

201007008A

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 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成 23 (2011) 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	
II. 分担報告書	
1. siRNA のホスホロチオエート化、2'-OMe 化、 コレステロール化による <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 長期効果 の評価	15
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機能性 siRNA の開発	30
山岡 哲二	
3. 機能性キャリアーの経口投与後の <i>in vivo</i> イメージング	39
飯田 秀博	
4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1	44
笹栗 俊之	
III. 研究成果の刊行物・別刷	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 国立循環器病研究センター研究所・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、第2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急性治療実験を行ない、肝臓でのアポ B mRNA 発現量および血中総コレステロール値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 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など、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。最終年度である本年度は、siBNA にホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、*in vivo* における効果を評価し、24日間という長期間、標的 mRNA の低下、血清総コレステロール値の低下を認めた。siRNA キャリアーについては、側鎖にガラクトースユニットとカチオンユニットを有する Pullulan-PEI を用いて、尾静中投与後の肝臓における ApoB mRNA 量を有意に低下させた。経口投与による siRNA の肝臓へのデリバリーは、腸膜に存在する M 細胞を介するパン酵母の殻である β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用することで実現した。

本年度の成果により、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に成功し、最終目的に到達した。

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

九州大学大学院医学研究院

臨床薬理学分野

飯田秀博

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 アフェレシス療法という血漿交換療法を定期的に行なうことで、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。

昨年度までに、修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)により修飾された siRNA (siBNA)が、高脂肪食負荷マウスに対して尾静脈注射により肝臓でのアポ B mRNA 発現量の低下を認め、急性の治療効果を認めた。肝特異的デリバリーを実現するために、キャリアーとしては、プルラン-PEI 複合体の作製と *in vitro* 実験を行い、イメージングにて肝特異的なデリバリーの確認を行っている。

最終年度である本年度は、siBNA にホスホロチオエート化、2' -OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、その *in vitro* および *in vivo* における効果を評価した。特に *in vivo* 評価では、24 日間という長期の効果について検討し、BNA 化、ホスホロチオエート化、2' -OMe 化、コレステロール化の修飾により、長期に肝臓での標的 mRNA 発現抑制効果が示された。合成ベクターについては、*in vitro* において、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。経口投与による siRNA の肝臓へのデリバリーは、腸膜に存在する M 細胞を介するパン酵母の殻である β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用することで実現した。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.修飾化核酸の作製と *in vitro* および *in vivo* 評価 (斯波)

1-1. 修飾化核酸の作製

昨年度の研究成果より、siBNA-2 が *in vivo* において肝臓での標的遺伝子発現低下効果を有することから、本年度は siBNA-2

を基本構造として、さらにホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を行った。以下にその配列構造を示す。

siB2PT-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1M

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagu(M)gu(M)gaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1B

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagTgTgaugac(dT)(dT)-3'

大文字が 2', 4' -BNA、s はホスホロチオエート化、M は 2' -OMe 化、TEGchol はコレステロール修飾、小文字は RNA、dT は DNA のチミンを表す。

1-2. siBNA-2 シリーズの *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

マウス肝細胞(NMuLi)を 6-well プレートに 60 万個/well で蒔き 37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1, iB2PTC-1, siB2PTC-1M, siB2PTC-1B (以下、これらの総称を siRNAs とする)を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と Opti-MEM (Invitrogen) を混ぜ最終濃度の 4 倍の濃度で調製した。細胞にこれを D-MEM と 4 倍希釈になる様に加え 37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。その後、各 well を PBS で洗浄し TRIzol reagent (Invitrogen)を 1 mL 加えて細胞を回収し、RNA 抽出、目的 mRNA 量の定量を行った。

1-3. 修飾化核酸の *in vivo* 遺伝子発現抑制実験

6 週齢のマウス C57BL6/J (雄: 日本クレア)を用いて、2 週間の高脂肪食負荷の後、実験に供した。実験開始の 2 日前に尾静脈より採血を行い、群分けを行った。siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1 を Invivofectamine 2.0 Reagent (Invitrogen)と混合して複合体を作製し、5 mg/kg を尾静脈より単回投与した。またコントロール群には PBS を 200 μL を投与した。投与後 2 日目にそれぞれの群から 3 匹ずつ選び、尾静脈採血の後、ペントバルビタールによる麻酔下で開腹し、下大静脈採血を行い PBS により心臓から全身灌流後、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は 2 mm×2 mm の切片にして液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。切片 1 つを TRIzol

reagent (Invitrogen)に加えホモゲナイズし、*in vitro* 同様に AGPC 法により total RNA を抽出した。同様に投与後 7、14、24 日目にもこれらの操作を行った。

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 AST・ALT を測定し、肝機能を評価した。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。

1-4. 細胞および肝臓の mRNA 量の定量

TRIzol reagent を用いて回収した細胞および肝臓を、AGPC 法を用いて RNA を抽出した。その後、10 µg 量の RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、SYBR Green I (Applied Biosystems) を用いたインターカレーター法で Real-Time PCR を行い目的 mRNA の量を定量した。PCR Primer の配列を以下に示す。

ApoB- Forward primer:

TGGGCAACTTTACCTATGACTT

ApoB-Reverse primer:

AAGGAAATGGGCAACGATA

GAPDH-Forward primer:

CAAAATGGTGAAGGTCGGTGTG

GAPDH-Reverse primer:

ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

2. siRNA キャリアーの合成と *in vitro* および *in vivo* 評価（山岡）

2-1. siRNA キャリアーの合成

モノマーとして、2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA)、6-o-vinyl adipoyl galactose 及び、6-o-vinyl adipoyl glucose を用いてラジカル重合を行った。具体的には、モノマーを DMSO に溶解させ、凍結融解を 3 回繰り返す、反応溶媒内の酸素を抜きだした後、AIBN を開始剤として、60 °C で 4 時間攪拌を行った。4 時間、透析を行い、その後、凍結乾燥を行い回収した。

2-2. ゲル電気泳動

得られたキャリアーと siApoB-1 を混合し、37 °C、30 min インキュベートすることで、複合体を形成させた。C/A は 48, 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 とした。事前に 19%アクリルアミドゲルを作成し、それを用いてゲル電気泳動を行った。泳動条件は 150 V、1 h とし、泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液に 15 分浸漬した。その後、蛍光イメージャーを用いて写真の撮像を行った。

2-3. 複合体のサイズ・ζ-ポテンシャルの測定

様々な C/A において複合体を形成させ、室温においてサイズ・ζ-ポテンシャルの測定の測定を行った。測定はゼータナノサイザーを用いた。測定は、すべてのサンプル

において、複合体形成より1時間以内に行った。

2-4. 細胞毒性試験

毒性試験は、NMuLi 細胞にキャリアー/siRNA 複合体添加 24 時間後、WST-1 を用いて評価した。具体的には、 2.1×10^4 cells/cm² の NMuLi 細胞を播種し、24 時間インキュベートした後、キャリアー/siRNA 複合体を加え、さらに 24 時間培養した。その後、プロトコールに従って、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。

2-5. ApoB mRNA 発現定量

キャリアーによる siRNA のデリバリーについて、*in vitro* で検討した。キャリアー/siRNA 複合体を添加する 24 時間前に 2.1×10^4 cells/cm² 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 の条件下でキャリアー/siRNA 複合体を形成させ、細胞へ添加し、さらに 37 °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。

2-6. 複合体の細胞内取り込み実験

初めに、YOYO と siApoB-1 を混合し、37 °C で 30 min インキュベートを行った。その後すぐに、キャリアーを所定量混合し、更に、37 °C で 30 min インキュベートを行

うことで、複合体の形成を行った。5 に示す実験と同様に、細胞の播種、トランスフェクションを行い、所定の時間 (1, 3, 5, 7 and 24) 後に蛍光顕微鏡観察を行った。

2-7. *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

キャリアーを用いて、*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、高コレステロール血症モデルマウスを作成した。1 回あたり 300 pmol の siRNA を C/A=12 の条件で複合体を形成させ、RNase-free の PBS にて 150 μ l にメスアップし、尾静脈投与した。初回投与後から、2 日後に同量のキャリアー/siRNA を尾静中投与した。5 日後、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。

3. 機能性キャリアーの経口投与後の *in vivo* イメージング (飯田)

3-1. 異なる分子量 (4,900 と 107,000) のプルランを修飾したポリマーの合成

プルラン修飾ポリエチレンイミン(PEI)ポリマーはプルラン (分子量 4,900 と 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) (0.3 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、ポリエチレンイミン(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。

3-2. ポリマーの物性評価

C/A 比が 24、48、96、192 となるように調整したポリマー/siRNA 複合体のサイズとゼータポテンシャルをシスメックス社の Zetasizer(Nano series)を用いて測定した。

3-3. 複合体の毒性評価

C/A 比が 96 と 192 になるように調整したプルラン修飾 PEI ポリマー (PEI-pullulan) /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。コントロールとして PEI/siRNA 複合体を用いて同様の実験を行った。

3-4. ポリマー/ApoB siRNA 複合体の血中投与による肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価

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。プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (C/A 比 192) 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、3、6、12、および 24 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。

3-5. 高コレステロールモデルマウスを用い

た治療効果の評価

マウスはプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (C/A 比 192) 投与群、PEI/siRNA 複合体 (C/A 比 3) 投与群、siRNA 単独投与群、およびコントロールとしての PBS 群に分けて実験を行った。高脂肪食を 10 日間給餌し、高コレステロールモデルマウスを作製し、11 日目から 3 日間連続投与 (1 日 1 回投与) した。投与後 4 日目に血液採取と肝臓摘出を行い、血中コレステロール値と肝臓における Apo B mRNA の変化を調べた。

3-6. 経口投与用のキャリアーの創製とマウス経口投与実験

凍結乾燥した β 1,3-D-glucan に Alex 750 蛍光ラベル化 ApoB siRNA の溶液 (siRNA : β 1,3-D-glucan (w/w) の比率=0.5) を添加し、室温で 3 時間放置した。その後、PEI 溶液 (PEI : siRNA (w/w) の比率=80) を添加し、さらに 6 時間放置することで siRNA と PEI との複合体形成を行った。

β 1,3-D-glucan 内で、PEI と siRNA との複合体形成は顕微鏡観察で確認した。複合体を封入した β 1,3-D-glucan をマウスに経口投与し、6 時間後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る蛍光強度を測定した。

4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1 (笹栗)

4-1. 細胞培養

ヒト由来大腸がん HCT-116 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 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。

4-2. 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 (mPGES-1、GAPDH, Egr-1) と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

4-3. ヒト mPGES-1 プロモーター活性測定

24 穴培養用プレートに 1×10^5 個の HCT-116 細胞または HeLa 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。

4-4. リアルタイム PCR 解析

刺激した細胞を回収し、TRIzol 試薬 (GIBCO) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出した RNA は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用いて cDNA とし、リアルタイム PCR 装置 ABI-7500 を用いて TaqMan

Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems) にて解析を行った。プライマーは GAPDH、mPGES-1 それぞれ Hs99999905_m1、Hs01115610_m1 (Applied Biosystems) を使用した。

(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. 修飾化核酸の作製と *in vitro* および *in vivo* 評価 (斯波)

1-1. siBNA-2 シリーズの *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M, siB2PTC-1B をマウス肝細胞にトランスフェクションして、*in vitro* における標的遺伝子発現抑制効果を調べたところ、siApoB-1、siBNA-2 にて、アポ B mRNA 発現量は 95% 以上の低下を認めしたが、siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M では 80% 程度の抑制にとどまった。また、アンチセンス鎖に 2', 4' -BNA を組み込んだ siB2PTC-1B は OMe で同様に修飾した siB2PTC-1M とは異なり遺伝子発現抑制効果が 60% 程度であり、活性はやや低下を認めた。

1-2. siBNA-2 シリーズの *in vivo* における遺伝子発現抑制および毒性評価

機能性核酸の腹腔内投与後の、PBS コントロール群に対し siApoB-1 や siBNA-2 投与群では、投与後顕著に体重が減少した。また、siB2PT-1 投与群では、コントロール群とは有意差がないものの減少傾向にあった。それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の血清総コレステロール値は、siApoB-1 投与群で総コレステロール値が Day 2 において有意に減少しており、siBNA-2 投与群が有意差は無いが最も高い効果を示しており、68%の低下を認めた。Day 7 においても全ての機能性核酸において Day 2 と同程度の減少が確認された。siApoB-1 投与群においては Day 14 から総コレステロール値が上昇し始めたが siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群は Day 2 および Day 7 と同程度の抑制を認めた。Day 24 で siApoB-1 投与群は完全に総コレステロール値が前値に戻ったが、siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群は上昇を認めるものの、依然として 40%程度の抑制を認めた。

それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の肝臓での ApoB mRNA の発現量は、Day 2 では siApoB-1 投与群で 80%、siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群では 85%程度の抑制を認めた。siApoB-1 投与群に関しては day 7 より上昇が開始し、Day 24 までに前値に戻ったが、siBNA-2 や siB2PT-1 投与群は Day14 まで 80%程度の抑制が維持されており、Day 24 で若干回復し 50%程度の抑制効果を認めた。

それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の肝臓での apoB-100 タンパク質発現量の変

化は、siApoB-1 投与群は Day 2 より siBNA-2 や siB2PT-1 投与群に比べて遺伝子発現抑制効果が低く、Day 7 から Day 14 にかけて PBS コントロール群と同程度に回復した。一方、siBNA-2 や siB2PT-1 投与群は Day 7 まで 90%以上の抑制を示しており Day 14 より抑制効果の低下を認めた。また、Day 24 では全ての群でコントロール群と同程度に回復している事がわかった。これらのことから、2',4'-BNA で修飾した siBNA-2 と siB2PT-1 は天然のものに比べ有意に長く遺伝子発現抑制効果が持続することがわかった。

機能性核酸投与による肝機能への影響を調べるために、血清 AST/ALT 値を測定したところ、機能性核酸投与後 Day 2 で AST の上昇を認めたが、その後は全ての群で正常値範囲内であった。ALT においても投与直後の Day 2 では正常範囲内での上昇を認めた。

2. siRNA キャリアーの合成と *in vitro* および *in vivo* 評価 (山岡)

2-1. siRNA キャリアーの合成

DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl galactose 及び DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl glucose の共重合を行った。DMAEMA のみの場合、収率は 32%程度であり、分子量は 8.6×10^4 であった。Galactose 及び Glucose を導入した場合、いずれにおいても、仕込みの糖ユニットの増加に従い、収率・分子量の低下が見られた。得られたキャリアーにおいて、Galactose の場合 35%、Glucose の場合 39% が最も導入率が高かった。

2-2. ゲル電気泳動

アクリルアミドゲルの電気泳動写真の結果、糖ユニットの導入率が30%以下の場合において、C/A=6以上において複合体が形成していた。糖ユニットが30%以上では、Galactose及びGlucoseのいずれにおいても、C/A=3においてバンド輝度の低下が見られた。つまり、C/A=3においてある程度の複合体を形成していることが解った。

2-3. 複合体のサイズ・ ζ -ポテンシャルの測定

得られた複合体のサイズ・ ζ -ポテンシャルの測定を行った。粒径の測定の結果、C/Aに依存していた。C/Aが高い条件では、すべてのサンプルで粒径は150-200 nmであり、C/A=12において200-400 nmであった。更に、C/Aの減少に従い、粒径の増加が見られ、最終的には1 μm となった。また、Galactose及びGlucoseによる差はほとんど見られなかった。

2-4. 細胞毒性試験

キャリアー中のカチオンによる細胞毒性について、キャリアー/siRNA複合体を細胞へ添加し、24時間後にWST-1を用いて評価したところ、すべてのサンプルにおいて、C/A比の増加に伴い、細胞毒性が見られた。DMAEMAのみの場合、C/A=6において生存率は70%に低下し、最終的にC/A=48で50%となった。一方、糖含有量が多いキャリアーの場合、細胞毒性は低く、C/A=48においても生存率は80%程度となった。

2-5. ApoB mRNA 発現定量

キャリアーによるsiRNAのデリバリーについて、NMuLi細胞を用いて、*in vitro*で検討したところ、C/A比の増加とともにApoB mRNAの発現量の低下が見られた。また、糖含有量の増加に伴い、メッセージの抑制効果は見られなくなった。

2-6. 複合体の細胞内取り込み実験

YOYOラベル化したsiApoB-1とキャリアーとの複合体をNMuLi細胞に取り込ませ、径時変化について顕微鏡観察を行ったところ、取り込み開始後1時間では、いずれのキャリアーの場合でも細胞内に複合体は観察されなかった。しかし、3時間後においては、サンプル1及びサンプル3の場合において、細胞内に取り込まれていることが観察された。更に、サンプル3の場合、細胞の核に多く取り込まれていることが確認された。一方、サンプル11の場合、取り込み開始7時間後に細胞内に複合体が存在することが確認された。また、糖ユニットが多い場合(サンプル8及び16)、7時間後においても細胞内には取り込まれていなかった。

2-7. *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

キャリアーによるsiRNA *in vivo* デリバリーを検討したところ、PBS投与群と比較すると、サンプル1及び3において、48時間後では肝臓におけるApoB mRNAの発現量の低下が有意差を持って見られた。しかし、サンプル11を投与した系では、ほとんど差が見られなかった。この結果より、本研究で合成したキャリアーを用いた肝臓デリバリーは、*in vivo*における有意性が示された。

3. 機能性キャリアーの経口投与後の *in vivo* イメージング (飯田)

3-1. ポリマーの合成と物性評価

PEI 1 mol%に対するプルランの修飾率は分子量 5,900 のプルランを有するポリマーの場合は 0.69 mol%、分子量 100,700 のプルランを有するポリマーは 0.64 mol%であった。プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体のサイズは C/A 比が減少するに従い、サ

イズの増加が観察された。ゼータポテンシャルは C/A 比 96 と 192 で中性に近い結果が得られた。

3-2. 複合体の毒性評価

PEI/siRNA 複合体を投与したマウス群では、C/A 比 6 で 50%の死亡率と肺組織での損傷を確認したが、プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体の投与群では C/A 比 192 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。

3-3. ポリマー/ ApoB siRNA 複合体の血中投与による肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価

プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (C/A 比 192) の投与群では、24 時間まで強い蛍光強度が肝臓から観察された。低分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (PEI-pullulan(MW, 5,900)/siRNA) よりも、高分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA) のほうが優れた血中安定性を示した。一方、PEI/siRNA 複合体 (C/A 比 3) 投与群では、肝臓よりも肺への集積が高いことが分かった。

3-4. 高コレステロールモデルマウスを用いた治療効果の評価

高脂肪食を 10 日間給餌して作製した高コレステロールモデルマウスに 3 日間連続投与 (1 日 1 回投与) を行った。高い分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複

合体 (PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA) 投与群では TC (総コレステロール)、LDL、および VLDL コレステロール値の減少と肝臓 Apo B siRNA の発現量の減少が確認できた。一方、siRNA 単独投与群、または PEI/siRNA 複合体投与群では、コントロール群 (PBS 投与群) と比べて変化はなかった。

3-5. 経口投与用のキャリアーの創製と経口投与による評価

パン酵母である β 1,3-D-glucan の中で PEI と siRNA が複合体を形成していることが顕微鏡観察で確認できた。また、マウス経口投与実験では、わずかながら肝臓と腎臓で蛍光強度が上昇していることが確認できた。

4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1 (笹栗)

4-1 DIF-1 による mPGES-1 のタンパク質発現抑制

子宮けいがん細胞および大腸がん細胞では、炎症性の刺激が存在しなくても mPGES-1 が発現していることが知られている。そこで、それらの細胞の mPGES-1 の発現に及ぼす DIF の影響について検討した。両細胞において時間依存性に DIF-1 により mPGES-1 の発現が抑制され、その効果は刺激後 6 時間以降で明らかに認められた。

4-2 DIF-1 の mPGES-1 プロモーター活性へ

の影響

次に DIF-1 の mPGES-1 プロモーター活性に及ぼす影響について検討を行った。両がん細胞において、DIF-1 は mPGES-1 のプロモーター活性を抑制し、その効果はタンパク質の発現抑制よりも早い時間経過を示した。特に HeLa 細胞では刺激後 1 時間から、明らかな活性の低下が認められた。

4-3 DIF-1 による mPGES-1 mRNA 発現抑制

HeLa 細胞に DIF-1 (30 μ M) を添加し 1、3、6 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。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。

4-4 DIF-1 の炎症関連転写因子 Egr-1 への影響

mPGES-1 のプロモーター活性を調節する転写因子は Egr-1、NF κ B、AP-1 などが知られているが、その中でも特に Egr-1 の発現上昇により mPGES-1 の発現が強力に誘導されることが知られている。そこで、Egr-1 の発現に及ぼす DIF-1 の影響について検討した。予想に反して、DIF-1 により一過性に Egr-1 の発現が上昇することが示された。

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、siApoB-1 に比べて siBNA-2 は Tm の有意な増加および著明な血清耐性を示したこと、尾静脈投与により、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ことから、本年度の研究は siBNA-2 を用いてさらにコレステロール修飾等を施して長期効果を検討した。

Invivofectamine と siRNA の複合体を 1 回、尾静脈投与することにより、従来の siRNA である siApoB-1 は、1 週間は血清コレステロール値の低下を認めたが、その後上昇を認めたのに対し、BNA を搭載した siBNA-2 およびホスホロチオエート化を加えた siB2PT-1 投与群では血清コレステロール値の低下は 14 日間持続しており、24 日目においても前値の 50% 程度にとどまっている。BNA 化およびホスホロチオエート化により、*in vivo* において細胞内での遺伝子発現抑制効果が持続することが示されたことから、1 カ月に 1 回の投与によってコレステロール値が良好にコントロールされる可能性が示された。

前年度までに、肝指向性キャリアーとしてプルランを用いて研究を行った。本年度は、その知見を基に、より精密に構造が制

御された高分子キャリアーの開発に着手した。具体的には、側鎖にカチオンユニットとガラクトースユニットを有する共重合体を合成した。細胞毒性試験の結果、カチオンのみが導入されたキャリアーと比較して糖が導入された場合、毒性が低い結果となった。また、mRNA の抑制実験、顕微鏡観察の結果、糖ユニットが多い場合、細胞内にほとんど取り込まれないことが解った。これらの結果より、糖ユニットの含有量の増加と共に、複合体の状態の変化が示唆される。これらの中には、電荷密度の低下や糖ユニットによるシールドイング効果などが考えられる。

また、複合体の細胞内取り込み実験において、カチオンユニットのみのキャリアー（サンプル1）と比較して、サンプル11では取り込み時間に差が見られた。これは、グルコースユニットを導入することで、複合体の電荷密度が低下し、エンドサイトーシスによる取り込みを阻害するためだと考えられる。一方、ガラクトースユニットを導入した場合、グルコースと同様に、取り込みは阻害されると考えられるが、細胞に発現しているガラクトースレセプター経路の取り込みが起り、エンドサイトーシスと共に、レセプター経路の取り込みが行われるので、取り込み時間が早くなったと考えられる。サンプル3の取り込み写真の結果から、細胞の核に複合体が集積していることが観察され、これらの取り込みに関する考察を裏付けている。

異なる分子量（4,900 と 107,000）のプル

ランを修飾したポリマーの評価では、低分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体（PEI-pullulan(MW, 5,900)/siRNA）よりも、高分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体（PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA）のほうがより優れた血中安定性と肝臓集積を示した。これは、siRNA と複合体を形成する際、高分子量のプルランのほうが低分子量のものよりも、より広い範囲の親水性層を作り、血中タンパク質や分解酵素と siRNA との結合を阻害することで、siRNA を安定的に送達することができたと考えられる。

また、高コレステロールモデルマウスに3日間連続投与を行った治療実験でも、高分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体（PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA）の投与群で、TC、LDL、および VLDL 値の著しい減少と肝臓 Apo B siRNA 発現の抑制も確認できた。特に、治療に使用された siRNA の量（25 μ g）は、以前報告された論文（100 μ g）よりも低い濃度でありながら、コレステロール値の減少と肝臓 ApoB mRNA 発現量の抑制効果を示した。

これらの結果は、低分子量よりも高分子量プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体が、高い siRNA の血中安定性、肝臓集積能、肝細胞への送達能を有していることを示唆する。また、治療用遺伝子を肝臓に選択的に送達することで、副作用のリスクを軽減することもできると考えられる。

さらに、siRNA の経口投与による肝臓へのデリバリーを実現するためにパン酵母で

ある β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用した。 β 1,3-D-glucan の中で PEI と siRNA が複合体を形成していることを顕微鏡観察で確認できた。また、マウスへの経口投与 6 時間後、肝臓と腎臓での蛍光強度が上昇していることが確認できた。これは、複合体が封入された β 1,3-D-glucan が、腸膜に存在する M 細胞を経由して血中に運ばれたことを示唆する。また、siRNA 単独投与群に比べ、1,3-D-glucan は胃腸内環境でより安定的に siRNA を送達することができた。これらの結果から、1,3-D-glucan をキャリアーとして使用することで、経口投与による siRNA の肝臓デリバリーは実現可能であることが示唆される。

粥腫の炎症を抑制する治療標的分子を探索する目的で、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。

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-1 に着目した。前年度までの研究により、ヒト骨髄性白血病細胞株 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-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 の発現を抑制した。さらに、DIF は mPGES-1 のプロモーター活性を抑制することにより、mPGES-1 の発現を抑制していることが示唆された。本年度はさらに、炎症刺激を加えなくても mPGES-1 を発現しており、それにより産生される pGE2 ががんの進展に影響しているとされる 2 種類のヒト由来がん細胞 HCT-116 細胞と HeLa 細胞を用いて検討を行った。両細胞においてタンパク質の減少に先行してプロモーター活性の低下並びに mRNA 発現低下が認められたことから、DIF-1 が mPGES-1 の転写活性を阻害することにより発現を低下させていることが明らかとなった。そこで、mPGES-1 の代表的な転写因子である Egr-1 の発現におよぼす DIF-1 の効果について検討したところ、予想に反して DIF-1 によりこの転写因子の発現が上昇することが示された。この結果は、DIF が新しい機序によって mPGES-1 の転写活性を阻害している可能性を示すものである。

E. 結論

siBNA のコレステロール修飾、ホスホロチオエート化により、長期間の肝臓での標的遺伝子の発現抑制が可能になった。また、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。さらに、 β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用し、肝臓への siRNA デリバリーにも成功し、当初の目標を達成することができた。

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

—siBNA のホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化による
in vitro および *in vivo* 長期効果の評価—

分担研究者 斯波真理子 国立循環器病研究センター研究所・室長

研究要旨

家族性高コレステロール血症(FH) ホモ接合体は、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、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。LDL アフェレシス療法という血漿交換療法を定期的に行なうことで、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。昨年度は修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)により修飾された siRNA (siBNA)が、高脂肪食負荷マウスに対して尾静脈注射により肝臓でのアポ B mRNA 発現量の低下を認めたことを報告した。最終年度である本年度は、siBNA にホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、その *in vitro* および *in vivo* における効果を評価した。特に *in vivo* 評価では、24 日間という長期の効果について検討し、ホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾により、長期に肝臓での標的 mRNA 発現抑制効果、血清総コレステロール値の低下が示された。

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遺伝子導入実験が行なわれ、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 FH に対して遺伝子導入試験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。

昨年度は修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)により修飾された siRNA (siBNA)が、高脂肪食負荷マウスに対して尾静脈注射により肝臓でのアポ B mRNA 発現量の低下を認めたことを報告した。最終年度である本年度は、siBNA にホスホロチオエート化、2' -OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、その *in vitro* および *in vivo* における効果を評価した。特に *in vivo* 評価では、24 日間という長期の効果について検討し、BNA 化、ホスホロチオエート化、2' -OMe 化、コレステロール化の修飾により、長期に肝臓での標的 mRNA 発現抑制効果が示された。

B. 研究方法

1. 修飾化核酸の作製

昨年度の研究成果より、siBNA-2 が *in vivo* において肝臓での標的遺伝子発現低下効果を有することから、本年度は siBNA-2 を基本構造として、さらにホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を行った。以下にその配列構造を示す。

siB2PT-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1M

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagu(M)gu(M)gaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1B

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagTgTgaugac(dT)(dT)-3'

大文字が 2' ,4' -BNA、s はホスホロチオエート化、M は 2' -OMe 化、TEGchol はコレステロール修飾、小文字は RNA、dT は DNA のチミンを表す。

2. siBNA-2 シリーズの *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

マウス肝細胞(NMuLi)を 6-well プレート

に 60 万個/well で蒔き 37°C、5%CO₂ 下で 24 時間インキュベートした。siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M, siB2PTC-1B (以下、これらの総称を siRNAs とする) を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と Opti-MEM (Invitrogen) を混ぜ最終濃度の 4 倍の濃度で調製した。細胞にこれを D-MEM と 4 倍希釈になる様に加え 37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。その後、各 well を PBS で洗浄し TRIzol reagent (Invitrogen) を 1 mL 加えて細胞を回収し、RNA 抽出、目的 mRNA 量の定量を行った。

3. 修飾化核酸の *in vivo* 遺伝子発現抑制実験

6 週齢のマウス C57BL6/J (雄: 日本クレー) を用いて、2 週間の高脂肪食負荷の後、実験に供した。実験開始の 2 日前に尾静脈より採血を行い、群分けを行った。siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1 を Invivofectamine 2.0 Reagent (Invitrogen) と混合して複合体を作製し、5 mg/kg を尾静脈より単回投与した。またコントロール群には PBS を 200 µL を投与した。投与後 2 日目にそれぞれの群から 3 匹ずつ選り、尾静脈採血の後、ペントバルビタールによる麻酔下で開腹し、下大静脈採血を行い PBS により心臓から全身灌流後、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は 2 mm×2 mm の切片にして液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。切片 1 つを TRIzol reagent (Invitrogen) に加えホモゲナイズし、*in vitro* 同様に AGPC 法により total RNA を抽出した。同様に投与後 7、14、24 日目に

もこれらの操作を行った。

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 AST・ALT を測定し、肝機能を評価した。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。

4. 細胞および肝臓の mRNA 量の定量

TRIzol reagent を用いて回収した細胞および肝臓を、AGPC 法を用いて RNA を抽出した。その後、10 µg 量の RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、SYBR Green I (Applied Biosystems) を用いたインターカレーター法で Real-Time PCR をを行い目的 mRNA の量を定量した。PCR Primer の配列を以下に示す。

ApoB- Forward primer:

TGGGCAACTTTACCTATGACTT

ApoB-Reverse primer:

AAGGAAATGGGCAACGATA

GAPDH-Forward primer:

CAAATGGTGAAGGTCGGTGTG

GAPDH-Reverse primer:

ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

5. 肝臓でのアポ B100 の蛋白量の測定

凍結保存されていた肝臓切片を Ripa Buffer (Sigma)と complete 20 (Roche)の入ったチューブに入れ、ホモゲナイズした後、Amicon ultra centrifugal filter units-50k (Millipore)を用いて遠心濃縮した。濃縮産物を蒸留水で 200 μ L 程度までスケールアップし、BioRad Dc protein assay (BioRad)によりタンパク質濃度を測定した。60 μ g 量のタンパク質を採り、2 \times Sample Buffer (Invitrogen)と蒸留水で 18 μ L にしてサンプルを調製する。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate gel を準備し Tris-Acetate SDS Running Buffer を泳動槽に満たした。サンプルを 15 μ L ずつ well に入れ、75V, 15 分 \rightarrow 120V, 30 分 \rightarrow 150V, 130 分、泳動する(全て c.v)。PVDF メンブレンを用意し、Invitrogen 社の Transfer 用モジュールを用いて 200 mA, 140 分で PVDF メンブレンに転写した。Blocking One (ナカライテスク)を用いて転写後、ブロッキングを 4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトで行う。一次抗体は anti-mouse apoB-100, 48 antibody (Bioscience Resource Project)を 750 倍希釈で使用し、2 時間、室温で反応させた後、PBST で 10 分洗浄を 4 回行い二次抗体反応を行った。二次抗体反応には Horseradish peroxidase-labeled secondary anti-rabbit IgG-antibody (Amersham) を 15,000 倍希釈で使用した。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を Image J software を用い評価した。

C. 研究結果

1. siBNA-2 シリーズの *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M, siB2PTC-1B をマウス肝細胞にトランスフェクションして、*in vitro* における標的遺伝子発現抑制効果を調べたものを図 1 に示す。siApoB-1, siBNA-2 にて、アポ B mRNA 発現量は 95%以上の低下を認められたが、siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M では 80%程度の抑制にとどまった。また、アンチセンス鎖に 2',4' -BNA を組み込んだ siB2PTC-1B は OMe で同様に修飾した siB2PTC-1M とは異なり遺伝子発現抑制効果が 60%程度であり、活性はやや低下を認めた。

2. siBNA-2 シリーズの *in vivo* における遺伝子発現抑制および毒性評価

機能性核酸の腹腔内投与後の体重変化を図 2 に示す。PBS コントロール群に対し siApoB-1 や siBNA-2 投与群では、投与後顕著に体重が減少している事がわかる。また、siB2PT-1 投与群では投与後、コントロール群とは有意差がないものの減少傾向にあった。

それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の血清総コレステロール値変化を図 3 に示す。siApoB-1 投与群で総コレステロール値が Day 2 において有意に減少しており、siBNA-2 投与群が有意差は無いが最も高い効果を示しており、68%の低下を認めた。Day 7 においても全ての機能性核酸におい