

ラット髄腔内へのsiRNA導入 (*in vivo*)

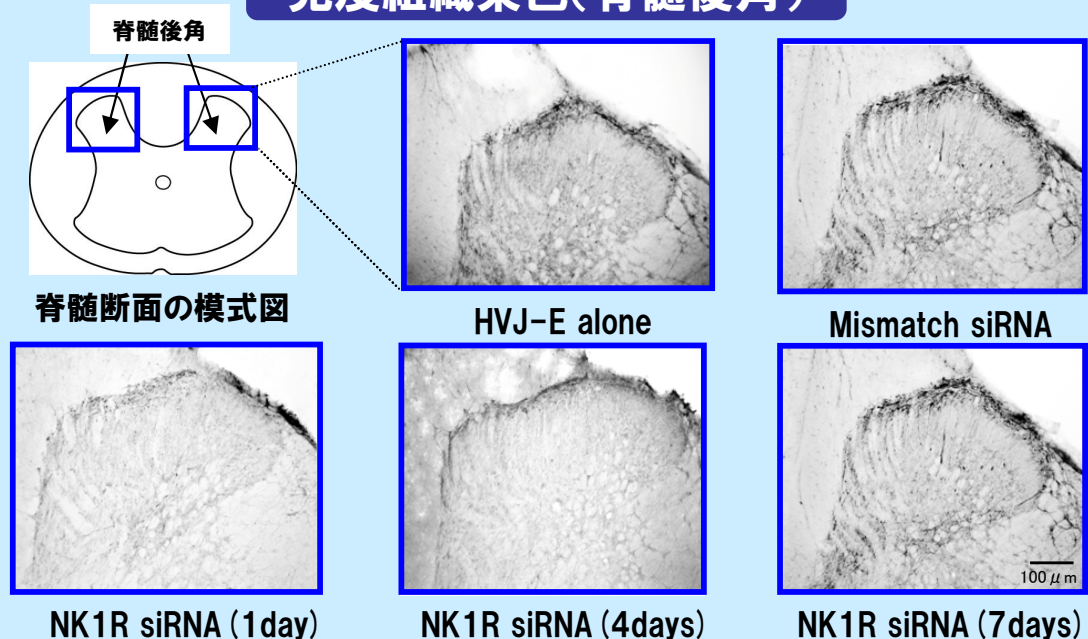
脊髄後角におけるNeurokinin1 receptor (NK1R) の発現抑制

方法



結果

免疫組織染色(脊髄後角)



NK1R siRNAの投与により、NK1Rの発現は顕著に抑制される

【免疫組織染色】

GenomONE-Neo (HVJ-Eベクター) を用いて、45pmolのNK1R*siRNAを髄腔内に留置したカテーテルを介して脊髄へ投与した。投与1日～7日後までNK1Rの発現の抑制を示した。

*NK1Rは、神経伝達物質の一つであるサブスタンスPの受容体

【siRNA投与によるNK1R発現の経時的変化】

条件	NK1R陽性細胞数
HVJ-E alone	38 \pm 0.9
NK1R siRNA (1day)	2 \pm 1.0
NK1R siRNA (4days)	12 \pm 0.4
NK1R siRNA (7days)	15 \pm 0.6
Mismatch siRNA	36 \pm 0.7

【NK1Rのノックダウン効果】

siRNA投与によって、サブスタンスP投与により誘発される疼痛関連行動の抑制、あるいは炎症誘発剤投与に伴う浮腫の減少や痛覚過敏行動の抑制効果(消炎・鎮痛効果)が認められた。

結論

siRNAによるNK1Rノックダウンモデルを用いたことで、脊髄でのNK1Rの機能が確認できた。

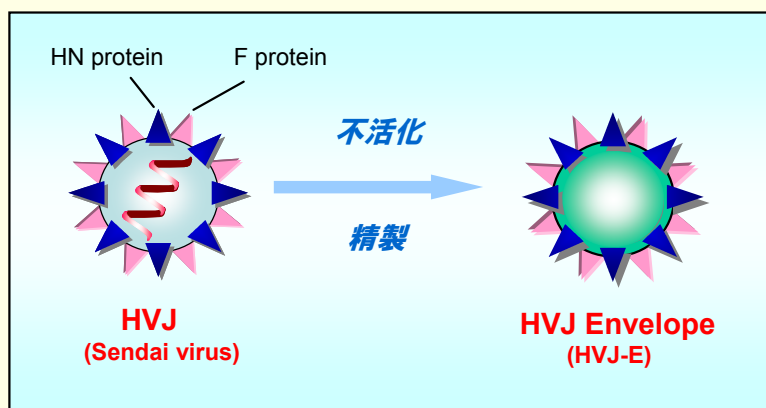
ラット髄腔内へのsiRNA導入プロトコル

Method: in vivo M法に準拠、試薬Cは無添加 [1~6は氷上で操作]		試薬量
1	HVJ-E (N) を融解し、マイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 250 μ L
2	試薬Bを添加・混合 (タッピング)	試薬B : 25 μ L
3	10,000g (10,000~12,000rpm)、4°Cで10分間遠心し、上清除去	
4	沈殿を緩衝液等に懸濁 (ピペティング20~30回)	緩衝液 : 100 μ L
5	3種類のsiRNA (各2 μ g/ μ L) 溶液を添加・混合 (タッピング)	siRNA溶液 : 各1 μ L 計3 μ L *
6	5分間静置	
7	留置したカテーテルを介してHVJ-Eベクター懸濁液を髄腔内から投与	10 μ L/1匹
8	人工脳脊髄液を追加で投与	10 μ L/1匹
9	投与1日~7日後に疼痛関連行動や消炎・鎮痛効果を評価	—

* NK1Rに対する3種類のsiRNAをHVJ-Eに封入(各2 μ g、計6 μ g)

データ提供 : 宮崎大学医学部神経生物学 中山(直野)留美 先生、西森 利数 先生
参考文献 : *Eur. J. Pharmacol.*, 670, 448-457 (2011).

■ HVJ Envelope (HVJ-E) とは?



HVJ Envelope(HVJ-E)は、センダイウイルス (HVJ : Hemagglutinating virus of Japan) のゲノムRNAを完全に不活化・精製し、外膜タンパク質 (HNおよびF) の膜融合活性のみを残した粒子です(増殖性・感染性はありません)。汎用される正電荷脂質系の導入試薬と異なり、膜融合を介して目的分子が直接細胞質内に導入されますので、リソソームでの分解を受けにくい利点があります。