

201407004A

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26年度 総括研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成27(2015)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. ヒトアポ C3 に対する高活性アンチセンスのスクリーニング選抜に向けた 2',4'-BNA^{NC}、2',4'-BNA^{AM} を搭載したアンチセンス核酸の構造最適化研究 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－最適化アンチセンス分子の脂質低下効果の評価－ 27
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－ 45
柴田 雅朗
- III. 研究成果の刊行物・別刷 67

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リポrotein C-III(ApoC-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、2',4'-BNA^{NC}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、アンチセンス(ASO)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、動脈硬化モデルマウス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。本年度は、新規ASOの*in vivo*での評価とこれらの構造活性相関の検討、ヒトApoC-IIIに対するアンチセンス核酸のスクリーニング、新規ASOの*in vivo*での代謝への影響、既存の薬剤との比較、新規ASOの投与後の病理組織学的解析、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分子レベルで行い、高脂肪食を負荷したApoE-KOマウスに誘発された動脈硬化は、ヒトへの外挿モデルとして、極めて有用であることが示された。

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 C-III 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 C-III 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 C-III 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 C-III 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 C-III 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、2',4'-BNA^{NC} を搭載した アポ C-III の ASO 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、ASO 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、動脈硬化モデルマウス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。

本年度は、新規 ASO の *in vivo* での評価とこれらの構造活性相関の検討、ヒト アポ C-III に対するアンチセンス核酸のスクリーニングを行った (小比賀 G)。新規 ASO の *in vivo* でのリポタンパクリパーゼ活性への影響を含めた代謝への影響の検討、既存の薬剤であるフィブラートとの比較を行った (斯波 G)、新規 ASO の投与後の病理組織学的解析、動脈硬化の治療実験モデルとしてアポ E-KO マウスを用いるための基礎的解析を分子レベルで行い、高脂肪食を負荷したアポ E-KO マウスに誘発された動脈硬化は、ヒトへの外挿モデルとして、極めて有用であることを明らかにした (柴田 G)

B. 研究方法

1. ASO 投与実験

被験動物として 7 週齢のマウスを購入し、1 週間以上馴化させたのち、投与試験を行った。各アンチセンス核酸を 1.07 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の投与量で、あるいは対照群として生理食塩水 200 μL を皮下より単回投与を行なった。投与後 3 日後あるいは 7 日後に、イソフルランによる麻酔下、採血および、肝臓、腎臓、脂肪の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、 -80°C 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 を μ T-12 ホモジナイザーにてジルコニアビーズを用いてホモジナイズを行い、その後 total RNA を抽出した。抽出した total RNA を分光光度計で定量し、rRNA を 1%アガロースゲル電気泳動で純度の確認を行った。

3. Realtime RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて total RNA 4 μ g から cDNA を作製した。Taqman® Fast Universal Master Mix および Fast SYBY® Green Master Mix を用いて、得られた cDNA の遺伝子発現解析を行った。また、ハウスキーピング遺伝子を *Gapdh* として標準化を行った。

4. 配列設計

ヒト ApoC-III mRNA に対してアンチセンスの設計を行った。14, 17, 19 塩基長の 3 種の配列についてそれぞれ設計した。配列設計にはバイオインフォマティクスに汎用されるオープンソース言語である BioRuby のライブラリオブジェクトと local BLAST を利用し、テキストマイニングとアンチセンス配列のチェックを行った。基本的な設計指針としては、RNase H の足場となるギャップ領域が同一領域になるように 3 鎖長について 3'末端側をアラインした。免疫刺激配列として知られる CpG モチーフを排除した。自己高次構造などをとりやすい cccc、gggg モチーフを

除外した。毒性発現が示唆される ttctgc 配列を除外した。

5. 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 μ L を用いて測定した。

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

6. LPL 測定実験

被験動物として 8 週齢のマウス C57BL/6/J (♂: 日本 SLC) を購入し、1 週間馴化させるとともに高脂肪食の負荷を行った。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を皮下より単回投与を行なった (15 mg/kg/回)。投与から 3 日後に 300 U/kg の用量でヘパリンを腹腔内投与し、10 分後に EDT 入り採血管にて血漿の回収を行った。得られた血漿を 10 倍希釈したものを Lipoprotein Lipase Activity Assay Kit を用いて LPL 活性の測定を行った。

7. 血清中 ApoC-III のウエスタンブロットによる検出

BIORAD DC™ Protein Assay を用いてマウス尾静脈血または下大静脈血より分離した血清中のタンパク定量を行なった。ポリアクリルアミドゲル Ready Gel J (16%)

の各レーンに血清 (タンパク質量 50 µg) アプライし、200 V にて 60 分間電気泳動した。Immun-Blot PVDF Membrane を用いて 180 mA にて 90 分間ブロッティングを行い、次いで Blocking one を用いて 1 時間ブロッティングを行った。得られたメンブレンに対し、1 次抗体として、抗 ApoC-III ポリクローナル抗体 (apoC-III M-75) を反応させ、二次抗体として、抗ウサギポリクローナル抗体を反応させた。次いで、ECL plus を用いてメンブレンを発色させ、マウスの APOC3 のタンパク質量を検出した。

8. 血清中 ApoC-III の ELISA による定量

5000 倍希釈した血清サンプルを用いて、Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit を用いて定量した。

9. HPLC によるリポタンパク質分解の解析

採取した血清サンプルを Skylight Biotech の LipoSEARCH サービスにより受託解析を行った。なお、サンプル中のリポタンパク質はゲル濾過カラムによりサイズごとに分画され、それぞれの分画における脂質値を定量した。

10. 一般病理組織学的検査

10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した肝臓および腎臓を切り出し、水洗の後、脱水系列を経て透徹を行い、パラフィン包

埋した。マイクロトームにて 5 µm に薄切後、カラッチのヘマトキシリン (武藤化学株式会社) とエオジン (Tissue-Tek) にて H&E 染色し、顕微鏡 (model BX53, Olympus) にて観察した。

11. 肝臓における脂肪蓄積の解析

前述の 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した肝臓を 10%、20%、30% のサッカロース (和光純薬工業株式会社) にて段階的に置換の後、クリオモルドに静置し、その中に O.C.T Compound を流し込み、液体窒素にてすみやかに凍結した。クリオスタットで 5 µm に薄切し、Oil red O 染色液と核染色に Hematoxylin Gill's Formula を用いて染色し、顕微鏡にて観察し、脂肪の蓄積の程度を評価した。

12. CT による内臓脂肪および肝臓内の蓄積脂肪の解析

(1) CT 装置を用いた内臓脂肪の測定

イソフルラン麻酔下にて、28 週齢 ApoE-KO 雄マウスの第 11 胸椎から尾骨下端までを、小動物用 X 線 CT 装置にて 1.0 mm 毎にスライスし、撮影した。解析は脂肪を皮下脂肪と内臓脂肪を分

け、体積より重量を算出し、脂肪重量 / (筋肉重量 + 脂肪重量) × 100 により脂肪率を算出した。なお、実験に供したマウスは 5 例で、体重は 34.4 ± 2.2 g であった。

(2) CT 装置を用いた肝臓の脂肪測定

上記の内臓脂肪測定に用いた 28 週齢 ApoE-KO 雄マウスをイソフルラン麻酔下で仰臥位にし、第 11 胸椎から第 1 腰椎の位置を小動物用 X 線 CT 装置にて 0.3 mm 毎にスライスし、CT 撮影を行い、肝臓の平均 CT 値 (Hounsfield unit: HU) / 筋肉の平均 CT 値 (HU) から CT 値比を算出して解析した。

(3) 脂肪重量測定

CT 撮影の後、マウスを麻酔下にて、放血して安楽死させ、腸間膜脂肪、腹腔内脂肪および生殖器周囲脂肪を摘出し重量を測定した。

(4) 肝臓の病理組織学的検査および脂肪

蓄積の解析

上記の CT 検査に用いたマウスより肝

臓を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、前述した方法で H&E 染色を行った。また、肝臓の脂肪を証明するため、摘出した肝臓の一部を O.C.T. Compound を用いて凍結し、Oil red O 染色液を用いて染色し、顕微鏡にて観察し、脂肪の蓄積の程度を評価した。

13. 大動脈石灰化のイメージング

(1) CT 装置による大動脈石灰化の定量

小動物用 X 線 CT 装置を用いて、イソフルラン麻酔下にて、動脈硬化モデルマウス (ApoE-KO マウス) の第 7 頸椎～第 2 胸椎を心拍同期条件下で撮影した。25 週齢、34 週齢および 45 週齢の各 4 例の ApoE-KO 雌マウスを用い、普通食を自由摂取させた。また、45 週齢のマウスを用いて、上行大動脈から大動脈弓の位置決定の目的で、血管造影剤であるイオパミロン注 300 をマウス尾静脈に注射し、10 分後、呼吸同期条件下にて CT 撮影を実施した。

(2) 動物用超音波装置による大動脈石灰化の観察

上記の CT 解析に供した ApoE-KO 雌マウスを実験に用いた。超音波断層撮影の前

処置のため、胸部除毛を施し、イソフルラン麻酔下にて、超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 装置を用いて、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、石灰化様エコー像を観察した。

(3)大動脈の病理組織学的解析

上記の CT ならびに超音波解析に供したマウスを麻酔下にて、PBS で還流し、放血し安楽死させ、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て固定した。固定後、実体顕微鏡下で大動脈周囲の脂肪組織を除去し、切り出し、脱水系列を経て透徹し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームにて薄切の後、H&E 染色を行った。また、弾性線維の染色として Elastica van Gieson (EVG)染色を行った。カルシウム検出法としては Kossa 反応を行った。これらの染色標本を顕微鏡(model BX53, Olympus)にて、動脈硬化病変と石灰化の有無、Kossa 反応陽性部位を観察した。

1.4.動脈硬化モデルマウスの作成

ApoE-KO マウス雄に 6 週齢から 16 週間、高脂肪食を自由摂取させ、動脈硬化モ

デルを作製した。対照としては、普通食を自由摂取させた C57BL/6J 雄マウスを用いた。これらの動物は昨年度の動脈病変解析に用いられた。本年度はこれらのパラフィン包埋標本を用いて行った。

15.動脈硬化病変の免疫組織学的解析

大動脈組織が包埋されているパラフィンブロックを 5 μ m に薄切し、シランコートスライドガラスに貼付して標本を作製し、網羅的解析で選ばれた分子について免疫組織学的染色を施した。スライド標本を 110°C、15 分間の熱処理により抗原賦活化、ブロッキング処置を行い、3% H₂O₂ を反応させた後、1 次抗体を反応させ、洗浄の後、それぞれの 1 次抗体に対応する 2 次抗体を反応させ、DAB で発色、ヘマトキシリンにて核染色を行い、封入した。染色標本を顕微鏡で観察し、代表的な部位を撮影し、デジタル画像を保存した。

免疫組織化学的染色を行った分子はヒトで動脈硬化との関連が報告されている分子と昨年度の網羅的解析で上昇を示した 2 分子 (TIMP-1 および Cxcl16) である。本実験によりヒトと ApoE-KO マウスの動脈硬化病変の類似性をみた。用いた 1 次抗体は次の通りである。抗 F4/80 ウサギ抗体、抗 TIMP-1 ラット抗体、抗 MMP-9 ヤギ抗

体、抗 MMP-1/8 ウサギ抗体、抗 sLOX-1 ウサギ抗体、抗 Cxcl16 ウサギ抗体であった。

(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. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の *in vivo* スクリーニング評価

昨年度、表 1 に示す 34 種のアンチセンス核酸の活性をマウス肝臓由来初代培養にてスクリーニングしたところ期待通り、2',4'-BNA 搭載型のアンチセンス核酸に比較しても上回る活性を有する 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸の同定に成功した。中でも特に活性の高かった

mApoC3-411-NC(14),

mApoC3-436-NC(14),

mApoC3-456-NC(14),

mApoC3-466-NC(14)

の 4 種の 14 塩基長のアンチセンス核酸について *in vivo* での投与試験を行ったが、*in vivo* では 2',4'-BNA 型の活性を上回る事は出来なかった。鎖長による効果を検討するために mApoC3-471-BNA(14)の塩基配列を 14 塩基長から 20 塩基長まで前後に塩基配列を拡張し、表 2 に示したア

ンチセンスを 2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{NC}, 2',4'-BNA^{AM}それぞれについて *in vivo* 実験に使用可能な大量スケールでの合成を行った。鎖長の伸長に伴ってギャップ長も 8 塩基から 13 塩基まで広げることとした。これらをマウスに対して単回投与を行い、肝臓におけるノックダウン効果を評価した。投与量は、mApoC3-471-BNA(14)にて 5 mg/kg とする 1.07 μmol/kg とした。14 塩基長同士で比較した場合には、2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} にて有意なアンチセンス効果を見出したが、2',4'-BNA^{NC} では全く効果は認められなかった。2',4'-BNA^{NC} については効果発現のタイミングが変化している可能性を考え、7 日後にも効果を評価したが、有意な活性を見出せなかった。一方、2',4'-BNA^{NC} が最も効果を発揮したのは 17 塩基長であり、同配列の 2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} を上回る活性を見出した。同様に、2',4'-BNA^{AM} については 14 塩基長に加え、19 塩基長でも活性の極大が見出された。

2. ApoC-III 阻害による TG 低下作用の機序に関する検討

マウスに対するスクリーニングから得られた ASO を 15 mg/kg の用量で単回、皮下投与を行い、3 日後にヘパリンを 300 U/kg で腹腔内投与した後に採血した。血漿中 ApoC-III タンパク質量を ELISA 法にて定量を行った結果、saline 群と比較して 65%程度の減少が確認された。次に、LPL

の活性を測定するために LPL の加水分解によって蛍光を発するプローブを用意し、血漿サンプルとともに 37°C でインキュベートした後、蛍光強度の測定を行った。結果、saline 群と比較し、ASO 群では LPL が約 20% 活性化していることが明らかとなった。ApoC-III 阻害による TG 低下作用の機序としては、TG に富んだりポタンパク質の産生抑制や LPL の活性化、また、レムナントリポタンパク質の代謝促進などが挙げられる。これまでは ApoC-III の阻害による血中 TG 値の低下という間接的な作用を示すに留まっていたが、本検討により、ASO の TG 低下作用の一部が ApoC-III の減少に伴う LPL の直接的な活性化によるものであることが示された。

2. ApoC-III 標的型アンチセンスのマウスに対する脂質低下効果の評価

フィブラートはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR α) のアゴニストであるが、その作用としては LPL 活性の亢進や HDL コレステロールの増加、中性脂肪に富んだ超低比重リポタンパク質 (VLDL) の産生抑制などが挙げられる。また、詳細については明らかとなっていないが、今回の我々の標的である ApoC-III の発現を抑制することも知られており、フィブラートの TG 低下作用に大きく寄与するとされている。従って、ApoC-III を直接標的にした我々の ASO と間接的阻害をするフィブラートとの脂質プロファイルや脂質代謝関連因子発現レベルの比較を

行うことで、ApoC-III 標的型 ASO の脂質低下薬としての評価を行うこととした。

既に上市されているフェノフィブラート (FF) を用いることとした。事前に高脂肪食を 1 週間負荷したマウスに対して、ASO は 15 mg/kg 単回皮下投与、FF は corn oil に溶かしたものをゾンデから 100 mg/kg の用量で毎日経口投与し、7 日後に以下の解析を行った。但し、TG 値は食後に大幅に変動することから、16 時間の絶食後に採血を行った。まず、体重に関してはどの投与群においてもわずかに増加傾向を示し、肝毒性の指標である ALT や AST はわずかに高い個体があったが、投与群に依らないことから高脂肪食の影響であることが考えられる。また、BUN はどの群においても正常範囲内であったことから、腎臓への影響はなかったことが伺える。標的である ApoC-III の抑制効果については、肝臓中 mRNA レベルで FF 群が 60%、ASO 群では 95% 低下しており、血清中タンパク質レベルにおいては減少傾向にはあるものの FF 群はコントロール群と比べ有意な抑制は認められなかった。一方で、ASO 群は単回の投与にも関わらず、一週間後においても 65% ほど低下している状態が維持されていた。このことから、標的である ApoC-III の抑制効果については、選択的阻害薬であるアンチセンス分子のほうが強力であることが明らかになった。血清中 TG 値については、FF およびアンチセンスの両群においてコントロール群と比べて、有意な低下が認められた。

高効率液体クロマトグラフィー (HPLC) 用いてサイズごとに振り分け、それぞれの分画における TG やコレステロール濃度を測定した。各分画中の TG の値は、FF および ASO の両群において VLDL 分画において顕著な低下が認められた。また、コレステロール値においては、ASO のみにおいて約 2 倍もの HDL 分画の増加が認められた。

HDL の産生や代謝に関与する因子について遺伝子発現レベルの解析を行った。最も HDL コレステロール値に影響を及ぼす HDL の主要構成成分である apolipoprotein A-I (APOA1) や肝臓における HDL 受容体として知られる scavenger receptor class B, member 1 (SR-BI) の変化と ASO の HDL コレステロール上昇との相関は認められなかった。一方で、HDL の構成成分の一つである apolipoprotein A-IV (APOA4) の増加や HDL の代謝に関わる肝性リパーゼ (LIPC) の減少が確認された。APOA4 の過剰発現マウスおよび LIPC のノックアウトマウスにおいては顕著な HDL コレステロール値の上昇が報告されていることから、上記の因子の変化が今回の HDL コレステロール上昇効果に関与していることが示唆された。

3. ApoC-III アンチセンスの投与を受けた高脂肪食負荷マウスの安全性評価のための病理組織学的解析

1) 一般病理組織学的検査

肝臓では、溶媒対照群において、肝細胞の空胞変性が軽度～強度に渡り全例 (4 例) に観察され、フィブラート系の FF (溶媒として Corn oil) 投与群では、空胞変性は正常範囲内の痕跡程度にしか示されなかった。また、FF 投与群では好酸性顆粒を含む肝細胞肥大を全例 (4 例) に観察したが、溶媒対照群では全く観察されなかった。

溶媒として生理食塩水を投与した溶媒対照群では、軽度な肝細胞の空胞変性を全例 (4 例) に観察した。一方、ASO 投与群では軽度～中等度に肝細胞の空胞変性が殆どの動物 (3 例) に見られた。また、ASO 投与群で肝細胞肥大が 1 例に観察された。さらに ASO 投与群では肝臓において泡沫細胞の集簇が 4 例中の 2 例に観察された。

2) 肝臓における脂肪蓄積の解析

肝臓に Oil red 染色を施し、肝細胞内に蓄積している脂肪を可視化し、顕微鏡下で観察した。溶媒対照群 (Corn oil) では軽度～強度の脂肪蓄積が観察されたが、FF 群では痕跡程度にしか示されなかった。溶媒対照群 (生理食塩水) では軽度～中等度の脂肪蓄積であったが、ASO 群では軽度～強度であった。ASO 群では、脂肪蓄積

量が若干、増加している傾向が窺われた。

4. 動脈硬化モデルマウスのCTによる病態イメージングとその病理組織像: 脂肪肝と石灰化を伴う動脈硬化の検出

1) CT による内臓脂肪および肝臓内の蓄積脂肪の解析

CT 装置による内臓脂肪の脂肪率は、脂肪摘出重量と良い相関を示した。

2) CT 装置を用いた肝臓の脂肪測定

ApoE-KO マウスにおいて肝臓の CT 値比 (CT 値比 = 肝臓の平均 CT 値/筋肉の平均 CT 値) と肝臓の脂肪染色 (Oil Red 染色) との比較で、CT 値が低いほど Oil red に強く染まり、CT 値比と組織像とは相関していた。CT 値比が最も低値である IH63 (CT 値比 0.26) と高値である IH64 (CT 値比 0.71) の H&E 染色像および Oil red による脂肪染色像を示す。IH63 は IH64 より強く染まっており、CT 値比と逆相関していた。因みに、ヒトにおいても CT 値比が低いほど肝臓に脂肪が沈着していると診断されている。

3) CT、超音波および病理組織学的検査による大動脈石灰化の評価

45 週齢 ApoE-KO マウスを用い、イオパミロン血管造影剤の静脈投与後の CT 像にて、大動脈を認識し、石灰化様の CT 像を認めた。25 週齢の ApoE-KO マウス 4 例を用いた検査で、大動脈の石灰化様の所見を CT で 1 例に、超音波では石灰化の疑いを 1 例に認め、病理組織学的検査では 3 例に観察した。34 週齢および 45 週齢の各 4 例の ApoE-KO マウスを用いた検査では、CT、超音波、病理組織学的検査のいずれにおいても全例に石灰化を検出し得た。病理組織学的に観察された石灰化所見は、別動物であるが、Kossa 反応陽性を示し、HE 染色で観察された石灰化所見は、カルシウム沈着であることを確認した。

5. 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) 動脈硬化病変の免疫組織学的解析

抗 F4/80 抗体はマクロファージを認識する抗体である。初期病変、進行性病変、複合病変の各病変に泡沫細胞の集簇が見られ、これらは F4/80 陽性を示すマクロファージであることが確認された。なお、Wild type マウスの動脈には陽性細胞は観察されなかった。

TIMP-1 は昨年度の研究で抗体アレイを用いた分子生物学的な網羅的解析で顕著な上昇をみた分子である。TIMP (Tissue Inhibitor of Matrix metalloproteinase) は内因性の MMP (Matrix metalloproteinase) 活性阻害因子で、TIMP-1 はマクロファージが分泌し、MMP-9 を分解する。TIMP-1 は初期病変で既に発現しており、いずれのステージの病期の動脈硬化病変にも発現していた。なお、Wild type マウスの正常な動脈では発現は全く観察されなかった。

MMP-9 はマクロファージが分泌する蛋白質分解酵素の1つである。動脈硬化病変のない Wild type マウスの正常な動脈では陽性所見は全く観察されなかった。一方、動脈硬化病変では進展の程度に関わらず、病変部に一致して陽性を示した。詳細に観察すると、病変部では泡沫細胞 (マクロファージ) の細胞質に陽性を示し、その他、線維被膜下や病変部の間質に陽性を示した。

MMP-9 と同様にマクロファージが分泌する蛋白質分解酵素の1つである。動脈硬化病変のない Wild type マウスの正常な動脈では陽性部位は全く観察されなかった。一方、動脈硬化病変では、MMP-9 と同じように進展の程度に関わらず、病変部に限局して陽性を示した。詳細に見ると、

病変部では泡沫細胞 (マクロファージ) の細胞質に陽性を認めるが、病変部の間質により強く陽性を示した点は MMP-9 と異なっていた。

sLOX-1 はごく初期の病変から発現を示し、以降、進展してゆく過程に渡り、発現が継続して観察された。末期の複合病変でも依然、発現しているが、その発現強度はむしろ減弱しているように思われた。この点に関してはさらに詳細な解析が必要である。なお、Wild type では発現は全く観察されなかった。

Cxcl16 は昨年度の研究で Primer array を用いた分子生物学的な網羅的解析で顕著な上昇をみた分子である。Wild type マウスの正常な動脈では全く Cxcl16 の発現は認められなかったが、ApoE-KO マウスでは、動脈硬化病変の進展の程度に関わらず、いずれの病変でも発現が観察された。

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、2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{NC}, 2',4'-BNA^{AM} それぞれのアンチセンス核酸についてノックダウン活性を評価した結果それぞれのケミストリーで活性を示す鎖長が異なると

いう、興味深い治験が得られた。また、2',4'-BNA^{AM} では極大活性を示す鎖長が 14 と 19 塩基長の 2 鎖長あり、これらの背景に隠れるバイオロジーは非常に興味深い。2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} はともに 14 塩基長にて有意なノックダウン活性を示した事は、おそらくこれらが、ともに五員環の架橋構造を有しており、糖部コンフォメーションや架橋部の立体的嵩高さ、生体内におけるタンパク質結合率などの点で共通点が多炒めであると考えられる。六員環架橋構造を有する 2',4'-BNA^{NC} とはこの意味で一線を画することからこのような *in vivo* における活性の差が得られたものと考えられる。実際、2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} はともに高速液体クロマトグラフィーを用いた簡易的な疎水性の評価をした場合に、非常によく似た極性を有する事を確認している。このことは、生体内におけるタンパク質結合率などの体内動態パラメータが類似してくることを意味しており、活性もこれに伴って類似する傾向を確認している (Yamamoto et al., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *in press*, DOI: 10.1039/c5ob00242g)。

2',4'-BNA^{NC} において、17 塩基長で極大活性が得られた点については、これまでの *in vitro* の知見とは一致せず、非常に興味深い。我々は、以前に apoB を標的とした 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸についてより短鎖の 14 塩基長で極大活性が得られることを培養細胞の実験で示している (Yamamoto et al., *J Nucleic*

Acid, **2012**, 707323)。 *in vitro* においては 14 塩基長などの短い 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスが高い活性を示すことは、昨年度の研究結果からも明らかであり、*in vivo* での活性が *in vitro* の試験では十分に予測できないことを示唆する。このことは、*in vitro* 試験では、細胞内導入試薬を利用しているのに対して、*in vivo* では裸のまま投与している点で動態の効果を十分に考慮できていない点が主たる要因であると想像される。この意味から考えると、肝実質細胞内の ApoC-III mRNA の存在するコンパートメント (おそらく細胞核内) に効率的に 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスを送達できれば *in vitro* での効果を反映した *in vivo* の結果が得られると考えられる。引き続き、invivofectamine® や GalNac などの *in vivo* で利用可能なデリバリー剤を活用して検討を進めていきたい。

他方で、今回の結果から、14, 17, 19 塩基長で大きく活性が変動することが見出された。これらの結果はヒトアポ C3 に対する 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスや 2',4'-BNA^{AM} アンチセンスを開発するにあたり、14, 17, 19 塩基長の 3 種の鎖長のアンチセンス核酸をそれぞれについて設計し、mRNA ワイドに網羅的 *in vitro* スクリーニングを実施するとともに、選抜された候補品を実際に *in vivo* (げっ歯類、霊長類) 評価系の有効性評価を併用して開発候補を選定する必要性を強く支持するものである。この点を鑑みて、3 種の

鎖長についてギャップ部分をアラインしたアンチセンスをデザインした。

斯波グループは、昨年度は、さらに肝臓得意的な送達を可能にするための検討を行った。実際に、アンチセンス分子にコレステロールを修飾することで標的以外の組織への移行量を低減させ、肝臓への移行量を劇的に増加させることに成功した。一方で、標的である ApoC-III mRNA の発現抑制率の向上には至らなかったことから、薬効の改善には化学修飾の方法についてさらなる検討が必要であることが示唆された。そこで本年度は、一昨年度の研究成果として得られた高活性な ASO の脂質低下効果についての評価を進めた。

血中 TG 値の低下や LPL の活性など、*ApoC3* ノックアウトマウスや *APOC3* 機能欠失型変異の保有者のデータから予想される結果を示すことができた。フィブラーとの比較においては、単回の投与実験であったにも関わらず、優位な総 TG 値並びに TG を豊富に含む VLDL 分画における TG 値の優位な低下効果が示されたことから、ApoC-III 特異的阻害薬は TG 低下薬として非常に優れた薬剤であることが示された。さらに驚くべきは、本アンチセンス分子の投与により善玉コレステロールとされる HDL コレステロールが劇的に上昇する結果が得られた点である。この作用機序に関する詳細は不明であるが、前節で述べたように APOA4 や LIPC といった HDL 関連因子の影響によると推察される。近年、HDL 上昇薬がスタチン治療後の残存リス

クを拭い去るブレクスルーとなることが期待され、様々な薬剤の開発が試みられている。中でも HDL と VLDL との間でコレステリルエステルを交換する役割を担うコレステリルエステル輸送タンパク質 (CETP) を阻害する CETP 阻害薬が大手製薬企業により盛んに研究開発されてきたが、期待とは反して、有意に心血管イベントの抑制が出来ずに開発中止となっている [*N Engl J Med*, **367**, 22, 2089-99 (2012).]。また、CETP 阻害薬で先行しているアナセトラピブは第 3 相臨床試験において心血管イベントを優位に抑制するとい良好な結果を報告しているが、血中半減期が非常に長く薬剤投与終了後 2~4 年後も血中に薬剤が残存していることが明らかになり問題となっている [*Am J Cardiol*, **113**, 1, 76-83 (2014).]。今回得られた HDL コレステロールの上昇は CETP 阻害薬と作用機序も異なり抗 ApoC-III アンチセンス分子は、ApoC-III 選択的阻害による TG 値の改善のみならず、コレステロール異常の是正という面からも動脈硬化症の改善に寄与するものと期待される。

本年度、柴田 G では、新規 ASO の投与後の病理組織学的解析、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分子レベルで行い、高脂肪食を負荷した ApoE-KO マウスに誘発された動脈硬化の、ヒトへの外挿モデルとしての有用性の検討を行った。

ASO 投与後の病理組織学的検査では、肝細胞に空胞変性を観察し、Oil red 染色

では肝臓に脂肪の蓄積が亢進している傾向が窺われた。一方、既存の脂質低下製剤である FF 投与群では肝細胞の空胞変性や脂肪の蓄積はほとんど正常程度に改善されていた。その反面、FF 投与群では著しい肝細胞肥大を観察し、細胞質内には好酸性顆粒を多数含んでおり、増生したペルオキシソームと思われるが、同定するにはカタラーゼを証明する必要がある。また、ASO 投与群では肝臓内に泡沫細胞の集簇が観察され、クッパー星細胞の変性像であると推測される。検索例数が各群 4 例と少数であり、統計処理も出来ず、明言出来ないが、ASO は肝臓の蓄積脂肪の亢進と恐らくクッパー星細胞を標的とするのではないかと推察される。ASO が核酸であることを考えるとマクロファージであるクッパー星細胞が応答するのは自然な事象である可能性も存在する。

CT を用いた非侵襲的な手法で、内臓脂肪および肝臓の脂肪蓄積量の評価を試みた。その結果、CT 計測値と生体内に存在する実際の脂肪量は極めて良い相関を示し、小動物においても、ヒトと同様の側面からのアプローチが可能であることが示された。また、動脈硬化の初期石灰化では病理組織学的解析では検出し得たが、CT や超音波では検出が困難であった。しかしながら、ある程度の進展した動脈硬化病変の石灰化はいずれの手法でも検出が可能であった。CT や超音波によるイメージングは非侵襲的手法であることから、継時的に同一個体の同一病変を追跡することが

可能であり、貴重なモデル動物を屠殺する必要もなく、動物愛護の観点からも好ましい。治療実験にも応用できる極めて有用な解析手法の一つと考えられた。

ApoE-KO マウスに高脂肪食を負荷して作製した動脈硬化病変はヒトと類似の進展形態を示し、ヒト同様の病理組織学的な分類も可能であった。また、本モデルマウスの動脈硬化病変における分子生物学的な網羅的解析により、Cxcl16 や TIMP-1 を著明に上昇した分子として見出した。これらの分子は、ヒトにおいても動脈硬化の発症との関連が示唆されている重要な因子として注目されている。そこで今回は、ヒト動脈硬化病変の発症やその進展に関わる分子（F4/80, TIMP-1, MMP-9, MMP-1/8, sLOX-1, Cxcl16）を免疫組織学的に解析した。その結果、これら分子はいずれも動脈硬化病変に局在しており、高脂肪食負荷の ApoE-KO マウスに誘発された動脈硬化はヒトへの外挿モデルとして、極めて有用であることが示された。プラークは線維性被膜で被われており、線維性被膜の崩壊こそがプラーク破綻であり、急性血栓性閉塞のトリガーとなる。血管壁に侵入したマクロファージは蛋白質分解酵素の MMP を分泌し、線維性被膜を脆弱化させる。今回の実験で、これらのいずれの分子も ApoE-KO マウスの動脈硬化モデルで観察されており、治療モデルとしての有用性が高いことも新たに示唆している。

5. 結論

本年度の研究により、ケミストリーが異なると最大活性が得られる鎖長や最適なギャップサイズが異なる事を見出した。これらの実験事実を元に、ヒトアポ C3 アンチセンスのスクリーニング計画を立案した。

ApoC-III を高効率で阻害することで LPL 活性を上昇させ、TG 値への影響のみならず、HDL コレステールの大幅な上昇が認められたことで、動脈硬化症の予防薬として ApoC-III 阻害薬がさらに期待されるものとなった。

非侵襲的手法である CT や超音波によるイメージングにより、生体内の脂肪の計測や進展した動脈硬化の石灰化を検出することができ、治療実験にも応用できる有用な解析手法の一つと考えられた。

ApoE-KO マウスに高脂肪食を負荷して誘発した動脈硬化病変は、ヒトと類似の進展形態と同様の分子を発現し、ヒトの動脈硬化モデルとしての有用性が示され、治療実験や発症機序解析に相応しい病態モデルであることが示された。

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。

ヒトアポ C3 に対する高活性アンチセンスのスクリーニング選抜に向けた 2',4'-BNA^{NC}、2',4'-BNA^{AM} を搭載したアンチセンス核酸の構造最適化研究

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、動脈硬化症の危険因子の一つとされる高トリグリセリド血症の是正を主目的とし、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。特に、独自人工核酸技術「BNA」(2',4'-BNA、2',4'-BNA^{NC}および2',4'-BNA^{AM} (= AmNA)) の高い標的 RNA 親和性と優れた体内動態特性、安全性に鑑み、これを搭載した ApoC-III に対する高活性・低毒性アンチセンス医薬の開発を目指す。前年度には、高活性・低毒性な 2',4'-BNA 搭載型アンチセンス医薬の同定を目指し、2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンスの設計、合成を行った。これらの BNA^{NC} 搭載アンチセンスの *in vitro* スクリーニングを行ったところ、2',4'-BNA のものより強力な細胞活性を得た。本年度は、これらの新規 BNA 搭載型アンチセンスの *in vivo* での評価とこれらの構造活性相関について *in vivo* 活性に基づき検討を進めた。またここまで得られたげっ歯類での検討を元に、ヒト ApoC-III に対するアンチセンス核酸のスクリーニング選抜を進めた。

大阪大学大学院薬学研究科

山本 剛史

脇 玲子

国立循環器病研究センター研究所

病態代謝部

ス波 真理子

和田 郁人

堀 美香

小倉 正恒

和田 俊輔

柴田 映子

高藤 義正

澤村 元気

森本 めぐむ

吉田 晶子

駒井 仁美

A. 研究目的

ここまでの検討により、アンチセンス分

子に BNA 修飾を施すことにより非常に高い mRNA 阻害効果とトリグリセリド低下効果が得られる事を確認してきた。一方で、その標的配列や BNA の種類により薬効や安全性に大きな違いが存在する事がみいだされた。このような背景からさらにメッセンジャーRNA ワイドなウォークスクリーニングを実施することにより、アンチセンス核酸に用いるケミストリーごとに最適構造を探索しなければならないことが示唆された。この点で昨年度までに 100 種を超える ApoC-III アンチセンスを設計・合成し、初代培養肝細胞を用いてスクリーニング評価を実施した。これらの検討から特に 3'-UTR を標的とした BNA アンチセンスが高い薬効を示すことを見出している。以上の結果から 3'-UTR を標的とした 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンスも同様に高い効果を示すと予想し、表 1 に示す 34 種のアンチセンス核酸の活性を *in vitro* スクリーニングしたところ期待通り非常に活性の高い 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸の同定に成功した。これらの *in vitro* での活性の高かった mApoC3-411-NC(14), mApoC3-436-NC(14), mApoC3-456-NC(14), mApoC3-466-NC(14)について *in vivo* での投与試験を行ったが、2',4'-BNA を有する mApoC3-471-BNA の活性を下回った。なぜこのような *in vitro* と *in vivo* 活性の差が生じたかについては現時点では定かではないが、世界的にも前例のない興味深い観察であり、BNA の構造活性相関に関する非常に重要な知見が得られる可能性がある。そ

こで本研究では、これらの 2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{NC} のケミストリーの差がなぜ生じたのか検討を進めることとした。

これまで我々のグループでは、2',4'-BNA^{NC} を搭載したアンチセンス核酸が、対応する 2',4'-BNA 搭載型アンチセンス核酸の活性を *in vivo* レベルで上回る事を見出してきた (Yamamoto *et al.*, *Molecular Ther-Nucleic Acids*, **2012**, 1, e22)。しかしながら、この報告においては鎖長が 20 塩基と今回の検討よりも長鎖アンチセンスを使用している点で異なる。そこでこの点に注目し、体内動態の違いが、*in vivo* での活性の差につながったと考え、2',4'-BNA^{NC} のケミストリーを用いた様々な鎖長をもつアンチセンス核酸を設計、合成し、*in vivo* でのアンチセンス活性を評価することとした。

他方で、2',4'-BNA^{NC}や2',4'-BNA^{AM} (= AmNA) と行った次世代のBNAは、理由は定かではないが、内外の研究から2',4'-BNAを上回る安全性が見出されている。加えて、架橋部に窒素を有するBNAアナログにおいては窒素の原子価の性質上、置換基を導入出来る点でプロトタイプの2',4'-BNAよりも高い展開可能性を証明してきた (Yamamoto *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *in press*, DOI: 10.1039/c5ob00242g)。ここでは、ヒトApoC3に対するmRNAワイドなウォークスクリーニングに向け、2',4'-BNA^{NC} に加えて 2',4'-BNA^{AM} (= AmNA) アンチセンス核酸についても構造最適化を目指した。

B. 研究方法

1. 投与実験

すべての動物実験は、大阪大学の実験動物委員会の承認を得て実施した。被験動物とし7週齢のマウス C57BL6/J(♂: 日本 SLC、日本クレア) を購入し、CE-2 (日本クレア) を付加するとともに 1 週間以上馴化させたのち、投与試験を行った。マウスは 12 時間毎の明暗周期環境下で飼育し、食餌は自由に取れる環境で飼育した。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を 1.07 $\mu\text{mol/kg}$ の投与量で、あるいは対照群として生理食塩水 200 μL を皮下より単回投与を行なった。投与後 3 日後あるいは 7 日後に、イソフルランによる麻酔下、採血および、肝臓、腎臓、脂肪の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、 -80°C 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 を $\mu\text{T-12}$ (タテック社) ホモジナイザーにてジルコニアビーズを用いてホモジナイズを行い(30s⁻¹ for 2 min)、その後 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、rRNA を 1%アガロースゲル電気泳動で純度の確認を行った。

3. Realtime RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いて total RNA4 μg から cDNA を作製した。

Taqman® Fast Universal Master Mix および Fast SYBY® Green Master Mix を用いて、得られた cDNA の遺伝子発現解析を行った。また、ハウスキーピング遺伝子を *Gapdh* として標準化を行った。以下のプライマーセットを用いた: TaqMan Gene Expression ID; Mm00445670_m1 (*Apoc3*), Mm99999915_g1 (*Gapdh*)。

4. 配列設計

ヒトアポ C3 mRNA (アクセッション番号: NM_000040) に対してアンチセンスの設計を行った。14, 17, 19 塩基長の 3 種の配列についてそれぞれ設計した (表 3 に 14 塩基長の一部を示した)。配列設計にはバイオインフォマティクスに汎用されるオープンソース言語である BioRuby のライブラリオブジェクトと local BLAST を利用し、テキストマイニングとアンチセンス配列のチェックを行った。基本的な設計指針としては、RNase H の足場となるギャップ領域が同一領域になるように 3 鎖長について 3'末端側をアラインした。免疫刺激配列として知られる CpG モチーフを排除した。自己高次構造などをとりやすい cccc、gggg モチーフを除外した。毒性発現が示唆される ttctgc 配列を除外した。

C. 研究結果

1. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の *in vivo* スクリーニング評価

昨年度、表 1 に示す 34 種のアンチセンス核酸の活性をマウス肝臓由来初代培養