

- IV, 2013年11月28日～29日, 徳島
- 7) 和田俊輔, 安原秀典, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸の薬理薬効評価, 第23回アンチセンスシンポジウム, セッションII, 2013年11月28日～29日, 徳島
- 8) 脇玲子, 山本剛史, 矢原愛子, 安原秀典, 斯波真理子, 田原早織, 川上純司, 小比賀聡, さまざまな置換基を施したアミド架橋型人工核酸の *in vitro* 機能評価, 第23回アンチセンスシンポジウム, セッションI, 2013年11月28日～29日, 徳島
- 9) 太田直孝, 宮本恵宏, 藤山啓美, 藤原明寛, 佐野道孝, 榎野久士, 岸本一郎, 斯波真理子, LDL 受容体遺伝子異常および PCSK9 遺伝子異常と家族性高コレステロール血症 (FH) の病態について, 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, ポスター発表, 2013年11月22日～23日, 大阪
- 10) 堀美香, 水野敏秀, 斯波真理子, ニューロメジンUの脂質代謝及び動脈硬化との関わり, 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 一般演題6, 2013年11月22日～23日, 大阪
- 11) 津田秀年, 山原研一, 大谷健太郎, 斯波真理子, 寒川賢治, 高原史郎, 猪阪善隆, 急性腎障害モデルにおける抗炎症性因子を介した同種他家卵膜由来間葉系幹細胞移植の腎保護作用, 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 一般演題5, 2013年11月22日～23日, 大阪
- 12) Yasuhara H, Yamamoto T, Wada S, Waki R, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S, Chemical Modifications of Antisense Oligonucleotides Enhance Unassisted Uptake in Tissues and Accumulate Over a Long Period of Time, 第28回日本薬物動態学会, ポスター発表, 2013年10月9日～11日, 東京
- 13) 三原元気, 姜貞勲, 中沖隆彦, 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による分子標的型核酸徐放化システムの構築, 日本バイオマテリアル学会 第9回関西若手研究発表会, 2013年8月31日, 大阪
- 14) 和田郁人, 山本剛史, 安原秀典, 小比賀聡, 斯波真理子, Apolipoprotein C-IIIを標的とした高活性なアンチセンス核酸の探索とその薬理効果及び、毒性の評価, 遺伝子・デリバリー研究会 第13回夏期セミナー, 2013年7月24日, Honolulu, Hawaii, USA
- 15) 和田俊輔, 安原秀典, 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸の薬理薬効評価,

- 遺伝子・デリバリー研究会 第13  
回夏期セミナー, 2013年7月24日,  
Honolulu, Hawaii, USA
- 16) 安原秀典, 山本剛史, 和田郁人,  
和田俊輔, 中谷萌夏, 小比賀聡,  
斯波真理子, 家族性高コレステロ  
ール血症治療を目的とした人工核  
酸 BNA 搭載型アンチセンス医薬  
品の開発, 第45回日本動脈硬化学  
会総会・学術集会, ポスター発表,  
2013年7月18日~19日, 東京
- 17) Wada F, Yamamoto T, Yasuhara H,  
Wada S, Obika S, Harada-Shiba M,  
Screening and Selection of Highly  
Effective 2',4'-BNA-Modified  
Antisenses targeting  
ApolipoproteinC-III, 第45回日本動  
脈硬化学会総会・学術集会, ポス  
ター発表, 2013年7月18日~19日,  
東京
- 18) Shibata E, Enmi J, Shibata MA,  
Morimoto M, Fukuda H, Hashikawa  
Y, Iguchi S, Kawashima H,  
Michikura M, Fuke C, Hori M, Iida H,  
Harada-Shiba M, Imaging and  
histopathological analyses of aortic  
lesions in atherosclerosis model mice  
using MRI, 第45回日本動脈硬化学  
会総会・学術集会, ポスター発  
表, 2013年7月18日~19日, 東京
- 19) Yuasa Y, Makino H, Minamino N,  
Kishimoto I, Tamanaha T, Koezuka R,  
Hori M, Harada-Shiba M, Protein  
convertase subtilisin-like/kexin  
type9(PCSK9) is removed by  
LDL-apheresis in patients with  
familial hypercholesterolemia(FH)  
and arteriosclerosis obliterans(ASO),  
第45回日本動脈硬化学会総会・学  
術集会, ポスター発表, 2013年7月  
18日~19日, 東京
- 20) Ohta N, Miyamoto Y, Makino H,  
Fujiwara A, Fujiyama H, Nakasone I,  
Sano M, Kishimoto I, Harada-Shiba  
M, Gene testing of the LDLR and  
PCSK9 genes in heterozygous  
Familial Hypercholesterolemia, 第  
45回日本動脈硬化学会総会・学術  
集会, ポスター発表, 2013年7月  
18日~19日, 東京
- 21) 道倉雅仁, 富家千鶴, 榎野久士,  
椽谷真由, 玉那覇民子, 大畑洋子,  
吉田晶子, 森本めぐむ, 柴田映子,  
堀美香, 岸本一郎, 斯波真理子,  
家族性高コレステロール血症患者  
における超音波によるアキレス腱  
測定の評価, 第45回日本動脈硬化学  
会総会・学術集会, ポスター発  
表, 2013年7月18日~19日, 東京
- 22) 横山信治, 上島弘嗣, 三井田孝,  
高田耕基, 福川辰之, 五藤孝秋,  
中村雄一, 斯波真理子, 佐野道孝,  
日本人の HDL コレステロール測  
定値の長期上昇傾向について, 第  
45回日本動脈硬化学会総会・学術  
集会, ポスター発表, 2013年7月

- 18日～19日, 東京
- 23) Harada-Shiba M, Arai H, Oikawa S, Ohta T, Okada T, Okamura T, Nohara A, Bujo H, Yokote K, Wakatsuki A, Yamashita S, Guideline for Management of FH in Japan, 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会, APSAVD-JAS Joint Symposium, 2013年7月18日～19日, 東京
- 24) Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Recent Development of Anti-PCSK9 Therapy for Hypercholesterolemia, 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会, シンポジウム5, 2013年7月18日～19日, 東京
- 25) 三原元気, 姜貞勲, 中沖隆彦, 鳥越秀峰, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二, Controlled Release System of Antisense Molecule from Atelocollagen Gel for Hyperlipemia Treatment, 第62回高分子学会年次大会, 2013年5月29日～31日, 京都
- 26) 和田郁人, 山本剛史, 和田俊輔, 安原秀典, 小比賀聡, 斯波真理子, 2',4'-BNA を搭載した高活性な Apolipoprotein C-III 標的型アンチセンス核酸の開発, 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, ポスター発表, 2013年5月11日, 東京
- 27) 斯波真理子, BNA 修飾アンチセン
- スを用いた脂質異常症治療, 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 依頼講演, 2013年5月11日, 東京

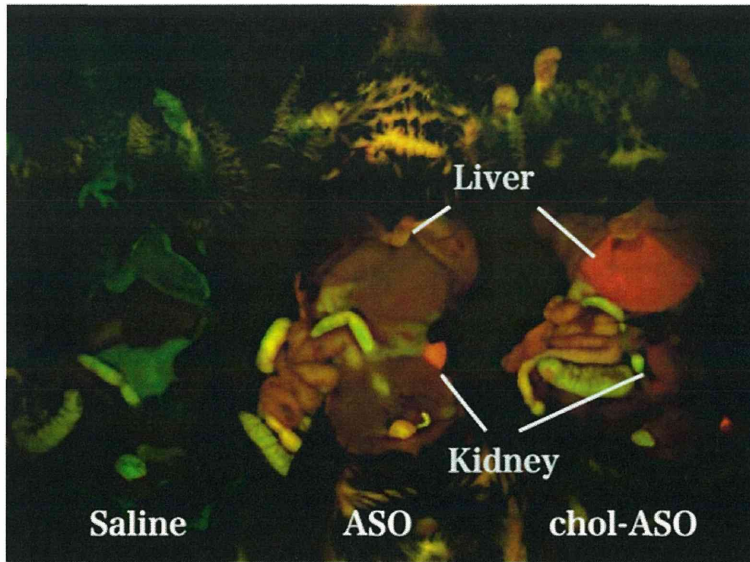


図 1. ASO および chol-ASO の *in vivo* イメージング

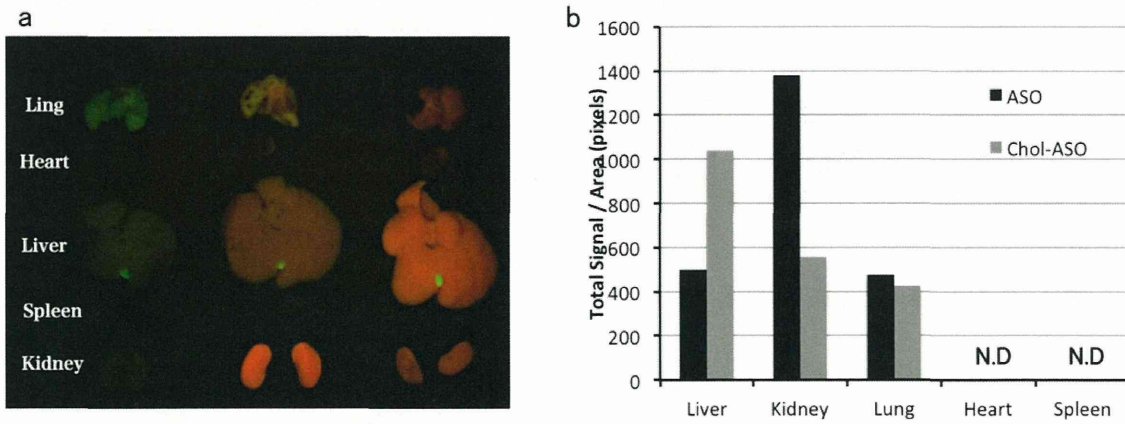


図 2. a) ASO および chol-ASO の *ex vivo* イメージング b) 各臓器における Cy3 の輝度

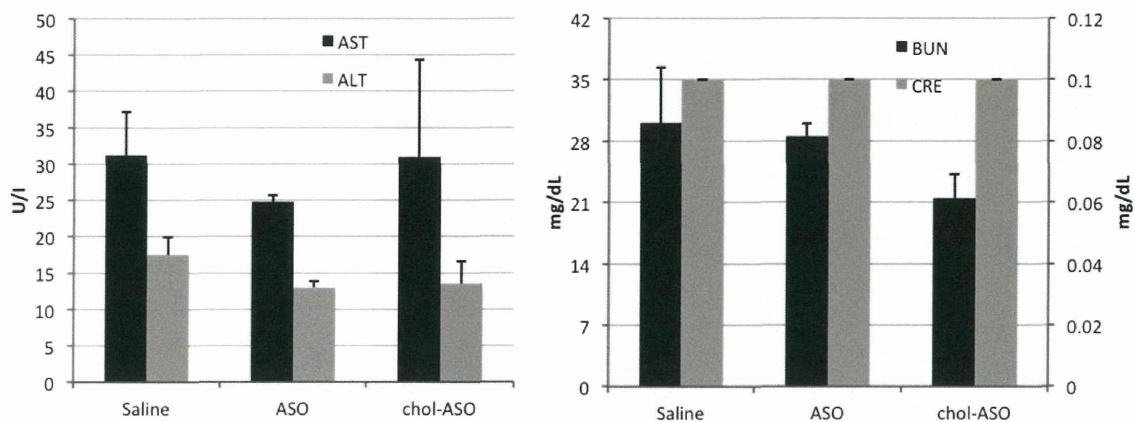


図 3. 各投与群における肝毒性および腎毒性パラメータ (投与後 3 日)

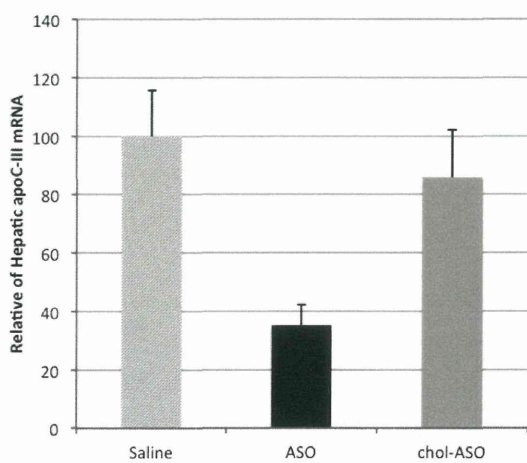


図 4. 各投与群の肝臓における apoC-III mRNA (投与後 3 日)

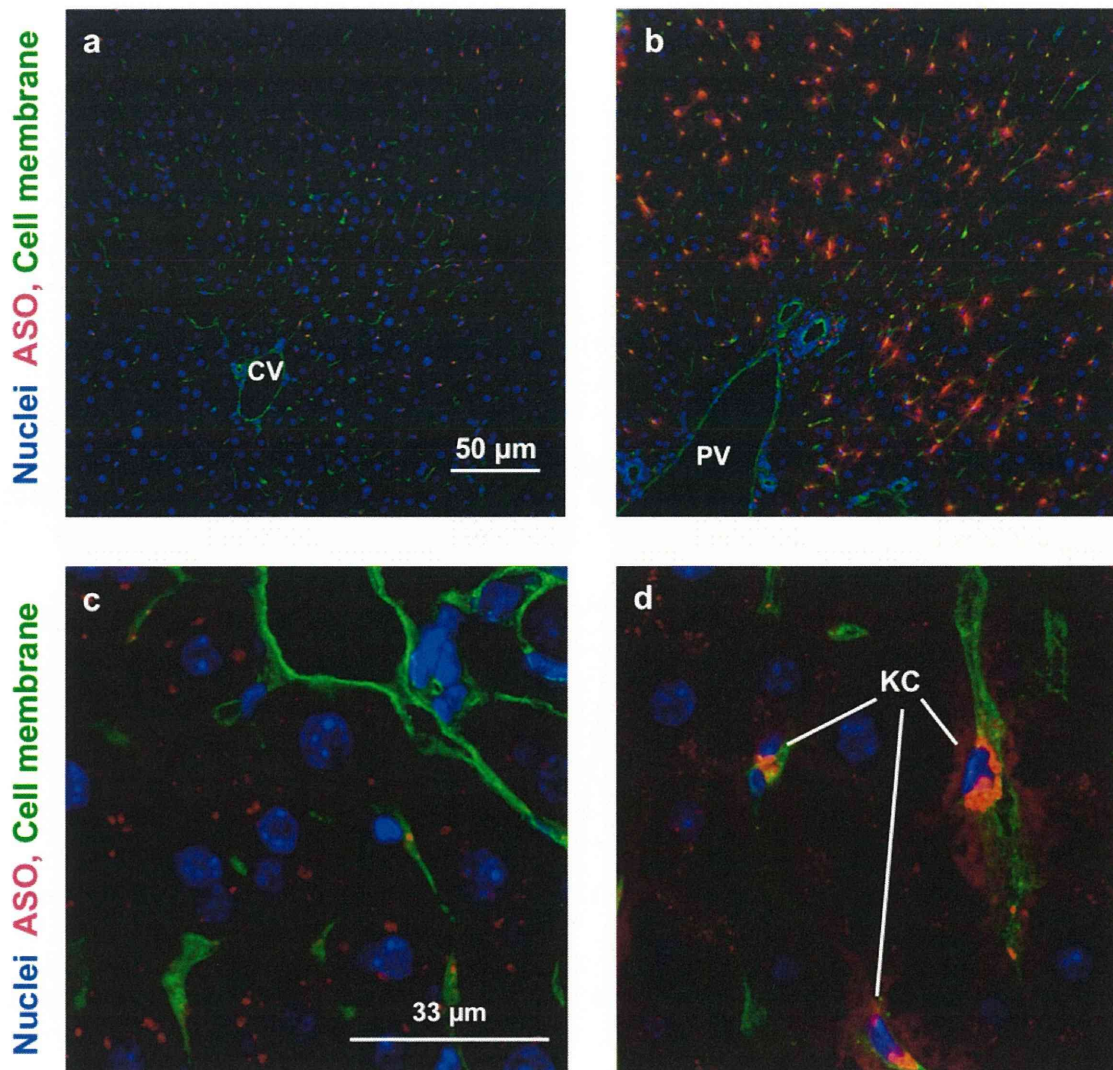


図 5. 各種アンチセンス投与マウスの肝臓切片のイメージング (投与後 2 日)  
 a, b) 蛍光顕微鏡による観察 (a: ASO, b: chol-ASO)、  
 c, d) CLSM による観察 (c: ASO, d: chol-ASO)

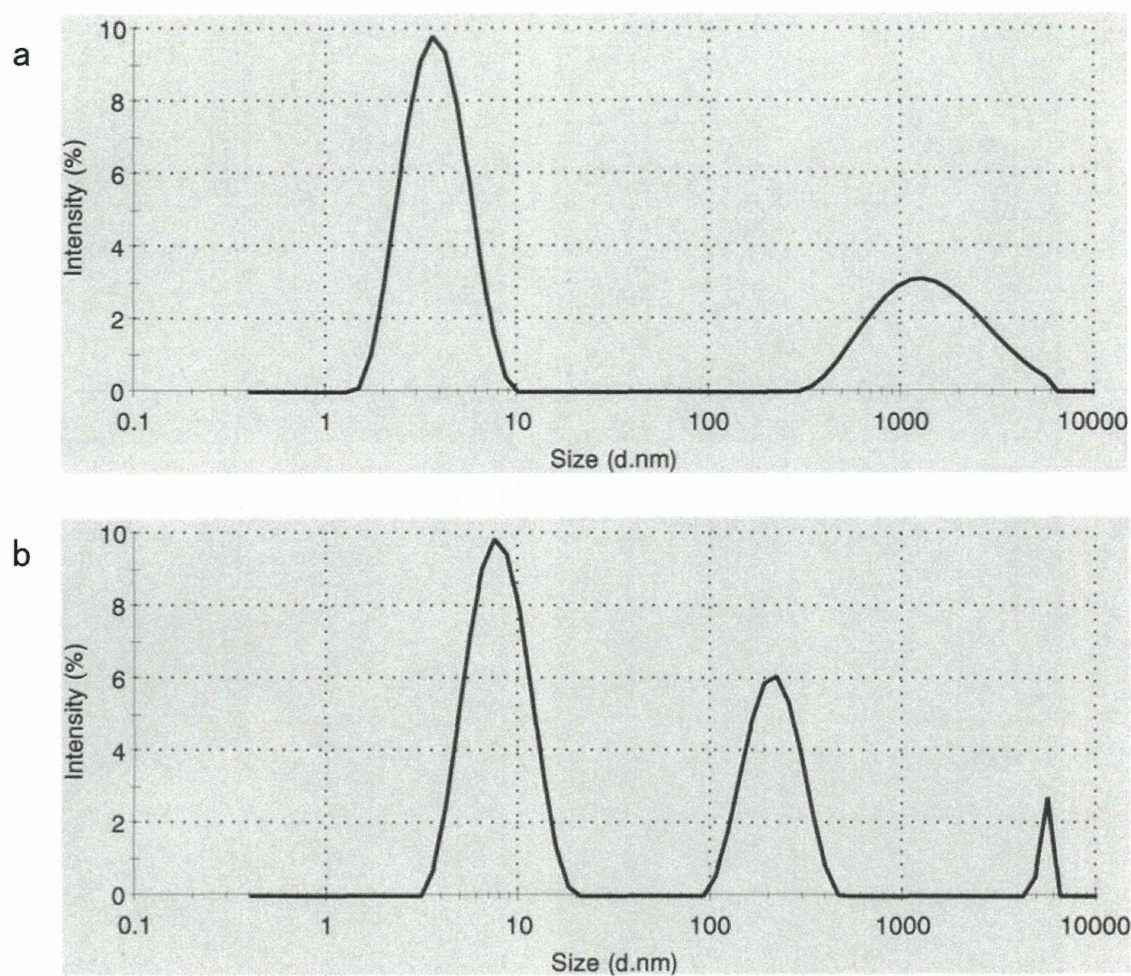


図 6. 動的光散乱法による ASO および chol-ASO の粒子径測定 (a: ASO, b: chol-ASO)

分担研究報告

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-

分担研究者 柴田 雅朗 大阪保健医療大学大学院・教授

研究要旨

本研究において、昨年度はApoEノックアウト (ApoE-KO) マウスに対して、BNA搭載型アンチセンスが動脈硬化抑制の作用傾向を示し、更なるアンチセンスの改良で優れた医薬品になるものと期待が高まった。そこで、ヒトと同様に経時的に動脈硬化病変を追究でき、また病理組織学的にもより精度の高い治療結果の評価法の確立を試みた。【実験1】動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化病変に対して、MRIや超音波を用いたイメージング解析を試み、それらについて病理組織学的解析を行った。その結果、1年齢以上のAN-KOマウスでは、Gadofluorine Mを用いたMRIや超音波において、動脈硬化病変を検出し得たが、14および22週齢では有効に検出できなかった。これらの手法では肥厚・広がりをもった、あるいは石灰化の顕著な複合病変で検出されやすい傾向にあった。【実験2】薬剤の開発やその薬効を評価する小動物での動脈硬化解析法の確立は極めて重要であり、そのための病理学的、分子病理学的な基礎的解析を行った。その結果、ApoE-KOマウスモデルにおいて、動脈の超音波断層解析で、隆起性病変や動脈壁の厚さが計測ができ、実験期間中の継時的な追跡が可能となり得た。マウスの微小な動脈硬化病変のパラフィン包埋組織を活用することで、Real-time PCRを用いて網羅的な解析が可能となり、動脈硬化病変と関連して変動する分子(Cxcl16およびTIMP-1)も検出し得た。マウスモデルを用いた治療実験において、これらの解析手法を導入することにより、治療成績の評価および作用機序解明の一助となるものと考えられた。



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

斯波真理子

柴田 映子

#### A. 研究目的

本研究では ApoC-III に対する BNA 搭載アンチセンス医薬の有効性・毒性・安全性について病理組織学的に評価し、多角的な情報を提供することを目的としており、昨年度は、動脈硬化症モデルとして ApoE-KO マウスを用いて、BNA 搭載型アンチセンスを投与し、その結果、動脈硬化病変発生の抑制傾向を示した。次の段階として、ヒトへの予防や治療展開をするためには、「トランスレーショナルリサーチ」が重要となってくる。そのためには、薬効を評価する小動物での動脈硬化解析法の確立は極めて重要であり、非侵襲的な手法の MRI や超音波によるイメージングに期待がもたれる。そこで本年度はヒトと同様にモデル動物のマウスにおいても、経時的に動脈硬化病変が検出できるようなイメージング手法 (MRI や超音波) を試み、実験 1 として行った。実験 2 では、さらに超音波断層撮影で定量化することを試みた。また、病理組織学的に病変を診断して治療結果を評価するだけでなく、動脈硬化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試みた。

#### B. 研究方法

##### 【実験 1】

動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化病変の MRI や超音波を用いたイメージングを試み、それらについて病理組織学的解析を行った。

##### 1. 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。

##### 2. 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 7Tesla 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 スライスの条件で撮影した。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。

##### 3. 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、40 MHz 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。

#### 4. 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°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。

#### 5. 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  $\mu$ 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斑 (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。

#### 【実験 2】

動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析を行った。

#### 1. 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。

#### 2. 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 年を参考)。

### 3.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。ミクロトーム (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  $\mu$  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。

### 4. Real-time PCR を用いた網羅的解析

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  $\mu$  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°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。

### 5. 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 2-3 mm 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、10000rpm 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あり、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。

## 6. 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。

## 7. 肝臓での脂肪蓄積の解析

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。

## C. 研究結果

【実験 1】 - 「動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化病変の MRI や超音波を用いたイメージングと病理組織学的解析」

### 1. MRI イメージング

7tesraMRI 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(図 1)。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。

### 2. 超音波イメージング

普通食 1 年齢以上の 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(図 2)。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したが、残りの 6 例では明らかなプラーク像を認めなかった。

### 3. 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(図 3)。

### 4. 大動脈の病理組織学的解析

普通食を自由摂取させた 1 年齢以上の Wild type の大動脈では全例が正常な組織像を示した (図 4A)。普通食を自由摂取させた 1 年齢以上の 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(図 4C,D)。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(表 1)。マウス 1 匹当たりの動脈硬化病変の発生個数は負荷

前:  $0.1 \pm 0.4$  個、負荷 8 週:  $2.6 \pm 1.4$  個、負荷 16 週:  $12.3 \pm 1.9$  個であり、16 週では、8 週に比し、有意に増加していた(図 5)。

【実験 2】 - 「動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析」

### 1. 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 (図 6A)。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  $20 \pm 11\%$  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 (図 6B)、血管壁肥厚像 (IMT 計測による) を測定した結果、ApoE-KO マウスの大動脈、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(図 6C)。

### 2. 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 (図 7)。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 (図 8)。また、免疫蛍光染色により、多数の

マクロファージの集簇(図 9)やテネイシン C 発現(図 10)が各動脈硬化病変に認められた。

### 3. 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 (図 11)。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 (図 12)。

### 4. 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(図13A,B)。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 (図14)。

### 5. 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 (図 14A-D)。

## 6. 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 (図 15)。

## D. 考察

【実験 1】大動脈の Oil red 染色の広がり  
と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が見られた。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では Gadofluorine M により検出可能であった。

【実験 2】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。

脂肪肝に対する Oil Red 染色では、肝細胞内における脂肪の蓄積を明瞭に染め分けることが可能となり、今後の実験で得られ

るサンプルを同様の手法で評価してゆく。

## E. 結論

昨年の本研究では、私達が開発した高活性なアンチセンス分子をApoE-KO マウスに投与することにより、動脈硬化発症の抑制傾向を示した。次の段階として、臨床での予防や治療を展開するためには、「トランスレーショナルリサーチ」が重要である。そのためには、薬効を評価する*in vivo*での動脈硬化解析法の確立が極めて重要であり、ヒトと類似の非侵襲的なイメージング手法に期待がもたれる。遺伝子改変小動物を用いた本研究では、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と考えられた。また、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（Cxcl16およびTIMP-1）を指標としての解析も有望であることが示唆され、本研究の毒性評価や治療効果の評価ツールに加えてゆければ、さらに精度の高い評価が可能となり得るのではないかと考える。

## 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 MA, Shibata E, Morimoto J and 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 Res* 33: 4237-4247, 2013.
- 2) Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA and Harada-Shiba M: Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma. *Eur J Pharmacol* 723: 353-359, 2014.

(邦文)

なし

総説

- 1) Shibata MA, Shibata E, Fujioka S and Harada-Shiba M: Experimental translational research using siRNA to target vascular genesis in inhibition of mammary cancer metastasis. *Altern Integ Med* 2: 9: 2013.
- 2) Shibata MA, Matoba Y, Tosa H and Iinuma M: Effects of mangosteen pericarp extracts against mammary cancer. *Altern Integ Med* 2: 8, 2013.

著書

- 1) 柴田雅朗. 第1章 細胞増殖、「伊東毒性病理学」高橋道人、福島昭治編. 丸善出版, 48-50, 2013.



- Hawaii, U.S.A
2. 学会発表
    - 1) 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
    - 2) Shibata E, Enmi J, Shibata MA, Morimoto M, Fukuda H, Hashikawa Y, Iguchi S, Kawashima H, Michikura M, Fuke C, Hori M, Iida H, Harada-Shiba M: Imaging and histopathological analyses of aortic lesions in atherosclerosis model mice using MRI, 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2013年7月18日～19日, 東京
    - 3) 柴田雅朗, 日下部守昭, 森本純司, 柴田映子, 斯波真理子, 的場吉信, 土佐秀樹, 飯沼宗和: テネイシンC抗体と $\alpha$ -マンゴスチンとの複合投与によるマウス乳癌転移抑制の試み, 第22回乳癌基礎研究会, 2013年7月20日～21日, 三重
    - 4) 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, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, ポスター発表, 2013年7月21日～24日, Honolulu,
    - 5) 柴田雅朗, 森本純司, 日下部守昭: テネイシンC抗体および $\alpha$ -マンゴスチンによるマウス乳癌の転移抑制, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日～5日, 横浜
    - 6) 柴田雅朗, 日下部守昭, 柴田映子, 森本純司, 斯波真理子, 飯沼宗和: テネイシンC抗体または $\alpha$ -マンゴスチンの単独投与ならびにそれらの複合投与によるマウス乳癌転移抑制, 第30回日本毒性病理学会総会・学術集会, 2013年3月27日～29日, 徳島
    - 7) 柴田雅朗, 柴田映子, 森本純司, 斯波真理子: マウス乳癌転移モデルにおいて、Vegf-c siRNAでは転移を抑制し、Vegf-d siRNAではその作用が明らかではなかった, 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月27～29日, 栃木

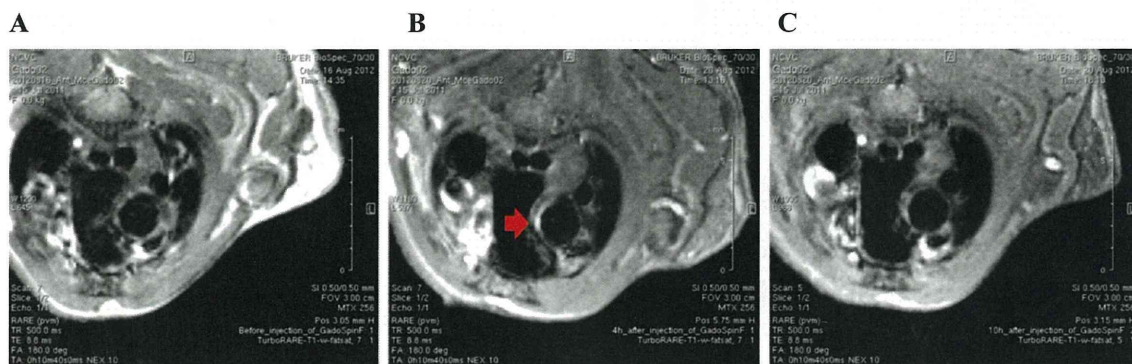


図 1. 1 年齢以上の AN-KO マウスの大動脈の MRI (T1 強調画像)。

A: Gadofluorine M 投与前、 B: 投与後 4 時間、 C: 投与後 9 時間。 Gadofluorine M を投与した 1 年齢以上の AN-KO で、投与後 4 時間で上行大動脈にプラークが高輝度に描出された(矢印)。

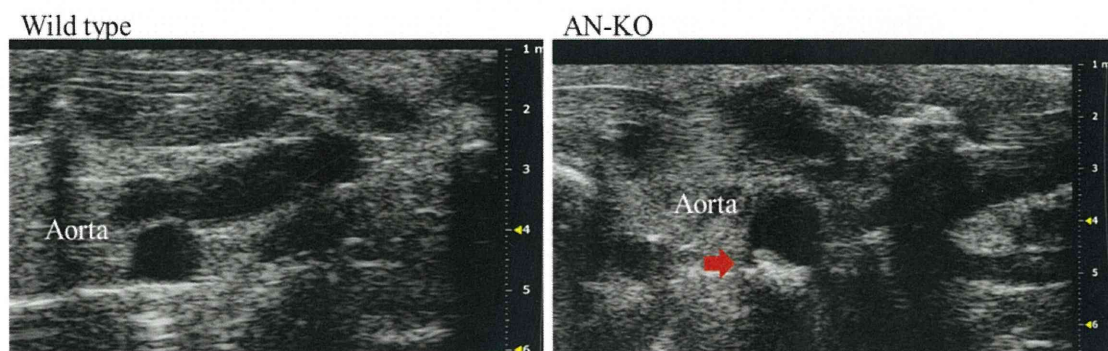


図 2. 1 年齢以上の Wild type と AN-KO マウスの大動脈弓の超音波短軸断層像。 AN-KO マウスの大動脈内腔に隆起する高輝度部位を認めた(矢印)。 Wild type マウスの大動脈は正常所見を示した。 また、 AN-KO マウスの大動脈弓短軸断層像で約 25-35%の狭窄を認めた。

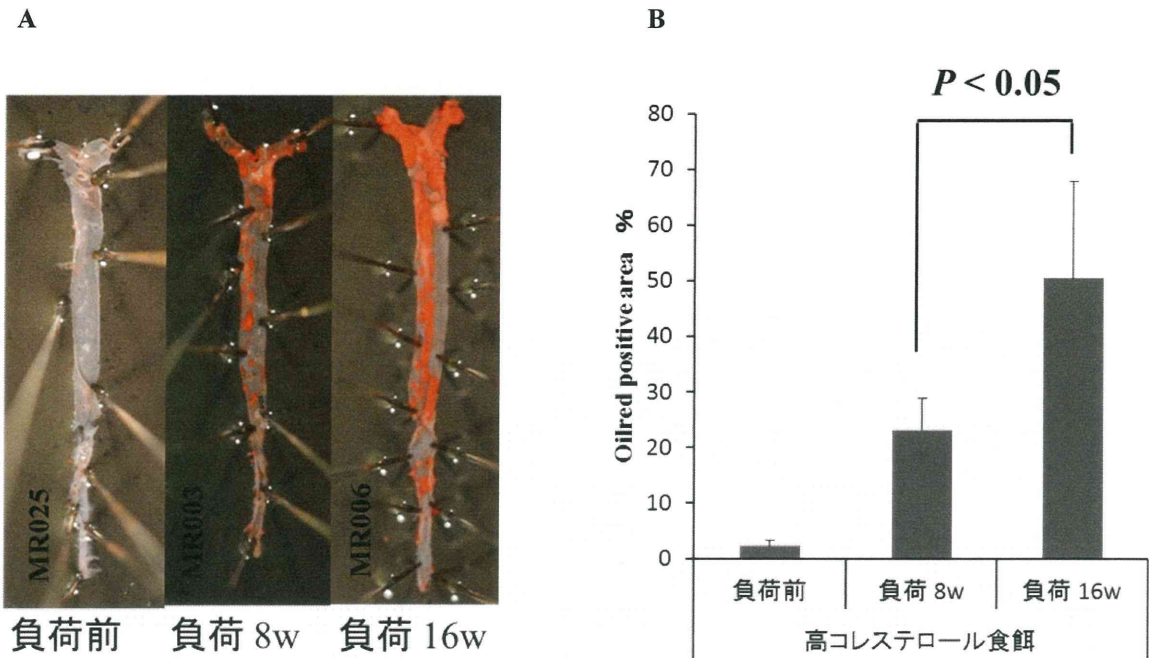


図 3. 大動脈動脈硬化病変の定量化。

A: 高コレステロール食餌を与えた AN-KO マウスの大動脈血管内壁の Oil Red 染色。B: Oil Red 染色陽性面積率。大動脈の Oil red 染色陽性面積は負荷週数の増加に伴い、Oil Red 染色の陽性部位は広がりを示し、その面積率は有意な上昇を示した。

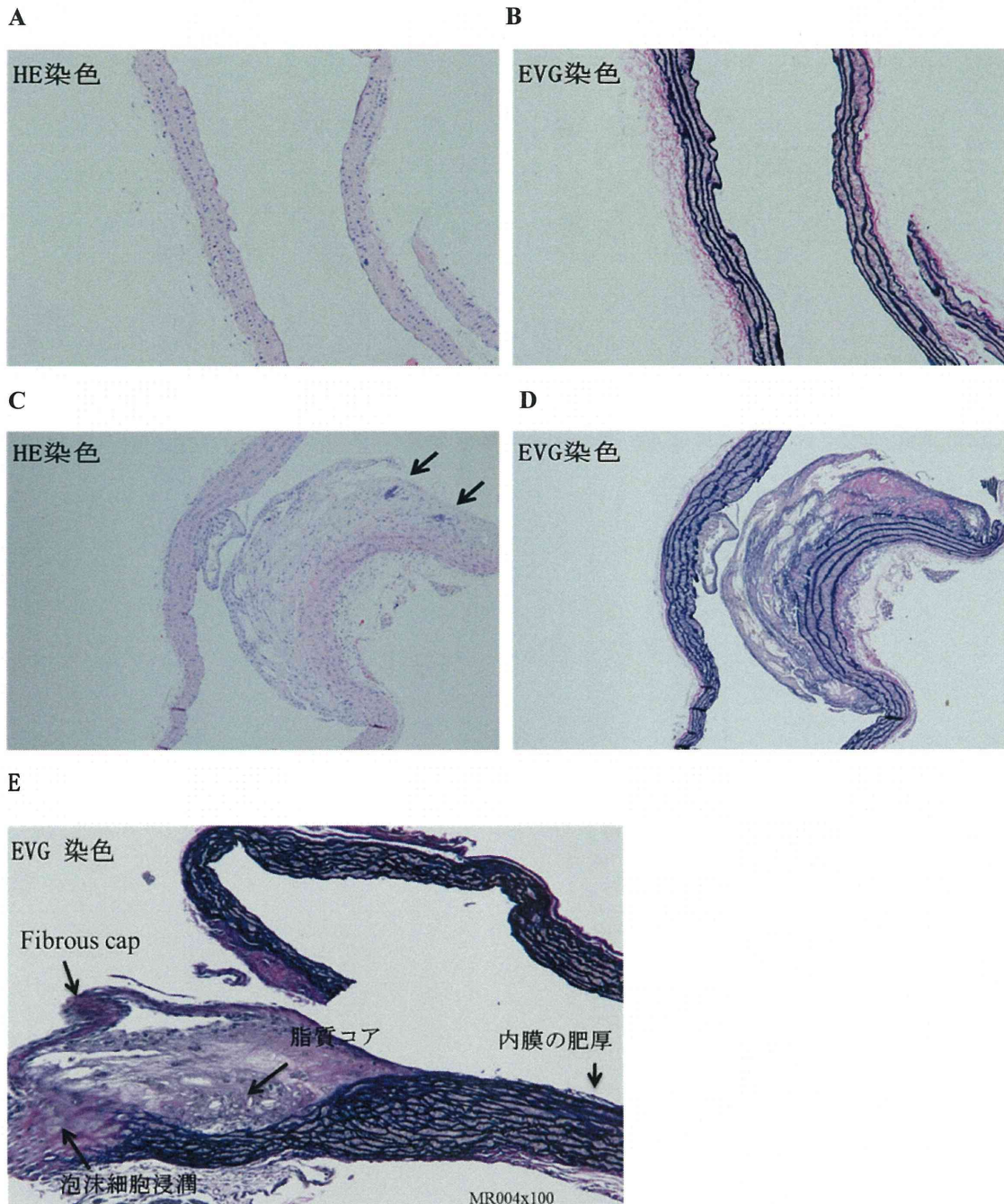


図4. 大動脈の HE 染色 (A, C)、EVG 染色 (B, D, E) による病理組織学的解析。

A, B: 普通食1年齢以上の Wild type, C, D: 普通食1年齢以上の AN-KO マウス。E: AN-KO マウスの高コレステロール食負荷8週。

Wild type のマウスでは大動脈は正常所見を示した (A, B)。AN-KO マウスの大動脈に石灰化 (C, 矢印) を含む複合病変が観察された (C, D)。AN-KO マウスの高コレステロール食負荷8週の動脈には、泡沫細胞などの細胞浸潤、Fibrous cap および脂質コアが認め