



APPLICATION NOTE

倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2シリーズ
画像解析ソフトウェアモジュールGeneral Analysis 3

smFISH法と蛍光顕微鏡画像解析による 単一細胞レベルでのsiRNA効果の定量評価

核酸医薬品は、18-30塩基程度のDNAやRNAから構成され、疾患の原因となる遺伝子発現の抑制、修飾、または補完を通じて効果を発揮する革新的な医薬品です。しかし、その研究開発においては、体内動態や薬効の向上が重要な課題であり、新規人工核酸やLNP（脂質ナノ粒子）の開発は特許競争の焦点となっています。また、創薬スクリーニング段階では、細胞レベルでの薬効や導入効率が代替指標として使用されています。特に、siRNA医薬品は標的mRNAの配列特異的な分解を介して遺伝子発現を抑制する仕組みを持ち、その評価にはリアルタイムPCRが広く用いられています。しかし、リアルタイムPCRでは配列依存的なノックダウン効率と細胞への導入効率を個別に評価することが技術的に困難であり、正確な性能評価の障壁となっていました。

本アプリケーションノートでは、RNAを一分子レベルで可視化可能なsmFISH（single-molecule Fluorescence In Situ Hybridization）を活用し、siRNAのノックダウン効率と導入効率を独立して評価する新規手法について紹介します。

キーワード：smFISH法、RNAイメージング、General Analysis 3、siRNA医薬品

実験の概要

ヒト肺基底上皮腺癌細胞株A549細胞（JCRB細胞バンク, JCRB0076）をsmFISH法およびリアルタイムPCR用に分けて96ウェルプレートに播種し、20～24時間後にNegative Control siRNA（4390843, Thermo Fisher Scientific）またはGAPDH siRNA（439084, Thermo Fisher Scientific）をトランスフェクションしました。トランスフェクション後20～24時間でsmFISH法またはリアルタイムPCRを図1の通りに実施しました。

smFISH法による一分子レベルでのRNA可視化技術

smFISH法は、細胞や組織内のRNAを高感度に可視化する分子生物学的手法です。この技術では、蛍光標識された相補配列プローブをRNAにハイブリダイズさせ、RNAの局在や発現量を一分子レベルで検出します（図2）。プローブは特定のRNA配列に合わせて設計され、通常18～22塩基程度の複数種類が使用されます。この設計により、バックグラウンドシグナルが低減され、特異性が向上しています。smFISH法は、RNAを一分子レベルで可視化できる技術として、細胞内RNAの動態解析や発現量の定量に幅広く利用されています。本アプリケーションノートでは、高感度・高特異性を持ち簡便なプロトコルが特徴のLGC Biosearch Technologies社製のStellaris RNA FISHプローブを使用しました。

図1. 実験方法の概要

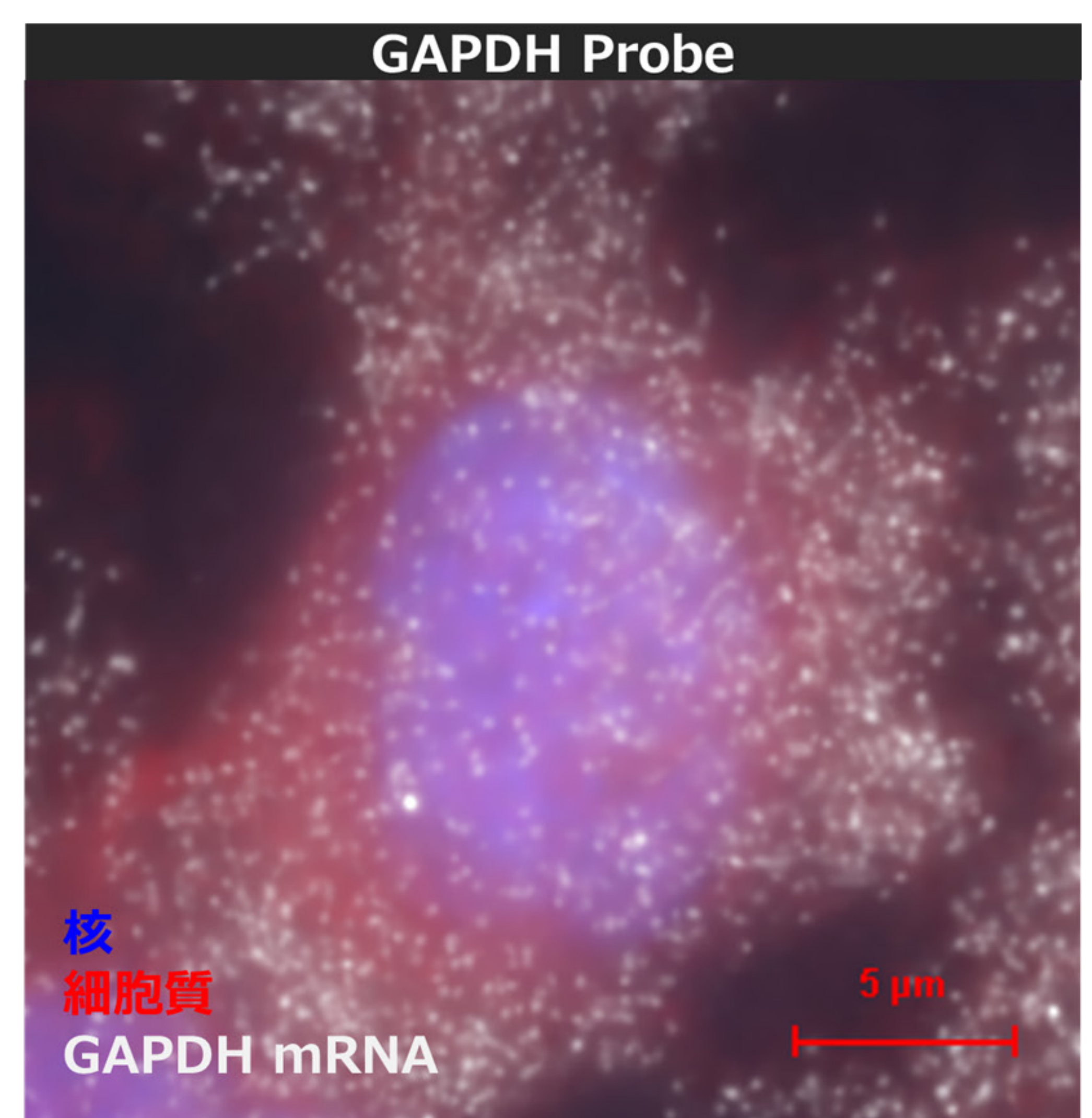
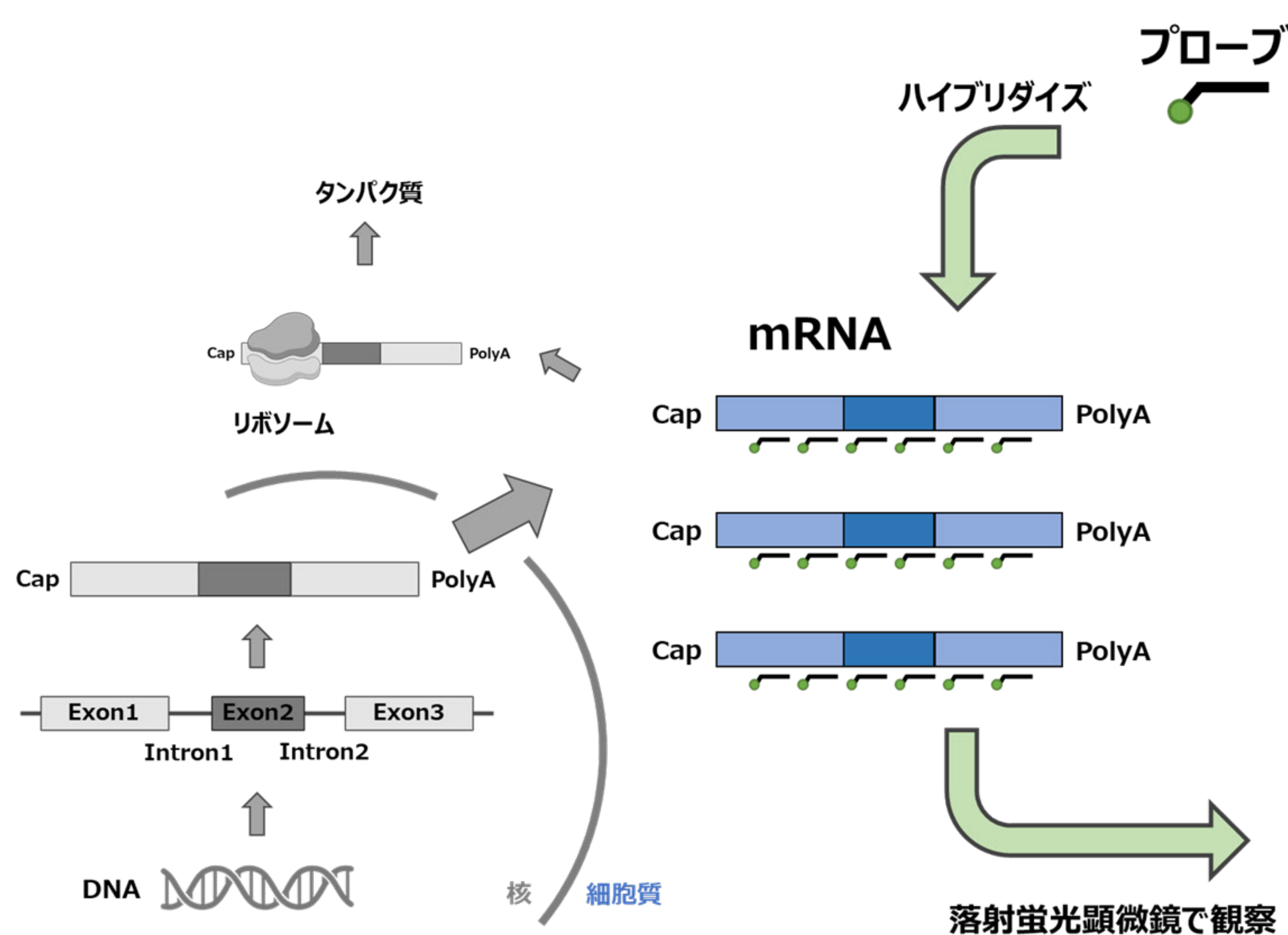


図2. smFISH法の概要

BioRender(<https://www.biorender.com/>)により作成。

siRNAによるノックダウンの細胞間ヘテロ性

GAPDH siRNAによるノックダウン実験を行い、細胞集団内で生じる現象をsmFISH法を用いて可視化しました。図3に示すGAPDH mRNAの蛍光画像において、GAPDH mRNAの輝点数が減少している細胞（①）と大きく変わらない細胞（②）が混在する「ヘテロな状態」が確認されました。この結果は、siRNAの細胞内への導入効率に細胞間で顕著な差異が存在することを示しています。

smFISH法のような高感度なイメージング技術は、従来の細胞集団全体を対象とした平均的解析では捉えることが困難な単一細胞レベルでの詳細なデータを取得することが可能であり、siRNAの特性や効果を評価する上で重要な示唆を与えるものと考えられます。

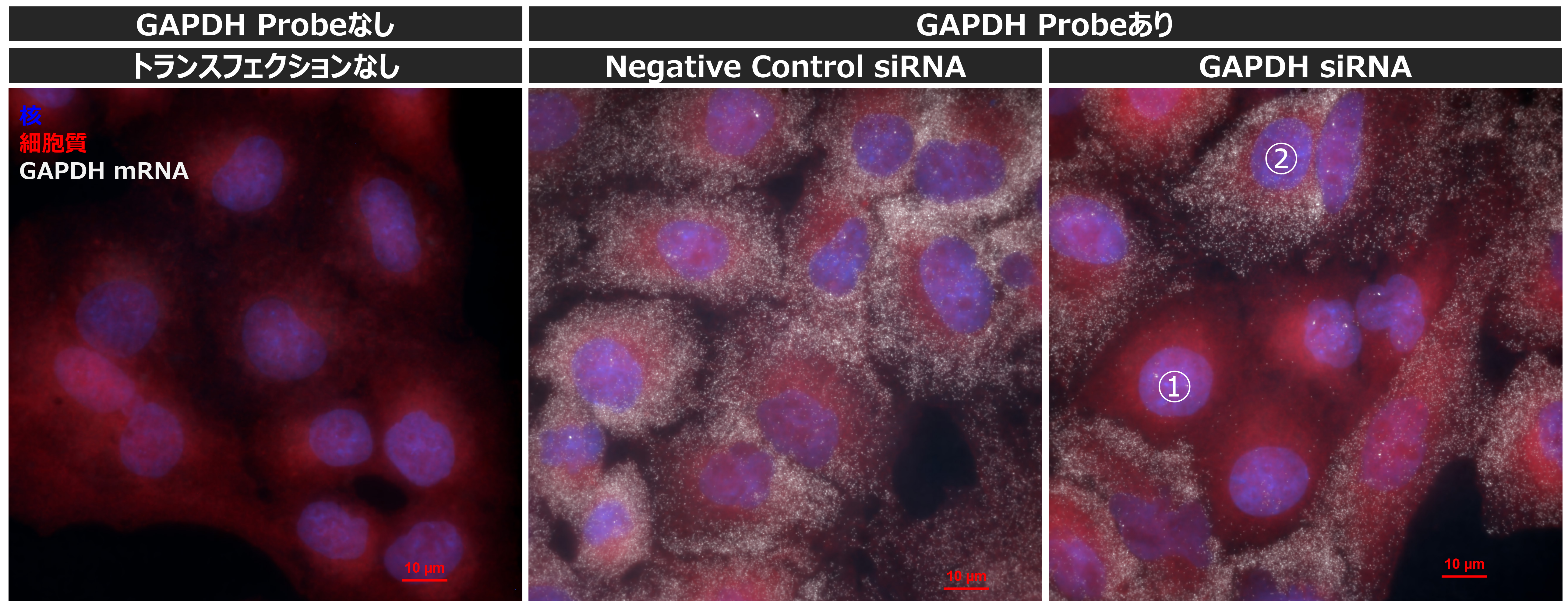


図3. GAPDH siRNA導入後のA549細胞におけるGAPDH mRNAのsmFISH画像
蛍光標識 青：核（DAPI）、赤：細胞質（HCS Cell Mask DeepRed Stain）、白：GAPDH mRNA（Quasar570）/100倍油浸対物レンズ
左）siRNAのトランスフェクションなし、GAPDH Probeの処理なし、中央）Negative Control siRNAをトランスフェクション、GAPDH Probe処理、右）GAPDH siRNAをトランスフェクション、GAPDH Probe処理を示す。右の画像に示す①はGAPDH mRNAの輝点数が減少している細胞、②は大きく変わらない細胞を示す。

smFISH法と画像解析によるノックダウン効率の定量化

smFISH法と画像解析を用いてノックダウン効率の定量性を確認するためリアルタイムPCRと比較しました。smFISH法では、倒立顕微鏡「ECLIPSE Ti2-E」と画像解析モジュールGeneral Analysis 3（GA3）を使用し、1細胞あたりのGAPDH mRNAの輝点数を定量しました（図4.A）。リアルタイムPCRでは相対検量線法でGAPDH mRNAの相対発現量を測定しました。

解析の結果、細胞間で輝点数に大きなばらつきが見られましたが、輝点数が減少した細胞はGAPDH siRNA濃度依存的に増加しました（図4.B）。また、GA3で定量した輝点数とリアルタイムPCRの相対発現量は高い相関を示し（決定係数 $R^2=0.99$ ）、smFISH法がリアルタイムPCRと同等の精度でノックダウン効率を評価できることが確認されました（図4.C）。さらに、解析に必要な細胞数を検討したところ、%CV（変動係数）を10%以下に抑えるには700細胞以上が必要であることが分かりました（図4.D）。

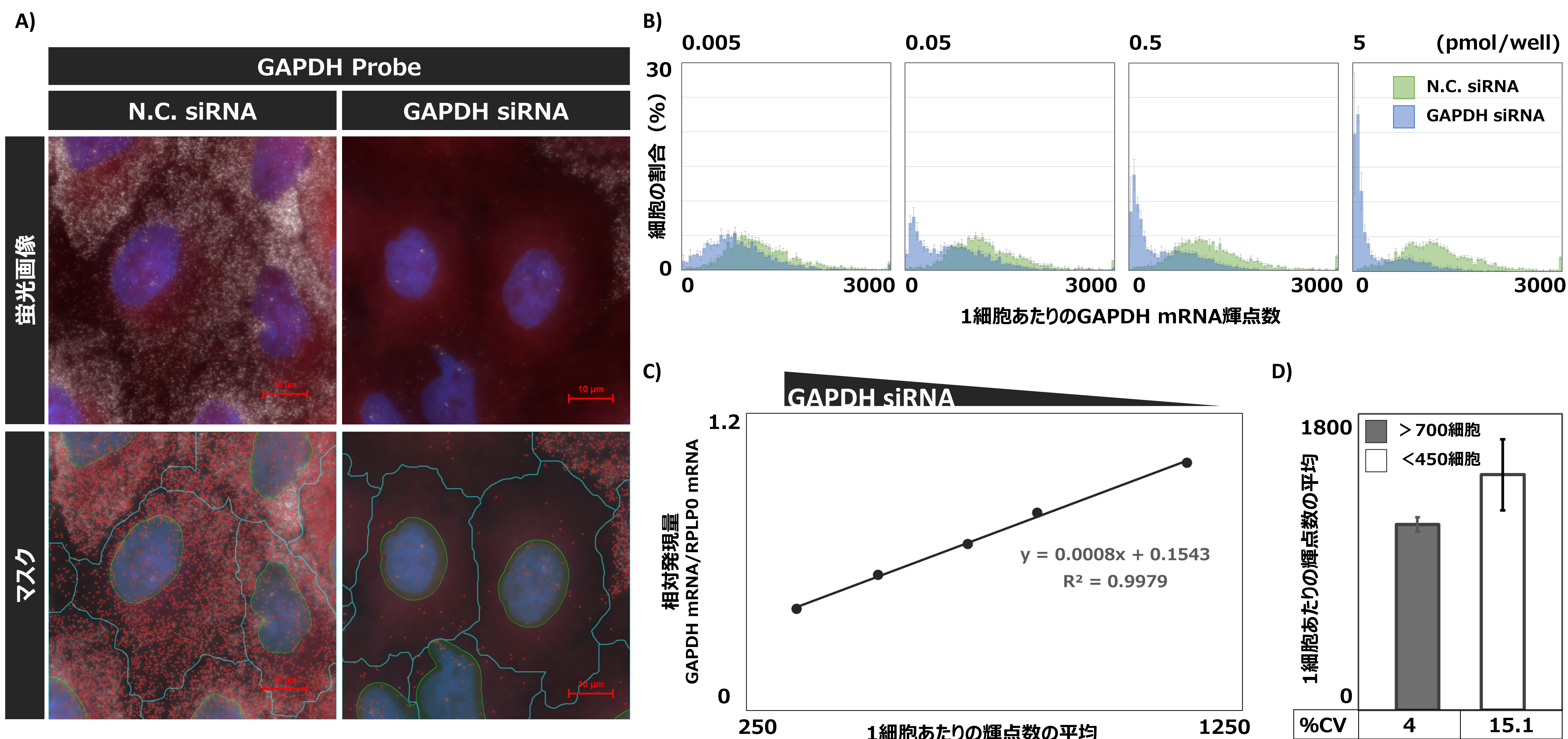


図4. smFISHによるGAPDH siRNA濃度依存的なノックダウン効果の定量化
A) siRNAを導入したA549細胞における1細胞あたりのGAPDH mRNA輝点数の代表的な蛍光画像（100倍油浸対物レンズを使用）。上）青：核（DAPI）、赤：細胞質（HCS Cell Mask DeepRed Stain）、白：GAPDH mRNA（Quasar570）の重ね合わせ画像、下）緑：核、青：細胞質、赤：GAPDH mRNAのマスキング画像を示す。B) 各濃度のGAPDH siRNA処理後の細胞集団における1細胞あたりのGAPDH mRNA輝点数のヒストグラム。C) smFISH法で定量した1細胞あたりのGAPDH mRNA輝点数と、リアルタイムPCRで測定したGAPDH mRNAの相対発現量の比較。D) 細胞数に応じた統計的信頼性。siRNAをトランスフェクションしていないコントロールサンプルにおける平均±SDを棒グラフとエラーバーで、%CVをテーブルに示す。

細胞単位で見るsiRNAの導入効率とノックダウン効率

smFISH法を用いて可視化したGAPDH mRNAの輝点数から、GAPDH siRNAが導入された細胞の割合（導入効率）およびその細胞におけるGAPDH mRNAの輝点数（ノックダウン効率）を詳細に解析しました。

siRNAをトランスフェクションしていないコントロールサンプルを基に、IQR法で正規化したヒストグラムから平均-2SDを算出し閾値と設定し（図5. A）、この閾値から図5. Bに示す方法でsiRNAの導入効率とノックダウン効率を算出しました。

結果、GAPDH siRNAの導入効率はsiRNA濃度依存的に増加した一方で、siRNAが導入された細胞では、どの濃度においても高いノックダウン効率を示しほぼ一定であることが確認されました（図5.C）。リアルタイムPCRで測定したGAPDH mRNAの相対発現量と導入効率を比較したところ、両者の間に高い相関が認められました（決定係数 $R^2 = 0.95$ 、図5. D）。この結果は、リアルタイムPCRで見られたsiRNA濃度依存的なmRNA発現量の減少は、細胞集団で一様な現象ではなく、図5における①と②に属するような細胞数の比の変化という、ヘテロな性質を反映したものであることを示しています。

このように、smFISH法は従来の手法では見落とされていたsiRNAのヘテロな効果を捉える新たな解析手法として有用であることが示唆されました（図5.E）。

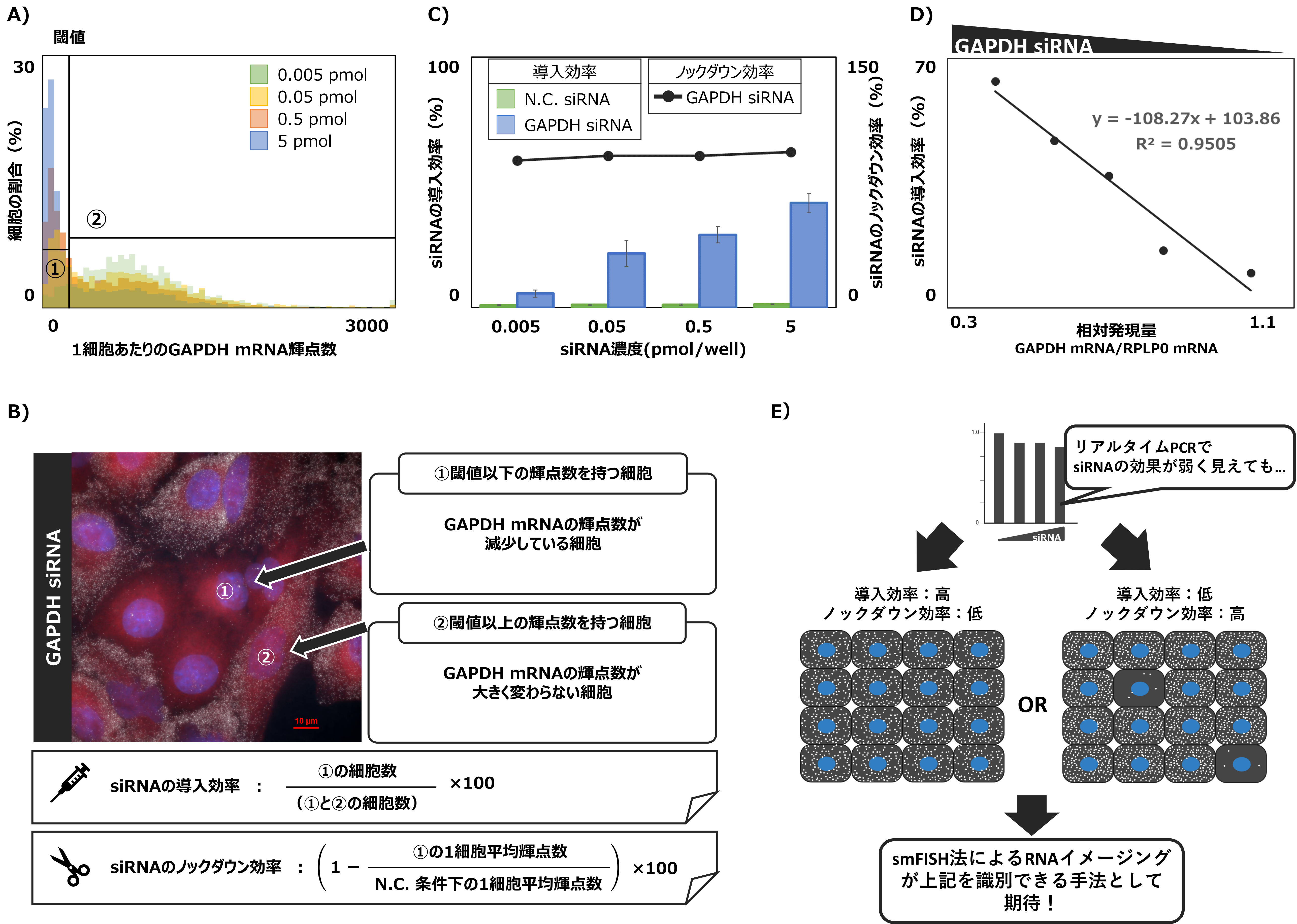


図5. GAPDH siRNAの導入効率とノックダウン効率の評価

A) 各濃度のGAPDH siRNAをトランスフェクションした細胞のGAPDH mRNAの輝点数のヒストグラム。siRNAをトランスフェクションしていないコントロールサンプルを用いてIQR法で正規化したヒストグラムから平均-2SDを算出し閾値として示す。B) A)で決定した閾値をもとに細胞を規定し、それぞれの数からGAPDH siRNAの導入効率とノックダウン効率を求めるための計算式についての説明を示す。C) B)より算出されたGAPDH siRNAの導入効率（棒グラフ）とノックダウン効率（折れ線グラフ）を示す。D) GAPDH siRNAの導入効率とリアルタイムPCRで測定したGAPDH mRNA相対発現量の比較。E) smFISH法を用いたRNAイメージングの有用性のイメージ。BioRender(<https://www.biorender.com/>)により作成。

まとめ

本アプリケーションノートでは、イメージングにより従来のリアルタイムPCRでは捉えられなかった細胞個々のsiRNAのノックダウン効率と導入効率を高精度に可視化・定量化することができました。特に、RNAの一分子レベルでの可視化を実現したsmFISH法は、リアルタイムPCRと同等の定量性を保ちながら、細胞ごとの詳細な応答の違いを識別できる優位性を示しました。

これは核酸医薬品の開発プロセスに新たな展望をもたらします。特に、個々の細胞での薬剤応答性や局在性の評価が重要となる核酸医薬品の設計と最適化において、イメージングをベースとするsmFISH法は信頼性の高い評価ツールとして、創薬開発の加速化に貢献することが期待されます。

著者 株式会社ニコン 早川知子 白土美香

製品情報

倒立顕微鏡
ECLIPSE Ti2シリーズ

視野数25の広視野により、サンプルの広範囲を効率的に取得できます。マニュアルモデルのほか、操作アシストガイドを搭載したモデルや、多次元画像取得にも対応する電動モデルをラインナップ。

