

2012 7: 7, 2012.

10) 柴田雅朗, Jayakrishna Ambati, 柴田映子, Romulo JC Albuquerque, 森本純司, 斯波真理子, 藤岡重和, 伊藤裕子, 大槻勝紀: スプライシング・バリエーションである可溶性 VEGF 受容体 2 型のマウス乳癌リンパ節転移に対する抑制効果, リンパ学 第 35 巻 第 1 号: 23-28, 2012.

11) 斯波真理子: 身近にいる家族性高脂血症, 日経メディカル 4 月号: 34-35, 2012.

学会発表

(国内)

1) Harada-Shiba M, Development of Anti Atherogenic Drug Targeting Apolipoprotein C-III Using Bridgend Nucleic Acids(BNAs), 第 77 回日本循環器学会学術集会, Featured Research Session 15(MD), 2013 年 3 月 15 日~17 日, 横浜

2) 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 デコイと SATB1 siRNA のマウス乳癌に対する転移抑制作用の検討: 可溶性 VEGFR-3 デコイは乳癌転移を抑制した, 第 29 回日本毒性病理学会, 2013 年 1 月 31 日~2 月 1 日, 茨城

3) Hori M, Harada-Shiba M, The Bioactive Peptide Neuromedin U is Associated with Lipid Metabolism and Inflammation, 第 35 回日本分子

生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日, 福岡

4) 小川浩司, 西垣孝行, 中崎宏則, 守田佳保里, 池宮裕太, 湯浅由美子, 田中彩子, 榎野久士, 林輝行, 岸本一郎, 斯波真理子, LDL-apheresis 施行方法の違いによる炎症性マーカーの変動, 第 33 回日本アフェレシス学会学術大会, 2012 年 11 月 8 日~10 日, 長崎

5) 湯浅由美子, 榎野久士, 肥塚諒, 田中彩子, 原田光一郎, 河原田修身, 野嶋祐兵, 岡島年也, 岸本一郎, 南野直人, 斯波真理子, ASO 患者に対する LDL-apheresis 治療後排液のプロテオーム解析, 第 33 回日本アフェレシス学会学術大会, 2012 年 11 月 8 日~10 日, 長崎

6) 田中彩子, 榎野久士, 肥塚諒, 椽谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 岡島年也, 野嶋祐兵, 河原田修身, 原田光一郎, 湯浅由美子, 斯波真理子, 岸本一郎, 閉塞性下肢動脈硬化症に対する LDL アフェレシスの有効性についての検討, 第 33 回日本アフェレシス学会学術大会, 2012 年 11 月 8 日~10 日, 長崎

7) 山岡哲二, 三原元気, 橘洋一, 小宮山萌美, 姜貞勲, 森反俊幸, 中沖隆彦, 鳥越秀峰, 斯波真理子, 小比賀聡, 抗 PCSK9 アンチセンス BNA の低容量長期投与に関する検討, アンチセンス・遺伝子・デリバリー

- シンポジウム 2012, ポスター発表, 2012年9月24日~26日, 仙台
- 8) 柴田映子, 位高啓史, 石井武彦, 西山伸宏, 宮田完二郎, 森本めぐむ, 西川元也, 高倉喜信, 柴田雅朗, 片岡一則, 斯波真理子, B-H poiyplex を用いた嚢胞性線維症モデル動物への遺伝子導入, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, ポスター発表, 2012年9月24日~26日, 仙台
- 9) 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, ポスター発表, 2012年9月24日~26日, 仙台
- 10) 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, ポスター発表, 2012年9月24日~26日, 仙台
- 11) 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, 一般講演, 2012年9月24日~26日, 仙台
- 12) 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~31日, 北九州
- 13) Yuasa Y, Makino H, Minamino N, Kishimoto I, Osaki T, Hori M, Shibata E, Ishihara M, Iwasaki T, Harada-Shiba M, Proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9(PCSK9) removed by LDL-apheresis, 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 14) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Yasuhara H, Nakatani M, Wada S, Sasaki K, Torigoe H, Shibata M-A, 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, ポスター発表, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 15) Tanaka A, Makino H, Nakatani R, Oohata Y, Iwamoto N, Kishimoto I, Harada-Shiba M, Long term effect of LDL-apheresis on patients with homozygous familial hypercholesterolemia, 第 44 回日本

- 動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 16) Ohta N, Miyamoto Y, Makino H, Iwamoto N, Fujino M, Fujiyama H, Nakasone I, Sano M, Harada-Shiba M, Verification of the new diagnostic criteria of FH by patients with mutation in LDLR and/or PCSK9, 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 17) 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, ポスター発表, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 18) 斯波真理子, 家族性高コレステロール血症の診断と治療, 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ランチョンセミナー11, 2012年7月19日~20日, 福岡
- 19) 斯波真理子, 太田直孝, 宮本恵宏, 榎野久士, 岸本一郎, FHにおける遺伝子異変と臨床的意義, 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 明日へのシンポジウム2, 2012年7月19日~20日, 福岡
- (国際)
- 1) Yasuhara H, Yamamoto T, Nakatani M, Wada S, Torigoe H, Yamaoka T, Shibata M-A, Imanishi T, Harada-Shiba M, Obika S, Design, Screening and Selection of Efficient BNA Antisense Oligonucleotides for PCSK9, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, ポスター発表, 2012年10月28日~31日, Boston, Massachusetts, USA
- 2) 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, ポスター発表, 2012年10月28日~31日, Boston, Massachusetts, USA
- 3) Wada S, Obika S, Shibata M-A, Yamamoto T, Yamaoka T, Harada-Shiba M, In Vivo Assessment of the Chemical Modification of siRNA. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, ポスター発表, 2012年10月28日~31日, Boston, Massachusetts, USA
- 4) Harada-Shiba M, The role of apheresis treatment in familial hypercholesterolemia (FH) - long-term experiences from the Osaka

Cardiovascular Research Institute,  
The European Society for Artificial  
Organs (ESAO XXXIX), Apheresis in  
Cardiovascular Diseases III, 2012 年  
9 月 26 日～29 日, Rostock, Germany

知的所有権の出願・取得状況

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  
含有する脂質異常症治療剤  
登録番号：特願 2012-150292  
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 24 年 7 月 4 日

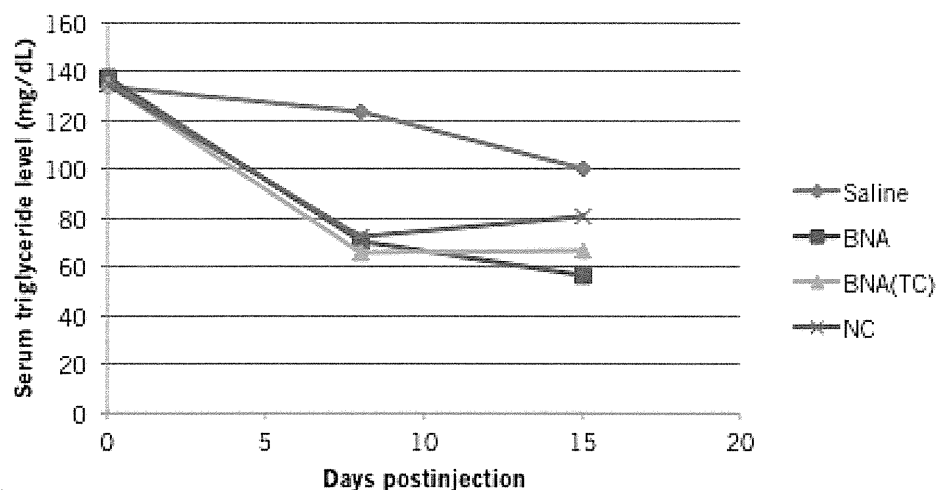


図 1. 各種 BNA を搭載したアンチセンス分子の投与に伴う血清トリグリセリド値の変化。  
BNA = BNA1, NC = NC(TC).

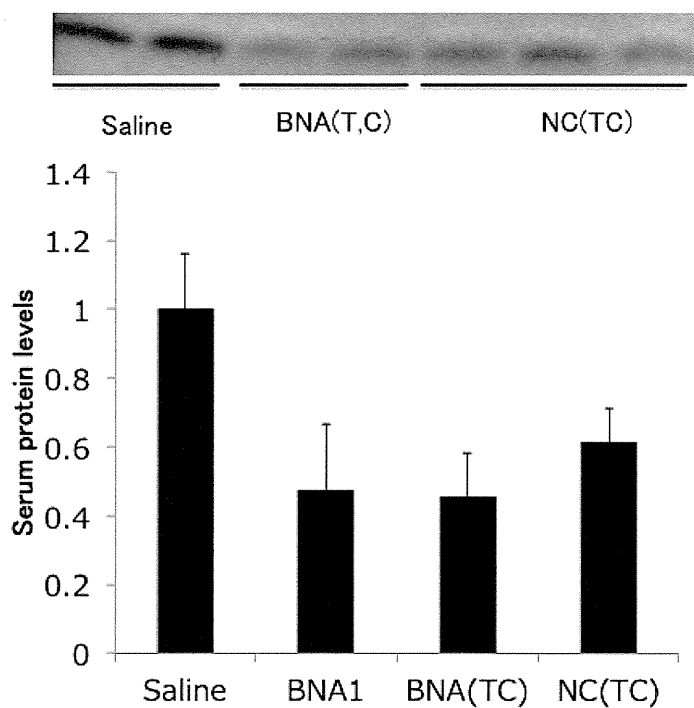


図 2. 各種 BNA を搭載したアンチセンス分子の投与に伴う apoC-III タンパク質量の変化(投与後 8 日)。

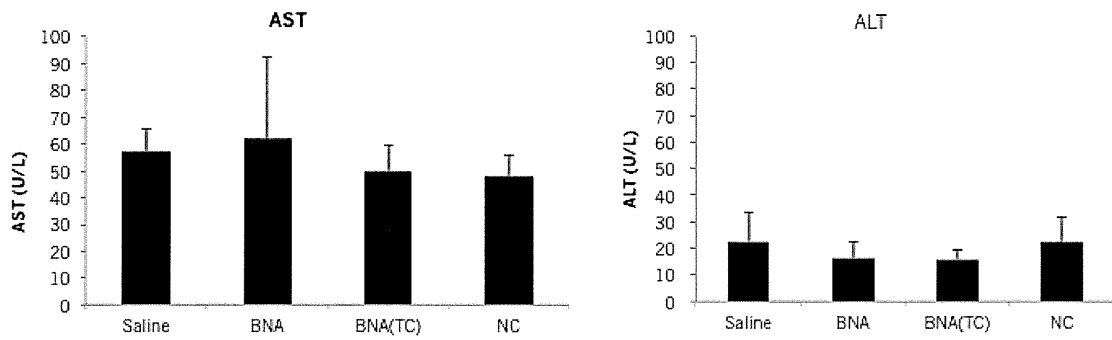


図 3. 各種 BNA を搭載したアンチセンス分子の投与後の肝毒性パラメータ (投与後 15 日)。

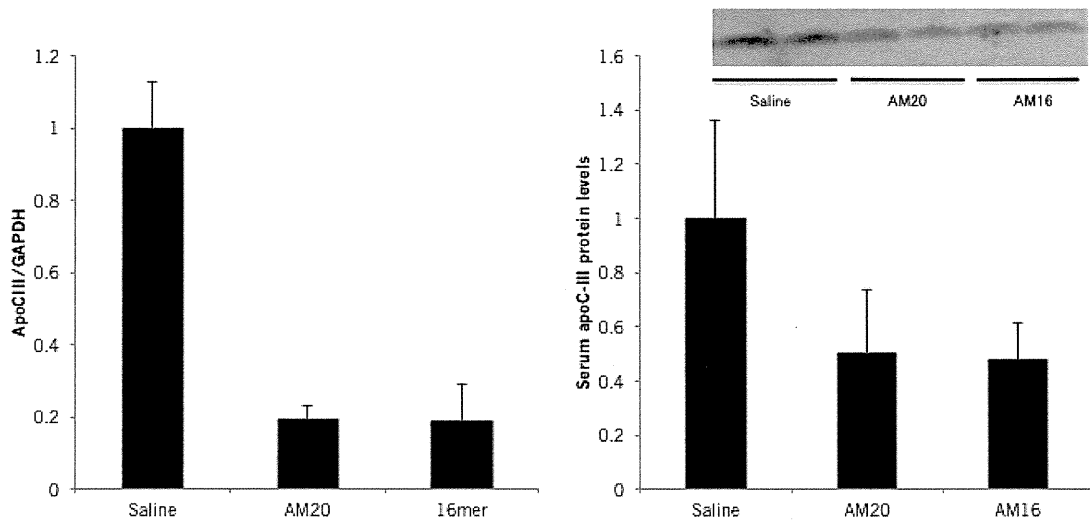


図 4. 2',4'-BNA<sup>AM</sup> を搭載したアンチセンス分子を投与した後の apoC-III mRNA (左図) と apoC-III タンパク質 (右図) の変化。

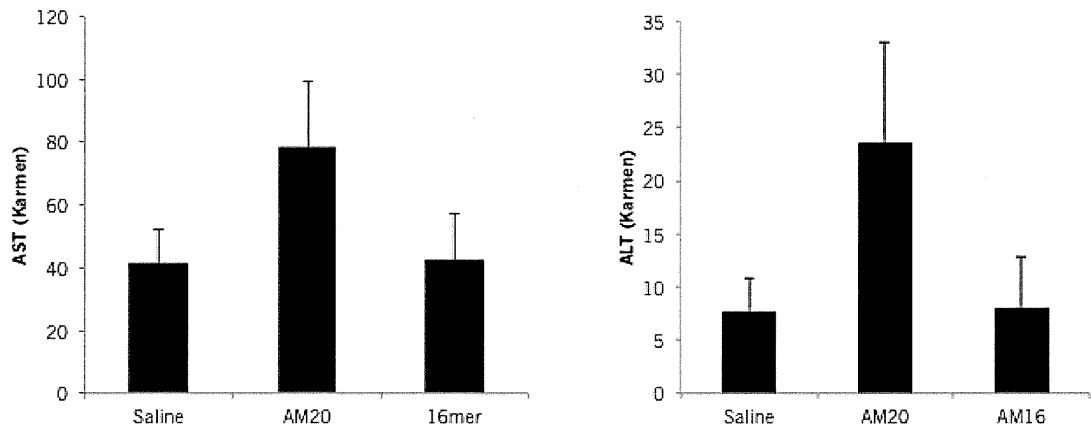


図 5. 2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載したアンチセンス分子を投与した後の肝毒性パラメータの変化。

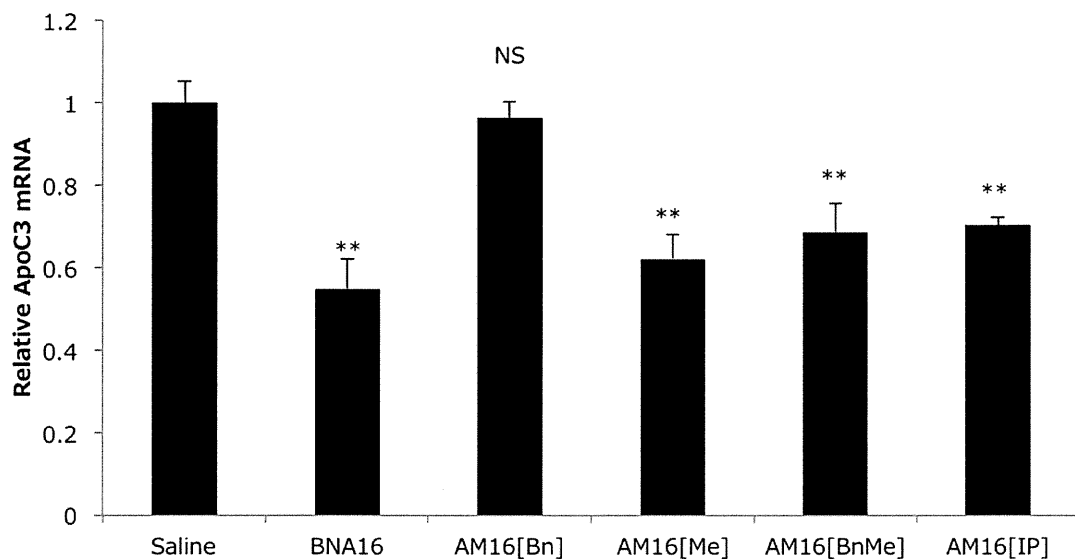


図 6. 疎水性の置換基を導入した 2',4'-BNA<sup>AM</sup>を搭載したアンチセンス分子を投与した後の肝臓における apoC-III mRNA の発現量。通常食負荷マウスに対して 10 mg/kg の用量で尾静脈より単回投与した。投与後 3 日目に屠殺し、肝臓内の apoC-III mRNA を realtime RT-PCR により定量した。

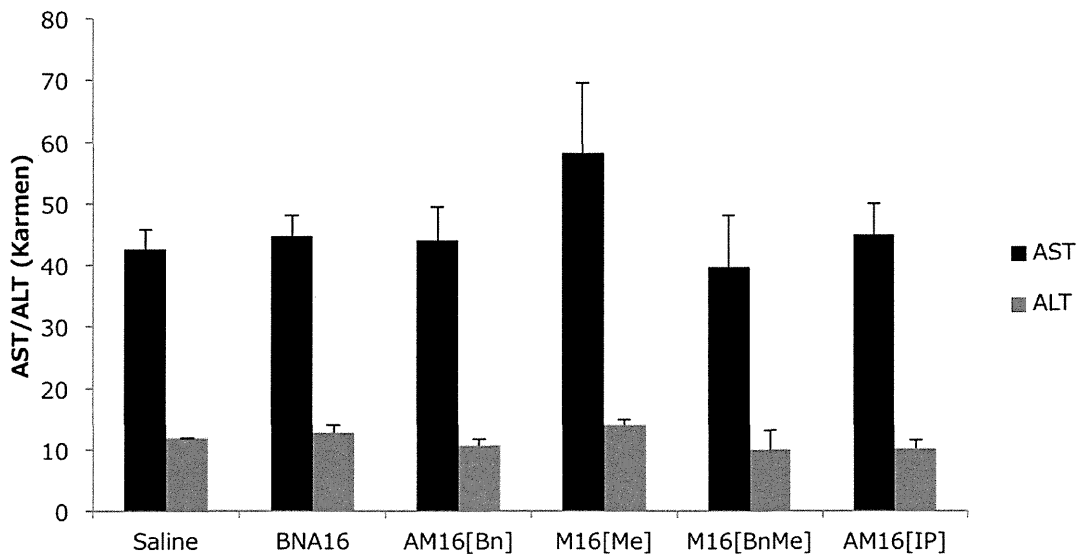


図 7. 疎水性の置換基を導入した 2',4'-BNA<sup>AM</sup> を搭載したアンチセンス分子を投与した後の肝毒性の評価。

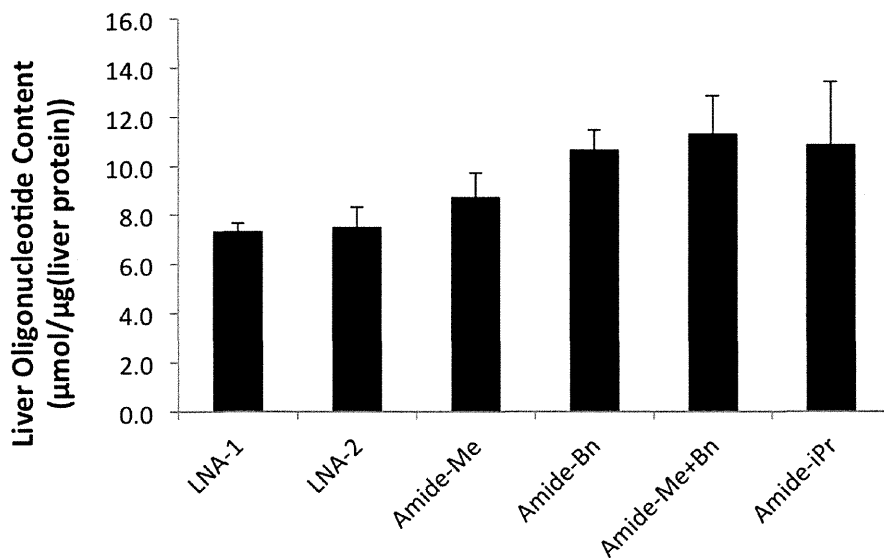


図 8. 疎水性の置換基を導入した 2',4'-BNA<sup>AM</sup> を搭載したアンチセンス分子を投与した後に肝臓に蓄積したアンチセンス分子の定量。



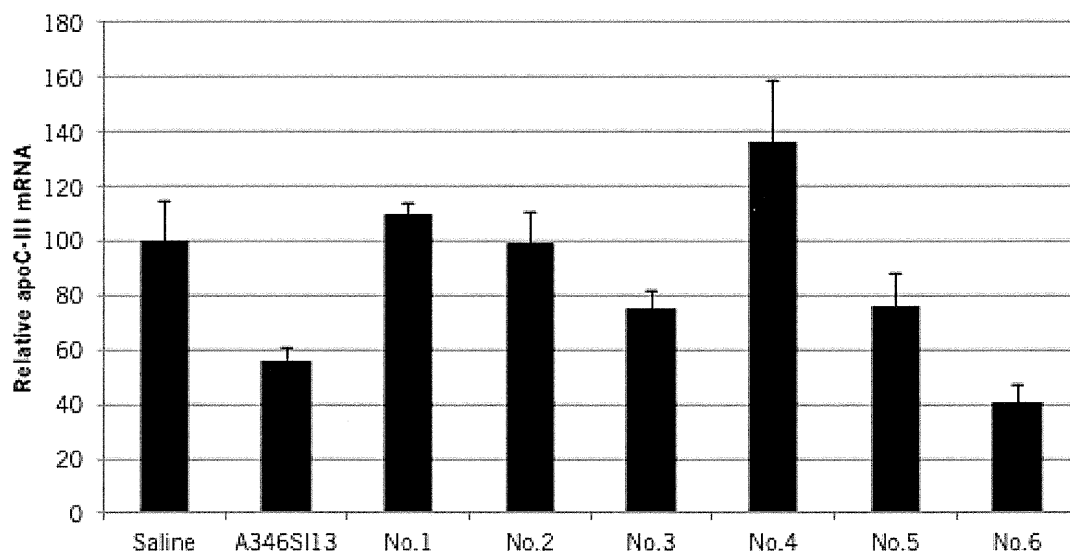


図9. *In vitro* グローバルスクリーニングにより得られた6つの配列について *in vivo* で効果を評価した際の apoC-III mRNA 発現量。皮下より 5 mg/kg の投与量で投与を行った後、3日後に採血、解剖を実施した。

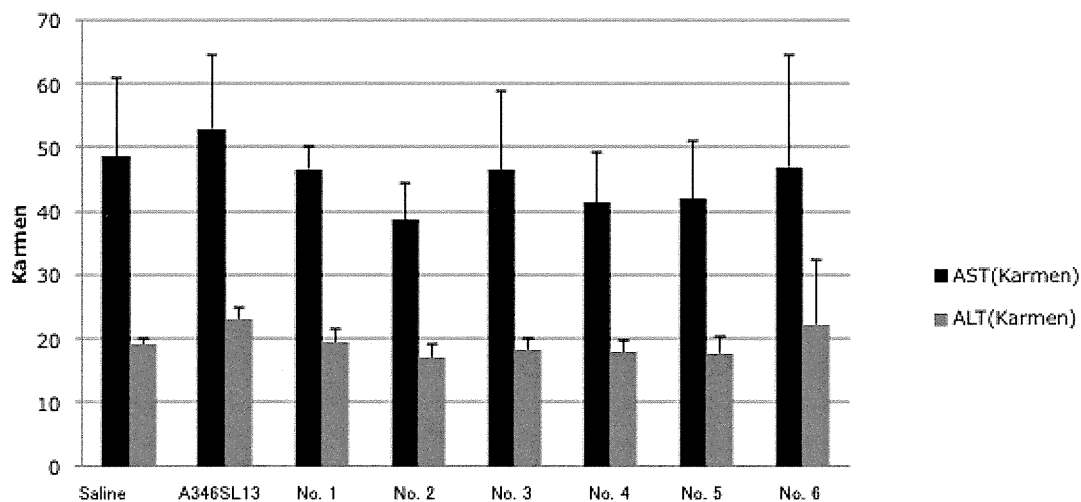


図10. *In vitro* グローバルスクリーニングにより得られた6つの配列について *in vivo* で効果を評価した際の肝毒性。皮下より 5 mg/kg の投与量で投与を行った後、3日後に採血、解剖を実施した。

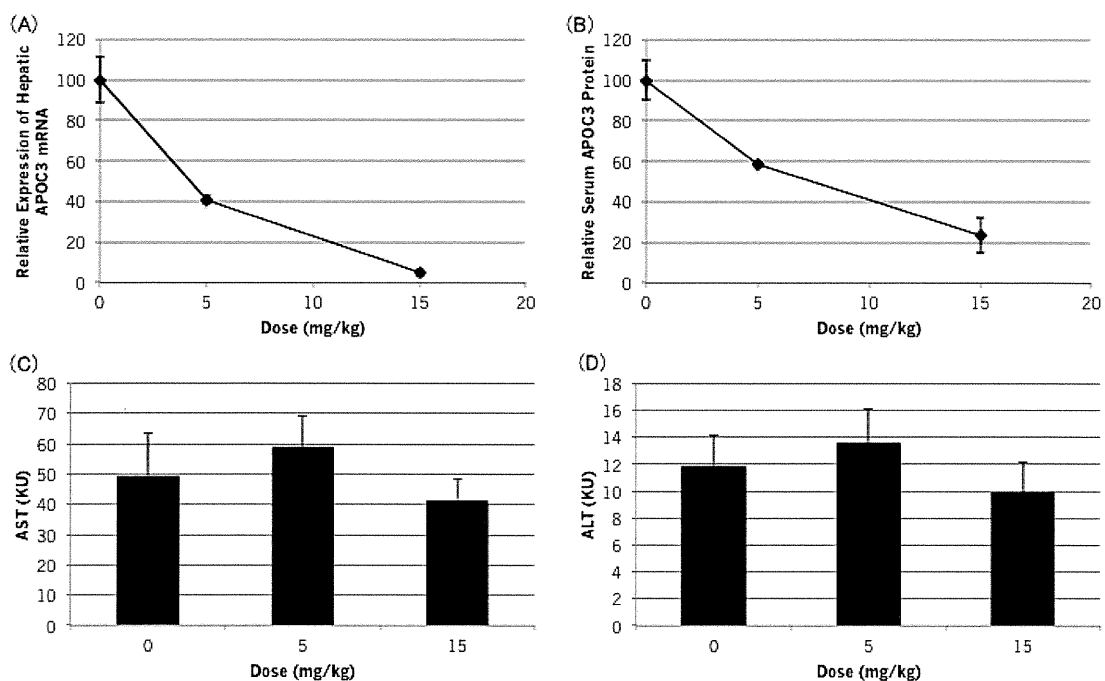


図 11. *In vitro* グローバルスクリーニングに続く *in vivo* スクリーニングより得られた高活性アンチセンスについて投与量依存性を検証。皮下より 5, 15 mg/kg の投与量で投与を行った後、3 日後に採血、解剖を実施した。(A) Realtime RT-PCR の結果、投与量依存的な肝臓での apoC-III mRNA の低下が認められた。(B) 血清中の apoC-III タンパク質をウエスタンブロッティングにより評価した。(C)、(D) 肝毒性の指標となるトランスアミナーゼ (AST, ALT) を測定した。

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告

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-

分担研究者 柴田 雅朗 大阪保健医療大学・教授

研究要旨

本研究は、アンチセンス医薬の有効性・安全性について病理組織学的に評価し、有効で安全なアポリポプロテインC-III (apoC-III)に対するBNA搭載アンチセンス医薬の開発に繋げる。昨年度は、*in vitro*スクリーニングにより選択されたBNA搭載アンチセンス分子で肝毒性の発現が認められた一方で、マウスの肝臓内の脂肪沈着の減少を促進することを見出した。本年度は、昨年度に見出されたアンチセンス分子の動脈への影響を調べるために動脈硬化症のモデルマウスとして汎用されている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った。この結果、血清トリグリセリド(TG)値の低下と有意な脂肪肝の減少が認められた。また、善玉のアディポサイトカインであるアディポネクチンの有意な上昇も確認した。一方で、投与に伴って有意なトランスアミナーゼ類の上昇を認めた。ApoEノックアウトマウスに対してもBNA搭載型アンチセンスは明らかな抗動脈硬化への作用を示した。更なる薬効の改善と安全性の向上によって、抗動脈硬化作用を有する優れた医薬品になりうるものと期待された。

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

和田 郁人

森本 めぐむ

斯波真理子

柴田 映子

安原 秀典

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症に対する初のアンチセンス医薬カイナムロがアメリカ

食品医薬品局(FDA)により承認され、脂質異常症に対するアンチセンス医薬の有効性及び安全性が示されたと言える。今後数年でさらに多くのアンチセンス医薬が実用化されるようになるものと期待される。一方、肝毒性等の安全性の懸念から欧州の欧州医薬品庁においては承認拒否と結論づけられた。BNA 搭載型アンチセンス医薬などの新型医薬品を臨床応用するためには、アンチセンス医薬の有効性及び安全性に関する情報を可能な限り広く収集し、有効に活用することが必要である。昨年度は、2',4'-BNA を搭載した長鎖アンチセンスが投与されたマウスの肝臓、腎臓について病理組織学的解析を行い、apoC-III の発現阻害による脂肪変性の軽減を認めた。一方、細胞浸潤や肉芽腫等の安全性への懸念も見出された。In vitro スクリーニングにより選択された BNA 搭載アンチセンス分子 (A346SL13) は、高いアンチセンス効果が示されているが(斯波の稿)、軽度の細胞浸潤等の懸念が認められた。本年度は、動脈硬化症モデルとして apoE ノックアウトマウスを用いて、A346SL13 を長期的な反復投与を行うことによって脂質異常症、動脈硬化症への影響の検証と安全性の評価を行い、慢性疾患を対象としたアンチセンス医薬にはどれほどの薬効と安全性が必要となるかについて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 反復投与試験

被験動物として3-4週齢の apoE ノックア

ウトマウスを各投与量で例数3匹となるように準備した。3週間の高脂肪食 F2WTD (コレステロール含量0.3%、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10 mg/kg/回で週1回全8回、皮下投与を行った。負担軽減のために採血は1ヶ月に一度全5回行った。4ヶ月後に塩酸メドトミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファンールの混合麻酔を行い、PBS で心臓より灌流し、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。

### 2. 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。

### 3. Real time 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量を評価した。使用したTaqMan Gene Expression IDを示した；Mm00445670\_m1 (apoc3) , Mm99999915\_m1 (gapdh) 。

#### 4. 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。マイクロトーム (Leica Microsystems) を用いて薄切切片 (2-3 $\mu$ m) 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。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。マイクロトーム (Leica Microsystems) を用いて薄切切片 (2-3 $\mu$ m) を作製した。Resorcin-Fuchsin Stain Solution (武藤化学)、Weigert's Iron Hematoxylin Stain Solution (武藤化学)、Van Gieson's stain Solution (武藤化学) を用いてElastica van Gieson stain (EVG染色) を行ない、顕微鏡にて観察し、写真撮影した。

#### 5. 血清TG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、5000 rpm、4 $^{\circ}$ 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

(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 $^{\circ}$ 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TG濃度を定量した。

#### 6. 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  $\mu$ 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 $^{\circ}$ Cにて5分間加温し、発色試液250  $\mu$ Lを加えて37 $^{\circ}$ 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。

#### C. 研究結果

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と比較して約50%もの低下を達成し、この効果は4ヶ月間維持された（図1）。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（図2）。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（図2）。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（図1）。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。（図3）。

#### D. 考察

本研究では、高いapoC-III阻害活性を持つ2',4'-BNA搭載型アンチセンス分子を長期的

に反復投与を行うことによって動脈硬化巣の形成にどのように影響するのか検証を試みた。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、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

本研究では、我々が先に開発した高活性なアンチセンス分子をapoEノックアウトマウスに慢性的に投与することにより、apoC-III阻害剤が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。但し、慢性疾患を対象としたアンチセンス医薬を開発する場合には有効性を示す投与量と毒性発現用量の差（治療域）がある程度広いことが必要であることを示唆する結果となった。現在、小比賀、斯波らにより新規に開発されている有効で安全なアンチセンス分子についても今後、反復投与による効果を検証し、よりよい候補の選定を進め、臨床応用に向けた準備を行う予定である。

#### 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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 原著論文

(欧文)

- 1) Shibata M.A., Khan I.A, Iinuma M, Shirai T: Natural products for medicine, J Biomed Biotechnol, ID resource:147120, 2012.
- 2) Kurose H, Shibata M.A., Iinuma M, Otsuki Y: Alterations in cell cycle and induction of apoptotic cell death in breast cancer cells treated with alpha-mangostin extracted from mangosteen pericarp, J Biomed Biotechnol, ID resource:672428, 2012.
- 3) 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 vitro: Mol Ther-Nucleic acids, e45, 1-15, 2012.

- 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) 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, Mol Ther-Nucleic acids, e22, 2012.

(邦文)

- 1) 柴田雅朗, Jayakrishia Ambati, 柴田映子, Romulo JC Albuquerque, 森本純司, 斯波真理子, 藤岡重和, 伊藤裕子, 大槻勝紀: スプライシング・バリエントである可溶性 VEGF 受容体 2 型のマウス乳癌リンパ節移転に対する抑制効果, リンパ学,

- 2) 35 卷, 23-28, 2012.
- 3) 柴田雅朗: 転移抑制を念頭に置いた乳癌遺伝子治療の実験的研究, 乳癌 (第 2 版) - 基礎と臨床の最新研究動向 -, 70 卷, 710-713, 2012.

の複合投与による乳癌転移抑制の試み, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日~30 日, 高松

## 2. 学会発表

- 1) 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 デコイはマウス乳癌モデルに対して転移抑制作用を発揮し, Satb1 siRNA はその効果を示さなかった, 第 36 回日本リンパ学会, 2012 年 6 月 29 日~7 月 1 日, 東京
- 2) 柴田雅朗, 森本純司: Soluble VEGFR-3 decoy but not Satb1 siRNA suppresses metastasis in a highly metastatic mouse mammary cancer model, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日~21 日, 札幌
- 3) 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 デコイと SATB1 siRNA のマウス乳癌に対する転移抑制作用の検討: 可溶性 VEGFR-3 デコイは乳癌転移を抑制した, 第 29 回日本毒性病理学会, 2013 年 1 月 31 日~2 月 1 日, つくば
- 4) 柴田雅朗, 日下部守昭, 森本純司, 柴田映子, 65AF 波真理子, 的場吉信, 土佐秀樹, 飯沼宗和: テネイシン C 抗体と  $\alpha$ -マンゴスチンと



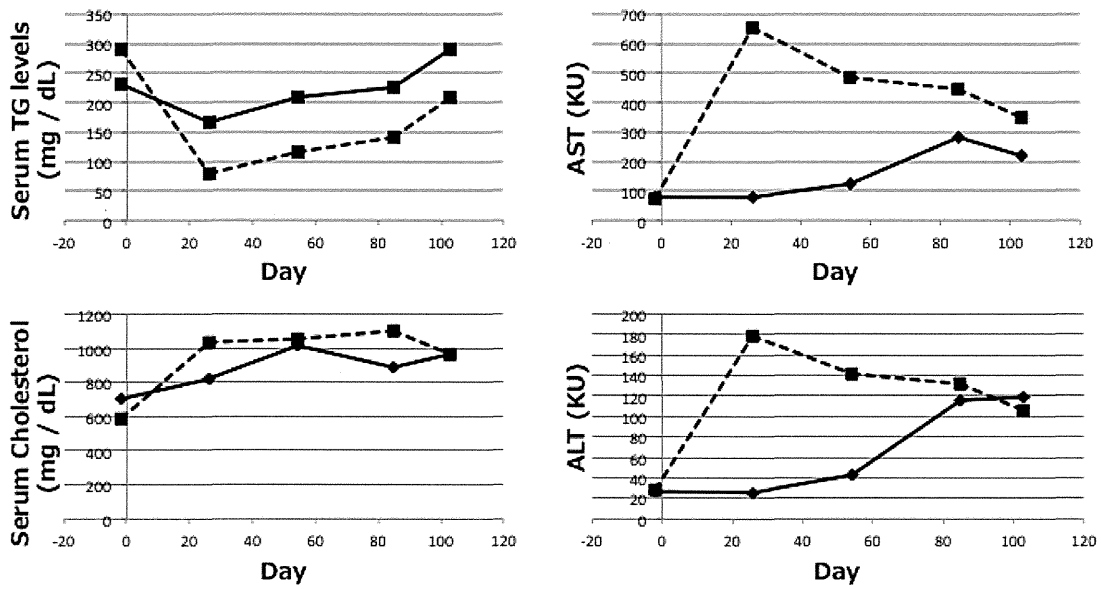


図 1. A346SL13 の長期投与に伴う経時的な血液パラメータの変化。TG: triglyceride, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase.

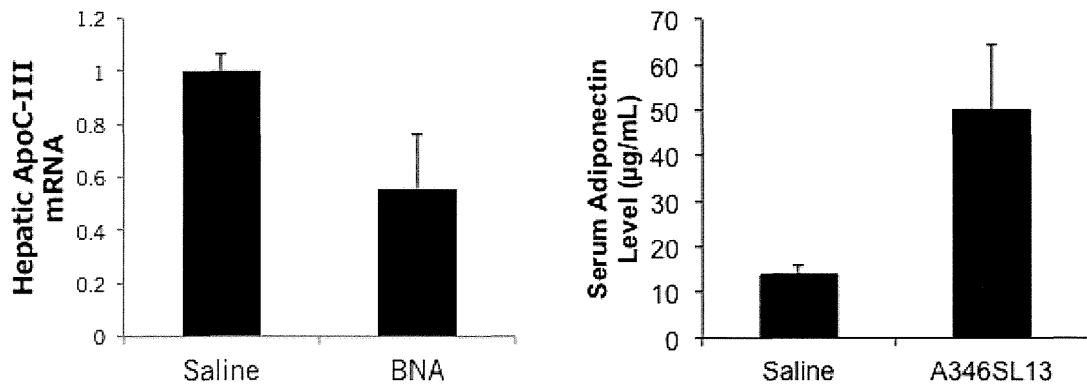
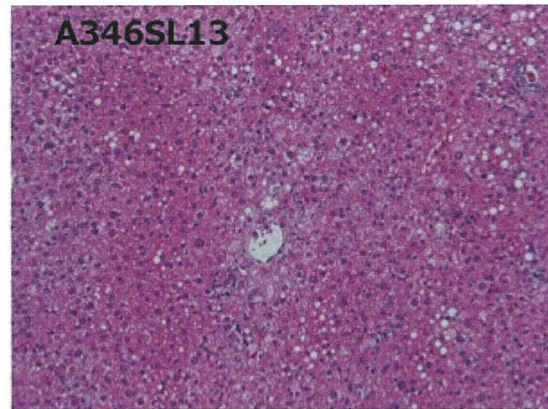
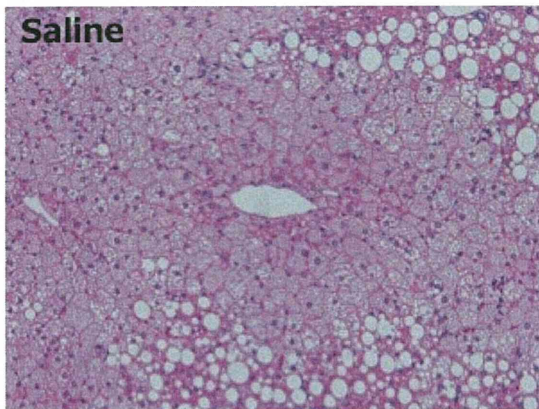


図 2. A346SL13 の長期投与に伴う肝臓中の apoC-III mRNA と血清アディポネクチン濃度の変化。投与後には apoC-III mRNA の発現量とアディポネクチン濃度が有意に上昇した。

(A)



(B)

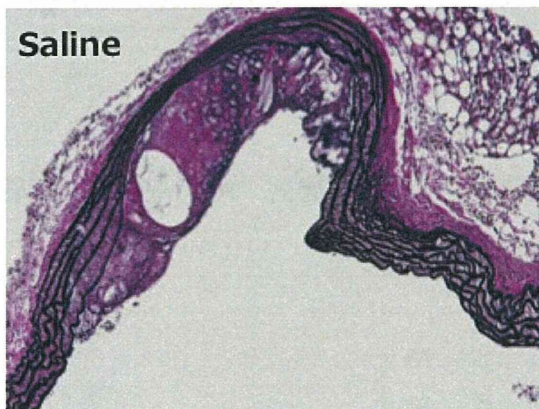


図 3. A346SL13 の長期投与後の肝臓 (A) と大動脈 (B) の病理組織学的解析。アンチセンス分子を投与することにより脂肪肝の形成が抑制された (A)。動脈硬化病変の発生にはアンチセンス分子の投与の有無により差異は観察されなかった。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wheeler M, Chardon A, Goubet A, Morihiko K, Tsan S.Y, Edwards S.L, Kodama T, <u>Obika S</u> , Veedu R.N	Synthesis of Selenomethylene-locked Nucleic Acid(SeLNA)-modified Oligonucleotides by Polymerases	Chem. Commun	48	11020-11022	2012年
Harai Y, Osawa T, <u>Obika S</u>	Synthesis and Duplex-forming Ability of Oligonucleotides Containing 4'-Carboxythymidine Analogs	Org. Biomol. Chem	10	9639-9649	2012年
Kang J.H, Tachibana Y, <u>Obika S</u> , Harada-Shiba M, Yamamoto 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年
Yahara A, Shrestha A.R, Yamamoto T, Hari Y, Osawa T, Yamaguchi M, Nishida M, Kodama T, <u>Obika S</u>	Amido-Bridged Nucleic Acids(AmNAs): Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro Antisense Potency	ChemBioChem	13	2513-2516	2012年
Yamamoto T, Yahara H, Wada F, <u>Harada-Shiba M</u> , Imanishi T, <u>Obika S</u>	Superior Silencing by 2',4'-BNANC-based Short Antisense Oligonucleotides Compared to 2',4'-BNA/LNA-based Apolipoprotein B Antisense Inhibitors	J. Nucleic Acids Res	707323	1-7	2012年
Wada S, <u>Obika S</u> , <u>Shibata M</u> , Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Torigoe H, <u>Harada-Shiba M</u>	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年
Kawada Y, Kodama T, Miyashita K, Imanishi T, <u>Obika S</u>	Synthesis and Evaluation of Novel Caged DNA Alkylating Agents Bearing 3,4-Epoxy piperidine Structure	Org. Biomol. Chem	10	5102-5108	2012年

Rahman S.M.A, Taba T, Kodama T, Islam M.A, <u>Obika S</u>	Hybridizing Ability and Nuclease Resistance Profile of Backbone Modified Cationic Phosphorothioate Oligonucleotides	Bioorg. Med. Chem	20	4098-4102	2012年
Yamamoto T, <u>Harada-Shiba M</u> , Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Narukawa K, Sasaki K, <u>Shibata M</u> , Torigoe H, Yamamoto T, Imanishi T, <u>Obika S</u>	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年
Torigoe H, Nakagawa O, Imanishi T, <u>Obika S</u> , Sasaki K	Chemical Modification of Triplex-forming Oligonucleotide to Promote Pyrimidine Motif Triplex Formation at Physiological pH	Biochimie	94	1032-1040	2012年
Hari Y, <u>Obika S</u> , Imanishi T	Towards the Sequence-Selective Recognition of Double-Stranded DNA Containing Pyrimidine-Purine Interruptions by Triplex-Forming Oligonucleotides	Eur. J. Org. Chem		2875-2887	2012年
桑原 正靖、 <u>小比賀 聡</u>	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	化学工業	63	42-48	2012年
<u>小比賀 聡</u>	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年
Sugisawa T, Okamura T, Makino H, Watanabe M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Iwamoto N, Yasamamoto A, Yokoyama S, <u>Harada-Shiba M</u>	Defining patients at extremely high risk for coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia	J Atherosclerosis Thromb	19	369-375	2012年
<u>Harada-Shiba M</u> , Arai H, Okamura T, Yokote K, 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 Atherosclerosis Thromb	19	1019-1026	2012年