

201209004A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成25(2013)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 . 分担研究報告書	
1. 2',4'-BNA、2',4'-BNA <sup>NC</sup> および 2',4'-BNA <sup>AM</sup> を搭載した高活性で低毒性な apoC-III に対するアンチセンス分子の設計・探索 .....	13
小比賀 聡	
2. アポ C-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— 2',4'-BNA、2',4'-BNA <sup>NC</sup> および 2',4'-BNA <sup>AM</sup> を搭載したアンチセンス分子の治療効果の評価— .....	29
斯波 真理子	
3. アポ C-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—ApoE ノックアウトマウスを用いた apoC-III アンチセンスの抗動脈硬化作用の評価— .....	51
柴田 雅朗	
III . 研究成果の刊行物・別刷 .....	63

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

## アポ C-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・部長

### 研究要旨

家族性複合型高脂血症や高トリグリセリド(TG)血症合併型の家族性高コレステロール血症においては、代表的な脂質低下薬であるスタチンとフィブラートの併用が原則禁忌であることから治療が非常に困難である。またメタボリックシンドロームや糖尿病においても高TG血症の治療が有意に冠動脈疾患の発症を抑えることが見出され、安全で有効な高TG血症治療薬、さらには動脈硬化症予防薬の開発が望まれている。本研究では、従来の高TG血症治療薬とは異なり、特異性が高く安全な治療薬の開発を目的としている。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。昨年度は、2',4'-BNA の*in vitro*および*in vivo*における効果および安全性の検討を行った。本年度は臨床応用を念頭において、より高活性で低毒性を示すアンチセンス医薬の開発を目指し、apoC-III mRNAの全領域を対象として最適配列を網羅的に約100種類選択して合成し、*in vitro*および*in vivo*スクリーニングを行った(小比賀G、斯波G)。その結果、*in vivo*において遺伝子発現抑制効果が極めて高く、毒性を示さない配列の選定に成功した。一方、さらに効果および安全性が高い核酸の開発のため、2',4'-BNA<sup>AM</sup>およびそのアナログの合成に成功し、これらを搭載したapoC-IIIに対するアンチセンスを設計・合成した(小比賀G)。2',4'-BNA<sup>AM</sup>およびそのアナログを搭載したアンチセンスを用いて*in vivo*での効果を検証することにより、置換基の疎水性により肝臓への蓄積量、ひいては体内動態を制御できる可能性が示された(斯波G)。アポリポプロテインE (apoE) ノックアウトマウスに対して約4ヶ月の反復投与を行い、血清TG値の低下と有意な脂肪肝の減少、アディポネクチンの有意な上昇も確認され、動脈硬化治療への可能性が示された(柴田G)。

## 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、心血管疾患の残存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が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。

本研究において用いる新規架橋型人工核酸である 2',4'-BNA/LNA(BNA)は、小比賀らの独自の開発によるもので、RNA に対して結合親和性が 10 万倍以上に高いこと、酵素耐性も高いことから、*in vivo* での効果が期待できる。

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 分子を標的として、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。

昨年度は、2',4'-BNA の *in vitro* および *in vivo* における効果および安全性の検討を行った。本年度は、臨床応用を念頭において、より高活性で低毒性を示すアンチセンス医薬の開発を目指し、グローバルスクリーニングを行った。また、動脈硬化モデル動物を用いて、動脈硬化症に対する効果の検討を行った。

## 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) を使用した。

### 2. 新規人工核酸 2',4'-BNA<sup>AM</sup> のヌクレオシド合成と 2'-窒素上の置換基変換

apoC-III に対する 2',4'-BNA<sup>AM</sup> を搭載したアンチセンスを供するために 2',4'-BNA<sup>AM</sup> のアミダイトユニットの合成を行った。また窒素上の置換基の変換を行った。

### 3. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の設計

昨年度に設計した BNA アンチセンス BNA1 (5'-TCtTaTCcagcttTaTTaGg-3')、BNA(TC) (5'-TCtTaTCcagcttTaTTagg-3')、NC(TC) (5'-TNCNtTNaTNCNcagcttTNaTNTNagg-3') を元に AM20 (5'-tcTATAaTAccagcttTAaTATAagg-3') および AM16 (5'-TATAaTAccagcttTAaTATAa-3') を設計、

合成した。ここで、大文字は 2',4'-BNA、小文字は天然の DNA、大文字 N は 2',4'-BNA<sup>NC</sup>、大文字 A は 2',4'-BNA<sup>AM</sup>をさす。

#### 4. 二本鎖融解温度 ( $T_m$ ) の測定

オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能は、融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。

#### 5. HPLC を用いた疎水性の検証

各種置換基をもつ 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 搭載型アンチセンス分子の HPLC 解析については逆相 HPLC により行った。

#### 6. ヌクレアーゼ耐性試験

各種置換基をもつ 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 搭載型アンチセンス分子を含む緩衝液に 3' -エキソヌクレアーゼを加え、37°C で反応を行った。一定時間ごとに 15  $\mu$ L ずつサンプル採取し、2 分間、90°C 加熱処理の後、氷冷することにより酵素を失活させた。経時的に採取したサンプルに滅菌水を加え、全量を 100  $\mu$ L に希釈し、オリゴヌクレオチドの残量を HPLC により定量した。

#### 7. マウス apoC-III mRNA に対するアンチセンス分子の再設計

マウスの apoC-III mRNA (Accession ID: NM\_023114) に対して、5 塩基間隔で全 103 種の 14 塩基長のアンチセンスを設計し、2',4'-BNA を搭載したアンチセンスを合成した。

#### 8. マウス肝臓初代培養細胞の単離

マウスの上腸間膜静脈よりコラゲナーゼ灌流液を灌流し、10 cm デッシュに上で軽く解した後、セルストレイナーに通して氷冷した 50 mL 遠沈管へと移した。遠心にて肝実質細胞を分離し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### 9. *in vitro* トランスフェクション実験

マウス肝実質細胞を、96ウェル平底マイクロプレートに播き、24時間培養した。Lipofectamine 2000を用いトランスフェクションし、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、RNAを回収した。

#### 10. Realtime RT-PCR 解析

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。

#### 11. *in vivo* 反復投与試験 (1)

マウスを2週間の高脂肪食 F2WTD 負荷の後、各種アンチセンスを1週間に2回、全部で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日目に肝臓を採取後、細切して液体窒素で瞬間凍結した。

#### 12. 反復投与試験 (2)

1.5 週間高脂肪食負荷マウスに対し、AM20 (5'-tcTATAaTAccagctTAaTATAagg-3') およびAM16 (5'-TATAaTAccagctTAaTATAa-3')

を1日目と3日目に2回、尾静脈投与を行った(20 mg/kg/injection)。5日目にマウスを肝臓を採取後、細切して液体窒素で瞬間凍結した。ここで、大文字 A は 2',4'-BNA<sup>AM</sup>を示す。

### 13. 肝臓からの mRNA 抽出

凍結した肝臓の切片を 1 mL の TRIzol 法を用いて 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。

### 14. ウェスタンブロッティング

マウス血清を Tris-Glycine Gel (16%) にて電気泳動した後、ブロッティングを行なった。ブロッキングを行い、抗マウス apoC-III抗体を反応させた後、二次抗体として抗ウサギ抗体を反応させた。次いで、ECL primeを用いてメンブレンを発色させ、発色量をイメージャーで定量した。

### 15. 血清パラメータの測定

マウス尾静脈より血液を採取して、血清を分離し、トリグリセリド E-テストワコーを用いて血清総 TG 値を定量した。総コレステロール値はコレステロール E-テストワコーを用いて測定した。アディポネクチンは、ELISA キット (MBL, CY-8051) を用いてプロトコルに従って測定した。

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。

### 16. 肝臓内アンチセンスオリゴヌクレオチドの定量

[試薬]

AM16 に相補的な 3' ビオチン化した DNA (5'-gaa tag cga taa taa agc tgg ata a-3') を Template DNA、5'位および3'位をそれぞれジゴキシゲニン化した DNA (5'-tcg cta ttc-3') を Ligation Probe とした。

[アッセイ]

凍結肝臓切片を TissueLyser II を用いて破砕した。Template DNA 溶液 (100 μL) および 10 μL の検量線サンプルおよび肝臓抽出液を 96 well のマイクロプレートに加え、37 °C で 1 時間インキュベーションした。洗浄に続いて Ligation Probe を 100 μL 加え、15 °C で 3 時間インキュベーションした。洗浄後、抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ抗体を加え、37 °C で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、150 μL の 溶液を加え、1 秒後に AttoPhos® Fluorescent AP Substrate System 溶液を加え、15 分後に Spectra Max M2e microplate reader (Molecular Devices) を用いて蛍光強度を測定した。得られた値とサンプルごとに準備した検量線から、サンプルに含まれるオリゴヌクレオチド濃度を算出した。

## 17. 病理組織解析

肝臓組織を採取して、10%ホルマリン緩衝液に24時間浸して固定した後5時間流水水洗し、パラフィン包埋した。ミクロトーム (Leica Microsystems) を用いて薄切切片 (2-3  $\mu\text{m}$ ) を作製して、Carrazzi's hematoxylin 及び Tissue-Tekeosin 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。大動脈切片は、10%ホルマリン緩衝液に24時間浸して固定した後5時間流水水洗し、パラフィン包埋した。ミクロトーム (Leica Microsystems) を用いて薄切切片 (2-3 $\mu\text{m}$ ) を作製した。Resorcin-Fuchsine Stain Solution、Weigert's Iron Hematoxylin Stain Solution、Van Gieson's stain Solution を用いて Elastica van Gieson stain を行ない、顕微鏡にて観察し、写真撮影した。

(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. 新規人工核酸2',4'-BNA<sup>AM</sup>のヌクレオシド合成と2'-窒素上の置換基変換

アミド窒素上の置換基のかさ高さが大きくなるに従って結合親和性の指標である  $T_m$  値は減少傾向を示したが、依然として相補RNA鎖との結合親和性は天然DNA鎖よりも高く、十分な結合親和性を

保持していることが確認できた。一方、AM[nPr] およびAM[IP]修飾オリゴヌクレオチドを比較するとAM[IP]修飾の方が若干ながら  $T_m$  値が高い傾向にあった。また、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph]修飾のように炭素鎖が直鎖の場合には、 $T_m$  値の著しい低下を認められた。

ApoC-III 配列へAM[NR]-T を6残基修飾した配列での脂溶性について検証するために、HPLCクロマトグラフィーを用いて各オリゴヌクレオチドの溶出時間を検討した。結果、溶出順序は、AM[R]-T を複数導入することにより、オリゴヌクレオチドの極性が大きく変化することがわかった。

置換基の核酸分解酵素に対する安定性への影響について評価した。天然 (H) および2',4'-BNA搭載オリゴヌクレオチド (I) に加え、リンケージをホスホロチオエート化したオリゴヌクレオチド (Hs)、AM[Me]オリゴヌクレオチド (As) を含む10種類のオリゴヌクレオチドに対して蛇毒由来のエキソヌクレアーゼを作用させ、経時的にHPLCにより分析した。天然のオリゴヌクレオチド(H)が2分で消失する高濃度酵素条件において、AM[Et] (B)とAM[IP] (C)を比較すると、AM[IP] (C)が40分経過後55%程の残存率であったのに対し、AM[Et] (B)は85%以上の残存率を示し、大きく酵素耐性を向上させた。また、極性基を有するAM[CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>] (F)の残率は30%程度であり、2',4'-BNAと同等の安定性にとどま

った。今回用いた多くのAM[R]修飾オリゴヌクレオチドにおいて、対応する2',4'-BNA修飾オリゴヌクレオチド (I)よりも高い酵素耐性能が確認されている。また、これまでの知見通り、リンケージをホスホロチオエート化しているオリゴヌクレオチド (Hs) は40 分後にも90%以上の残存率と、高い酵素耐性能を示したが、AM[Me]-T修飾することでさらに酵素に対する安定性が向上した。

## 2. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の設計および*in vitro*スクリーニング

昨年度は 13 塩基長のアンチセンス分子を 9 種設計したが、中でも効果の高かった **A346SL13** (5'-CTGcatggcaCCT-3') の *in vivo* での効果については mRNA のサイレンシングは良好であったが、軽度のトランスアミナーゼの上昇と肝臓細胞中への浸潤が認められ、安全性への懸念が残った。より網羅的なスクリーニングを行わなければ優れた候補品を選択する事は出来ないと考え、薬効の向上と毒性の改善を目指し、apoC-III mRNA の全領域を標的としたグローバルスクリーニングを励行すべく、100 種余りのアンチセンスの設計を行った。

ここで設計したアンチセンス分子について、*in vitro* でのスクリーニングアッセイを行った。昨年度から大きく変更した点は、スクリーニングに用いる細胞種である。これまで NMuLi と呼ばれるマウスの肝臓由来の癌細胞を用いて検討を行っ

てきたが、そもそも apoC-III の mRNA の発現量が個体のそれを大きく下回るために、*in vitro* のスクリーニングアッセイのためにアッセイスケールを落とし込むことが困難であったことと、アッセイ結果の *in vivo* の効果への外挿性にも不安があった。本年度は、この点についてマウス個体の肝臓から採取したプライマリー細胞を用いる事によってこの問題が解決する事を見出し、これを用いてスクリーニング評価を行った。103 種のアンチセンスのうち、まず 15 塩基ごとにあたる約 30 種のアンチセンスのスクリーニングを行った。濃度依存的な効果が認められ、最終 10 nM の濃度においては最大約 80% の apoC-III mRNA の発現抑制効果が見られた。さらに驚くべきことに、効果が高い効果を示すアンチセンス分子は特に 3'-UTR 部分に集中している事が明らかとなった。また、昨年度に見出した **A346SL13** にあたる付近のアンチセンスを見ると一定の効果は示しているが、3'-UTR 領域に設計したものの方が遥かに高い効果が認められた。

続いて、一次スクリーニングにて有効性が見出されたアンチセンスの周辺配列について肝臓初代培養細胞を用いて二次スクリーニングを行った。周辺配列においても類似の高い活性を示した。また濃度依存的な効果も見出された。

本スクリーニングにおいて高い効果を示した配列の周辺について2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンス分子を約40種設計



し、合成を行った。肝臓の初代培養細胞でのスクリーニング技術が確立したので、2',4'-BNA<sup>NC</sup>型についても今後、同様の多段階スクリーニングを行う予定である。

### 3. 2',4'-BNA および 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載抗 apoC-III アンチセンスの薬効比較

2',4'-BNA および 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載型抗 apoC-III アンチセンス : **BNA1** ( 5'-TCtTaTCcagcttTaTTaGg-3' ) 、 **BNA(TC)** (5'-TCtTaTCcagcttTaTTagg-3')、 **NC(TC)** (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') を 6 週齢の C57BL/6J の雄性マウスに対して 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 10 mg/kg/injection の投与量でアンチセンスの反復投与を行った。ここで、配列中の大文字は 2',4'-BNA、小文字は天然の DNA、大文字<sup>N</sup>は 2',4'-BNA<sup>NC</sup>を意味する。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。8 日目及び 15 日目に於ける血清 TG 濃度値は、**BNA1**、**BNA(TC)**、**NC(TC)**いずれの群においても著明な (約 50%) 総 TG 値の減少を認めた。肝臓の apoC-III mRNA 量は、**BNA1** と **NC(TC)**では約 40%の低下、**BNA(TC)**においては約 20%の低下を認めた。血清中の apoC-III タンパク質の量をウエスタンブロッティングにより定量したところ、40-50%の低下を確認した。このことから、2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載抗 apoC-III アンチセンスは、2',4'-BNA 型のアンチセンス分子と同等の効果を有していることを見出した。急

性毒性の評価も併せて行った。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) の測定を行った結果を図 3 に示した。**BNA(TC)**および**NC(TC)**投与群においては AST、ALT 値の上昇は全く認められなかった。

以上の検討から、2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載抗 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、安全性においても問題を認めなかった。

### 4. 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 搭載抗 apoC-III アンチセンスの薬効解析

2',4'-BNA<sup>AM</sup> 搭載抗 apoC-III アンチセンスの *in vivo*での薬効を評価するために、**AM20**と**AM16**を2回、尾静脈より投与を行った。ただし、2',4'-BNA<sup>AM</sup>については合成可能な供給量と塩基の種類に限りがあるため、ここではチミンにのみ修飾を加えた**AM20**および**AM16**を用い、投与を全2回、5日間の短期的なプロトコルで行った。最終日には血清TG値は、**AM20**、**AM16**でそれぞれ約10%および20%の低下に留まったが、5日目の肝臓中のapoC-III mRNAの量はいずれの投与群においても約80%低下しており、また血清中のapoC-IIIタンパク質についても50%以上の低下を認めた。**AM20**において若干程度のASTおよびALTの上昇が認められた。一方、**AM16**ではこれらの血液パラメータの変化は認めなかった。以上より、BNAのケミストリーを2',4'-BNA<sup>AM</sup>に置換した場合にも *in vivo*で非常に高い薬効を得ることが出来

ると結論づけられる。一方、同じケミストリーを用いていても肝毒性の有無に違いを認めた。

#### 5. 2',4'-BNA<sup>AM</sup>の2'位の窒素上の置換基がアンチセンス分子の薬効および動態に与える影響の検討

2',4'-BNA<sup>AM</sup>の置換基を疎水性の高い置換基（メチル基、ベンジル基、イソプロピル基など）を様々に変更したアナログについて、その体内動態と薬効の*in vivo*評価を行った。2',4'-BNAを有する**BNA16**（5'-TTaTccagcttTaTTa-3'）、メチル基をもつ**AM16**、ベンジル基をもつ**AM16[Bn]**、イソプロピル基をもつ**AM16[IP]**、ベンジル基とメチル基を併せ持つ**AM16[BnMe]**をそれぞれ2.868 μmol/kgの用量で単回投与し、3日後の肝臓におけるapoC-III mRNA量と肝臓に蓄積したアンチセンス分子をELISA法を用いて定量を行った。mRNAの発現量は、**BNA16**、**AM16**、**AM16[IP]**、**AM16[BnMe]**においてほぼ同等の有効性が見出された。しかしながら、一方で**AM16[Bn]**では、ほとんどサイレンシング効果が認められなかった。各アンチセンス分子投与後の肝臓蓄積量は、ほぼ疎水性の高さに相関する形で、2',4'-BNAよりもいずれのアンチセンス分子の蓄積量も多いことが明らかとなった（2',4'-BNAに比較して約1.6倍）。いずれの投与群においても肝毒性は全く認められなかった。

以上の検討から、2',4'-BNA<sup>AM</sup>の置換基の効果は顕著な薬効の上昇には結びつか

なかったものの、予想した通りに体内動態を大きく変化させることが示された。

#### 6. さらに高い活性、安全性を示す apoC-III mRNA上の良好な標的部位の探索

*in vitro* スクリーニングの結果、mRNAの3'-untranslated region (3'-UTR)領域に、高活性を示すアンチセンス分子が多数見出された。そのうちの6種類を選択し、*in vivo*でのスクリーニングを行った。通常食下マウスに対し、アンチセンス分子を5 mg/kgで皮下より単回投与を行った。投与後3日目に屠殺し、肝臓におけるapoC-III mRNAの発現を調べた結果、*in vitro*試験の結果に相関して3'-UTR領域に設計したアンチセンス分子が非常に高い効果を示した。この時、肝毒性は全く認められなかった。さらに、良好な配列について5, 15 mg/kgの投与量で検証を進めた結果、15 mg/kgでmRNAは約95%、タンパク質は約80%の低下を認め、肝毒性を全く認めなかった。

#### 7. 2',4'-BNA搭載型アンチセンスの長期反復投与に伴う薬効、毒性の評価

血清総コレステロール値およびTG値が極めて高く、動脈硬化の表現型をとることが知られているapoEノックアウトマウスに対して高脂肪食を負荷し、若齢にて動脈硬化促進させる条件で検討した。この高脂肪食負荷apoEノックアウトマウスに対して**A346SL13**（5'-CTGcatggcaCCT-3'）を10

mg/kg/回で4ヶ月間反復投与した。採血はマウス個体にストレスを与え、血清パラメータに大きな影響を及ぼしうるので、月に一度の頻度にとどめた。経時的な採血の結果、血清トリグリセリドは生理食塩水投与群に比較して約50%もの低下を達成し、この効果は4ヶ月間維持された。一方コレステロール値に関しては、有意な減少は認められなかった。肝臓のapoC-III mRNAを調べたところ、屠殺のタイミングでは約40%の低下を認めた。また善玉アディポサイトカインと呼ばれるアディポネクチン濃度を測定したところ、コントロール群では13.7 µg/mL、投与群では50 µg/mLと約4倍に増加していた。肝毒性の指標となるトランスアミナーゼを測定したところ、AST、ALTは共に増加を示した。屠殺後、肝臓の病理組織学的解析を行った結果、生理食塩水投与群では全個体で重度の脂肪肝の程度が認められたが、**A346SL13**投与群では3個体全てにおいて改善が認められた。しかしながら、EVG染色を施した大動脈の病理組織学的解析では、全例に動脈硬化病変の形成が認められた。

#### 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ものである。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。

昨年度の研究より、アンチセンス分子に BNA 修飾を施すことにより非常に高い mRNA 阻害効果とトリグリセリド低下効果が得られる事が見出された。一方で、その標的配列や BNA の種類により薬効や安全性に大きな違いが存在する事がみいだされた。このような背景からさらに厳密な網羅的スクリーニングが必要であること、ケミストリーごとに最適な標的配列が存在し得ることが示唆された。本年度は、この点に鑑みて apoC-III に対するアンチセンスとして、網羅的に 100種を超えるものを設計・合成し、初代培養肝細胞を用いてスクリーニング評価を行った。これらの結果から特に 3'-UTR を標的とした BNA アンチセンスが高い薬効を示すことが見出された。

*in vitro*スクリーニングで選抜されたアンチセンス分子の効果を *in vivo*で検証したところ、*in vitro*での効果に対応して、*in*

*vivo*で非常に良好な配列が存在することがわかった。それは3'-UTRを標的としたアンチセンスであった。さらに用量作用の関係についても調べ、予想通り効果は用量に依存し、肝毒性も認められなかった。一般的にmRNAの3'-UTRにはmiRNAの結合サイトが存在するなど安定性を調節するために重要な部分である。このためアンチセンスがこの部分を切断することによってその安定性に大きな摂動を与えたことが考えられる。このことから3'-UTRを標的とした2',4'-BNA<sup>NC</sup>搭載型アンチセンスも同様に高い効果を示すことが予想される。さらには、ヒトのapoC-III mRNAにおいても同様の傾向が期待出来る。

2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>などの次世代のBNAは、内外の研究から高い安全性が指摘されている。加えて、架橋部に窒素を有するBNAアナログにおいては窒素の原子価の性質上、置換基を導入出来る点でプロトタイプの2',4'-BNAよりも幅広い展開性が期待される。すなわち、置換基を様々に変更することによって医薬品としての性質を大きく変化させることが可能となる。ここでは、2',4'-BNA<sup>AM</sup>の置換基として、脂溶性の高い側鎖を導入することに成功した。これらを分子内に搭載したアンチセンス分子は、実際にその脂溶性が大きく変化した。肝臓への移行性については疎水性と概ね相関する結果となり、置換基を適切に選択することで体内動態を制御出来ることが期待される。肝臓への高い移行性は効果の増強並びに投与量の低下に

繋がることを期待出来る点で大きな進歩と言える。

高脂肪食を負荷したApoEノックアウトマウスは非常に重度の脂質異常症を示していたが、アンチセンス投与により、血清TG値の上昇が是正されていた。しかしながら、4ヶ月後には動脈硬化はいずれの群においても形成が認められた。これはトランスアミナーゼの上昇にあるように生体内で炎症反応が動脈硬化を加速してしまったことや、apoEノックアウトマウスはコレステロール値も非常に高いため、トリグリセリド値の低下の効果をマスクしてしまったこと、高脂肪食負荷apoEノックアウトマウスは動脈硬化能が非常に高いために、動脈硬化を観察するタイミングが遅すぎたなどの実験計画上の問題も考えられる。それでもやはり、apoC-III阻害がアディポネクチンの上昇や脂肪肝の抑制など代謝的には抗動脈硬化方向に作用することが見出された。動脈硬化そのものへの影響については、モデル動物の条件検討を行うこと、N数を増やすことなどにより、正確に評価することができると考えられる。また、病理組織学的には進行度を加味した動脈硬化病変の分類や更に進行度別の病巣の数を算出するなどの工夫も必要と考えられる。

## E. 結論

ApoC-III mRNAの全領域をカバーするようなアンチセンスを設計し、網羅的な*in vitro*および*in vivo*スクリーニングを行

った。この結果、非常に効果の高いアンチセンス分子を同定することに成功し、また 3'-UTR が好標的部位であることを見出した。次世代型 2',4'-BNA<sup>AM</sup> とその誘導体の合成に成功し、望み通りの化学的性質をアンチセンス分子に付与することにより、体内動態の制御ができることが示された。さらに、動脈硬化モデル動物を用いて高活性アンチセンスを投与することにより、抗動脈硬化への作用を有することを示すことに成功した。

抗 apoC-III アンチセンス医薬の開発を進めてきており、臨床応用に向けてさらに有効で安全なものへと改良を加えていく所存である。

#### 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。

**2',4'-BNA、2',4'-BNA<sup>NC</sup>および2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載した高活性で低毒性な apoC-III に対する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、動脈硬化症の危険因子の一つとされる高トリグリセリド血症の是正を主目的とし、トリグリセリドの代謝に関わるアポリポタンパク質 C-III (apoC-III) に対する優れた阻害剤の開発を行う。すなわち、独自に開発した高親和性人工核酸 BNA (2',4'-BNA、2',4'-BNA<sup>NC</sup>および2',4'-BNA<sup>AM</sup>) を搭載したアンチセンス医薬を用いて効率良く、かつ低毒性に apoC-III の mRNA の発現を抑制することを目的としている。前年度には、2',4'-BNA および 2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載したアンチセンスを設計した。他方で 13 塩基長のアンチセンスについては 9 種設計し、*in vitro* 並びに *in vivo* における効果・毒性をスクリーニング評価した。これらの結果を受けて、本年度は、より高活性で低毒性を示す 2',4'-BNA 搭載型アンチセンス医薬の同定を目指し、新たに apoC-III mRNA の全領域を標的とした約 100 種のアンチセンス配列を設計し、これらより医薬品に資する素材の探索を進めた。またこれらに対応する 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンスの設計、合成を行った。他方で、新規人工核酸 2',4'-BNA<sup>AM</sup> の合成とアナログの開発に成功し、これらを搭載した apoC-III に対するアンチセンスを設計・合成した。

A. 研究目的

2013年1月において世界初の全身作用型アンチセンス医薬「Kynamro」が米FDAにより承認され、アンチセンス医薬は近年再び活気を取り戻している。これは一つに標的 mRNA に対する結合親和性の向上と体内動態の改善に起因しており、Kynamro において

は従来から用いられてきたホスホロチオアートと核酸糖部の2'位を修飾した「MOE」の組み合わせをもって、これを達成している。しかしながら、まだ結合親和性や体内動態特性が十分とは言えず、投与量が非常に多い点とそれに付随してみられる肝毒性が次なる問題として認識されている。現に

欧州のEMAにおいてはこの副作用のために承認を拒否するに至っている。我々は、これに代表されるアンチセンス医薬に已然潜在する薬効の問題と毒性の問題を改善すべく研究を進めてきた。

これまでに我々が開発したBNAケミストリーはMOEに比べて遥かにmRNAとの親和性が高く、従来から用いられているホスホロチオアートを組み合わせる事によって大きな薬効が得られるものと期待している。これまでに2',4'-BNAを用いたアンチセンス医薬が生体においてMOEを搭載したアンチセンスを上回る非常に強力なアンチセンス効果を発揮する事が内外の研究により示されてきた。また2',4'-BNA<sup>NC</sup>においてはプロトタイプの2',4'-BNAの毒性を改善するという事も内外の研究により明らかとなっている。本研究においてはApoC-IIIに対するアンチセンス医薬においてはBNAを使用する事により非常に高い標的阻害効果が得られると同時に、また次世代型BNAの使用によってさらに毒性や体内動態を改善した形のアンチセンス医薬が奏せ出来縷々ものと考えている。前年度の研究成果においては、2',4'-BNAを搭載したapoC-IIIに対するアンチセンス医薬が培養細胞においてもまたマウスにおいても効率良くそのmRNAを減少させる事を見出した。その結果、血清のVLDL (very low-density lipoprotein) 中のトリグリセリドの大幅な減少という表現型を観察する事が出来た。同時に肝臓の病理組織学的解析においても脂肪変性の減少が認められた。一方で、*in vitro*のスクリーニング

で高い効果を発揮したアンチセンスを*in vivo*に適応した場合に肝毒性の指標であるトランスアミナーゼ類のわずかな上昇が観察された。本年度は、前年度に設計したアンチセンスに使用したケミストリーを2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>に置き換える事によって特性がどのように変化するか検証する事、およびmRNA上の標的部位をさらに網羅的にスクリーニング探索する事によってより薬効や安全性を高めることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 新規人工核酸2',4'-BNA<sup>AM</sup>のヌクレオシド合成と2'-窒素上の置換基変換

apoC-IIIに対する2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載したアンチセンスを供するために2',4'-BNA<sup>AM</sup>のアミダイトユニットの合成を行った。また窒素上の置換基の変換を行った。詳細を以下に示す。

チミン塩基を有する2',4'-BNA<sup>AM</sup>の合成を行った。D-グルコースから8工程で得られる化合物1の水酸基をTBDPS 基で保護し、2を得た。続いて、2からジアセタート体3へと変換後、ルイス酸存在下シリル基で活性化したチミンを導入し4を得た。化合物4の脱アセチル化の後、得られた5の2'位水酸基をトリフラート化したところ、チミンの2位酸素原子からの2'位炭素への求核攻撃により目的とするシクロ体6を高収率で得ることができた。化合物6を塩基性条件に付すことでアラビノ体7へと変換後、トリフラート化、続くアジ化によりアジド化合物8へと導

いた。その後、**8**のシリル基を除去し、得られた**9**の水酸基を、DMF 溶媒中PDC を用いてカルボン酸へと酸化した。カルボン酸体**10**の2'位アジド基をStaudinger 条件にてアミンへと還元し**11**とした後、EDC による縮合を行うことで目的とする2-オキサ-5-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-6-オン骨格をもつ化合物**12**の合成に成功した。閉環体**12**においては<sup>1</sup>H-NMR測定により糖部の2'位と4'位間が架橋されたと考えられた。得られた化合物**12**を接触還元条件に付し、目的のジオール体**13**(AM[H]-T モノマー)とした。この**13**は、メタノール中で再結晶を行い、X 線結晶構造解析によりその構造を確認した (Scheme 1, 2)。

種々の置換基を有するAM[R]-T モノマーの合成を行った。まず、ジベンジル体の架橋部アミド窒素原子へのメチル基の導入にあたり、チミン塩基の3位窒素上へのアルキル化を防ぐため、塩基部をBOM 基にて保護した。続いてBOM体を水素化ナトリウム、ヨウ化メチルと処理することで、アミド窒素上にメチル基を導入した化合物を得た。AM[Me]-Tの架橋構造は、ベンジル保護体の接触還元にて得たAM[Me]-TモノマーのX線結晶構造解析により確認した。最後に、5'位水酸基をジメトキシトリチル化することと、3'位水酸基をアミダイト化することにより、AM[Me]-Tアミダイト体を97%の高収率にて得ることに成功した。他の置換基についても同様に、各種ハロゲン化アルキル試薬を作用させることによってアミド窒素に各種のアルキル基を導入した。その後、ア

ンモニア処理を行うことにより、チミン塩基上のBOM 基を脱保護し、AM[R]モノマーを得ることに成功した。

## 2. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の設計

昨年度に設計した BNA アンチセンス **BNA1** (5'-TCtTaTcCagcttTaTTaGg-3')、**BNA(TC)** (5'-TCtTaTcCagcttTaTTagg-3')、**NC(TC)** (5'-T<sup>NC</sup>tT<sup>N</sup>aT<sup>NC</sup>cagcttT<sup>N</sup>aT<sup>N</sup>agg-3')を元に **AM20** (5'-tcT<sup>A</sup>T<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>ccagctt T<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>T<sup>A</sup>agg-3') および **AM16** (5'-T<sup>A</sup>T<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>ccagcttT<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>T<sup>A</sup>a-3') を設計、合成した。ここで、大文字は 2',4'-BNA、小文字は天然の DNA、大文字<sup>N</sup>は 2',4'-BNA<sup>NC</sup>、大文字<sup>A</sup>は 2',4'-BNA<sup>AM</sup>を示す。特に断らない限り 2',4'-BNA<sup>AM</sup>の 2'窒素の置換基はメチル基とする。またリン酸骨格はすべてホスホロチオアート化を施している。

## 3. 二本鎖融解温度 ( $T_m$ ) の測定

オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能は、融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。終濃度をそれぞれ塩化ナトリウム100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) 10 mM、各アンチセンス分子4.0  $\mu$ Mのサンプル溶液(140  $\mu$ L)を沸騰水中に置き、12時間かけて室温まで冷却した。測定は5°Cから始め、0.5°C/minの割合で80°Cまで昇温して、0.5°C間隔で260 nmにおける吸光度をプロットした。 $T_m$ 値は中線法により算出した。なお、温度上昇における蒸発により、溶液濃度は変化するのを防ぐため、セルは蓋付きのものを使用し



で測定を行った。SHIMADZU UV-1650PCを用い低測定した。測定は各サンプルにおいて3回測定し、その平均値を採用した。

#### 4. HPLCを用いた疎水性の検証

各種置換基をもつ2',4'-BNA<sup>AM</sup>搭載型アンチセンス分子のHPLC解析については逆相HPLCにより、以下の条件で行った。

HPLC: SHIMADZU LC-20AB, SPD-20A,

CTO-20A, SIL-20A

移動相:

A液) 0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液、pH 7.0

B液) 0.1M酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液: アセトニトリル= 1 : 1, pH 7.0

グラジエント: 5-33%アセトニトリル (30分)

使用カラム: WatersXbridge<sup>TM</sup>Shield RP<sub>18</sub> 2.5 μm (4.6 mm x 50 mm)

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 50°C

検出: UV(254 nm)

#### 5. ヌクレアーゼ耐性試験

各種置換基をもつ2',4'-BNA<sup>AM</sup>搭載型アンチセンス分子 (740 pmol) を含む緩衝液100 μL (50 mM Tris・HCl(pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>) に3'-エキソヌクレアーゼ (Crotalus

adamanteus venom phosphodiesterase: CAVP, Pharmcia Biotech) (0.175 μg) を加え、37°Cで反応を行った。一定時間ごとに15 μLずつサンプル採取し、2分間、90°C加熱処理の後、氷冷することにより酵素を失活させた。経時的に採取したサンプルに滅菌水を加え、

全量を100 μLに希釈し、オリゴヌクレオチドの残量をHPLCにより定量した。

HPLC: SHIMADZU LC-20AB, SPD-20A,

CTO-20A, SIL-20A

SHIMADZU LC-20AD, SPD-20A, CTO-20A,

SIL-20AC

移動相:

A液) 0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液、pH 7.0

B液) 0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液: アセトニトリル= 1 : 1, pH 7.0

グラジエント: 5-11.4%アセトニトリル (16分)

使用カラム: Xbridge<sup>TM</sup>Shield RP<sub>18</sub> (3.0 mm x 50 mm)

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 50°C

検出: UV(268 nm)

#### 6. マウス apoC-III mRNA に対するアンチセンス分子の再設計

マウスの apoC-III mRNA (Accession ID: NM\_023114) に対して、5塩基間隔で全103種の14塩基長のアンチセンスを設計し、2',4'-BNA を搭載したアンチセンスを合成した。

#### 7. マウス肝臓初代培養細胞の単離

麻酔下、マウスの腹壁をイソジン液で消毒した後、開腹し、上腸間膜静脈を露出させた。24G サーフロー針を上腸間膜静脈に穿刺し、内筒を抜き、空気が入らないようにサーフロー針外筒とペリスタポンプのチュ

ーブを接続し、前灌流用灌流液を 30~50 mL/5 min 灌流を行った。次にコラゲナーゼ灌流液を 6~10/min で灌流し、ポンプを止めた。肝臓を摘出し、10 cm デッシュに上で軽く解した後、William's E medium を 10 mL 注いだ。この細胞混濁液をセルストレイナーに通して氷冷した 50 mL 遠沈管へと移した。4°C、500 rpm、90 秒遠心し、クリーンベンチで上清を除去し、新たな培養液を 10 mL 注いで細胞のペレットを再懸濁し、さらに同条件で遠心した。この操作を上清の濁りがなくなるまで行った。最後に William's E medium (10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMax) でペレットを解したものをデッシュに移し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### 8. *In vitro* トランスフェクション実験

3.3×10<sup>5</sup> cells/mL に調製したマウス肝実質細胞を、96 ウェル平底マイクロプレート (IWAKI) に播き、37°C にて 5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した。各アンチセンスが最終濃度 0.4, 2, 10 nM となるように Lipofectamine 2000 (Life Technologies) 及び Opti-MEM (Life Technologies) を混合し、室温にて 20 分間静置し、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た。この後、TaqMan<sup>®</sup> Fast Cells-to-Ct<sup>™</sup> Kit (Life Technologies) を用いて細胞より RNA を回収した。

#### 9. Realtime RT-PCR 解析

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、ハウススキーピング遺伝子の 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. 新規人工核酸 2',4'-BNA<sup>AM</sup> のヌクレオシド合成と 2'-窒素上の置換基変換

本研究で合成した各種 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 誘導体を搭載したアンチセンス分子の標的 RNA との結合親和性の評価については、相補鎖核酸との *T<sub>m</sub>* 測定により行った。その結果、アミド窒素上の置換基のかさ高さが大きくなるに従って *T<sub>m</sub>* 値は減少傾向を示したが、依然として相補 RNA 鎖との結合親和性は天然 DNA 鎖よりも高く、十分な結合親和性を保持していることが確認できた。一方、AM[nPr] および AM[IP] 修飾オリゴヌクレオチドを比較すると AM[IP] 修飾の方が若干ながら *T<sub>m</sub>* 値が高い傾向にあった。また、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]、AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph] 修飾のように炭素鎖が直鎖の場合には、*T<sub>m</sub>* 値の著しい低下を認めた (表 1)。

ApoC-III 配列へ AM[NR]-T を 6 残基修飾した配列での脂溶性について検証するために、HPLC クロマトグラフィーを用いて各オリゴヌクレオチドの溶出時間を検討した。結果、溶出順序は、AM[R]-T を複数導入する

ことにより、オリゴヌクレオチドの極性が大きく変化することがわかった (図2)。

次に、それぞれの置換基が核酸分解酵素に対する安定性にどれだけ影響を与え得るか評価した。比較のために用いる天然 (H) および2',4'-BNA搭載オリゴヌクレオチド (I)に加え、リンケージをホスホロチオエート化したオリゴヌクレオチド (Hs)、AM[Me]オリゴヌクレオチド (As)を含む10種類のオリゴヌクレオチドに対して蛇毒由来のエキソヌクレアーゼを作用させ、経時的にHPLCにより分析した。天然のオリゴヌクレオチド(H)が2分で消失する高濃度酵素条件において、AM[Et] (B)とAM[IP] (C)を比較すると、AM[IP] (C)が40分経過後55%程の残存率であったのに対し、AM[Et] (B)は85%以上の残存率を示し、大きく酵素耐性を向上させた。また、極性基を有するAM[CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>] (F)の残率は30%程度であり、2',4'-BNAと同等の安定性とどまった。今回用いた多くのAM[R]修飾オリゴヌクレオチドにおいて、対応する2',4'-BNA修飾オリゴヌクレオチド (I)よりも高い酵素耐性能が確認されている。また、これまでの知見通り、リンケージをホスホロチオエート化しているオリゴヌクレオチド (Hs) は40 分後にも90%以上の残存率と、高い酵素耐性能を示したが、AM[Me]-T修飾することでさらに酵素に対する安定性が向上した。

2. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の設計および*in vitro*スクリーニング

昨年度は 13 塩基長のアンチセンス分子を 9 種設計したが、中でも効果の高かった **A346SL13** (5'-CTGcatggcaCCT-3') の *in vivo* での効果については mRNA のサイレンシングは良好であったが、軽度のトランスアミナーゼの上昇と肝臓細胞中への浸潤が認められ、安全性への懸念が残った。より網羅的なスクリーニングを行わなければ優れた候補品を選択する事は出来ないと考え、薬効の向上と毒性の改善を目指し、apoC-III mRNA の全領域を標的としたグローバルスクリーニングを励行すべく、100 種余りのアンチセンスの設計を行った。

ここで設計したアンチセンス分子について、*in vitro* でのスクリーニングアッセイを行った。昨年度から大きく変更した点は、スクリーニングに用いる細胞種である。これまで NMuLi と呼ばれるマウスの肝臓由来の癌細胞を用いて検討を行ってきたが、そもそも apoC-III の mRNA の発現量が個体のそれを大きく下回るために、*in vitro* のスクリーニングアッセイのためにアッセイスケールを落とし込むことが困難であったことと、アッセイ結果の *in vivo* の効果への外挿性にも不安があった。本年度は、この点についてマウス個体の肝臓から採取したプライマリー細胞を用いる事によってこの問題が解決する事を見出し、これを用いてスクリーニング評価を行った。103 種のアンチセンスのうち、まず 15 塩基ごとにあたる約 30 種のアンチセンスのスクリーニングを行った。結果を図 3 に示す。濃度依存的な効果が認められ、最終 10 nM

の濃度においては最大約 80%の apoC-III mRNA の発現抑制効果が見られた。さらに驚くべきことに、効果が高い効果を示すアンチセンス分子は特に 3'-UTR 部分に集中している事が明らかとなった。また、昨年度に見出した **A346SL13** にあたる付近のアンチセンスを見ると一定の効果は示しているが、3'-UTR 領域に設計したものの方が遥かに高い効果が認められた。

続いて、一次スクリーニングにて有効性が見出されたアンチセンスの周辺配列について肝臓初代培養細胞を用いて二次スクリーニングを行った。周辺配列においても類似の高い活性を示した(図 4)。また濃度依存的な効果も見出された。

本スクリーニングにおいて高い効果を示した配列の周辺について2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンス分子を約40種設計し、合成を行った。肝臓の初代培養細胞でのスクリーニング技術が確立したので、2',4'-BNA<sup>NC</sup>型についても今後、同様の多段階スクリーニングを行う予定である。

#### D. 考察

昨年度の研究より、アンチセンス分子に BNA 修飾を施すことにより非常に高い mRNA 阻害効果とトリグリセリド低下効果が得られる事が見出された。一方で、その標的配列や BNA の種類により薬効や安全性に大きな違いが存在する事がみだされた。このような背景からさらに厳密な網羅的スクリーニングが必要であることとケミストリーごとに最適な標的配列が

存在し得ることが示唆された。本年度は、この点に鑑みて 100 種を超える apoC-III アンチセンスを設計・合成し、初代培養肝細胞を用いてスクリーニング評価を行った。これらの結果から特に 3'-UTR を標的とした BNA アンチセンスが高い薬効を示すことが見出された。一般的に mRNA の 3'-UTR には miRNA の結合サイトが存在するなど安定性を調節するために重要な部分である。このためアンチセンスがこの部分を切断することによってその安定性に大きな擾動を与えたことが考えられる。このことから 3'-UTR を標的とした 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンスも同様に高い効果を示すことが予想される。さらには、ヒトの apoC-III mRNA においても同様の傾向が期待出来る。

他方で、2',4'-BNA<sup>NC</sup> や 2',4'-BNA<sup>AM</sup> と行った次世代の BNA は、理由は定かではないが、内外の研究から高い安全性が指摘されている。加えて、架橋部に窒素を有する BNA アナログにおいては窒素の原子価の性質上、置換基を導入出来る点でプロトタイプの 2',4'-BNA よりも幅広い展開性が期待される。すなわち、置換基を様々に変更することによって医薬品としての性質を大きく変化させることが可能となる。ここでは、2',4'-BNA<sup>AM</sup> の置換基として、脂溶性の高い側鎖を導入することに成功した。これらを分子内に搭載したアンチセンス分子は、実際にその脂溶性が大きく変化し、体内動態、特に肝臓への移行性に大きな影響を与えうることが示唆された。肝臓への