

200907015A

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 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 斯波 真理子

平成 21 年度 (2010) 平成 22 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<br>新しい治療薬の開発<br>斯波 真理子 |    |
| (資料)  |    |
| II . 分担報告書  |    |
| 1. siRNA の BNA 修飾による in vitro および in vivo 機能評価            | 11 |
| 斯波 真理子  |    |
| 2. 家族性高コレステロール血症を克服するための<br>機能性 siRNA の開発                 | 26 |
| 山岡 哲二   |    |
| 3. siRNA のプルラン修飾キャリアーによる肝臓ターゲティング<br>及びイメージング             | 35 |
| 飯田 秀博   |    |
| 4. 創薬ターゲットとしての mPGES - I                                  | 44 |
| 笹栗 俊之   |    |
| III . 研究成果の刊行物・印刷物  | 48 |

## 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

主任研究者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所・室長

### 研究要旨

家族性高コレステロール血症(FH)は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、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、未治療では心筋梗塞などの動脈硬化症に伴う重篤な合併症を引き起こし20才まで生きられないと言われている。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している。初年度は、in vitro 及び in vivo スクリーニングにて有効な siRNA 配列の選択、肝指向性を有する siRNA とキャリアーの合成を完了している。本年度は、ApoB siRNA に修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)を搭載して、血清耐性試験、細胞を用いたアポ B 合成抑制実験、高脂血症モデルマウスへの静脈内投与による治療実験を行ない、肝臓でのアポ B mRNA 発現量の低下、投与後の血中総コレステロール値、VLDL、LDL コレステロール値の低下などの治療効果を確認した。合成ベクターについては、in vitro において、Pullulan-siRNA 効果、Pullulan-PEI を用いた siRNA 効果、細胞毒性、また in vivo において、Pullulan-PEI/siRNA 複合体の尾静脈投与による治療実験を行ない、単回、または、複数回投与後の肝臓における ApoB mRNA 量を有意に低下させること、組織に対する毒性の軽減、siRNA の安定性向上、肝臓ターゲティングおよび肝臓選択的イメージングを実現できた。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。

本年度の成果により、最終目的である、修飾化 siRNA の高脂血症モデル動物への経口投与による治療実験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

家族性高コレステロール血症(FH)は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、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、未治療では心筋梗

塞などの動脈硬化症に伴う重篤な合併症を引き起こし 20 才まで生きられないと言われている。現在は、LDL アフェレーシス療法という血漿交換療法を定期的に行なっていて、動脈硬化の進展を予防している。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している。FH に対しては、1990 年代にレトロウィルスベクターを用いた研究が行なわれ、臨床試験にまで至ったが、有効性、安全性において重大な問題点が指摘され、以後は行なわれていない。一方、非ウィルスベクターは、安全性はウィルスベクターに勝ると言われているが、治療効果を現すのに十分な発現効率が得られず、治療法としての確立には至っていない。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している。

本年度は、初年度に作製して *in vitro* および *in vivo* スクリーニングを行ない、選択された配列の ApoB siRNA に、機能性核酸である bridged nucleic acid (BNA) を搭載して、血清耐性試験、細胞を用いたアポ B 合成抑制実験、高脂血症モデルマウスへの腹腔内投与による治療実験を行ない、治療効果を

示す条件を見出すことが出来た。合成ベクターについては、*in vitro* において、Pullulan-siRNA 効果、Pullulan-PEI を用いた siRNA 効果、細胞毒性、また *in vivo* において、Pullulan-PEI/siRNA 複合体の尾静脈投与による治療実験を行ない、単回、または、複数回投与後の肝臓における ApoB mRNA 量を有意に低下させること、組織に対する毒性の軽減、siRNA の安定性向上、肝臓ターゲティングおよび肝臓選択的イメージングを実現できた。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。

## B. 研究方法

### 1. 修飾化核酸(BNA)を用いた実験 (斯波) 1-1 血清耐性実験

ApoB-1 siRNA および siBNA-1、siBNA-2 を用いて、以下の実験を行なった。マウスの血清 100  $\mu$ l に各 siRNA (siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2) を 40 pmol ずつ添加し攪拌して、37°C でインキュベートした。また、添加攪拌した後直ちに (インキュベート開始前) 5  $\mu$ l を採り出し、これを 1.5 ml 容量のチューブに入れて液体窒素で瞬間凍結させた。血清から、経時的にサンプリングを行い (0~1500 分) -80°C で保存した。20%TBE gel (Invitrogen) を用いて電気泳動を行い、SYBR Gold (Invitrogen) を用いて染色、FujiFilm 製の LAS-4000 mini で撮影を行い、Image J によりゲルの photo image にあるバンドの暗度から、ApoB mRNA の発現量を定量化した。

### 1-2. 修飾化核酸の in vitro 遺伝子発現抑制実験 (斯波)

マウス肝細胞 (NMuLi 細胞) に siApoB-1、siBNA-1 及び siBNA-2 (以下、これらを便宜上「siRNA」と総称する) をそれぞれ Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションした。細胞から AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作成、SYBR Green I (Applied Biosystems) を用いたインターカレーター法で Real-Time RT PCR を用いて mRNA の定量を行なった。

### 1-3. 修飾化核酸の in vivo 遺伝子発現抑制実験 (斯波)

C57BL6/J を用いて二週間の高脂肪食負荷の後、0 日目に採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。3 日目に再度採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。4 日後に下大静脈から採血した後、PBS で上腸間膜静脈より灌流し、終了後、肝臓を採取し、PBS で洗浄した後、細切、液体窒素で瞬間凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。凍結した肝臓の切片を 5ml の TRIzol Regent (Invitrogen) 内で、ホモゲナイズし AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、in vitro 実験と同様の real time RT-PCR 法を用いて mRNA の定量を行なった。

採取した血液は、血清分離後、血清総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値、及び HDL コレステロール

値を Wako のコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業(株)製) を用いて測定した。また、同様に Wako のトランスアミナーゼ CII-テストワコーで ALT・AST を測定し、肝臓障害度を評価した。さらにリポタンパク分析のため、スカイライトバイオテック株式会社において、HPLC によるリポタンパクの 20 分画のコレステロール値を解析した。

### 2. Pullulan-siRNA コンジュゲートの導入実験 (山岡)

NMuLi 細胞を用いて Pullulan-siRNA の導入を行った。100 pmol、または、500 pmol の Pullulan-siRNA を各 well に添加後、さらに 24 時間インキュベートし、24 時間後に、RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて評価した。

### 3. Pullulan-PEI 中和滴定 (山岡)

実験には、分子量 22,000 の PEI を用いた。さらに、分子量 5,900、および、107,000 の pullulan を用いて合成したポリマー (Pullulan5900-PEI、Pullulan107000-PEI) を用いた。PEI、Pullulan5900-PEI、Pullulan107000-PEI は、それぞれ 4.7 mg、4.8 mg 秤量し、150 mM の NaCl 8.0 ml で溶解した。0.1 M の NaOH を、PEI には 2.1 ml、Pullulan5900-PEI には 1.1 ml、Pullulan107000-PEI には 1.5 ml 添加し、 $\text{pH} \approx 12$  にした。その後、 $\text{pH} \approx 2$  に達するまで 0.1 M の HCl を少量ずつ添加し、中和点を算出した。なお、 $\text{pH} \approx 2$  に達するまで添加した HCl の総量は、PEI は 3.81 ml、Pullulan5900-PEI は 1.63 ml、Pullulan107000-PEI は 1.825 ml である。

### 4. Pullulan-PEI を用いた siRNA 導入実験 (山

岡)

#### 4-1. 複合体形成

中和滴定より算出したポリマー中のカチオン量から、Pullulan-PEI 5  $\mu$ l と siRNA 4  $\mu$ l (200 pmol) を混合し、37  $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートすることで、任意の C/A 比で複合体を形成させた。ポリアクリルアミドゲルを用い、100 V、60 分間電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により複合体の形成を評価した。

#### 4-2. ApoB mRNA 発現定量

Pullulan-PEI/siRNA 複合体を添加する 24 時間前に  $2.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の NMuLi 細胞を播種した。その後、前述した方法と同様に、C/A=1.5-48 の条件下で Pullulan-PEI/siRNA 複合体を形成させ、10 倍希釈した後、細胞へ添加し、さらに 37  $^{\circ}$ C でインキュベートした。24 時間後、QuickGene RNA cultured cell kit S (富士フィルム製) を用いて RNA を抽出し、リアルタイム PCR により ApoB の発現を GAPDH で定量を行った。

#### 4-3. 細胞毒性

毒性試験は、Pullulan-PEI/siRNA 複合体添加 24 時間後、WST-1 を用いて評価した。 $2.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の NMuLi 細胞を播種し、24 時間インキュベートした後、Pullulan-PEI/siRNA 複合体を加え、さらに 24 時間培養した。その後、WST-1 を添加し、30 分後にマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 4-4. in vivo 血中投与による治療効果

Pullulan5900-PEI、Pullulan107000-PEI を用いて、in vivo における siRNA のデリバリーを検討した。実験にあたり、6 週齢の雄のマウス (C57BL/6 J) に高脂肪食を 2 週間摂取させ

た、高コレステロール血症モデルマウスを作成した。実験の開始直前に、3 回絶食を経験 (食餌摂取 8 時間、絶食 16 時間) させたマウスを用い、1 回あたり 3  $\mu$ g (196 pmol) の siRNA を尾静脈投与した。複合体の形成は、前述と同様、Pullulan5900-PEI と siRNA を混合し、37  $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。その後、RNase-free の PBS にて 150  $\mu$ l にメスアップし、マウス尾静脈より単回投与した。なお、投与直前を 0 時間とし、24 時間ごとに 96 時間後まで採血した。さらに、実験終了時に肝臓を摘出し、肝臓での ApoB の発現量をリアルタイム PCR により定量した。同様に、Pullulan107000-PEI と siRNA を混合し、37  $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートすることで複合体を形成させ、Pullulan107000-PEI/siRNA 複合体 150  $\mu$ l をマウス尾静脈より投与した。48 時間後、同量の Pullulan107000-PEI/siRNA 複合体をさらに投与し、1 回目の投与より 120 時間後に肝臓を摘出した。

#### 5. 肝臓選択的ターゲティングを目指したポリマーの合成 (飯田)

Pullulan-PEI ポリマーはプルラン (分子量 107,000、0.3 unit mmol) 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) (0.15 mmol) を脱水 DMSO 30 mL 中で混合し、室温で 6 時間攪拌した。その後、ポリエチレンジアミン (分子量 22 kDa、0.3 mmol) を反応溶液に添加し、さらに 24 時間攪拌した。最後に透析を用いて未反応の残渣を除去し、凍結乾燥を行うことで目的物を回収した。

#### 6. Pullulan-PEI の毒性評価 (飯田)

C/A 比が 3、6、12、24、48 となるように調整し

たポリマー/siRNA 複合体をマウス(BALB/c)に尾静脈投与した後、死亡率と摘出した臓器での障害を調べた。

#### 7. 肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価(飯田)

肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価は BALB/c マウス(6 週齢)を用いて行った。ApoB siRNA は Alex 750 蛍光でラベル化した。Pullulan-PEI /siRNA 複合体(C/A 比 48) または PEI/siRNA 複合体(C/A 比 3)をマウスの尾静脈より投与した。投与後、1 および 3 時間にマウスを安楽死させ、臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓および脾臓)を摘出し、蛍光イメージャーにより各臓器における蛍光強度を測定した。

#### 8. 創薬ターゲットとしての mPGES-1(笹栗)

##### 8-1 細胞培養

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。また、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。ヒト由来大腸がん HCT-116 細胞の培養には 10%ウシ胎仔血清を加えた DMEM 培地を用いた。

##### 8-2. 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、mPGES、GAPDH)と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

##### 8-3. ヒト mPGES-1 プロモーター活性測定(笹栗)

24 穴培養用プレートに  $1 \times 10^5$  個のヒト大腸がん由来 HCT-116 細胞を撒き、24 時間後、ヒト mPGES-1 プロモーター(-35/-1068 bp)組み込んだホタルルシフェラーゼレポーターベクター(pGL3-Basic)と導入効率の適正化のためのウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター(pRL-SV40)を細胞に導入した。24 時間後、DIF-1(10 または  $30 \mu\text{M}$ )で 6、12、及び 24 時間処理した。処理後の HCT-116 細胞におけるルシフェラーゼ活性を Promega 社のキット Dual Luciferase Assay System を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って行なった。動物実験についても施設における動物実験指針に従い、動物愛護の精神を持って施行した。

#### C. 研究結果

##### 1-1. 修飾化核酸(BNA)の血清耐性実験(斯波)

血清耐性実験の結果を図 1 に示す。対応する未修飾の siRNA (図 1 において「siApoB-1」として示す)は、その血清半減期が 138 分であるのに対して、siBNA-1 の血清半減期は 267 分、siBNA-2 の血清半減期は 1107 分であった。siRNA の一部 BNA 化することにより、血清中での耐性が極端に上昇すること、BNA 化する核酸の位置によって、血清耐性の程度が大きく変化することがわかった。

##### 1-2. 修飾化核酸の in vitro 遺伝子発現抑制実験(斯波)

siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2 の濃度依存

的遺伝子発現抑制実験の結果を図2に示す。siBNA-1、siBNA-2ともに、マウス肝細胞株において siApoB-1 と同様の濃度依存的アポB遺伝子発現抑制効果を示すことがわかった。

### 1-3. 修飾化核酸の in vivo 遺伝子発現抑制実験 (斯波)

生理食塩水を投与した対照群 (Saline 投与群)、及び siApoB-1 または siBNA-2 をそれぞれ投与した被験群における肝臓での ApoB の mRNA の発現量を Relative CT Method により評価した結果を図3に示す。結果は、GAPDH の結果を用いて相対的に定量化したものである。in vivo で、siBNA-2 は、ApoB に対する未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも有意に ApoB の mRNA 発現を抑制した ( $P<0.05$ )。このことから、siBNA2 は、生体内で、未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも高い RNA 干渉効果を発揮することがわかった。siRNA を BNA 化することにより、生体内で有効な低分子干渉 RNA 分子として機能することが確認された。

siBNA-2 投与群は、生理食塩液や siApoB-1 投与群に比し、総コレステロールおよび VLDL コレステロール値は2日後に有意に低下、LDL コレステロール値は1日後に有意に低下を認めた。一方、HDL コレステロール値は、有意な変化を認めなかった。これらのことから、siBNA-2 は、肝臓でのアポB mRNA 発現を低下させることにより、血中の総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値

を低下させることが示された。

修飾化 siRNA の毒性を調べるために、siApoB-1、siBNA-2 投与後のマウス血清における AST および ALT 値を測定して、生理食塩液投与群と比較した。生理食塩液投与群に比べて siBNA-2 投与群で AST、ALT の低下を認めた。

### 2. Pullulan-siRNA コンジュゲートの導入実験 (山岡)

Lipofectamine RNAiMAX を用いて Pullulan-siRNA を NMuLi 細胞へ導入した結果、Pullulan-siRNA を導入した細胞の ApoB の発現量は、未修飾の siRNA を導入した場合と同程度を示し、Pullulan-siRNA は ApoB の発現を著しく抑制していることが示された。Pullulan-siRNA のみの導入を行った結果、すべてのサンプルにおいて、未処理の細胞と同程度の発現量を示した。

### 3. Pullulan-PEI 中和滴定 (山岡)

ポリマー中のカチオン量は、中和滴定により算出した。以後の実験は、C/A=192、96、48、24、12、6、3、1.5、0.75、0.375 の条件下で行った。

### 4. Pullulan-PEI を用いた siRNA 導入実験 (山岡)

#### 4-1. 複合体形成

Pullulan-PEI と siRNA の複合体形成能について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。その結果、PEI では、C/A=1.5 で複合体を一部形成し、C/A=6 以上では、完全に複合体を形成していた。Pullulan5900-PEI では、C/A=96 以上で完全に、C/A=48 では一部形成し、C/A=24 以



下では複合体を形成していないことが示された。一方、Pullulan107000-PEI では、C/A=192 のみ完全に、C/A=96 では一部複合体を形成し、C/A=48 以下では複合体を形成していないことがわかった。

#### 4-2. ApoB mRNA 発現定量

Pullulan-PEI による siRNA のデリバリーについて、NMuLi 細胞を用いて、in vitro で検討した。その結果、PEI、および、Pullulan5900-PEI どちらのキャリアーを用いた場合でも、C/A 比の増加とともに ApoB mRNA の発現量の低下が見られた。最終的に C/A=48 において約 0.7 程度まで減少した。

#### 4-3. 細胞毒性

キャリアー中のカチオンによる細胞障害について、PEI/siRNA、または、Pullulan-PEI/siRNA 複合体を細胞へ添加し、24 時間後に WST-1 を用いて評価した。PEI では、C/A 比の増加に伴い、細胞毒性がみられ、C/A=24 以上で細胞生存率が 50 % であった。一方、Pullulan5900-PEI では、C/A 比の増加に伴う毒性は見られなかった。

#### 4-4. in vivo 血中投与による治療効果

Pullulan-PEI による siRNA in vivo デリバリーを検討した。Pullulan5900-PEI を用いて siRNA を単回投与した結果、PBS 投与群と Pullulan5900-PEI/siRNA 群と比較すると、48 時間後では肝臓における ApoB mRNA の発現量の変化は見られなかった。しかし、96 時間後では、Pullulan5900-PEI 投与群で、約 15 % 低下しており、in vivo における有意性が示された。

さらに、Pullulan107000-PEI を用いて 2 回

投与した結果、C/A=192, 96 投与群で、PBS 投与群と比較して、有意な減少がみられた。特に、C/A=96 投与群では、40 % 以上の低下を示した。

5. PEI 1 mol% に対するプルランの修飾率は 0.64 mol% であった。次は、Pullulan-PEI /siRNA 複合体とコントロールである PEI/siRNA 複合体のサイズを測定した。PEI/siRNA 複合体のサイズはすべての C/A 比において 200 nm 以下であった。Pullulan-PEI /siRNA 複合体の場合は、C/A 比 12 以上の条件において 200 nm 以下であったが、C/A 比が減少するに従い、サイズの増加が観察された。

6. PEI/siRNA 複合体を投与したマウス群では、C/A 比の増加に伴い、死亡率が増加した。死亡したマウスの特徴として、呼吸混乱の症状と肺組織からの出血性赤斑点が確認された。しかし、Pullulan-PEI /siRNA 複合体の投与群では C/A 比 48 までマウスの死亡は確認されず、肺組織の異常もなかった。

7. 複合体の体内動態を調べるために、Alex 750 蛍光ラベル化 ApoB siRNA を用いた。Pullulan-PEI /siRNA 複合体を BALB/c マウス (6 週齢) に尾静脈投与し、蛍光イメージャーにより各臓器における蛍光強度を測定した。投与 1 時間後、PEI/siRNA 複合体投与群とプルラン修飾 PEI/siRNA 複合体投与群、両方とも主に肺と腎臓から蛍光が検出された。一方、3 時間経過後は、Pullulan-PEI siRNA 複合体を投与したマウスの肝臓のみ強い赤色の蛍光が検出され

た。

#### 8. DIF ファミリーによる mPGES-1 のタンパク質発現抑制 (笹栗)

PMA を 24 時間作用させて THP-1 細胞に分化を誘導し、DIF-1 (30  $\mu$ M) にて 3 時間刺激した後、LPS (1 または 10  $\mu$ g/ml) で 24 時間刺激した。回収したサンプルの COX-2 および mPGES-1 のタンパク質発現について検討したところ、DIF-1 での前処置によりこれらの酵素の発現が抑制されていた。DIF-1 による mPGES-1 発現抑制の時間依存性の検討を行い、PMA で分化誘導を行った THP-1 細胞を LPS で 24 時間刺激した後 DIF-1 (30  $\mu$ M) を添加し 1、3、6、12、24 時間後にサンプルを回収した。LPS で 24 時間刺激することにより mPGES-1 の発現は明らかに上昇し、時間経過とともにさらに発現が上昇していく。一方 LPS で 24 時間刺激後に DIF-1 を添加した群では、時間経過にしたがって若干の発現上昇が認められるものの、コントロール群と比較して明らかな発現抑制効果が認められた。

DIF-1 による mPGES-1 mRNA 発現抑制 PMA で分化誘導を行った THP-1 細胞を LPS (10  $\mu$ g/ml) で 24 時間刺激した後 DIF-1 (30  $\mu$ M) を添加し 24 時間後にサンプルを回収し総 RNA を抽出した。これを用いてリアルタイム PCR 法にて mRNA の発現量の変化を検討した。図 3 に示すように DIF-1 の添加により明らかな mPGES-1 の mRNA の発現量の低下が認められた。この結果から、DIF-1 が mRNA の発現量を低下させることにより、mPGES-1 のタンパク質発現量

を減少させていることが示唆された。

PGES には、mPGES-1 の他にも数種類存在するので、他の PGES に及ぼす DIF-1 の効果を検討したが、特に変化はみられなかった。

#### 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 をターゲットとした 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。昨年度の成果で、*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行わない、siApoB-1 が有効であることがわかっていった。siApoB-1 尾静脈投与により、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、この配列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り、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き、siRNA に酵素耐性を持たせる修飾を行うことにした。siBNA-1 および siBNA-2 は、ともに血清存在下での分解速度が遅く、特に siBNA-2 は siApoB-1 の 8 倍の半減期を示し、BNA 搭載の部位により、酵素耐性が大きく異なることがわかった。また、酵素耐性が強いことから、*in vivo* での RNAi 効果発現

を目的としては、siBNA-2 を用いるのが適当であると考えられた。in vitro トランスフェクションによるそれぞれの核酸の RNAi 効果については特に有意差が無く、いずれも in vitro では同等の作用を有することがわかった。一方、高脂肪食負荷マウスに対する核酸の尾静脈投与により、肝臓でのアポ B mRNA は、siApoB-1 に比し siBNA-2 によって有意に低下を認め、血清中の総コレステロール値、VLDL および LDL コレステロール値が有意に低下を認め、HDL コレステロール値は有意な変化を認めなかったことから、siBNA-1 は、siApoB-1 に比べて in vivo で著効を示すことがわかった。肝毒性の指標となる AST および ALT 値の上昇も認めないことから、BNA 修飾核酸は、核酸医薬として安全で有効な薬剤であることが示された。

in vitro において、Pullulan-PEI による siRNA のデリバリーについて検討した結果、PEI、および、Pullulan5900-PEI 共に C/A 比の増加とともに ApoB mRNA の発現抑制が見られたことから、高い C/A 比においてキャリアーとして有用であることを示している。

また、PEI では、C/A=24 以上で細胞生存率が 50 %であったが、Pullulan5900-PEI では、C/A 比の増加に伴う毒性は見られなかったことから、合成した Pullulan-PEI は、細胞への障害を抑え、効率よく肝細胞へ siRNA を送達できることが示唆される。

in vivo において、Pullulan5900-PEI を用いて単回投与、あるいは、Pullulan107000-PEI

を用いて複数回投与、いずれの場合も、PBS 投与群と比較して有意な差がみられた。このことから、in vivo においても、Pullulan-PEI をキャリアーとした siRNA のデリバリーが有効であることが示唆された。

ApoB siRNA は体内で非常に不安定であり、分解されやすいことが体内動態実験により確認した。この問題は、ポリマーと複合体を形成することで解決した。Pullulan-PEI /siRNA 複合体は siRNA の血中安定性を著しく向上し、肝臓ターゲティングおよびイメージングを実現させた。

以上の結果から、より強い Pullulan-PEI /siRNA 複合体の形成、胃酸や腸内酵素による複合体の消化、分化の軽減に必要なコーティング剤の検討を行うことで、Apo B siRNA の経口投与は十分可能であると判断される。

本研究は、主にターゲットをアポ B としているが、FH では実際、診断時にはすでに動脈硬化症の著明な進展を認める例も少なくない。動脈硬化巣における治療のターゲットとなる分子の探索を行ない、炎症性刺激下における直接的な PGE2 産生酵素である mPGES が候補としてあがっている。マクロファージを分化させ、これに炎症性刺激を加えると、mPGES-1 タンパク質の誘導が認められるが、細胞性粘菌が産生する分化誘導因 DIF-1 が、炎症性刺激により誘導される mPGES-1 の発現を抑制することがわかった。今後、これらの分子の動脈硬化巣成立のメカニズムの解明と、新し

い治療法の開発を行なっていく予定である。

以上の結果より、最終目的である、修飾化 siRNA の高脂血症モデル動物への経口投与による治療実験の準備が整ったと言える。

#### E. 結論

siRNA の BNA 化、および Pullulan-PEI をキャリアーとした siRNA の肝臓へのデリバリーが可能になった。

#### 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。

## 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 BNA 修飾による in vitro および in vivo 機能評価—

分担研究者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所・室長

### 研究要旨

家族性高コレステロール血症(FH)は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、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、未治療では心筋梗塞などの動脈硬化症に伴う重篤な合併症を引き起こし20才まで生きられないと言われている。現在は、LDL アフェレーシス療法という血漿交換療法を定期的に行なって、動脈硬化の進展を予防している。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している。本年度は、初年度に作製して in vitro および in vivo スクリーニングを行ない、選択された配列の ApoB siRNA に、修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA) を搭載して、血清耐性試験、細胞を用いたアポ B 合成抑制実験、高脂血症モデルマウスへの静脈内投与による治療実験を行ない、肝臓でのアポ B mRNA 発現量の低下、投与後の血中総コレステロール値、VLDL、LDL コレステロール値の有意な低下を認め、治療効果を示す条件を見出すことが出来た。肝臓への毒性を認めなかったことから、臨床応用が可能であることも示唆された。本年度の成果により、最終目的である、修飾化 siRNA の高脂血症モデル動物への経口投与による治療実験の準備が整ったと言える。

### A. 研究目的

家族性高コレステロール血症 (Familial Hypercholesterolemia; FH) は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、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す。未治療では心筋梗塞などの動脈硬化症による重篤な

合併症により、20 才まで生きられないと言われている。FH に対しては、1990 年代にレトロウイルスベクターを用いた研究が行なわれ、臨床試験にまで至ったが、有効性、安全性において重大な問題点が指摘され、以後は行なわれていない。一方、非ウイルスベクターは、安全性はウイルスベクターに勝ると言われているが、

治療効果を現すのに十分な発現効率が得られず、治療法としての確立には至っていない。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している。

本年度は、初年度に作製して *in vitro* および *in vivo* スクリーニングを行ない、選択された配列の ApoB siRNA に、機能的核酸である bridged nucleic acid (BNA) を搭載して、血清耐性試験、細胞を用いたアポ B 合成抑制実験、高脂血症モデルマウスへの腹腔内投与による治療実験を行ない、治療効果を示す条件を見出すことが出来た。本年度の成果により、最終目的である、修飾化 siRNA の高脂血症モデル動物への経口投与による治療実験の準備が整ったと言える。

## B. 研究方法

### 1. 修飾化核酸の作製

*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。

### 2. 血清耐性実験

ApoB-1 siRNA および siBNA-1、siBNA-2 を用いて、以下の実験を行なった。マウスの血清 100  $\mu$ l に各 siRNA (siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2) を 40 pmol ずつ添加し攪拌して、37°C でインキュベートした。また、添加攪拌した後直ちに (インキュベート開始前) 5  $\mu$ l を採り出し、これを 1.5 ml 容量のチューブに入れて液体窒素で瞬間凍結させた。また、この時のサンプルを 0 min とした。

血清から、経時的にサンプリングを行い (0~1500 分) -80°C で保存した。測定時に解凍し、Proteinase K (TaKaRa) 5  $\mu$ l と DMSO 5  $\mu$ l を入れて 30 分間、37°C でインキュベート、6×Sample Buffer を 3  $\mu$ l 入れ、20%TBE gel (Invitrogen) を用いて電気泳動を行った (始め 75V、15 分の後、110V で 120 分)。電気泳動の後、ゲルを同じ TBE Buffer 100ml 中に入れ、10  $\mu$ l の SYBR Gold (Invitrogen) 入れて 20~40 分ほど浸透した。その後、FujiFilm 製の LAS-4000 mini で撮影を行い、Image J によりゲルの photo image にあるバンドの暗度から、ApoB mRNA の発現量を定量化した。

### 3. 修飾化核酸の *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

マウス肝細胞 (NMuLi 細胞) を、6well プレートに細胞数 60 万個/well 蒔き、37°C で 36 時間、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターでインキュベートした。以下の要領で、siApoB-1、siBNA-1 及び siBNA-2 (以下、これらを便宜上「siRNA」と総称する) をそれぞれト

ランスフェクションした。

まず、トランスフェクションする siRNA を、最終濃度の 4 倍の濃度に調製し Lipofectamine RNAiMAX を混ぜて、Opti-MEM を加え、37°C で 24 時間、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターでインキュベートした。プレートを洗浄し、各ウェルに TRIzol Regent (Invitrogen) を 1ml ずつ加え、細胞のライセート溶液から AGPC 法を用いて total RNA を抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作成し、SYBR Green I (Applied Biosystems) を用いたインターカーター法で Real-Time RT PCR を用いて mRNA の定量を行なった。PCR の装置は Step one plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。使用した Primer の配列を以下に示す。Primer は各サンプルに対し 1 pmol ずつ使用した。

ApoB- Forward Primer:

TGGGCAACTTTACCTATGACTT

ApoB-Reverse primer:

AAGGAAATGGGCAACGATA

GAPDH-Forward Primer:

CAAAATGGTGAAGGTCGGTGTG

GAPDH-ReversePrimer:

ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

#### 4. 修飾化核酸の in vivo 遺伝子発現抑制実験

被験動物として 6 週齢のマウス C57BL6/J (雄：日本クレア) を用いた。二週間の高

脂肪食負荷の後、0 日目に採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。3 日目に再度採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。4 日後に下大静脈から採血した後、PBS で上腸間膜静脈より灌流し、終了後、肝臓を採取し、PBS で洗浄した後、細切、液体窒素で瞬間凍結した後、-80°C で保存した。凍結した肝臓の切片を 5ml の TRIzol Regent (Invitrogen) 内で、ホモゲナイズし AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、in vitro 実験と同様の real time RT-PCR 法を用いて mRNA の定量を行なった。

試験期間中に採取した血液は、遠心して血清を分離し、血清総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値、及び HDL コレステロール値を Wako のコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業(株)製) を用いて測定した。また、同様に Wako のトランスアミナーゼ CII-テストワコーで ALT・AST を測定し、肝臓障害度を評価した。さらにリポタンパク分析のため、スカイライトバイオテック株式会社において、HPLC によるリポタンパクの 20 分画のコレステロール値を解析した。

#### C. 研究結果

##### 1. 修飾化核酸の作製

作製した核酸の配列を下に記す。

(大文字は RNA、小文字は BNA)

(siBNA-1)

5' -gtcatCACACUGAAUACCAAUTT-3'

(siBNA-2)

5' -gtCAtCACACUGAAAtACcAAUTT-3'

## 2. 血清耐性実験

血清耐性実験の結果を図 1 に示す。対応する未修飾の siRNA (図 1 において「siApoB-1」として示す) は、その血清半減期が 138 分であるのに対して、siBNA-1 の血清半減期は 267 分、siBNA-2 の血清半減期は 1107 分であった。siRNA の一部 BNA 化することにより、血清中での耐性が極端に上昇すること、BNA 化する核酸の位置によって、血清耐性の程度が大きく変化することがわかった。

## 3. 修飾化核酸の in vitro 遺伝子発現抑制実験

siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2 の濃度依存的遺伝子発現抑制実験の結果を図 2 に示す。siBNA-1、siBNA-2 とともに、マウス肝細胞株において siApoB-1 と同様の濃度依存的アポ B 遺伝子発現抑制効果を示すことがわかった。

## 4. 修飾化核酸の in vivo 遺伝子発現抑制実験

生理食塩水を投与した対照群 (Saline 投与群)、及び siApoB-1 または siBNA-2 をそれぞれ投与した被験群における肝臓での ApoB の mRNA の発現量を Relative CT Method により評価した結果を図 3 に示す。結果は、GAPDH の結果を用いて相対的に定

量化したものである。in vivo で、siBNA-2 は、ApoB に対する未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも有意に ApoB の mRNA 発現を抑制した ( $P < 0.05$ )。このことから、siBNA2 は、生体内で、未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも高い RNA 干渉効果を発揮することがわかった。siRNA を BNA 化することにより、生体内で有効な低分子干渉 RNA 分子として機能することが確認された。

siBNA-2 投与群は、生理食塩液や siApoB-1 投与群に比し、総コレステロール値 (図 4) および VLDL コレステロール値 (図 5) は 2 日後に有意に低下、LDL コレステロール値 (図 6) は 1 日後に有意に低下を認めた。一方、HDL コレステロール値は、有意な変化を認めなかった (図 7)。これらのことから、siBNA-2 は、肝臓でのアポ B mRNA 発現を低下させることにより、血中の総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値を低下させることが示された。

修飾化 siRNA の毒性を調べるために、siApoB-1、siBNA-2 投与後のマウス血清における AST および ALT 値を測定して、生理食塩液投与群と比較した (図 8、9)。生理食塩液投与群に比べて siBNA-2 投与群で AST、ALT の低下を認めた。

## 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 をターゲットとした 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。昨年度の成果で、*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行ない、siApoB-1 が有効であることがわかってきた。siApoB-1 尾静脈投与により、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、この配列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り、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き、siRNA に酵素耐性を持たせる修飾を行うことにした。siRNA は、N タイプと S タイプで存在し、容易に N タイプから S タイプに形を変化させる (図 8A)。RNA に結合するためには、N タイプの形をとることが極めて有利であることがわかってきており、共同研究者の小比賀らは BNA 化を行なうことにより、N タイプに固定することができること (図 8B)、BNA 化することにより、酵素耐性が強くなることをすでに報告していた。そこで我々は、siRNA に BNA を搭載させた siBNA を用いて *in vitro* および *in vivo* の効果を検討した。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、昨年度に siBNA-1 と siBNA-2 を合成した。

siBNA-1 および siBNA-2 は、ともに血清

存在下での分解速度が遅く、特に siBNA-2 は siApoB-1 の 8 倍の半減期を示し、BNA 搭載の部位により、酵素耐性が大きく異なることがわかった。また、酵素耐性が強いことから、*in vivo* での RNAi 効果発現を目的としては、siBNA-2 を用いるのが適当であると考えられた。*in vitro* トランスフェクションによるそれぞれの核酸の RNAi 効果については特に有意差が無く、いずれも *in vitro* では同等の作用を有することがわかった。一方、高脂肪食負荷マウスに対する核酸の尾静脈投与により、肝臓でのアポ B mRNA は、siApoB-1 に比し siBNA-2 によって有意に低下を認め、血清中の総コレステロール値、VLDL および LDL コレステロール値が有意に低下を認め、HDL コレステロール値は有意な変化を認めなかったことから、siBNA-1 は、siApoB-1 に比べて *in vivo* で著効を示すことがわかった。肝毒性の指標となる AST および ALT 値の上昇も認めないことから、BNA 修飾核酸は、核酸医薬として安全で有効な薬剤であることが示された。以上の結果より、最終目的である、修飾化 siRNA の高脂血症モデル動物への経口投与による治療実験の準備が整ったと言える。

#### E. 結論

BNA 化 siRNA は、*in vitro* および *in vivo* で安全で有効である核酸医薬であることが示された。

#### 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, Sugisawa T, Makino H, Abe M, Tsushima M, Yoshimasa Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H, Yokoyama S: Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, in press
- 2) Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kangawa K, Yoshihara F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N and Kataoka K: Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol Ther*, 2009; 17:1180-1186.
- 3) Watanabe K, Harada-Shiba M, Suzuki A, Gokuden R, Kurihara R, Sugao Y, Mori T, Katayama Y and Niidome T: In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol Biosyst*, 2009; 5:1306-1310.
- 4) Fujita Y, Kakino A, Harada-Shiba M, Sato Y, Otsui K, Yoshimoto R and Sawamura

T: C-reactive protein uptake by macrophage via class A scavenger receptor. *Clin Chem*, in press

- 5) Harada K, Miyamoto Y, Morisaki H, Ohta N, Yamanaka I, Kokubo Y, Makino H, Harada-Shiba M, Okayama A, Tomoike H, Okumura T, Saito Y, Yoshimasa Y, Morisaki T, A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated with hypercholesterolemia. *J. Atheroscler Thromb*, in press

#### 総説

1. 大畑洋子、斯波真理子「家族性高コレステロール血症 (FH, LDL 受容体遺伝子異変)」*The Lipid Vol.20* 14-19 (366-371) No.4
2. 斯波真理子「遺伝子異変による LDL 代謝異常—変異遺伝子の発見と装薬への応用—特集にあたって *The Lipid Vol.20* No. 4 12-13(364-365) 2009
3. 山下貴裕、斯波真理子「常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症 (ARH)」*The Lipid Vol.20* No. 4 20-25(372-377) 2009.
4. 鈴木朗、斯波真理子「高分子ナノキャリアによる遺伝子デリバリー」*The Lung perspectives Vol. 17* No.3 67-71(289-293) 2009
5. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症と類縁疾患」*血管医学* Vol. 10 No. 1 41-47 2009
6. 槇野久士、斯波真理子「循環器疾患に

関する大規模臨床試験脂質異常症」

Heart View Vol. 13 No. 4,  
67-71(415-419) 2009

7. 槇野久士、斯波真理子 「脂質異常症」

Heart View Vol.13 No.4 67-70(415-418)  
2009

8・杉沢貴子、斯波真理子 「トリグリセ  
リド低下作用」薬局 2009Vol.60 55-58  
(239-242)No.2

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 鈴木彩香、馬原淳、山下敦、姜貞勲、森  
反俊幸、斯波真理子、山岡哲二

血中LDL濃度の低下効果を有するガ  
ラクトース修飾デキストラン硫酸の合成  
と評価

日本再生医療学会 ポスター発表  
2010年3月 広島

2. 斯波真理子

家族性高コレステロール血症の性差

日本性差医学医療学会 シンポジウム  
2010年2月 東京

3. 斯波真理子

Impact of statin treatment on the  
clinical fate of heterozygous familial  
hypercholesterolemia

日本循環器学会 シンポジウム 2010  
年3月 京都

4. Tachibana Y, Kamata W, Kang J,  
Harada-Shiba M, and Yamaoka T,  
Development of siRNA carrier for liver  
targeting, Joint Symposium of the 5th

Annual Meeting of the Oligonucleotide  
Therapeutics Society and the 19th  
Antisense Symposium ポスター発表 2009  
年 福岡

5. Kamata W, Tachibana Y, Kang J, Miyata  
H, Harada-Shiba M, Obika S, Yamaoka T,  
Hepatocyte-specific siRNA delivery for  
treating familial hypercholesterolemia,  
Joint Symposium of the 5th Annual  
Meeting of the Oligonucleotide  
Therapeutics Society and the 19th  
Antisense Symposium ポスター発表 2009  
年 福岡

6. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Wada S,  
Torigoe H, Yamamoka T, Narukawa K,  
Imanishi T and Obika S, Therapeutic  
application of 2',4' -BNA/LNA-modified  
oligonucleotide for the treatment of  
hypercholesterolemia, Joint Symposium  
of the 5th Annual Meeting of the  
Oligonucleotide Therapeutics Society  
and the 19th Antisense Symposium ポスタ  
ー発表 2009年 福岡

7. Watanabe K, Harada-Shiba M, Suzuki A,  
Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M,  
Gokuden R, Kurihara R, Sugao Y, Mori T,  
Katayama Y, Niidome T, Systemic  
oligonucleotide delivery with dendritic  
poly(L-lysine) into the mouse models of  
the liver diseases, Joint Symposium of  
the 5th Annual Meeting of the  
Oligonucleotide Therapeutics Society  
and the 19th Antisense Symposium ポスタ

一発表 2009年 福岡

8. Suzuki A, Miyata K, Itaka K, Nishiyama N, Miyata H, Inoue M, Shibata E, Yamaguchi S, Ishii T, Kataoka K, Harada-Shiba M, Safe and efficient gene delivery to cystic fibrosis cells by using polyplex nanomicelles, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

9. 湯浅由美子、槇野久士、尾崎司、南野直人、宇佐美眞、吉政康直、斯波真理子

「LDL-アフェレーシス (LDL-A)」治療時に除去される物質のプロテオーム解析

日本アフェレーシス学会 一般演題 2009年9月 札幌

10. 斯波真理子、山本剛史、山岡哲二、小比賀聡、小川浩司、峠崎純一、西岡宏、西垣孝幸、吉田幸太郎、槇野久士「家族性高コレステロール血症 (FH) に対する治療法の変遷と今後の展望」第 30 回日本アフェレーシス学会 シンポジウム 2009年9月 札幌

11. 槇野久士、湯浅由美子、吉政康直、斯波真理子「LDL アフェレーシスにより除去される分子の検討」第 30 回アフェレーシス学会 シンポジウム 2009年9月 札幌

12. 宮本恵宏、吉政康直、斯波真理子、太田直孝、山本賢、藤山啓美、佐野隆宏、佐野道孝「遺伝子診断に基づく家族性高コレステロール血症の診断基準の有用性の検討」第 16 回日本遺伝子医療学会大会一般

口演口頭発表 2009年7月30日～8月1日 北海道

13. Suzuki A, Obika S, Yamaoka T, Torigoe H, Miyata H, Jinno K, Inoue M, Nagumo A, Gouda M, Harada-Shiba M, Therapeutic use of bridged nucleic acid (BNA) for the treatment of hypercholesterolemia」第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

14. Yuasa Y, Makino H, Sugisawa T, Nishimura M, Osaki T, Minamino N, Usami M, Yoshimasa Y, Tomoike H, Harada-Shiba M, Proteomic analysis of substances removed by LDL-Apheresis (LDL-A) Treatment 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

15. Harada-Shiba M, Yamashita S, Arai H, Bujo H, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Decrease in Achilles tendon xanthomas by probucol is associated with decreased LDL-C and TC levels in patients with familial hypercholesterolemia (FH) 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

16. Ohta N, Harada-Shiba M, Miyamoto Y, Ura T, Makino H, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yokoyama S, Tomoike H, Yamada N, Verification of the diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia」第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口