

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°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 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. Realtime 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) , Mm99999915\_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 C57BL/6J (♂: 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°C 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. Realtime RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いて total RNA 4 μg から cDNA を作製した。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、apoC-III の mRNA 量を定量した。リアルタイム PCR では、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH の mRNA 量も同時に定量し、GAPDH に対する apoC-III の mRNA 量の比 (検量線法) で評価した。TaqMan Gene Expression Assays ID; Mm00445670\_m1 (apoc3) , Mm99999915\_g1 (gapdh)

### 7. 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

イクテム 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

## 8. 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (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  $\text{MgCl}_2$ , 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<sup>®</sup> 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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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<sup>®</sup> 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<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合物がいくつか見出された (図 2)。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った (図 3)。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 (図 5)。

他方、*in vitro* スクリーニング (図 2) で

効果の最も高かった mApoC3-411, 436, 456, 466-NC(14) について *in vivo* での効果の評価した。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 (図 4)。

## D. 考察

本研究では、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進めた。昨年度の 2',4'-BNA での結果より apoC-III mRNA の標的としては mRNA の 3'UTR 領域が有効であることが示唆されていたことから、ここでは 3'UTR を標的とした 2',4'-BNA<sup>NC</sup> を搭載したアンチセンス分子を中心に、設計・合成を行い、機能評価を行った。2',4'-BNA<sup>NC</sup> の A, T, G, <sup>13</sup>C を有するホスホロチオアート型アンチセンスについては、いずれの塩基組成および配列においても問題なく合成することが可能であることが明らかとなった。これらのアンチセンスをそれぞれマウス初代培養肝臓細胞にトランスフェクションし、ノックダウン効果をスクリーニングしたところ、活性の強弱の順位に差はあったものの 2',4'-BNA での結果と同様に 3'UTR の高い活性を見出した。このことは apoC-III mRNA が 3'UTR にて品質管理がなされている、あるいは apoC-III mRNA の 3'UTR には結合タンパク質や高次構造など

が少なく、ターゲティングし易い状態で存在していることなどが示唆される。*in vitro* で効果の高かった mApoC3-471-BNA(14)などの 2',4'-BNA 型アンチセンスは、*in vivo* においても他の配列に比較して高い効果を示した。本研究では、これらの、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)の配列をマウスに適用し、効果の評価したところ mApoC3-436-NC(14)において若干のノックダウン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、ホスホロチオアート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うること

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。ス波グループによるコレステロール修飾した 2',4'-BNA 搭載型アンチセンスの薬効および動態解析の結果でも、肝臓へのこれらのオリゴヌクレオチドの移行量は大幅に増加したが薬効は大きく低下することが見出されている。肝臓への移行量の増大は、主にクッパー細胞への取り込みの亢進に由来することが明らかとなっているがこれらは薬効には寄与しないことを意味する。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ートによる疎水性)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。

#### E. 結論

本研究では、3'UTR を標的にした 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載アンチセンスが *in vitro* で高い活性を示した一方で、*in vivo* での薬効には繋がらなかったことから、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、*in vivo* での低活性につながったものと考えられる。*in vivo* での薬効の向上を目指し、さらなる構造の最適化（特に架橋部の置換基の変換）が肝要であり、ブレイクスルーにつながりうる。

#### 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) Morihiko K, Kodama T, Mori S, Obika S, Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand, *Org. Biomol. Chem.*, 12, 2468-2473, 2014.
- 2) Shrestha A. R, Kotobuki Y, Hari Y, Obika S, Guanidine Bridged Nucleic Acid (GuNA): An Effect of Cationic Bridged Nucleic Acid on DNA Binding Affinity,

*Chem. Commun.*, 50, 575-577, 2014.

- 3) Morihiko K, Kodama T, Waki R, Obika S, Light-triggered Strand Exchange Reaction Using the Change in the Hydrogen Bonding Pattern of the Nucleobase Analog, *Chem. Sci.*, 5, 744-750, 2014
- 4) Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata M, Shiba M, Locked Nucleic Acid Antisense Inhibitor Targeting Apolipoprotein C-III Efficiently and Preferentially Removes Tryglyceride from Large Very Low-density Lipoprotein Particles in Murine Plasma, *Eur. J. Pharmacol.*, 723, 353-359, 2014
- 5) Hari Y, Nakahara M, Ijitsu S, Obika S, The Ability of 1-Aryltriazole-containing Nucleobases to Recognize a TA Base Pair in Triplex DNA, *Heterocycles*, 88, 377-386, 2014.
- 6) Hari Y, Morikawa T, Osawa T, Obika S, Synthesis and Properties of 2'-O,4'-C-Ethyleneoxy Bridged 5-Methyluridine, *Org. Lett.*, 15, 3702-3705, 2013.
- 7) Hari Y, Akabane M, Obika S, 2',4'-BNA Bearing a Chiral Guanidinopyrrolidine-containing Nucleobase with Potent Ability to Recognize the CG Base Pair in Parallel-motif DNA Triplex, *Chem. Commun.*, 49, 7421-7423, 2013.
- 8) Akiyama H, Miyashita K, Hari Y, Obika S,

- Imanishi T, Synthesis of Novel Polyesteramine Dendrimers by Divergent and Convergent Methods, *Tetrahedron*, 33, 6810-6820, 2013.
- 9) Hari Y, Nakahara M, Obika S, Triplex-forming Ability of Oligonucleotides Containing 1-Aryl-1,2,3-Triazole Nucleobases Linked via a Two Atom-length Spacer, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 5583-5588, 2013.
- 10) Hari Y, Kashima S, Inohara H, Ijitsu S, Imanishi T, Obika S, Base-pair Recognition Ability of Hydroxyphenyl Nucleobases in Parallel Triplex DNA, *Tetrahedron*, 69, 6381-6391, 2013.
- 11) Hari Y, Osawa T, Kotobuki Y, Yahara, A Shrestha A. R, Obika S, Synthesis and Properties of Thymidines with Six-membered Amide Bridge, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 4405-4412, 2013.
- 12) Morihiro K, Kodama T, Kentefu, Moai Y, Veedu R. N, Obika S, Selenomethylene-Locked Nucleic Acid Enables Reversible Hybridization in Response to Redox Changes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 5074-5078, 2013.
- (邦文)  
なし
2. 学会発表
- 1) 小比賀聡, 核酸創薬の新展開, 大阪大学未来戦略機構創薬シンポジウム<アカデミア基盤研究から未来創薬へ>, 2014年3月27日, 東京
- 2) 小比賀聡, 核酸創薬研究における新たな取り組み, 第7回レドックス・ライフノベーションシンポジウム, 2014年3月6日, 東京
- 3) 小比賀聡, 核酸創薬を目指した人工核酸の開発研究, 千里ライフサイエンスセミナー「生命科学・医薬研究を拓くマイクロRNAの研究最前線」, 2014年2月21日, 大阪
- 4) 小比賀聡, 核酸医薬開発の現状と今後の展開 -高機能化技術/核酸修飾技術-, JST 研究開発戦略センター「次世代バイオ医薬品の俯瞰に関するワークショップ」, 2013年12月19日, 東京
- 5) 小比賀聡, 核酸医薬の有効性・安全性評価における課題, 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム, 2013年12月12日, 東京
- 6) 小比賀聡, 核酸創薬に向けた我々の取り組み～基礎から最前線まで～, 新科学技術推進協会ライフサイエンス技術部会・分科会講演会, 2013年11月14日, 東京
- 7) 小比賀聡, 新規架橋型人工核酸の開発研究, ヒューマンサイエンス振興財団規制基準委員会規制動向調査WG勉強会, 2013年7月10日, 大阪

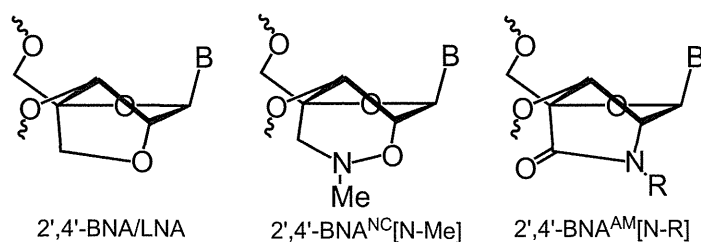


図 1. 糖部架橋型人工核酸「BNA」の化学構造。B は塩基、R は種々の置換基を指す。

表 1 本研究で設計・合成した 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 搭載アンチセンスオリゴヌクレオチド一覧

遺伝子名-標的位置-BNA 種(鎖長)	遺伝子名-標的位置-BNA 種(鎖長)
mApoC3-96-NC (14)	mApoC3-426-NC (14)
mApoC3-306-NC (14)	mApoC3-431-NC (14)
mApoC3-316-NC (14)	mApoC3-436-NC (14)
mApoC3-321-NC (14)	mApoC3-441-NC (14)
mApoC3-331-NC (14)	mApoC3-446-NC (14)
mApoC3-336-NC (14)	mApoC3-451-NC (14)
mApoC3-346-NC (14)	mApoC3-456-NC (14)
mApoC3-351-NC (14)	mApoC3-461-NC (14)
mApoC3-361-NC (14)	mApoC3-466-NC (14)
mApoC3-366-NC (14)	mApoC3-471-NC (14)
mApoC3-376-NC (14)	mApoC3-476-NC (14)
mApoC3-381-NC (14)	mApoC3-486-NC (14)
mApoC3-391-NC (14)	mApoC3-491-NC (14)
mApoC3-396-NC (14)	mApoC3-496-NC (14)
mApoC3-406-NC (14)	mApoC3-501-NC (14)
mApoC3-411-NC (14)	mApoC3-506-NC (14)
mApoC3-416-NC (14)	mApoC3-511-NC (14)

骨格は全てホスホロチオアート化。各配列で 5 カ所に 2',4'-BNA<sup>NC</sup> を導入。

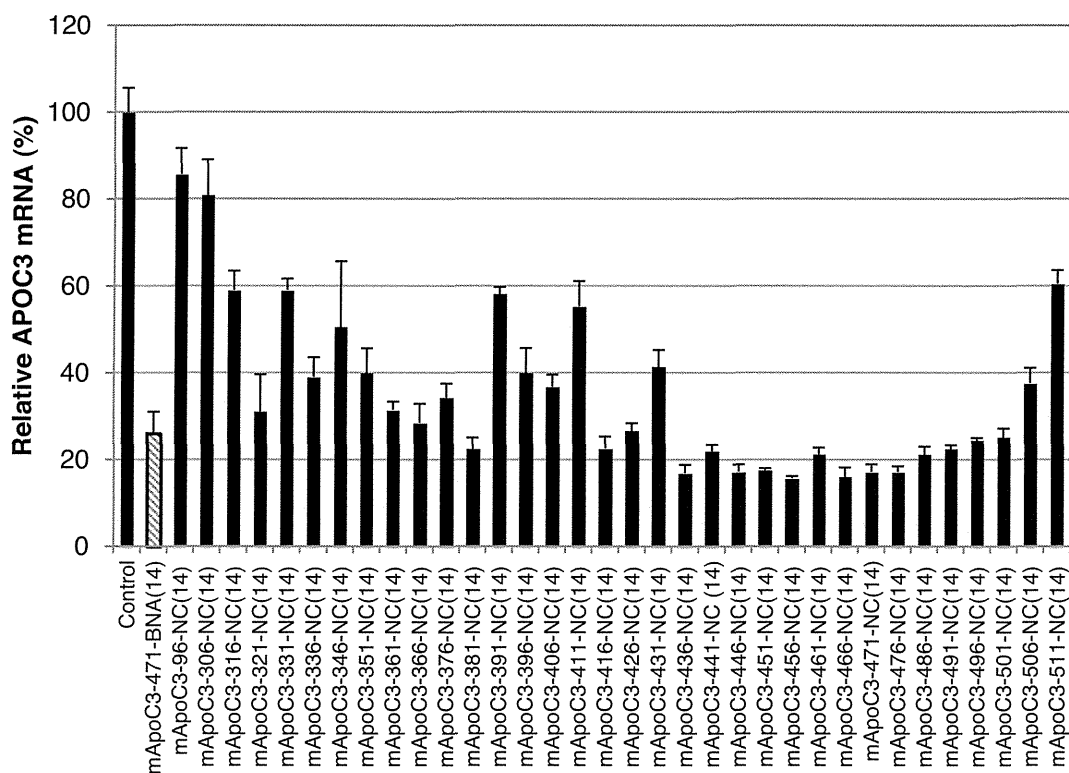


図 2. マウスの初代培養肝臓細胞を用いたアンチセンス分子の薬効スクリーニング結果。2',4'-BNA を搭載したアンチセンスを 35 種選択し、それぞれを Lipofectamine2000 とともに最終 10nM の濃度で添加し、4 時間インキュベート (35°C, 5%CO<sub>2</sub>) し、培地交換後 20 時間培養を行った。

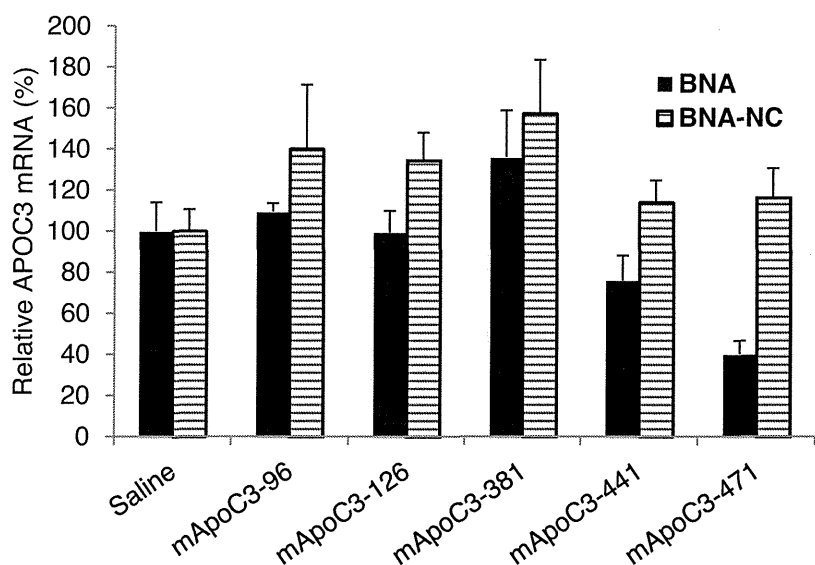


図 3. 2',4'-BNA において効果の高かったアンチセンスについて 2',4'-BNA<sup>NC</sup>に置換し、それぞれをマウス個体に適応し効果を比較した。



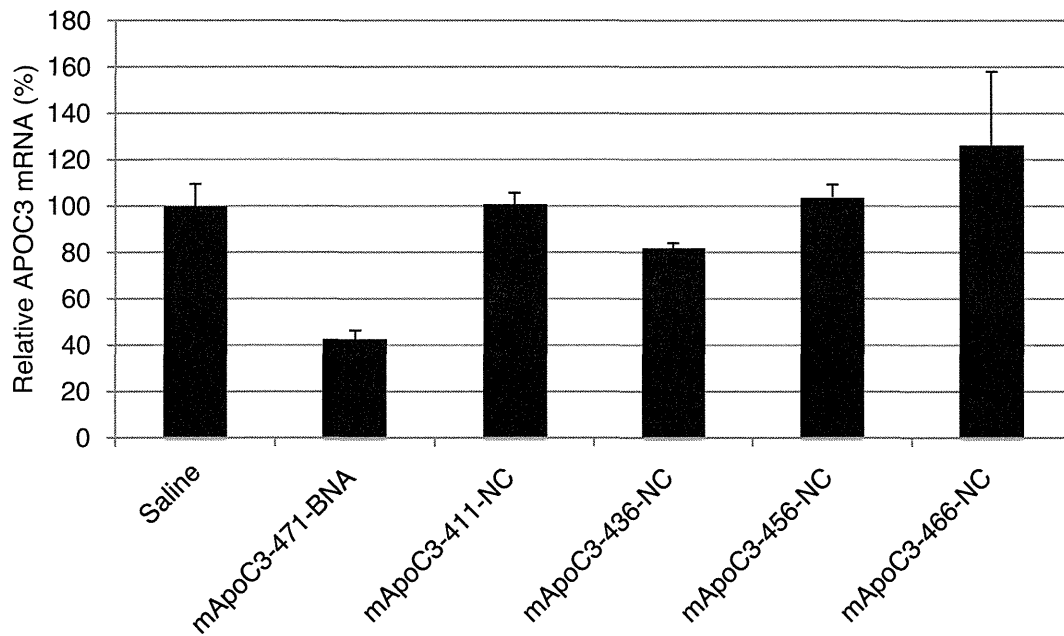


図4. 2',4'-BNA<sup>NC</sup>において *in vitro* スクリーニングで一定の効果を示したアンチセンスについてそれぞれをマウス個体に適応し効果を比較した。

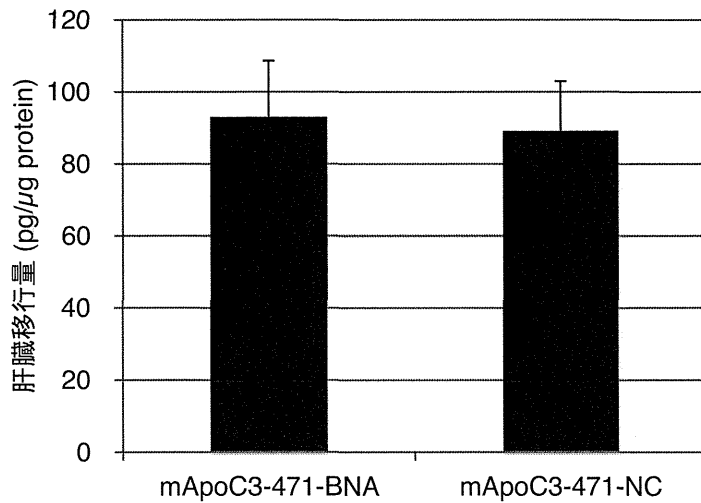


図5. 同一配列で異なるケミストリーを有するアンチセンスについて肝臓移行量をELISA法を用いて比較した。

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  
-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-

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

レムナントリポタンパク質（RLP）の代謝に関与するとされるアポリポタンパク質 C-III（apoC-III）は、高トリグリセリド（TG）血症の原因因子の一つと考えられている他、血管壁において慢性炎症の誘導や動脈硬化巣の形成に直接関わっていることが示唆されている。本研究では、apoC-III を特異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の探索および構造の最適化により、高 TG 血症の治療並びに動脈硬化の予防を目的とした今までにない治療薬の開発を行う。昨年度は、apoC-III を標的としたアンチセンスの網羅的な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。また、「BNA」シリーズの次世代型となる 2',4'-BNA<sup>NC</sup> および AmNA (2',4'-BNA<sup>AM</sup>) の *in vivo* における薬理効果、安全性について評価した。その結果、第一世代の 2',4'-BNA と比較し、同等の遺伝子発現抑制効果を示し、さらに安全性において優れていることを見出した。本年度は、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）することで肝移行性の向上について検討し、実際に肝臓への集積量の増加を確認した。一方で、Chol-ASO は肝臓における遺伝子発現抑制効果は顕著に減弱する結果となった。本結果の原因について解析を行ったところ、Chol-ASO は肝臓内において肝実質細胞ではなく非実質細胞、とくにクッパー細胞に特異的に取込まれていることが明らかとなった。安全性の面においては動態を制御する分子の修飾を行うことで他組織への蓄積を回避することは有効な手段であるが、大きな分子の修飾はアンチセンス自体の性質を大きく変えてしまうことが示された。本年度および昨年度の研究から、医薬品への応用を考慮した際、アンチセンス自体の特性（配列もしくは BNA の特性）の最適化による活性及び動態、毒性の制御を行うことが重要であると考えられる。

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  
安原 秀典  
堀 美香  
小倉 正恒  
和田 俊輔  
柴田 映子  
長谷川 夕希子  
森本 めぐむ  
駒井 仁美  
吉田 晶子

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀 聡  
山本 剛史

#### A. 研究目的

動脈硬化症は、虚血性心疾患や脳血管疾患発症の原因として知られ、これらは本邦における死因の大半を占めている。動脈硬化症の発症リスクとしては脂質異常症や高血圧、糖尿病などが認知されているが、脂質異常症の一つである高トリグリセリド（TG）血症は、独立した冠動脈疾患の危険因子であることが疫学的に示されている。しかしながら、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に加え、強力なTG低下作用を有する薬剤がないことが原因で十分な治

療が困難である。メタボリックシンドロームや糖尿病などのリスク因子を重複したような状況においては特に、高TG血症への介入が功を奏した例も少なくはないことから、高TG血症の管理が残された喫緊の課題である。

動脈硬化薬にはTGに富むリポタンパク質（TG-rich lipoprotein: TRLs）であるCM,VLDL及びそれらのレムナント（TRLs remnant lipoprotein: TRL 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もっと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）が大きく関与している。apoC-IIIはLPLの活性阻害や、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、血管内皮や単球に作用し、血管内皮表面で辛勝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、RNAに対する高い親和性を有する新規人工核酸「BNA」搭載型アンチセンスを用いた選択的apoC-III阻害薬の臨床開発を目的とし、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、アンチセンス効果の向上を目的として次世代型BNAの検討とapoC-III mRNAに対するアンチセンスを多数設計および評価することで高活性かつ安全なapoC-III mRNA上の標的部位の探索を試み

た。次世代型 BNA である 2',4'-BNA<sup>NC</sup> および AmNA (2',4'-BNA<sup>AM</sup>) の *in vivo* における評価では、AmNA の置換基を様々に変えることで肝臓への移行性の上昇が認められたことから、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示唆された。また、アンチセンス効果を最大限高めるために、網羅的な mRNA 上の標的部位の探索を試みた結果、*in vitro* 並びに *in vivo* において高い活性・安全性を有する配列の選定に成功している。本年度は、apoC-III が高く発現している肝臓への移行性を向上させるために、アンチセンスに対してコレステロールを修飾した。コレステロールは血中において LDL と相互作用することで肝臓へと運搬されることから、アンチセンスが効率よく肝臓へと移行することが期待される。

## B. 研究方法

### 1. 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  $\mu\text{mol/kg/回}$ )。投与後、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°C にて保存した。

### 2. 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。

### 3. Real time RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いて total RNA 4  $\mu\text{g}$  から cDNA を作製した。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、apoC-III の mRNA 量を定量した。リアルタイム PCR では、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH の mRNA 量も同時に定量し、GAPDH に対する apoC-III の mRNA 量の比で評価した。TaqMan Gene Expression ID; Mm00445670\_m1 ( apoc3 ) , Mm99999915\_g1 ( gapdh )

### 4. 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  $\mu\text{L}$  を用いて測定した。

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

### 5. *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/6J (♂: 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、マウスを塩酸メドトミジン+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して観察を行った。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。

## 6. 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。

## 7. 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。

## C. 研究結果

### 1. 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 (図 1)。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（図 2a）。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（図 2b）。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。

## 2. 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（図 3）。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（図 4）。

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。

## 3. 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（図 5a, b）。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（図 5c）。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（図 5d）。

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。

#### 4. 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。図 6a,b に示すように、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。

#### D. 考案

本研究は、今までにない優れた高 TG 血症治療薬の臨床開発を目的とし、apoC-III を標的としたアンチセンス医薬について研究を行ってきた。apoC-III は主に肝臓に発現しているタンパク質であり、昨年度の成果において、次世代型 BNA である AmNA をアンチセンスに搭載することで肝移行性の向上が認められたことは非常に有益な結果と言える。AmNA の置換基の最適化により、さらに生体内において効率の良いアンチセンスの設計が可能になることが予想される。また、マウス初代培養肝細胞を用いた apoC-III mRNA 全領域の網羅的な標的部位の探索では、*in vivo* レベルで高活性かつ安全な配列の単離に成功している。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。標的である apoC-III は肝臓で主に発現しているタンパク質であり、アンチセンスの肝臓への効率的な送達により、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が期待される。

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。実際に非修飾型の 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* イメージングによる検討におい

ては、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、が考えられる。顕微鏡を用いた肝臓切片のイメージングから、原因として②の可能性が高いことが示唆された。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。

オリゴ核酸のマクロファージへの取込みに関して、2013年に、オリゴ核酸単体の状態と金ナノ粒子上に球状に配置されたオリゴ核酸では、後者はスカベンジャー受容体クラス A を介したマクロファージへの取込みが著増するという報告がある。(Chol, C. H., et al., 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7625-30.) chol-ASO が 100-200 nm ほどの粒子を形成しているという本研究の結果から、上記の報告と同様の経路を介したクッパー細胞への取込みが示唆された。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。

## 5. 結論

本研究では、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、非特異的な臓器への集積を減少させ、従来よりさらに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、その薬効は大幅に低下させる結果となった。原因として、コレステロール修飾型アンチセンスは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唆された。アンチセンスの動態を制御する上でアンチセンスに対して臓器選択的に移行する分子を修飾することは有効な方法である。しかしながら、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と我々は考えた。

## 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) Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 9:e88319, 2014.
- 2) Tachibana Y, Munisso MC, Kamata W, Kitagawa M, Harada-Shiba M, Yamaoka T. Quick nuclear transportation of sirna and in vivo hepatic apob gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier. J. Biotechnol. 2014
- 3) Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T: Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells in a mouse model of neonatal stroke, NeuroScience, 263C: 148-158, 2014.
- 4) Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA, Harada-Shiba M: Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removed triglyceride from large VLDL particles from murine plasma, European Journal of Pharmacology, 723: 353-359, 2014.
- 5) Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K, Harada-Shiba M, Arai H, Bujo H, Nohara A, Oikawa S, Okada T, Wakatsuki A: Familial hypercholesterolemia, J Atheroscler Thromb, 21: 6-10, 2014.
- 6) Nagasaki Y, Yamazaki T, Kikuchi A, Harada-Shiba M: Elevated atherogenic index following oral administration of quaternized polyamine nanogels, Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 113: 237-242, 2014.
- 7) 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, 18(1): 93-102, 2014.
- 8) Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T,

- Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K: High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in Japan, *J Atheroscler Thromb*, 21(2): 151-160, 2014.
- 9) Shibata MA, Shibata E, Morimoto J, Harada-Shiba M: Therapy with siRNA for Vegf-c but Not for Vegf-d Suppresses Wide-spectrum Organ Metastasis in an Immunocompetent Xenograft Model of Metastatic Mammary Cancer, *Anticancer Research*, 33: 4237-4248, 2013.
- 10) Kobayashi K, Nagata E, Sasaki K, Harada-Shiba M, Kojo S, Kikuzaki H: Increase in Secretory Sphingomyelinase Activity and Specific Ceramides in the Aorta of Apolipoprotein E Knockout Mice during Aging, *Biol. Pharm. Bull*, 36(7): 1192-1196, 2013.
- 11) Makino H, Harada-Shiba M: New aspects of statin therapy, *IEMAMC*, 13: 97-106, 2013.
- 12) 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: Familial Hypercholesterolemia with Multiple Large Tendinous Xanthomas and Advanced coronary Artery Atherosclerosis: *Intern Med*, 52: 577-581, 2013.
- (和文)  
なし  
総説
- 1) 斯波真理子, 日常診療で必ず出会う“家族性高コレステロール血症”を見逃さない為に, *小倉内科医会誌*, 第36号, 86, 2014.3
- 2) 斯波真理子, 人を見たら泥棒と思え, *Medical Practice*, Vol.31 No.3, 486, 2014.3
- 3) 斯波真理子, 日常臨床に潜む家族性高コレステロール血症～ストロングスタチンの位置付け～, *岡崎医報*, 第332号, 3, 2013.11
- 4) 長谷川夕希子, 斯波真理子, 妊娠・出産・授乳を契機に内頸動脈内膜肥厚の著明な増悪をきたした家族性高コレステロール血症ホモ接合体の一例, *動脈硬化症例 Q&A News and Scope 2013 No.5*, 7-9, 2013.10
- 5) 斯波真理子, 山本剛史, 小比賀聡, PCSK9(protein convertase subtilisin/kexin type 9)阻害による高LDL コレステロール血症の治療, *内分泌・糖尿病・代謝内科 Vol.37*, No.4, 441-447, 2013.10
- 6) 斯波真理子, 今、動脈硬化はこう予防する 家族性高コレステロール血症, *Medio Vol.30 No.9*, 108-113, 2013.9

- 7) 稲垣暢也, 西村理明, 綿田裕孝, 斯波真理子, 座談会 新規 DPP-4 阻害薬アナグリプチンの総合力を 探る!, Medical Tribune Vol.46, No.26, 16-17, 2013.6
- 8) 横山信治, 斯波真理子, 家族性高 コレステロール血症の治療, 医学 のあゆみ 動脈硬化のすべて Vol.245 No.13, 1353-1359, 2013.6
- 9) 斯波真理子, 家族性高コレステロ ール血症: PCSK9, 医学のあゆみ 動脈硬化のすべて Vol.245 No.13, 1343-1346, 2013.6
- 10) 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, PCSK9 阻害薬, 脂質異常症 — 基礎・臨床研究の最新知見 — 日本 臨牀 71 巻 増刊号 3, 603-608, 2013.6
- 11) 斯波真理子: 常染色体劣性遺伝性 高コレステロール血症, 脂質異常 症 — 基礎・臨床研究の最新知見 — 日本臨牀 71 巻 増刊号 3, 207-210, 2013.6
- 12) 斯波真理子, 山本剛史, 小比賀聡, PCSK9 遺伝子変異による高コレス テロール血症 (ADH), 脂質異常 症 — 基礎・臨床研究の最新知見 — 日本臨牀 71 巻 増刊号 3, 203-206, 2013.6
- 13) 斯波真理子: 動脈硬化を意識した 身体所見のとり方, medicina Vol.50 No.6, 962-966, 2013.6
- 14) 斯波真理子: 「コレステロールを 下げなくても良い」は真か? — FH の知見をふまえて, 大阪府保険医 協会研究会テキスト, 1-7, 2013.5
1. 学会発表  
(国際学会)
- 1) Mihara G, J-H, Nakaoki T, Torigoe H, Harada-Shiba M, Obika S, Yamaoka T, Controlled Release System of Antisense Molecule from Atelocollagen Porous Gel for Hyperlipemia Treatment, The 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013 年 12 月 4 日~7 日, Singapore
- 2) Harada-Shiba M, Long-term Effects of LDL Apheresis in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia, Joint International Congress 2013(51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs(JSAO2013)/5<sup>th</sup> Congress of the International Federation for Artificial Organs(IFA2013)), Symposium Kidney Metabolism 3, 2013 年 9 月 27 日~29 日, 横浜
- 3) Harada-Shiba M, Shibata E, Shibata MA, Morimoto M, Wada S, Wada F, Uchida S, Itaka K, Nishiyama N, Miyata K, Ishii T, Nishikawa M, Kataoka K, Intratracheal gene delivery into the model mouse of cystic fibrosis using B-H polyplex,

- 40<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, ポスター発表, 2013年7月21日~24日, Honolulu, Hawaii, U.S.A
- 4) Harada-Shiba M, Mizuno T, Harada-Shiba M, Association of Neuromedin U with Lipid Metabolism, 81th European Atherosclerosis Society Congress, ポスター発表, 2013年6月2日~5日, Lyon, France
- 5) Harada-Shiba M, Makino H, Okamura T, Kishimoto I, Miyamoto Y, Tomoike H, Yokoyama S, Defining Patients at Extremely High Risk for Coronary Artery Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia, 81th European Atherosclerosis Society Congress, ポスター発表, 2013年6月2日~5日, Lyon, France
- 6) Harada-Shiba M, Yamamoto T, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shibata MA, Obika S, Bridged Nucleic Acid(BNA)-Based Antisense Therapeutics Targeting PCSK9, 81th European Atherosclerosis Society Congress, ポスター発表, 2013年6月2日~5日, Lyon, France
- (国内学会)
- 1) 和田郁人, 山本剛史, 斯波真理子, 小比賀聡, 肝臓内取込みの上昇を目的としたコレステロール修飾型アンチセンス核酸の体内及び、肝臓内動態解析, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27 日~30 日, 熊本
- 2) 和田俊輔, 和田郁人, 小比賀聡, 斯波真理子, LDLRAP1 過剰発現が及ぼす脂質代謝への影響, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27 日~30 日, 熊本
- 3) 小倉正恒, 榎野久士, 玉那覇民子, 肥塚諒, 菱田藍, 長谷川夕希子, 岸本一郎, 斯波真理子, 冠動脈三枝病変を合併した家族性高コレステロール血症 (FH) ヘテロ接合体高齢初産の 1 例, 第 32 回日本アフレスシス学会関西地方会, 一般演題 1, 2014 年 2 月 8 日, 滋賀
- 4) 堀美香, 駒井仁美, 水野敏秀, 斯波真理子, ニューロメジン U の役割と動脈硬化との関連, 第 36 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸
- 5) 安原秀典, 山本剛史, 斯波真理子, 小比賀聡, 架橋型アンチセンス核酸の体内動態に関する定量的評価, 第 23 回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2013 年 11 月 28 日~29 日, 徳島
- 6) 三原元気, 姜貞勲, 中沖隆彦, 鳥越秀峰, 鳥越秀峰, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二, アテロコラーゲンゲルを用いた分子標的型核酸除放化システム, 第 23 回アンチセンスシンポジウム, セッション