

るように準備した。3週間の高脂肪食F2WTD（オリエンタル酵母工業株式会社）負荷の後、アンチセンスを1週間で2回全5回、腹腔内投与を行った。3回目及び5回目の投与翌日に尾静脈より絶食下採血を行なった。16日目にマウスを麻酔後、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た。使用まで -80°C で保存した。

4. 肝臓からのmRNA抽出

凍結した肝臓の切片を1mLのTRIzol Regent (Invitrogen, Cat#15596018) 内でホモジナイズし、クロロホルム200 μL を加えた後、13,200rpm、 4°C にて15分間遠心した。上清220 μL をイソプロパノール400 μL に添加して転倒混和し、13,200rpm、 4°C にて15分間遠心した後、イソプロパノールを除去した。次いで、75%エタノール800 μL を加えた後、13,200rpm、 4°C にて5分間遠心した。Total RNAを含む沈殿をRNaseフリー水(Water, DEPC treated, RNase tested;ナカライテスク)80 μL に溶解した。抽出した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。

5. Realtime RT-PCR解析

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いてTotal RNA10 μg 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、ハウスキーパー遺伝子の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) 。

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) 。

6. ウェスタンブロッティング

凍結肝臓切片に対して500 μL のプロテアーゼ阻害剤入りのRIPAバッファー (SIGMA, Cat#R0278-50ML, Roche, Cat# 1183615301) を加え、TissueLyser II (Qiagen) を持ちいて破碎した。本懸濁液を10,000rpm、3分間冷却遠心し、上清を回収した後、BIO RAD DC Protein Assay (BIO-RAD社製) を用いてタンパク質定量を行なった。Tris-Glycine Gel (4-20%) (Invitrogen, Cat#EC6025BOX) の各レーンにタンパク質量10 μg ずつアプライし、180Vにて60分間電気泳動した。Immun-Blot[®] PVDF Membrane (Biorad, Cat#162-0177) を用いて200mAにて120分間ブロッティングを行ない、次いでBlocking one (ナカライテスク, Cat#05999-84) を用いて1時間ブロッキングを行なった。得られたメンブレンに対して抗マウスApoC-III抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-50378) 、抗 β -actin (Cell signalings, Cat#4967) を反応させた後、二次抗体として抗ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-2004) を反応させた。次いで、ECL prime (GE healthcare, Cat#RPN2232) を用いてメンブレンを発色させ、発色量をイメージャー (Fujifilm, Cat#LAS 4000mini) で定量した。

7. 血清トリグリセリド値の測定

マウス尾静脈より血液を採取して、室温にて20分間静置した後、5000rpm、4°Cにて20分間遠心して血清を分離した。それぞれの血清について、トリグリセリドE-テストワコー(和光純薬工業株式会社, Cat#432-40201)を用いて血清総トリグリセリド値を定量した。血清10 μ Lに発色試液を1.5mL加えて37°Cにて5分間加温し、分光光度計を用いて600nmの吸光度を測定した。標準試薬による検量線を用いて値を算出した。

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。

8. 血液生化学検査

アンチセンス投与後のマウス血清を用いて、AST値、ALT値、BUN値及びCRE値を定量した。AST値及びALT値は、トランスアミナーゼCII-テストワコー (WAKO, Cat#464-43101, Cat#4460-43201) を用いて定量した。血清10 μ LにAST値測定用またはALT値測定用基質酵素液250 μ Lを加えて37°Cにて5分間加温し、発色試液250 μ Lを加えて37°Cにて20分間加温した。次いで、反応停止液1mLを加えた後、分光光度計を用いて555nmの吸光度を測定した。標準試薬による検量線を用いて各値を算出した。BUN値

(WAKO, Cat#279-36201) は、血清10 μ Lに発色試液A 1mLを加えて37°Cにて15分間加温し、発色試液B 1mLを加えて37°Cにて10分間加温後、分光光度計を用いて570nmの吸光度を測定した。標準試薬による検量線を用いて値を算出した。CRE値 (WAKO, Cat#410-39891) は、血清5 μ Lに酵素発色試液A 300 μ Lを加えて37°Cにて5分間加温し、発色試液B 100 μ Lを加えて37°Cにて5分間加温後、分光光度計を用いて600nmの吸光度を測定した。標準試薬による検量線を用いて値を算出した。

9. 単回投与実験

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匹となるように準備した。負荷の後、0日目に採血して、アンチセンスを静脈内より単回投与した (3-35mg/kg)。投与後2、7、16及び21日目に絶食下尾静脈より採血し、ジエチルエーテルで麻酔後、PBSで下大静脈より灌流し、肝臓を採取、PBSで洗浄した後、細切し、液体窒素で瞬間凍結した後、-80°Cにて保存した。

10. 統計処理

薬効評価試験は各群 3-7 匹で行い、有意差の評価についてはスチューデントの t 検定を用いて行った。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、国立循環器病研究センター研究所の動物実験委員会の承認を得た上で、規律に従い、動物愛護の精神を持って施行した。

C. 研究結果

1. 高トリグリセリド (TG) 血症モデルマウスの検討

豊富な動物性の油脂や炭水化物を特徴とする F2WTD (オリエンタル酵母工業株式会社) をマウスに対して約 2 週間負荷した場合、血清中のコレステロール値上昇は緩やかであるが有意な上昇を示し、同時に血清の総 TG 濃度は普通食マウスに比較して飛躍的に上昇した(約 150-250mg/dL)。この時、特に脂質の豊富なリポタンパク質 (triglyceride-rich lipoproteins, TRLs) である VLDL 分画中の TG 濃度の上昇が認められた。F2WTD 負荷によってヒトの脂質プロフィールに非常に近い組成をもつマウスを作り出すことに成功した。

2. 2',4'-BNA/LNA搭載抗ApoC-IIIアンチセンスの薬効解析

BNA 搭載抗 ApoC- III アンチセンス (A3495S20、A3495SL20、A3495SLTC20) が高脂血症マウスで薬効を示し得るかどうかを検討するために、6週齢のC57BL/6Jの雄マウスに対して2週間高脂肪食負荷を行い、その後週2回の頻度で計5回、腹腔内より 20mg/kg/injectionの投与量でアンチセンスの反復投与を行った。実験終了時まで高脂肪食の給餌を継続した。試験群は全3群で、生

理食塩水投与群、A3495S20投与群、A3495SL20投与群とし、例数は各群5匹とした。採血は絶食下投与前と3回目投与後と最終5回目投与後の計3回行った。初回投与から16日後にマウスを屠殺し、全血の採血及び肝臓の摘出を行った。投与前後で群間に体重の差は認められず、摂食や摂水障害なども観察されなかった。続いて8日目及び15日目に於ける血清のTG濃度を測定したところ、A3495SL20に於いて著明な総TG濃度の減少を認めた(図1)。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めた。その他、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、統計的に有意とは言えなかった(図1)。また血清サンプルにおけるコレステロール含量を測定した結果、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(data not shown)。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。VLDL中の脂質成分の多くがTGであり、総TGあるいはVLDL-TGの減少に起因する粒子サイズへの影響が考えられた。図2は、VLDL及びLDLについて粒子径の大きなものを左端として横軸方向に分類し、各サイズ領域に含まれるTG含量を縦軸とした頻度分布図である。図2bは対応するコレステロール分布であ

る。図2 aの生理食塩水投与群のVLDL分画を見るとVery Large VLDL分画にピークが認められる。これはVery Large VLDL分画が最もTGを多く保持していることを示している。一方で**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。実際の粒子径については8日目の血清では、生理食塩水投与群及び**A3495S20**投与群に於けるVLDLの粒子サイズが $\phi = 43.96 \pm 1.34$ nm及び $\phi = 42.78 \pm 0.55$ nmと見積もられたのに対して**A3495SL20**投与群のVLDLサイズは $\phi = 33.00 \pm 4.16$ nmと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、生理食塩水投与群及び**A3495S20**投与群に於けるVLDLの粒子サイズが $\phi = 44.74 \pm 1.41$ nm及び $\phi = 42.13 \pm 1.47$ nmと見積もられたのに対して**A3495SL20**投与群ではVLDLの粒子径 ($\phi = 30-80$ nm) 領域にピークが認められなかった。15日目の血清の総TG値を投与前値で規格化した場合の相対TG値を図3 aに示した。図1 bと同様に、**A3495SL20**投与群で減少率が約88%の有意な減少を認めた。16日目の解剖後、肝臓の切片からRNAを抽出し、cDNA化した後、定量的PCRを行った。投与後の肝臓でのApoC-III mRNAの発現量を図3 bに示した。**A3495SL20**投与群で最も高い遺伝子発現抑制効果が認められた (抑制率 $\approx 72\%$)。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 (図3 c)、この結果は図3 a及びbに完全

に符合する。**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。

また急性期毒性の評価を行った。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) の測定を行った結果を図4に示した。**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、20mg/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。

3. **A3495SL20**の用量-作用関係の検討

続いて用量-反応性の検討を行うために、6週齢のC57BL/6Jの雄マウスに対して2週間高脂肪食 (F2WTD) 負荷を行い、その後、週2回の頻度で計5回、腹腔内より1、5、10mg/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。試験群は生理食塩水投与群及び**A3495SL20**投与群 (3群) の計4群、例数は各群5匹とした。採血は絶食下投与前と3回目投与後と最終5回目投与後の計3回行った。初回投与か

ら16日後にマウスを屠殺し、全血の採血、肝臓の摘出を行った。処置に起因する平均体重の差は生じなかった。図5には投与開始から8日目及び15日目の血清TG値を示した。両日共に投与量依存的な総TG値及びVLDL-TG値の減少が確認された。ここでも血清中における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 (data not shown)。また、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 (図6 a)。さらに下大静脈血の血清を用いてApoC-IIIのタンパク質量をウエスタンブロッティングにより評価した。結果を図6 cに示した。用量依存的なApoC-IIIタンパク質の減少が認められ、わずか1mg/kgの投与量でも約60%の抑制効果を確認した。

続いて投与に伴う急性期毒性について解析を行った。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 (図3 d)。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。

4. 短鎖型アンチセンス、**A346SL13**、の*in vivo* 薬効の評価

A346SL13の薬効を見積もるために、6週齢のC57BL/6Jの雄マウスに対して2週間高脂肪食 (F2WTD) 負荷を行い、その後、**A346SL13**を尾静脈より7及び21mg/kgの投与量で単回投与を行った。実験終了時まで高脂肪食の給餌は継続した。例数は各群3匹とした。各群2日後及び7日後 (7日後は21mg/kg投与群のみ実施) に屠殺し、臓器を回収した。図7に血清TG値の相対値及びApoC-III mRNAの経時変化を示した。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21mg/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に対するBNA搭載アンチセンスの有効性を評価すると同時に、設計したいくつかのアンチセンス分子の*in vivo*における機能を評価することを主目的としている。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(図2b)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**についてアッセイしたところ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。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

(欧文)

- 1) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Narukawa K, Sasaki K, Shibata M.A, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S: Cholesterol-Lowering Action of BNA-based Antisense Oligonucleotides Targeting PCSK9 in Atherogenic Diet-Induced Hypercholesterolemic Mice: Molecular Therapy Nucleic Acid, in press
- 2) Uchida S, Itaka K, Chen Q, Osada K,

- Ishii T, Shibata M, Harada-Shiba M, Kataoka K: PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses: Molecular Therapy, in press
- 3) Sugisawa T, Okamura T, Makino H, Watanabe M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Iwamoto N, Yamamoto A, Yokoyama S, Harada-Shiba M: Defining patients at extremely high risk for coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19,4 : 369-375, 2012.
- 4) Yokoyama S, Yamashita S, Ishibashi S, Sone H, Oikawa S, Shirai K, Ohta T, Bujo H, Kobayashi J, Arai H, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Gotoda T, Suzuki H, Yamada N: Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19,3: 207-212, 2012.
- 5) Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, Bujo H, Ishibashi S, Arai H, Yamashita S, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Sone H, Suzuki H, Yamada N: Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19: 1-12, 2012.
- 6) Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yokoyama S, Oikawa S, Kobayashi J, Shirai K, Ota T, Yamashita S, Gotoda T, Harada-Shiba M, Sone H, Eto M, Suzuki H, Yamada N: Management of type IIb dyslipidemia. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19: 105-114, 2012.
- 7) Uchida S, Itaka K, Chen Q, Osada K, Miyata K, Ishii T, Harada-Shiba M, Kataoka K: Combination of chondroitin sulfate and polyplex micelles from Poly(ethylene glycol)-poly{N¹-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} block copolymer for prolonged in vivo gene transfection with reduced toxicity: J Control Release, 2011 Oct 30; 155(2): 296-302. Epub 2011 May 5
- (和文) なし
1. 総説
 欧文 なし
 和文
- 1) 斯波真理子: 高 LDL コレステロール血症, CURRENT THERAPY Vol.30 No.3: 33-38,2012.3
- 2) 斯波真理子: LDL アフェレシスの適応の是非—日本と世界の違い—, 月刊循環器 CIRCULATION 第 2 巻 第 3 号:92-99,2012.3.
- 3) 岩本紀之, 斯波真理子: 脂質異常症に

対するアフェレシス治療の現況, 臨牀透析 第 27 卷 第 12 号: 23-28 (1555-1560), 2011.

- 4) 斯波真理子: 脂質異常症の病態と治療 家族性高コレステロール血症, 臨牀と研究 第 88 卷 第 10 号 :45-49 (1263-1267) ,2011.
- 5) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症の診断と治療, 日本医師会雑誌 第 140 卷 第 6 号: 1247-1250, 2011.
- 6) 斯波真理子: 動脈硬化症例 Q&A 妊娠を合併した家族性高コレステロール血症ホモ接合体例, News and Scope No.4: 9-10,2011.
- 7) 斯波真理子: 実地医家による診断を視野に家族性高コレステロール血症 GL 作成 , Medical Tribune Vol.44 No.35:27,2011.
- 8) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症の治療指針と実態, Medical Tribune circulation today 2011 8 62,2011.
- 9) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症をどのように診るか?, Heart View Vol.15 No.9:32-37,2011.
- 10) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症をどう扱うか, medicina Vol.48 No.5: 837-841, 2011.
- 11) 斯波真理子: 原発性高脂血症の治療, 脂質異常症診療 Q&A: 91-98, 2011

2. 著書

- 1) Shibata M, Morimoto J, Shibata E,

Harada-Shiba M, Fujioka S, Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Combination of Anti-VEGF-C and Enhanced IL-12 Therapy in an Immunocompetent Mouse Mammary Cancer Model, edited by Esra Gunduz and Mehmet Gunduz, Breast Cancer-Current and Alternative Therapeutic Modalities, In Tech, 489-502, 2011

- 2) Iwamoto N, Harada-Shiba M, Intratracheal Gene Transfer Using Polyplex Nanomicelles and Their Application to Cardiology, Nanomedicine and the Cardiovascular System, editors Ross J. Hunter, Victor R. Preedy, Nanomedicine and the Cardiovascular System, Science Publishers, 284-302, 2011

学会発表

(国内)

- 1) 湯浅由美子, 槇野久士, 岩本紀之, 尾崎司, 南野直人, 柳光司, 宇佐美眞, 斯波真理子, FH 患者の LDL-A 治療で除去される動脈硬化危険因子の検討, 第 32 回日本アフェレシス学会学術大会, 2011 年 9 月 30 日 ~10 月 2 日, 東京
- 2) 小川浩司, 西垣孝行, 四井田英樹, 高橋裕三, 吉田幸太郎, 中崎宏則, 藤井順也, 守田佳保里, 林輝行, 中谷理恵子, 岩本紀之, 槇野久士, 斯波真理子, LDL-Apheresis 施行中の血圧低下に関する当院における対応, 第 32 回日本アフェレシス学会

- 学術大会, 2011年9月30日~10月2日, 東京
- 3) 槇野久士, 岩本紀之, 斯波真理子, FH 治療における LDL アフェレシス治療の適応と限界, 第 32 回日本アフェレシス学会学術大会, 2011年9月30日~10月2日, 東京
 - 4) 柴田映子, Carlos Agudelo, 井上麻衣, 森本めぐむ, 宮田完二郎, 位高啓史, 西山伸宏, 石井武彦, 西川元也, 高倉喜信, 柴田雅朗, 片岡一則, 斯波真理子, 嚢胞性線維症モデル動物への経肺遺伝子導入, アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011, ポスター発表, 2011年9月1日~2日, 大阪
 - 5) 和田俊輔, 山本剛史, 中谷萌夏, 山岡哲二, 鳥越秀峰, 小比賀聡, 斯波真理子, 化学修飾型 siRNA が in vivo において及ぼす影響, アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011, ポスター発表, 2011年9月1日~2日, 大阪
 - 6) 中谷萌夏, 斯波真理子, 山本剛史, 和田俊輔, 安原秀典, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 生川径祐, 小比賀聡, 次世代型 BNA を用いた抗 PCSK9 アンチセンス医薬の開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011, ポスター発表, 2011年9月1日~2日, 大阪
 - 7) Harada-Shiba M, Development of Nucleic Acid Durg for Dyslipidemia Using 2',4'-Control HDL in Vivo, 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, Plenary Session 2(H), 2011年8月3日~4日, 神奈川
 - 8) Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Ogawa K, Hattori H, Harada-Shiba M, Development of sandwich ELISA for Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日~16日, 北海道
 - 9) Asada T, Ishihara M, Iwasaki T, Kodama M, Fujiwara A, Murakami M, Yoshida R, Toyomasa T, Ohta N, Sano T, Sano M, Harada-Shiba M, Serum PCSK9 levels in familial hypercholesterolemia (FH) patients, 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日~16日, 北海道
 - 10) Iwamoto N, Makino H, Nakatani R, Suzuki Y, Iwamiya T, Kamiya C, Katsuragi S, Ikeda T, Kishimoto I, Harada-Shiba M, Management of pregnancy and delivery in homozygous familial hypercholesterolemia, 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日~16日, 北海道
 - 11) Ohta N, Miyamoto Y, Makino H, Iwamoto N, Fujino M, Fujiyama H,

- Ishihara M, Sano T, Sano M, Harada-Shiba M, Clinical characteristics of familial hypercholesterolemia with mutation in PCSK9 gene, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日～16日, 北海道
- 12) Yuasa Y, Iwamoto N, Makino H, Osaki T, Minamide N, Usami M, Harada-Shiba M, Change of serum levels in patients of substances removed by LDL-Apheresis(LDL-A)treatment, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日～16日, 北海道
- 13) Wada S, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Shibata E, Inoue M, Morimoto M, Obika S, Harada-Shiba M, Therapeutic effects of each modification in siRNA for dyslipidemia, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011年7月15日～16日, 北海道
- 14) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Narukawa K, Sasaki K, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S, BNA Therapy for Hypercholesterolemia, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, Panel Discussion 2, 2011年7月15日～16日, 北海道
- 15) Makino H, Harada-Shiba M, Long-term effect of LDL-apheresis in patients with familial hypercholesterolemia, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, Panel Discussion 2, 2011年7月15日～16日, 北海道
- 16) Harada-Shiba M, Management of familial hypercholesterolemia(FH), 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, Guideline-Revision of JAS Guidline in2012(新ガイドライン2012に向けて), 2011年7月15日～16日, 北海道
- 17) 柴田雅朗, 森本純司, 柴田映子, 藤岡重和, 斯波真理子, 可溶性 VEGFR-3 デコイは高転移性マウス乳癌モデルに対して転移抑制作用を發揮したが、Satb1 はその効果を示さなかった, 第35回日本リンパ学会総会, 2011年6月3日～4日, 東京
- (国際)
- 1) Yuasa Y, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Minamino N, Osaki T, Usami M, Ishihara M, Iwasaki T, Harada-Shiba M, Exhaustive Analysis of Substances Removed by LDL-Apheresis(LDL-A) Treatment. X VI International Symposium on Atherosclerosis(ISA2012), ポスター発表, 2012年3月25日～29日, Sydney, Australia

- 2) Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Harada-Shiba M, Long-Term Effects of LDL Apheresis in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. XVI International Symposium on Atherosclerosis(ISA2012), ポスター発表, 2012年3月25日～29日, Sydney, Australia
- 3) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Shibata M, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S, Bridged Nucleic Acid-based Antisense Therapeutics Targeting PCSK9 Reduced Serum LDL-Cholesterol Levels of Mice Fed a Diet in High Cholesterol. XVI International Symposium on Atherosclerosis(ISA2012), ポスター発表, 2012年3月25日～29日, Sydney, Australia
- 4) Harada-Shiba M, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Tomoike H, Yokoyama S, Has Statin Delayed the Onset Age of Coronary Artery Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia?. XVI International Symposium on Atherosclerosis(ISA2012), Workshop 9, 2012年3月25日～29日, Sydney, Australia
- 5) Harada-Shiba M, Ohta N, Makino H, Miyamoto Y, Iwamoto N, Kishimoto I, Tomoike H, Genetic Analysis of Familial Hypercholesterolemia. XVI International Symposium on Atherosclerosis(ISA2012), Mini Oral Session B, 2012年3月25日～29日, Sydney, Australia
- 6) Yuasa Y, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Minamino N, Osaki T, Usami M, Ishihara M, Iwasaki T, Harada-Shiba M, Exhaustive Analysis of Substancers Removed by LDL-apheresis(LDL-A) Treatment. Familial Hypercholesterolaemia and Genetic Dyslipidaemia Satellite Meeting, ISA2012, ポスター発表 2012年3月23日～25日, Australia
- 7) Harada-Shiba M, Guideline for Management of FH in Japan. Familial Hypercholesterolaemia and Genetic Dyslipidaemia Satellite Meeting, ISA2012, Free Communications, 2012年3月23日～25日, Australia
- 8) Wada S, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Torigoe H, Obika S, Harada-Shiba M, Development of the 2',4'-BNA based siRNA drug and elucidation of the effects on its chemical modifications. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, ポスター発表 2011年11月9日～11日, 北海道
- 9) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Sasaki K, Yasuhara H, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S, Evaluation of Efficacies of BNA-modified Anti-PCSK9 Antisenses. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, ポスター発表 2011年11月9

日～11日、北海道

知的所有権の出願・取得状況

特許取得

- 1) 高コレステロール血症の疾患モデルマウス

登録番号：第 4734523 号

特許権者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：斯波真理子、寒川賢治

出願番号：特願 2005-243938

出願日：平成 17 年 8 月 25 日

登録日：平成 23 年 5 月 13 日

特許出願中

- 1) 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高脂血症治療剤

登録番号：特願 2011-271751

出願人：国立大学法人大阪大学、独立行政法人国立循環器病研究センター

発明者：小比賀聡、斯波真理子他

出願日：平成 23 年 12 月 12 日

- 2) PCSK 9 の吸着体および PCSK 9 の吸着器

出願番号：特許 2011-153216

出願人：国立循環器病研究センター、株式会社カネカ

発明者：斯波真理子、湯浅由美子他

出願日：平成 23 年 7 月 11 日

- 3) 高コレステロール血症と動脈硬化

の検出方法

出願番号：特願 2011-100682

出願人：株式会社ビー・エム・エル、国立循環器病研究センター

発明者：斯波真理子他

出願日：平成 23 年 4 月 28 日

研究協力者

国立循環器病研究センター研究所
病態代謝部

山本 剛史

安原 秀典

中谷 萌夏

堀 美香

和田 俊輔

柴田 映子

森本 めぐむ

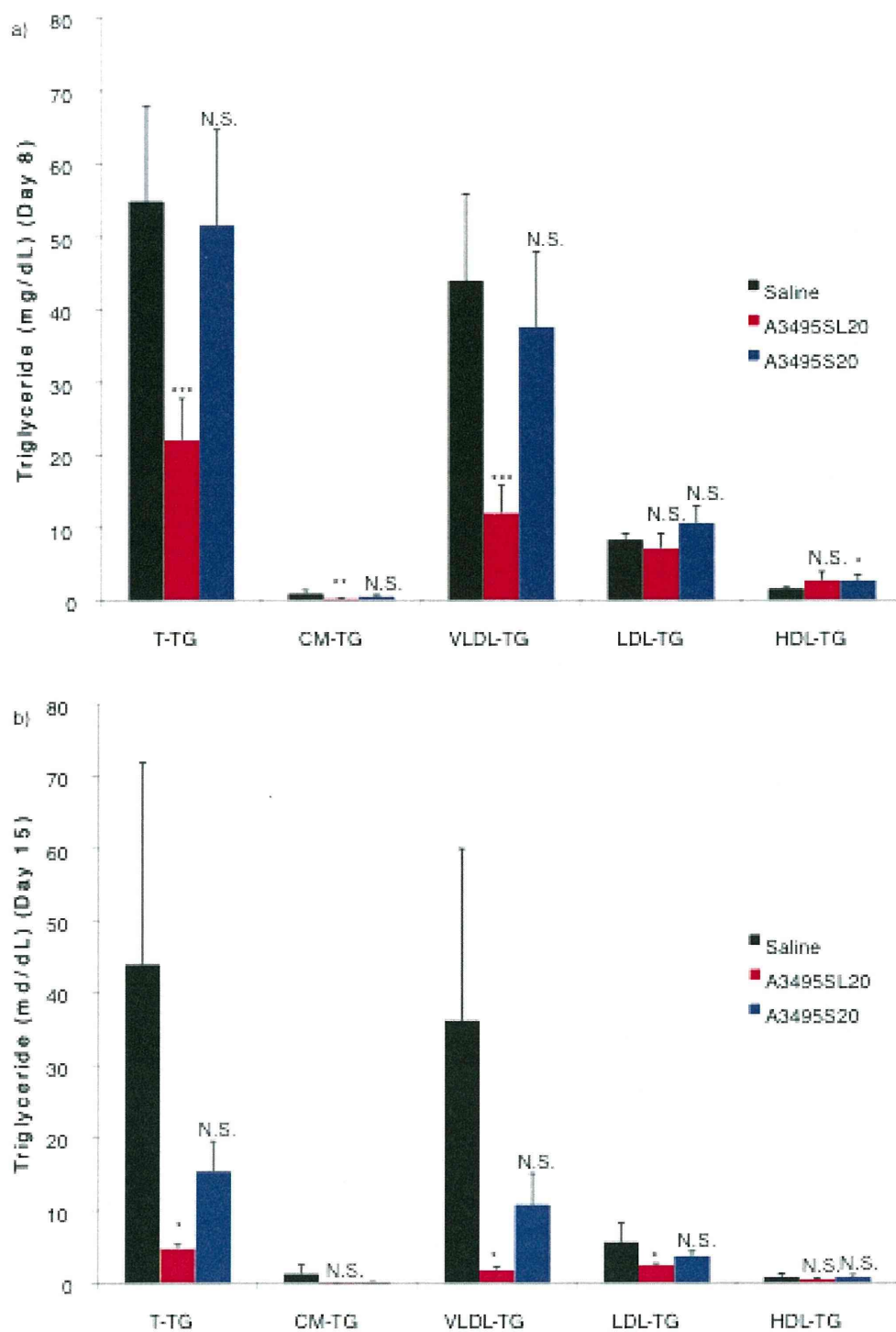
湯浅 由美子

吉田 晶子

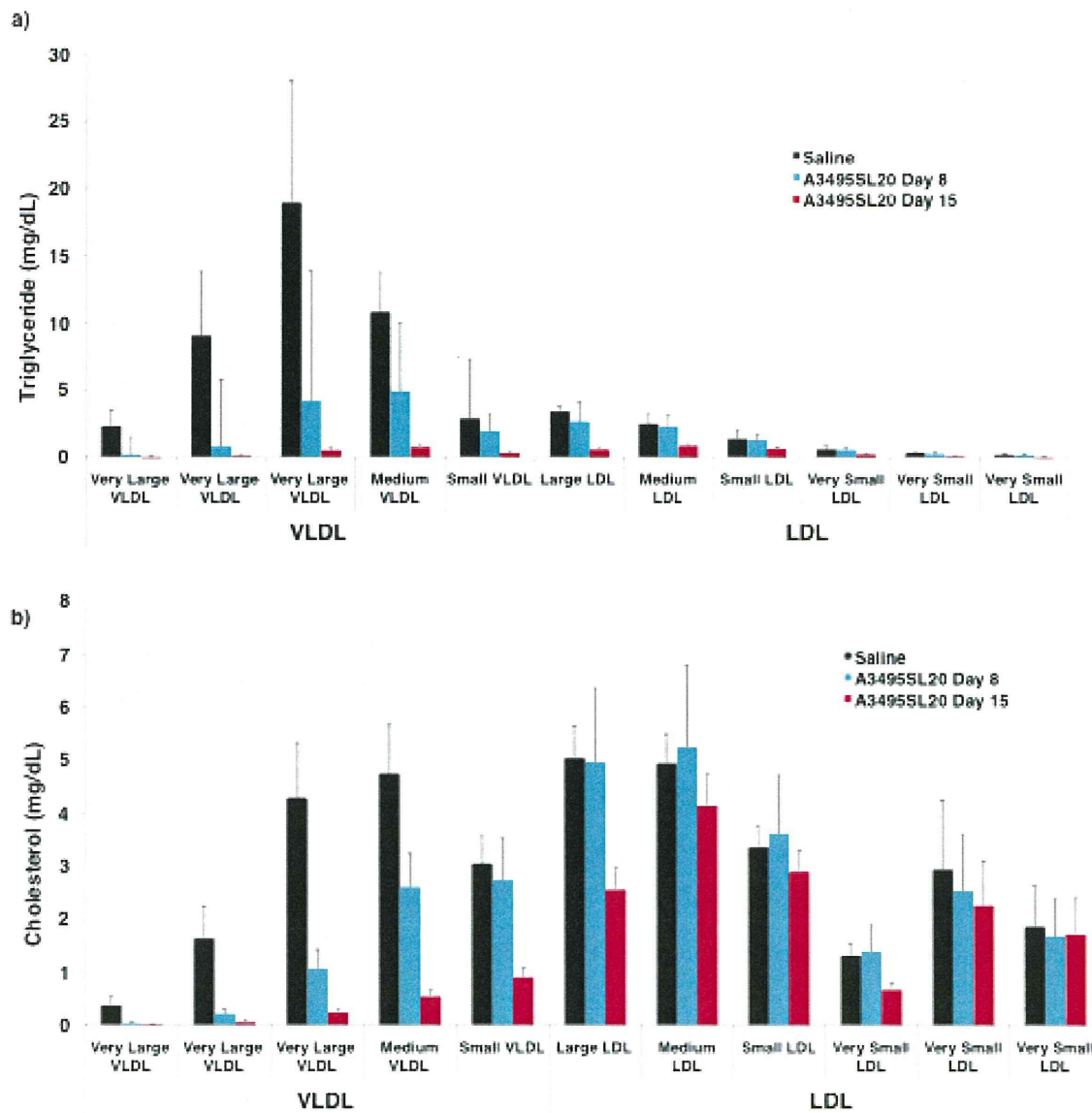
表 1 Twenty-nucleotides-long antisenses used in this study.

	Sequence ID	Sequence
1	A3495S20	5'-tcttatccagctttattagg-3'
2	A3495SL20	5'-TctTaTccagctttATTAGg-3'
3	A3495SLTC20	5'-TctTaTccagctttATTagg-3'
4	A3495SNCTC20	5'-T ^B C ^B tT ^B aT ^B C ^B cagcttT ^B aT ^B T ^B agg-3'

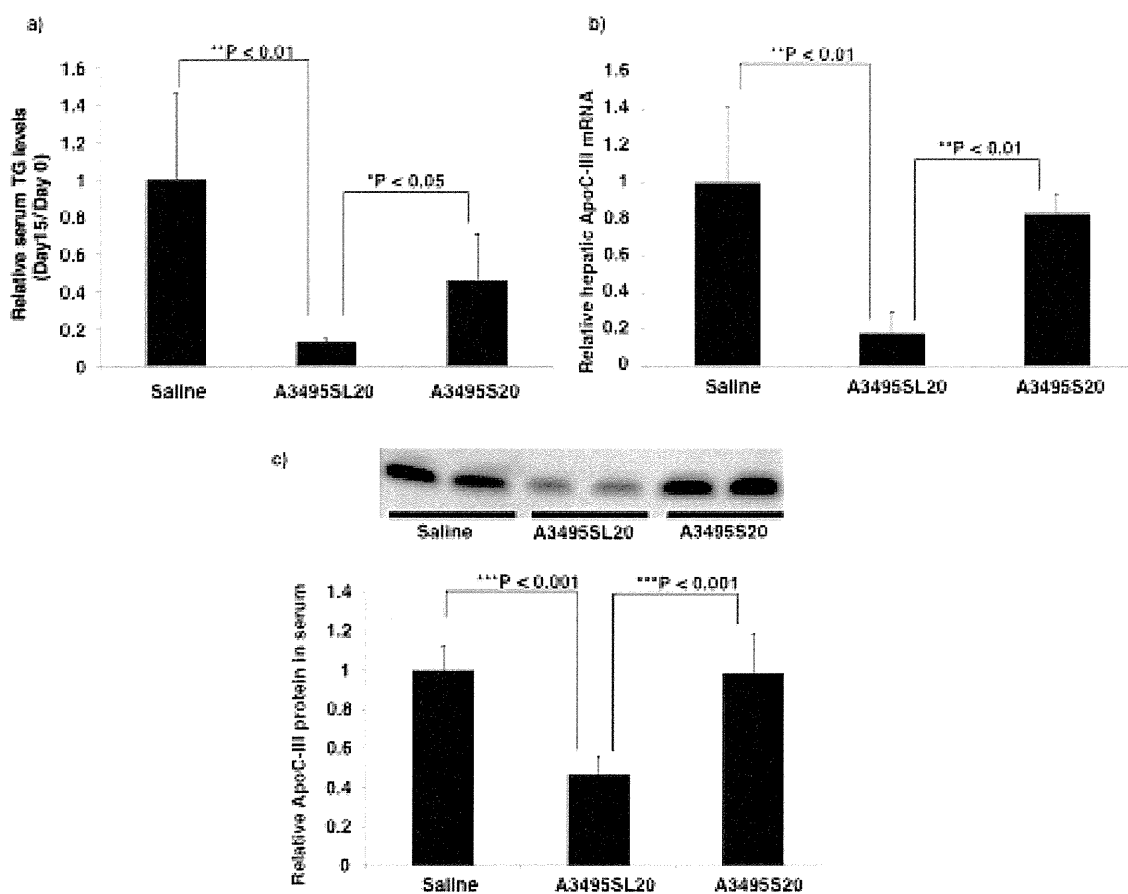
Oligonucleotides with 2',4'-BNA/LNA (upper case), 2',4'-BNA^{NC} (capital with superscript N) and DNA (lower case letters). All internucleotide linkages are phosphorothioated.



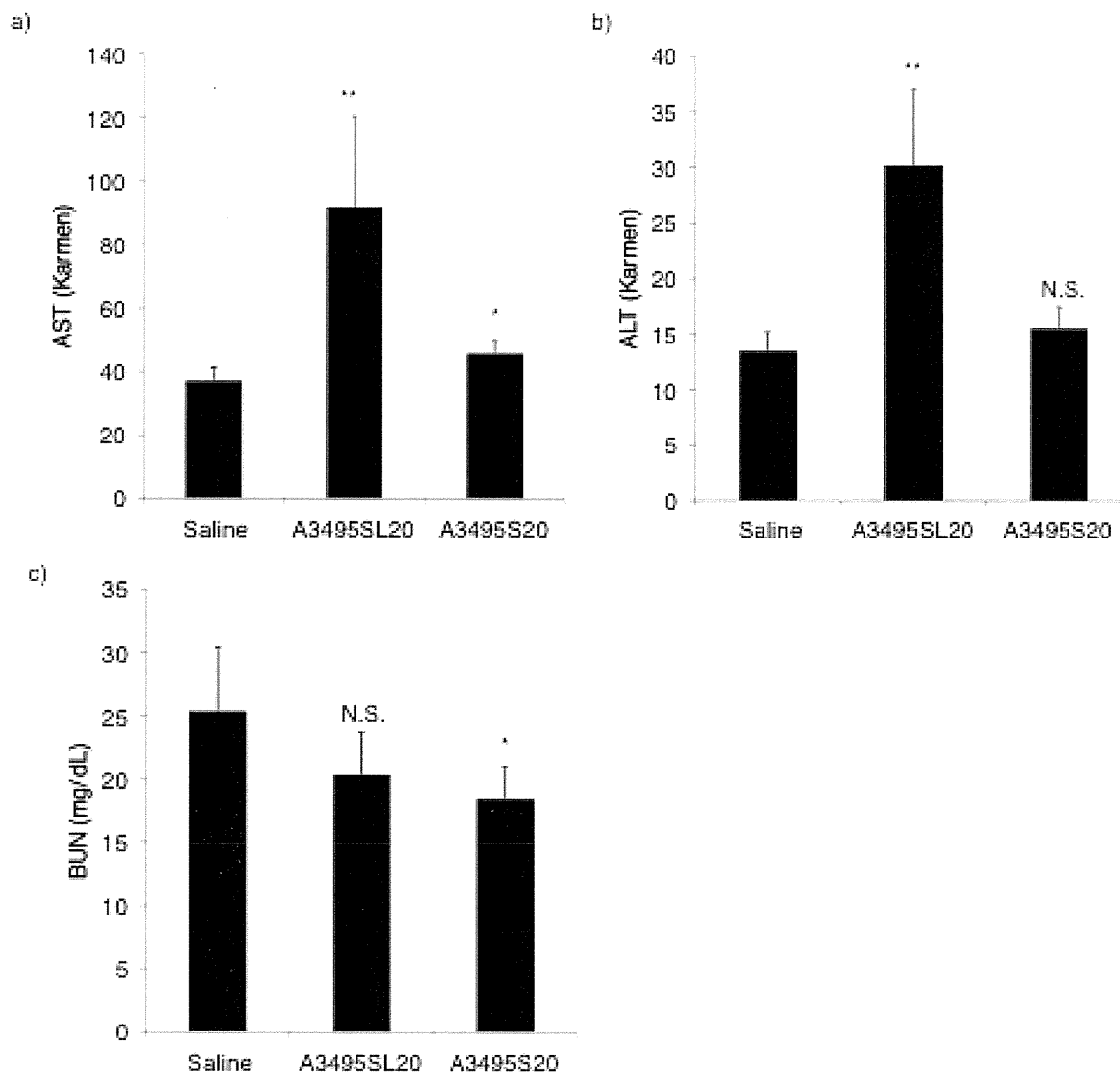
☒ **1 Effects of A3495S20 and A3495SL20 on serum lipid levels.** High fat-fed mice received i.p. administration of A3495S20 and A3495SL20 at a dose of 20 mg/kg five times during 2 weeks. (a) Serum triglyceride level of each fraction of day 8 after and (b) of day 15 after the first injection were displayed. Data represent mean values (\pm SD). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, N.S indicates not significant. $n = 5$.



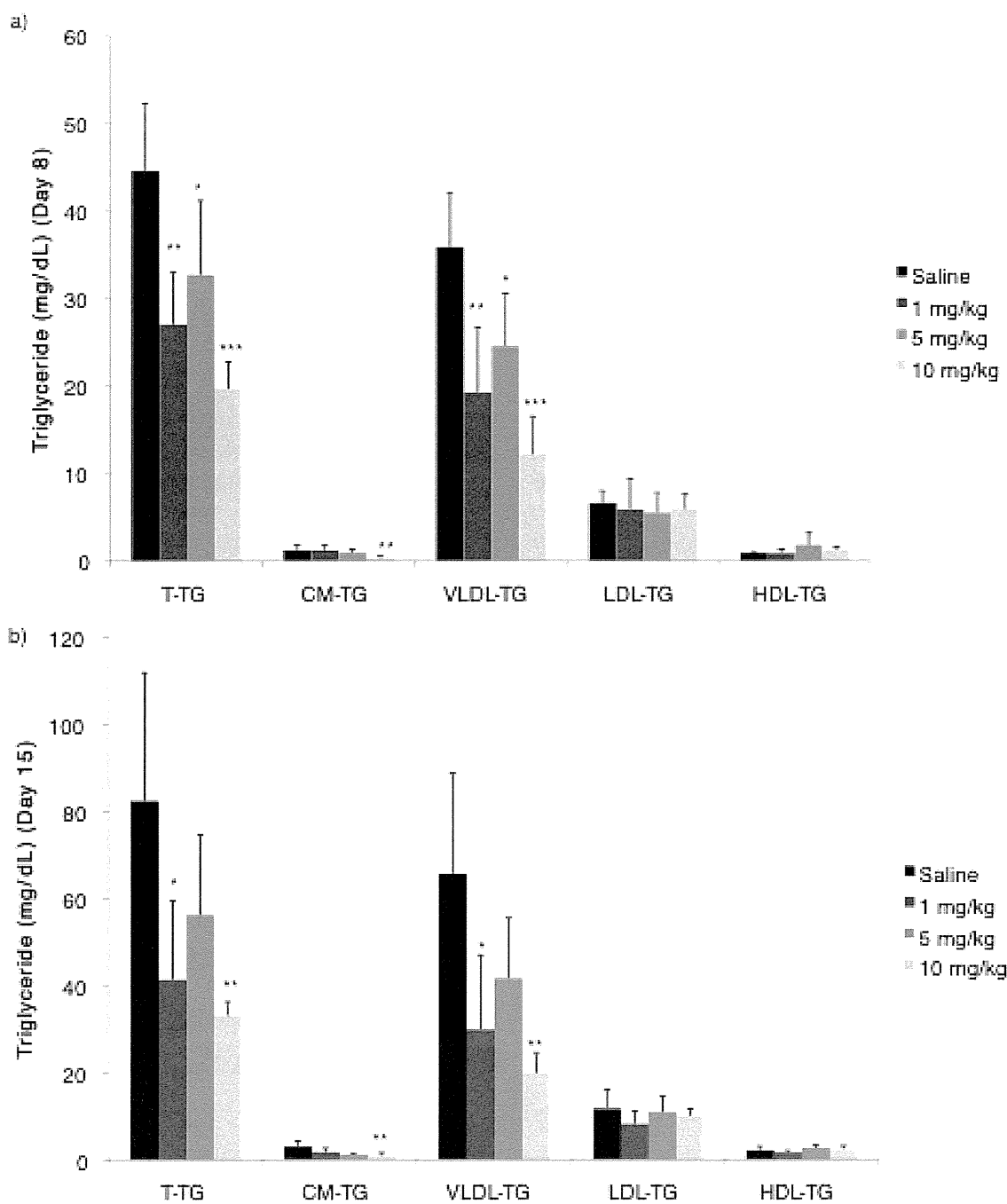
☒ 2 Lipid content in each lipoprotein fractions having different particle size. (a) Triglyceride content, (b) cholesterol content.



☒ **3 Effects of A2495S20 and A3495SL20.** High fat-fed mice received i.p. administration of **A2495S20** and **A3495SL20** at a dose of 20 mg/kg five times during 2 weeks. (a) Serum total TG levels of final day of the schedule, (b) hepatic ApoC-III mRNA levels, (c) serum ApoC-III protein expression levels. Data represent mean values (\pm SD). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 5$.



☒ **4** Changes in toxicological parameters upon A3495S20 and A3495SL20 dosing. (a), (b), (c) Serum liver transaminases (AST and ALT) and BUN levels were measured. Data represent mean values±SD. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, N.S. indicates no statistical significance.



⊗ **5 Dose-dependent responses of serum triglycerides to A3495SL20 dosing.** (a) and (b) shows triglyceride levels on day 8 and 15, respectively. Data represent mean values \pm SD. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 5$.

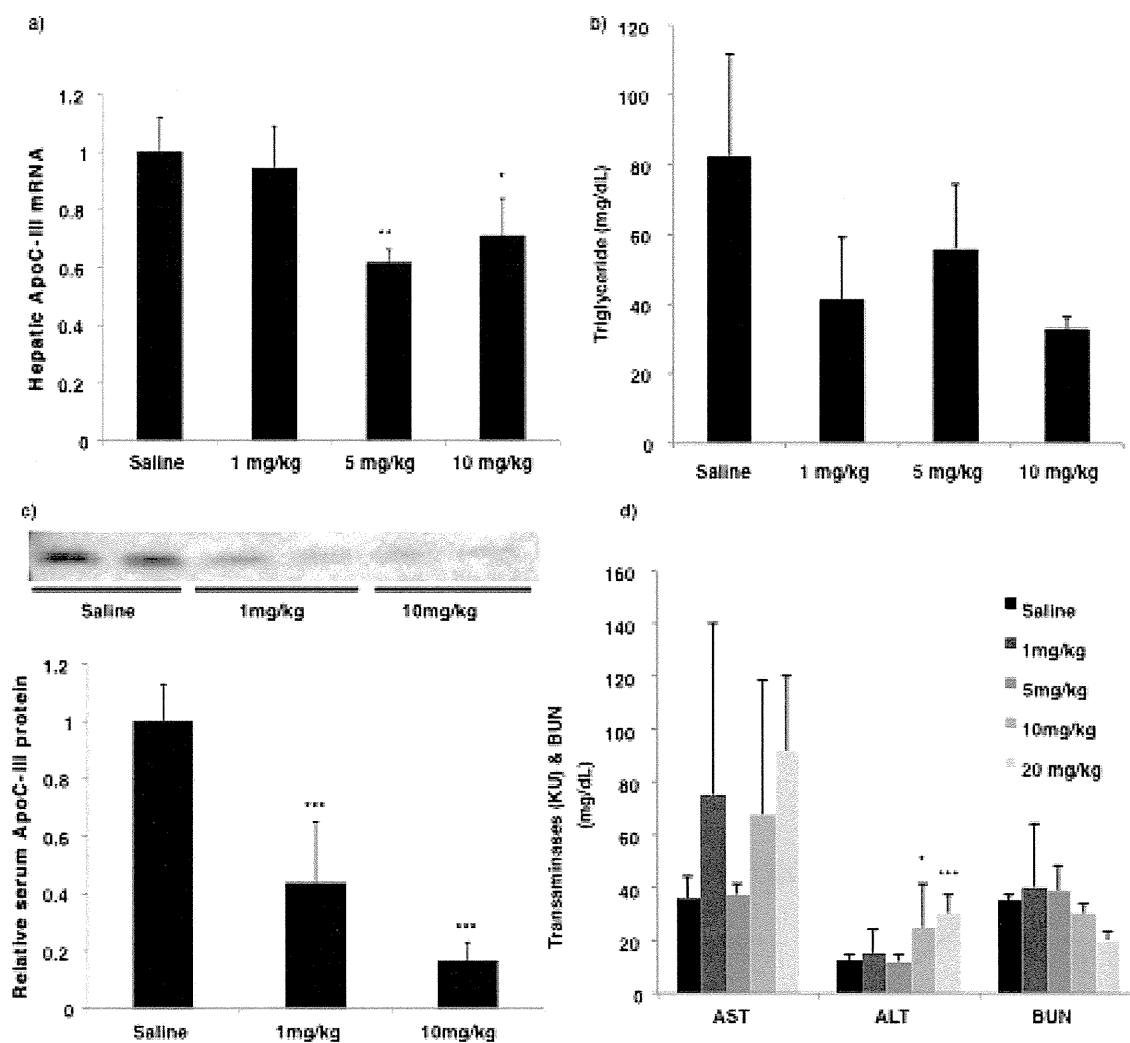


Figure 6 Dose-dependent effects of A3495SL20. High fat-fed mice received i.p. administration of A3495SL20 at a dose range of 1-10 mg/kg five times during 2 weeks. (a) Hepatic ApoC-III mRNA levels, (b) serum mRNA levels, (c) serum ApoC-III protein expression levels, and (d) serum liver transaminases (AST and ALT) and BUN levels were measured. Data represent mean values (\pm SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 5$.

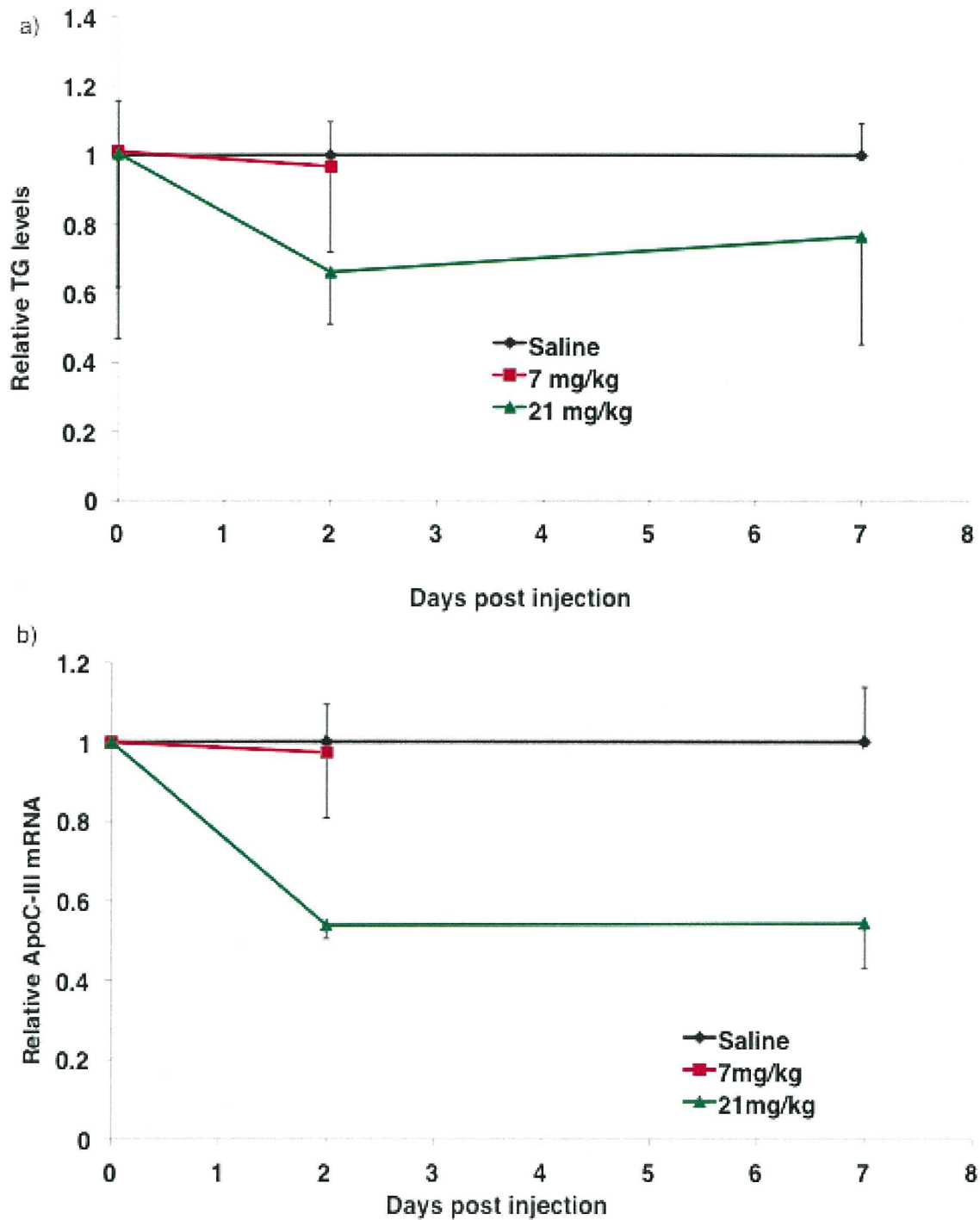


Figure 7 **Duration of effect in mice.** Mice were administered a single i.v. injection of saline (black) or A346SL13 at 7 (red) and 21 mg/kg (green). (a) Relative serum total triglyceride levels at day 2 and 7 after administration. Livers were analyzed for (b) ApoC-III mRNA expression normalized to GAPDH. Data represent mean values + SD. n = 3.