

200807028A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテーラーメイド研究事業)

機能性 siRNA 経口投与による家族性
高コレステロール血症に対する新しい治療薬の開発

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 斯波 真理子

平成20年度 (2009) 平成21年3月

目次

I. 総括研究報告書	1
機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に対する 新しい治療薬の開発 斯波 真理子 (資料)	
II. 分担報告書	
1. siRNA の <i>in vivo</i> スクリーニングと修飾化 siRNA の合成 ...	1 3
斯波 真理子	
2. 機能性 siRNA のデリバリー.....	2 3
山岡 哲二	
3. 機能性 siRNA イメージングの基礎研究.....	3 0
飯田 秀博	
4. 創薬ターゲットとしての mPGES.....	3 3
笹栗 俊之	
III. 研究成果の刊行物・印刷.....	3 9

機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に
対する新しい治療薬の開発

総括研究者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所・室長

研究要旨

FH は、LDL 受容体(LDLR)遺伝子を欠損する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では 20 才まで生きられない。本研究では、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後の臨床試験に備えることを目的とする。

初年度には、ApoB siRNA を合成して *in vitro* 及び *in vivo* スクリーニングを行い、肝臓での ApoB 発現抑制作用を持つ最適 siRNA の選択を行った。また、siRNA の *in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA の作成に成功している。

一方、肝細胞への優位的な取り込みが知られているプルランを用いて、siRNA に結合させた機能化 siRNA の合成について検討した。キャリアー分子を介した間接的戦略として、非ウイルスキャリアー分野において注目されているポリエチレンイミンをプルラン側鎖に導入したプルラン-siRNA コンジュゲートを作成し、非修飾 siRNA との複合体形成について検討し、また、マウス肝細胞を用い、ポリエチレンイミンと siRNA の複合体を形成させ、細胞内導入を行ったところ、最適な C/A を見出すことができた。更に、プルラン-siRNA コンジュゲートを用い、siRNA の発現について検討を行った。修飾化 siRNA の体内動態解析のために、¹²⁵I による標識法を確立して、次年度のイメージング解析に備えた。また、動脈硬化の粥腫安定化のための創薬標的分子として mPGES の可能性についても検討した。

2 年目以降の、修飾化 siRNA のモデル動物への静脈、腹腔内投与による体内動態解析、および治療効果の検討に用いる修飾化 siRNA の準備が整ったと言える。

分担研究者

国立循環器病センター研究所
生体工学部
山岡哲二
放射線医学部
飯田秀博
九州大学大学院医学研究院
臨床薬理学分野
笹栗俊之

A. 研究目的

FH は、LDL 受容体(LDLR) 遺伝子を欠損する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では 20 才まで生きられない。FH に対しては、以前よりウイルスベクターを用いた臨床試験まで行われているが、有効性、安全性において重大な問題点が指摘されている。一方、非ウイルスベクター

は、発現効率が低い場合十分な治療効果を得られていない。本研究では、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後に臨床試験に備えることを目的とする。目的を達成するために、以下の四点をクリアしなければならない。①経口投与から腸管吸収まで siRNA の消化・分解を抑える、②腸管での吸収を促進させる、③SPECT によるトレーサー分子の結合部位を確保する④siRNA を機能させるため、速やかに siRNA をリリースさせる。

まず、有効である siRNA の選別を行なった。13 種類の ApoB siRNA を合成してマウス肝細胞株を用いた *in vitro* におけるスクリーニングを行い、さらに hydrodynamics 法を用いて投与して、*in vivo* の肝臓での ApoB 発現抑制作用を持つ最適 siRNA の選択を行った。また、siRNA の *in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA の作成に成功した。

肝細胞指標性を有する siRNA の合成を行った。具体的には、肝細胞への優位的な取り込みが知られているプルランを用い 1、siRNA との複合体形成について検討した。更に、細胞に対する遺伝子導入の分野において用いられているポリエチレンイミンをプルラン側鎖に導入し、ポリエチレンイミンと siRNA を相互作用させ、プルラン-siRNA コンジュゲートの形成について検討した。

修飾化 siRNA の体内動態を制御する過程を評価するために、高分子の放射性同位元素でラベルする方法を確立した。

粥腫安定化のための創薬標的分子としての mPGES の可能性についても検討した。

B. 研究方法

1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシークエンスより、Profile Score (活性のある siRNA に共通する配列的特徴との比較によるスコア)、GC Score (siRNA の GC% から算出したスコア)、Position Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Load Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Specificity Score (UniGene を用いた off-target の予測によるスコア)などのパラメーターを用いて、siRNA に適する配列を選択した。

2. ApoB siRNA の *in vitro* におけるスクリーニング

マウス正常肝細胞 NMuLi 細胞を用いて、ApoB siRNA のスクリーニングを行なった。1 日目に細胞を 6 well plate に撒き、2 日目にそれぞれの siRNA を 1 well あたり 100 pmol ずつ用いて、Lipofectamine RNAiMAX とのコンプレックスを作製してトランスフェクションを行なった。3 日目にプレートから細胞を回収し、Trizol を用いて RNA の抽出を行なった。抽出した RNA は、Real time RT-PCR を用いて ApoB および GAPDH の mRNA 量の定量を行なった。

3. ApoB siRNA の *in vivo* におけるスクリーニング

ApoB siRNA の *in vitro* におけるスクリーニングの結果、有効であると判断された siRNA について、*in vivo* スクリーニングを行なった。バックグラウンドを C57Bl6/J にあわせてアポ E ノックアウトマウスを用いて、12 時間の空腹の後に尾静脈より採血した。さらに、尾静脈より hydrodynamics 法を用いてそれぞれの ApoB siRNA を投与した。すなわち、siRNA 20 μ g を 5% sucrose 溶液 2 ml に溶解して、尾静脈より 5 秒間で投与した。1 日後、2 日後、3 日後、4 日後に採血して、HPLC によりリポ蛋白分画中のコレステロール値を測定した。4 日後には、肝臓を取り出して細切し、液体窒素にて凍結して -80°C 保存した。肝臓から RNA を精製し、real time RT-PCR を用いて mRNA 量を定量した。

4. siBNA の作製

in vitro および *in vivo* スクリーニングにより効果が認められた ApoB siRNA について、*in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA (siBNA) を作製した。

5. プルラン-siRNA コンジュゲートの合成

プルラン (分子量 22,800, 1.083 \square mol, 昭和電工) と脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾール (CDI) (7.5mmol, 東京化成) を脱水 DMSO 60 μ l 中で 6 時間、室温で放置した。6 時間後、440 μ l の DEPC 水を加えた siRNA (Apo-B1 : sense 5'-

GUCAUCACACUGAAUACCAAUdTdT-3'

antisense

3'-dTdTTCACAGUAGUGUGACUUAUGGUUA

-5': sense 鎖の 5'末端をアミノ化)を、反応溶液に添加し、40 °C で 2 日間攪拌した (Scheme 1)。反応終了後、透析膜 (cut-off: 1,000) を用いた透析、凍結乾燥を経て精製を行った。

6. ブラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

ポリ (エチレンオキサソリン) (分子量 50,000) を出発物質とし、酸加水分解反応より、直鎖状ポリエチレンイミンを得た。得られたポリエチレンイミンはクロロホルムに易溶であり、高温条件にて、水、DMSO に可溶であった。

肝指標性を示す高分子としてブランを選択し、ポリエチレンイミンとの複合体形成を試みた。反応は、脱水 DMSO 中でブランの側鎖水酸基をカルボニルビスイミダゾール (CDI) により活性化し、ポリエチレンイミンと混合させた。具体的には、ブランと CDI を DMSO 中で 6 時間、室温で攪拌し、その後、ポリエチレンイミンを反応溶液に添加した。24 時間室温で攪拌した後、透析を用いて残渣を除去し、凍結乾燥を行うことで回収とした (Scheme 2)。

7. ポリエチレンイミンを用いた siRNA 導入

ポリエチレンイミンのアニオン (以下、A) に対して、siRNA のカチオン (以下、C) の割合が 48、24、12、6、3、1.5 となるように調整し、siRNA の細胞への導入実験を行った。2.1×10⁴ cells/cm² の NMuLi 細胞 (マウス肝細胞) を播種し、24 時間後にポリエチレンイミンと siRNA 100 pmol を混合させ、37 °C で 30 分インキュベートした。その後、細胞に添加し、37 °C で 24 時間インキュベート後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR により ApoB の発現を GAPDH で定量した。

8. ブラン-siRNA コンジュゲートの導入

ブラン-siRNA コンジュゲートを Lipofectamine RNAiMAX を用いて細胞へ導入した。導入 24 時間前に NMuLi 細胞を 2.1×10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種した。導入するブラン-siRNA は、仕込んだ siRNA を基準として 100 pmol になるように調製した。ブラン-siRNA (100 pmol) と Opti-MEM

150 μ l、Lipofectamine RNAiMAX 5 μ l と Opti-MEM 143 μ l を、それぞれ室温で 5 分間インキュベート後、混合し、続けて室温で 20 分間インキュベートした。その後、96 well プレートを用い、各 well に 300 μ l ずつ添加し、24 時間インキュベートした。評価はリアルタイム PCR 法で行った。

9. Na¹²⁵I を用いて、ペプチドの標識を行なった。Na¹²⁵I の酸化には過酸化水素-乳酸脱水素酵素を用い、ペプチドのチロシン残基に ¹²⁵I を標識した。

10. 細胞培養

U937 および THP-1 の培養には 10% ウシ胎仔血清を加えた RPMI1640 培地を用いた。両細胞株ともに、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100nM) にて分化誘導した後、リポ多糖 (LPS) および DIF-1 を用いて刺激した。

11. siRNA 導入

THP-1 に mPGE2 特異的 siRNA (Invitrogen) を RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。24 時間培養したのちに、PMA による分化誘導を行った。

12. ウェスタンブロット

刺激した細胞を回収し、SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。タンパク質を転写したメンブレンを一次抗体 (COX-2、mPGE2、GAPDH) と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

13. PGE2 濃度測定

培養上清中に含まれる PGE2 の濃度は、Prostaglandin E2 Expression EIA Kit (Cayman Chemical) にて測定した。

C. 研究結果

1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシーケンズより、Profile Score、GC Score、Load Score、Specificity Score などのパラメーターを用いて、Total Score が 90 点以上のもの 10 個を選択した。

2. 選択した ApoB siRNA の in vitro スクリーニング

配列により選択された ApoB siRNA の No.1~10 (ApoB-2~11) および ApoB-1 を用いてマウス肝細胞にトランスフェクションを行

なった。トランスフェクション1日後に細胞をかきとり、RNAを精製し、Real Time RT-PCRを用いてApoBおよびGAPDHのmRNA量の定量を行なった。一番効果を示したのは、ApoB-1であった。ApoB-7~11も効果を有することが示された。ApoB-1は、21塩基対を有しており、19塩基対用のソフトではスコアを計算することが出来ないで、1つずつ塩基をずらして3種類のsiRNA ApoB-1a、ApoB-1b、ApoB-1cとしてスコアを計算した。いずれも、siRNAとしてはほとんど効果がない、というスコアであった。

3. ApoB siRNAのin vivoにおけるスクリーニング

in vitro スクリーニングで最も効果を示したApoB-1およびApoB-10をhydrodynamics法を用いてアポEノックアウトマウスに投与して、血清総コレステロール値およびLDL-コレステロール値の変化を検討した。Negative controlとして、ルシフェラーゼ遺伝子のsiRNAを投与した。ApoB-1投与により、1日目から4日目まで、血清総コレステロール値およびVLDL+LDL-コレステロール値の有意な低下を認めたが、ApoB-10投与によっては、1日目のみの低下にとどまっていた。4日後の肝臓でのアポB mRNA量は、ルシフェラーゼ siRNA投与のコントロール群より低下していたが、有意な差は認めなかった。

4. siBNAの作製

in vitro およびin vivo スクリーニングにより効果が認められたApoB-1 siRNAについて、in vivo 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNAの一部の核酸をbridged nucleic acid (BNA)に置き換える修飾化siRNA(siBNA)を作製した。(大文字はRNA、小文字はBNA)

(siBNA-1)

5'-gtcatCACACUGAAUACCAAUTT-3'

(siBNA-2)

5'-gtCAtCACACUGAAtACcAAUTT-3'

5. プルラン-siRNA コンジュゲートの合成

精製後、白色の粉末を得た (Table 1)。得られたサンプルは水に易溶であった。siRNAが1 μg/1 μlになるように調整し水に溶解さ

せた。85℃で5分間インキュベートし、ゆるやかに室温に戻すことで、アニーリング操作を行った。

合成したサンプルの電気泳動を行った。電気泳動用に19%アクリルアミドゲルを作成した。1 well に対し、siRNAが0.6 μgになるよう調整し、反応前後のサンプル及びサイズマーカーを泳動した。サイズマーカーは20, 30, 40, 60, 80 merを用いた。得られた結果から、合成前と合成後に変化は見られなかった。これは、非常に希薄な濃度で反応を行ったため、縮合反応が進行しなかった、或いは、反応がわずかであるため、電気泳動で確認できなかったと考えられる。

6. プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

脱水縮合剤の量、ポリエチレンイミンの仕込量を変化させて合成した。溶媒量が少ない場合、系がゲル化した。また、活性剤及びポリエチレンイミンが多い場合、沈殿物の形成、系の白濁化が見られた。一方、希薄条件下において、水に対し溶解性を有する複合体が得られた。

得られた結果を基に、プルランの分子量を変化させ合成を行った。低分子プルラン(Mw 5,900)を用いた場合、合成条件では全て水に可溶であった。また、元素分析の結果、脱水縮合剤の量が増加するに従いNの割合の増加が見られた。一方、高分子量プルラン(Mw 22,800, 107,000)を用いた場合、脱水縮合剤の量が多い条件で水に不溶であり、白濁した溶液となった。

7. ポリエチレンイミンを用いた siRNA 導入実験

予備的検討として従来のポリエチレンイミンを用いて、マウス肝細胞にsiRNAを導入した。結果を図2に示す。C/Aの増加と共にApoBの発現は小さくなり、C/A=24以上で、ApoBの発現が抑制された。C/A=48において、発現は、コントロールと比較して20%となった。また、ポリエチレンイミンのみを添加した細胞と、siRNAを導入していない細胞(コントロール)と比較すると、発現量はほぼ同程度であった。この結果より、ポリエチレンイミンがApoBの発現に対し、影響を及ぼさないことが解った。さらに、siRNAのみを添加した細胞でも、ApoBの発現量の低下は見られなかった。以上より、ポリエチレンイミ

ンを用いることで、siRNA と複合体を形成し、細胞に影響を与えることなく、効果的に ApoB の発現を抑えることができることがわかった。

8. プルラン-siRNA コンジュゲートの導入

1 で合成したプルラン-siRNA コンジュゲートを用い、Lipofectamine RNAiMAX を導入試薬として使用することで、ApoB の発現抑制に関する検討を行った。プルラン-siRNA コンジュゲート (サンプル A-F) を用いた結果、全てのサンプルにおいて ApoB の発現量は低い値を示した。得られた値は、siRNA のみを導入した場合とほぼ同程度を示した。また、導入試薬の有無により、ApoB の発現量は変化しなかった。つまり、プルランを用いることで、siRNA の効果に影響することなく、肝細胞ターゲティングを可能にすると考えられた。

9. ^{125}I 標識の方法を図 1 に示す。チロシン残基に ^{125}I による標識がなされた。得られた ^{125}I -ペプチドの放射化学的純度は 96.8%、比放射能は 1006 TBq/mmol 以上であった。 ^{125}I -ペプチドの標識後、HPLC を用いて精製した。

10. COX-2 および mPGES の発現

THP-1 と U937 を LPS により刺激し、COX-2 および mPGES の発現をウェスタンブロットで検討した。THP-1 では、COX-2 の弱い発現上昇と mPGES の強い発現上昇が認められた。一方、U937 では COX-2 の発現上昇が認められたが、mPGES には変化が認められなかった。

11. mPGES に対する siRNA の効果

THP-1 に mPGES に対する siRNA を導入した後、PMA で分化誘導を行い、LPS で刺激した。図 2 に示すように、用いた 2 種類の siRNA (#1、#2) は両方とも、LPS による mPGES の発現誘導を抑制した。

また、培養上清に含まれる PGE2 の濃度を測定したところ、LPS により明らかな PGE2 の産生上昇が認められたが、siRNA を導入した細胞では、PGE2 の産生が有意に抑えられた。

12. mPGES に対する DIF-1 の効果

DIF は細胞性粘菌が産生する分化誘導因子であるが、哺乳類細胞においても種々の作用

を発揮することが報告されている。我々は、DIF-1 がウシ大動脈内皮細胞において LPS による COX-2 の誘導を阻害するという知見を得ていたので、THP-1 を用いて LPS による COX-2 および mPGES の発現に及ぼす影響について検討した。

DIF-1 は LPS による COX-2 および mPGES の発現上昇を明らかに抑制していた。

D. 考案

本研究は、家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体に対して、アポリポタンパク B の siRNA を用いて、経口投与による核酸医薬の開発を目的としている。本年度の成果で、*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行ない、ApoB-1 siRNA が有効であることがわかった。ApoB-1 siRNA は、*in vitro* で約 70% の ApoB 遺伝子発現抑制効果を有し、他の候補 siRNA より有効であることが示された。また、*in vivo* のスクリーニングは、静脈内投与では siRNA は分解速度が速いため評価が困難であることが予想されるため、hydrodynamics 法により施行した。hydrodynamics 法は、マウスの血液総量と同じ程度の量の溶液を 5~10 秒で投与すると、効率よくプラスミドや核酸が肝臓に運ばれる方法である。ApoB-1 siRNA 投与により、1 日~4 日後の総コレステロール値および VLDL+LDL-コレステロール値が有意に低下を認め、*in vivo* での有効性が示された。一方、ApoB-10 siRNA 投与によっては、1 日目のみに低下を認め、2 日目以降は有意な変化を認めなかった。これらのことから、ApoB-1 siRNA が *in vitro* および *in vivo* で有効であることがわかった。従って、修飾化 siRNA は、ApoB-1 siRNA を用いることにした。

siRNA は、endonuclease および exonuclease により容易に分解され、効力を失ってしまう。経口投与を考えた場合、これらの酵素が多量に存在する消化管、血液中において安定な形態を保つ工夫が必要である。我々は、siRNA が外的な環境において、できるだけ安定に存在させることが、本研究を成功させる上で極めて重要であることに気づいた。siRNA を安定に存在させる試みとして、RNA の塩基の一部を BNA に置き換える方法があることが報告されており、我々も siBNA を試みることにした。BNA を導入する部位は、siRNA のセンス側の 5' 末端付近が有効であるとの報告があり、siBNA-1 と siBNA-2 を合成した。来年

度は、これらの *in vitro* および *in vivo* での有効性の評価を行ない、さらに *in vivo* で有効性を示す修飾を付加して最終剤型に近づける予定である。

ApoB のキャリアーとした、プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成では、合成条件及びプルランの分子量を変化させることで、最適なキャリアーを見出すことが可能である。更に、機能化（消化、分解の軽減・トレーサー分子の結合）を見据え、数多くのサンプルを合成できたことは、本研究の達成に向けて大きく前進したといえる。今後、サンプルごとの ApoB の発現を検討していくと共に、キャリアーの機能化、新たなコンジュゲートの開発を行う。本研究は、遺伝子導入ベクターの開発の世界でも、画期的なことである。

放射性同位元素により、放射化学的純度、比放射能ともに十分に高い標識が得られたと考えられた。得られた画像については、論文発表の予定であり、報告書に記載することは出来ないが、ペプチドの受容体が多量存在する臓器に集積を認めており、siRNA の標識の準備はできたと考えられる。現在、修飾化 siRNA の合成がなされている最中であり、合成が成功すれば、直ちに ^{125}I による標識を行ない、画像が得られる予定である。

粥腫の炎症を抑制する治療標的分子を探る目的で、マクロファージの活性化と炎症反応のメディエーターである PGE2 の産生系に着目して検討を行ったところ、既存の抗炎症薬である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を抑制することにより下流の PGE2 の産生を抑制するが、NSAIDs は COX-1 をも抑制するため、生理機能の維持に必要なエイコサノイドの産生も低下させてしまう。この問題を解決するため、炎症時に誘導される COX-2 に特異的な阻害薬 (セレコキシブなど) が開発され、すでに臨床使用されているが、これらの薬剤は、プロスタサイクリンの産生減少によると思われる心血管イベントの増加を引き起こすことが報告され、その使用が制限されている。そこで、炎症を増悪させる PGE2 の産生を特異的に抑制する方法を開発するため、炎症性刺激下における直接的な PGE2 産生酵素である mPGES の抑制を試みた。ヒト骨髓性白血病細胞株 THP-1 を PMA で処置することにより、マクロファージ様細胞に分化させ、これに炎症性刺激を加

えると、mPGES タンパク質の誘導、および PGE2 産生上昇が認められたが、mPGES 特異的な siRNA を細胞にあらかじめ導入しておくことにより、これらの炎症反応を抑えることができた。

さらに、細胞性粘菌が産生する分化誘導因子 DIF-1 が、炎症性刺激により誘導される mPGES ならびに COX-2 の発現を抑制した。この結果は、DIF が抗炎症作用を有する可能性を示すものである。

E. 結論

ApoB siRNA を作製し、*in vitro* および *in vivo* スクリーニングを行ない、*in vivo* で有効な siRNA を選択し、BNA 化、プルラン化、プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの作製、 ^{125}I 標識方法の確立などを行い、次年度に行なう修飾化 siRNA の静脈注射による投与、最終年度に行なう修飾化 siRNA の経口投与による体内動態、効果の評価の準備が完了した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

(斯波真理子)

1. Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kangawa K, Yoshihara F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N, Kataoka K: Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.

Molecular Therapy in press

2. Shimano H, Arai H, Harada-Shiba M, Ueshima H, Ohta Y, Yamashita S, Gotoda T, Kiyohara Y, Hayashi T, Kobayashi J,

- Shimamoto K, Bujyo H, Ishibashi S, Shirai K, Oikawa S, Saito Y, Yamada N, Proposed guidelines for hypertriglyceridemia in japan with non-HDL cholesterol as the second target. **J. Atheroscler Thromb.** 2008; 15(3): 116-21
3. Yamashita S, bujyo H, Ari H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events : a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan, **J. Atheroscler. Thromb** in press
4. Hisashi Makino, Harada-Shiba M, Safety Aspects of Statins: Which Factors Create the Adverse Effects of Statins, **Medicinal Chemistry** 2008; 8(2):172-176
5. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」**ゲノム医学** Vol.8 No.2 2008年発行
6. 南雲彩子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) LDL アフェレーシス」**最新医学 新しい診断と治療の ABC13** 2008年発行
7. 杉沢貴子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) 病態生理 : (3) ARH, PCSK9 とリポタンパク代謝」**最新医学 新しい診断と治療の ABC13** 2008年発行
8. Hisashi Makino, Mariko Harada-Shiba Safety aspects of statins : Which factors create the adverse effects of statins Immun, Endoc, & Metab. Agents in Med. Chem, 2008年8月発行
9. 木下誠, 芳野原、田中朗、庄司哲雄、斯波真理子「small, dense LDL コレステロール測定試薬を用いた家族性複合型高脂血症診断における臨床評価」**医療と検査機器・試薬** 第31巻第2号 2008年4月発行
- 総説
1. 杉沢貴子、斯波真理子 「高コレステロール血症」**内科** Vol. 103 No.1 2009年1月発行
2. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症はどう治療するのか？」**レジデント** Vol.1 No.10 2009年1月発行
3. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」**ゲノム医学** Vol.8 No.2(2008-6)59-62(143-146)
4. 斯波真理子「脂質異常症の薬物療法および非薬物療法」**呼吸と循環** 第56巻 第11号 2008年11月発行
2. 学会発表
《国内学会》
1. Tuyoshi Yamazaki, Masato Tamura, Motoi Oishi, Mariko Harada-Shiba, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki ; Enhanced Serum Cholesterol Reducation in Vivo by PEGylated Nanogels Containing Quaternary Polyamine Core as a Bile Acid Adsorbent,

3rd International Symposium on Atomic
Technology / 3rd Polyscale Technology
Workshop, 2009.3 東京

1. 斯波真理子; ワークショップ 家族性高
コレステロール血症の小児期における
薬物治療 追加発言
第 22 回日本小児脂質研究会、2008.12
東京
2. 斯波真理子; 家族性高コレステロール血
症のガイドライン、ランチョンセミナー
第 22 回日本小児脂質研究会、2008.12
東京
2008.12 東京
3. 斯波真理子、杉沢貴子、楨野久士、南雲
彩子、友池仁暢、横山信治; 家族性高コ
レステロール血症 (FH) の最近の動向
第 29 回日本アフェレーシス学会学術大
会、シンポジウム 2008.11 広島
4. 楨野久士、南雲彩子、杉沢貴子、中濱肇、
吉政康直、斯波真理子
第 29 回日本アフェレーシス学会学術大
会、シンポジウム 2008.11 広島
5. 渡部和人、斯波真理子、菅尾祐輔、御供
田理沙、栗原亮介、森健、片山佳樹、新
留琢郎; デンドリティックポリリジン
を利用した肝細胞への siRNA デリバリー、
日本バイオマテリアル学会シンポジウ
ム 2008 ポスター発表 2008.11 東
京
6. 山崎毅、大石基、吉田吉行、斯波真理子、
長崎幸夫; コア-シェル型ポリアミンナ
ノゲルの 4 級化と胆汁酸吸着特性

日本バイオマテリアル学会シンポジウ
ム 2008 ポスター発表 2008.11 東
京

7. 斯波真理子、宮田完二郎、石井武彦、西
山伸宏、位高啓史、片岡一則; 高分子ナ
ノミセルを用いたアドレメデュリン遺
伝子導入によるモノクロタリン肺高血
圧症の改善
第 57 回高分子討論会 2008.9 東京
8. Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa,
Yasunao Yoshimasa, Motto Tsushima,
Akira Yamamoto, Hitonobu
Tomoike; Management of Atherosclerosis in
Adult FH Patients. 第 40 回日本動脈硬化学
会総会・学術集会、シンポジウム、2008.7、
つくば
9. 杉沢貴子、斯波真理子、楨野久士、宮本
恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友
池仁暢; スタチンは家族性高コレステロ
ール血症 (FH) ヘテロ接合体における冠
動脈疾患 (CAD) の発症年齢を遅らせた
か?
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集
会一般演題、2008.7 つくば
10. 斯波真理子; 遺伝子解析
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集
会座長、2008.7 つくば
11. 太田直孝、斯波真理子、宮本恵宏、杉沢
貴子、浦敏郎、新井浩司、佐藤清、楨野
久士、友池仁暢、吉政康直; LDL 受容体
遺伝子異常と家族性高コレステロール
血症 (FH) の 病態
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集

- 会一般演題、2008.7 つくば
12. 南雲彩子、安部映里、神野桂子、高木敦子、吉政康直、斯波真理子; ARH 遺伝子発現調節機構の検討
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008.7 つくば
13. Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa, Yoshihiro Miyamoto, Hisashi Makino, Ayako Nagumo, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Has Statin Delayed the First Event of Coronary Artery Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia(FH)?
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 口頭発表 2008.3 福岡
14. Takako Sugisawa, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Yoshihiro Miyamoto, Yasunao Yoshimasa, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Familial hypercholesterolemia (FH) associate with coronary artery disease(CAD)
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 ポスター発表 2008.3 福岡
15. Ayako Nagumo, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Takako Sugisawa, Hajime Nakahama, Yasunao Yoshimasa, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Applying LDL apheresis is vital for patients with not only homozygous FH ,but also statin-resistant heterozygous FH and coronary artery disease(CAD)
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 ポスター発表 2008.3 福岡
- (山岡 哲二)
- 1) K. Sawada, D. Terada, T. Fujisato, T. Yamaoka, and S. Kitamura. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 2008; 83 (6), 943-949.
- 2) T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, and T. Iwata. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials.* 2008; 29, 1307-1317.
- 3) S. Kakinoki, A. Panitch, D. A. Tirrell, and T. Yamaoka. Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials. *The Japanese Peptide Society.* 2008; 427-428
- 4) T. Yamaoka. Transcription efficiency in the nonviral gene transfer. *高分子.* 2008; 7
- 5) 馬原 淳, 山岡哲二. 幹細胞分離法とポピュレーション解析. In 次世代医療のための高分子材料工学. シーエムシー出版. 東京. 2008; 168-177
- 6) 山岡哲二, 橋 洋一. 細胞移植と分子イメージング. 最近の進歩. *人工臓器.* 2008; 37 (3)
2. 学会発表
- 1) 橋 洋一, 野寄久枝, 橋本朋子, 村上章, 山岡哲二. 感温性ポリエチレンイミン誘導体を用いた遺伝子導入. 第 8 回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム. 大阪. 2008 年 5 月 9 日
- 2) 鎌田和加子, 馬原 淳, 清野泰, 小林正和, 藤林康久, 山岡哲二. PET 追跡遺伝子を導入した細胞の in vivo イメージング. 第 8 回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム. 大阪. 2008 年 5 月 9 日
- 3) 山岡哲二. 転写効率向上を目指したポリ

- メリック遺伝子キャリアーの分子設計. 第57回高分子学会年次大会, 横浜. 2008年5月28日
- 4) 東 晃至, 橋 洋一, 飯田秀博, 平野義明, 山岡哲二. ソノポレーション法を用いた高分子造影剤の細胞内導入. 第57回高分子学会年次大会, 横浜. 2008年5月28日
- 5) T. Yamaoka, Y. Tachibana, J. Enmi, and H. Iida. In Vivo Tracking of the Transplanted Cells Using a Novel Polyric Contrast Agent. 8th World Biomaterials Congress. アムステルダム (オランダ) 2008年5月31日
- 6) 東 晃至, 橋 洋一, 平野義明, 山岡哲二. 分子量の異なる高分子化 MRI 造影剤を用いた細胞標識と in vivo イメージング. 第57回高分子討論会. 大阪. 2008年9月25日
- 7) 山岡哲二. Novel biomaterials for cell transplantation. TERMIS-AP 2008. 台北 (台湾) 2008年11月7日
- 8) 柿木佐知朗, 平工香織, 山岡哲二. ラミンの生理活性配列を付与した構造タンパク質の合成と評価. バイオマテリアル学会シンポジウム 2008. 東京. 2008年11月18日
- 9) 鎌田和加子, 馬原 淳, 清野 泰, 小林正和, 藤林康久, 山岡哲二. 移植細胞における in vivo PET イメージングシステムにおける感度の向上. 第8回日本再生医療学会総会. 東京. 2009年3月6日
- (飯田 秀博)
1. Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H. Absolute quantitation of myocardial blood flow with ^{201}Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. . Eur J Nucl Med Mol Imaging. 35:896-905, 2008
2. Kudomi N, Slimani L, Jarvisalo M, Kiss J, Lautamaki R, Naum G, Savunen T, Knuuti J, Iida H, Nuutila P, Iozzo P. Non-invasive estimation of hepatic blood perfusion from H_2^{15}O PET images using tissue-derived arterial and portal input functions. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 35:1899-911, 2008
2. Kudomi N, Slimani L, Jarvisalo M, Kiss J, Lautamaki R, Naum G, Savunen T, Knuuti J, Iida H, Nuutila P, Iozzo P. Non-invasive estimation of hepatic blood perfusion from H_2^{15}O PET images using tissue-derived arterial and portal input functions. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 35:1899-911, 2008
4. Shidahara M, Watabe H, Kim K, Kudomi N, Ito H, Iida H. Optimal scan time of oxygen-15-labeled gas inhalation autoradiographic method for measurement of cerebral oxygen extraction fraction and cerebral oxygen metabolic rate. Ann Nucl Med. 22:667-75, 2008
5. Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction. Ann Nucl Med. 22:549-56, 2008
6. Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. Phys Med Biol. 53:277-85, 2008
7. Yamamoto A, Sato H, Enmi J, Ishida K, Ose T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Use of clinical MRI scanner for

pre-clinical research on rats. Radiological Physics and Technology. 2008

8. Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and CO2 in Healthy Men. Acta Physiol (Oxf). 193:303-8. 2008

9. Zeniya T, Watabe H, Kudo H, Hirano Y, Minato K, Iida H. Clinical usability of a compact high resolution detector for high resolution and quantitative SPECT imaging in a selected small ROI. EEE 2008 Nuclear Science Symposium Conference Record. 4257-59. 2008

10. 越野 一博, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 福田 肇, 樋掛 正明, 渡部 浩司, 飯田 秀博. 心筋 PET 検査の有用性. 臨床画像. 24:157-64. 2008

11. 越野 一博, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 福田 肇, 樋掛 正明, 渡部 浩司, 飯田 秀博. 心筋 PET 検査の有用性. 臨床画像. 24:157-64. 2008

12. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 飯田 秀博. SPECT イメージング. 遺伝子医学MOOK9号「分子イメージング技術」. 75-81. 2008

13. 林 拓也, 武信 洋平, 久富 信之, 渡部 浩司, 寺本 昇, 佐藤 博司, 越野 一博, 岩西 雄大, 永沼 雅基, 森脇 博, 横田 千晶, 成富 博章, 峰松 一夫, 飯田 秀博. 神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握. 循環器病研究の進歩. 48:79-86. 2008

(笹栗 俊之)

1) Tanaka, R., Miwa, Y., Mou, K., Tomikawa, M., Eguchi, N., Urade, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Wake, N., & Sasaguri, T. (2009) Knockout of the L-PGDS gene induces obesity and atherosclerosis in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 378 (4). 851-856

2) Miwa, Y., Oda, H., Shiina, Y., Shikata, K., Tsushima, M., Nakano, S., Maruyama, T., Kyotani, S., Eguchi, N., Urade, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2008) Association of serum lipocalin-type prostaglandin D synthase levels with subclinical atherosclerosis in untreated asymptomatic subjects. Hypertens. Res. 31 (10). 1931-1939

3) Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Jingushi, K., Miwa, Y., Morimoto, S., Hirata, M., & Sasaguri, T. (2008) Celecoxib-induced degradation of T-cell factors-1 and -4 in human colon cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377 (4). 1185-1190

4) Ohmine, T., Miwa, Y., Yao, H., Yuzuriha, T., Takashima, Y., Uchino, A., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Maehara, Y., & Sasaguri, T. (2008) Association between arterial stiffness and cerebral white matter lesions in community-dwelling elderly subjects. Hypertens. Res. 31 (1). 75-81

5) Han, Z., Miwa, Y., Obikane, H., Mitsumata, M., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2008) Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. Cardiovasc Res. 77 (4). 809-818

2. 学会発表

1) 三輪宜一, 白石富美恵, 高橋富美, 笹栗俊之, β_1 アドレナリン受容体遺伝子多型のアテノロール感受性への影響の検討, 第29回日本臨床薬理学会年会(12月4~6日, 東京)

2) 吉原達也, 高橋富美, 笹栗俊之, Differentiation-inducing factor-1による血管新生制御作用の検討, 第29回日本臨床薬理学会年会(12月4~6日, 東京)

3) 高橋富美, 吉原達也, 笹栗俊之, マウスを用いた Differentiation-inducing factor-1の体内動態および抗腫瘍作用の検討, 第29回日本臨床薬理学会年会(12月4~6日, 東京)

4) 三輪宜一, 大田祐子, 土橋卓也, 富永光裕, 河野雄平, 笹栗俊之, 上野道雄, 松岡博昭, レニン-アンジオテンシン系阻害薬投与下でのシルニジピンの蛋白尿減少効果-24時間家庭蓄尿での検討-, 第31回日本高血圧学会総会(10月9~11日, 札幌)

機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に
対する新しい治療薬の開発

siRNA の *in vivo* スクリーニングと修飾化 siRNA 合成

研究代表者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所・室長

研究要旨

FH は、LDL 受容体(LDLR)遺伝子を欠損する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では 20 才まで生きられない。本研究では、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後の臨床試験に備えることを目的とする。初年度には、ApoB siRNA を合成して *in vitro* 及び *in vivo* スクリーニングを行い、肝臓での ApoB 発現抑制作用を持つ最適 siRNA の選択を行った。また、siRNA の *in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA の作成に成功している。2 年目以降の、修飾化 siRNA のモデル動物への静脈、腹腔内投与による体内動態解析、および治療効果の検討に用いる機能性核酸の準備が整った。

研究協力者

大阪大学大学院薬学系研究科
小比賀 聡
国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部
鈴木 朗
宮田 浩子
神野 桂子
井上 麻衣
合田 睦美

効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後に臨床試験に備えることを目的とする。

初年度は、13 種類の ApoB siRNA を合成してマウス肝細胞株を用いた *in vitro* におけるスクリーニングを行い、さらに hydrodynamics 法を用いて投与して、*in vivo* の肝臓での ApoB 発現抑制作用を持つ最適 siRNA の選択を行った。また、siRNA の *in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA の作成に成功した。

A. 研究目的

FH は、LDL 受容体 (LDLR) 遺伝子を欠損する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では 20 才まで生きられない。FH に対しては、以前よりウイルスベクターを用いた臨床試験まで行われているが、有効性、安全性において重大な問題点が指摘されている。一方、非ウイルスベクターは、発現効率が低いため十分な治療効果を得られていない。本研究では、安全性が高く

B. 研究方法

1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシークエンスより、Profile Score (活性のある siRNA に共通する配列的特徴との比較によるスコア)、GC Score (siRNA の

GC%から算出したスコア)、Position Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Load Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Specificity Score (UniGene を用いた off-target の予測によるスコア) などのパラメーターを用いて、siRNA に適する配列を選択した。

2. ApoB siRNA の in vitro におけるスクリーニング

マウス正常肝細胞 NMuLi 細胞を用いて、ApoB siRNA のスクリーニングを行なった。1 日目に細胞を 6 well plate に撒き、2 日目にそれぞれの siRNA を 1 well あたり 100 pmol ずつ用いて、Lipofectamine RNAiMAX とのコンプレックスを作製してトランスフェクションを行なった。3 日目にプレートから細胞を回収し、Trizol を用いて RNA の抽出を行なった。抽出した RNA は、Real time RT-PCR を用いて ApoB および GAPDH の mRNA 量の定量を行なった。

3. ApoB siRNA の in vivo におけるスクリーニング

ApoB siRNA の in vitro におけるスクリーニングの結果、有効であると判断された siRNA について、in vivo スクリーニングを行なった。バックグラウンドを C57B16/J にあわせたアポ E ノックアウトマウスを用いて、12 時間の空腹の後に尾静脈より採血した。さらに、尾静脈より hydrodynamics 法を用いてそれぞれの ApoB siRNA を投与した。すなわち、siRNA 20 μ g を 5% sucrose 溶液 2 ml に溶解して、尾静脈より 5 秒間で投与した。1 日後、2 日後、3 日後、4 日後に採血して、HPLC によりリポ蛋白分画中のコレステロール値を測定した。4 日後には、肝臓を取り出して細切し、液体窒素にて凍結して -80°C 保存した。肝臓から RNA を精製し、real time RT-PCR を用いて mRNA 量を定量した。

4. siBNA の作製

in vitro および in vivo スクリーニングにより効果が認められた ApoB siRNA について、in vivo 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA (siBNA) を作製した。

C. 研究結果

1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシーケンスより、Profile Score、GC Score、Load Score、Specificity Score などのパラメーターを用いて、Total Score が 90 点以上のもの 10 個を選択し、Table 1 の No. 1~10 に示した。既報 (Nature 432 (11):173-177, 2004 年) の配列を No. 11 に ApoB-1 として記載した。

2. 選択した ApoB siRNA の in vitro スクリーニング

配列により選択された ApoB siRNA の No. 1~10 (ApoB-2~11) および ApoB-1 を用いてマウス肝細胞にトランスフェクションを行なった。トランスフェクション 1 日後に細胞をかきとり、RNA を精製し、Real Time RT-PCR を用いて ApoB および GAPDH の mRNA 量の定量を行なった (Fig. 1, 2)。一番効果を示したのは、ApoB-1 であった。ApoB-7 11 も効果を有することが示された。ApoB-1 は、21 塩基対を有しており、19 塩基対用のソフトではスコアを計算することが出来ないため、1 つずつ塩基をずらして 3 種類の siRNA ApoB-1a、ApoB-1b、ApoB-1c としてスコアを計算した (Table 1)。いずれも、siRNA としてはほとんど効果がない、というスコアであった。

3. ApoB siRNA の in vivo におけるスクリーニング

in vitro スクリーニングで最も効果を示した ApoB-1 および ApoB-10 を hydrodynamics 法を用いてアポ E ノックアウトマウスに投与して、血清総コレステロール値および LDL-コレステロール値の変化を Fig. 3, 4 に示した。Negative control として、ルシフェラーゼ遺伝子の siRNA を投与した。ApoB-1 投与により、1 日目から 4 日目まで、血清総コレステロール値および VLDL+LDL-コレステロール値の有意な低下を認めたが、ApoB-10 投与によっては、1 日目のみの低下にとどまっていた。4 日後の肝臓でのアポ B mRNA 量は、ルシフェラーゼ siRNA 投与のコントロール群より低下していたが、有意な差は認めなかった。

4. siBNA の作製

in vitro および in vivo スクリーニングにより効果が認められた ApoB-1 siRNA について、in vivo 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の

抑制のために、siRNAの一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA (siBNA) を作製した。(大文字は RNA、小文字は BNA)

(siBNA-1)

5'-gtcatCACACUGAAUACCAAUTT-3'

(siBNA-2)

5'-gtCAcCACACUGAAAtACcAAUTT-3'

D. 考案

本研究は、家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体に対して、アポリポタンパク B の siRNA を用いて、経口投与による核酸医薬の開発を目的としている。本年度の成果で、*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行ない、ApoB-1 siRNA が有効であることがわかった。ApoB-1 siRNA は、*in vitro* で約 70% の ApoB 遺伝子発現抑制効果を有し、他の候補 siRNA より有効であることが示された。また、*in vivo* のスクリーニングは、静脈内投与では siRNA は分解速度が速いため評価が困難であることが予想されるため、hydrodynamics 法により施行した。hydrodynamics 法は、マウスの血液総量と同じ程度の量の溶液を 5~10 秒で投与すると、効率よくプラスミドや核酸が肝臓に運ばれる方法である。ApoB-1 siRNA 投与により、1 日~4 日後の総コレステロール値および VLDL+LDL-コレステロール値が有意に低下を認め、*in vivo* での有効性が示された。一方、ApoB-10 siRNA 投与によっては、1 日目だけに低下を認め、2 日目以降は有意な変化を認めなかった。これらのことから、ApoB-1 siRNA が *in vitro* および *in vivo* で有効であることがわかった。従って、修飾化 siRNA は、ApoB-1 siRNA を用いることにした。

siRNA は、endonuclease および exonuclease により容易に分解され、効力を失ってしまう。経口投与を考えた場合、これらの酵素が多量に存在する消化管、血液中において安定な形態を保つ工夫が必要である。我々は、siRNA が外的な環境において、できるだけ安定に存在させることが、本研究を成功させる上で極めて重要であることに気づいた。siRNA を安定に存在させる試みとして、RNA の塩基の一部を BNA に置き換える方法があることが報告されており、我々も siBNA を試みることにした。BNA を導入する部位は、siRNA のセンス

側の 5' 末端付近が有効であるとの報告があり、siBNA-1 と siBNA-2 を合成した。来年度は、これらの *in vitro* および *in vivo* での有効性の評価を行ない、さらに *in vivo* で有効性を示す修飾を付加して最終剤型に近づける予定である。

E. 結論

ApoB siRNA を作製し、*in vitro* および *in vivo* スクリーニングを行ない、*in vivo* で有効な siRNA を選択した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1. Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kangawa K, Yoshihara F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N, Kataoka K: Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Molecular Therapy* in press

2. Shimano H, Arai H, Harada-Shiba M, Ueshima H, Ohta Y, Yamashita S, Gotoda T, Kiyohara Y, Hayashi T, Kobayashi J, Shimamoto K, Bujo H, Ishibashi S, Shirai K, Oikawa S, Saito Y, Yamada N. Proposed guidelines for hypertriglyceridemia in Japan with non-HDL cholesterol as the second target. *J. Atheroscler Thromb.* 2008; 15(3): 116-21

3. Yamashita S, bujyo H, Ari H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events : a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *J. Atheroscler. Thromb* in press

4. Hisashi Makino, Harada-Shiba M. Safety Aspects of Statins: Which Factors Create the Adverse Effects of Statins. *Medicinal Chemistry* 2008; 8 (2) :172-176

総説

1. 杉沢貴子、斯波真理子 「高コレステロール血症」内科 Vol. 103 No. 1
2009年1月発行

2. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症はどう治療するのか？」レジデント Vol. 1 No. 10 2009年1月発行

3. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」ゲノム医学 Vol. 8 No. 2 (2008-6) 59-62 (143-146)

4. 斯波真理子「脂質異常症の薬物療法および非薬物療法」呼吸と循環 第56巻 第11号 2008年11月発行

5. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」ゲノム医学 Vol. 8 No. 2 2008年発行

6. 南雲彩子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) LDL アフェレーシス」

最新医学 新しい診断と治療の ABC13
2008年発行

7. 杉沢貴子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) 病態生理: (3) ARH, PCSK9 とリポタンパク代謝 最新医学 新しい診断と治療の ABC13 2008年発行

8. Hisashi Makino, Mariko Harada-Shiba Safety aspects of statins : Which factors create the adverse effects of statins *Immun, Endoc, & Metab. Agents in Med. Chem.* 2008年8月発行

9. 木下誠, 芳野原, 田中朗, 庄司哲雄、斯波真理子「small, dense LDL. コレステロール測定試薬を用いた家族性複合型高脂血症診断における臨床評価」医療と検査機器・試薬 第31巻 第2号 2008年4月発行

2. 学会発表
《国内学会》

1. Tuyoshi Yamazaki, Masato Tamura, Motoi Oishi, Mariko Harada-Shiba, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki ; Enhanced Serum Cholesterol Reducation in Vivo by PEGylated Nanogels Containing Quaternary Polyamine Core as a Bile Acid Adsorbent, 3rd International Symposium on Atomic Technology / 3rd Polyscale Technology Workshop, 2009. 3 東京

1. 斯波真理子; ワークショップ 家族性高コレステロール血症の小児期における薬物治療 追加発言
第 22 回日本小児脂質研究会、2008. 12 東京
2. 斯波真理子; 家族性高コレステロール血症のガイドライン、ランチョンセミナー
第 22 回日本小児脂質研究会、2008. 12 東京
2008. 12 東京
3. 斯波真理子、杉沢貴子、槇野久士、南雲彩子、友池仁暢、横山信治; 家族性高コレステロール血症 (FH) の最近の動向
第 29 回日本アフェレーシス学会学術大会、シンポジウム 2008. 11 広島
4. 槇野久士、南雲彩子、杉沢貴子、中濱肇、吉政康直、斯波真理子
第 29 回日本アフェレーシス学会学術大会、シンポジウム 2008. 11 広島
5. 渡部和人、斯波真理子、菅尾祐輔、御供田理沙、栗原亮介、森健、片山佳樹、新留琢郎; デンドリティックポリリジンを利用した肝細胞への siRNA デリバリー、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 ポスター発表 2008. 11 東京
6. 山崎毅、大石基、吉田吉行、斯波真理子、長崎幸夫; コア-シェル型ポリアミンナノゲルの 4 級化と胆汁酸吸着特性
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 ポスター発表 2008. 11 東京
7. 斯波真理子、宮田完二郎、石井武彦、西山伸宏、位高啓史、片岡一則; 高分子ナノミセルを用いたアドレメデュリン遺伝子導入によるモノクロタリン肺高血圧症の改善
第 57 回高分子討論会 2008. 9 東京
8. Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa, Yasunao Yoshimasa, Motto Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Management of Atherosclerosis in Adult FH Patients.
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、シンポジウム、2008. 7、つくば
9. 杉沢貴子、斯波真理子、槇野久士、宮本恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友池仁暢; スタチンは家族性高コレステロール血症 (FH) ヘテロ接合体における冠動脈疾患 (CAD) の発症年齢を遅らせたか?
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会一般演題、2008. 7 つくば
10. 斯波真理子; 遺伝子解析
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会座長、2008. 7 つくば
11. 太田直孝、斯波真理子、宮本恵宏、杉沢貴子、浦敏郎、新井浩司、佐藤清、槇野久士、友池仁暢、吉政康直; LDL 受容体遺伝子異常と家族性高コレステロール血症 (FH) の病態
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会一般演題、2008. 7 つくば
12. 南雲彩子、安部映里、神野桂子、高木敦子、吉政康直、斯波真理子; ARH 遺伝子発現調節機構の検討

第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集
会 2008.7 つくば

13. Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa,
Yoshihiro Miyamoto, Hisashi makino,
Ayako nagumo, Motoo Tsushima, Akira
Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Has Statin
Delayed the First Event of Coronary
Artery Disease in Heterozygouse
Familial Hypercholesterolemia (FH) ?

第 72 回日本循環器学会総会・学術集会
口頭発表 2008.3 福岡

14. Takako Sugisawa, Mariko Harada-Shiba,
Hisashi Makino, Yoshihiro Miyamoto,
Yasunao Yoshimasa, Motoo Tsushima,
Akira Yamamoto, Hitonobu
Tomoike; Familial hypercholesterolemia
(FH) associate with coronary aartery
disease (CAD)

第 72 回日本循環器学会総会・学術集会
ポスター発表 2008.3 福岡

15. Ayako Nagumo, Mariko Harada-Shiba,
Hisashi Makino, Takako Sugisawa,
Hajime Nakahama, Yasunao Yoshimasa,
Akira Yamamoto, Hitonobu
Tomoike; Applying LDL apheresis is
vital for patients with not only
homozygous FH ,but also
statin-resistant heterozygous FH and
coronary artery disease (CAD)

第 72 回日本循環器学会総会・学術集会
ポスター発表 2008.3 福岡