

201307016A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成26 (2014) 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 <sup>NC</sup> を搭載した高活性アンチセンス分子の設計と探 索研究 .....	17
小比賀 聡	
2. 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-コレステロールを修飾した 2',4'-BNA 搭載型 アンチセンス分子の体内分布解析と薬効評価 .....	29
斯波 真理子	
3. 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-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 .....	47
柴田 雅朗	
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	69

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アポC-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、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い、最適化配列の選択に成功した。本年度は、2' ,4' -BNA<sup>NC</sup>を搭載したapoC-IIIアンチセンスの治療基盤の構築をめざし、3' UTRを中心に*in vitro*スクリーニングを実施した (小比賀G)。また、昨年度に選定したアンチセンスに対しコレステロールを修飾 (Chol-ASO) による*in vivo*での効果について検討を行い、肝臓への集積、細胞特異性について検討を行った (斯波G)。一方、アンチセンスによる動脈硬化に対する予防効果を評価するために、動脈硬化モデルマウスを用いて、MRIや超音波を用いたイメージング解析、および病理学的、分子病理学的な基礎的解析の検討を行った (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、心血管疾患の残りのリスクである食後高 TG 血症などのリスクに対して、分子を標的とした特異的な治療法の開発が待望されている。アポ C3 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。アポ C3 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)、アポ C3 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。アポ C3 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アポ C3 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、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。本年度は、2',4'-BNANC を搭載した apoC-III アンチセン

スの治療基盤の構築をめざし、3' UTR を中心に *in vitro* スクリーニングを実施した (小比賀 G)。また、昨年度に選定したアンチセンスに対しコレステロールを修飾 (Chol-ASO) による *in vitro* での効果について検討を行い、肝臓への集積、細胞特異性について検討を行った (斯波 G)。一方、アンチセンスによる動脈硬化に対する予防効果を評価するために、動脈硬化モデルマウスを用いて、MRI や超音波を用いたイメージング解析、および病理学的、分子病理学的な基礎的解析の検討を行った (柴田 G)。

## B. 研究方法

### 1. 2',4'-BNANC 搭載型アンチセンス分子の設計と合成

マウス apoC-III mRNA の 3' UTR 領域を中心に 2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載した 14 塩基長アンチセンスを 34 種設計し、合成した。各配列名は、マウス apoC-III の転写開始から数えた結合位置と人工核酸の種類 (NC は 2',4'-BNA<sup>NC</sup>) と鎖長を示す。また 2',4'-BNA<sup>NC</sup> は 5' 所修飾し、リン酸骨格はすべてホスホロチオアートを施している。

### 2. *in vitro* トランスフェクション実験

#### a. 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、回復し、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℃、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℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

b.  $3.3 \times 10^5$  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℃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 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®Fast Cells-to-Ct™ Kit (Life Technologies) を用いて細胞より total RNA を回収した。

### 3. Real time RT-PCR 解析

Total RNA よりランダムプライマーを用いて cDNA 化し、得られた cDNA を適宜希釈しリアルタイム PCR を行い apoC-III の mRNA 量を定量した。リアルタイム PCR では、ハウススキープینگ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 量を検量線法により定量的に評価した。使用した TaqMan Gene Expression Assays の Assay ID を示した； Mm00445670\_m1 ( apoc3 ) , Mm9999915\_m1 (gapdh)。

### 4. 動物への投与実験

被験動物として 8 週齢のマウス C57BL6/J (♂: 日本 SLC) を購入し、1 週間以上馴化させた。各投与群で例数 4 匹となるように準備した。各種アンチセンス核酸あるいは生理食塩水 (200 µL/head) を皮下より 5 mg/kg の用量で単回投与を行なった。投与後、3 日後に絶食下、イソフルラン (マイラン製薬, Cat#152003) による吸入麻酔を行なった。下大静脈より血液を採取した後、PBS で心臓より灌流し、採取した肝臓を細切し、液体窒素で瞬間凍結した後、使用まで -80℃にて保存した。

### 5. 肝臓からの total RNA の抽出

凍結した肝臓の切片約 30 mg から QuickGene RNA tissue kit SII (Fujifilm Life Science, Cat#634-23601) に従い total RNA

を抽出した。抽出した total RNA を分光光度計で定量し、リボソーム RNA を 1% アガロースゲル電気泳動で確認した。

## 6. 血清パラメータの測定

マウスの下大静脈より採血した血液を 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富士ドライケム 7000 を用いて各パラメータの測定を行った。以下に示す専用スライド一枚につき、血清 10  $\mu$ L を用いて測定した。

GOT/AST-PIII, GPT/ALT-PIII, BUN-PIII, CRE-PIII

## 7. 肝臓内オリゴヌクレオチドの定量

mApoC3-471-BNA(14) と mApoC3-471-NC(14) に相補的な 3' ビオチン化した DNA (5' -gaa tag cga tag atc tca cct aa-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。

2 mL チューブに凍結肝臓切片、1 mL の PBS およびビーズ ( $\phi = 5$  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  $\mu$ L) および 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。続いて Ligation Probe を 100  $\mu$ L 加え、15 °C で 3 時間インキュベーションした。その後 200  $\mu$ L の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。さらに 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

### 8. *in vivo*, *ex vivo* イメージング

被験動物として 8 週齢のマウス C57BL/6/J (♂: 日本 SLC) を各投与群で例数 4 匹となるように準備した。1 週間の *ivid#2* (オリエンタル酵母工業株式会社) 負荷後、Cy3 で標識した各アンチセンス核酸あるいは生理食塩水 (Saline: コントロール) を尾静脈より単回投与を行なった ( $1.1 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{回}$ )。投与後、2 日もしくは 3 日後に尾静脈より絶食下採血を行った。次いで、マウスを塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェールの混合麻酔を行なった。開腹した状態で Maestro *in vivo* imaging system (Perkin Elmer) を用いて観察を行った。その後、下大静脈より血液を採取し、PBS で心臓より灌流後、各臓器を摘出し同様に観察を行った。採取した組織は 10%ホルマリン PBS 溶液で一週間固定後に、凍結用包埋 O.C.T コンパウンド (サクラファインテック社) に包埋し、液体窒素で凍結した。その後 -80 にて保存した。

### 9. 蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によるイメージング

10%ホルマリン固定後、O.C.T コンパウンドにより包埋、凍結した肝臓をクリ

オスタット (Leica Microsystems) を用いて  $10 \mu\text{m}$  の切片を作製した。乾燥後、HBSS にて穏やかに洗浄した。Alexa Fluor® 488 WGA (Lifetechnologies, W11261) による細胞膜の染色後、HBSS にて 5 分  $\times$  2 の洗浄を行い、Dapi-Fluoromount G™ (Southern Biotech) を用いて核染色とともに封入を行った。作製したスライドを蛍光顕微鏡 (BZ9000, KEYENCE) および CLSM (TSC-SP5, Leica) を用いて観察を行った。

### 10. 動的光散乱法による粒子径の測定

それぞれのアンチセンス核酸について、動物への投与時の濃度 ( $126 \mu\text{M}$ ) になるように saline を用いて調整した。それぞれの調整溶液  $100 \mu\text{L}$  をゼータサイザー ナノ ZS (Malvern) にて分散媒の屈折率および粘度は水と同様の条件にて、その粒子径の測定を行った。

### 11. 動脈硬化イメージングのための動脈硬化モデルマウスの作成

動脈硬化モデルマウス (AN-KO マウス) に 6 週齢から 16 週間、高コレステロール食餌 (F2HFD1: オリエンタル酵母工業) を自由摂取させた。対照群の C57BL/6J (Wild type: 日本 SLC) には普通食 CE-2 (日本クレア) を自由摂取させた。

### 12. MRI イメージング

普通食を 1 年以上摂食した高齢の AN-KO マウスおよび Wild type を小動物

用 7 Tesla MRI を用いて、マウス大動脈を撮影した。血管造影剤としてガドリニウム系試薬である Gadofluorine M (Miltenyi Biotec GmbH) を  $100 \mu\text{mol/kg}$  体重の用量で静脈投与し、投与前と投与後、経時的にイソフルラン麻酔下にて、T1 強調、脂肪抑制有、0.5 mm スライスで撮影した。また、高コレステロール食を摂取させた AN-KO マウスを、食餌負荷 8 週と 16 週に Gadofluorine M を用いて上記と同様の条件で MRI 撮影を行った。

### 13. 超音波断層法によるイメージング

普通食を 1 年以上摂取させた高齢の AN-KO マウスおよび Wild type と高コレステロール食を摂取させた AN-KO マウスの食餌負荷前と負荷 8 週と 16 週において、胸部の除毛をし、イソフルラン麻酔下で、超音波検査を行った。超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 装置 (Primetech Corp.) を用いて、40MHz の探触子で大動脈のプラークの有無や輝度を観察し、大動脈弓横断像では狭窄率 (血管腔内周径と血管壁偽外膜間距離) を測定した。

### 14. 大動脈の Oil red 染色

マウスを麻酔下にて、PBS にて還流し、放血・安楽死させ、大動脈起始部から総腸骨動脈分岐部までの下行大動脈を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬して固定した。1 日の固定の後、実体顕微鏡下 (model LG-PS2, Olympus) にて動

脈周囲の脂肪組織を除去し、動脈を切開して、イソプロパノールで 0.3% に調製した Oil Red O (和光純薬工業) と精製水を 6:4 に調整した染色溶液で  $37^{\circ}\text{C}$  15 分染色し、動脈硬化病変を肉眼的に可視化した。写真撮影を行い、その画像を取り込み、画像解析ソフト WinROOF を用いて、動脈硬化病変と動脈内腔の面積を計測し、定量的解析を行った。

### 15. 大動脈の病理組織学的解析

大動脈の Oil red 染色の後、大動脈弁起始部から大動脈弓を 2-3 mm に、下行大動脈を 4-5 mm に切り出し、5~6 時間水洗後、脱水系列を経て、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Leica Microsystems) にて  $3 \mu\text{m}$  に薄切し、HE 染色および弾性線維を証明するエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を施し、顕微鏡下にて鏡検した (model BX53, Olympus)。

#### 1) 大動脈硬化症の進行度による分類

HE 染色および EVG 染色標本を詳細に病理組織学的に観察し、動脈硬化病変の進行度別に初期病変、進行性病変、複合病変の 3 段階に分類した。

- ① 初期病変：内膜の肥厚または脂肪班 (泡沫細胞の集簇) のみが観察される。
- ② 進行性病変：泡沫細胞などの細胞浸潤、線維性被膜および脂質蓄積が観察される。
- ③ 複合病変：進行性病変に加え石灰化または血管内腔の狭窄が観察される。

#### 2) 動脈硬化病変の病理組織学的な定量



HE 染色および EVG 染色標本より、各動脈硬化病変の発生個数をカウントした。

## 16. 動脈硬化モデルマウスの作成

ApoE-KO マウス♂に 6 週齢から 16 週間、高コレステロール食（コレステロール 1.25% 含む餌 F2HFD1：オリエンタル酵母工業）を自由摂取させ、動脈硬化モデルを作製した。コントロールとして普通食(CE-2 日本クレア)を自由摂取させた C57BL/6J♂（Wild type、日本 SLC）を用いた。

## 17. 超音波断層法による大動脈の Intima-media thickness (IMT) の計測

ApoE-KO マウスおよび Wild type の胸部を除毛し、イソフルラン麻酔下で、Vevo2100 装置、探触子 40 MHz を用いて、大動脈を描出した。大動脈の観察および大動脈弓の短軸断層像における径狭窄率に加えて、上行大動脈の長軸断層像の大動脈弁、大動脈起始部と上行大動脈および腕頭動脈の位置で IMT を計測した (Denis et.al. Circulation, 125, 894-90, 2012 年)。

## 18. 大動脈の病理組織学的解析

1) 実験 1 と同様の方法で実験を行った。即ち、マウスを麻酔下にて、PBS を還流し、放血・安楽死させ、大動脈弁起始部から総腸骨動脈分岐部までの下行大動脈を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬して固定した。固定後、実体顕微

鏡下 (model LG-PS2, Olympus もしくは model SZX7, Olympus) で動脈周囲の脂肪組織を除去し、大動脈を切り出し、脱水系列を経て、パラフィン包埋を行った。

マイクロトーム (Leica Microsystems) にて薄切の後、標本を HE 染色および EVG 染色を行い、顕微鏡下にて鏡検した (model BX53, Olympus)。

### 2) 大動脈硬化症の進行度による分類

HE 染色および EVG 染色標本より、動脈硬化病変の進行度により初期病変、進行性病変、複合病変の 3 段階に実験 1 と同様に分類し、各動脈硬化病変別に発生個数をカウントした。

### 3) 複合病変における石灰化の検証

大動脈のパラフィン包埋ブロックを  $5\mu\text{m}$  に薄切した標本を脱パラフィン後、Kossa 反応 (5% 硝酸銀、5% チオ硫酸ナトリウム、ケルンエヒロート) を行い、顕微鏡にて陽性反応の出た部位を HE 染色標本ないしは EVG 染色標本と対比し、病理組織像と石灰化の関係を観察し、複合病変の診断基準を確認した。

## 19. Real-time PCR を用いた動脈壁における発現遺伝子の網羅的解析

普通食を自由摂取させた ApoE-KO マウス 28 週齢と 60 週齢、Wild type マウス 25 週齢のパラフィン包埋された動脈硬化病変を含む大動脈を  $4\mu\text{m}$  に薄切し、1.5ml チューブに入れ、キシレン、アルコール処置後、 $37^{\circ}\text{C}$  保温器で乾燥させ、FFPE Kit (Qiagen) にて RNA 抽出を行った。

抽出は FFPE Kit の手順書に従った。RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA にし、プライマーアレイの Cytokine-cytokine receptor interaction (96 遺伝子、Takara Bio) を利用して、Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を行い、Real-time PCR を行い、網羅的に解析し、動脈硬化病変で著しく変動する mRNA を検出した。

## 20. 抗体アレイ解析

普通食を自由摂取させた各々 28 および 46 週齢 ApoE-KO マウス、47 週齢の Wild type マウスをイソフルラン麻酔下で PBS 還流し、実験 1 と同様に大動脈を摘出した。実体顕微鏡下ですばやく動脈周囲の脂肪組織を除去し、動脈を 2-3mm にカットして液体窒素にて凍結した。凍結組織に RIPA buffer (Sigma) と Complete (Roche Applied Science) を加え、TissueLyser II (Qiagen) でホモジナイズの後、10000 rpm 3 分 4°C の条件で遠心分離し、タンパク抽出を行った。タンパク定量は Bio Rad DCTM Protein Assay (Bio Rad) を用いて、iMark Microplate Reader (Bio-Rad) あるいは Bio Photometer (Eppendorf) で比色測定した。その後、各サンプルのタンパク濃度を 300  $\mu$ g に調整し、Mouse Cytokine Array Panel A Kit (R & D) を用いて、抗体アレイを行った。この抗体アレイではニトロセルロース膜上にサイトカイン関連の 40 種類の抗体が

固相化しており、動脈硬化病変で増減するタンパク分子を発光させ、ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) でデジタル画像を取得し、デジタル画像解析ソフト Image J にて density を解析した。

## 21. 免疫組織学的染色

1) パラフィン包埋組織の薄切標本作製  
実験 2 における「2.動脈硬化モデルマウスの作成」および「4.Real-time PCR を用いた網羅的解析」で作製されたパラフィン包埋動脈硬化病変について、免疫組織学的解析を行った。すなわち、パラフィン包埋組織をマイクロトーム (Leica) で 5  $\mu$ m に薄切し、シランコートスライドガラス (DAKO) に貼付して標本作製し、従来より動脈硬化との関連が指摘されているマクロファージやテネイシン C について検討した。また、Real-time PCR や抗体アレイを用いた解析にて著しく増加した分子 (Cxcl16 および TIMP-1) についても検討した。

### 2)マクロファージの証明

動脈硬化病変組織の薄切標本を加熱して抗原賦活化を行い、マクロファージを認識する抗 F4/80 抗体 (Santa Cruz) と Alexa594 標識抗体 (Invitrogen) を反応させ、DAPI で核染色し、免疫組織学的蛍光染色を行った。染色標本を蛍光顕微鏡 (model BX53 with U-RFL-T, Olympus) で観察し、デジタル画像を取得した。

### 3) テネイシン C 発現

動脈硬化病変組織の薄切標本を熱処理に

より抗原賦活化し、抗テネイシン-C 抗体 (和光純薬工業) と Alexa594 標識抗体 (Invitrogen) を反応させ、DAPI で核染色し、免疫組織学的蛍光染色を行った。染色標本を蛍光顕微鏡 (model BX53 with U-RFL-T, Olympus) で観察し、デジタル画像を取得した。

4) F4/80 と TIMP-1 の二重免疫蛍光染色  
動脈硬化病変組織の薄切標本を抗原賦活化し、マクロファージを認識する抗 F4/80 抗体 (Santa Cruz) と Alexa594 標識抗体 (Invitrogen)、さらに抗 TIMP-1 抗体 (Abcam) と Alexa488 標識抗体 (Invitrogen) を反応させ、DAPI で核染色を行った後、蛍光顕微鏡 (model BX53 with U-RFL-T, Olympus) で観察し、デジタル画像を取得した。

## 22. 肝臓における脂肪蓄積の解析

C57BL/6J マウスにアンチセンスの ApoC3-1-S 投与後、摘出した肝を 10% 中性緩衝ホルマリン固定し、肝臓の 1 部は液体窒素にて凍結した。パラフィン包埋より薄切切片を作製し、HE 染色を行った。凍結肝組織をクリオモールドに入れ、O.C.T Compound (Sakura Finetek) に流し込み、液体窒素で凍結した。クリオスタット (Leica) にて 5  $\mu$  m に薄切し、Oil red O 染色液 (和光純薬工業)、Hematoxylin Gill's Formula (Vector) を用いて染色した。

(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<sup>NC</sup> 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、*in vitro* スクリーニングによりみいだされた高活性アンチセンス (mApoC3-471-BNA) を陽性コントロールとして 2',4' -BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンスを 34 種スクリーニングした。最終濃度 10 nM でマウス初代培養肝細胞にトランスフェクションをしたところ、この陽性コントロールの効果を上回る高活性化化合物がいくつか見出された。より高い活性を示したアンチセンス分子の mRNA における標的位置は、2',4' -BNA 搭載型アンチセンスの標的サイトと酷似していた。

### 2. 2',4' -BNA と 2',4' -BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンス分子 *in vivo* 効果の比較

高い活性を見出した 2',4' -BNA 搭載型アンチセンス (mApoC3-96, 126, 381, 441, 471-BNA(14)) と対応する 2',4' -BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンス (mApoC3-96, 126, 381, 441, 471-NC(14)) をマウス個体における薬効を比較したところ、例えば mApoC3-471-NC(14) では 60% 程度の抑制効果を示した一方で、概して 2',4' -BNA<sup>NC</sup> 搭載型アンチセンスは効果を示さなかつ

た。特に *in vivo* にて活性の差が大きかった mApoC3-471-BNA(14) と mApoC3-471-NC(14)について肝臓における各アンチセンス分子の移行量を ELISA 法にて定量したところ各アンチセンス分子の肝臓内移行量に有意な差は見出されなかった。

他方、*in vitro* スクリーニングで効果の最も高かった mApoC3-411, 436, 456, 466-NC(14)について *in vivo* での効果を評価した。いずれにおいても大きなノックダウン効果はえられなかったが、mApoC3-436-NC(14)について約 20%の有意な減少を確認した。

### 3. 2',4'-BNA 搭載抗 apoC-III アンチセンスのコレステロール修飾型 (chol-ASO) および非修飾型 (ASO) の体内分布解析

アンチセンスに対してコレステロールを修飾することによる肝移行量の変化を検証する為に、昨年度のスクリーニングにより得られた apoC-III を標的とした配列に対して 5' 末端: Cy3 (ASO) および 5' 末端: Cy3, 3' 末端: cholesterol (chol-ASO) を修飾したものを用意した。これらを 6 週齢の C57BL/6J の雄性マウスに、2 週間自家蛍光軽減食負荷後、単回投与を行った。投与 2 日後に、Cy3 の蛍光を *in vivo* イメージングシステムにて観察を行ったところ、chol-ASO 投与群は ASO 投与群と比較し、肝臓において明らかに強い蛍光が認められた。各組織(肺、

心臓、肝臓、脾臓、腎臓)を摘出し、*ex vivo* での観察を行うと、ASO 投与群の腎臓において強い蛍光が検出された一方で、chol-ASO は腎臓への集積が軽減していることが明らかになった。各組織についてその輝度を解析したところ、心臓、脾臓での Cy3 による蛍光は検出出来ず、肺への蓄積は ASO および chol-ASO で同等であった。また、Cy3 標識によるアンチセンスの動態への影響を確認すべく、コントロールとして Cy3 のみを投与する群を設け同様の実験を行ったところ、Cy3 は腎臓への集積は僅かに認められたが、肝臓においては検出されなかった。この結果より、Cy3 標識の肝移行性への影響はないものとした。

以上の検討から、アンチセンスにコレステロールを修飾することにより、期待通りに肝臓への移行性を向上させることを確認した。

### 4. コレステロール修飾型および非修飾型抗 apoC-III アンチセンスの薬効解析

apoC-III を標的とした ASO および chol-ASO の *in vivo* での薬効を評価するために、それぞれ 1.1  $\mu\text{mol/kg}$  の用量で、尾静脈より投与を行った。単回の投与から 3 日後における AST や ALT、BUN や CRE はどの投与群においても正常値を示し、際立った肝毒性および腎毒性は認められなかった。一方で、肝臓中 apoC-III mRNA の量は非修飾型のものが約 6 割の低下が認められたのに対し、chol-ASO は

2割弱の低下と、期待に反して遺伝子発現抑制効果を減弱する結果となった。

以上より、アンチセンスへのコレステロール修飾は、毒性に関しては、非修飾型のものと差異が認められないことが示された。しかしながら、コレステロールの修飾は肝臓への移行性を向上させる一方で、アンチセンス活性の低下もしくは肝臓内における標的細胞への移行性に問題があることを示唆する結果となった。

## 5. 肝臓内における ASO および chol-ASO の分布局在解析

*in vivo* イメージング実験の肝臓サンプルを1週間10%ホルマリン溶液にて固定後、O.C.T コンパウンドを用いて包埋し、液体窒素にて凍結した。本サンプルから作製した肝臓切片スライドを蛍光顕微鏡にて観察を行った。低倍率における観察からは *in vivo* イメージングの観察像と同様に、chol-ASO を投与したマウスの肝臓切片では非修飾型と比較し、多くのアンチセンスの存在が確認される。一方で、chol-ASO は肝臓全体に均一に取込まれておらず、局在していることが伺える。CLSM により、さらに高倍率における観察を行った結果、chol-ASO は肝実質細胞の間隙に存在する肝臓内マクロファージであるクッパー細胞へと特異的に取込まれている像が得られた。非修飾型にも同様の傾向が認められたが、肝実質細胞内においてもアンチセンスは多く認められた。

本結果から、アンチセンスにコレステロールを修飾することで、より肝臓特異的な送達が可能になった一方で、遺伝子発現抑制効果が顕著に低下したのは、chol-ASO が肝臓への移行後にクッパー細胞特異的に取込まれていたことが原因として考えられた。

## 6. 動的光散乱法によるアンチセンスの粒子径測定

今回、動態を制御する為に選択したコレステロールは、水に対する溶解性が極めて低いことから、アンチセンスにコレステロールを修飾することで、saline 中ではある程度凝集することが考えられる。また、薬物の体内動態はその粒子サイズに大きく依存することから、chol-ASO が粒子を形成し、期待した経路とは別の経路によりクッパー細胞へと取込まれたことが予想された。従って、動的光散乱法により投与時の濃度における ASO および chol-ASO の粒子径の測定を行うこととした。それぞれのグラフにおいて 10, 1000 nm 付近にピークが確認できるが、1000 nm 付近は saline 由来のバックグラウンドであり、10 nm 付近はアンチセンス単体の大きさを検出したものと考えられる。chol-ASO の測定結果において 100 nm 付近の特徴的なピークが確認されることから、実際に chol-ASO は 100-200 nm の粒子を形成していることが示された。

組織特異的な送達を目的とした場合、血中のタンパク質と相互作用するような

分子や組織特異的な受容体のリガンドとなるような分子を修飾することは非常に有用な方法である。しかしながら、アンチセンスに対してそれらを修飾することは、その性質に大きな影響を及ぼし、投与時の形態を変化させてしまいかねないことが、本結果より伺える。

### 7. MRI イメージング

7 tesla MRIにおける普通食1年以上のAN-KOマウスの大動脈プラーク描出は、造影剤を用いないT1強調、T2強調、脂肪抑制有無のいずれの条件下でも病変部を断定する像を得ることができなかった。しかし、ガドリニウム系試薬のGadofluorine Mを静注したことにより、4時間後にT1WI強調画像により高輝度に病変が描出された。高コレステロール食餌負荷8週と16週)MRIでは描出されなかった。

### 8. 超音波イメージング

普通食1年以上のAN-KOマウスでは、大動脈弓に特に高輝度な隆起像が観察された。大動脈弓横断像の径狭窄率は約25~35%の狭窄を認めた。また、動脈起始部より上行大動脈に血管壁肥厚像がみられた。高コレステロール食餌負荷16週では小さなプラークを大動脈弓のみに描出し得た。また、大動脈弓横断像で、10%以下の狭窄率であった。高コレステロール食餌負荷8週では7例中1例に大動脈弓に極小のプラークを認めたが、残りの6例では明らかなプラーク像を認めなかった。

### 9. 大動脈の Oil red 染色

高コレステロール食餌のAN-KOマウスでは、負荷期間の長さに伴い、Oil redに染色された面積率は有意な上昇を示した。

### 10. 大動脈の病理組織学的解析

普通食を自由摂取させた1年以上のWild typeの大動脈では全例が正常な組織像を示した。普通食を自由摂取させた1年以上のAN-KOマウスでは、泡沫細胞などの細胞浸潤、線維性被膜および脂質蓄積が認められる進行性病変やさらに進行した複合病変を認めた。なお、高コレステロール食餌負荷前のAN-KOマウスでは、7例中1例に初期病変である内膜肥厚像が見られたが、6例は動脈硬化病変を認めなかった。負荷8週では7例全例に進行病変を認め、負荷14週では4例全例に複合病変が認められた。マウス1匹当たりの動脈硬化病変の発生個数は負荷前：0.1±0.4個、負荷8週：2.6±1.4個、負荷16週：12.3±1.9個であり、16週では、8週に比し、有意に増加していた。

### 11. 超音波断層法による IMT の計測

コントロールとして普通食を与えた動物は正常所見を示した。高コレステロール食餌16週間摂取のApoE-KOマウスの大動脈弓に高輝度な隆起像が観察され、大動脈弓横断像にて径狭窄率は20±11%であった。また、動脈起始部より上行大動脈に血管壁肥厚像がみられ、血管壁肥厚像

(IMT 計測による) を測定した結果、ApoE-KO マウスの動脈弁、大動脈起始部、上行大動脈および腕頭動脈の位置での IMT 値は、Wild type より有意に高値であった。

## 12. 大動脈の病理組織学的解析

大動脈の HE 染色、EVG 染色や Kossa 染色標本の対比により、HE 染色や EVG 染色標本における染色態度とコッサ反応陽性との関連付けが出来た。多数の進行性病変や石灰化を伴う複合病変が観察され、進行性病変では 1 匹当たりの平均発生個数は  $14.3 \pm 4.8$ 、複合病変では  $2.3 \pm 1.6$  個であった。また、免疫蛍光染色により、多数のマクロファージの集簇やテネイシン C 発現が各動脈硬化病変に認められた。

## 13. Real-time PCR 解析および免疫組織学的染色

HE 染色、EVG 染色により動脈硬化病変を確認できたホルマリン固定パラフィン包埋組織から RNA 抽出を行い、Real-time PCR により、網羅的解析を行った。その結果、動脈硬化病変を含む動脈では幾つかのサイトカインが著しく上昇した。種々の動脈硬化病変について、Cxcl16 に対する免疫組織学的染色を行った結果、進行性病変や複合病変の病変部に一致して Cxcl16 の発現を認めた。

## 14. 抗体アレイ解析および免疫蛍光染色

動脈硬化病変を含む動脈の凍結組織からタンパクを抽出して、抗体アレイ解析を行った結果、TIMP-1が上昇を示した。そこで、TIMP-1に対する免疫蛍光染色を行い、TIMP-1分子の発現が全ての進行度の病変部において観察された。

## 15. F4/80とTIMP-1の二重免疫蛍光染色

TIMP-1 はマクロファージにより産生・分泌されると報告されていることより、マクロファージを認識する F4/80 と TIMP-1 の二重免疫蛍光染色を行った。その結果、多くの病変では、殆どの TIMP-1 はマクロファージに局在していた。

## 16. 肝臓での脂肪蓄積の解析

アンチセンス ApoC3-01S 20 mg/kg 投与群で、病理組織学的に脂肪肝の減少が観察され、Oil Red 染色により肝細胞での脂肪の蓄積が著しく減少していることを示した (Yamamoto T, et al *European Journal of Pharmacology*, 723, 353-359, 2014)。肝臓での脂肪蓄積を一目瞭然に判別できるような Oil Red 染色が可能となった。

## D. 考案

本研究は、高TG血症および動脈硬化の予防を目的とした、アポCIIIを対象とした核酸医薬の開発を行うものである。

小比賀グループにおいては、本年度は、まず、初代BNAである2',4'-BNAよりも結

合力と酵素耐性の向上を実現可能な2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンス分子の開発をめざし、配列の設計と合成を行うと共に、*in vitro*及び*in vivo*における効果の評価を行った。2',4'-BNAの配列を2',4'-BNA<sup>NC</sup>で置き換えた化合物を用意し、*in vivo*での効果の評価した。予想に反して、2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載したアンチセンスはほとんど効果を示さなかった。一つの原因として、2',4'-BNAと2',4'-BNA<sup>NC</sup>ではその構造上の違いに起因して、活性を示す配列に差があることが考えられた。そこで、*in vitro*スクリーニングの結果から最も効果の高かったmApoC3-436, 456, 466-NC(14)の配列について、*in vivo*での効果の評価したところmApoC3-436-NC(14)においてわずかな効果を認めたと留まった。*in vitro*では効果が認められた一方で*in vivo*で大きな効果の減弱につながった原因として、*in vitro*ではLipofectamine 2000などの導入試薬を使っているが*in vivo*ではnakedで単剤投与を行っていることが挙げられる。2',4'-BNAと2',4'-BNA<sup>NC</sup>では後者の方が架橋環内にヘテロ原子を多く含み、親水性に富むことから体内動態の違いが示唆された。そこで mApoC3-471-BNA と mApoC3-471-NC(14)について肝臓内移行率を比較したところ両者に大きな違いは無かった。肝臓には多くの種類の実質以外の非実質細胞が存在し、ホスホロチオアト型のオリゴヌクレオチドはクッパー細胞などの非実質細胞に貪食されることが知られている（非生産的経路）。

2',4'-BNAと2',4'-BNA<sup>NC</sup>の化学構造の違いが、非生産的経路への取り込みを変化させ、薬効量が減少したことが一因であると考えられる。すなわち、2',4'-BNA<sup>NC</sup>のケミストリーにおいても小さな疎水性や電荷の違いが生産的経路への移行量を減少させた可能性が大きい。昨年度の結果では、20塩基程度の2',4'-BNA<sup>NC</sup>搭載型アンチセンスであれば、*in vivo*でも高い効果を示したことから鎖長（恐らくホスホロチオアトによる疎水性）が大きなファクターであると予想される。2',4'-BNA<sup>NC</sup>や2',4'-BNA<sup>AM</sup>などの次世代型BNAプラットフォームは置換基を容易に変化させることが可能であるため、生産的経路への移行量をどのような置換基を用いることで、増加させることが可能であるかという観点でのスクリーニングが非常に大きな鍵を握っていると示唆される。我々は昨年度、2',4'-BNA<sup>AM</sup>の2'位窒素の置換基を疎水性にしたアナログの合成を達成し、動態が変化することを見出しており、2',4'-BNA<sup>NC</sup>においても同様のアプローチが可能である。*in vitro*で高い活性を示したが、*in vivo*では効果を示さなかったアンチセンスを利用すれば、*in vivo*で効果を得るための置換基をスクリーニングにより探索することが可能であろう。

斯波グループにおいては、本年度は、昨年度の探索により得られたアンチセンスに対し、コレステロールを修飾することで肝臓への移行性の向上を図った。コレステロール修飾することで、アンチセンスの肝



臓への送達が効率的なり、非特異的な臓器における副作用の回避や投与量の低減から低コストの治療が可能となることを期待した。

コレステロールをアンチセンスに対して修飾する戦略は、投与後、血中において LDL と相互作用することで肝臓内へ LDL 受容体を介して取込まれることを期待したものである。非修飾型の ASO とコレステロール修飾型の chol-ASO を尾静脈から投与後の *in vivo* イメージングにより、非特異的な臓器への集積を低減させ、肝臓への移行を向上させることに成功している。しかしながら、実際の肝臓における標的遺伝子発現抑制効果は、ASO と比較し大幅に低下させる結果となった。原因としては、①コレステロールを修飾することでアンチセンス活性自体を立体的に阻害したこと、②肝臓内において標的の肝実質細胞への取込みに至っていなかったこと、が考えられた。顕微鏡を用いた肝臓切片のイメージングから、chol-ASO は肝臓内において、肝実質細胞の間隙に存在する貪食系細胞であるクッパー細胞に特異的に集積している像が得られた。アンチセンスにコレステロールを修飾したことで、その大きさや化学的性質が変化したことにより肝臓内でクッパー細胞への認識を高めてしまったことが予想される。

コレステロールは疎水性の分子であることから、親水性のアンチセンスに対して疎水性のコレステロールを修飾することで、溶液中にてミセル様の粒子を形成した

と考えられる。また、スカベンジャー受容体クラス A は、上記のような陰性荷電の高分子の他、酸化 LDL やアセチル化 LDL などといった修飾 LDL を認識することが知られている。このことから、本年度の研究において検証には至らなかったが、LDL は chol-ASO と相互作用することで修飾 LDL 様の認識を受けてクッパー細胞へと取込まれたことも可能性として考えられ得る。この点に関しては、今後の検討が必要である。

柴田グループにおいては、本年度は ASO のマウスにおける動脈硬化への効果の評価することを目的として、マウスにおける動脈硬化症のイメージングとその病理組織学的裏付け、および病巣における遺伝子発現の網羅的解析を行った。

大動脈の Oil red 染色の広がりや病理組織学的検査結果では、1 年齢以上の AN-KO マウスと高コレステロール負荷 16 週齢 AN-KO マウスではほぼ同程度の病変発生であったが、超音波断層法では狭窄率に差を認めた。MRI では良好な成績が得られず、その原因として狭窄率の差異に起因するプラーク肥厚の差が、部分容積効果により、描出されなかったと推察された。初期のプラークの描出には、さらに撮像技術や造影剤の改良が必要と考えられた。高度に進行したマウス大動脈のプラークについては、Gadofluorine M により検出することに成功した。超音波断層撮影法では、血管壁隆起の観察に加えて、大動脈の IMT 値は動脈硬化の進行度を評価する有効な手

段と考えられた。また、パラフィン包埋された動脈硬化病から mRNA を抽出し、Real time RT-PCR による網羅的解析を行った結果、変動分子として Cxcl16 を検出した。さらに、免疫組織学的に Cxcl16 は初期病変から複合病変まで発現していることを明らかにした。Cxcl16 はリンパ球の遊走能に関与しているだけでなく、血管内皮の増殖や血管新生にも関与しているとされており、動脈硬化病変の発症・進展に関わるものと推測されている分子である。さらに、抗体アレイ解析の結果、TIMP-1 が上昇を示し、免疫組織学的に初期病変から複合病変まで発現していることが分かった。TIMP-1 は MMP 活性を抑制すると報告されていることから、動脈硬化病変における線維化を亢進するものと考えられる。粥状動脈硬化症の進展からプラーク破綻へ至る分子機構において、MMP による Fibrous cap の崩壊が不安定プラークとして臨床的に重要と考えられるが、その MMP を抑制している TIMP-1 の発現調節機構は治療戦略や治療効果を評価する上で重要な分子マーカーとなり得ると考えられる。また、TIMP-1 はマクロファージが産生・分泌していることから、TIMP-1 とマクロファージを認識する F4/80 の 2 重免疫蛍光染色を行った。その結果、多くの病変で染色性の重なりが観察されることから、動脈硬化病変においても、TIMP-1 の産生源はマクロファージであることが示唆された。

## 5. 結論

本年度の研究により、2',4'-BNA と 2',4'-BNA<sup>NC</sup> の物理化学的性質が *in vivo* での動態に影響を与えること、アンチセンスに対してコレステロールを修飾することで、肝臓特異的なアンチセンスの送達が可能であることを示した一方で、肝臓内においてクッパー細胞へ特異的に取込まれていることが示された。本年度および昨年度の研究結果より、臨床応用を目的とした場合、アンチセンス配列の選定とアンチセンス核酸自体の化学的性質の最適化による高活性かつ安全なアンチセンスの設計が重要である。また、動脈硬化のイメージングについては、超音波断層撮影法において、血管壁隆起の観察に加えて、大動脈の IMT 値は動脈硬化の進行度を評価する有効な手段であること、薬効の評価は病理組織学的検査のみならず、動脈硬化発症の分子メカニズムに基づいた分子マーカーを指標としての解析も有望であることが示唆された。

## 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。

2',4'-BNA<sup>NC</sup>を搭載した高活性アンチセンス分子の設計と探索研究

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、高トリグリセリド血症の治療を目的とし、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。前年度には、apoC-III mRNA の 3'UTR 領域を標的としたアンチセンスが高い薬効を発揮することを見出した。本年度は、2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載した apoC-III アンチセンスの治療基盤の構築をめざし、3'UTR を中心に *in vitro* スクリーニングを実施した。2',4'-BNA<sup>NC</sup> においても 3'UTR 領域で高いノックダウン効果が見出されることを見出した一方で、*in vitro* で高い活性を示したアンチセンスをマウスに投与したところ、ノックダウン効果は低率に留まった。肝臓への移行率を比較したところ 2',4'-BNA と 2',4'-BNA<sup>NC</sup> に大きな差は認められなかったことから、2',4'-BNA<sup>NC</sup> 架橋サイズや親水性などが体内動態を微妙に変化させ、薬効を低下させたものと考えられた。2',4'-BNA<sup>NC</sup> の大きな特徴である、置換基導入の容易さを利用して、動態を微調整しうるアナログの探索が望まれる。

大阪大学大学院薬学研究科

柴田 映子

山本 剛史

A. 研究目的

脇 玲子

昨年度には2',4'-BNAを搭載したapoC-III

国立循環器病研究センター研究所

に対するアンチセンスのスクリーニングを

病態代謝部

経て、3'UTRがアンチセンスの標的部位とし

ス波 真理子

て好適であるという結果を得た。これらの

和田 俊輔

アンチセンスは、マウスにおいても高いノ

和田 郁人

ックダウン効果とともに高い脂質低下効果

を示した。一方で2',4'-BNAにおいては若干程度の肝毒性が確認され、この2',4'-BNAに起因する肝毒性は、世界的にも臨床開発品や研究開発段階にある2',4'-BNA搭載型アンチセンスにおいても見られているようである。我々がこれまでに開発してきた2',4'-BNA<sup>NC</sup>は、2',4'-BNAの5員環架橋構造とは異なり、窒素原子を一つ多く持つ6員環架橋構造を有し、親水性に富み、また二重鎖の安定化に重要な分子間水素結合を安定化させるための水素結合アクセプターを多く含んでいる。その大きな架橋構造は酵素認識を低下させ、ヌクレアーゼによる分解もさることながら、免疫寛容にも寄与する。このようなことから2',4'-BNA<sup>NC</sup>を基盤としたアンチセンス医薬を開発することはこれまでの2',4'-BNAをベースとしたアンチセンスの弱点を補完することが出来るものと期待される。他方で、2',4'-BNA<sup>NC</sup>搭載型アンチセンスについては、開発経験が少なく、モノマーヌクレオシドの物理化学的特徴がオリゴヌクレオチドに組み込んだ場合にはどのように影響がでてくるのか未だ不明な点が多い。我々は昨年度、20塩基長の2',4'-BNA<sup>NC</sup> (Tと<sup>13</sup>Cのみ) 搭載型アンチセンスが2',4'-BNAに劣らぬ効果と安全性を示すことを確認している。本年度は、2',4'-BNA<sup>NC</sup>搭載型アンチセンスの開発基盤を構築すべく、2',4'-BNA で得られた知見を基礎として3'UTRを中心に、活性化化合物の探索を行うこととした。

## B. 研究方法

### 1. 2',4'-BNA<sup>NC</sup>搭載型アンチセンス分子の設計と合成

マウス apoC-III mRNA の3'UTR 領域を中心に 2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載した14塩基長アンチセンスを34種設計し、合成した(表1)。各配列名は、マウス apoC-III の転写開始から数えた結合位置と人工核酸の種類(NCは2',4'-BNA<sup>NC</sup>)と鎖長を示す。また2',4'-BNA<sup>NC</sup>は5カ所修飾し、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。

### 2. *in vitro* トランスフェクション実験

#### a. 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、回復し、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。