

高い移行性は効果の増強並びに投与量の低下に繋がるのが期待出来る点で大きな進歩と言える。ただ、現状では2',4'-BNA<sup>AM</sup>として使用できる塩基の種類に制限があることや大量供給の問題があり、次年度以降に化学合成の効率化を進めていきたい。

#### 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、網羅的なスクリーニングを行った。初代肝臓培養細胞を用いることにより、より *in vivo* の状況を反映した形のスクリーニングを可能にした。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。他方で、2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンス分子を設計合成し、これらについてのスクリーニングを進めている状況である。さらに次世代型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成功した。

#### 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

原著論文

- 1) Morihiko K, Kodama T, Kentefu, Yoshihiro M, Veedu R. N, Obika S,

Selenomethylene-Locked Nucleic Acid (SeLNA) Enables Reversible Hybridization in Response to Redox Changes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, in press.

- 2) Wheeler M, Chardon A, Goubet A, Morihiko K, Tsan S. Y, Edwards S. L, Kodama T, Obika S, Veedu R. N, Synthesis of Selenomethylene-locked Nucleic Acid (SeLNA)-modified Oligonucleotides by Polymerases, *Chem. Commun*, 48, 11020-11022, 2012.
- 3) Hari Y, Osawa T, Obika S, Synthesis and Duplex-forming Ability of Oligonucleotides Containing 4'-Carboxythymidine Analogs, *Org. Biomol. Chem.*, 10, 9639-9649, 2012.
- 4) Kang J.-H, Tachibana Y, Obika S, Harada-Shiba M, Yamaoka T, Efficient Reduction of Serum Cholesterol by Combining a Liver-targeted Gene Delivery System with Chemically Modified Apolipoprotein B siRNA, *J. Controlled Release*, 163, 119-124, 2012.
- 5) Yahara A, Shrestha A. R, Yamamoto T, Hari Y, Osawa T, Yamaguchi M, Nishida M, Kodama T, Obika S, Amido-Bridged Nucleic Acids (AmNAs): Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro Antisense Potency, *ChemBioChem*, 13, 2513-2516, 2012.
- 6) Yamamoto T, Yasuhara H, Wada F,

- Harada-Shiba M, Imanishi T, Obika S, Superior Silencing by 2',4'-BNA<sup>NC</sup>-based Short Antisense Oligonucleotides Compared to 2',4'-BNA/LNA-based Apolipoprotein B Antisense Inhibitors, *J. Nucleic Acids Res.*, 707323, 2012.
- 7) Wada S, Obika S, Shibata M, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Torigoe H, Shiba M, Development of a 2',4'-BNA/LNA Based siRNA for Dyslipidemia and Assessment of the Effects of its Chemical Modifications in vivo, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 1, e45, 2012.
- 8) Kawada Y, Kodama T, Miyashita K, Imanishi T, Obika S, Synthesis and Evaluation of Novel Caged DNA Alkylating Agents Bearing 3,4-Epoxy piperidine Structure, *Org. Biomol. Chem.*, 10, 5102-5108, 2012.
- 9) Rahman S. M. A, Baba T, Kodama T, Islam M. A, Obika S, Hybridizing Ability and Nuclease Resistance Profile of Backbone Modified Cationic Phosphorothioate Oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 4098-4102, 2012.
- 10) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Narukawa K, Sasaki K, Shibata M, 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 Acids*, 1, e22; 1-11, 2012.
- 11) 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.
- 12) Hari Y, Obika S, Imanishi T, Towards the Sequence-Selective Recognition of Double-Stranded DNA Containing Pyrimidine-Purine Interruptions by Triplex-Forming Oligonucleotides (Review), *Eur. J. Org. Chem.*, 2875-2887, 2012.
- 13) 桑原 正靖、小比賀 聡, 医薬・診断薬への応用に向けた化学修飾核酸アプタマーの開発 (Review), *化学工業*, 63, 42-48, 2012.
- 14) 小比賀 聡, 糖部架橋型核酸の医薬への応用 (Review), *医薬ジャーナル*, 48, 65-69, 2012.
2. 学会発表
- 1) 原 孝志、兒玉 哲也、竹垣 裕美、森 廣 邦彦、伊藤 浩介、小比賀 聡, 2',4'-BNA/LNA-プリン塩基類縁体の二重鎖形成能に及ぼす二面角  $\chi$  の影響, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27 日-3 月 30 日, 横浜
- 2) 森廣 邦彦、兒玉 哲也、肯 特夫、百

- 合 義大、Rakesh N. Veedu、小比賀 聡、  
セレノメチレン架橋型人工核酸の開発と酸化還元スイッチへの応用、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-3 月 30 日、横浜
- 3) 山本 剛史、斯波 真理子、安原 秀典、  
中谷 萌夏、小比賀 聡、高力 佳抗  
PCSK9 アンチセンスの探索研究、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-3 月 30 日、横浜
- 4) Mori K, Kodama T, Obika S, Synthesis and properties of a nucleic acid bearing boat-shaped pyranose sugar, 13th Tetrahedron Symposium - Asia Edition, 2012 年 11 月 27 日-11 月 30 日、台北
- 5) Fujisaka A, Hari Y, Takuma H, Pang J, Imanishi T, Obika S, Synthesis and Property of Oligonucleotides Modified with 2',4'-BNANC Bearing Adenine, Guanine, Thymine and 5-Methylcytosine, 13th Tetrahedron Symposium - Asia Edition, 2012 年 11 月 27 日-11 月 30 日、台北
- 6) Yasuhara H, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Quantitative measurement of hepatic accumulation of phosphorothioated antisense oligonucleotides modified with bridged nucleic acids by elisa-based oligonucleotide detection method, 日本薬物動態学会 第27回年会、2012年11月20日-11月22日、東京
- 7) Kotobuki Y, Hari Y, Shrestha A. R, Obika S, Synthesis and properties of guanidine-bridged nucleic acid: The effect of cationic bridge on duplex stability, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-11 月 17 日、名古屋
- 8) Morihiro K, Kodama T, Obika S, Light-triggered Strand-displacement Reaction Using Recognition-base-changeable Nucleic Acids, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2012 年 11 月 15 日-11 月 17 日、名古屋
- 9) 中原 基、張功 幸、小比賀 聡、クリックケミストリーを活用した新規人工核酸塩基の開発と三重鎖形成核酸への応用、第 38 回 反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 5 日-11 月 6 日、東京
- 10) 藤坂 朱紀、張 功幸、田熊 寛子、逢 娟娟、今西 武、小比賀 聡、核酸塩基部にアデニン、グアニン、チミン、5-メチルシトシンを持つ N-メチル-2',4'-BNA<sup>NC</sup> の合成、第 38 回 反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 5 日-11 月 6 日、東京
- 11) Yahara A, Shrestha A. R, Yamamoto T, Hari Y, Osawa T, Yamaguchi M, Nishida M, Kodama T, Obika S, Amido-bridged Nucleic Acid: Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro Antisense Potency, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide

- Therapeutics Society, 2012年10月28日-10月31日, Boston
- 12) Yamamoto T, Yasuhara H, Nakatani M, Shibata M-A, Obika S, Harada-Shiba M, Correction of Murine Hypertriglyceridemia by BNA Antisense Oligonucleotides Targeting Apolipoprotein C-III, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2012年10月28日-10月31日, Boston
- 13) Yasuhara H, Yamamoto T, Nakatani M, Wada S, Torigoe H, Yamaoka T, Shibata M-A, Imanishi T, Harada-Shiba M, Obika S, Design, Screening of Efficient BNA Antisense Oligonucleotides for PCSK9, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2012年10月28日-10月31日, Boston
- 14) Wada S, Obika S, Shibata M-A, Yamamoto T, Yamaoka T, and Harada-Shiba M, In Vivo Assessment of the Chemical Modification of siRNA, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2012年10月28日-10月31日, Boston
- 15) 張 功幸、赤羽 昌明、小比賀 聡, CG 塩基対を含む二重鎖 DNA と安定な三重差核酸を形成する人工核酸の開発-二重鎖 DNA と三重鎖核酸を形成する人工核酸の開発-,第 62 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012年10月20日, 兵庫
- 16) 中原 基、張 功幸、小比賀 聡, クリックケミストリーによる塩基修飾型人工核酸の合成及び二重鎖 DNA 認識能評価-非天然型核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドの二重鎖 DNA 認識能-, 第 62 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012年10月20日, 兵庫
- 17) 安原 秀典、山本 剛史、和田 俊輔、中谷 萌夏、和田 郁人、鳥越 秀峰、山岡 哲二、柴田 雅朗、今西 武、斯波 真理子、小比賀 聡, PCSK9 阻害による家族性高コレステロール血症治療のための高機能性核酸医薬品の開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012年9月24日-9月26日, 仙台
- 18) 安原 秀典、山本 剛史、中谷 萌夏、柴田 雅朗、小比賀 聡、斯波 真理子, 抗 ApoC-III アンチセンス核酸による高トリグリセリド血症治療薬の開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012年9月24日-9月26日, 仙台
- 19) 壽 悠太郎、張 功幸、Shrestha Ajaya Ram、小比賀 聡, 新規架橋型人工核酸の合成と機能評価;グアニジノ基による架橋部へのカチオン導入の効果, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012年9月24日-9月26日, 仙台
- 20) Hara T, Kodama T, Takegaki Y, Morihiko K, Ito K.R, Obika S, Synthesis and Hybridization Property of Oligonucleotides

- Containing 2',4'-BNA-7-Deazaguanine Analog, XX IRT - 20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012年8月5日-2012年8月9日, モントリオール
- 21) Mori K, Kodama T, Obika S, Investigation of the Factor Affecting the Duplex-Forming Ability of Boat-Shaped Glucopyranosyl Nucleic Acid, XX IRT - 20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012年8月5日-2012年8月9日, モントリオール
- 22) 安原 秀典、山本 剛史、和田 俊輔、小比賀 聡、斯波 真理子、PCSK9 を標的とした人工核酸 BNA 搭載型アンチセンス医薬の開発, 第12回遺伝子・デリバリー研究会 夏季セミナー, 2012年7月30日-7月31日, 北九州
- 23) Yamamoto T, Yasuhara H, Nakatani M, Shibata M-A, Obika S, Harada-Shiba M, Hypertriglyceridemic mice were responsive to Apolipoprotein C-III-lowering therapy by BNA-modified antisense oligonucleotides, 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2012年7月19日-7月20日, 福岡
- 24) 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, Screening and Selection of Efficient BNA-Modified anti-PCSK9 Antisenses, 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2012年7月19日-7月20日, 福岡
- 25) 森廣 邦彦、兒玉 哲也、小比賀 聡, 光刺激により認識塩基がグアニンからアデニンに変化するシン配向型人工核酸の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会, 2012年6月7日-6月9日, 京都
- 26) Osawa T, Hari Y, Obika S, Development of a novel bridged nucleic acid based on intramolecular hydrogen bond formation, The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, 2012年5月23日-5月25日, 京都
- 27) Mori K, Kodama T, Obika S, A Boat-Shaped Glucopyranosyl Nucleic Acid: Design, Synthesis and Hybridization Properties, The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, 2012年5月23日-5月25日, 京都

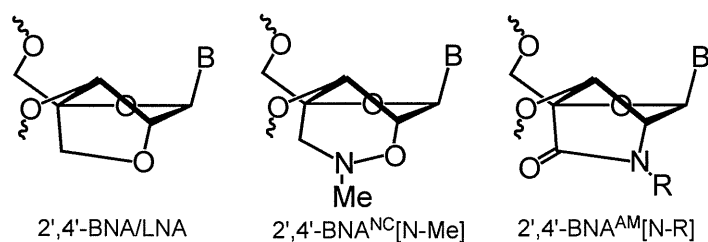
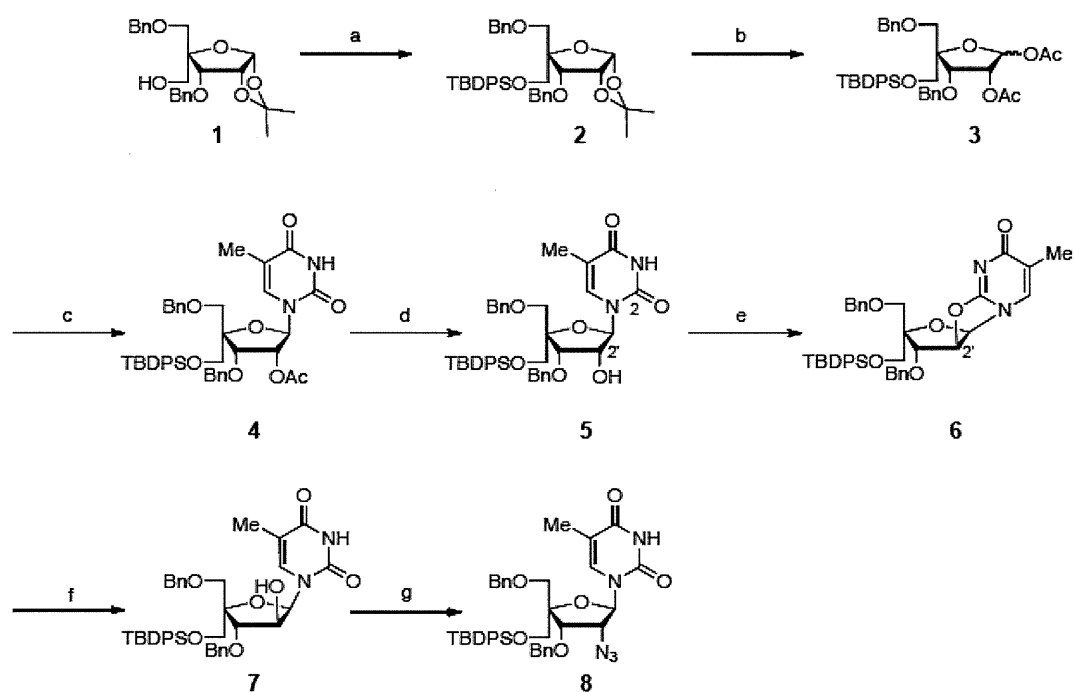
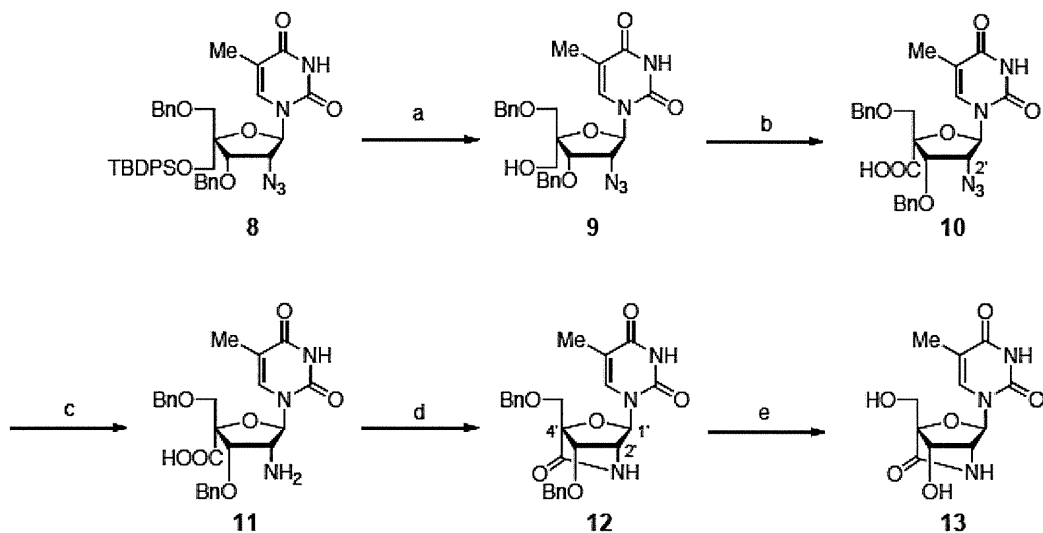


図 1. 本研究で用いた糖部架橋型人工核酸「BNA」の化学構造。B は塩基、R は種々の置換基を指す。



**Scheme 1.** Reagents and conditions: a) TBDPSCI, TEA, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 86%; b) Ac<sub>2</sub>O, c.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, rt; c) thymine, BSA, TMSOTf, MeCN, reflux, 49% (2 steps); d) 40% MeNH<sub>2</sub> aq., THF, rt, quant.; e) TfCl, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 97%; f) 1N NaOH aq., THF, rt, quant.; g) Tf<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, then NaN<sub>3</sub>, DMF, rt, 66% (2 steps).



**Scheme 2.** Reagents and conditions: a) 1N TBAF/THF, THF, rt, 92%; b) PDC, MS4Å, DMF, rt, quant.; c) (*n*-Bu)<sub>3</sub>P, THF/H<sub>2</sub>O, rt; d) EDCI, DMF, rt, 54% (2 steps); e) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub>, THF, rt, 93%.

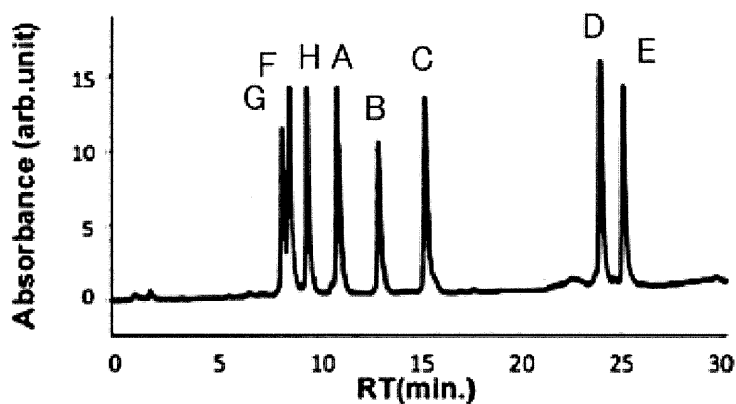


図2. 各種置換基を有する2',4'-BNA<sup>AM</sup>搭載型アンチセンス分子のHPLCクロマトグラフィー。  
 Conditions : eluent A : 0.1M TEAA buffer, eluent B : A/MeCN (1/1, v/v), gradient : MeCN conc. = 5-33% (30min), 260 nm. Strand: 5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3', t = AM[CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H] (G), AM[CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>] (F), thymidine (H), AM[Me] (A), AM[Et] (B), AM[IP] (C), AM[Bn] (D), AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph] (E). Me : メチル基、Et: イソプロピル基、IP: イソプロピル基、Bn: ベンジル基

表 1. 各種 2',4'-BNA<sup>AM</sup> を搭載した apoC-III アンチセンスの  $T_m$  値

Oligonucleotides		$T_m$ (°C) ( $\Delta T_m$ /mod.)
5'-d(TTATCCAGCTTTATTA)-3'	H	49 (-)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	A	70 (+4)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	B	70 (+4)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	C	67 (+3)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	D	68 (+3)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	E	59 (+2)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	F	68 (+3)
5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3'	G	65 (+3)

Conditions : 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min, 260 nm. Strand: 5'-d(ttAtCCAGCTTtAttA)-3', t = AM[CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H] (G), AM[CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>] (F), thymidine (H), AM[Me] (A), AM[Et] (B), AM[IP] (C), AM[Bn] (D), AM[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph] (E). Target strand : 3'-r(AAUAGGUCGAAAUAAU)-5'. Me : メチル基、Et: イソプロピル基、IP: イソプロピル基、Bn: ベンジル基



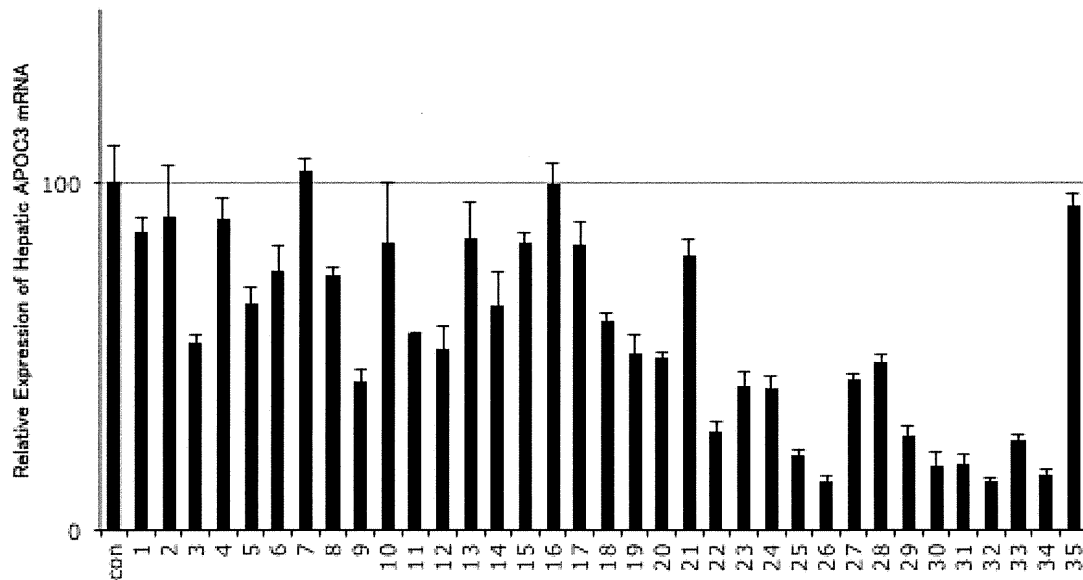


図 3. マウスの初代培養肝臓細胞を用いたアンチセンス分子の薬効スクリーニング結果。2',4'-BNA を搭載したアンチセンスを 35 種選択し、それぞれを Lipofectamine2000 とともに最終 10 nM の濃度で添加し、4 時間インキュベート (35°C, 5% CO<sub>2</sub>) し、培地交換後 20 時間培養を行った。

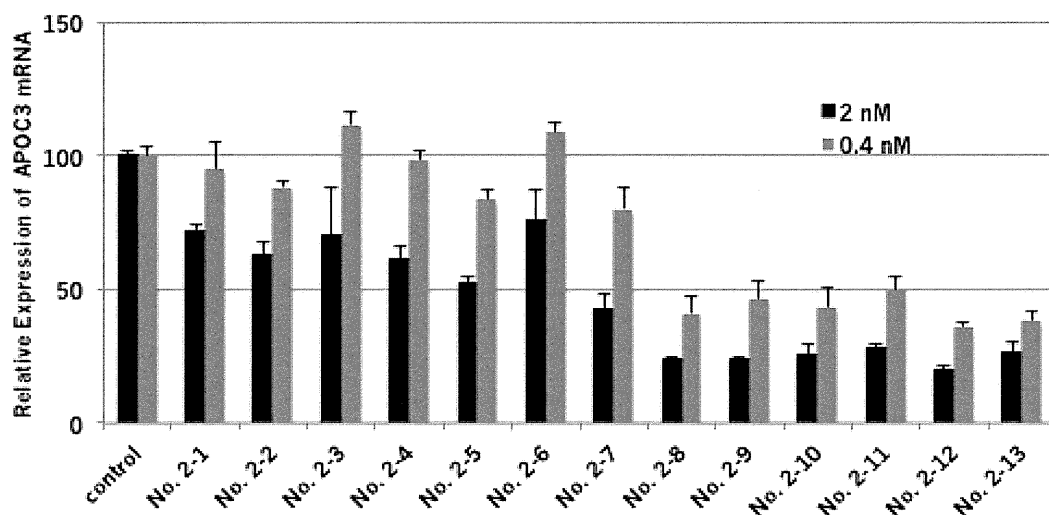


図 4. マウスの初代培養肝臓細胞を用いたアンチセンス分子の 2<sup>nd</sup> スクリーニング。2',4'-BNA を搭載したアンチセンスを 35 種選択し、それぞれを Lipofectamine2000 とともに最終 0.4 および 2 nM の濃度で添加し、4 時間インキュベート (35°C, 5% CO<sub>2</sub>) し、培地交換後 20 時間培養を行った。

アポC3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-

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・部長

研究要旨

アポリポ蛋白C-III (apoC-III) は、レムナントリポ蛋白 (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、apoC-IIIを特異的・選択的に阻害する新規人工核酸「BNA」を搭載したアンチセンス医薬を探索し、高TG血症、抗動脈硬化を示す新しい薬剤の開発を行う。昨年度は、脂質異常症モデルマウスを用いた検討から2',4'-BNAを搭載したアンチセンス分子が極めて鋭敏に血清トリグリセリド値を低下させることを証明した。他方で、優れたBNA搭載アンチセンスの開発を目的とした*in vitro*スクリーニングから選出されたアンチセンスを*in vivo*にて評価したところ、高いトリグリセリドの低下を認めた一方で、軽度な肝毒性を見出した。本年度は、さらに広範囲な網羅的スクリーニングにより選出された数種のアンチセンス分子について*in vivo*レベルでの薬効スクリーニングを敢行し、*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、2',4'-BNA を超える有用性を有することが期待される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の*in vivo*活性を評価した。その結果、2',4'-BNA<sup>NC</sup> は、従来の2',4'-BNA と同等の活性および安全性を示した。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。

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

堀 美香  
柴田 映子  
和田 俊輔  
安原 秀典  
和田 郁人  
森本 めぐむ  
湯浅 由美子  
吉田 晶子

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀 聡  
山本 剛

#### A. 研究目的

高トリグリセリド(TG)血症患者のうち約5%が遺伝性であり、家族性複合型高脂血症や高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、強力なTG低下作用を有する薬剤がないことなどが原因で十分な治療が困難である。またメタボリックシンドロームや糖尿病のような冠動脈疾患のリスク因子が重積したような状況においては特に高TG血症への介入が奏功することが疫学的にも証明されており、近年のライフスタイルの変化を鑑みても、高TG血症の管理が残された喫緊の課題である。このような背景から本研究では新しい高トリグリセリド血症治療薬の開発を目指す。

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。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VLDL上に存在するアポリポタンパク質C-III (apoC-III)が大きな役割を担っている。apoC-IIIはLPL活性の阻害や、TRLsとLDL受容体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、動脈硬化薬への直接的な作用も証明されつつある。本研究では、高親和性人工核酸「BNA」を搭載したアンチセンスを用いた選択的apoC-III阻害薬の臨床開発を指向し、概念の実証とともに臨床試験に資する情報の蓄積を目指す。

昨年度は、従来型のホスホロチオアートアンチセンスに2',4'-BNAを搭載することによって大幅なアンチセンス効果の改善が脂質異常症モデルマウスを用いた検討において見出され、本方法論の有用性の一端を証明することに成功した。またさらに、鎖長や標的配列の修飾に伴って効果や安全性が大きく変動することも見出した。昨年度の検討の中で、*in vivo*においても活性が良好なアンチセンスを見出すことに成功した一方で、更なる薬効改善と安全性の向上が求められる結果となった。本年度は、①2',4'-BNAにくわえて、2',4'-BNA<sup>NC</sup>や

2',4'-BNA<sup>AM</sup>などの次世代型 BNA を用いた検討を行い、活性や安全性への影響を検証する、②より効果の高い標的部位を模索する、③2',4'-BNA<sup>AM</sup>の置換基を変化させた時の薬効と動態を観察し、置換基の効果を見積もることで薬効や安全性の最大化を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 高 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) を利用した。

### 2. 反復投与試験 (1)

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。2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、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日目にマウスを麻酔 (塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファノール混合液) 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。

### 3. 反復投与試験 (2)

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。AM20 (5'-tcT<sup>A</sup>T<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>ccagcttT<sup>A</sup>aT<sup>A</sup>T<sup>A</sup>agg-3')

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1.5週間高脂肪食 F2WTD (オリエンタル酵母工業株式会社) 負荷の後、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。ここで、大文字<sup>A</sup>は2',4'-BNA<sup>AM</sup>を示す。

### 4. 肝臓からの mRNA 抽出

凍結した肝臓の切片を1 mL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、13,200 rpm、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、13,200 rpm、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、13,200 rpm、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apoC-IIIのmRNA量の比で評価した。使用したTaqMan Gene Expression IDを示す；Mm00445670\_m1 (apoc3), Mm99999915\_m1 (gapdh)。

## 6. ウェスタンブロッティング

マウス尾静脈より採取した血液より得た血清を5  $\mu$ Lを使用し、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 (16%) (Invitrogen, Cat#EC6025BOX)の各レーンにタンパク質量10  $\mu$ gずつアプライし、180 Vにて60分間電気泳動した。Immun-Blot<sup>®</sup> PVDF Membrane (Biorad, Cat#162-0177) を用いて200 mA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)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. 血清パラメータの測定

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、5000 rpm、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TG値を定量した。血清10  $\mu$ Lに発色試液を1.5 mL加えて37°Cにて5分間加温し、分光光度計を用いて600 nmの吸光度を測定し、標準試薬による検量線を用いて値を算出した。総コレステロール値はコレステロールE-テストワコー(和光純薬工業株式会社, Cat#439-1751)を用いて測定した。アディポネクチンについては、血清を用いて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。血清10  $\mu$ LにAST値測定用またはALT値測定用基質酵素液250  $\mu$ Lを加えて37°Cにて5分間加温し、発色試液250  $\mu$ Lを加えて37°Cにて20分間加温した。次いで、反応停止液1 mLを加えた後、分光光度計を用いて555 nm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  $\mu$ Lに発色試液A 1 mLを加えて37°Cにて15分間加温し、発色試液B 1 mLを加えて37°Cにて10分間加温後、分光光度計を用いて570 nm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  $\mu$ Lに酵素発色試液A 300  $\mu$ Lを加えて37°Cにて5分間加温し、発色試液B 100  $\mu$ Lを加えて37°Cにて5分間加温後、分光光度計を用いて600

nm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。

## 8. 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。これらの修飾DNA は日本バイオサービスから購入した。Reacti-Bind NeutrAvidincoated polystyrene strip plates (Thermo fisher Scientific, Cat#436016) をサーモフィッシャーより購入した。Template DNA をバッファー (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 0.9 M NaCl, and 0.24% Tween 20) に溶解し、100 nM とした。Ligation Probe と 1.5 unit/well の T4 DNA ligase (TaKaRa, Cat#2011A) をバッファー (66 mM Tris-HCl (pH7.6), 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.1 mM ATP) に溶解し、200 nM に調製した。洗浄バッファー (25 mM Tris-HCl (pH7.2), 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20) を準備した。抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ抗体 (Roche, Cat#1093274) を1:2000の割合で Superblock blocking buffer (Pierce, Cat#37515) を用いて希釈した。アルカリホスファターゼの基質として AttoPhos® Fluorescent AP Substrate System, (Promega, Cat#S1001)を使用した。

### [アッセイ]

2 mL チューブに凍結肝臓切片、1 mL の PBS およびビーズ (ø = 5 mm, Irie) を添加し、TissueLyser II を用いて2分間破碎した。総タンパク質量を BIO RAD DC Protein Assay を用いて定量し、10 mg/L となるように調製した。検量線を 128 pM から 400 nM の範囲で 6 点採った。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。その後 200 μL の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。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。その後 200 μL の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。さらに 100 μL の抗ジゴキシゲニン-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。3 回洗浄した後、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。

### (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. 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<sup>NC</sup> 搭載型抗 apoC-III アンチセンスが対応する BNA と同様の薬効を示しうるか検証するために、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(図 1)。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(図 2)。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。

#### 2. 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(図4)。肝毒性については **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(図5)。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も肝毒性の有無に違いを認めた。

### 3. 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>はリボース環の2'位窒素上の置換基を手軽に変化させることが出来る新しい人工核酸である。この部位の置換基を様々に変更することによって、結合親和性や生体内での安定性のみならず、体内動態や薬効をも修飾しうる。本研究では、小比賀らのグループで化学合成された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。その結果、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（図6）。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）（図8）。このとき、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（図7）。

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。

### 4. 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

昨年度および本年度の検討から、BNA修飾がアンチセンスのサイレンシング効果に大きな影響を与え、マウスの脂質異常を顕著に改善することを実証した。しかしながら、アンチセンス分子の投与に起因する肝毒性が一部認められた。我々はこの毒性の回避が臨床開発における肝となると考え、改善することを試みた。昨年度の研究において、少数のアンチセンス分子を用いた*in vitro*スクリーニングにより選抜されたアンチセンスは優れた効果を発揮することが見出されたが、一部肝毒性の発現を認めた。毒性が無く、高い薬効を示すことが出来るアンチセンス分子を探索すべく、網羅的な*in vitro*スクリーニングが小比賀らによって実施された。その中で、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。ここではそのうちの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（図9）。この時、肝毒性



は全く認められなかった(図10)。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(図11)。

#### D. 考案

本研究は、優れた高TG血症治療薬の臨床開発を目指し、apoC-IIIを標的とした安全で特異性の極めて高いアンチセンス分子の開発を進めている。昨年度の成果では、ホスホロチオアートアンチセンスに「2',4'-BNA」を搭載した場合には*in vivo*において著明なサイレンシング効果が認められ、脂質異常症モデル動物に対しても治療効果を認めることを見出した。さらに高活性な配列を探索すべく行ったスクリーニングで見出された9種の配列のひとつについて*in vivo*で効果を検証した結果、一週間以上の高い薬効の持続が見出された一方で、肝毒性の傾向が見出された。本年度は、apoC-IIIを標的としたアンチセンス分子の薬効や安全性がBNAの化学構造の違いによって変動することを期待し、新規BNAを搭載したアンチセンス分子の効果をマウスを用いて評価した。より活性の高いアンチセンスの標的配列の同定を目指し、*in vivo*スクリーニングを実施した。

プロトタイプの2',4'-BNAを持つBNA1, BNA(TC)と新規人工核酸2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したNC(TC)を脂質異常マウスに対して複数回投与し、サイレンシング効果と血清TG値の低下効果を検証した。投与後8日後には

一様に高い脂質低下効果を示した。投与後15日後もこれらの効果は持続されていたことから、新規人工核酸2',4'-BNA<sup>NC</sup>においても2',4'-BNAと同等の効果が期待出来る。今後は安全性のパラメータについても2',4'-BNA<sup>NC</sup>は2',4'-BNAと同様の特性を有するのか、検証を進めたい。

また、小比賀らのグループによって近年開発された2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載したアンチセンス(AM20とAM16)の効果についても検証を試みた。尾静脈より単回投与で、AM20とAM16のいずれにおいても約80%のmRNA低下効果を認めた。血清TG値の変化が小さな減少にとどまったのは尾静脈投与という投与方法と、投与後の日数が5日と短かったことに由来すると考えられる。apoC-III mRNAの減少とタンパク質量の低下や血清TG値の低下に一定の時間差があるものと考えられる。2',4'-BNA<sup>NC</sup>と同様、2',4'-BNA<sup>AM</sup>もアンチセンス医薬の素材としての有用性を示すことに成功した。

さらに2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>は架橋部位の窒素上の置換基を手軽に変化させることが出来るという2',4'-BNAには無い特徴を有する人工核酸である。置換基を様々に変えることによって、アンチセンスの効果をさらに改善することに繋がると考え、疎水性の高いメチル基、ベンジル基、イソプロピル基を持つ2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載したアンチセンス分子をマウスに投与した。この結果、ベンジル基を有するアンチセンスにおいて、全く薬効が認められなかった。これは恐らくベンジル基が立体的に大きいため

にアンチセンス効果の鍵酵素であるRNase Hによる認識能が低下したためと考えられる。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。

他方で、アンチセンス効果を最大限高めるためには化学修飾の種類のみならず、標的とするmRNA上の位置や配列も重要であることが知られている。本年度は、アンチセンス分子をmRNAの全領域にもれなく設計し、標的部位と効果や毒性の関連性を見出すこととした。*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。今後は、この配列に対して2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>を適用し、さらに有効性、安全性を最大限に高め、臨床応用に向けた開発を進めていく所存である。

#### E. 結論

本研究では、2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>などの次世代型BNAが、従来の2',4'-BNAと同等のアンチセンス活性を誘導しうることを示した。昨年度に見出されたアンチセンス分子の有効性、安全性をさらに高める為に2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>の新しいケミストリーを用いること、適切な標的配列を選

択することを試み、それらが総じてapoC-IIIに対するアンチセンスの効果と安全性をためることを見出した。

#### 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

原著論文

(欧文)

- 1) Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, Harada-Shiba M: Proteomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis, Ther Apher Dial, in press
- 2) Makino H, Harada-Shiba M: New aspects of statin therapy, IEMAMC, in press
- 3) Terasaki F, Morita H, Harada-Shiba M, Ohta N, Otsuka K, Nogi S, Miyamura M, Suzuki S, Ito T, Shimomura H, Katsumata T, Miyamoto Y, Ishizaka N: A Case of Familial Hypercholesterolemia with Multiple Huge Tendinous Xanthomas and Advanced coronary Artery Atherosclerosis: Internal Medicine, in press
- 4) Shibata M-A, Ambati J, Shibata E, Yoshidome K, Harada-Shiba M: Mammary cancer gene therapy targeting lymphangiogenesis: VEGF-C siRNA and soluble VEGF receptor-s, a splicing variant, Med Mol Morphol, 45: 179-184, 2012.

- 5) Kang JH, Tachibana Y, Obika S, Harada-Shiba M, Yamaoka T: Efficient reduction of serum cholesterol by combining a liver-targeted gene delivery system with chemically modified apolipoprotein B siRNA: *J Control Release*, 163(2): 119-124, 2012.
- 6) Yamamoto T, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Imanishi T, Obika S: Superior silencing by 2',4'-BNA<sup>NC</sup>-based short antisense oligonucleotides compared to 2',4'-BNA/LNA-based apolipoprotein B antisense inhibitors: *J Nucleic Acids*, 707323, 1-7, 2012.
- 7) Harada-Shiba M, Arai H, Oikawa S, Ohta T, Okada T, Okamura T, Nohara A, Bujo H, Yokote K, Wakatsuki A, Ishibashi S, Yamashita S: Guidelines for the management of familial hypercholesterolemia: *J Atheroscler Thromb*, 19(12): 1043-1060, 2012.
- 8) Harada-Shiba M, Arai H, Okamura T, Yokote K, Oikawa S, Nohara A, Okada T, Ohta T, Bujo H, Watanabe M, Wakatsuki A, Yamashita S: Multicenter study to determine the diagnosis criteria of heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan: *J Atheroscler Thromb*, 19(11): 1019-1026, 2012.
- 9) Wada S, Obika S, Shibata M.A, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Torigoe H, Harada-Shiba M: Development of a 2',4'-BNA/LNA based siRNA for dyslipidemia and assessment of the effects of its chemical modifications *in vivo*: *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1, e45: 1-15, 2012.
- 10) 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*, 1, e22: 1-11, 2012.
- 11) 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: *Mol Ther*, 20(6): 1196-1203, 2012.
- 12) 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. *J Atheroscler Thromb*, 19(4) : 369-375, 2012.
- 13) 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. *J Atheroscler Thromb*, 19(3): 207-212, 2012.
- 14) 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. *J Atheroscler Thromb*, 19: 1-12, 2012.
- 15) 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. *J Atheroscler Thromb*, 19: 105-114, 2012.
- 16) Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K: Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia*, 55: 1689-1698. 2012.
- (和文) なし
1. 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の診断基準と治療, 動脈硬化予防 Vol.11 No.4, 38-43, 2013.
- 2) 斯波真理子: 高コレステロール血症の分子疫学と分子標的治療, *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2013: 131-136, 2013.
- 3) 榎野久士, 斯波真理子: FH における LDL アフェレシス—最近の知見—, *日本アフェレシス学会雑誌* 第 32 巻 1 号: 43-48, 2013.
- 4) 斯波真理子: 常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症, 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下: 42-46, 2012.12
- 5) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症, 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下: 37-41, 2012.12
- 6) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症とその実践的治療法, *Medical Practice* 第 29 巻 12 号: 2131-2134, 2012.
- 7) 田中彩子, 岩本紀之, 榎野久士, 田中裕史, 松田均, 湊谷謙司, 斯波真理子: 濃厚な大動脈瘤の家族歴を有する家族性高コレステロール血症の 1 例, *Progress in Medicine* Vol.32 No.8: 157-162(1743-1748), 2012.
- 8) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症患者の管理, 産科と婦人科 第 79 巻 8 号: 1007-1012(69-74), 2012.
- 9) 斯波真理子: 誰もが遭遇するヘテロ接合型 FH アキレス腱の触診を, *Medical Tribune circulation today*