

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。

#### 4-8. 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、NFkB、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。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 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。*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行ない、アポ B に対して有効である siRNA の配列を選定した。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 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。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、研究協力者の小比賀らは 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、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、初年度に 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して尾静脈投与することにより、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た。また、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-2 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。

さらに長期効果を見るために、Invivofectamine 2.0 Reagent を用いて、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だのに対し、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。

肝指向性キャリアーの開発については、アシアロ糖タンパクレセプターに着目し、キャリアーにプルランまたはガラクトースユニットを持たせることで、siApoB を肝臓へデリバリーすることに成功した。初めに、遺伝子導入試薬を用いてプルラン-siRNA コンジュゲートを細胞へ導入した結果、未修飾の siRNA を導入した場合と ApoB の発現量に変化はなかったことから、siRNA の効

果に影響することがなかった。そこで、プルランを用いることで siRNA の機能を損なうことなく、肝細胞ターゲティングを可能にすると考えられる。しかし、異なる濃度のプルラン-siRNA のみを導入した結果から、プルラン修飾のみでは、細胞への導入が困難であることが示唆された。そこで、カチオン性ポリマーにプルランが結合した肝指向性プルラン-PEI をキャリアーとして選択した。*in vitro* において、プルラン-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、プルラン<sub>5900</sub>-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 siRNA 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、プルラン<sub>5900</sub>-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、合成したプルラン-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、プルラン<sub>5900</sub>-PEI を用いて単回投与、あるいは、プルラン<sub>107000</sub>-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、プルラン-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。

更に、プルラン-PEI を用いた実験の知見を基に、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た。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た。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由の取り込みが起これ、エンドサイトーシスと共に、レセプター経由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た。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。

これらの結果から、**siApoB** を肝臓へ特異的に、効率良くデリバリーできることが示唆された。これより、キャリアーを用いることで、少ない投与量で、最大の効果を発揮させることができる可能性を見出すことができた。

プルラン修飾 PEI ポリマーは PEI に比べてマウスの死亡率を顕著に軽減した。マウス実験では PEI/siRNA 複合体の C/A 比増加に伴い、マウスの死亡率の増加や肺組織での出血性赤斑点の拡大が確認できた。しかし、プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体によるマウスの死亡、臓器損傷を示すような結果は得られなかった。一方、プルランを PEI へ導入することは、プルラン本来の肝臓指向能に影響を与える可能性があるため、マウスを用いた体内動態実験によ

りその影響を調べた。プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体を尾静脈によりマウスに投与したところ、肝臓で集積することを確認した。この結果から、プルランを PEI へ導入することは、肝臓指向能に影響を与えないことが明らかとなった。この結果から、開発したプルラン修飾 PEI ポリマーは肝臓選択的送達に有効な材料として期待される。本研究で、プルランの PEI への導入により、組織に対する毒性の軽減と同時に、肝臓への選択的送達に成功したことは画期的なものと言える。

さらに、**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。プルラン修飾 PEI ポリマー/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。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 値の著しい低下と肝臓 ApoB mRNA 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  $\mu$ g) は、以前報告された論文(100  $\mu$ g)よりも低い濃度でありながら、コレステロール値の有意な低下と肝臓 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  $\beta$  1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用した。 $\beta$  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  $\beta$  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。

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。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。

及ぼす可能性はない。

#### 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、 $\beta$  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

## 修飾化核酸の *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(LDLR)経路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、皮膚および腱黄色腫、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、大動脈弁狭窄、弁城狭窄、狭心症や心筋梗塞を引き起こすため、未治療では 20 才まで生きられない。コレステロール低下薬であるスタチンは、有効ではないため、LDL アフェレンスと呼ばれる、身体的、時間的、経済的に負担の多い血漿交換療法が必要である。本研究では、FH ホモ接合体を対象疾患として、siRNA 遺伝子導入システムを開発して、モデル動物を用いて治療実験を行い、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な治療法を開発す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。2 年目には、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静脈内投与による急性治療効果判定実験を行ない、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などの有効性を認めた。最終年度には、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、siBNA を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すことにより、1 回の静脈内注射により 24 日間という長期にわたって肝臓での標的 mRNA 発現抑制効果が示された。

### A. 研究目的

家族性高コレステロール血症 Familial Hypercholesterolemia; FH) は、LDL 受容体経路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や大動脈弁狭窄、弁上狭窄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 年代にレトロウィ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。

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。2 年目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と報告した。最終年度は、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 発現抑制効果が示された。

## B. 研究方法

### 1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシーケンスより、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 (表 1)。

### 2. 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。

(小文字は RNA、大文字は BNA)

(siBNA-1)

5'-GTCATcacacugaauaccaautt-3'

(siBNA-2)

5'-GTcaTcacacugaa T acCautt-3'

### 3. 修飾化核酸の作製

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。

3. 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。

#### 4. 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 $\times$  Sample Buffer を 3ul 入れ、20%TBE gel(*In vitro*)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 (*In vitro*)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。

#### 5. ApoB siRNA の *in vivo* におけるスクリーニング (ハイドロダイナミクス法)

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  $\mu$ 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 保存して mRNA 抽出、定量に供した。

#### 6. 修飾化核酸の *in vivo* 遺伝子発現抑制実験 (尾静脈注射)

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 (In vitrogen) 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。

#### 7. 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  $\mu$ g 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:  
CAAATGGTGAAGGTCGGTGTG  
GAPDH-Reverse primer:  
ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG

#### 8. 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  $\mu$ 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  $\mu$ g 量のタンパク質を採り、2 $\times$  Sample Buffer (Invitrogen) と蒸留水で 18 $\mu$ L にしてサンプルを調製した。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate gel を準備し Tris-Acetate SDS Running Buffer を泳動槽に入れた。その後、サンプルを 15  $\mu$ L ずつ well に入れ、75V, 15 分  $\rightarrow$  120V, 30 分  $\rightarrow$  150V, 130 分、泳動した。PVDF メンブレンを用意し、Invitrogen 社の Transfer 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った。一次抗体は anti-mouse apoB-100, 48 antibody (Bioss) 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 回繰り返し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 15000 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 を用いて評価した。

#### 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、表 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(図 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(表 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図 3 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(図 4)。

### 4. 血清耐性実験

血清耐性実験の結果を図 5 に示す。対応する未修飾の siRNA (図 5 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。

### 5. 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 6 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。

### 6. 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 7 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(図 8)および VLDL コレステロール値(図 9)は 2 日後に有意に低下、LDL コレステロール値(図 10)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 11)。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 12、13)。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。

#### 7. 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 15 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。

#### 8. 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

機能性核酸の投与後の体重変化を図 16

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投与後の血清総コレステロール値変化を図 17 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投与後の肝臓での ApoB mRNA の発現量を図 18 に示す。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 Day 14 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投与後の肝臓で

の apoB-100 タンパク質発現量の変化を図 19 に示す。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。それぞれの時点の AST 値、ALT 値をそれぞれ図 20、21 に示す。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。

#### 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。*in vitro* のスクリーニング、*in vivo* のスクリーニングを行ない、アポ B に対して有効である siRNA の配列を選定した。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 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 14A)。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 14B)、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。

siBNA 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。

#### E. 結論

BNA 化、ホスホロチオエート化等の修飾を施すことで、siRNA は *in vivo* で高い治療効果を発現することが明らかになった。核酸医薬としての大きな可能性が示され

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

(欧文)

- 1) Kang J, Tachibana Y, Kanata W, Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T  
Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine(PEI)-pullulan carrir: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010; 18: 3946-3950
- 2) Fujita Y, Kakino A, Harada-Shiba M, Sato Y, Otsui K, Yoshimoto R, and Sawamura T  
C-Reactive Protein Uptake by Macrophage Cell Line via Class-A Scavenger Receptor. *Clinical Chemistry*, 2010; 56, 3: 478-481
- 3) 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*, 2010; 17, 7: 667-674
- 4) Harada K, Miyamoto Y, Morisaki H, Ohta N, Yamanaka I, Kokubo Y, Makino H, Harada-Shiba M, Okayama A, Tomoike H, Okamura T, Saito Y, Yoshimasa Y, Morisaki T: A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated

- with hypercholesterolemia. J Atheroscler Thromb, 17, 2: 131-140, 2010
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 15, 6: 292-303, 2008
- 10) Makino H, Harada-Shiba M: Safety Aspects of Statins: Which Factors Create the Adverse Effects of Statins: Immun. Endoc.&Metab.Agents in Med.Chem, 8, 2: 172-176, 2008
- (和文)
- 1) 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 2009-2
2. 総説  
欧文 なし  
和文
- 1) 斯波真理子  
「家族性高コレステロール血症 (FH)」  
循環器病研究の進歩 (通巻50号) Vol.XXXI  
No.1 25-33 2010
- 2) 山本剛史, 斯波真理子  
「LDL受容体のあらたな制御機構と治療戦略」  
医学のあゆみ Vol.234 Nos.7,8 754-757  
2010
- 3) 斯波真理子, 山下貴裕  
「ARHとPCSK9」  
Medical Practice Vol.27 No.03 494-495

- 2010
- 4) 斯波真理子, 山下貴裕  
「家族性高コレステロール血症の治療」  
Medical Practice Vol.27 No.03 527-532 2010
- 5) 山本剛史, 斯波真理子  
「PCSK9阻害薬の可能性」  
Mebio, 2010; 27(5):54-62
- 6) 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 No.4: 14-19(366-371), 2009
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 杉沢貴子, 斯波真理子  
「トリグリセリド低下作用」  
薬局Vol.60 No.2: 55-58 (239-242), 2009
- 14) 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: 51-58, 2009
- 15) 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: 62-68, 2009
- 16) Yamashita S, Bujo H, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, and Matsuzawa Y  
[Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events : a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan Journal of Atherosclerosis and Thrombosis Vol.15, No.6 2008
- 17) 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, 59-62(143-146), 2008-6
- 18) 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
- 19) 平野勉, 木庭新治, 芳野原, 田中明,



庄司哲雄, 斯波真理子, 木下誠  
「家族性複合型高脂血症の新しい診断マーカーの評価」  
ラボ・サービス 機器・試薬31(3): 273~280, 2008  
20) 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  
21) 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  
22) 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  
23) Makino H, Harada-Shiba M  
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  
24) 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  
25) 杉沢貴子, 斯波真理子  
「家族性高コレステロール血症と類縁疾患」

ホルモンと臨床 Vol.56 No.3, 2008

3. 著書

欧文

1) Iwamoto N, Harada-Shiba M  
Intratracheal gene transfer using polyplex nanomicelles and their application to cardiology, Nanomedicine and Cardiovascular System, edited by Victor R. Preedy, Science Publishers, in press

学会発表

(国内)

1) 斯波真理子  
家族性高コレステロール血症  
第10回動脈硬化教育フォーラム, 教育講演,  
2010年2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) 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  
日本循環器学会, シンポジウム, 2010年3月, 京都

4) 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
- 5) 中谷理恵子, 宮本恵宏, 大畑洋子, 斯波真理子, 山下貴裕, 榎野久士, 岸本一郎  
 医長障害を繰り返すミトコンドリア糖尿病(3243変異)に対してBOT療法を検討した一例  
 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 口頭発表, 2010年5月, 岡山
- 6) 内田智士, 位高啓史, Qixian Chen, 長田健介, 宮田完二郎, 斯波真理子, 片岡一則  
 コンドロイチン硫酸添加型ナノミセルの機能解析—組織傷害性軽減による安全かつ効率的な遺伝子導入  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, 2010年6月, 北海道
- 7) 柴田映子, 井上麻衣, 宮田完二郎, 位高啓史, 西山伸宏, 石井武彦, 西川元也, 高倉喜高, 片岡一則, 斯波真理子  
 PEG-P [Asp-(DET)] を用いた気管内投与による遺伝子導入—臨床応用に向けての炎症変化軽減の試み—  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道
- 8) 山本剛史, 斯波真理子, 和田俊輔, 生川径祐, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 今西武, 小比賀聡  
 新規PCSK9阻害薬の開発: 2', 4' -BNA/LHA修飾型人工核酸による抗高コレステロール血症作用の評価  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, 2010年6月, 北海道
- 9) 鎌田和加子, 橘洋一, 姜貞勲, 井上麻衣, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二  
 糖修飾カチオン性キャリアを用いたsiRNAによる高コレステロール血症治療  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道
- 10) 橘洋一, 鎌田和加子, 姜貞勲, 斯波真理子, 山岡哲二  
 肝細胞指向性キャリアーを用いた抗ApoB si-RNAのデリバリー  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, 2010年6月, 北海道
- 11) 和田俊輔, 山本剛史, 井上麻衣, 柴田映子, 山岡哲二, 鳥越秀峰, 小比賀聡, 斯波真理子  
 機能性siRNA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  
 遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道
- 12) Harada-Shiba M, Makino H, Miyamoto Y, Kishimoto I, Iwamoto N, Yokoyama S, Tomoike H  
 Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia (FH)  
 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、シンポジウム, 2010年7月, 岐阜
- 13) Harada-Shiba M  
 Management of familial hypercholesterolemia (FH)  
 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、シンポジウム, 2010年7月, 岐阜
- 14) Harada-Shiba M  
 Long term effect of LDL-apheresis on familial

- hypercholesterolemia  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、  
ランチョンセミナー、2010年7月、岐阜
- 15) Ohta N, Harada-Shiba M, Miyamoto Y, Makino H, Yamamoto S, Fujiyama H, Sano T, Sano M, Tomoike H  
Geneti analysis of familial hypercholesterolemia  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ  
スター発表、2010年7月、岐阜
- 16) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Wada S, Torigoe H, Yamaoka T, Narukawa K, Imanishi T, Obika S  
Antisense Therapy for Dyslipidemia :  
2',4'-BNA/LNA-Modified Oligonucleotide  
Targeting PCSK9  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ  
スター発表、2010年7月、岐阜
- 17) Yuasa Y, Makino H, Osaki T, Mnamino N, Usami M, Ishikawa Y, Yoshimasa Y, Tomoike H, Harada-Shiba M  
Proteomic analysis of substances removed by  
LDL-Apheresis(LDL-A)treatment  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ  
スター発表、2010年7月、岐阜
- 18) Wada S, Yamamoto T, Yamaoka T, Obika S, Harada-Shiba M  
Therapeutic approach for homozygous familial  
hypercholesterolemia by using  
2',4'-BNA/LNA-modified small-interfering  
RNA  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ  
スター発表、2010年7月、岐阜
- 19) Asada T, Kodama M, Fujiwara A, Murakami M, Yoshida R, Sano T, Sano M, Ito Y, Hirano T, Harada-Shiba M  
Analysis of LDL and sdLDL measurement in  
familial hypercholesterolemia(FH) patients  
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ  
スター発表、2010年7月、岐阜
- 20) 姜貞勲, 橘洋一, 鎌田和加子, 馬原淳, 斯波真理子, 山岡哲二  
プルラン修飾キャリアーによる Apo B  
siRNAの肝臓選択的デリバリー  
第59回高分子討論会、一般口演、2010年9月、札幌
- 21) 和田俊輔, 山本剛史, 鳥越秀峰, 小比賀聡, 斯波真理子  
架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAを用いた  
家族性高コレステロール血症に対する遺伝  
子治療の開発  
第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年  
9月、大阪
- 22) 中谷萌夏, 斯波真理子, 山本剛史, 和田俊輔, 生川径祐, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 今西 武, 小比賀 聡  
家族性高コレステロール血症治療を目的と  
した高機能性核酸医薬の開発 (2)  
第60回日本薬学会近畿支部総会・大会、一般  
口演、2010年10月、大阪
- 23) 小川浩司, 西垣孝行, 四井田英樹, 高橋裕三, 吉田幸太郎, 西岡宏, 峰崎純一, 染川将太, 林輝行, 岩宮正, 池田智明, 岩本紀之, 槇野久士, 斯波真理子  
家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接  
合型妊婦に関するLDL-apheresisの経験  
第31回日本アファレシス学会学術大会、

- 2010年11月, 千葉
- 24) 湯浅由美子, 榎野久士, 岩本紀之, 尾崎司, 南野直人, 宇佐美眞, 斯波真理子  
「LDL-Aによって除去される動脈硬化危険因子について」排液Proteome解析からの検討  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 25) 榎野久士, 岩本紀之, 岸本一郎, 斯波真理子  
家族性高コレステロール血症ホモ接合体におけるLDLアファレシス治療  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 26) 岩本紀之, 榎野久士, 斯波真理子  
FHにおける妊婦とLDLアファレシス  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 27) 斯波真理子, 湯浅由美子, 榎野久士, 岩本紀之, 宇佐美眞, 岡島年也  
LDLアファレシスに除去される物質と病態  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 28) 山岡哲二, 斯波真理子, 姜貞勲, 山下敦, 鈴木彩香, 馬原淳  
新しい病医物質除去システムへのチャレンジ: DNCS  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 29) 斯波真理子, 湯浅由美子, 榎野久士, 岩本紀之, 宇佐美眞, 岡島年也  
LDLアファレシスに除去される物質と病態  
第31回日本アファレシス学会学術大会,  
2010年11月, 千葉
- 30) 山本剛史, 斯波真理子, 中谷萌夏, 和田俊輔, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 生川径祐, 今西武, 小比賀聡  
2',4'-BNA/LNA修飾型抗PCSK9アンチセンス医薬の薬理評価  
第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸
- 31) 和田俊輔, 山本剛史, 山岡哲二, 小比賀聡, 斯波真理子  
糖部架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAを用いた家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療の開発  
第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸
- 32) 橘洋一, 山下敦, 小宮山萌美, 鎌田和加子, 姜貞勲, 森反俊幸, 鳥越秀峰, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二  
抗PCSK9アンチセンスBNA徐放化による高脂血症治療  
第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸
- 33) 斯波真理子  
家族性高コレステロール血症の病態と核酸医療治療へのアプローチ  
第20回アンチセンスシンポジウム, 招待講演, 2010年12月, 神戸
- 34) 斯波真理子  
原発性高コレステロール血症  
第14回日本病態栄養学会年次学術集会,  
2011年1月, 横浜
- 34) 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