

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年12 月16 日 (16.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/108962 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, G01N 33/58 // C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006303
- (22) 国際出願日: 2004 年4 月30 日 (30.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-163038 2003 年6 月6 日 (06.06.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4 丁目1 番8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi) [JP/JP]; 〒0600812 北海道札幌市北区北1 2 条西6 丁目 北海道大学内 Hokkaido (JP). 秋田 英万 (AKITA, Hidetaka) [JP/JP]; 〒0600812 北海道札幌市北区北1 2 条西6 丁目 北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 早川 裕司, 外 (HAYAKAWA, Yuzi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂六丁目9 番5 号 氷川アネックス2 号館5 0 1 アーケイディア特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING NUCLEIC ACID TRANSFERRED INTO CELL AND LOCALIZED IN TARGET ORGANELLE

(54) 発明の名称: 細胞に導入した核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of accurately quantifying a nucleic acid which has been transferred into a cell and then localized all over a target organelle. This object is achieved by a method comprising: (a) staining a target organelle with a first fluorescent dye; (b) transferring a complex of a polycationic substance with a nucleic acid labeled with a second fluorescent dye into a cell; (c) detecting a fluorescence emitted from the first fluorescent dye on a plane intersecting with the cell to thereby determine the region in which the target organelle is present on the above-described plane; (d) detecting a fluorescence emitted from the second fluorescent dye on the above-described plane and thus calculating the area of the region stained in the second fluorescent dye in the region in which the target organelle is present; (e) repeating the procedures (c) and (d) with respect to each of plural planes intersecting with the cell; and (f) summing up the areas of the regions stained with the second fluorescent dye calculated with respect to the plural planes and thus quantifying the nucleic acid localized in the target organelle with the use of the total area of the regions stained with the second fluorescent dye.

(57) 要約: 細胞に導入した核酸の標的オルガネラ全体における局在量を正確に定量する方法を提供することを目的とし、この目的を達成するために、(a) 標的オルガネラを第一の蛍光色素で染色し、(b) ポリカチオン性物質と第二の蛍光色素で標識した核酸との複合体を細胞に導入し、(c) 細胞と交差する平面上に存在する第一の蛍光色素が発する蛍光を検出し、上記平面上における標的オルガネラの存在領域を決定し、(d) 上記平面上に存在する第二の蛍光色素が発する蛍光を検出し、標的オルガネラの存在領域のうち、第二の蛍光色素によって染色された領域の面積を算出し、(e) 細胞と交差する複数の平面に対して工程(c)及び(d)を行い、(f) 複数の平面について算出された第二の蛍光色素による染色領域の面積を総和し、第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を指標として、核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する。

WO 2004/108962 A1

明 細 書

細胞に導入した核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する方法

技術分野

本発明は、細胞に導入した核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する方法、及び当該方法を利用して細胞に導入した核酸の細胞内動態を分析する方法に関する。

背景技術

近年、遺伝子治療に大きな期待が寄せられており、遺伝子導入技術の重要性が増加している。細胞への遺伝子導入技術は、生化学的又は物理的方法を利用するトランスフェクションと、ウイルスを利用するインフェクションとに大別される。インフェクションによる遺伝子導入は、特定の細胞（ウイルスが感染できる細胞）に対する遺伝子導入効率や遺伝子発現効率は高いものの、トランスフェクションによりも操作が複雑で多大な時間を要し、利用するウイルスによっては安全性が問題となる。このため、現在ではトランスフェクションによる遺伝子導入技術が汎用されており、トランスフェクションによる遺伝子導入技術としては、リン酸カルシウム共沈法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、陽電荷を有するDEAE-デキストラン、ポリブレン、カチオン性脂質との複合体形成法等が知られている。

遺伝子導入技術の評価、開発、改良等にあたっては、遺伝子導入効率や遺伝子発現効率の検討に加え、導入遺伝子の細胞内動態の検討が重要となる。導入遺伝子の細胞内動態を知るためには、導入遺伝子の各種オルガネラにおける局在量の定量が必要であり、導入遺伝子の定量法とし

ては、細胞分画法、共焦点レーザー顕微鏡法（共焦点走査顕微鏡法）等が知られている。

発明の開示

しかしながら、細胞分画法は、細胞の破壊が必要となるため、オルガネラ間におけるコンタミネーションが生じ、個々のオルガネラにおける導入遺伝子の局在量を定量することは困難である。また、これまでの共焦点レーザー顕微鏡法は、導入遺伝子を標識する蛍光色素の蛍光強度を二次元的に検出するものであったため、オルガネラの一部に存在する導入遺伝子を定量することはできたが、個々のオルガネラ全体に存在する導入遺伝子を定量することはできず、さらに蛍光強度の減衰の影響を受けるため正確な定量が困難であった。

そこで、本発明は、細胞に導入した核酸の標的オルガネラ全体における局在量を正確に定量する方法、及び当該方法を利用して細胞に導入した核酸の細胞内動態を分析する方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明は以下の方法を提供する。

(1)細胞に導入した核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する方法であって、

- (a) 前記標的オルガネラを第一の蛍光色素で染色する工程、
- (b) ポリカチオン性物質と第二の蛍光色素で標識した前記核酸との複合体を前記細胞に導入する工程、
- (c) 前記細胞と交差する平面上に存在する前記第一の蛍光色素が発する蛍光を検出し、前記平面上における前記標的オルガネラの存在領域を決定する工程、
- (d) 前記平面上に存在する前記第二の蛍光色素が発する蛍光を検出し、前記標的オルガネラの存在領域のうち、前記第二の蛍光色素によって染

色された領域の面積を算出する工程、

(e) 前記細胞と交差する複数の平面に対して前記工程 (c) 及び (d) を行う工程、並びに

(f) 前記複数の平面について算出された前記第二の蛍光色素による染色領域の面積を総和し、前記第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を指標として、前記核酸の前記標的オルガネラにおける局在量を定量する工程を含む前記方法。

(2) 前記第一の蛍光色素又は前記第二の蛍光色素が発する蛍光を共焦点レーザー顕微鏡によって検出する前記 (1) 記載の方法。

(3) 前記複数の平面が、前記細胞内において互いに交差しない平面である前記 (1) 又は (2) 記載の方法。

(4) 前記複数の平面の数が 20 以上である前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

(5) 前記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の方法により、細胞に導入した核酸の異なる複数のオルガネラにおける局在量を定量し、前記核酸の細胞内動態を分析する方法。

図面の簡単な説明

図 1 は、共焦点レーザー顕微鏡によって得られる、1 つの細胞の Z 軸方向（細胞の厚さの方向）に連続的な x-y 断面画像に関する説明図である。

図 2 は、x-y 断面画像数と、各 x-y 断面画像数に基づいて算出された各オルガネラにおけるプラスミド DNA の局在量の比率との関係を示す図である。

図 3 は、プラスミド DNA の細胞内動態の時間的変化を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明において、「細胞」とは、生物体から分離された状態で存在する細胞を意味し、現に生物体を構成している細胞は含まれない。

本発明で使用する細胞は真核細胞又は原核細胞のいずれであってもよい。また、本発明で使用する細胞が由来する生物種は特に限定されるものではなく、動物、植物、微生物等のいずれであってもよいが、動物であることが好ましく、哺乳動物であることがさらに好ましい。哺乳動物としては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられる。また、本発明で使用する細胞の種類は特に限定されるものではなく、例えば、体細胞、生殖細胞、幹細胞又はこれらの培養細胞等を使用することができる。

本発明において、「核酸」には、DNA及びRNAの他、これらの類似体又は誘導體（例えば、ペプチド核酸（PNA）、ホスホロチオエートDNA等）が含まれる。また、核酸の塩基長は特に限定されるものではなく、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドのいずれであってもよい。また、核酸は一本鎖及び二本鎖のいずれの状態であってもよく、これらの混合状態であってもよい。

本発明において、オルガネラの種類は特に限定されるものではなく、例えば、核、細胞膜、細胞質ゾル、細胞骨格、リソソーム、エンドソーム、小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム、微小管、ミトコンドリア、葉緑体、液胞、細胞壁等が挙げられる。本発明においては、これらのうち1種類を標的オルガネラとしてもよいし、2種類以上を標的オルガネラとしてもよい。

本発明において、「ポリカチオン性物質」とは、その分子中にカチオ

ン性基を有する物質を意味し、核酸と複合体を形成し得る限り、その種類は特に限定されるものではないが、例えば、カチオン性脂質；カチオン性脂質（例えば、Lipofectamine（Invitrogen 社製））によって形成されるカチオン性リポソーム；カチオン性基を有する中性リポソーム；カチオン性基を有する高分子ミセル；ポリリジン、ポリアルギニン、リジンとアルギニンの共重合体等の塩基性アミノ酸の単独重合体若しくは共重合体又はこれらの誘導体（例えばステアリル化誘導体）；ポリエチレンイミン等のポリカチオン性ポリマー；硫酸プロタミン等が挙げられる。カチオン性物質が有するカチオン性基の数は特に限定されるものではないが、好ましくは2個以上である。カチオン性基は正に荷電し得る限り特に限定されるものではなく、例えば、アミノ基；メチルアミノ基、エチルアミノ基等のモノアルキルアミノ基；ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等のジアルキルアミノ基；イミノ基；グアニジノ基等が挙げられる。

本発明において、「第一の蛍光色素」と「第二の蛍光色素」とは異なる蛍光色素である。2種類以上のオルガネラを標的とする場合、第一の蛍光色素として、オルガネラの種類ごとに異なる蛍光色素を選択することができる。また、2種類以上の核酸を使用する場合、第二の蛍光色素として、核酸の種類ごとに異なる蛍光色素を選択することができる。

第一の蛍光色素として使用し得る蛍光色素は、標的オルガネラを染色し得る限り特に限定されるものではなく、例えば、核の染色については DAPI、Hoechst 等、エンドソーム／リソソームの染色については Lyotracker、Lysosensor 等、ミトコンドリアについては Mitotracker、MitoRed 等を使用することができる。また、第二の蛍光色素として使用し得る蛍光色素は特に限定されるものではないが、例えば、Marine Blue、Cascade Blue、Cascade Yellow、Fluorescein、Rhodamine、Phycoerythrin、

CyChrome、PerCP、Texas Red、Allophycocyanin、PharRed 等の他、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy7 等の Cy 系色素、Alexa-488、Alexa-532、Alexa-546、Alexa-633、Alexa-680 等の Alexa 系色素、BODIPY FL、BODIPY TR-等の BODIPY 系色素、量子ドット等が挙げられる。

本発明において、工程（a）及び（b）の前後は特に限定されないが、通常は工程（a）の後に工程（b）を行う。工程（c）及び（d）は、工程（a）及び（b）の後に行う。工程（c）及び（d）の前後は特に限定されないが、通常は工程（c）の後に工程（d）を行う。工程（f）は工程（e）の後に行う。

工程（a）において、第一の蛍光色素による標的オルガネラの染色は常法に従って行うことができる。第一の蛍光色素による染色は、標的オルガネラ全体に対して行うことが好ましい。これにより、標的オルガネラ全体における核酸の局在量を定量することができる。

工程（b）において、細胞に導入されるポリカチオン性物質と核酸との複合体複合体の数は特に限定されないが、通常は複数の複合体が細胞に導入される。複数の複合体が細胞に導入される場合、複合体に含まれる核酸量は、いずれの複合体においても均一又はほぼ均一であることが好ましい。複合体に含まれる核酸量がいずれの複合体においても均一又はほぼ均一である場合、第二の蛍光色素による染色領域の単位面積当たりの核酸量が、異なる染色領域間で均一又はほぼ均一となるので、第二の蛍光色素による染色領域の総面積を指標とした核酸の局在量の定量がより正確なものとなる。

ポリカチオン性物質と核酸との複合体は常法に従って調製することができる。ポリカチオン性物質は正に荷電しており、核酸は負に荷電しているので、両者を混合することにより容易に複合体を調製することができる。核酸含有量が均一又はほぼ均一である複合体を調製するにあつ

ては、ポリカチオン性物質として、カチオン性脂質（例えば、Lipofectamine (Invitrogen 社製)）によって形成されるカチオン性リポソーム、ポリリジン、ステアリル化ポリリジン、ポリエチレンジイミン、硫酸プロタミン等を使用することが好ましい。

ポリカチオン性物質と核酸との複合体は、粒径 30 ~ 300 nm の粒子状であることが好ましい。

工程（b）において、ポリカチオン性物質と核酸との複合体を細胞に導入する方法は特に限定されるものではない。当該複合体はポリカチオン性物質を含んでおり正に荷電しているので、負に荷電した細胞膜表面に静電的に引き付けられ、エンドサイトーシス等のメカニズムにより細胞内に導入させることができる。エンドサイトーシスを利用する場合には、ポリカチオン性物質と核酸との複合体を細胞に接触させることにより当該複合体を細胞に導入することができる。

工程（c）において、「細胞と交差する平面」は仮想の平面であり、自由に選択することができる。

工程（c）において、細胞と交差する平面上に存在する第一の蛍光色素が発する蛍光を検出する方法は特に限定されるものではないが、例えば、共焦点レーザー顕微鏡を利用して検出することができる。共焦点レーザー顕微鏡を利用する場合、焦点面上に存在する第一の蛍光色素が発する蛍光を検出することができ、共焦点レーザー顕微鏡により得られた二次元像から、焦点面上における標的オルガネラの存在領域を容易に決定することができる。

工程（d）において、細胞と交差する平面上に存在する第二の蛍光色素が発する蛍光を検出する方法は特に限定されるものではないが、例えば、共焦点レーザー顕微鏡を利用して検出することができる。共焦点レーザー顕微鏡を利用する場合、焦点面上に存在する第二の蛍光色素が発

する蛍光を検出することができ、共焦点レーザー顕微鏡により得られた二次元像から、標的オルガネラの存在領域のうち、第二の蛍光色素によって染色された領域（第二の蛍光色素による染色領域）の面積を容易に算出することができる。標的オルガネラの存在領域は第一の蛍光色素によって染色されているので、標的オルガネラの存在領域のうち、第二の蛍光色素によって染色された領域は、第一の蛍光色素の蛍光色と第二の蛍光色素の蛍光色との合成蛍光色で染色されている。例えば、第一の蛍光色素の蛍光色が赤色で、第二の蛍光色素の蛍光色が緑色である場合には、両者の合成蛍光色である黄色で染色され、第一の蛍光色素が赤色で、第二の蛍光色素が青色である場合には、両者の合成蛍光色である桃色で染色される。

工程（e）において、複数の平面として、細胞と交差し、かつ細胞内において互いに交差しない複数の平面を選択することが好ましい。同一の第二の蛍光色素による染色領域について重複して面積が算出されることを避けるためである。これにより、工程（f）で算出される第二の蛍光色素による染色領域の総和面積が、標的オルガネラにおける核酸の局在量を正確に反映する。

工程（e）において、細胞と交差し、かつ細胞内において互いに交差しない複数の平面として、例えば、重力方向（すなわち細胞の厚みの方向）に対して垂直な平面を選択することができる。

工程（e）において、複数の平面の数は2以上である限り特に限定されるものではないが、15以上であることが好ましく、20以上であることがさらに好ましい。平面の数が多いほど、第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を指標として、標的オルガネラにおける核酸の局在量を正確に定量することができる。

工程（f）において算出された第二の蛍光色素による染色領域の総和

面積は、標的オルガネラにおける核酸の局在量を正確に反映する。すなわち、第二の蛍光色素で標識した核酸を他の物質と複合体化することなく細胞に導入した場合、異なる核酸に結合している第二の蛍光色素同士が重なり合う可能性があり、その場合には第二の蛍光色素による染色領域の面積は、その領域に含まれる核酸量を正確に反映しない。これに対して、本発明においては、第二の蛍光色素で標識した核酸をポリカチオン性物質と複合体化して細胞に導入するので、第二の蛍光色素で標識した核酸はポリカチオン性物質で囲まれた状態にあり、異なる核酸に結合している第二の蛍光色素の間にはポリカチオン性物質が介在することとなる。これにより、異なる核酸に結合している第二の蛍光色素同士が重なり合うことが防止され、第二の蛍光色素による染色領域の面積は、その領域に含まれる核酸量を正確に反映し、第二の蛍光色素による染色領域の面積が大きいほど、その領域に含まれる核酸量が多く、第二の蛍光色素による染色領域の面積が小さいほど、その領域に含まれる核酸量が少ないということになる。したがって、工程（f）において、第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を算出することにより、標的オルガネラ全体における核酸の局在量を正確に定量することができる。

異なる複数のオルガネラについて、第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を算出し、異なる複数のオルガネラ間で比較することにより、異なる複数のオルガネラ間における核酸の局在比率を算出することができる。これによって細胞に導入した核酸の細胞内動態を分析することができる。第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を、異なる複数のオルガネラ間で比較する際には、工程（e）において選択する複数の平面を同一とすることが好ましい。細胞に導入した核酸の細胞内動態に関する情報は、核酸導入に当たって使用するベクターを開発、最適化等する上で有用である。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

なお、実施例では以下の略語を用いられる。

Amp : アンピシリン

DAPI: 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール ジヒドロクロライド (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

D' MEM : ダルベッコ変法イーグル培地 (dulbecco's modified eagle medium)

FCS : ウシ胎子血清 (fetal calf serum)

LB : LB 培地

Hoechst33258 : ビスベンズイミド H33258 (bisbenzimidazole H33258)

PBS : リン酸緩衝化生理食塩水 (phosphatebuffered saline)

R8 : オクタアルギニン (octaarginine)

STR8 : ステアリルオクタアルギニン (stearyl octaarginine)

1. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた3重染色の確立

(1) 実験方法

① プラスミド DNA (pQBI25-63) の調製

E. coli DH5a/pQBI25-63 を LB amp (7ml) 中に入れ、37℃で半日振とう培養した。この培養液 5ml を LB amp (500 ml) 中に入れたものを2本調製し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液を 4℃, 6000×g の条件下で15分間遠心した後、上清を除き、QIAGEN EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN 社製) を用いて、プロトコールに従い、精製した。精製したプラスミド DNA は 200 倍希釈して、UV を測定し、収量を求めた (収量: 528.6 μg)。また、HindIII 及び MluI 処理による確認も行った。

② NIH/3T3 細胞の培養

非動化した FCS を 10% 加えた D' MEM を培地として NIH/3T3 細胞を培養した。

③プラスミド DNA の蛍光標識

Label IT CX-Rhodamine Labeling Kit (PanVera, Medison, Wiscosine) を用いて、プロトコールに従い、プラスミド DNA を蛍光標識した。標識後、エタノール沈殿法によってプラスミド DNA を精製した。

④トランスフェクション

Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen 社製) を用いた。トランスフェクション時には、最も細胞がはがれにくかったディッシュである、Poly-D-Lysine Cellware 35mm Coverslip-bottom Dishes (FALCON 社製) を用いた。トランスフェクション 24 時間前に 2.5×10^5 cells を播き、非動化した 10% FCS を含む D' MEM 中でインキュベートした。トランスフェクション直前に FCS を除いた D' MEM と交換し、ここに蛍光標識をしたプラスミド DNA を Lipofectamine (Invitrogen 社製) とともに加え、一定時間細胞培養条件でインキュベートした。なお、Lipofectamine はカチオン性脂質であり、Lipofectamine によってカチオン性リポソームが形成され、これがプラスミド DNA と複合体を形成する。

⑤細胞内オルガネラの染色

核染色試薬として DAPI (Molecular Probes 社製) 及び Hoechst 33258 (Wako 純薬社製) を用いた。DAPI は $100 \mu\text{M}$ となるように一度滅菌水に溶かし、最終的に $50 \mu\text{M}$ まで PBS (-) を用いて希釈し、これを 1ml 細胞溶液に加え、5 分間細胞培養条件でインキュベートした。Hoechst 33258 は 1mg/ml となるように滅菌水に溶かし、最終的に $100 \mu\text{g/ml}$ まで PBS (-) を用いて希釈し、さらに 10% FCS を含む D' MEM を用いて $20 \mu\text{g/ml}$ に希釈した後、そのうち 1ml を細胞に加え、10 分間室温でインキュベートした。

エンドソーム/リソソームの染色試薬として LysoTracker DND-99 (Molecular Probes) 及び LysoSensor DND-189 (Molecular Probes) を用いた。LysoTracker を PBS (-) で 10 倍に希釈し $10 \mu\text{M}$ とした。これのうち 5ml

を FCS 不含の 1ml の D' MEM に加え、これを細胞に添加し、30 分間細胞培養条件でインキュベートした。Lysotracker については、FCS 不含の 1 ml の D' MEM に原液のまま 1 μ l 加え、これを細胞に添加し、細胞培養条件で 30 分間インキュベートした。

⑥共焦点レーザー顕微鏡による観察

トランスフェクション後一定時間インキュベートした細胞に前述した方法で Lysotracker 又は Lysosensor を用いてエンドソーム/リソソームを染色した。染色後 D' MEM(+10%FCS)で細胞を洗浄し、さらに前述した方法で DAPI 又は Hoechst33258 を用いて核を染色した。(ここまでのインキュベート時間を 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5 時間の 6 ポイントに設定した。) D' MEM(+10%FCS)で細胞を 3 回洗浄した後、D' MEM(+10%FCS)を 1ml 加え、細胞を固定せずに Carl Zeiss LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。ここで、細胞を固定せずに観察した理由は、細胞を固定すると、Lysosensor や Lysotracker がグルタルアルデヒド等の有機化合物を含む固定剤によって細胞質に一樣に拡散してしまうためである。拡散の理由は、染色試薬の pH 依存性が壊れてしまったためではないかと考えられる。

(2) 実験結果

①Lysotracker と Lysosensor による染色結果の比較

同時に Lysotracker と Lysosensor を用いてエンドソーム/リソソームを染色したときの様子を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、Lysotracker、Lysosensor とともにほぼ同様の局在の様子を示すことが確認できた。したがって、これらの試薬がエンドソーム/リソソームを正確に染色していることが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡の画像から、Lysosensor がよりすべての細胞を均一に染色していることが確認できたため、以後の試験では、Lysosensor を用いてエンドソ-

ム/リソソームの染色を行うことにした。

②DAPI と Hoechst33258 による核染色結果

核染色試薬として DAPI を選択した場合、Lysosensor が細胞質に一樣に拡散してしまうことが明らかとなった。次に、核染色試薬である Hoechst33258 を用いてみたところ、Lysosensor の細胞質への拡散が観察されなくなった。この原因は、Lysosensor の pH 依存性に DAPI のみが影響を与えたことにあると考えられる。したがって、以後の試験では、Hoechst33258 を用いて核の染色を行うことにした。

2. 3重染色画像を用いた定量的評価系の確立

共焦点レーザー顕微鏡を利用して、1つの細胞のZ軸方向（細胞の厚さの方向）に連続的なx-y断面画像を取得し（図1参照）、コンピューター解析ソフトであるアクアコスモスにより定量解析した。Rhodamine で標識したプラスミド DNA は、細胞質に存在するときは赤色を呈し、エンドソーム/リソソームに存在するときは Lysosensor の緑色と混ざって黄色を呈し、核内に存在するときは Hoechst33258 の青色と混ざって桃色を呈した。ここで、90%以上が同一色に染色された領域をプラスミド DNA の存在領域と判断した。各々のオルガネラの存在領域のうち、プラスミド DNA の存在領域を特定し、1つのx-y断面画像において各オルガネラに含まれるプラスミド DNA の存在領域の面積を計算し、これを各オルガネラにおけるプラスミド DNA の局在量の指標とした。さらに、各x-y断面画像において各オルガネラに含まれるプラスミド DNA の存在領域の面積を総和し、各オルガネラにおけるプラスミド DNA の存在領域の総和面積の比率を求めることにより、各オルガネラにおけるプラスミド DNA の局在量の比率を求めた。

この際、x-y断面画像数について最適化を行った。x-y断片画像数を30個に設定し、4つの細胞について、5、10、15、20、25個のx-

y 断面画像を均等に抽出し、各 x-y 断面画像から各オルガネラに含まれるプラスミド DNA の存在領域の総面積を求め、これを指標として、各オルガネラにおけるプラスミド DNA の局在量の比率を求めた。結果を図 2 に示す。なお、図 2 中、各プロットは 1 細胞についての結果であり、同一細胞の結果は同一形状のプロットで示す。

図 2 に示すように、x-y 断面画像数が 15 個以上、好ましくは 20 個以上であると、各オルガネラにおけるプラスミド DNA の局在量の比率について、測定値が安定することが判明した。すなわち、x-y 断面画像数が x-y 断面画像数が 15 個以上、好ましくは 20 個以上であると、各オルガネラ全体におけるプラスミド DNA の局在量を正確に定量できることが判明した。

3. 本評価系を用いたプラスミド DNA の細胞内動態の時間的追跡

Lipofectamine によるプラスミド DNA 導入の所定時間後において、各オルガネラへのプラスミド DNA の分布を解析した。各時間において 10 個の細胞を解析に用いた。結果を図 3 に示す。

図 3 に示すように、すべてのオルガネラにおいて非常に大きなヘテロジェネティが認められることが明らかとなった。この非常に大きなヘテロジェネティの原因の一つとして、トランスフェクションした細胞の細胞周期がそろっていないということが考えられたが、同調細胞を用いた実験においてもヘテロジェネティが認められた（データは示さず）。

プラスミド DNA の核膜透過過程は核膜消失のおこる M 期に促進されることがこれまで明らかになっているが、図 3 に示す結果から、エンドサイトーシス過程及びエンドソームから細胞質への移行過程においてもこのような細胞同期依存性があることが示唆される。まず、エンドソーム/ライソソーム及び細胞質への分布を考えると、バラツキは大きい約 80% の細胞で、エンドソームにおけるプラスミド DNA の存在が認められる

ことから、従来の報告通り、エンドサイトーシスが1つのメジャーな細胞内取り込みメカニズムであると考えられる。一方で、いくつかの細胞においては、30分、1時間という速い時間で50～70%のプラスミドDNAが細胞質中に存在しており、これらの細胞においてはエンドソーム中への分布がほとんど確認されないことから、これらの細胞ではエンドサイトーシス以外のメカニズムで細胞質に導入される可能性が示唆される。さらに核膜透過に注目すると1.5時間後までは上昇するが、その後減少することから、核内へ取り込まれた後の分解又は核外への排出、核への取り込みクリアランスの低下が示唆される。多くの細胞で3.5時間では核膜付近にプラスミドDNAが存在することからも、核からの排出メカニズムの存在が支持されることが考えられる。

4. 本評価系によるR8とSTR8を用いたプラスミドDNAの核移行量の比較実験

(1) 実験方法

①トランスフェクション

マイクロチューブに血清不含のD'MEMを100ml加えた後、蛍光標識したプラスミドDNAを1mgの加え、よく攪拌した。そこに100mlの血清不含のD'MEMに溶解した9.5mlのR8を加え、よく攪拌し、30分間室温で放置した。30分後、血清不含のD'MEM 400mlを加え、よく攪拌し、これを上記と同様にして準備した細胞に添加し、インキュベートした。

STR8に関してもR8と同様にして、マイクロチューブに血清不含のD'MEMを100ml加えた後、1mgの蛍光標識したプラスミドDNAを加え、よく攪拌した。そこに100mlの血清不含のD'MEMに溶解した6.35mlのSTR8を加え、よく攪拌し、30分間室温で放置した。30分後、血清不含のD'MEM 400mlを加え、よく攪拌し、これを上記と同様にして準備した細胞に添加し、インキュベートした。

②共焦点レーザー顕微鏡による観察

インキュベート時間はトランスフェクション後 1 時間、3 時間とし、以降、上記と同様の方法で観察した。

(2) 実験結果

human immunodeficiency virus (HIV)-1 Tat protein(positions 48-69)における基本的なペプチドは、細胞膜浸透性を持つペプチドで、外来分子（遺伝子，タンパク等）を効率よく細胞内に運ぶキャリアーとして知られている。アルギニン-rich ペプチドも Tat-(48-69)と非常によく似た細胞内への導入が観察されることが知られている。本研究で用いた R8 及び STR8 はともにアルギニン-rich ペプチドであり、遺伝子キャリアーとして報告されており、特に STR8 は R8 に比較して非常に高い発現効率をしめすことが報告されている。それぞれのペプチドとプラスミド DNA との複合体を調製し、各複合体の細胞内動態を本評価系によって定量解析した。

まず、各複合体の細胞内における局在の様子を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その画像から R8 とプラスミド DNA との複合体（以下「R8 複合体」という。）は、1 時間及び 3 時間において細胞内にあまり存在していなかった。細胞内に見られた R8 複合体は、1 時間及び 3 時間ともにエンドソーム/リソソームに局在している様子が観察された。また 1 時間及び 3 時間どちらにおいても核内に存在する R8 複合体を観察することはできなかった。一方、STR8 とプラスミド DNA との複合体（以下「STR8 複合体」）は 1 時間では細胞膜周辺に凝集している様子や、エンドソームに約半数近くの細胞で局在している様子が観察された。さらに、R8 複合体においては観察できなかった核膜周辺に、STR8 複合体の局在している様子を観察できた。3 時間においては核内に存在している STR8 複合体を観察することができた。

つぎに、より詳細に各複合体の細胞内動態を観察するために、本評価系を用いて5個の細胞について定量解析を行った。解析の結果、1時間、3時間ともにR8複合体はエンドソーム/リソソームに90%以上の細胞で局在しており、このことからエンドサイトーシスによって取り込まれたことが示唆される。また、3時間においてもほとんどがエンドソーム/リソソームに存在することから、細胞質への放出効率が低いことが考えられた。

一方、STR8複合体に関しては1時間において60%の細胞でエンドソーム/リソソームに存在していることから、やはりエンドサイトーシスによる細胞内への取込が示唆される。さらに3時間においては70%近くの細胞において細胞質や核膜周辺にSTR8複合体が局在していること、40%の細胞で核内移行が観察されたことから、STR8複合体がエンドソームから細胞質に放出され、核膜透過が生じたと考えられる。このことから、STR8の細胞質への放出効率が高いのではないかということが示唆された。

産業上の利用の可能性

本発明により、細胞に導入した核酸の標的オルガネラ全体における局在量を正確に定量する方法、及び当該方法を利用して細胞に導入した核酸の細胞内動態を分析する方法が提供される。

請 求 の 範 囲

1. 細胞に導入した核酸の標的オルガネラにおける局在量を定量する方法であって、

- (a) 前記標的オルガネラを第一の蛍光色素で染色する工程、
- (b) ポリカチオン性物質と第二の蛍光色素で標識した前記核酸との複合体を前記細胞に導入する工程、
- (c) 前記細胞と交差する平面上に存在する前記第一の蛍光色素が発する蛍光を検出し、前記平面上における前記標的オルガネラの存在領域を決定する工程、
- (d) 前記平面上に存在する前記第二の蛍光色素が発する蛍光を検出し、前記標的オルガネラの存在領域のうち、前記第二の蛍光色素によって染色された領域の面積を算出する工程、
- (e) 前記細胞と交差する複数の平面に対して前記工程 (c) 及び (d) を行う工程、並びに
- (f) 前記複数の平面について算出された前記第二の蛍光色素による染色領域の面積を総和し、前記第二の蛍光色素による染色領域の総和面積を指標として、前記核酸の前記標的オルガネラにおける局在量を定量する工程を含む前記方法。

2. 前記第一の蛍光色素又は前記第二の蛍光色素が発する蛍光を共焦点レーザー顕微鏡によって検出する請求項 1 記載の方法。

3. 前記複数の平面が、前記細胞内において互いに交差しない平面である請求項 1 又は 2 記載の方法。

4. 前記複数の平面の数が 20 以上である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

5. 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法により、細胞に導入した核

酸の異なる複数のオルガネラにおける局在量を定量し、前記核酸の細胞内動態を分析する方法。

図 1

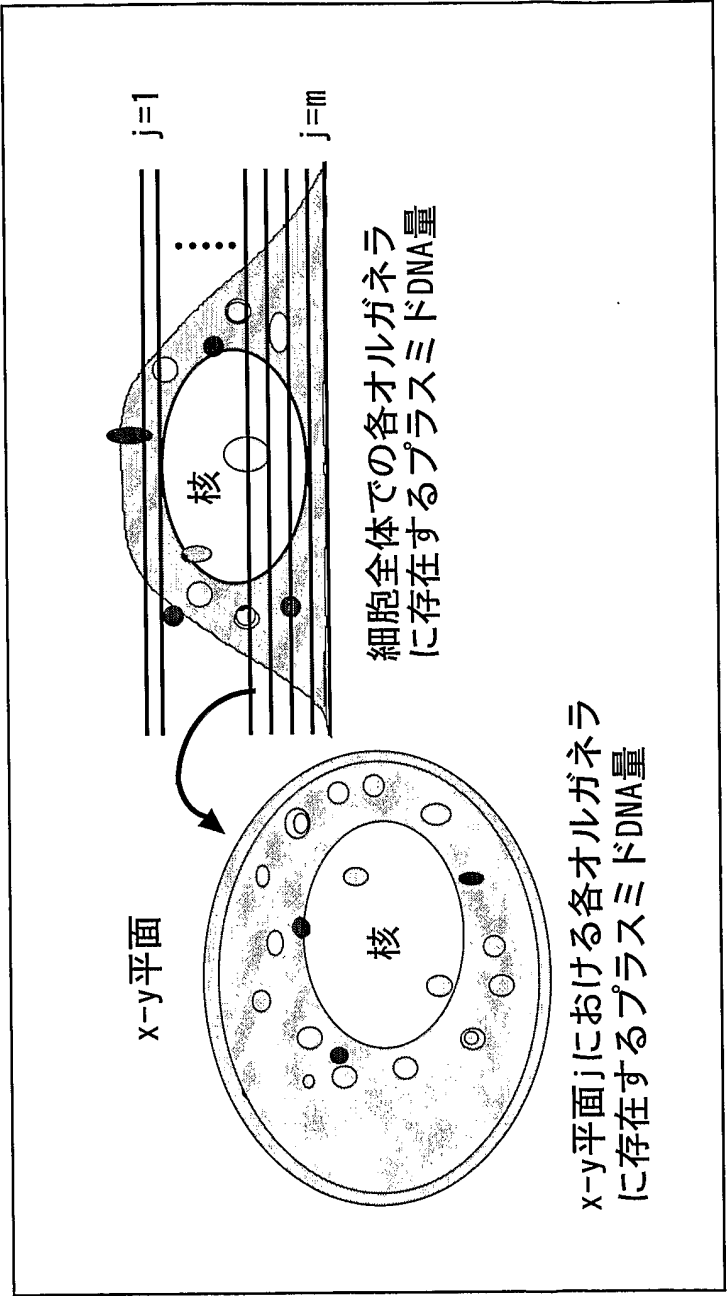


図 2

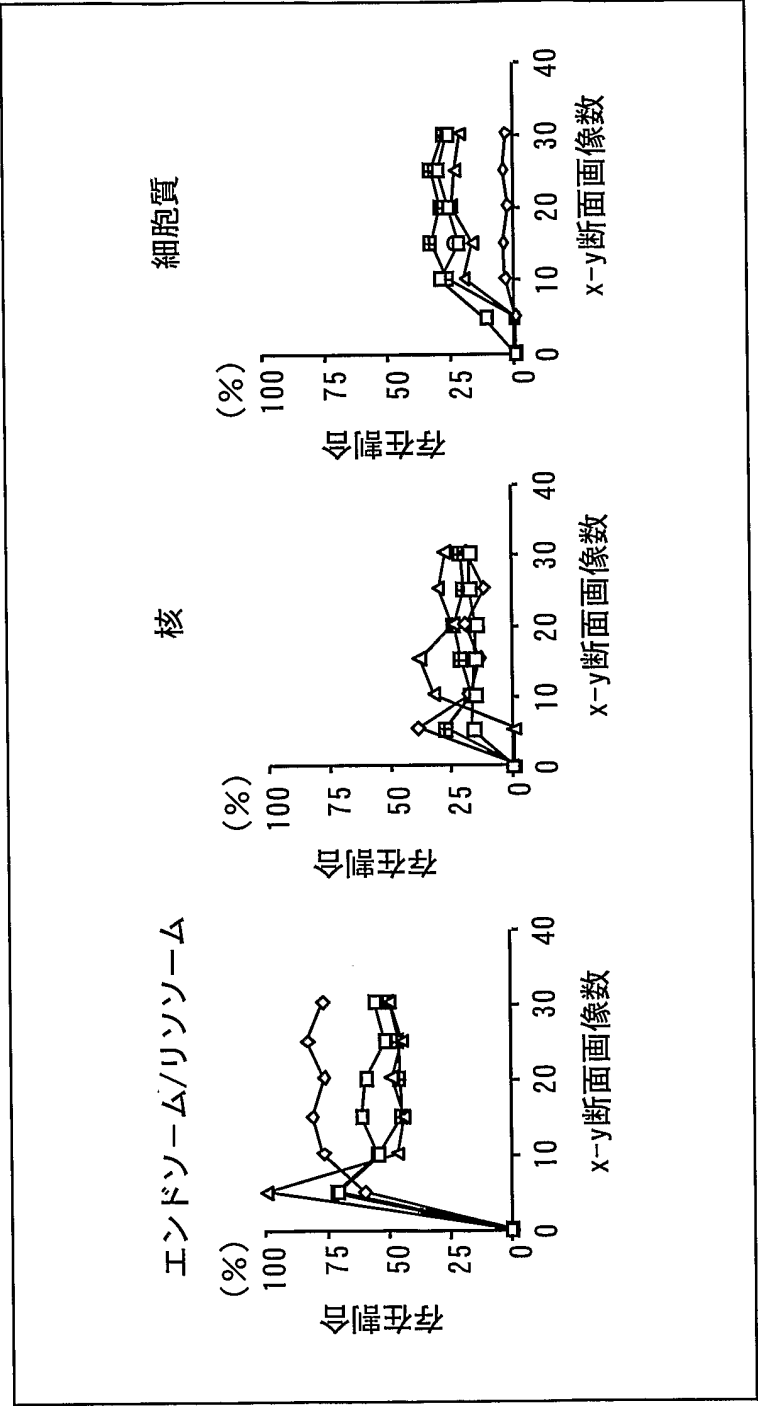
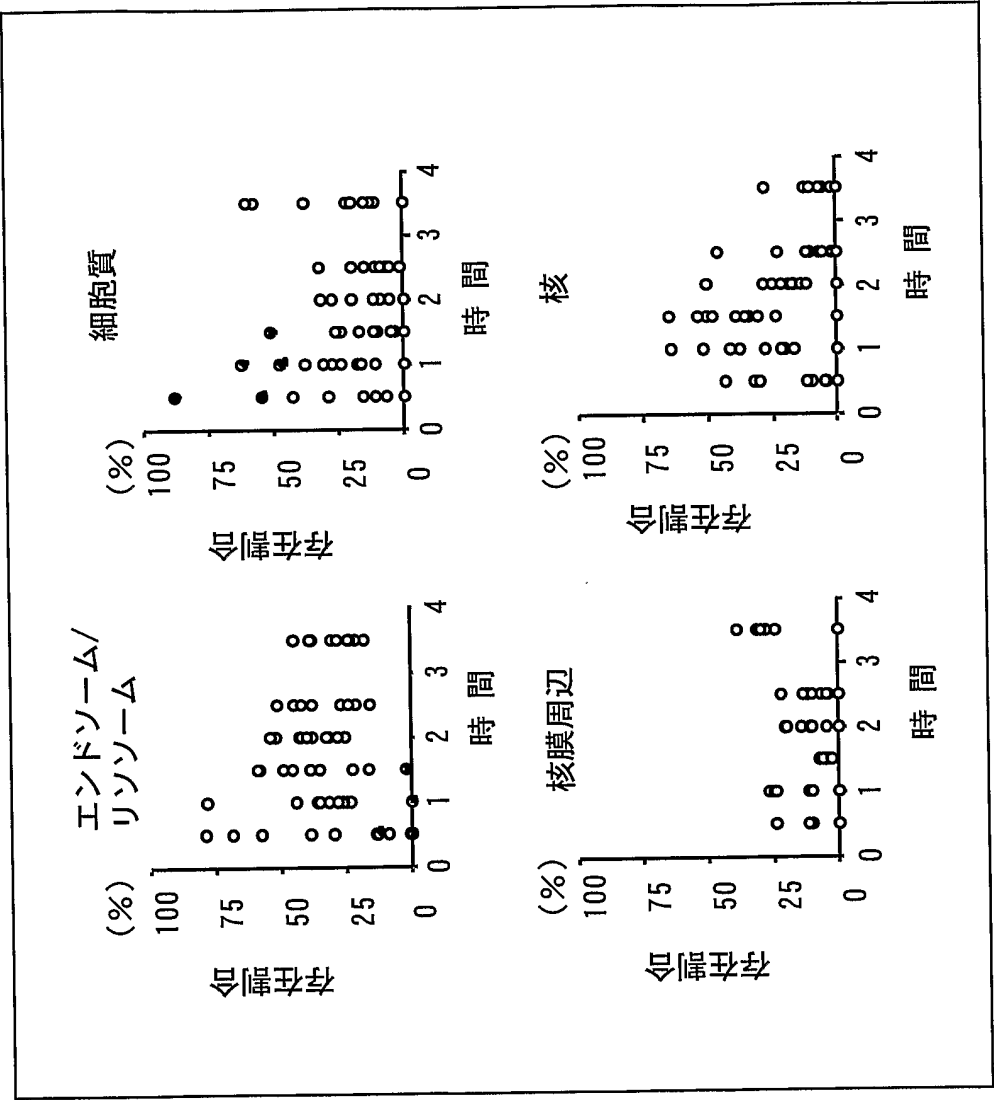


図 3



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 原島 秀吉 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	その他: インターネットから入手される電子的文書
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 05月 07日 (07.05.2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	http://208.164.121.55/ASGTupdates/
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

27 MAY 2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, 1/06, G01N33/58//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, 1/06, G01N33/58, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JICST)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKITA H. et al., Semi-quantitative analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA with confocal laser scanning microscopy. Mol. Ther., 2003, May, 7(5), supplement 1, p.S214, 548	1-5
Y	KAMIYA H. et al., Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 298(4), p.591-7	1-5
Y	TRIVEDI N.S. et al., Quantitative analysis of Pc4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. Photochem. Photobiol., 2000, 71(5), p.634-9	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2004 (09.06.04)Date of mailing of the international search report
29 June, 2004 (29.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006303

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	AKITA, H. et al., Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy., Mol.Ther., 2004, Mar., 9(3), p.443-51	1-5
A	Hideyoshi HARASHIMA, et al., "Triple Targeting niyori Gan Saibo ni Tokuiteki na Kakunai Tensha Yokusei System no Kochiku", Monbusho Kagaku Kenkyuho Hojokin Tokutei Ryoiki Kenkyu(I), Bio Targeting no tameno Seitai Bunshi Design Heisei 10 Nendo Kenkyu Seika Hokokusho. 1999, pages 418 to 423	1-5
A	GODBEY W.T. et al., Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery.Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 1999, 96(9), p.5177-81	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12Q1/68, 1/06, G01N33/58 // C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12Q1/68, 1/06, G01N33/58, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	AKITA H. et al., Semi-quantitative analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA with confocal laser scanning microscopy. Mol. Ther., 2003 May, 7(5), supplement 1, p. S214, 548	1-5
Y	KAMIYA H. et al., Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 298(4), p. 591-7	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
09. 06. 2004

国際調査報告の発送日
29. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上條 肇

4 B 3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TRIVEDI N. S. et al., Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. Photochem. Photobiol., 2000, 71(5), p. 634-9	1-5
PX	AKITA H. et al., Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. Mol. Ther., 2004 Mar, 9(3), p. 443-51	1-5
A	原島秀吉, 外2名, トリプルターゲティングによるがん細胞に特異的な核内転写抑制システムの構築, 文部省科学研究費補助金特定領域研究(I) バイオターゲティングのための生体分子デザイン 平成10年度研究成果報告書, 1999, p. 418-423	1-5
A	GODBEY W. T. et al., Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1999, 96(9), p. 5177-81	1-5