **71**(5), 1956-67 (2011).

使用ライブラリー：Human miRIDIAN Mimic microRNA Library

■ カスタムライブラリー

マウスES細胞の分化に関与するmicroRNAの探索

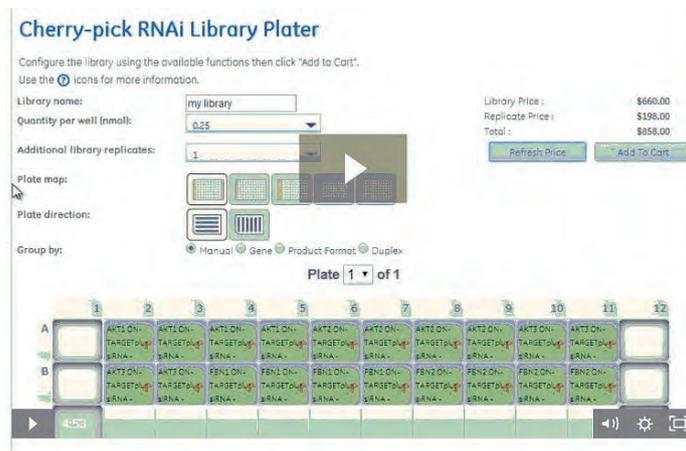
Ma Y *et al.* Functional screen reveals essential roles of miR-27a/24 in differentiation of embryonic stem cells. *The EMBO Journal* **34**, 361–378 (2015)

使用ライブラリー： Mouse miRIDIAN Mimic microRNA custom Library –お客様があらかじめ選択した40種類のマウスmicroRNA

Cherry-pick RNAi Library Platerで カスタムライブラリーを簡単設計

<https://dharmacon.horizondiscovery.com/resources/videos/how-to-use-cherry-pick-library-plater/>

Cherry-pick RNAi Library Platerを使用して、RNAi試薬のカスタムライブラリーを設計する方法を動画でご紹介しています。動画では、関連RNAi試薬を検索するための各遺伝子の識別子 (gene identifier) のロード方法、試薬フォーマットおよび数量の選び方、96ウェルプレート中での配置方法をご紹介します。



製品検索・注文のご案内

製品検索・注文はDharmacon専用Webサイト

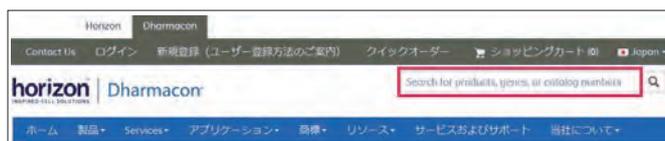
dharmacon.horizondiscovery.com にアクセスしてください。

※ ご注文には事前のユーザー登録が必要です。

Step 1

ターゲット遺伝子情報を入力してください。

ターゲット遺伝子のGenBank accession number、gene symbol、gene IDのいずれかを、Webページの上にある検索窓（赤枠）に入力して検索ボタンをクリックしてください。



Step 2

製品群ごとに検索結果をまとめてお知らせします。

画面は「BRCA1」と入力して検索した結果が表示された状態です。製品ならびに関連する技術情報が「遺伝子」のフィールドに表示されます。crRNA/sgRNAのリンク（赤枠）から各製品リストのページに移動してください。移動先ページで、各種デザイン済みcrRNA/sgRNAの+をクリックすると、さらに詳細な製品リストが表示されます。**製品のコード番号および価格は製品検索時に各Webページで表示されます。**ご希望の製品をカートに入れて注文してください。

製品名	Description	Species
siRNA	BRCA1 BRCA1, DNA repair associated ID: 672 Alias: BRCA1, BRCC1, BROVCA1, FANCS, IRIS, PNCAA, PPP1R53, PSCP, RNF53	Human
shRNA		
crRNA / sgRNA		
cDNA / ORF		
EST		

dharmacon.horizondiscovery.com

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0036 東京都渋谷区南平台町16-28 グラスシテイ渋谷6F

Tel : 03-4360-5160

rnai.jp@horizondiscovery.com

www.horizondiscoverykk.com

B007-1812.10-v1

© Horizon Discovery Group Company

本書の全部または一部を無断で複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客様よりいただいた情報は、お客様への回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただきます場合があります。

horizonTM
INSPIRED CELL SOLUTIONS