

201109004A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(政策創薬探索研究事業)

アポ C3をターゲットとした高中性脂肪血症、動脈硬化症  
に対する革新的核酸医薬の開発

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成24 (2012) 年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告書	1
ApoC-III をターゲットとした高中性脂肪血症、動脈硬化症に対する革新的核酸医薬の開発	
斯波真理子	
II. 分担報告書	
1. ApoC-III の発現を効率的に阻害する BNA 搭載アンチセンス分子の設計・探索	9
小比賀 聡	
2. ApoC-III をターゲットとした BNA 搭載アンチセンスの in vivo 機能評価	17
斯波 真理子	
3. ApoC-III をターゲットとした BNA 搭載アンチセンスの安全性評価	41
柴田 雅朗	
III. 研究成果の刊行物・別刷	53

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告

## ApoC-IIIをターゲットとした高中性脂肪血症、動脈硬化症に対する革新的核酸医薬の開発

総括研究者 斯波真理子 国立循環器病研究センター研究所・特任部長

### 研究要旨

アポリポ蛋白C-III (ApoC-III) は、レムナントリポプロテイン (RLP) の代謝に関わり、血清トリグリセリド (TG) 値上昇作用を有すること、血管壁において慢性炎症を引き起こし、動脈硬化の発症や進展に直接関わっていることが明らかにされてきた。本研究では、高TG血症および動脈硬化発症のキーとなるApoC-IIIを標的として、動脈硬化症の予防および治療を目的とした新しい核酸医薬を開発する。本年度は、架橋型核酸である2',4'-BNA/LNA(BNA)および新しい架橋型核酸であるBNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンス配列の*in vitro*スクリーニングを行い、著効を示す配列の選定に成功した (小比賀G)。また、脂質異常症モデルマウスにApoC-IIIに対するBNA搭載アンチセンスを投与し、肝臓でのApoC-III遺伝子発現および血中ApoC-III蛋白量を有意に低下すると同時に血清トリグリセリド値を低下することが示され、*in vivo*での有効性が示された (斯波G)。*in vitro*スクリーニングで選択されたBNA搭載アンチセンス分子の投与により、肝臓内の脂肪沈着の減少を促進すること、肝臓における軽微な毒性の発現を認めた (柴田G)。有効性及び安全性を兼ね備えたBNA搭載アンチセンス分子を見つけ出すためには、*in vivo*スクリーニングの強化が重要であることが示唆された。

分担研究者

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀聡

大阪保健医療大学

柴田雅朗

A. 研究目的

我が国の死因の4分の1は心および脳血管疾患で占められており、これらの疾患の予防法や治療法を開発することは超高齢化社会における喫緊の課題である。強力な

LDL-C 低下作用を有するスタチンが臨床の場で使用される現在、心血管疾患の残りのリスクである食後高 TG 血症などのリスクに対して、分子を標的とした特異的な治療法の開発が待望されている。ApoC-IIIは、RLP の代謝に関わり血清 TG 値上昇作用を有すること、さらに最近では血管壁において慢性炎症を引き起こし、動脈硬化の発症や進展に直接関わっていることが明らかにされてきた。ApoC-III欠損患者において低 TG 血症、冠動脈硬化の頻度が低いことが明らかにされ (Science 322: 1702-1705, 2008)、ApoC-IIIが標的遺伝子として安全で適切であることは既に示されている。ApoC-IIIの発現抑制により、動脈硬化症の予防や治療が可能であると考えられるが、現在のところそのような薬剤はない。

特異的に遺伝子発現を抑制する方法としては、古くからアンチセンス法が知られている。mRNA に対する相補的な配列を持つ DNA 鎖を用いて mRNA に結合させ、蛋白質への翻訳を抑制するものである。In vitro において、特定の遺伝子発現を抑制させる方法として有用である。しかしながら、アンチセンスを病気の治療に用いることは困難であった。アンチセンスは、血液では豊富に存在する endonuclease により即座に分解されてしまうこと、そしてアンチセンスと mRNA の結合親和性が低いことなどが原因であった。小比賀らは、アンチセンスに化学修飾を施すことにより、endonuclease に対して耐性を持ち、mRNA

との結合親和性が飛躍的に高い 2'4'BNA 修飾型アンチセンスを開発し、斯波らとの共同研究で *in vivo* において有効である新規核酸医薬に成功している (Yamamoto et al, Molecular Therapy Nucleic Acid, in press)。

本研究では、高 TG 血症および動脈硬化発症のキーとなる ApoC-IIIを標的として、動脈硬化症の予防および治療を目的とした新しい核酸医薬を開発することを狙いとする。

## B. 研究方法

### 1. ApoC-IIIの発現を効率的に阻害する BNA 搭載アンチセンス分子の設計・探索

アンチセンス分子は、mRNA 二次構造予測プログラム、mfold を用いて標的 mRNA の二次構造を予測し、その中で一本鎖領域を標的とするアンチセンスを選択して設計した。さらに、CpG モチーフを含まないこと、GC 含量が 50-60%程度で GGG や CCC を含まないこと等の条件を満足する配列を抽出した。

マウス肝細胞に対して Lipofectamine 2000 を用いて各 13mer アンチセンスをトランスフェクションし、解析した。mRNA は、TRIzol Reagent 抽出し、分光光度計で定量した。Total RNA から cDNA を作製し、リアルタイム PCR を行い ApoC-III の mRNA 量を定量した。

### 2. ApoC-IIIをターゲットとした BNA 搭載アンチセンスの *in vivo* 機能評価

高トリグリセリド (TG) 血症モデルマ

ウスは、高脂肪、高シヨ糖、高カロリーを特徴とした F2WTD（オリエンタル酵母工業）を用い 3 週間投与後のマウスを実験に供した。

2',4'-BNA/LNAあるいは2',4'-BNA<sup>NC</sup>の2種の人工核酸で部分的に修飾されたホスホロチオアート型のアンチセンスを設計し、2',4'-BNA/LNAあるいは2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したホスホロチオアート型オリゴヌクレオチドを購入した。

6 週齢のマウスに3週間の高脂肪食 F2WTD 負荷の後、アンチセンスを 1 週間で2回全5回、腹腔内投与し尾静脈より採血した。マウスを麻酔後、PBSで下大静脈より灌流し、肝臓を採取後、細切して液体窒素で瞬間凍結し、RNAや蛋白の精製を行った。

RNAはTRizol Regentを用いて精製し、total RNAは分光光度計で定量し、RNAの存在を1%アガロースゲル電気泳動で確認した。mRNAの定量はリアルタイムPCR法を用いた。

蛋白質の検出は、ウェスタンブロット法を用いた。

血清トリグリセリド値は、マウス尾静脈より血液を採取して、トリグリセリドE-テストワコーを用いて定量した。

リポタンパク質分析は、スカイライトバイオテック株式会社において、HPLCを用いたゲルろ過により、リポタンパク質を分子量によって3画分（VLDL:Very low densityリポタンパク質、LDL:Low densityリポたんぱく質及びHDL:High densityリ

ポタンパク質）に分画して、それぞれのトリグリセリド濃度を定量した。

血清毒性試験としては、酵素法によりAST値、ALT値、BUN値及びCRE値を定量した。

### 3. ApoC-IIIをターゲットとした革新的核酸医薬の有効性及び安全性評価

病理組織解析のために、肝臓組織を採取して、20%ホルマリン緩衝液に浸して固定した後水洗し、パラフィン包埋した。薄切切片（5 μm）を作製して、Carrazzi' s hematoxylin 及び Tissue-Tek eosin を用いてヘマトキシリン染色を行ない、顕微鏡にて観察し、写真撮影した。

#### C. 研究結果

##### 1. ApoC-IIIの発現を効率的に阻害するBNA 搭載アンチセンス分子の設計・探索（小比賀）

ApoC- III mRNA（Accession ID: NM023114）の495塩基から20塩基を標的として20mer型BNA 搭載アンチセンスを4種類設計し、合成した。**A3495S20**（ホスホロチオアート型）、**A3495SL20**（**A3495S20**の両末端付近に2',4'-BNA/LNAで置換し、さらに中央部に天然型DNAを6塩基挟んだ構造）、**A3495SLTC20**（**A3495SL20**の3'末端のGを天然に置換したものであり、TとCのみが2',4'-BNA/LNA化された構造を持つ）と**A3495SNCTC20**（**A3495SLTC20**の2',4'-BNA/LNAを2',4'-BNA<sup>NC</sup>で置換

した構造を有している) である。

2',4'-BNA/LNA を搭載した **A3495SL20** 及び **A3495SLTC20**、2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載した **A3495SNCTC20** についてマウスの肝臓由来細胞に対して 5, 10, 50nM の濃度でトランスフェクションを行った。ApoC-III の mRNA 量は濃度依存的に減少し、いずれも *in vitro* においては高い mRNA 発現抑制効果を示した。2',4'-BNA/LNA を 2',4'-BNA<sup>NC</sup> で置換した場合には若干程度効果の減弱が認められた。

配列長を 13mer に限定して、上述の指針に基づいてアンチセンス分子の設計を行、合成した。

上記 9 種の候補分子に関して、*in vitro* スクリーニングを行ったところ、それぞれ異なる活性を示し、**A3495SL20** を上回るものもいくつか見いだされた。中でも **A346SL13** が最も高い抑制効果を示した。

## 2. ApoC-IIIをターゲットとした BNA 搭載アンチセンスの *in vivo* 機能評価

F2WTD 負荷により、血清中のコレステロール値、TG 値は上昇し (約 150-250 mg/dL)、ヒトの脂質異常症プロフィールに近い組成をもつマウスを作り出すことに成功した。

BNA 搭載抗 ApoC- III アンチセンス (**A3495S20**、**A3495SL20**、**A3495SLTC20**) について、週2回の頻度で計5回、マウス腹腔内より 20 mg/kg/injection の投与量で反復投与を行ったところ、**A3495SL20** に於いて著明な総TG濃度の減少を認めた。特に

トリグリセリドリッチリポタンパク質 (TRLs) のひとつであるVLDL分画において大幅な減少を認、CM、LDL、HDL分画に於いてもTG含量の低下を認めた。一方で**A3495S20**投与に伴う、TGの減少傾向が認められたが、有意ではなかった(図1)。**A3495SL20**投与群においてコレステロール値の著減を認め、投与を重ねるごとに減少率が高くなることを確認した。特にVLDL及びHDLのApoC-III含有リポタンパク質分画での減少率が顕著であった。次いで薬剤投与に付随するVLDL粒子サイズの変化について検討したところ、**A3495SL20**投与群ではTGの絶対量が大きく減少していることに加えて、ピークが右へシフトしていることが認められた。8日目の血清では、生理食塩水投与群及び**A3495S20**投与群に比べて**A3495SL20**投与群のVLDLは有意に粒子サイズが低下した。この現象は、15日目にはさらに顕著に現れた。16日目の解剖後、肝臓の切ApoC-III mRNAの発現量は**A3495SL20**投与群で最も高い遺伝子発現抑制効果が認められた。さらに血清中のApoC-IIIタンパク質の定量を行った結果、**A3495SL20**投与群の血清において約60%のApoC-IIIタンパク質の減少を認めた。**A3495S20**投与群に関しては弱い脂質低下効果に一致して、緩徐な遺伝子発現抑制効果及びタンパク質抑制効果に留まった。

最終日16日目に回収した血液の血清を用いて肝逸脱酵素 (AST、ALT) の測定及び腎機能 (BUN) の測定を行ったところ、

**A3495SL20**投与群においてAST、ALT値共に緩やかな上昇を認めたことから中等度の急性期肝毒性が示唆される。このときBUN値の上昇は認めなかった。

以上の検討から、抗 ApoC-III アンチセンスは、期待した機序で血清 TG 値を低下させ、この脂質低下作用は2',4'-BNA/LNA を搭載することによって飛躍的に上昇することを見出した。一方で、20 mg/kg を5回投与した場合においては血液生化学検査により若干の急性期肝毒性の発現が認められた。

用量-反応性の検討を行うために、週2回の頻度で計5回、腹腔内より1、5、10 mg/kg/injection の投与量で **A3495SL20** (5'-CTGcatggcaCCT-3') の反復投与を行った。実験終了時まで高脂肪食の給餌は継続した。投与量依存的な総TG値及びVLDL-TG値の減少が確認された。VLDLの粒子径が投与量依存的にその粒子径が小型化していくことを確認し、前節の検討結果に準ずる結果を得た。投与開始から16日目に回収した肝臓組織中のApoC-III mRNAの発現を測定した結果、概ね投与量依存的な減少傾向が確認された。ApoC-IIIのタンパク質量を血清のウエスタンブロットティングにより評価したところ、用量依存的なApoC-IIIタンパク質の減少が認められ、わずか1 mg/kgの投与量でも約60%の抑制効果を確認した。

下大静脈血を用いて肝逸脱酵素 (AST、ALT) 及び腎毒性マーカーである尿素窒素 (BUN) を測定したところ、AST及びALT

については、生理食塩水群と統計的な有意差は無いものの投与量依存的な上昇が示唆される。BUNの投与量依存的な上昇は認められなかった。これらの知見から **A3495SL20**には弱い急性期肝毒性の惹起作用があるとみられる。

**A346SL13**の薬効を見積もるために、**A346SL13**を尾静脈より7及び21 mg/kgの投与量で単回投与を行った。投与量依存的な良好なTG及びApoC-III mRNAの発現抑制を認め、mRNAは7日後に最も抑制され、TG値については2日後に下限値を示した。血液生化学検査により急性期毒性を評価したところ、7日目において21 mg/kg投与群に毒性の兆候が見出された。以上から、**A346SL13**は脂質を大きく低下させたが、毒性マーカーが上昇してしまう点については更なる改善が要求される。

#### D. 考案

本研究は、ApoC-III 遺伝子をターゲットとして、架橋型人工核酸 (BNA) を用いて、高TG血症、および動脈硬化症に対する新しい治療法を開発することを目的としている。現在、我が国における心筋梗塞患者の約20%は、高TG血症および高LDL血症を示す家族性複合型高脂血症(FCHL)患者が占めると言われている。FCHL患者においては、高LDL血症に対するスタチン治療に主眼が置かれ、スタチンとフィブレートとの併用による副作用誘発の問題から高TG血症に対する十分な治療ができていないのが現状である。本研究の成果によ

り、スタチンとの併用が可能な高TG血症治療薬を提供できるだけでなく、血管壁に対する直接的な抗動脈硬化作用が期待されることから、冠動脈疾患の予防のみならず、動脈硬化巣への積極的な治療が可能になり循環器疾患の予防や治療の分野で大きな貢献が出来ると考えられる。

本年度は架橋型人工核酸(BNA)を用いて、ApoC-IIIを標的とした配列の候補を選定し、*in vitro*スクリーニングを経て*in vivo*スクリーニングおよび毒性試験にて最終的に最適の配列を選定するとともに、さらに標的mRNAと強固に結合し、毒性の低い新たな架橋型人工核酸の設計、合成を行うことを予定していた。本年度の研究により、当初の予定に加えて前倒しにBNA<sup>NC</sup>についての*in vivo*機能評価を終えており、小比賀、斯波、柴田グループの共同研究も有効に行われ、研究は極めて順調に進んでいると言える。

ApoC-IIIの遺伝子発現を効率よく抑制するアンチセンス分子の探索においては、いくつかの優れたアンチセンス分子を探索することに成功した。20merの鎖長を有するアンチセンス分子の薬効を検討した場合には、BNA修飾を一カ所外したA3495SLTC20でも非常に高い効果を保持したことから、修飾の数については更なる検討の余地があるものと考えられた。また、2',4'-BNA/LNAを2',4'-BNA<sup>NC</sup>に置換したA3495SNCTC20の場合には、若干の効果低減を認めた。当グループのこれまでの研究では同一配列でも2',4'-BNA<sup>NC</sup>で修

飾したものが高い効果が高いを示すと言う結果を見いだしており (Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2012, in press)、2',4'-BNA<sup>NC</sup>化アンチセンスに対しては個別に最適化を行う必要性が示唆された。13merでの検討については、配列に応じて大きな優劣差が見いだされる結果となり、配列選択の重要性が明示された。20merと比較した場合には短鎖化が特に優れているという見解は得られなかったが、短鎖アンチセンス分子の方がコスト面や薬物動態面でのアドバンテージがあり、従来型の20merを使用するよりは優先されると考えられる。

ApoC-IIIに対するアンチセンスの*in vivo*機能評価においては、2',4'-BNA/LNA搭載した**A3495SL20**は、非常に鋭敏に血清TG値を抑制し、脂質異常の改善を達成した。さらに生理食塩水投与群ではVLDL分画を見るとVery Large VLDL分画にピークが認められるが、**A3495SL20**投与群ではTGの絶対量が大きく減少していることに加えて、ピークが右へシフトしていることも見いだされた。一般的にリポタンパク質の代謝に関わるLPLは、より大きな粒子径を持つリポタンパク質に対して優先的に作用し、TGの分解を促進することが知られており、アンチセンスによってApoC-IIIの発現抑制を介したLPLの活性化が引き起こされたと考えられる。また対応する粒子径のコレステロール成分を見てみると、ここでも絶対値の減少とともにvery large ~ medium VLDL領域での高率な減少が確認



できる。IIb型高脂血症患者の血清中に存在する大型のVLDL (VLDL-1) は、より小型のVLDL-2やIDLと比べて効率的にヒトのマクロファージに対して脂肪蓄積を行い、泡沫化を促進することが報告されており、本結果はApoC-IIIの阻害薬が抗動脈硬化の方向に働くことを示唆している。

*in vitro*スクリーニングから選択されたアンチセンスのうち**A346SL13**については、単回投与で非常にトリグリセリド低下効果の高いアンチセンス分子であることが見いだされた。一方で、用量依存的な毒性の発現が認められた。

ApoC-IIIに対するアンチセンスの投与に伴う、肝細胞における脂肪変性の減少が認められたことは、治療効果としての血清中のトリグリセリドの大幅な減少と一致する。一方で、投与量の増加に伴って軽微な肉芽腫、細胞浸潤や顆粒変性などといった毒性変化が認められた。これらの毒性については、①標的分子の抑制に起因する毒性か②化合物に起因する毒性が考えられる。①ApoC-IIIの阻害に起因する毒性の可能性については、ApoC-IIIの機能欠損患者が健康でかつ動脈硬化のリスクが低いことやノックアウトマウスが致死性でないことから類推すれば可能性は低いと考えられる。他方でアンチセンス薬剤の場合、②の化合物に起因する毒性はさらにA)配列に起因する毒性とB)特定の化学構造に起因する毒性に大別できる。配列によっては内在の免疫システムを活性化するものや標的以外と結合し、予期せぬ効果を引き

起こすものもある。特定の化学構造とは例えばホスホロチオアート結合やBNAなどの化学構造のことを指す。ホスホロチオアートは、リン酸結合の非架橋の酸素のひとつを硫黄原子に置換した構造を有し、化学的には酸素原子に比べると柔らかく、疎水性の性質を有しており、タンパク質との非特異的な相互作用をしやすいと考えられている。ホスホロチオアートに起因する毒性についてはこれまでに多くの報告がある。また最近では2',4'-BNA/LNAに起因する毒性もいくつか報告されている。これらのことから本検討で観察された毒性の原因としては②の化合物に起因する毒性であることが推測され、特に20merから13merへの鎖長の短縮に伴い、2',4'-BNA/LNAの導入数は減少していることから、配列に起因する毒性であると推測できる。*in vitro*スクリーニングによって、非常に脂質低下効果の極めて高いアンチセンス分子の選択が可能であることを見出したが、今回*in vivo*試験を実施した分子については毒性の発現が見出された。A346SL13の毒性惹起作用が何に起因するかについては現段階では見積もり推定し難いが、両者は鎖長及び2',4'-BNA/LNAの導入数は等しく、可能性としてはアンチセンスの短鎖化に伴う他の標的に結合する確立率 (off-target効果) が高まったことが考えられる。BLAST (Basic Local Alignment Tool) による解析によればマウスの遺伝子及び転写産物中に完全相補配列がA346SL13では約190存在するとされ

る。また20merのA2495SL20の場合においても完全マッチ遺伝子はApoC-III遺伝子のみであるが、部分的に相補鎖形成が可能な遺伝子は数多く存在することになる。現時点では少なくともoff-targetの候補の数に関して言えば副作用を予測する重要な因子である可能性は考えられる。

本検討から、*in vitro*スクリーニングで選択された候補分子の中から、薬効の大きさに加えて低毒性なアンチセンス分子を選出するために*in vivo*スクリーニングを強化する必要があると考えられる。また、off-target効果削減の意味では鎖の長さはある程度の鎖長を保ち、しかも部分マッチでは機能しないように特異性を上げる分子設計の工夫が有効ではないかと考えられる。

#### E. 結論

2',4'-BNA/LNA搭載したアンチセンス(A3495SL20)は、非常に鋭敏に血清TG値を低下させ、マウスの脂質異常の是正、延いては動脈硬化の是正に高い効果を示した。高TG血症の病態解明や治療薬の新たな選択肢になるものと期待される。さらに、研究協力者である小比賀らのグループにより実施された*in vitro*スクリーニングから、高い活性を有すると判断されたアンチセンス分子は*in vivo*でも高い効果を発揮した。今回選択された短鎖アンチセンスの単回投与実験から約2週間アンチセンス効果が持続することが明らかとなり、BNA搭載アンチセンスが長期TG低下特性

を有していることを見出した。一方で、若干の毒性発現も確認された。今後は本知見をもとに、毒性を回避できるアンチセンス分子の分子設計法の確立、*in vitro*に於ける毒性の予測法の確立、*in vivo*で毒性を発現しない配列のセレクションなどが重要となってくると考えられる。

#### 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。

## ApoC-IIIの発現を効率的に阻害する BNA 搭載アンチセンス分子の設計・探索

分担研究者 小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科・教授

本研究では、ApoC-IIIに対する優れたアンチセンス医薬の探索を目的として、糖部架橋型人工核酸 BNA を搭載したアンチセンス分子を設計し、*in vitro*における薬効スクリーニングを進めた。この中で、いくつかの優れた BNA 修飾アンチセンス分子を見いだすことに成功した。さらに開発の中で、鎖長や BNA の修飾位置などの分子デザインに関する重要な知見も得ることが出来た。今後はこれらの知見をもとにより効果的な BNA 搭載アンチセンス分子の設計を進める。

### A. 研究目的

アンチセンス医薬の特許競争が激化する近年において、BNA搭載アンチセンスを医薬品として開発していくためには独自の有効な標的配列を探索することが必要である。また最近ではmRNAに対して高い親和性を示す核酸アナログが多数開発されており、中でも2',4'-BNA/LNAなどの「超高親和性アナログ」は、これまでとは異なった、新しいアンチセンス分子デザイン法を組み合わせることで効果をさらに高めると言われている。具体的には、デンマークのSantaris社は、独自の研究により2',4'-BNA/LNAの場合には従来の5-10-5のgapmerよりも、8-nt程度のギャップ構造を持った長さ13-16merのgapmerが有効であると報告している[69, 109]。これらのことから、

配列の違いによる薬効の違いや鎖長の変化に伴う薬効の変化を検証し、独自に優れたアンチセンスをデザインする必要がある。本研究ではこのような背景からApoC-IIIを効率よく阻害し得るアンチセンス分子の探索を行うこととした。

これまでのアンチセンス研究から、アンチセンスの設計指針がいくつか提案されている。

- ①長さを適正にする
- ②標的RNAの高次構造を考慮する
- ③CpGモチーフを除く
- ④GC含量を適正に保つ

①に関しては、20mer前後の長さが非特異的なハイブリダイゼーションを防ぎ、標的との結合力を保持できる点で最適とされてき

たが、近年開発が進んでいる「高親和性核酸」は、配列を短縮しても結合力は保持できるため短縮化への展開を可能とした。短縮化により分子が小型化し、体内動態などの改善に繋がるのが期待される一方で、標的以外の相補配列の数も増加するためオフターゲット効果に注意が必要である。②については、RNAの高次構造によりアンチセンスの接近が阻害され、速度論的に非常に不利となると考えられている[115, 116]。現在では様々なRNAの高次構造予測プログラムが開発されている。ただし、実際の生体内ではそのコンピュータ予測通りの折り畳み構造を採るかどうかについては不明な場合が多く、このことが予想された一本鎖領域を標的としても必ずしも抑制的に働かないことの一因かもしれない。③非メチル化CとGが隣り合ったCpGモチーフは微生物に多く、体内に取り込まれた場合には免疫刺激作用を示す可能性が示唆されている[119, 120]。ホスホロチオアート化したCpGモチーフも同様の傾向がある[121]。最も簡便な解決策としてはモチーフを取り除くこともしくはメチルシトシンで置換することである。④G及びCは、ハイブリダイゼーションに於ける熱的安定性を担保し、一定の割合を保持するのが効果的である。一方でGが2、3カ所以上連続した場合分子内高次構造を形成する可能性がある[122, 123]。アンチセンスが分子内あるいは分子内で構造をとった場合、標的への結合が不利になったり、それ自体が生物活性を示したりするこ

とが考えられている。このためCG含量には配慮が必要である。

上述の指針は優れたアンチセンス分子を選択するための必要条件に過ぎず、必ずしも有用な分子を設計することが出来る訳ではないが、今回は①～④の指針に即した配列を設計し、その中から有用なアンチセンス分子を探索するために*in vitro*評価系を用いて薬効を評価することとした。

## B. 研究方法

### 1. アンチセンス分子の設計

mRNA 二次構造予測プログラム、mfold を用いて標的 mRNA の二次構造を予測し、その中で一本鎖領域を標的とするアンチセンスを選択した。さらに、CpG モチーフを含まないこと、GC 含量が 50-60%程度で GGG や CCC を含まないこと等の条件を満足する配列を抽出した。

### 2. *In vitro* トランスフェクション実験

$5.0 \times 10^5$  cells/mL に調製した NMuLi 細胞を、1wellあたり 2 mL ずつ 6 ウェル平底マイクロプレート (IWAKI, Cat#3810-006) に播き、37°C にて 5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した。各 13mer アンチセンスが最終濃度 50nM となるように Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat# 11668-027 ) を 14.3μL 及び Opti-MEM (Invitrogen, Cat#31985-070) を 425.7μL 混合し、室温にて 20 分間静置し、このうち 500μL と Opti-MEM 1500μL を各ウェルに添加した。オリゴヌクレオチドを添加して 4 時間後に

培地を交換した。さらに20時間後に細胞を回収し、解析に用いた。

### 3. 細胞からのmRNA抽出

TRIzol Reagent (Invitrogen, Cat#15596018) を用いて細胞より Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA を分光光度計で定量し、RNA の存在を1%アガロースゲル電気泳動で確認した。

### 4. Realtime RT-PCR解析

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いて Total RNA 10 $\mu$ g から cDNA を作製した。得られた cDNA を用いてリアルタイムPCRを行い、ApoC-III の mRNA 量を定量した。リアルタイムPCRでは、ハウスキューピング遺伝子の GAPDH の mRNA 量も同時に定量し、GAPDH の mRNA 量に対する PCSK9 の mRNA 量を評価した。使用した TaqMan Gene Expression ID を示した ; Mm00445670 m1 (apoc3) , Mm99999915 m1 (gapdh) 。

## C. 研究結果

### 1. 配列設計 (1)

抗ApoC-IIIアンチセンスに対するBNA修飾の効果を検討するために、まず、20mer型BNA搭載アンチセンスを設計した。今回用いた配列は、ApoC-III mRNA (Accession ID: NM 023114) の495塩基から20塩基を標的と

しており、3'UTR (untranslated region) 領域に位置する。本研究では表に示した4種類の配列を設計、合成した (Table 1)。**A3495S20** は、すべて天然のDNAで骨格はホスホロチオアート型の20merのアンチセンス分子である。**A3495SL20**は、**A3495S20**の両末端付近に2',4'-BNA/LNAで置換し、さらに中央部に天然型DNAを6塩基挟んだ構造を有する。**A3495SLTC20**は、**A3495SL20**の3'末端のGを天然に置換したものであり、TとCのみが2',4'-BNA/LNA化された構造を持つ。**A3495SNCTC20** は、**A3495SLTC20** の2',4'-BNA/LNAを2',4'-BNA<sup>NC</sup>で置換した構造を有している。

### 2. *in vitro* トランスフェクションアッセイ (1)

2',4'-BNA/LNA を搭載した **A3495SL20** 及び **A3495SLTC20**、2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載した **A3495SNCTC20** についてマウスの肝臓由来細胞に対して 5, 10, 50nM の濃度でトランスフェクションを行った。ApoC-III の mRNA 量は濃度依存的に減少し、いずれも *in vitro* においては高い mRNA 発現抑制効果を示した (Figure 1)。2',4'-BNA/LNA を 2',4'-BNA<sup>NC</sup> で置換した場合には若干程度効果の減弱が認められた。

### 3. 配列設計 (2)

近年、2',4'-BNA/LNA をもちいたアンチセンスは従来型の 20mer よりも 13mer の短鎖アンチセンスの方が効果的であるという報告がなされている (*Nucleic Acids Res.*, **2010**,

38, 7100)。本研究ではさらに高い効果を追求し、配列長を 13mer に限定して、上述の指針に基づいてアンチセンス分子の設計を試みた。すなわち、mfold プログラムを用いて標的 mRNA の二次構造を予測し、一本鎖領域を狙うこと、CpG モチーフを含まないこと、GC 含量が 50-60%程度で GGG や CCC を含まないこと等の条件を満足する配列を合計 9 本用意した (Table 2)。

#### 4. *in vitro* トランスフェクションアッセイ (2)

上記 9 種の候補分子に関して、*in vitro* スクリーニングを行い、有効なアンチセンス分子を選択することとした。先述の **A3495SL20** を含む 10 本についてマウス肝臓由来細胞である NMuLi 細胞に対して 50 nM の濃度でトランスフェクションを行い、24 時間後に細胞を回収し、ApoC-III mRNA を定量した。各アンチセンス分子はそれぞれ異なる活性を示し、**A3495SL20** を上回るものもいくつか見いだされた (Figure 2)。中でも **A346SL13** が最も高い抑制効果を示した。

#### D. 考案

本研究では ApoC-III の遺伝子発現を効率よく抑制するアンチセンス分子の探索を主目的とし、いくつかの優れたアンチセンス分子を探索することに成功した。20mer の鎖長を有するアンチセンス分子の薬効を検討した場合には、BNA 修飾を一カ所外した **A3495SLTC20** でも非常に高い効果を

保持したことから、修飾の数については更なる検討の余地があるものと考えられる。また、2',4'-BNA/LNA を 2',4'-BNA<sup>NC</sup> に置換した **A3495SNCTC20** の場合には、若干の効果低減を認めた。当グループのこれまでの研究では同一配列でも 2',4'-BNA<sup>NC</sup> で修飾したものが効果が高いという結果を見いだしており (*Molecular Therapy-Nucleic Acids*, **2012**, *in press*)、2',4'-BNA<sup>NC</sup> 化アンチセンスに対しては個別に最適化を行う必要性が示唆された。13mer での検討については、配列に応じて大きな優劣差が見いだされる結果となり、配列選択の重要性が明示された。20mer と比較した場合には短鎖化が特に優れているという見解は得られなかったが、医薬品化の観点から言えば、短鎖アンチセンス分子の方がコスト面や薬物動態面でのアドバンテージがあり、従来型の 20mer を使用するよりは優先される。

#### E. 結論

本研究では、優れたアンチセンス分子の探索を目的として、BNA 技術をもちいた様々な鎖長や配置位置を変えたアンチセンス分子を設計、薬効評価を進めた。いくつかの優れた BNA 修飾アンチセンス分子を見いだすと同時に、分子デザインに関する重要な知見を得た。今後は、ここで選ばれたアンチセンス分子を用いて治療効果の検討を進める一方で、さらにここで得られた知見をもとにより効果的な BNA 搭載アンチセンス分子の設計を進めていく。

## 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. Torigoe H, Nakagawa O, Imanishi T, Obika S, Sasaki K, Chemical Modification of Triplex-forming Oligonucleotide to Promote Pyrimidine Motif Triplex Formation at Physiological pH, *Biochimie*, 94, 1032–1040, 2012.
2. Ito K. R, Kodama T, Makimura F, Hosoki N, Osaki T, Orita A, Imanishi T, Obika S, Cleavage of Oligonucleotides Containing a P3'→N5' Phosphoramidate Linkage Mediated by Single-stranded Oligonucleotide Templates. *Molecules*, 16, 10695-10708, 2011.
3. Mori K, Kodama T, Obika S, Design, Synthesis and Properties of Boat-shaped Glucopyranosyl Nucleic Acid. *Org. Lett.*, 13, 6050-6053, 2011.
4. Shrestha A. R, Hari Y, Yahara A, Osawa T, Obika S, Synthesis and Properties of a Bridged Nucleic Acid with a Perhydro-1,2-oxazin-3-one Ring. *J. Org.*

*Chem.*, 76, 9891-9899,2011.

5. Morihiro K, Kodama T, Obika S, Benzylidene Acetal-Type Bridged Nucleic Acids: Changes in Properties Upon Cleavage of the Bridge Triggered by External Stimuli. *Chem. Eur. J.*, 17, 7918-7926,2011.
  6. Mori K, Kodama T, Baba T, Obika S, Bridged Nucleic Acid Conjugates at 6'-Thiol: Synthesis, Hybridization Properties and Nuclease Resistances. *Org. Biomol. Chem.*, 9, 5272-5279,2011.
  7. 小比賀 聡, 糖部架橋型核酸の医薬への応用, *医薬ジャーナル*, 48, 65-69,2012.
- ### 2. 学会発表
1. 小比賀 聡 : 人工核酸の開発とその応用 -核酸医薬・診断薬の創出に向けて-, RNA研究会 (先端創薬医療シンポジウム), 2012年1月31日, 岐阜
  2. Obika S: Development of Nucleic Acid Analogues for Antisense Strategy, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11) Frontier of Medicinal Science, 2011年11月30日, 東京
  3. 小比賀 聡: 核酸医薬・診断薬創出に向けた人工核酸の開発, 創薬フォーラム・若手シンポジウム, 2011年11

月 19 日, 京都

4. 小比賀 聡: 次世代医療に向けた核酸  
医薬の最前線 —DNA をくすりにす  
る最新技術—, サイエンス・ライブ・  
チケット, 2011 年 11 月 18 日, 神戸
5. Obika S: Synthesis and Properties of  
External Stimulus-Responsive Bridged  
Nucleic Acids, The NAC  
mini-symposium - Nucleic Acid  
Chemical Biology anno 2011, 2011 年 6  
月 16 日, Denmark



Table 1 本研究で用いた 20mer 型アンチセンス分子の配列名及び配列

	Sequence ID	Sequence
1	A3495S20	5'-tcttatccagctttattagg-3'
2	A3495SL20	5'-TCtTaTCcagcttTaTTaGg-3'
3	A3495SLTC20	5'-TCtTaTCcagcttTaTTagg-3'
4	A3495SNCTC20	5'-T <sup>N</sup> C <sup>N</sup> tT <sup>N</sup> aT <sup>N</sup> C <sup>N</sup> cagcttT <sup>N</sup> aT <sup>N</sup> T <sup>N</sup> agg-3'

Oligonucleotides with 2',4'-BNA/LNA (upper case), 2',4'-BNA<sup>NC</sup> (capital with superscript N) and DNA (lower case letters). All internucleotide linkages are phosphorothioated.

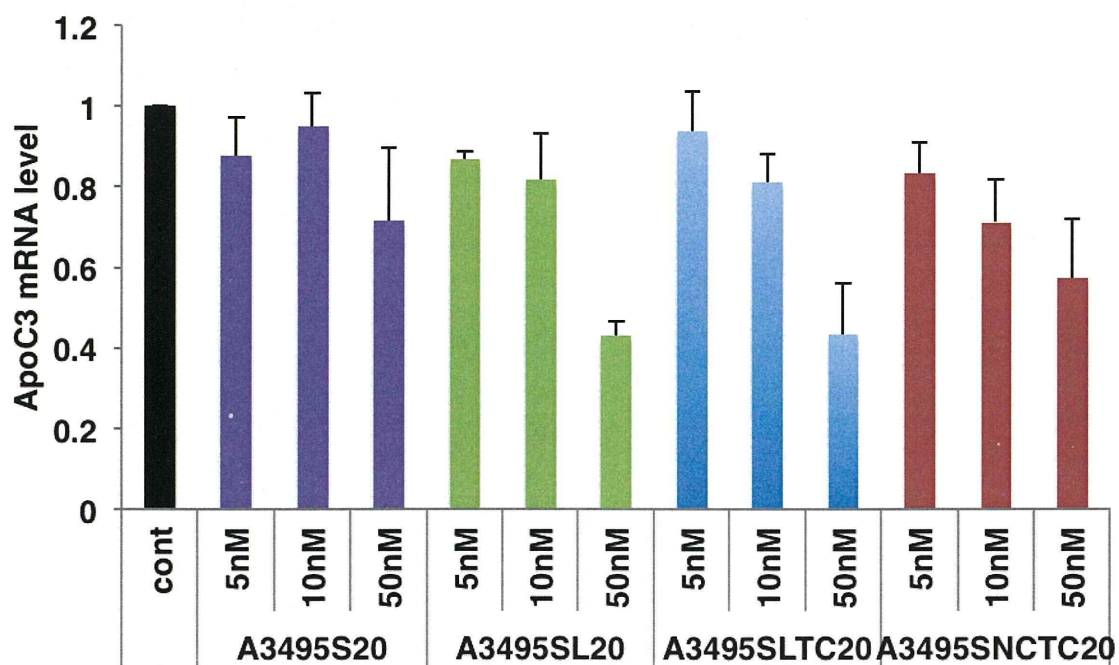


Figure 1 20mer 型アンチセンス分子の *in vitro* 活性

Table 2 本研究で用いた 13mer 型アンチセンス分子

	Sequence ID	Sequence
1	A3498SL13	5'-ATCcagctttATT-3'
2	A346SL13	5'-CTGcatggcaCCT-3'
3	A343SL13	5'-CATggcacctACG-3'
4	A397SL13	5'-TCGggcagatGCC-3'
5	A3150SL13	5'-TCCatgtagcCCT-3'
6	A3164SL13	5'-TCTtggaggcTTG-3'
7	A3265SL13	5'-GCTccagtagCCT-3'
8	A3424SL13	5'-TTAaagcaacCTT-3'
9	A3508SL13	5'-GCAgcttcttATC-3'

Oligonucleotides with 2',4'-BNA/LNA (upper case) and DNA (lower case). All internucleotide linkages are phosphorothioated.

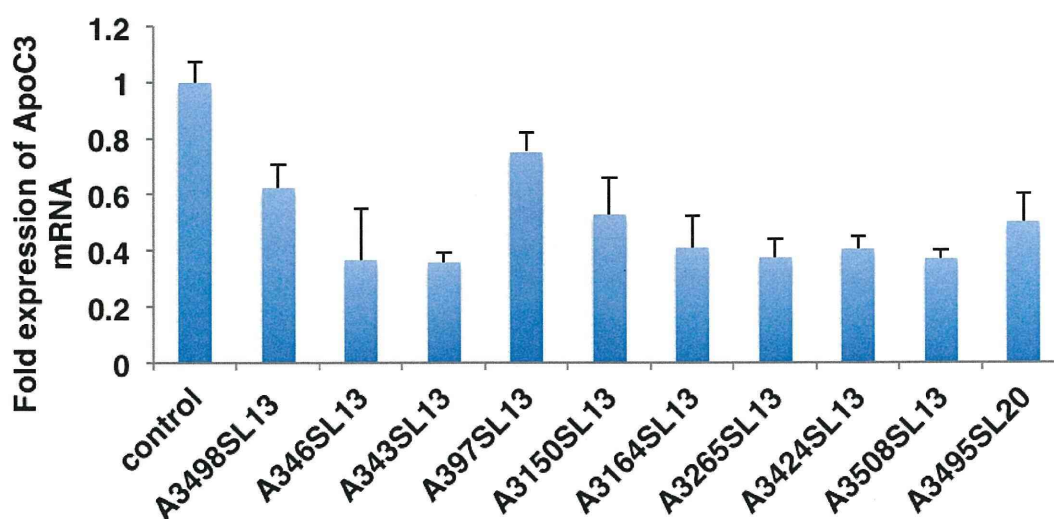


Figure 2 13mer 型アンチセンス分子の *in vitro* 活性 (Transfected at 50 nM each)

**ApoC-IIIをターゲットとしたBNA搭載アンチセンスの *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・特任部長

研究要旨

トリグリセリドに富むリポタンパク質の産生亢進やクリアランスの低下によって引き起こされる高トリグリセリド血症の治療を目指し、本研究では原因因子としての「ApoC-III」の発現をBNA搭載アンチセンスを用いて選択的に阻害することを試みた。2',4'-BNA/LNAを搭載したアンチセンス分子を脂質異常マウスに対して投与した場合、鋭敏に血清トリグリセリド値を抑制し、中でもトリグリセリドに富む大型のリポタンパク質の低下を達成した。本結果は、ApoC-IIIの阻害薬が脂質異常症の改善のみならず、抗動脈硬化的に作用することを示唆している。他方で、より優れたBNA搭載アンチセンスの開発を目的として実施された*in vitro*スクリーニングから選ばれてきた開発候補化合物を*in vivo*にて評価したところ、単回投与で約40%ものトリグリセリドの低下を認め、非常に高い活性が見いだされた。

A. 研究目的

多数の疫学調査により高トリグリセリド (TG) 血症単独で冠動脈疾患の危険因子となることが示唆されている。動脈硬化薬には TG に富むリポタンパク質 (TG-rich lipoproteins: TRLs) である CM、VLDL 及びそれらのレムナント (TRLs remnant lipoprotein: TRLs remnant) の存在が確認され、直接的に動脈硬化の進展を促すと考えられている。またインスリン抵抗性や肥満、糖尿病等のメタボリックシンドロームには高頻度に脂質異常症を合併することが知られ

ている。例えば 2 型糖尿病患者では、インスリン抵抗性の亢進により脂肪組織に於ける脂肪の異化亢進や TRLs の産生亢進とクリアランスの低下が引き起こされ、結果として高 TG 血症を呈すると考えられている。その他、高 TG 血症状態では動脈硬化形成に促進的に働く LDL の小型化 (small dense LDL, sdLDL) 及び低 HDL-C 血症を促進することも知られている。このように TRLs の産生亢進やクリアランスの低下によって引き起こされた高 TG 血症は直接及び間接的に動脈硬化を促進すると考えられ、TG の是正

は動脈硬化の進展の抑制あるいは縮退に対して有意義であると考えられている。

TRLsのクリアランスを促進する最も重要な酵素の一つは血管内壁上に存在するLipoprotein lipase (LPL)である。この酵素の不活性化にはCM、VLDLやHDL上に存在するApolipoprotein C-III (ApoC-III)が大きな役割を担っている。ApoC-IIIは79アミノ酸からなる糖タンパク質であり、主に肝臓や小腸で合成され、ヒトやマウスに於いてはトリグリセリドの代謝を制御していることが知られている。ApoC-IIIはLPL活性の阻害や、ApoBやApoEを介したTRLsとLDL受容体との相互作用の阻害、あるいはCMとLipolysis-stimulated receptor (LSR)との相互作用の阻害によってTRLsの血中貯留を促すと考えられている。また血管内皮や単球などに作用し、血管内皮表面で炎症を惹起している可能性も示唆され、動脈硬化巣への直接的な作用も証明されつつある。さらに多数の大規模臨床試験において血中ApoC-III濃度が冠動脈疾患の危険因子であること、ApoC-IIIに機能喪失変異を有する患者においてはTGやLDL-Cが低く、HDL-Cが高いことやApoC-IIIに機能獲得がある患者ではTGが高く、非アルコール性脂肪肝が見られることなどが示され、薬剤標的としても注目を集めている。

血中ApoC-IIIを低下させる医薬としてはスタチン、フィブラートやナイアシン等が挙げられるが、いずれもApoC-IIIを低下させるメカニズムが十分に理解されておらず、標的選択性に問題がある。そこで本研究で

は、BNA搭載アンチセンスを用いて選択的にApoC-IIIを阻害することにより、血清脂質がどのような表現型をとり、脂質異常症治療薬として有効であるかどうか評価することとした。

## B. 研究方法

### 1. 高トリグリセリド (TG) 血症モデルマウスの作成

マウスにおいて高TG血症状態を作り出すために高脂肪、高ショ糖、高カロリーを特徴としたF2WTD (オリエンタル酵母工業) を利用することとした。

### 2. アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製

2',4'-BNA/LNAあるいは2',4'-BNA<sup>NC</sup>の2種の人工核酸で部分的に修飾されたホスホロチオアート型のアンチセンスを設計した(表1)。2',4'-BNA<sup>NC</sup>のアミダイトユニットは株式会社BNAから購入した。2',4'-BNA/LNAあるいは2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したホスホロチオアート型オリゴヌクレオチドは株式会社ジーンデザインより購入した。オリゴヌクレオチドの合成は一般的なホスホロアミダイト法により行われ、生成物は無菌条件下で注意深く取り扱われ精製された。全ての製品はエンドトキシンフリーや低残塩量が保証されており、*in vivo*での使用に適した状態で提供されている。

### 3. 反復投与試験

被験動物として6週齢のマウスC57BL/6J (♂:日本クレア) を各投与群で例数5匹とな