

- 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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 ポスター発表 2009年 福岡
- 41) 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
- 42) 湯浅由美子、榎野久士、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
- 43) 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、榎野久士
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

44) 榎野久士、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

45) 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

46) 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

47) 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

48) 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

49) 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

50) Bujo H, Yamashita S, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Decrease in HDL-cholesterol levels by purobucol treatment is not associated with cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolemia,

第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口

51) Hirano K, Zang B, Yamaguchi S, Ikegami C, Nagasaka H, Miida T, Sasaguri Y, Okazaki M, Harada-Shiba M, Saku K, Tochino Y, Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by in situ perfusion technique,

第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シ

ンポジウム 2009年7月17日～18日 山口

52) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, Yoshimasa Y, Yokoyama S, Tomoike H, Non HDL-cholesterol as a risk factor for CAD in heterozygous familial hypercholesterolemia(FH),

第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口

53) 鈴木朗、宮田完二郎、位高啓二、西山伸宏、宮田浩子、井上麻衣、柴田映子、山口知是、石井武彦、片岡一則、斯波真理子

嚢胞性線維症に対する経肺遺伝子治療法の開発

遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日～11日 大阪

54) 渡部和人、斯波真理子、鈴木朗、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、御供田理沙、栗原亮介、菅尾祐輔、森健、片山佳樹、新留琢郎

肝疾患治療に向けたリジンデンドリマーによるオリゴ核酸デリバリー

遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日～11日 大阪

55) 山崎毅、大石基、田村磨聖、斯波真理子、菊池明彦、長崎幸夫

高いHDL/LDL比を示す高機能型胆汁酸吸着剤としての4級化ナノゲルの創製

平成21年度繊維学会年次大会 ポスター発表 2009年6月10日～12日 東京

56) 山崎 毅、大石 基、田村磨聖、斯

波真理子、菊池明彦、長崎幸夫

経口投与型胆汁酸吸着剤の設計—高いHDL/LDL比を示す4級化ナノゲルの設計と評価

第58回高分子学会年次大ポスター発表会 2009年5月27日～29日 神戸

57) 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106回日本内科学会 ポスター発表 2009年4月10日 東京

58) 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

家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体におけるLDL-C及びアキレス腱肥厚(ATT)による冠動脈疾患(CAD)高リスク患者の抽出

第106回日本内科学会 ポスター発表 2009年4月10日 東京

59) 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

60) 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

61) 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
- 62) 榎野久士、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
- 63) 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
 dendro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 69)
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
- 64) 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
- 65) 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
- 66) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Tsushima M, Yamamoto A, Tomoike H
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
- 67) 杉沢貴子、斯波真理子、榎野久士、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
- 68) 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
- 太田直孝、斯波真理子、宮本恵、杉沢貴子、浦敏郎、新井浩司、佐藤清、榎野久士、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
- 70) 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
- 71) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Miyamoto Y, Makino H, Nagumo A, Tsushima M, Yamamoto A, Tomoike H
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
- 72) Sugisawa T, Harada-Shiba M, Makino

H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Tsushima M, Yamamoto A, Tomoike H

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

73) Nagumo A, Harada-Shiba M, Makino H, Sugisawa T, Nakahama H, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Tomoike H

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

(国際)

1) Yamashita T, Harada-Shiba M, Makino H, Ohata Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H

Long term LDL-apheresis prevents catastrophic cardiovascular events in patients with homozygous familial hypercholesterolemia

XXth World Congress of the International Society for Heart Research, ポスター発表, 2010年5月13-16日、京都

2) Wada S, Harada-Shiba M, Yamamoto T, Sasaki K, Yamaoka T, Obika S, Torigoe H

Applying 2',4'-BNA/LNA-modified siRNA for familial hypercholesterolemia, 2010 Round Table in France, 2010年8月、France

3) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Narukawa K, Sasaki K,

Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S

Systemic administration of 2', 4'-

BNA-LNA-modified anti-PCSK9 antisense, 6th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2010年10月、Dana Point、USA

4) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H,

Impact of statins on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia,

2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月 Boston, USA

5) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H

Identifying very high risk patients of coronary artery disease in heterozygous familial

hypercholesterolemia from clinical features, 2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月 Boston, USA

6) Yamazaki T, Tamura M, Oishi M, Harada-Shiba M, Kikuchi A, Nagasaki Y,

Enhanced serum cholesterol reduction *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年3月 東京

7) Arai H, Yamashita S, Bujyo H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito

Y, Kita T, Matsuzawa Y, Long-term probucol treatment prevents cardiovascular events in coronary artery disease patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, International Symposium on Atherosclerosis 2009年6月 Boston, USA

山本 剛史
井上 麻衣
柴田 映子
森本 恵
中谷 萌夏
湯浅 由美子
宮田 浩子
鈴木 朗
浦田 由美子
吉田 晶子

H. 知的所有権の出願・取得状況

1) 脂質異常症治療薬剤としての化学修飾siRNA

出願番号：特願2010-020720

発明者：斯波真理子、小比賀聡、和田俊輔
他

出願人：ヒューマンサイエンス振興財団、
大阪大学

出願日：平成22年2月1日

2) オリゴヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する脂質異常症治療剤

出願番号：特願2010-195187

発明者：斯波真理子、小比賀聡、山本剛史
他

出願人：国立循環器病研究センター研究所、
大阪大学、東京理科大学

出願日：平成22年8月31日

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
分子薬理部
和田 俊輔

No.	Name	Start	Sequence (Sense)	Sequence (Antisense)	Total	Profile	GC	Pos.	Load	Speci.
1	ApoB-5	1375	AGGCUGCAGGAAUCUUAdTdT	UAAAGAUUUCUGCAGCCUdTdT	93.2	66.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	ApoB-6	4962	UUCCCAGGGUGUAGAAUUAdTdT	UAAUUCUACACCCUGGAAdTdT	92.6	63.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3	ApoB-4	5878	GGGCAGCUAUUAGUAAGUdTdT	ACUUACUUAUAGCUGCCdTdT	94.0	70.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	ApoB-3	6195	GCCUGUCAAUUGCCUUAAUdTdT	AUUUAGGACAUUGACAGGCdTdT	97.2	86.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	ApoB-9	7305	GUGGCUUAAAGCAUUGUCUdTdT	AGACAAUGCUUUAAGCCAdTdT	91.9	100.0	100.0	100.0	73.0	100.0
6	ApoB-10	8142	GCCUCUUCAGAAUUGUAUdTdT	AUACAUUUCUGGAAGAGGCdTdT	92.2	70.0	100.0	100.0	94.0	100.0
7	ApoB-2	9515	CUCCCUUACUGAAGGAUUUdTdT	AAAUCCUUCAGUAAGGAGdTdT	99.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	ApoB-11	12224	AGGCUUCUAAGGCUAUUUAdTdT	UAAUJAGCCUUAGAAGCCUdTdT	92.6	78.0	90.0	100.0	100.0	100.0
9	ApoB-7	12443	GGGUGUUAGACAGUAUAGUdTdT	ACUUAUCUGUCUAACACCCdTdT	96.7	100.0	100.0	100.0	89.0	100.0
10	ApoB-8	13104	UGGUGGACAGUGAAUAdTdT	AUAAUUCACUGUCCACCCAdTdT	93.4	67.0	100.0	100.0	100.0	100.0
11	ApoB-1	10049	GUCAUCACACUGAAUACCAAUdTdT	CACAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT						
12	ApoB-1a	10049	GUCAUCACACUGAAUACCAAdTdT	CAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	72.6	10.0	30.0	5.0	12.6	15.0
13	ApoB-1b	10050	UCAUCACACUGAAUACCAAdTdT	ACAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	74.8	14.0	27.0	5.0	13.8	15.0
14	ApoB-1c	10051	CAUCACACUGAAUACCAAUdTdT	CAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	68.9	6.0	27.0	5.0	15.9	15.0

表 1. ApoB siRNA の候補配列とパラメーター

Start: siRNA の開始位置

Sequence (Sense): siRNA のセンス鎖の配列

Sequence (Antisense): siRNA のアンチセンス鎖の配列

Total: 合計スコア

Profile: (=Profile Score) 活性のある siRNA に共通する配列的特徴によるスコア

GC: (=GC Score) siRNA の GC% から算出したスコア

Pos.: (=Position Score) mRNA 中の位置から算出したスコア

Load: (=Load Score) siRNA のエネルギー分布から算出したスコア

Speci: (=Specificity Score) Off target effect の予測によるスコア

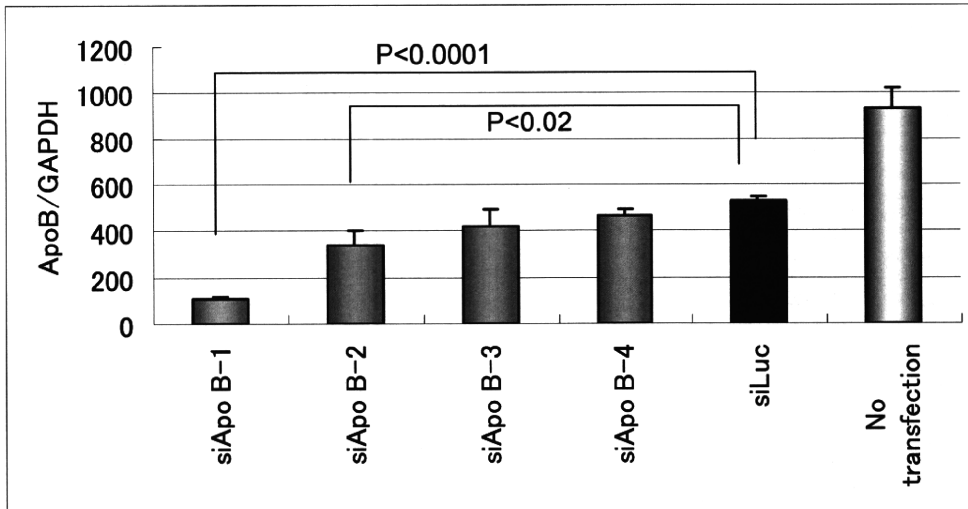


図 1 ApoB siRNA (ApoB-1~B-4)の *in vitro* スクリーニング

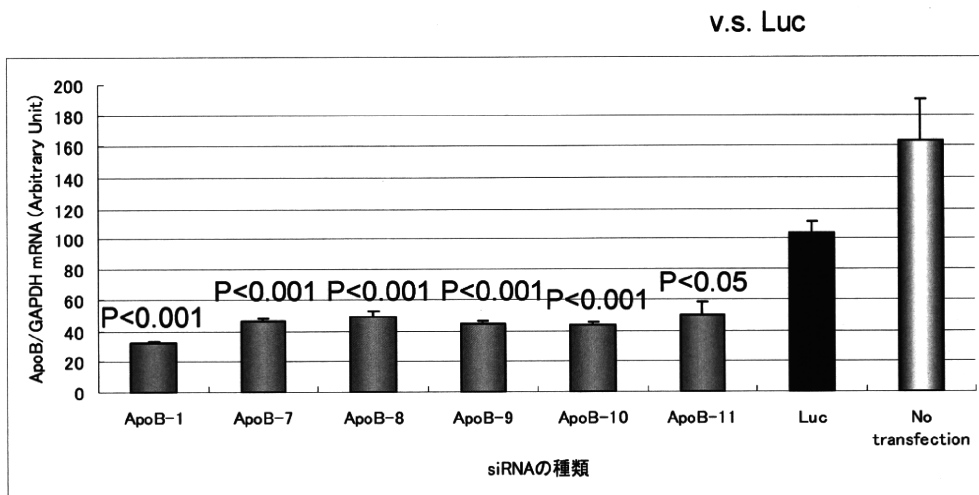


図 2 ApoB siRNA (ApoB-7~B11)の *in vitro* スクリーニング

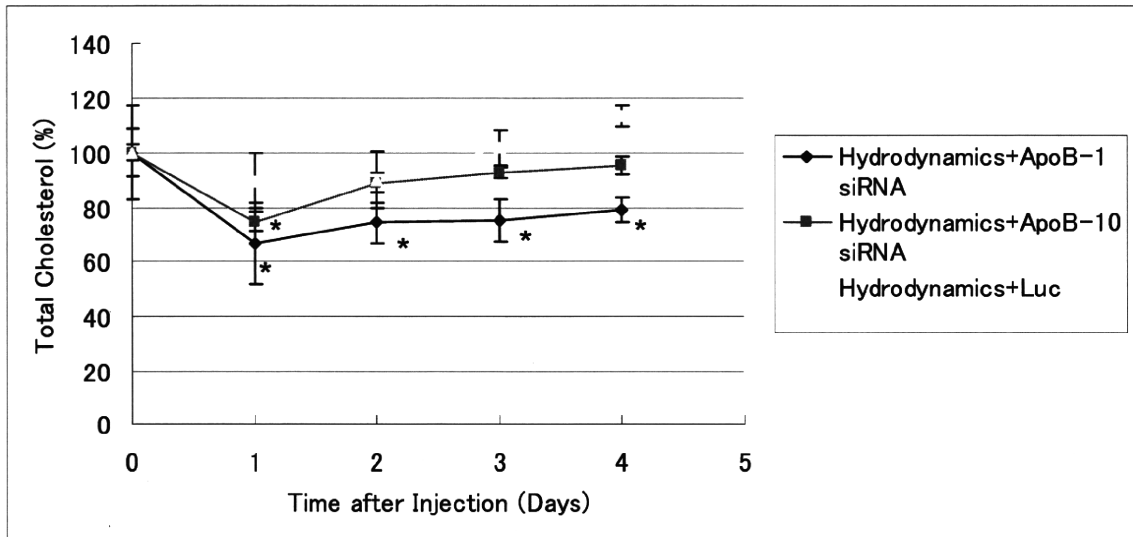


図3 hydrodynamics法によるApoB siRNAの投与後の血清VLDL+LDLコレステロール値の変化。

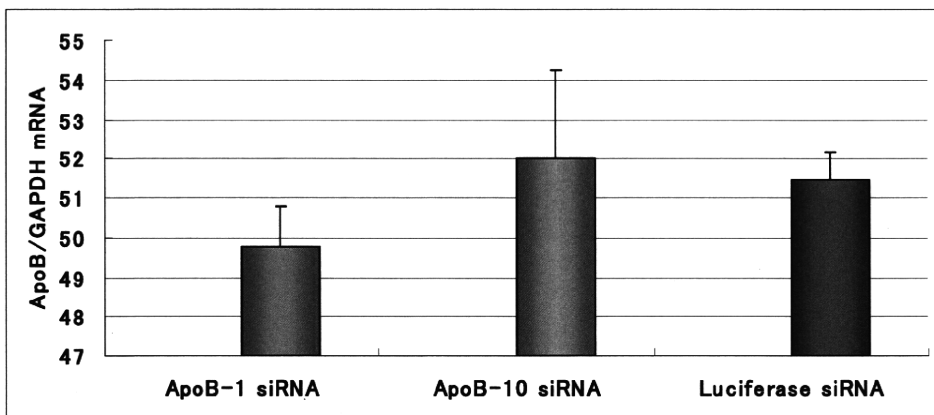


図4 siRNA投与4日後のマウスの肝臓におけるApoB mRNA量

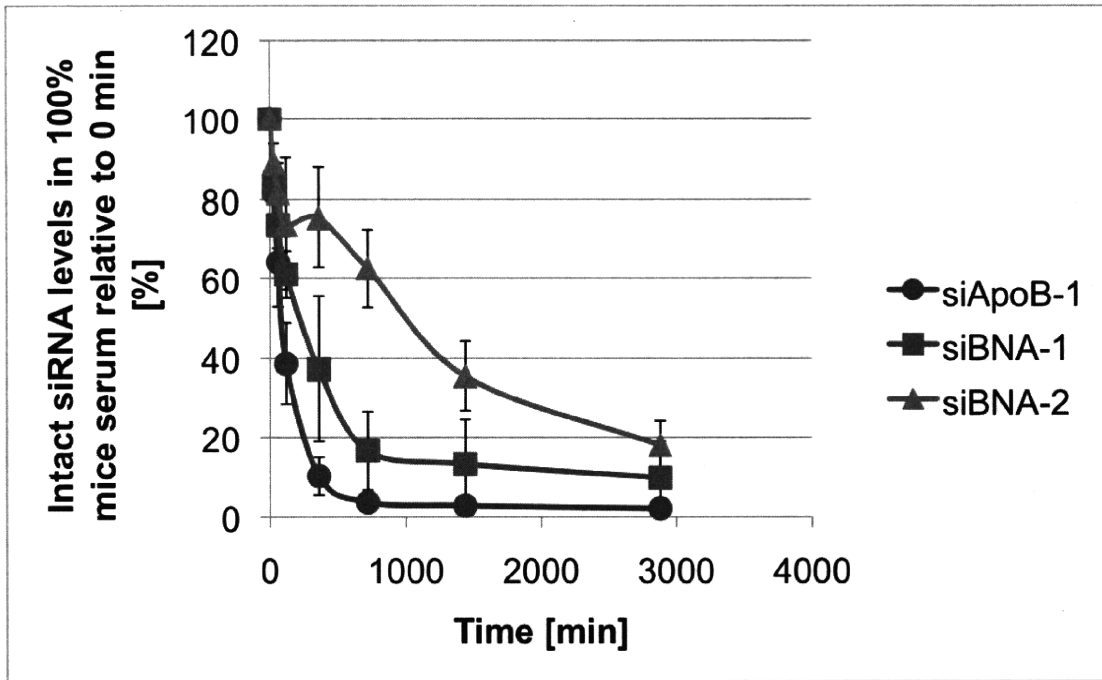


図5 ApoB siRNA(siApoB-1)、BNA化したsiRNA (siBNA-1、siBNA-2)の血清耐性試験

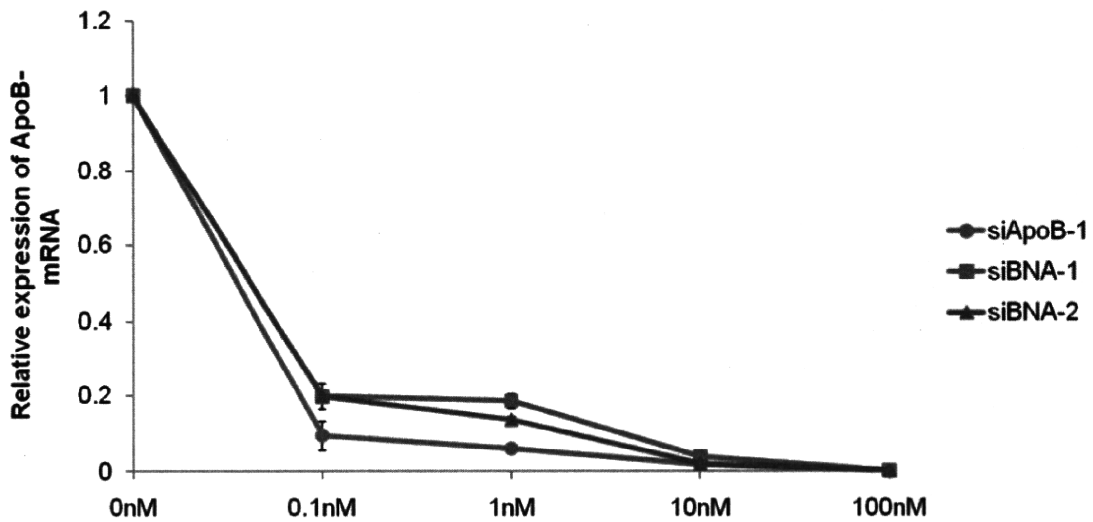


図6 ApoB siRNA(siApoB-1)、BNA化したsiRNA (siBNA-1、siBNA-2)の*in vitro*トランスフェクションによる遺伝子発現抑制効果

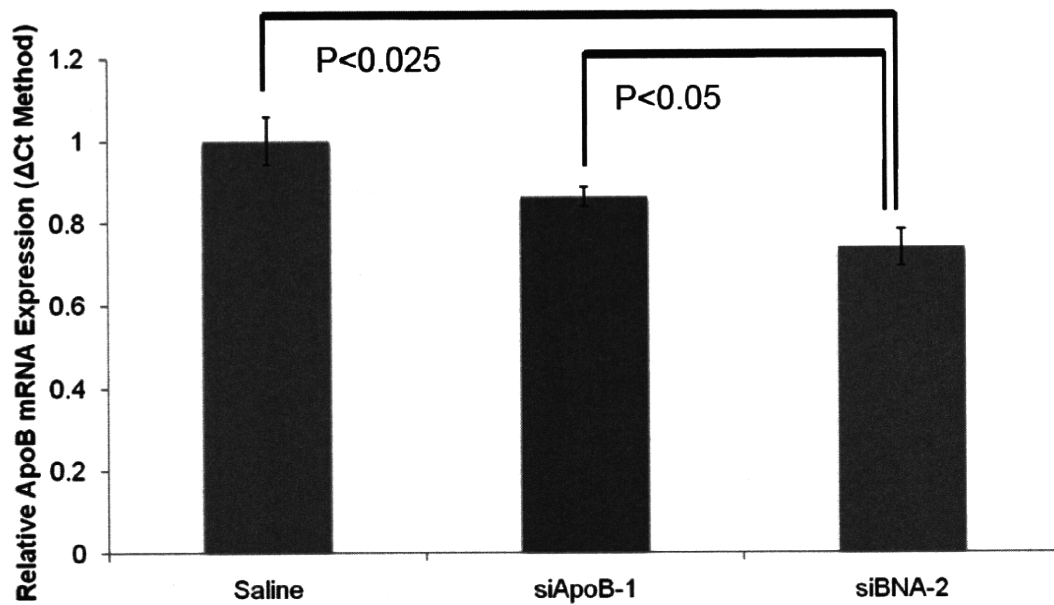


図7. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による肝臓での遺伝子発現抑制効果

: Total Cholesterol Assay

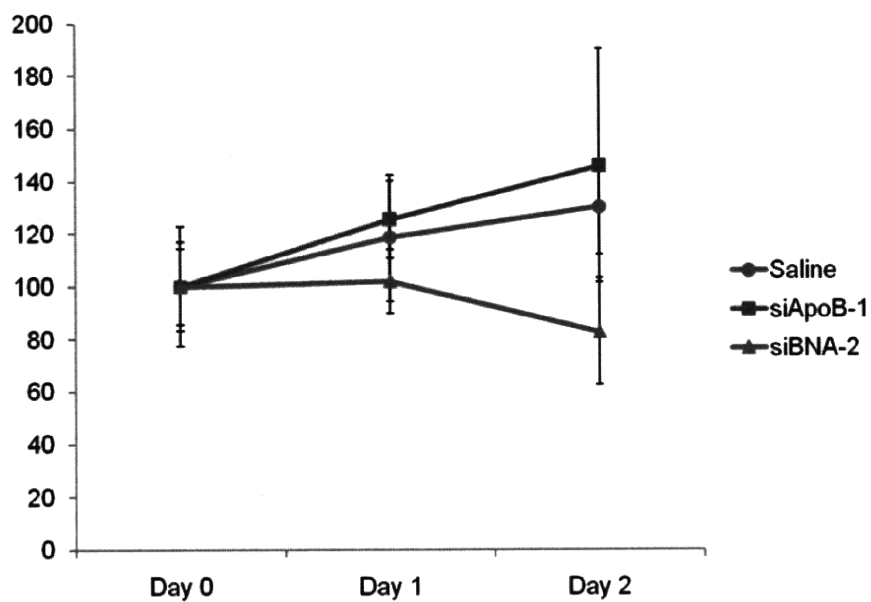


図8. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中総コレステロール値の変化

VLDL Cholesterol Level of Mice Serum

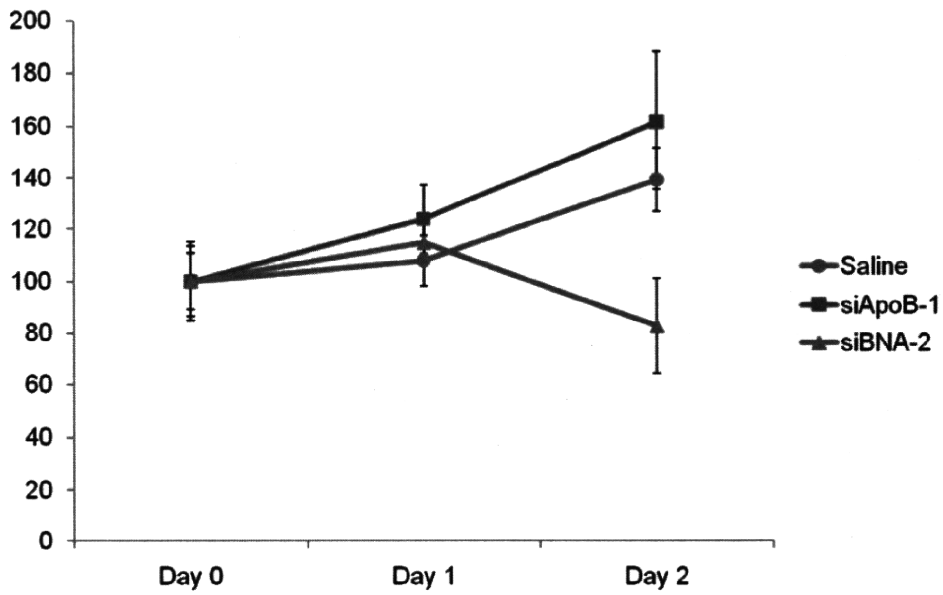


図9. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中VLDL-コレステロール値の変化

LDL Cholesterol Level of Mice Serum

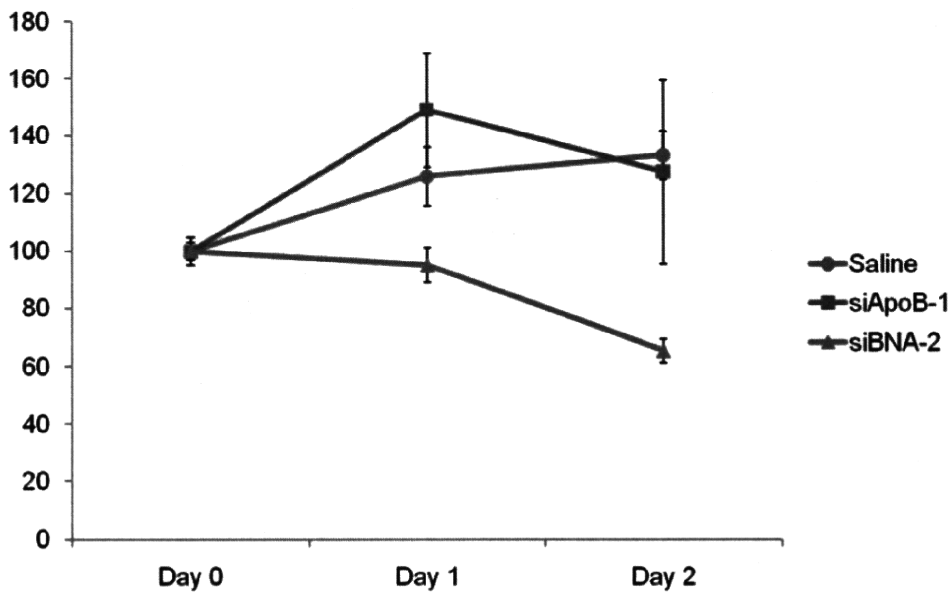


図10. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中LDL-コレステロール値の変化

HDL Cholesterol Level of Mice Serum

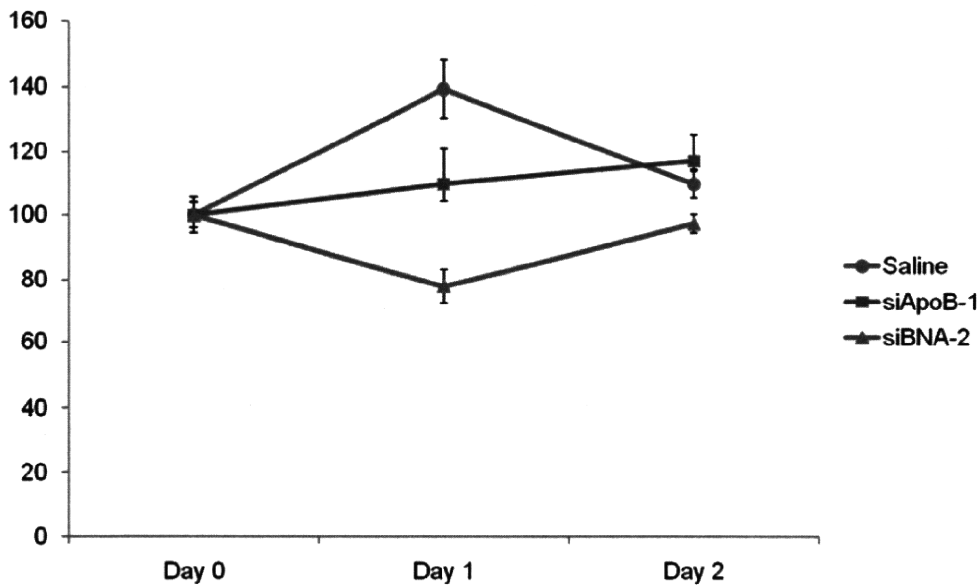


図11. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中HDL-コレステロール値の変化

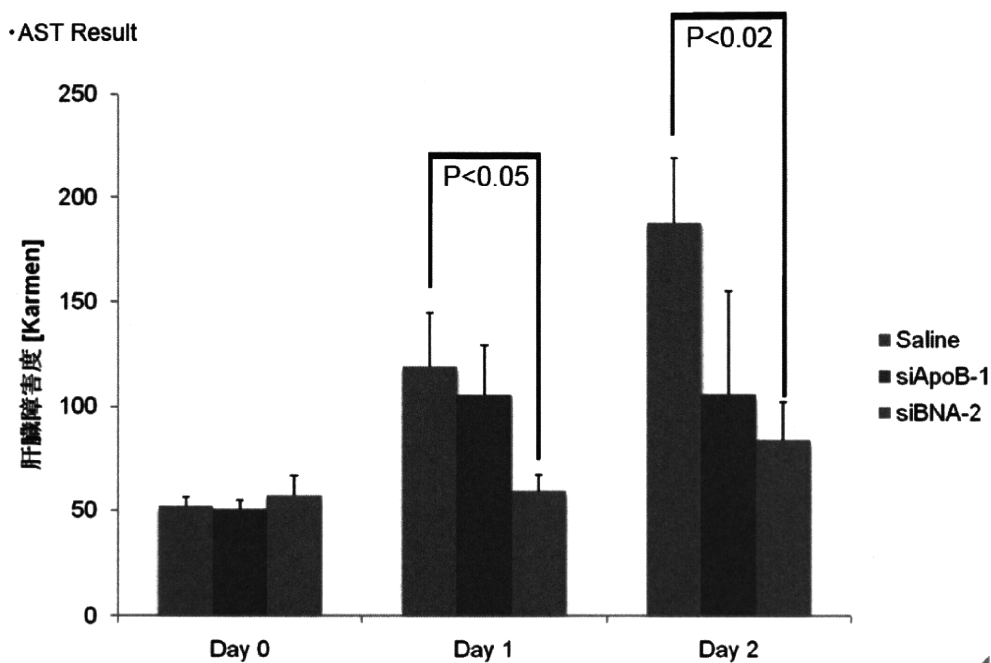


図 12. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2 の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中 AST 値の変化

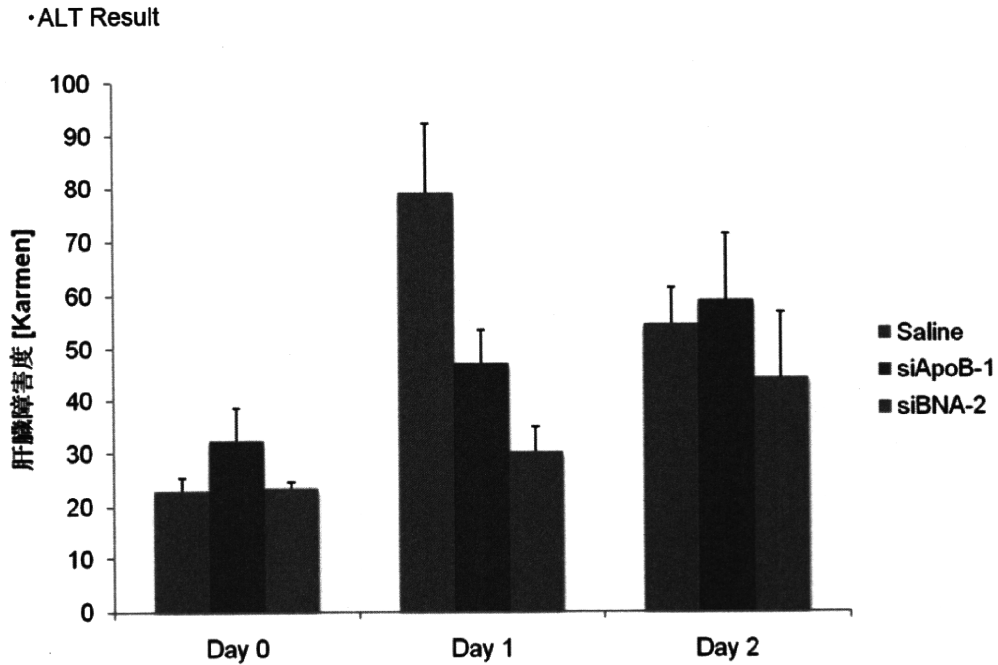


図 13. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2 の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中 ALT 値の変化

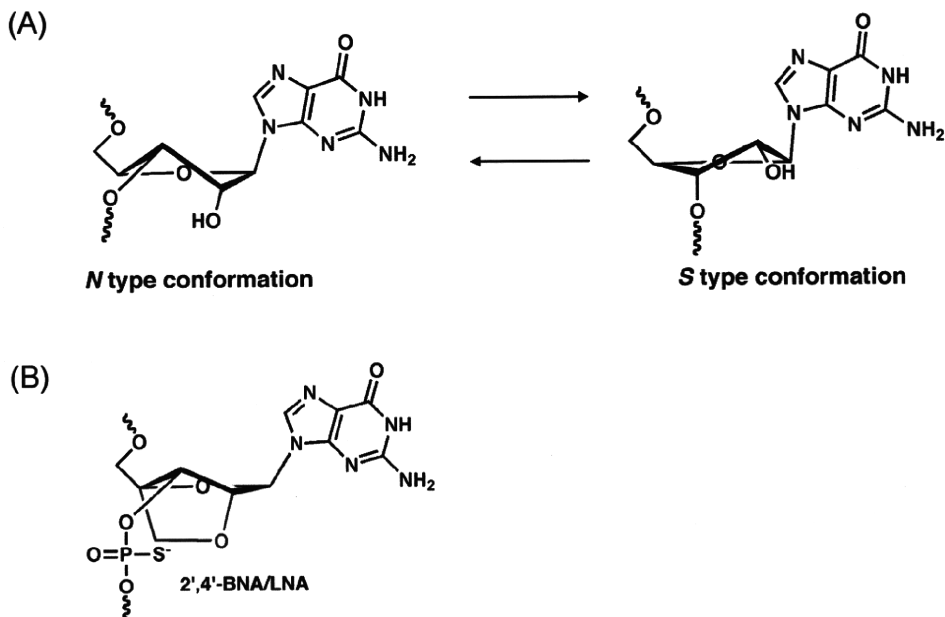


図 14. 核酸の構造 (A)N タイプと S タイプの核酸の構造。(B)Bridged Nucleic Acid (BNA)の構造。

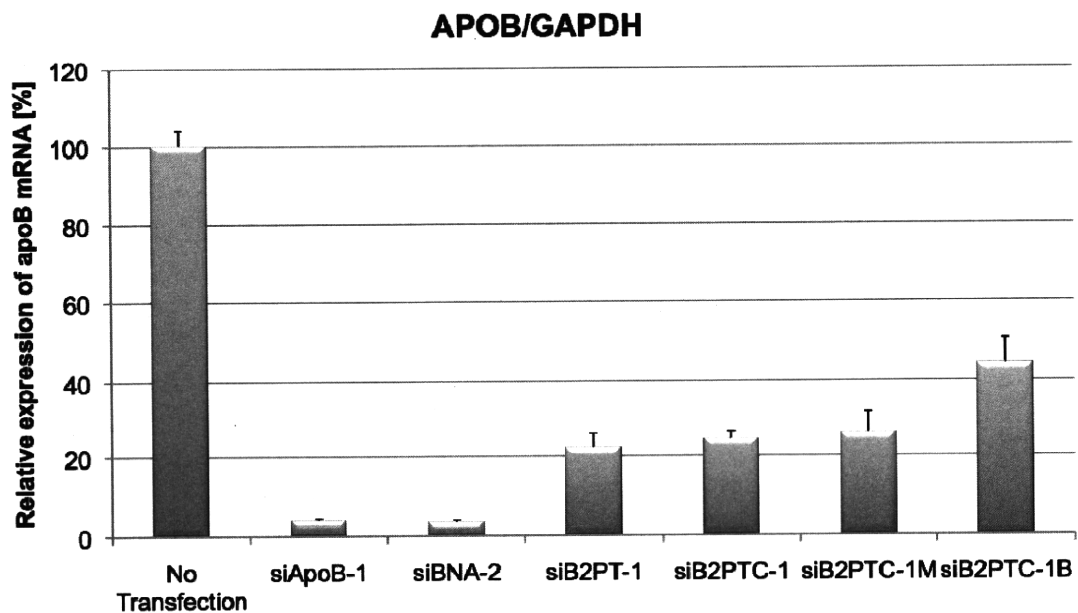


図 15 *in vitro* トランスフェクションによる遺伝子発現抑制効果

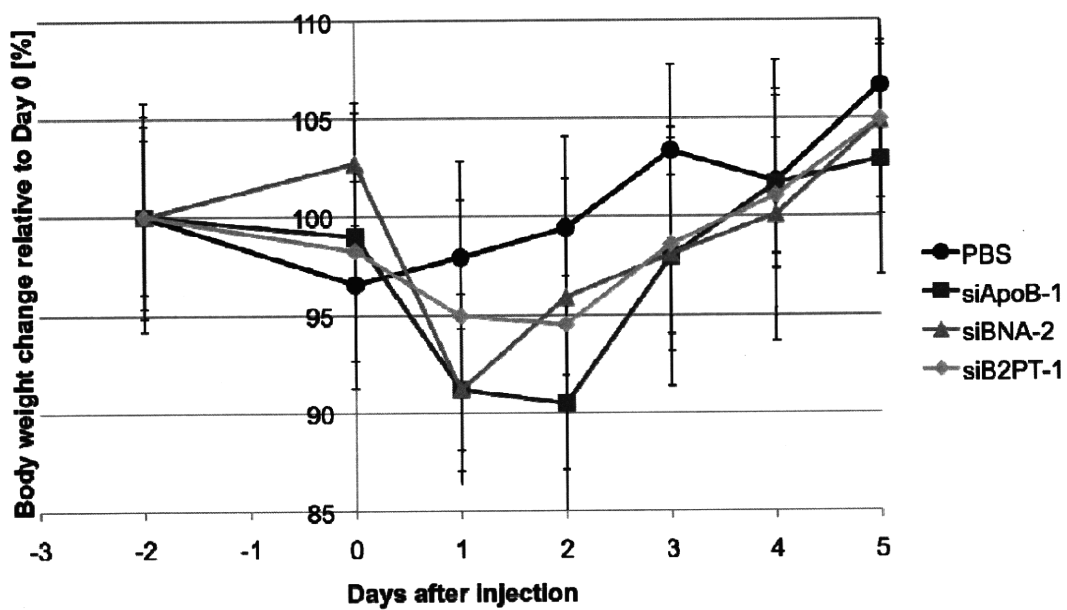


図 16 相対体重変化

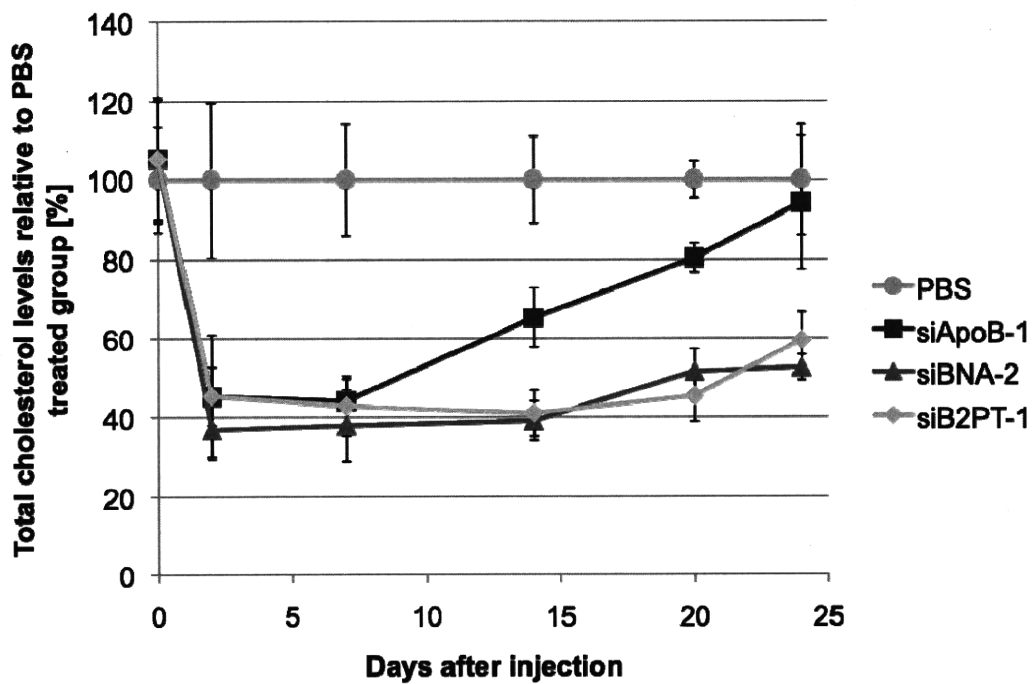


図 17 相対総コレステロール値変化

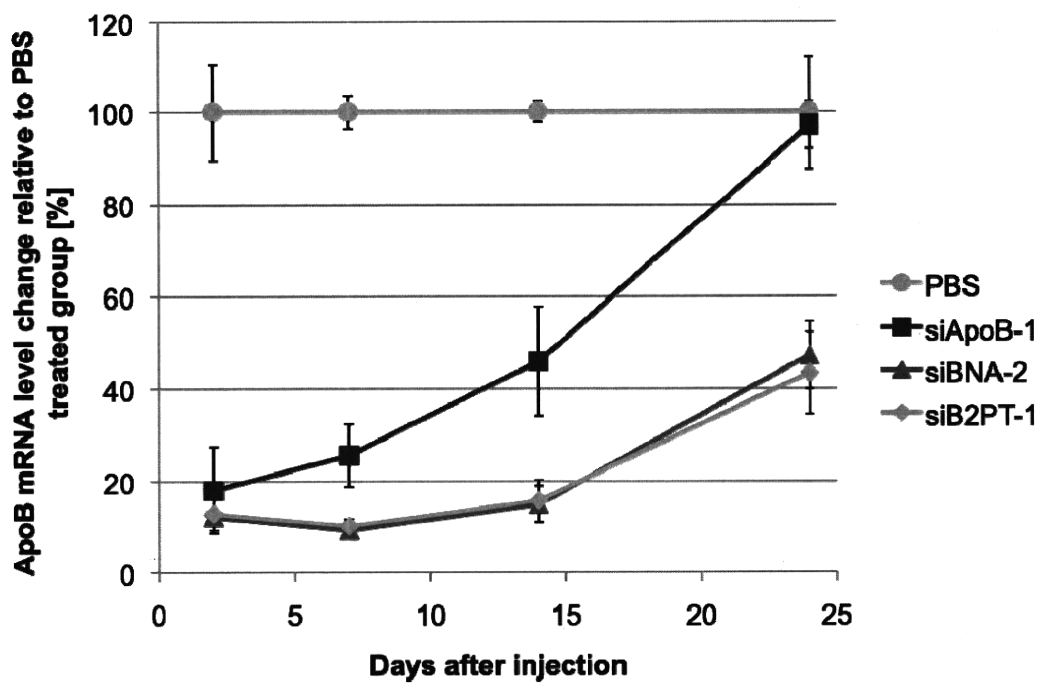
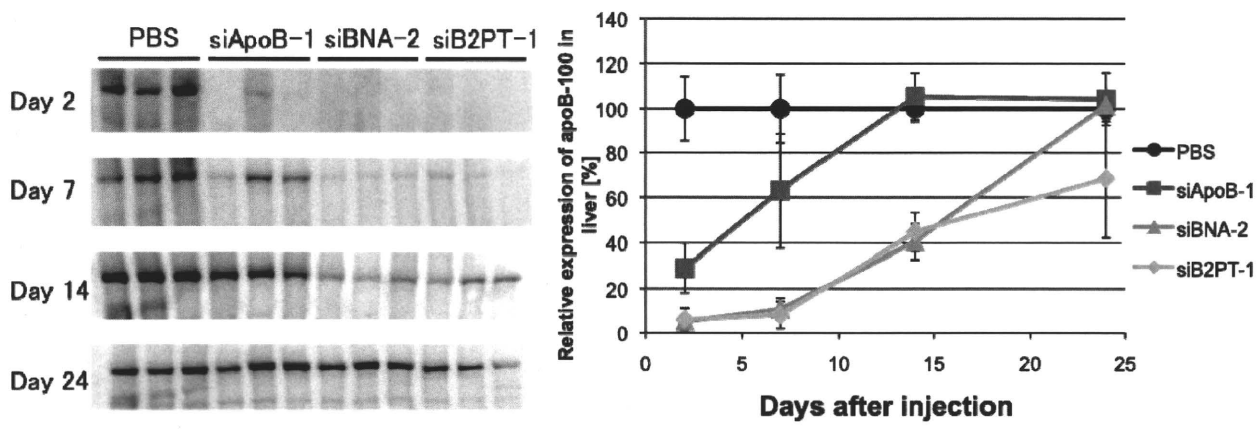


図 18 ApoB mRNA 発現量変化



A

B

図 19 apoB-100 Western Blot イメージ(A)と発現量変化(B)。

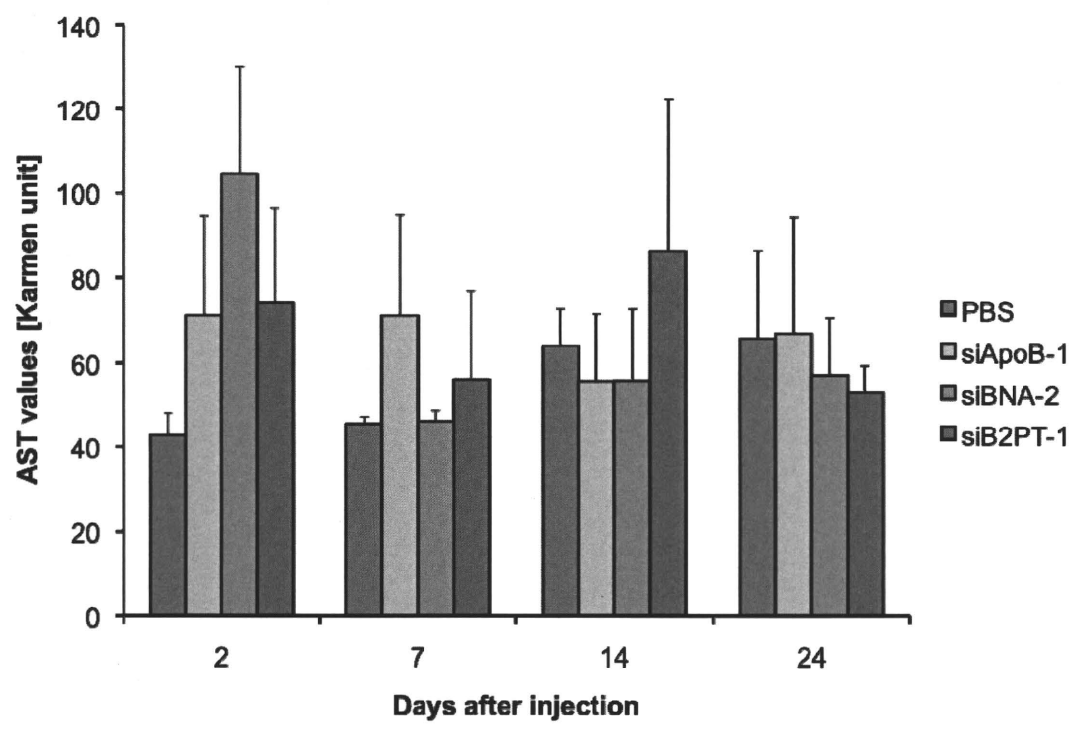


図 20 AST 値変化

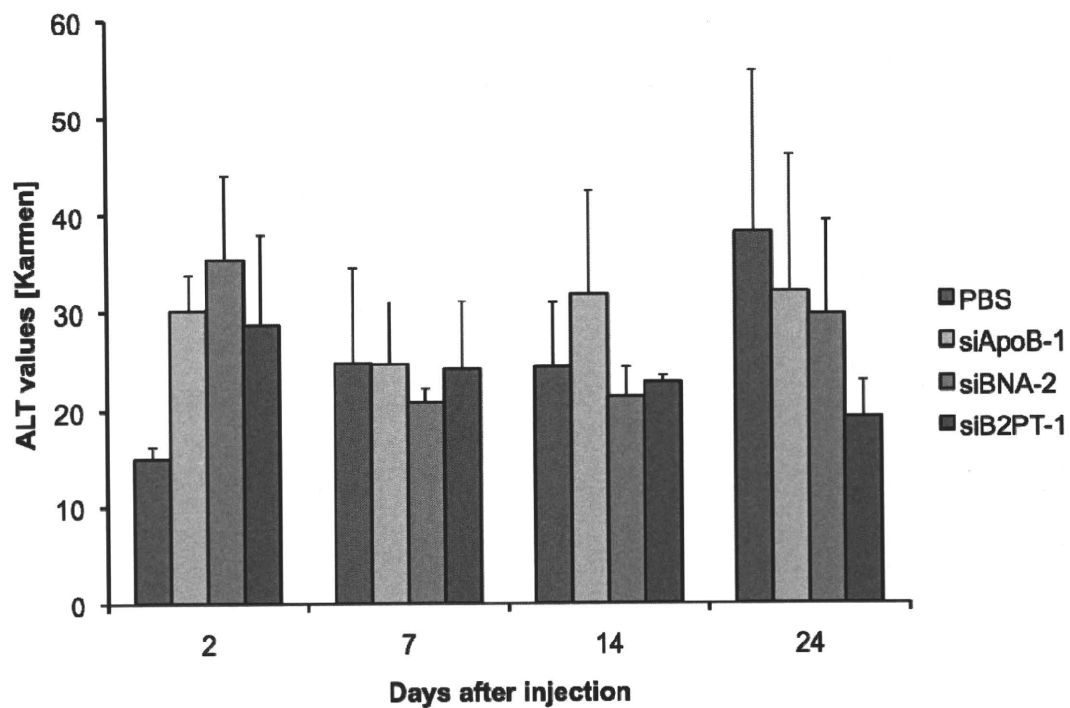


図 21 ALT 値変化

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

分担研究者 山岡 哲二 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨 本研究は、家族性高コレステロール血症に対する新規薬剤の開発を行う。機能化 siRNA を用いて経口投与による腸管での吸収を可能にし、小腸および肝臓でのリポ蛋白合成を抑制することで、高コレステロール血症の改善を目指すものである。これまでに、肝指向性を有する siRNA キャリアーの合成を行った。具体的には、直接的 siRNA 修飾として、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 siRNA に結合させた機能化 siRNA、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修飾 Polyethylenimine (PEI) (プルラン-PEI) 及び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高分子を合成してきた。これらのキャリアーとしての有用性について検討を行った。*in vitro* において、(1) 複合体形成能、(2) 複合体のサイズ・ζ-ポテンシャルの測定、(3) 細胞毒性および、(4) ApoB の抑制効果の検討を、また *in vivo* において、(5) キャリアー/siRNA 複合体の尾静中投与による治療実験を進めた。これらの結果より、本研究で合成されたキャリアーの肝臓指向性が示されており、siRNA の肝臓ターゲティングによる治療効果が期待できる。

A. 研究目的

siRNA が遺伝子の働きを強力に抑制する特徴を有することが知られて以来、siRNA を用いた研究が様々行われてきた。近年では、siRNA の合成・設計という基礎的な研究だけでなくへ向けた試みも多い。しかし、siRNA を臨床化するためには、目的部位へのターゲティング・途中経路における分解の抑制等が必要となり多くの困難を伴う。それらの問題点を解決するためには、siRNA の化学的修飾が一つの戦略である。

本来、細胞内への遺伝子の導入は、細胞膜によるブロックのために容易ではない。そのため、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が一般的である。しかし、ウイルスベクターは、細胞種に依存することなく遺伝子を導入でき、既存のベクターでは最も効率が良いとされている。しかし、ウイルス由来のタンパクに対する免疫反応の誘導やゲノムに変異が挿入される危険性等の大き

な問題が存在する。そこで、非ウイルス性の合成高分子キャリアー（ポリエチレンイミンなど）が着目されてきた。合成高分子キャリアーによる導入効率は、高分子の分子量や混合する核酸との比率に依存し、導入する細胞によっても異なるため、詳細な検討が必要となる。

本研究は、家族性高コレステロール血症治療を達成するための、経口投与可能な siRNA を開発することである。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、③トレーサー分子の結合部位を確保する④目的部位に於いて速やかに siRNA をリリースさせる。我々は④の条件に着目し、研究を行った。これまでに、肝細胞指向性を有する siRNA 及びキャリアーの合成を行ってきた。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、siRNA と

の複合体形成・mRNA の抑制効果について検討した。また、細胞に対する遺伝子導入の分野において用い、有用であると知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。さらに、上記で得られた知見を基に、より精密に制御された構造を持つ高分子キャリアーを合成し、細胞毒性・mRNA の抑制効果について検討を行った。いずれも、肝細胞への取り込み促進を狙い、且つ、siRNA の機能を保持させる化学的アプローチである。

B. 研究方法

B-1. 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 μmol , 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 μl 中で 6 時間、室温で放置した。6 時間後、440 μl の DEPC 水を加えた siRNA (ApoB : sense 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAUdTdT-3' antisense 3'-dTdTTCACAGUAGUGACUUAUGGUUA-5': sense 鎖の 5'末端をアミノ化) を、反応溶液に添加し、40 $^{\circ}\text{C}$ 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。

B-2. プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

ポリ (エチレンオキサザリン) (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プルランを選択し、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 中でプル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、プルランと 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)。

B-3. プルラン-siRNA コンジュゲートの導入実験

これまでに、プルラン-siRNA (Table 1) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて NMuLi 細胞 (マウス肝細胞) へ導入してきた。本年度は、プルラン-siRNA のみの導入を行った。導入するプルラン-siRNA は、仕込んだ siRNA を基準に調製した。NMuLi 細胞を、導入 24 時間前に 2.1×10^4 cells/cm² 播種し、100 pmol、または、500 pmol のプルラン-siRNA を各 well に添加後、さらに 24 時間インキュベートした。24 時間後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて評価した。

B-4. プルラン-PEI の中和滴定

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 のプルランを用いて合成したポリマー (プルラン₅₉₀₀-PEI、プルラン₁₀₇₀₀₀-PEI) を用いた。PEI、プルラン₅₉₀₀-PEI、プルラン₁₀₇₀₀₀-PEI は、それぞれ mg、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、プルラン₅₉₀₀-PEI には 1.1 ml、プルラン₁₀₇₀₀₀-PEI には 1.5 ml 添加し、pH = 12 にした。その後、pH = 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、pH = 2 達するまで添加した HCl の総量は、PEI は 3.81 ml、プルラン₅₉₀₀-PEI は 1.63 ml、プルラン₁₀₇₀₀₀-PEI は 1.825 ml である。

B-5. プルラン-PEI を用いた siRNA との複合体形成

中和滴定より算出したポリマー中のカチオン量から、プルラン-PEI 5 μl と siRNA 4 μl (200 pmol) を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

B-6. プルラン-PEI/siRNA 複合体を用いた ApoB