

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<sup>NC</sup> 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<sup>NC</sup>, 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 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 となる 1.07 μmol/kg とした。結果は、図 2 に示したように 14 塩基長同士で比較した場合には、2',4'-BNA と 2',4'-BNA<sup>AM</sup> にて有意なアンチセンス効果を見出したが、2',4'-BNA<sup>NC</sup> では全く効果は認められなかった。2',4'-BNA<sup>NC</sup> 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、興味深いことに 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 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<sup>AM</sup> を上回る活性を見出した。同様に、2',4'-BNA<sup>AM</sup> 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。

#### D. 考察

表 2 に示した 2',4'-BNA, 2',4'-BNA<sup>NC</sup>, 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 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大変興味深い知見が得られた。すなわち、それぞれのケミストリーで活性を示す鎖長が異なる点である。また、2',4'-BNA<sup>AM</sup> 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<sup>AM</sup> 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いためであると考えられる。六員環架橋構造を有する 2',4'-BNA<sup>NC</sup> 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<sup>AM</sup> 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<sup>NC</sup>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<sup>NC</sup> 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<sup>NC</sup> 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 apoC3 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<sup>NC</sup> アンチセンスを送達できれば *in vitro* 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<sup>NC</sup> アンチセンスや 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 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。

#### E. 結論

2',4'-BNA<sup>AM</sup>についても、A, T, G, <sup>13</sup>C の 4 種の塩基を持つ 2',4'-BNA<sup>AM</sup> のルート貫通、*in vivo* での使用に耐えうるスケールアップ合成が可能となり、また固相合成の最適化により多様な塩基配列を持つ 2',4'-BNA<sup>AM</sup> 搭載型アンチセンスの合成が可能になった。これらを用いて今回は、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。次年度から具体的に選抜試験を実施していく予定である。また、非臨床・臨床試験の実施に向け、大量合成の検討を行うとともに、品質評価方法ならびに品質管理の方法についても検討を進める。

#### 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

論文

1. Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S, Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides *in vivo*, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, *in revision*.
2. Mori K, Kodama T, Obika S, Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, *23*, 33-37.
3. Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S, Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance, *Org. Lett.*, 2014, *16*, 5640-5643.
4. Mori S, Morihiro K, Obika S, C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability, *Molecules*, 2014, *19*, 5109-5118.
5. Morihiro 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.*, 2014, *12*, 2468-2473.
6. Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, Obika S, Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides *in Vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, *42*, 8174-8187.
7. Yamamoto T, Wada S, Wada F, Shigesada H, Harada-Shiba M, Obika S, Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice, *Nucleic Acid Therapeutics*, 2014, *24*, 283-290.

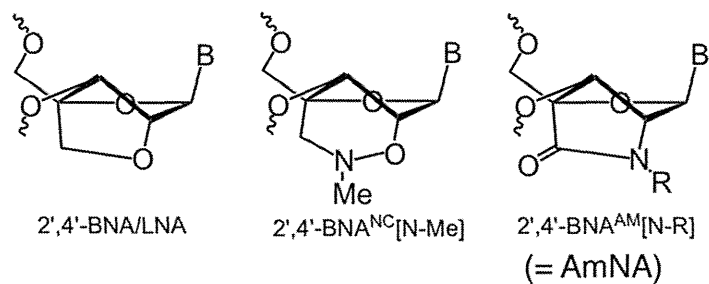


図 1. 各種糖部架橋型人工核酸の化学構造。B は塩基、R は種々の置換基を指す。

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-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。

表2 本研究で使用した各種 BNA 搭載型アンチセンス核酸一覧

Length	Sequence	Gap
14	TTAggtgagatCTa	8
14-2	TTaggtgagatCTa	9
16	TTTtaggtgagatCTAg	9
17	GTTtaggtgagatCTAg	10
18	TGTtaggtgagatCTAg	11
19	TGTtaggtgagatcTAGg	12
20	ATGTTtaggtgagatcTAGg	13

Upper case : 2',4'-BNA or 2',4'-BNA<sup>NC</sup> or 2',4'-BNA<sup>AM</sup>, C = 5-methyl-C, Lower case : DNA, Linkage : all phosphorothioate.

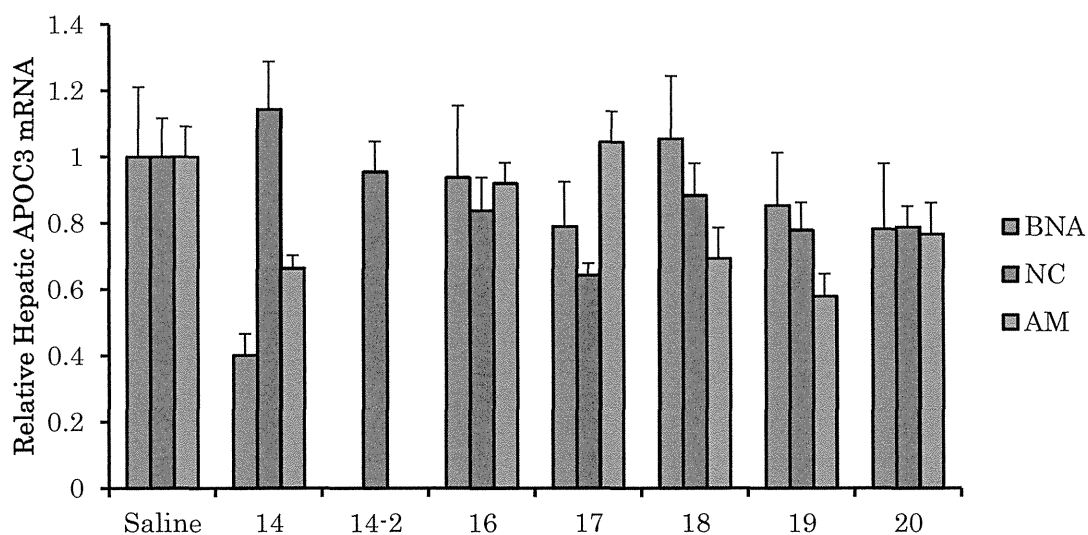


図2. 用いるケミストリーの違いによる鎖長ごとのアンチセンス活性

表3. ヒトApoC3スクリーニングに向けたアンチセンスデザイン (一部)

No.	ASO ID	CpG	cccc	gggg
1	hApoC3-2-AM(14)	なし	なし	なし
2	hApoC3-12-AM(14)	なし	なし	なし
3	hApoC3-32-AM(14)	なし	なし	なし
4	hApoC3-57-AM(14)	なし	なし	なし
5	hApoC3-67-AM(14)	なし	なし	なし
6	hApoC3-117-AM(14)	なし	なし	なし
7	hApoC3-137-AM(14)	なし	なし	なし
8	hApoC3-202-AM(14)	なし	なし	なし

9	hApoC3-237-AM(14)	なし	なし	なし
10	hApoC3-247-AM(14)	なし	なし	なし
11	hApoC3-257-AM(14)	なし	なし	なし
12	hApoC3-282-AM(14)	なし	なし	なし
13	hApoC3-287-AM(14)	なし	なし	なし
14	hApoC3-302-AM(14)	なし	なし	なし
15	hApoC3-307-AM(14)	なし	なし	なし
16	hApoC3-312-AM(14)	なし	なし	なし
17	hApoC3-317-AM(14)	なし	なし	なし
18	hApoC3-332-AM(14)	なし	なし	なし
19	hApoC3-337-AM(14)	なし	なし	なし
20	hApoC3-342-AM(14)	なし	なし	なし
21	hApoC3-347-AM(14)	なし	なし	あり
22	hApoC3-362-AM(14)	なし	なし	なし
23	hApoC3-367-AM(14)	なし	なし	なし
24	hApoC3-392-AM(14)	なし	なし	なし
25	hApoC3-422-AM(14)	なし	なし	なし
26	hApoC3-437-AM(14)	なし	なし	なし
27	hApoC3-442-AM(14)	なし	なし	なし
28	hApoC3-447-AM(14)	なし	なし	なし
29	hApoC3-492-AM(14)	なし	なし	なし
30	hApoC3-497-AM(14)	なし	なし	なし
31	hApoC3-502-AM(14)	なし	なし	なし
32	hApoC3-512-AM(14)	なし	なし	なし

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 －

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

近年、本邦の死因の多くを占める心疾患などの冠動脈性疾患のリスクと apolipoprotein C-III (ApoC-III)との強い関係性が示されている。ApoC-IIIは高トリグリセリド (TG) 血症の原因因子の一つとされ、レムナントリポタンパク質 (RLP) の代謝に関与するタンパク質で、さらに、血管壁における炎症を惹起することで直接的に動脈硬化症を促進することが明らかにされつつある。本研究では、ApoC-III を選択的に阻害可能かつ効率的な BNA 搭載型アンチセンス分子 (ASO) の研究により、高 TG 血症の治療ならびに動脈硬化症の予防が可能な新しい治療薬の開発を行う。昨年度は、当初の計画通り、ASO の肝指向性の向上を目的としたコレステロール修飾型 ASO の開発および評価を行った。期待通りに肝臓への移行量の増加を確認したが標的遺伝子抑制効果の向上には至らなかった。本年度は、一昨年度の研究成果により最適化された ASO の脂質低下効果について評価を行った。ApoC-III は TG 分解酵素である LPL の活性を阻害することで血中の TG 値を上昇させることが知られているが、実際に ASO の投与により末梢 LPL が活性化することを実証した。また、既存の脂質低下薬かつ、ApoC-III の抑制作用を示すフィブラート系製剤と比較することで脂質低下薬としての評価を行った。その結果、短期投与実験において、大過剰量のフィブラートと比較して ASO は ApoC-III 阻害効果に優れていることを確認した。また、両群において血中 TG 値の低下が認められ、さらに ASO 投与群のみにおいて善玉コレステロールとされる HDL コレステロールの増加も認めた。本結果から、ApoC-III 選択的阻害薬は TG 低下作用のみならず、リポタンパクのプロフィールの改善という面からも動脈硬化症の改善が可能であることが期待される。以上の結果より、動脈硬化モデルマウスへの優れた治療効果が望めることから、現在、長期投与実験を進めている。

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  
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  
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

心疾患や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患は本邦の死因の多くを占めている。動脈硬化症の発症に関わる危険因子としては、脂質異常症や高血圧、糖尿病などが認知されているが、遺伝的要因を除けば、近年の食の欧米化や運動不足などといった生活習慣に伴ってこれらの疾患はここ十数年で増加傾向にある。また、脂質異常症の一種である高トリグリセリド (TG) 血症は、大規模疫学調査より、冠動脈疾患の独立した危険因子であることが示されている。しかしながら、家族性複合型脂血症や高 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、大規模臨床試験において代表的な

脂質低下薬であるスタチンとフィブラートの併用は良好な結果を出しているが、一方で、これらの併用は原則禁忌となっているため十分な治療が困難である。このことから、上記のようなリスクを重複したような状況においては、高 TG 血症への介入が有効であることは明白であり、強力な TG 低下作用を有する治療薬が求められている。

高 TG 血症の遺伝性疾患の原因遺伝子の一つとして同定されている *LPL* (lipoprotein lipase) は、レムナントリポタンパク質 (TRL) のクリアランスを促す最重要な酵素の一つであり、機能不全に陥るとリポタンパク質中の TG の分解が抑制され、血中の TG 濃度は高値を示す。Apolipoprotein C-III (ApoC-III) は、この *LPL* の活性を阻害するものとして同定されたタンパク質で、このタンパク質の機能欠失型変異の保有者は健常人と比較して TG 値および冠動脈性疾患のリスクが有意に低いことが明らかになっている。また、ApoC-III は *LPL* の阻害のほかに、血管内皮における慢性炎症に関与することで動脈硬化症への直接的な作用が示唆されている。以上のような背景より、近年、ApoC-III は創薬ターゲットとして非常に注目されている。一方で、その作用上、小分子などによる阻害剤の開発は困難とされていることから、本研究では、厳密な分子認識が可能な新規人工核酸「BNA」搭載型アンチセンス分子を用いた 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、標的組織である肝臓以外の腎



臓や肺などにも蓄積が確認されるアンチセンス分子の体内動態の改善についての検討を行った。アンチセンス分子にコレステロールを修飾することで、低比重リポタンパク質 (LDL) コレステロールとともに肝臓特異的な送達が可能と考えた。実際にコレステロール修飾を施したアンチセンス分子の開発を行い、その体内動態について評価した。結果、期待通りに肝臓への移行量は著増し、腎臓などの他の組織への蓄積を抑えることに成功した。一方で、標的遺伝子抑制効果は低下し、その原因が目的の肝実質細胞ではなくクッパー細胞等の非実質細胞への蓄積量の増加であることが明らかになった。この結果から、本研究では、一昨年度の研究成果である AmNA などの次世代型人工核酸による安全かつ高活性な分子の選択が臨床応用に適していることが考えられた。本年度は、実際に一昨年度にスクリーニングによって得られた分子を用いて、実際の脂質低下効果や脂質代謝系に与える影響について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 投与実験

被験動物とし7週齢のマウス C57BL/6J (♂: 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 (15 mg/kg/回)あるいは生理食塩水 (Saline: コントロール) を皮下より単回投与を行なった。また、corn oil (SIGMA)に溶解したフェノフィブラート

(FF, Wako)は 100 mg/kg/day の用量で 50  $\mu$ L のボリュームで経口投与を行い、その比較対象として corn oil を 50  $\mu$ L/day で経口投与した群を用意した。投与開始より 7 日後に、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 $^{\circ}$ 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 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. Realtime RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いて total RNA 4  $\mu$ g から cDNA を作製した。Taqman<sup>®</sup> Fast Universal Master Mix および Fast SYBY<sup>®</sup> 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。

TaqMan Gene Expression ID;

Mm00445670\_m1 (*Apoc3*), Mm99999915\_g1 (*Gapdh*), Mm01171487\_m1 (*Lipc*),

Mm00437568\_g1 (*Apoa1*),

Mm00450234\_m1 (*Scarb1*), Mm00442646\_m1 (*Abca1*)

Primer ;

*Apoa4* Fw\_ TCATCGAGGTGTGCAGGTTG, Rv\_ CAGCTGACCCCATACATCCAG, *Apoa5*

Fw\_ GGGACTACTTCAGCCAAAACAG,  
Rv\_ TCTCAAGGGTCCCAGCTTTTC

#### 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 µL を用いて測定した。

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

#### 5. LPL 測定実験

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 (Saline: コントロール) 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。

#### 6. 血清中 APOC3 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 分間ブロッキングを行い、次いで Blocking one を用いて 1 時間ブロッキングを行った。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 (Goat anti rabbit IgG HRP) 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。

#### 7. 血清中 APOC3 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 (Cloud-Clone Corp) を用いて定量した。

#### 8. 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。

### C. 研究結果

#### 1. ApoC-III 阻害による TG 低下作用の機序に関する検討

前述のように、ApoC-III の TG 上昇作用の一つとして、TG 分解酵素である LPL の活性を阻害することが知られており、

ApoC-III を阻害することで LPL の活性化が期待されることから、その実証を行うこととした。ApoC-III の発現量はグルコースや脂質などによって制御されており、高脂肪食の負荷によりその発現量が増加することが示されている。従って、本検討においては、アンチセンス分子による ApoC-III 阻害効果を明瞭にするために、事前に高脂肪食を 1 週間負荷したマウスを使用することとした。マウスに対するスクリーニングから得られたアンチセンス分子 (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することで、ヘパリンとともに末梢の LPL を回収した。まず、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 (図 1-a)。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 (Roar Biomedical, Inc) 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分かった (図 1-b)。

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

現在、脂質異常症の中でも TG 値が高いような患者に対しては、フィブラート系製剤が使用される場合が多い。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 $\alpha$ ) 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種々のフィブラート系製剤のうち、今回はフェノフィブラート (FF) を用いることとした。フィブラートには PPAR $\alpha$  のみのアゴニストであるもの、また PPAR $\alpha$  及び PPAR $\gamma$  の両方のアゴニストのものがあるが、ベザフィブラートなど後者に分類されるものは評価が煩雑になると推定されるため前者に分類される FF が本評価に適していると判断した。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(図2-a)。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(図2-b)。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(図3-a)。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(図3-b,c)。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分かった。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(図4)。

冒頭でも述べたように、TGやコレステロールなどといった脂質はリポタンパク質と呼ばれる粒子の形で体内を運搬され、最終的に代謝され、これらのリポタンパク質はTGやコレステロールを含む割合で大きさ

が異なり、TGに富んでいるほど大きい。また、リポタンパク質はサイズによって構成するタンパク質や機能が異なることから、サイズごとのリポタンパク質の定量は臨床においても非常に重要な項目となっている。これらのサイズの異なるリポタンパク質は超遠心や液体クロマトグラフィーで分離をすることで、今回は高効率液体クロマトグラフィー(HPLC)を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(図5-a, b, 表1)。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。LPLの活性化によりリポタンパク質が小型化する過程でHDLコレステロールが増加したことが一因として考えられるが、同様の作用を有するFFの処置によるこの増加が認められないことから、その他の因子に寄るところが大きいと考え、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(図6)。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

#### D. 考案

本研究は、アンチセンス分子を用いた今までにない高中性脂肪血症の治療薬の開発を目的として研究を行ってきた。アンチセンス医薬は、主に肝臓を標的とした薬剤の開発が盛んであるが、天然のDNAのリン酸骨格へ硫黄原子を導入したホスホロチオエート骨格の開発により、アンチセンス分子の動態に肝臓指向性が付与されたからである。しかしながら、標的以外の組織に蓄積する割合も多かったことから、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。従って、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。

その結果として、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。フィブラート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。

#### E. 結論

本年度は、一昨年度の研究成果より得られた ApoC-III を標的とした高活性な ASO の脂質低下効果について研究を進めた。平成 23 年度の最適化を行う前の ASO による複数回投与実験で得られた同程度の脂質低下効果が、今回は単回投与で確認できたことからアンチセンス医薬の実用化に向けた大きな進展であると言える。また、ApoC-III を高効率で阻害することで TG 値への影響のみならず、一般的に善玉コレステロールとされる HDL コレステロ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。従って、次年度に向けて準備を進めている動脈硬化モデルマウスに対する本アンチセンス分子の長期投与では、優れた治療効果を示すに違いないと予測できる。

#### 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

##### 論文

- 1) Yamamoto Y, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba

M, Obika S: Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo, *Organic & Biomolecular Chemistry*, in press

- 2) Pang J, Sullivan D R, Harada-Shiba M, YA Ding P, Selvey S, Ail S, Watts G F, Significant Gaps in Awareness of Familial Hypercholesterolaemia among Physicians in selected Asia-Pacific Countries: a Pilot Study, *Journal of Clinical Lipidology*, in press
- 3) Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, Harada-Shiba M. Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (pcsk9) by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for pcsk9. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;jc20143066
- 4) Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Dev.* 2014

- 5) Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada N, Harada-Shiba M, Obika S. Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free RNase H-mediated antisense reaction and in mice. *Nucleic acid therapeutics*. 24: 283-290, 2014.
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 総説
- 1) 小倉正恒, 斯波真理子: 動脈硬化症の治療標的ー脂質代謝を中心に, 臨床検査 Vol.59 No.2, 133-141, 2015.2
- 2) 安原秀典, 和田俊輔, 斯波真理子: 第6節 PCSK9, series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用ー脂質代謝異常と関連疾患<上巻> 180-194, 2015.1
- 3) 和田俊輔, 斯波真理子, 小比賀聡: 第5節 ARH, series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用ー脂質代謝異常と関連疾患<上巻> 169-179, 2015.1
- 4) 小倉正恒, 斯波真理子: 重症高コレステロール血症の治療, Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分泌, 133-140, 2015.1
- 5) 斯波真理子: 補助療法 LDL アフェレシス, 高 LDL-C 血症 低 LDL-C 血症 診断と治療の ABC 101, 196-203, 2015.1
- 6) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症への対応, 動脈硬化予防 Vol.13 No.4, 36-41, 2015.1
- 7) 槇野久士, 斯波真理子: Low density lipoprotein(LDL)アフェレシス, 人工臓器 43 巻3号, 197-201, 2014.
- 8) 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子: 新規人工核酸を基盤とした循環器疾患の新たな治療薬の開発, 循環器病の進歩 Vol.XXXV No.1, 60-68, 2014.11
- 9) 斯波真理子: すべては患者さんのためにー脂質代謝異常研究の最前線で, 糖尿病診療マスター Vol.12 No.8, 772-778, 2014.11
- 10) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症, Current Therapy Vol.32 No.9, 95 (927), 2014.9
- 11) 槇野久士, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症に対する LDL アフェレシスの治療効果と臨床評価方法, 日本アフェレシス学会雑誌 33 巻2号, 129-134, 2014.5
- 12) 小倉正恒, 斯波真理子: 脂質異常症, 内科 Vol.113 No.6, 1558-1561, 2014.6
- 13) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症 (FH), 診断と治療 第102 巻 第5号, 757-761, 2014.5
- 14) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高



コレステロール血症 (PCSK9,ARH)  
と黄色腫,動脈硬化, The Lipid,  
Vol.25 No.2, 4-10, 2014.4

15) 斯波真理子.; 家族性高コレステ  
ロール血症, あなたも名医! パタ  
ーンで把握する脂質異常症治療,  
jmed31, 134-138, 2014.4

16) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高  
コレステロール血症を再考する,  
Vascular Medicine, Vol.10 No.1,  
16-23, 2014.4

学会発表  
(国際学会)

1) Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M,  
Serum Total Bilirubin Levels in  
Japanese Patients with Familial  
Hypercholesterolemia, The 2<sup>nd</sup> World  
Congress of Clinical Lipidology,  
2014年12月5日~7日, Vienna,  
Austria

2) Wada S, Saito H, Endo K, Wada F,  
Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba  
M, Development of archaeal  
L7Ae-based siRNA delivery vehicle  
with apoE mimetic-like effect, 10th  
Annual Meeting of the  
Oligonucleotide Therapeutics Society,  
ポスター発表, 2014年10月12日  
~15日, San Diego, California, USA

3) Harada-Shiba M, Management of  
pregnancy and delivery in 4  
homozygous FH with LDL apheresis,

9<sup>th</sup> LIPIDCLUB & Therapeutic  
Apheresis 2014, 2014年6月6日~7  
日, Rome

4) Harada-Shiba M, Yamamoto T,  
Yasuhara H, Wada F, Wada S, Shibata  
M.A, Obika S, Long Term Effect of  
Bridged Nucleic Acid(BNA)-Based  
Antisense Targeting PCSK9 on  
Metabolism and Inflammation, 82<sup>nd</sup>  
European Atherosclerosis Society, ポ  
スター発表, 2014年5月31日~6  
月3日, Madrid Spain

5) Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai  
H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha  
T, Kishimoto I, Hattori H,  
Harada-Shiba M, Plasma Mature and  
Furin-Cleaved PCSK9S are Removed  
by LDL Apheresis Treatment with  
Both LDL Adsorption and Double  
Membrane Filtration, 82<sup>nd</sup> European  
Atherosclerosis Society, ポスター発  
表, 2014年5月31日~6月3日,  
Madrid Spain

6) Harada-Shiba M, Efficacy of  
Evolocumab(AMG145) in Patients  
with PCSK9 Gain-of-Function  
Mutations, 82<sup>nd</sup> European  
Atherosclerosis Society, Clinical and  
Late Breaking Session 1, 2014年5月  
31日~6月3日, Madrid Spain

(国内学会)

1) 堀美香, 駒井仁美, 水野敏秀, 斯  
波真理子, ApoE/NMU 二重欠損マ

- ウスにおける血清脂質の上昇と肝臓におけるマクロファージ数の低下, 第37回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2014年11月25日～27日, 横浜
- 2) 和田郁人, 山本剛史, 斯波真理子, 小比賀聡, フィブラート系薬剤との比較によるアンチセンス Apolipoprotein C-III 阻害剤の脂質低下効果の評価, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, ポスター発表, 2014年9月8日～9日, 東京
  - 3) 和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型 siRNA の肝臓における免疫惹起性の増大, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, ポスター発表, 2014年9月8日～9日, 東京
  - 4) 山本剛史, 藤井奈緒子, 安原秀典, 斯波真理子, 小比賀聡, アンチセンス核酸の mRNA 切断反応における効率的回転に関する検討, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, シンポジウム 3, 2014年9月8日～9日, 東京
  - 5) 斯波真理子, 脂質異常症に対するアンチセンス医薬の開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, シンポジウム 1, 2014年9月8日～9日, 東京
  - 6) 和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型 siRNA の肝臓における免疫惹起促進の機序について, 遺伝子・デリバリー研究会 第14回夏期セミナー, 2014年8月20日～21日, 一般発表, 熊本
  - 7) 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型アンチセンス核酸の薬理効果及び、体内分布解析, 遺伝子・デリバリー研究会 第14回夏期セミナー, 2014年8月20日～21日, 一般発表, 熊本
  - 8) 柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子, 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, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日～11日, 東京
  - 9) Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Effects of Selective Down-regulation of Apolipoprotein C-III by Antisense Oligonucleotides, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日～11日, 東京
  - 10) Harada-Shiba M, Sumeray M, Rationale and design of a phase 3 study evaluating the efficacy and safety of lomitapide in Japanese patients with homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH), 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集

- 会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 11) Ohta N, Hori M, Fujiwara A, Fujiyama H, Sano M, Tamanaha T, Makino H, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Characteristics of heterozygous familial hypercholesterolemia with mutations in between LDLR, PCSK9 and LDLRAP1 gene, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 12) 小倉正恒, 榎野久士, 玉那覇民子, 肥後諒, 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ヘテロ接合体高齢初産の1例, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 13) 石原光昭, 鯨岡健, 岩崎忠雄, 小川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9)非ヘテロダイマー型 mature segment 分子の LDL 受容体分解活性, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 14) 鯨岡健, 石原光昭, 岩崎忠雄, 小川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子, ヒト血中における PCSK9 の分子形態の解析, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 15) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内膵安子, GLP-1 のコレステロール代謝に及ぼす影響, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 16) 道倉雅仁, 小倉正恒, 富家千鶴, 肥後諒, 菱田藍, 椋谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 榎野久士, 柴田映子, 堀美香, 岸本一郎, 斯波真理子, 超音波で測定したアキレス腱厚と頸動脈内膜中膜複合体厚の関連, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 17) Ogura M, Harada-Shiba M, Renal cysts as an emergent risk factor for arterial stiffness, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 18) Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M, LDL apheresis treatment by both LDL adsorption and double membrane filtration reduces plasma levels of mature and furin-cleaved PCSK9s, 第46回日本

動脈硬化学会総会・学術集会, ポ  
スター発表, 2014年7月10日~11  
日, 東京

- 19) Wada S, Yasuhara H, Wada F,  
Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba  
M, Conjugation approach toward  
anti-PCSK9 antisense oligonucleotide  
agent for getting further inhibitory  
effects, 第46回日本動脈硬化学会  
総会・学術集会, ポスター発表,  
2014年7月10日~11日, 東京
- 20) 斯波真理子, 荒井秀典, 山下静也,  
石橋俊, 我が国における家族性高  
コレステロール血症ホモ接合体の  
実体調査, 第46回日本動脈硬化学  
会総会・学術集会, シンポジウム  
5, 2014年7月10日~11日, 東京
- 21) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子,  
斯波真理子, 内潟安子, 肝細胞に  
おける GLP-1 のコレステロール代  
謝に及ぼす影響, 第57回日本糖尿  
病学会年次学術集会, 口演, 2014  
年5月22日~24日, 大阪