

厚生労働科学研究委託費

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指し
た治験に橋渡しするための非臨床試験

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 斯波 真理子

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

- . 委託業務成果報告（総括）・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験
に橋渡しするための非臨床試験
斯波 真理子

- . 委託業務成果報告（業務項目）
 - 1 . 臨床試験を開始するための非臨床安全性試験・・・・・・・・ 1 3
小林 直之
 - 2 . 品質保証に関わる検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 9
小比賀 聡
 - 3 . PCSK9 標的型アンチセンスの臨床試験へ向けたヒト初回投与
量の検討 - ゲッ歯類における毒性検討試験および分析法のバ
リデーション - ・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 5
斯波 真理子
 - 4 . 対面助言資料・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 1

- . 学会等発表実績・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 5 1

- . 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 5 7

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化研究事業（臨床研究・治験推進研究事業））
委託業務成果報告（総括）

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に 橋渡しするための非臨床試験

業務主任者 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

家族性高コレステロール血症(FH)は、冠動脈疾患の一次予防や二次予防のためにスタチン等の脂質低下薬を用いて LDL-C のコントロールを行っている。これらの薬剤は LDL 受容体の分解活性を持つ Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) の発現を上昇するため、目標 LDL-C 値に達する例は少ない。本研究においては、PCSK9 をターゲットとした新規核酸医薬の臨床化に向けて、非臨床試験および品質を行うことを目的とする。本研究は厚生労働省革新的医薬品医療機器実用化研究事業に選ばれ、核酸医薬実用化に向けたガイダンス作成のモデルケースとなっており、そのガイダンス作成プロジェクトと密にコンタクトを取りながら、研究初年度には PMDA の薬理戦略相談（対面助言）を受けてその内容を研究計画に反映させ、最終年度には再度対面助言を受けることにより、研究期間の終了後に実施する薬事申請を目指した治験に橋渡しするために十分な非臨床試験のデータを収集する。

研究初年度の本年度において研究代表者の斯波は、研究の総括を行うとともに、げっ歯類による毒性検討試験および分析法のバリデーションを実施し、三種の候補のうち 1 種の開発候補および 1 種のバックアップを選定した。分析法に関しては、高感度で検出可能なハイブリダイゼーション ELISA 法の構築を構築し、バリデーションを実施した。研究分担者の小比賀は、核酸医薬の原薬となる人工核酸搭載型オリゴヌクレオチドの製造における原料（アミダイト体）の品質を検証するために、逆相 HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMR による分析を実施し、各分析手法の Scope と Limitation について精査を行った。分担研究者の小林は、非臨床試験の実施戦略を作成するとともに、各試験の試験計画を立案した。本年度の研究は、当初の研究計画通りに進行しており、来年度以降の研究計画に沿って研究が進行できる基礎が整ったと言える。

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症（FH）は、高 LDL コレステロール(LDL-C)血症、皮膚および腱黄色腫、若年性動脈硬化症による冠動脈疾患を主徴とする遺伝病であり、ヘテロ接合体は 500 人に 1 人以上の頻度で認められる。冠動脈疾患の一次予防や二次予防のために、多くの FH ヘテロ接合体においてはスタチンを含む複数の脂質低下薬が処方されている。しかしながら、目標 LDL-C 値に達する例は少ない。スタチンや脂質低下薬は、SREBP2 を活性化して LDL 受容体活性を上昇するため、同時に LDL 受容体分解活性を持つ PCSK9 発現を上昇することが大きな原因と考えられている。PCSK9 は、そのプロドメインが活性部位を覆う形で存在するため、低分子阻害薬で阻害することが困難であることが創薬を困難にしている。

我々は、「保健医療分野における基礎研究推進事業」において PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の開発を行い、リード化合物の選択に成功している。すなわち、PCSK9 に対するアンチセンス(AS)に革新的核酸医薬である架橋型人工核酸(BNA)修飾を行うことにより、酵素耐性能、PCSK9 mRNA との結合親和性の著増を認め、マウスへの皮下投与により肝臓での PCSK9 mRNA を 95%抑制した。臨床化に向けて AS の配列選択のためにヒトとマウスの共通配列部分について 103 種類の BNA 修飾 AS を合成し、*in vitro* および *in vivo* スクリーニングにより、著効を示し毒性を有しない最適配列の選択に成功している。また、本研究内容は、厚

生労働省革新的医薬品医療機器実用化研究事業に選ばれ、核酸医薬実用化に向けたガイドランス作成のモデルケースとなっている。

本研究は、小比賀らのオリジナルである人工核酸修飾技術を用いて、家族性高コレステロール血症を始めとする難治性高コレステロール血症の治療を行うものであり、日本発の技術を世界に示すことができる。核酸医薬については、アポリポプロテイン B に対するアンチセンス医薬である Mipomersen が臨床開発されているが、副作用が強いため FDA では限定的に認められ、EMA には否認された。PCSK9 を標的とした薬剤としては、海外の製薬企業より抗体医薬が開発されており、現在臨床試験が行われてその有効性が示されつつある。

本研究においては、これまでに最適化された BNA 修飾 AS を動物に投与する非臨床試験および品質保証計画立案、実施を行う。遺伝毒性試験、急性毒性試験、反復投与毒性試験、安全性薬理試験を行い、薬事申請を目指した治験に橋渡しするための非臨床試験を実施する。

本年度では、小比賀グループでは原薬製造における重要な検討項目の一つであるアミダイト体の品質評価を行い、斯波グループではげっ歯類による毒性検討試験および分析法のバリデーションを行った。小林グループでは、非臨床安全性試験及びそれに伴う原薬の品質管理の実施戦略を作成するとともに、各試験の試験計画を PMDA による事前面談の内容を反映させながら立案した。平成 27 年 3 月 12 日には、対面助言の

予定であり、その内容を次年度以降の研究計画に反映させる予定である。

B. 研究方法

非臨床安全性試験の立案

1) 非臨床安全性試験全体の実施戦略

目標とする臨床の前期第 相試験(P a)の試験デザインの概要を基に、FIH となる臨床第 相試験(P)の試験デザインを作成した。次いで、日米 EU 医薬品規制調和国際会議で合意されたガイドライン(ICH ガイドライン)等を参照して、治験薬の品質管理、薬効確認試験、非臨床動態試験(ADME)並びに GLP 適合を必要とする安全性薬理試験、遺伝毒性試験及び一般毒性試験について、それぞれの試験デザインと実施スケジュールを策定した。なお、実施戦略の立案にあたっては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)が行っている薬事戦略相談を受け、内容を計画に反映させることとした。

品質管理計画と実施

2) 品質管理戦略

開発の初期段階であることから、原薬や製剤の製造法の改良が行われることを念頭に、非臨床試験に供する原薬から治験薬、ひいては臨床応用に至までの品質の一貫性担保を特に意識した管理方法を作成した。また、非臨床試験に用いられる原薬の特性試験における試験項目を設定した。さらに、これから蓄積していく特性試験の結果や原薬の暫定製造法等で得られるサンプルの分

析データに非臨床試験の結果を加えることで治験薬の暫定規格を設定する計画を作成した。

3) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

核酸のアミダイト体には紫外吸収のクロモフォアとなる核酸塩基が含まれるため、一般に 260 nm の紫外吸収を測定することでその検出が可能である。そこで、これら AmNA のアミダイト体(A, G, C, T の 4 種)について、紫外吸収(260 nm)を指標とした逆相 HPLC による分析を実施し、その純度を評価した。

4) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ³¹P-NMR 分析

各 AmNA アミダイト体について ³¹P-NMR 測定を実施し、その構造並びに純度情報を収集した。

5) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ¹H-NMR 分析

一般的な有機化合物の分析に広く用いられている ¹H-NMR 測定を行い、リン原子を含まない夾雑物の検出の可否について検討を行った。

非げっ歯類における薬効確認

6) 薬効確認試験

試験動物には、本被験物質のターゲット遺伝子がヒトと同じ配列を有するカニクイザルを選択し、2~6 歳の雌雄計 28 匹(馴

化開始時：2.0～6.0kg)を用意し、馴化終了日(馴化期間：7日)に、トリグリセリド(TG)あるいはLDL-Cの高い動物を選別し、試験に供給した。試験期間中の観察は、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査[アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、総コレステロール、TG、及びLDL-C]を設定した。投与は1週間に1回とし、初回の投与後のTG又はLDL-Cの変化を指標として、2回目以降の投与量を決定する漸増法として実施することとした。なお、投与方法は予定している臨床投与経路にあわせて皮下投与とした。

毒性試験

7) 遺伝毒性試験

ICHガイドラインS2に従って、FIHまでにバクテリアを用いた復帰突然変異試験(Ames試験)及びほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験の二つの*in vitro*試験をおこなうことを計画し、いずれかの試験において、陽性の結果または陽性が疑われる結果が得られた場合、FIHの開始までに、*in vivo*遺伝毒性試験であるげっ歯類を用いた小核試験を実施することとした。

8) 一般毒性試験及び安全性薬理試験

FIHの開始に必要なとされている安全性薬理試験のコアバッテリー(中枢神経系、心血管系および呼吸器系への影響試験)は、動物愛護の観点も考慮し、検査項目に追加することにより、一般毒性試験に組み込んで

で評価する計画とした。具体的には、中枢神経系への影響は、げっ歯類を用いた毒性試験において、Irwinの変法による観察を、呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響は、非げっ歯類を用いた毒性試験において、血液ガスや呼吸数の計測、ホルター心電図を用いた検査を組み込むことで実施する計画とした。

一般毒性試験では2種の動物種を用いるが、げっ歯類では、使用する動物数の削減や検査可能な項目を考慮して、ラットを選択した。また、本被験物質のターゲット遺伝子であるPCSK9の遺伝子配列がヒトと同じである動物を使うことにより、本被験物質によるオンターゲット効果による影響を観察することが可能とすることから、非げっ歯類ではカニクイザルを選択した。

さらに、GLP適合試験の実施に先立ち、予備毒性試験を実施することで、群数及び投与量、さらには検査項目の最終的な決定を行うこととした。

TKバリデーシオンの確立と移管

9) TKバリデーション

アンチセンス分子に相補的な3'ピオチン化したtemplateDNA、5'位および3'位をそれぞれジゴキシゲニン化したDNAをprobeDNAとした。TemplateDNAをバッファーに溶解し、100nMとした。ProbeDNAと1.5unit/wellのT4DNAligase(TaKaRa, Cat#2011A)をバッファーに溶解した。抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ抗体を1:5000の割合でSuperblock blocking

buffer を用いて希釈した。アルカリフォスファターゼの基質として AttoPhos® Fluorescent AP Substrate System を使用した。この技術については、GLP に適合した試験において実施するために、GLP 適合施設への、移管をおこなった後、バリデーションを実施するものとした。

非臨床動態試験の立案

10) 非臨床動態試験

ICH ガイドライン M3 に従って、非臨床動態試験のうち、FIH の開始に必要な動態試験、*in vitro* 代謝試験及び *in vitro* タンパク結合試験の実施スケジュールを立案した。

非臨床安全性試験

11) 投与実験

各アンチセンス核酸 (10, 50 mg/kg/回)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。投与開始より 7 日後に、採血および、肝臓、腎臓の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、-80 保存した。

12) 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遠心して血清を分離し、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。

相同遺伝子の検索

13) 相同遺伝子検索

3 種の候補化合物の塩基配列と相補的な遺伝子もしくは non-coding RNA を BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いてヒトおよびマウスを対象に検索を行った。

C. 研究結果

品質保証計画

1) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

AmNA アミダイト体の純度を精査するために、逆相 HPLC による分析を実施した。アミダイト体はその化学構造上、リン原子の立体化学が異なる 2 種のジアステレオマー混合物として存在するが、今回これらジアステレオマーは一般的な逆相 HPLC 条件下で分離可能であった。HPLC 分析では、立体化学の同定は困難であるが、その比率は AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 70 : 30$ (ここで、 a は逆相 HPLC において保持時間の短い異性体を、 b は保持時間の長い異性体の割合を示す)、AmNA-mC においては、 $a : b = 74 : 26$ 、また AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ 及び $a : b = 59 : 41$ であった。一方、今回分析を行った AmNA アミダイト体は、いずれも比較的純度が高く今回の逆相 HPLC 分析では、いずれも 96%以上の純度を示した。

2) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分析

AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分析を実施した。逆相 HPLC 分析において確認されたリン原子の立体化学が異なる 2 種のジアステレオマーの存在については、今回の

³¹P-NMR 分析においても明確に検出された。すなわち、各アミダイト体は 150 ppm 付近にジアステレオマー由来の 2 本のシングレットシグナルを与えた。³¹P-NMR のシグナル強度（シグナルの積分値）からその存在比を決定することは一般的ではないが、今回測定を行った 4 種の AmNA アミダイト体について、³¹P-NMR のシグナル積分値から両ジアステレオマーの存在比を算出したところ、AmNA-T アミダイトの場合 a : b = 71 : 29（HPLC では 70 : 30）、AmNA-mC では a : b = 73 : 27（HPLC では 74 : 26）、AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ a : b = 56 : 44（HPLC では 56 : 44）及び a : b = 59 : 41（HPLC では 58 : 42）という結果を与え、いずれも逆相 HPLC 分析での結果と良い一致を示した。

また、今回の ³¹P-NMR 測定において、各アミダイト体に由来する 150 ppm 付近のシグナル以外に、高磁場側に複数のシグナルが観測された。

3) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ¹H-NMR 分析

ほぼ全ての有機化合物にはプロトンが存在するため、¹H-NMR は対象とする化合物の構造同定、特性解析に有力な手法である。しかしながら定量下限の問題から、医薬品並びにその原料の不純物分析には用いられることが少ない。AmNA アミダイト体の ¹H-NMR 測定を行い、その特性解析並びに不純物分析の可否について検証を行った。

今回測定を行った各アミダイト体は、高

磁場側から低磁場側の比較的広い領域に特徴的なシグナルを与えた。特に、3.8ppm 付近に見られる DMTr 基由来の強いシングレットシグナルや 5.5ppm 付近の 1' 位水素原子に由来するシングレットシグナル等が特徴的である。またその他にも、アミド窒素原子上のメチル基や T 又は mC 塩基の 5 位メチル基など、特徴的なシングレットシグナルが観測されている。先述の通り、アミダイト体はジアステレオマー混合物であるため、各シグナルはそれぞれのジアステレオマー存在比に応じた強度で観測されており、比較的複雑なチャートを与えるが、今回の試料のように比較的純度が高い場合には、ほぼ全てのシグナルを帰属することが可能であり、構造同定、特製解析には十分利用可能であると言える。一方で、純度分析という観点からこのチャートを検証した場合、¹H-NMR 測定はアミダイト体の純度を正確に判断する分析法であるとは言い難いことがあらためて確認された。

品質管理戦略の立案

4) 抗 PCSK9 アンチセンスの品質管理戦略

原薬の製造法検討と非臨床安全性試験の実施を同時並行的に実施することを計画し、非臨床試験に用いる被験物質は、分析データを取得した上で製造法の検討中に得られるサンプルを被験物質として用いる可能性を考慮し、GLP 適合試験に供するための暫定的な製造方法及び暫定規格を設定することとした。製造法を改良する場合には、一貫性を損なわない様にするため、目的とす

る化合物以外の不純物の含量や種類が減少する様に行い、特に非臨床安全性試験に用いる原薬では、品質データの比較が可能となるように可能な限り一貫して同じ分析項目及び分析法にて分析を実施することを原則とした。ただし、より良く品質を管理する観点から新たな分析項目を加えたり、分析方法を変更したりする場合、それまでに設定していた項目は省略しないことを原則とし、新たな試験方法から得られるデータを用いることにより、それまで設定していた分析項目や試験の代替が可能であると判断できる場合にのみ、従来の分析項目の省略又は分析方法の変更を行うこととした。また、開発を進めていく上で分析法を改良する場合に新規の分析法による分析を行うことが可能となるように、非臨床安全性試験に用いる原薬については、GLP に定めるところとは別に一部を適切な条件で保存することとした（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。

非げっ歯類を用いた薬効試験

5) カニクイザルを用いた薬効確認試験

カニクイザルを用いた *in vivo* 薬効確認試験では、検疫済みのカニクイザル雌雄計 28 匹を入手し、7 日間の馴化期間終了日にトリグリセリド或は LDL-C の高い動物を 6 匹選別する計画にしていたが、馴化期間終了後の検査において、LDL-C の高い動物が 4 匹（雄 2 匹，雌 2 匹）であったことから、計画を変更し、初回の投与はこの 4 匹を用いて実施することにした（現在、試験実施

中，3月中旬試験終了予定）。

なお、投与量については、計画通りは初回の 1 mg/kg を投与し、現在、検査を実施中である。2 回目以降の投与量については、一般状態観察、体重、摂餌量及び投与後 6 日までの血液生化学検査の結果から薬効或は毒性症状を判断し決定する予定である。

非臨床安全性試験の立案

6) FIH 試験実施のための非臨床安全性試験実施戦略

本研究の被験物質である AmNA 搭載型抗 PCSK9 アンチセンスによる FIH 試験実施のために必要な非臨床安全性試験として、

遺伝毒性試験では、Ames 試験 (GLP 適合) 及び染色体異常試験 (GLP 適合) の 2 試験を、

一般毒性試験では、1 ヶ月間反復投与予備毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに信頼性保証基準に従う）、3 ヶ月間反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに GLP 適合）の計 4 試験を実施することを計画し、それぞれの試験計画の草案を立案した（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。

また、一般毒性試験における TK 測定のために、一般毒性試験の実施に先立ち、ラットあるいはカニクイザルの血清を用いた TK 測定法の試験法移管及びバリデーション（信頼性保証基準）試験を実施することとした（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。現在、試験法を移管し、バリデーション実施に向けたバリデーション試験の試験計画を立案している。

非臨床安全性試験実施

7) マウスにおける毒性検討試験

ヒト肝臓癌由来細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* スクローニングから得られた候補化合物の一般毒性試験のための予備検討として、マウスを用いた毒性検討試験を行うこととした。用量設定については、臨床試験の投与量を 1 mg/kg と想定し、中間用量に 10 mg/kg、高用量には 50 倍量の 50 mg/kg として単回尾静脈投与を行い、7 日後の血液生化学値の測定を行った。候補 3 種のうち HsPCSK9-1771-AM(14) は重度の肝毒性を示し、50 mg/kg は致死量であることが分かった。また、マウスおよびヒトの遺伝子および non-coding RNA (ncRNA) を対象に BLAST を用いてホモロジー検索を行ったところ、マウスにおいて HsPCSK9-1771-AM(14) は細胞内の種々の機能調節に關与する ADP-ribosylation factor に属する ADP-ribosylation factor-like 4C (Arl4c) などのような重要な遺伝子の一部と完全一致する塩基配列を有していた。重度の肝毒性が配列依存的な現象であった場合、HsPCSK9-1771-AM(14) はヒトや本研究の被験動物であるアカゲザルにおいても同遺伝子に一致する配列が含まれていることから、多少の肝毒性が懸念される。また、50 mg/kg の用量で投与した際の ALT 値と細胞実験から得られた IC₅₀ の積をとり、もっとも低い値をとる分子が総合的に優れていると考え、この値から HsPCSK9-1131-AM(14) を開発候補とし、HsPCSK9-1091-AM(14) をバックア

ップとした。なお、HsPCSK9-1131-AM(14) は標的である PCSK9 以外のヒト遺伝子との相同性がもっとも低いことから配列依存的な肝毒性の可能性は低いと考えられる。

TK バリデーシヨンの検討

8) 定量法の構築

核酸医薬は、現在の医薬品で多くを占めている小分子薬と異なり、塩基配列の確認が重要であるため簡便な LC/MS などといった質量分析計による検出が困難である。従って、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay を改良した配列特異的かつ定量的なアンチセンス分子の定量法を構築した。本ハイブリダイゼーション ELISA (HELISA) 法の同時再現性を検証すべく、表 5 に示す各種オリゴ DNA を用意した。アンチセンス分子 (P20B) を段階希釈し、マウス肝臓由来のタンパク質を一定量加え、HELISA 法を用いて、蛍光強度を測定した。サンプル濃度と蛍光強度をそれぞれ対数化し、直線性の高い濃度領域における検量線を作成した。また、同じ理論値のサンプル (n=8) を用いて測定を行い、その結果から真度と精度を求めた。分析測定法において検量線サンプルの真度が 80~120% (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの真度は 75~125%)、検量線サンプルの精度が 20%以下 (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの精度が 25%以下) であることが望ましいとされており、本検討結果は良好であったと言える。

また、HELISA 法の選択性について検証すべく、16 塩基長のアンチセンス分子を基準として 20 および 10 塩基長のものを用意し、検出を行った。結果、濃度の高い領域においてより選択的に 16 塩基長の検出が可能であることが示された。

D. 考案

本研究では、従来の薬剤ではコントロールが困難である重症高コレステロール血症を対象とした、新しい薬剤の開発を目的としている。PCSK9 をターゲットとした、高い効果と安全性を有する薬剤を開発して、薬事申請を目指した治験に橋渡しするための非臨床試験を行うものである。

今回、核酸医薬の製造原料となる AmNA アミダイト体を、逆相 HPLC、 ^{31}P -NMR、 ^1H -NMR により分析した。アミダイト体には、クロモフォアとして核酸塩基や 5' 位の保護基である DMTr 基等が存在するため、紫外吸収により高感度検出が可能である。そのため、逆相 HPLC による分析は高い検出力をもって行うことができ、純度確認においても高い有効性を示すことが確認された。一方で、紫外吸収を示さない不純物の検出には他の分析手法の利用が必要となる。今回は検証を行っていないが、例えば LC-MS のように質量分析を併用する手法はその候補の一つであろう。また、アミダイト体の化学合成過程を鑑みて、リン原子を含む不純物の混入にも注意を払う必要がある。

今回、 ^{31}P -NMR 分析により、逆相 HPLC

分析に匹敵する精度で、各アミダイト体のジアステレオマー比を算出可能であることが示された。今回は、 ^{31}P -NMR の定量下限を精査するには至らなかったため、本法がアミダイト体の純度試験にどの程度利用可能かは十分に検証できていないが、今後純度試験への利用の可否について検討する価値があると考えられる。また、 ^{31}P -NMR では化合物に含まれるリン原子の環境の違いを検出できることから、構造解析において強力な分析手法であることが確認された。

一方で、今回の検討から ^1H -NMR 分析は比較的純度の高いアミダイト体の構造同定、特性解析には有効であるものの、純度試験には適さないことがあらためて確認された。これは、アミダイト体自身に数多くのプロトンが存在することに加えて、アミダイト体がジアステレオマー混合物であることに起因する。

今回の結果から、高度に官能基化され、その構造中にクロモフォアやリン原子を含むアミダイト体の品質管理においては、その構造特性に応じた分析手法を単独であるいは複数組み合わせることが重要であることがわかった。また、今回は詳細な検証に至らなかったが、高純度に精製されたアミダイト体にも含まれる不純物の構造同定を進めることで、核酸医薬の製造における課題を原料の純度という観点から議論することが望まれる。

本研究は、我が国ではこれまでに経験の少ない核酸医薬の非臨床安全性試験を実施するものであり、新規人工核酸を搭載した

核酸医薬の非臨床試験の先駆けでもある。すなわち、今後の核酸医薬開発におけるバックグラウンドデータの蓄積や核酸医薬の非臨床安全性試験の実施例としての技術蓄積にも繋がることから、今後は、本年度作成した試験実施戦略についての検証を進めるため、GLP に適合した試験を実施し、我々が見いだした抗 PCSK9 アンチセンスの臨床試験に向けた準備を行う。核酸医薬の品質管理においても、従来の低分子医薬とは違った課題が考えられている。本研究を進めていくことで、データの蓄積や検証をおこないつつ、我々の抗 PCSK9 アンチセンスの臨床開発に向けた品質管理法を作成していきたい。

さらには、本研究を進めていくことで、非臨床安全性試験や品質管理を行う上で、核酸医薬に特有の課題の抽出や解決法の提案にも繋げることができると期待される。これまでの研究において、高い活性を示す配列の最終候補化合物が決定されており、この最終候補のアンチセンス分子の臨床試験へ橋渡しをするべく、本年度は、本被験物質の非臨床安全性試験の実施に向けた戦略を立案した。

本研究は、我が国ではこれまでに経験の少ない核酸医薬の非臨床安全性試験を実施するものであり、新規人工核酸を搭載した核酸医薬の非臨床試験の先駆けでもある。すなわち、今後の核酸医薬開発におけるバックグラウンドデータの蓄積や核酸医薬の非臨床安全性試験の実施例としての技術蓄積にも繋がることから、今後は、本年度作

成した試験実施戦略についての検証を進めるため、GLP に適合した試験を実施し、我々が見いだした抗 PCSK9 アンチセンスの臨床試験に向けた準備をおこなう所存である。また、核酸医薬の品質管理においても、従来の低分子医薬とは違った課題が考えられている。本研究を進めていくことで、データの蓄積や検証をおこないつつ、我々の抗 PCSK9 アンチセンスの臨床開発に向けた品質管理法を作成していきたい。

さらには、本研究を進めていくことで、非臨床安全性試験や品質管理を行う上で、核酸医薬に特有の課題の抽出や解決法の提案にも繋げることができると期待している。

アンチセンス医薬は、その副作用として肝毒性が問題視されているが、その詳細は明らかになっていない。しかしながら、近年、バイオインフォマティクスを駆使した手法で、アンチセンス分子中の塩基配列で肝毒性を惹起する可能性の高いモチーフが見出されている[Nucleic Acids Res, 42, 8, 2014]。今回の毒性検討試験において、HsPCSK9-1771-AM(14)が重度の肝毒性を示したが、結果で示した配列由来のオフターゲット効果の他に、この配列中には毒性惹起モチーフの一つとされる TCC の配列を含んでいることも一つの原因と考えられる。また、毒性惹起モチーフには TCC の他にも TGC が挙げられているが、開発候補にはこのようなモチーフは含まれていない。

また現在、核酸医薬は上市している薬剤が極めて少ないため、定量法については様々な方法が試みられている。小分子薬の

定量においては検出が簡便である質量分析計を用いるのが一般的であるが、核酸医薬などのような活性が配列に依存するような薬剤の定量は困難である。一方で、同じように配列依存的な活性が特徴であるペプチド製剤などについては、現在、質量分析計を用いた手法が最適化されつつあり、核酸医薬も将来的には質量分析計を用いた簡便な定量法が開発されるかもしれない。本研究では、検出過程が多少煩雑である一方で、検出下限が小さく、選択性が高い ELISA 法を改良した HELISA 法を構築し、真度および精度ともに良好な結果が得られている。この結果から、開発候補の定量法にも本手法を採用するとして、開発候補を選択的に検出 DNA プローブを作成した。

E. 結論

アンチセンス分子の臨床試験に橋渡しをするための非臨床安全性試験の実施戦略を作成するとともに、臨床応用を見据えた品質管理法の戦略を立案した。品質保証に関しては、逆相 HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMR による分析を実施し、それぞれの分析手法の有効性、適用範囲等について検証を行った。定量法の構築や、安全性の担保できる開発候補を選定し、現在は、非げっ歯類としてアカゲザルへの投与実験を遂行している。定量法に関しては HELISA 法の構築と定量法としての評価を行い、良好な結果が得られたことから、GLP 施設への技術移管を実施している。

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。

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・
治験推進研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

**PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に
橋渡しするための非臨床試験
-臨床試験を開始するための非臨床安全性試験-**

担当責任者

小林直之 大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター・特任准教授

研究要旨

家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体（FH）の薬物療法に用いられているスタチンでは、プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシニン9型（PCSK9）によるフィードバック機構が働くことにより、血中のLDLコレステロール値を十分に低下させることが出来ない。そこで我々はこのPCSK9を創薬ターゲットとして、新規人工核酸「AmNA」を搭載した抗PCSK9アンチセンスを見出した。本研究では、この抗PCSK9アンチセンスの臨床試験に橋渡しするための非臨床安全性試験及びそれに伴う原薬の品質管理の実施を目的として、本年度は、それら試験の実施戦略を作成するとともに、各試験の試験計画を立案した。この試験戦略に沿って非臨床安全性試験を遂行していくことで、本研究の被験物質である抗PCSK9アンチセンスの臨床試験実施への道筋が示され、核酸医薬の臨床開発の実施例となることが示された。

なお、試験戦略を作成するにあたっては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構がおこなう薬事戦略相談を受けてきている。

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

吉田 晶子

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀 聡

橘 敬祐

山本 剛

A. 研究目的

現在家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体 (FH) においては、スタチンの投薬による治療が主流であるが、血中の LDL-コレステロール (LDL-C) を十分に下げることが出来ないケースが多い。このことは、スタチンの薬効が、コレステロールの生合成経路にあるメバロン酸経路に関与しているヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMGCoA) 還元酵素を阻害することでコレステロール量を低下させる。しかしながら、肝臓内のコレステロール量の低下に伴い、LDL 受容体の分解に関与しているプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン 9 型 (PCSK9) が増加することで、コレステロール量が上昇するというフィードバック経路が同時に働くことがその要因の一つであると考えられている。

そこで我々は、この PCSK9 をターゲットとした核酸医薬による FH 治療薬の創薬研究を推進してきており、これまでに臨床開発候補化合物の絞り込みに成功している。

本研究では、絞り込まれた候補化合物によるヒト初回投与試験 (FIH) を可能とするための非臨床安全性試験の実施と評価を目的として、本年度は、品質管理戦略及び非臨床動態試験を含む非臨床安全性試験の実施戦略及び試験計画を立案するとともに、これまでに我々が開発した血中薬物濃度測定法を優良試験所規範 (GLP) に適合したトキシコキネティクス (TK) 測定法として利用するべく、バリデーション実施のための技術移転を目指した。

B. 研究方法

1. 非臨床安全性試験全体の実施戦略

目標とする臨床の前期第 相試験 (P a) の試験デザインの概要を基に、FIH となる臨床第 相試験 (P) の試験デザインを作成した。次いで、日米 EU 医薬品規制調和国際会議で合意されたガイドライン (ICH ガイドライン) 等を参照して、治験薬の品質管理、薬効確認試験、非臨床動態試験 (ADME) 並びに GLP 適合を必要とする安全性薬理試験、遺伝毒性試験及び一般毒性試験について、それぞれの試験デザインと実施スケジュールを策定した。なお、実施戦略の立案にあたっては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) が行っている薬事戦略相談を受けることとした。

2. 品質管理戦略

開発の初期段階であることから、原薬や製剤の製造法の改良が行われることを念頭に、非臨床試験に供する原薬から治験薬、

ひいては臨床応用に至までの品質の一貫性担保を特に意識した管理方法を作成した。また、非臨床試験に用いられる原薬の特性試験における試験項目を設定した。さらに、これから蓄積していく特性試験の結果や原薬の暫定製造法等で得られるサンプルの分析データに非臨床試験の結果を加えることで治験薬の暫定規格を設定する計画を作成した。

3. 薬効確認試験

試験動物には、本被験物質のターゲット遺伝子がヒトと同じ配列を有するカニクイザルを選択し、2～6歳の雌雄計28匹(馴化開始時：2.0～6.0kg)を用意し、馴化終了日(馴化期間：7日)に、トリグリセリド(TG)あるいはLDL-Cの高い動物を選別し、試験に供給した。試験期間中の観察は、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査[アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、総コレステロール、TG、及びLDL-C]を設定した。投与は1週間に1回とし、初回の投与後のTG又はLDL-Cの変化を指標として、2回目以降の投与量を決定する漸増法として実施することとした。なお、投与方法は予定している臨床投与経路にあわせて皮下投与とした。

4. 遺伝毒性試験

ICHガイドラインS2に従って、FIHまでにバクテリアを用いた復帰突然変異試験(Ames試験)及びほ乳類培養細胞を用いた

染色体異常試験の二つの*in vitro*試験をおこなうことを計画し、いずれかの試験において、陽性の結果または陽性が疑われる結果が得られた場合、FIHの開始までに、*in vivo*遺伝毒性試験であるげっ歯類を用いた小核試験を実施することとした。

5. 一般毒性試験及び安全性薬理試験

FIHの開始に必要とされている安全性薬理試験のコアバッテリー(中枢神経系、心血管系および呼吸器系への影響試験)は、動物愛護の観点も考慮し、検査項目に追加することにより、一般毒性試験に組み込んで評価する計画とした。具体的には、中枢神経系への影響は、げっ歯類を用いた毒性試験において、Irwinの変法による観察を、呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響は、非げっ歯類を用いた毒性試験において、血液ガスや呼吸数の計測、ホルター心電図を用いた検査を組み込むことで実施する計画とした。

一般毒性試験では2種の動物種を用いるが、げっ歯類では、使用する動物数の削減や検査可能な項目を考慮して、ラットを選択した。また、本被験物質のターゲット遺伝子であるPCSK9の遺伝子配列がヒトと同じである動物を使うことにより、本被験物質によるオンターゲット効果による影響を観察することが可能とすることから、非げっ歯類ではカニクイザルを選択した。

さらに、GLP適合試験の実施に先立ち、予備毒性試験を実施することで、群数及び投与

量、さらには検査項目の最終的な決定を行うこととした。

6. TK測定法の確立

これまでの研究において、我々が開発したELISA法による生体内のアンチセンス分子の濃度測定法をGLPに適合した試験において実施するために、GLP適合施設に対して、移管を行った後、バリデーションを実施するものとした。

7. 非臨床動態試験

ICHガイドラインM3に従って、非臨床動態試験のうち、FIHの開始に必要な動態試験、*in vitro*代謝試験及び*in vitro*タンパク結合試験の実施スケジュールを立案した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、試験委託施設である株式会社新日本科学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するものとした。

また、試験戦略および試験計画立案に際しても、代替法の考慮、動物数の削減、動物への負担の軽減を考慮した。

C. 研究結果

1. 抗PCSK9アンチセンスの品質管理戦略

原薬の製造法検討と非臨床安全性試験の実施を同時並行的に実施することを計画し、非臨床試験に用いる被験物質は、分析データを取得した上で製造法の検討中に得られるサンプルを被験物質として用いる可能性

を考慮し、GLP適合試験に供するための暫定的な製造方法及び暫定規格を設定することとした。

製造法を改良する場合には、一貫性を損なわない様にするため、目的とする化合物以外の不純物の含量や種類が減少する様に行い、特に非臨床安全性試験に用いる原薬では、品質データの比較が可能となるように可能な限り一貫して同じ分析項目及び分析法にて分析を実施することを原則とした。ただし、より良く品質を管理する観点から新たな分析項目を加えたり、分析方法を変更したりする場合、それまでに設定していた項目は省略しないことを原則とし、新たな試験方法から得られるデータを用いることにより、それまで設定していた分析項目や試験の代替が可能であると判断できる場合にのみ、従来の分析項目の省略又は分析方法の変更を行うこととした。また、開発を進めていく上で分析法を改良する場合に新規の分析法による分析を行うことが可能となるように、非臨床安全性試験に用いる原薬については、GLPに定めるところとは別に一部を適切な条件で保存することとした(別添 薬事戦略相談対面助言資料参照)。

2. カニクイザルを用いた薬効確認試験

カニクイザルを用いた*in vivo*薬効確認試験では、検疫済みのカニクイザル雌雄計28匹を入手し、7日間の馴化期間終了日にトリグリセリド或はLDL-Cの高い動物を6匹選別する計画にしていたが、馴化期間終了後の検査において、LDL-Cの高い動物が4匹(雄2

匹，雌2匹）であったことから、計画を変更し、初回の投与はこの4匹を用いて実施することにした（現在、試験実施中，3月中旬試験終了予定）。

なお、投与量については、計画通りは初回の1 mg/kgを投与し、現在、検査を実施中である。2回目以降の投与量については、一般状態観察、体重、摂餌量及び投与後6日までの血液生化学検査の結果から薬効或は毒性症状を判断し決定する予定である。

3. FIH 試験実施のための非臨床安全性試験実施戦略

本研究の被験物質である AmNA 搭載型抗 PCSK9 アンチセンスによる FIH 試験実施のために必要な非臨床安全性試験として、遺伝毒性試験では、Ames 試験（GLP 適合）及び染色体異常試験（GLP 適合）の2試験を、

一般毒性試験では、1ヶ月間反復投与予備毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに信頼性保証基準に従う）、3ヶ月間反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに GLP 適合）の計4試験を実施することを計画し、それぞれの試験計画の草案を立案した（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。

また、一般毒性試験における TK 測定のために、一般毒性試験の実施に先立ち、ラットあるいはカニクイザルの血清を用いた TK 測定法の試験法移管及びバリデーション（信頼性保証基準）試験を実施することとした（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。現在、試験法を移管し、バリデー

ション実施に向けたバリデーション試験の試験計画を立案している。

D. 考案

本研究では、優れたFH治療薬の臨床応用を目指し、PCSK9を標的とした安全で特異性の極めて高いAmNA搭載型のアンチセンス分子の医薬品開発を進めている。これまでの研究において、高活性な配列を有する開発の最終候補化合物が決定されており、この最終候補のアンチセンス分子の臨床試験へ橋渡しをするべく、本年度は、本被験物質の非臨床安全性試験の実施に向けた戦略を立案した。

本研究は、我が国ではこれまでに経験の少ない核酸医薬の非臨床安全性試験を実施するものであり、新規人工核酸を搭載した核酸医薬の非臨床試験の先駆けでもある。すなわち、今後の核酸医薬開発におけるバックグラウンドデータの蓄積や核酸医薬の非臨床安全性試験の実施例としての技術蓄積にも繋がることから、今後は、本年度作成した試験実施戦略についての検証を進めるため、GLPに適合した試験を実施し、我々が見いだした抗PCSK9アンチセンスの臨床試験に向けた準備をおこなう所存である。また、核酸医薬の品質管理においても、従来の低分子医薬とは違った課題が考えられている。本研究を進めていくことで、データの蓄積や検証をおこないつつ、我々の抗PCSK9アンチセンスの臨床開発に向けた品質管理法を作成していきたい。

さらには、本研究を進めていくことで、非臨床安全性試験や品質管理を行う上で、核酸医薬に特有の課題の抽出や解決法の提案にも繋げることができると期待している。

E. 結論

本年度は、アンチセンス分子の臨床試験に橋渡しをするための非臨床安全性試験の実施戦略を作成するとともに、臨床応用を見据えた品質管理法の戦略を立案し、これらを実施することが、世界的にも数少ない核酸医薬の医薬品開発の一例となり、データの蓄積となることを示した。

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

知的所有権の出願・取得状況

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化研究事業（臨床研究・治験
推進研究事業））

委託業務成果報告（業務項目）

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に
橋渡しするための非臨床試験

品質保証に関わる検討

担当責任者

小比賀 聡 大阪大学薬学研究科附属創薬センター・教授

研究要旨

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に橋渡しするための非臨床試験を着実に遂行するために、分担機関である大阪大学薬学研究科では、1) 核酸医薬の原薬となる人工核酸搭載型オリゴヌクレオチドの製造における原料（アミダイト体）の品質を検証するために、逆相 HPLC、 ^{31}P -NMR、 ^1H -NMR による分析を実施し、各分析手法の Scope と Limitation について精査を行った。その結果、逆相 HPLC では定量分析、純度解析に、一方、 ^1H -NMR では特性解析に適することが確認された。また、 ^{31}P -NMR は特性解析に加え純度解析への応用にも期待が持てることが見出された。

研究協力者

大阪大学薬学研究科

小林 直之

山本 剛史

橋 敬祐

A. 研究目的

一般に核酸医薬の原薬となるオリゴヌクレオチドは、DNA 自動合成装置を用いた固相合成により調製される。従来の低分子医薬品で主に用いられている液相合成とは異なり、固相合成では厳密に制御された化学反応を繰り返し行うことでオリゴヌクレオチドやペプチドのようにモノマー（オリゴヌクレオチドの場合はヌクレオチドモノマー、ペプチドの場合はアミノ酸モノマー）を決められた配列通り合成することが可能であり、自動化に対応しやすく、比較的簡便に目的とする中～長鎖の生成物を得ることができるという利点を有する。特に、オリゴヌクレオチドの固相合成においては、ホスホロアミダイト法と呼ばれる成熟した化学合成法が利用でき、比較的純度の高いオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。一方で、繰り返し行われる化学反応サイクルの過程においては基本的に精製工程が含まれないことから、医薬品の原薬としてオリゴヌクレオチドを捉えた場合に、その品質担保は極めて重要であり、とりわけ、DNA 自動合成に用いる原料(アミダイト体)の品質には一定の注意を払う必要が有ることとは言うまでもない。

そこで、今年度は原薬製造における重要な検討項目の一つであるアミダイト体の品質評価に関して、各種の分析手法を利用して精査を行うこととした。

B. 研究方法

今回、原薬製造の原料となるアミダイト体の品質を評価するために、1) 逆相 HPLC、2) ^{31}P -NMR、3) ^1H -NMR の各手法を用い分析を実施した。対象とした原料は原薬となるオリゴヌクレオチドに搭載されている人工核酸 AmNA アミダイトであり、これらは国内化学メーカーにより受託合成されたものである。また、AmNA アミダイトの分析は株式会社ジーンデザインの協力のもと実施した。

1) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

今回のオリゴヌクレオチド原薬には、AmNA と呼ばれる架橋型人工核酸が搭載される。核酸のアミダイト体には紫外吸収のクロモフォアとなる核酸塩基が含まれるため、一般に 260 nm の紫外吸収を測定することでその検出が可能である。そこで、これら AmNA のアミダイト体(A, G, C, T の 4 種)について、紫外吸収 (260 nm) を指標とした逆相 HPLC による分析を実施し、その純度を評価した。

2) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分析

アミダイト体合成の最終段階では、基質となるヌクレオシド体の 3' 位水酸基への亜リン酸化が施され、その後クロマト等による精製が行われる。そのため、アミダイト

体に含まれる不純物として各種のリン誘導体が想定される。またアミダイト体自身には3個のリン原子が含まれること、そのリン原子の立体化学は制御されないことから、一般に³¹P-NMR測定により、その構造の特定、純度の評価が可能となる。そこで、各AmNAアミダイト体について³¹P-NMR測定を実施し、その構造並びに純度情報を収集した。

3)人工核酸AmNAアミダイト体の¹H-NMR分析

上述の通り、アミダイト体には3個のリン原子が含まれることから³¹P-NMR分析は非常に強力な分析手法である。しかし、リン原子を含まない不純物の確認に³¹P-NMRは非力である。そこで、一般的な有機化合物の分析に広く用いられている¹H-NMR測定を行い、リン原子を含まない夾雑物の検出の可否について検討を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1)人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

AmNA アミダイト体の純度を精査するために、逆相 HPLC による分析を実施した(図 1-a~h)。アミダイト体はその化学構造上、リン原子の立体化学が異なる2種のジアステレオマー混合物として存在するが、今回これらジアステレオマーは一般的な

逆相 HPLC 条件下で分離可能であった。HPLC 分析では、立体化学の同定は困難であるが、その比率は AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 70 : 30$ (ここで、 a は逆相 HPLC において保持時間の短い異性体を、 b は保持時間の長い異性体の割合を示す)、AmNA-mC においては、 $a : b = 74 : 26$ 、また AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ 及び $a : b = 59 : 41$ であった。なお、ここでそれぞれの割合については、260 nm の紫外吸収を指標とした面積百分率より算出している。一方、今回分析を行った AmNA アミダイト体は、いずれも比較的純度が高く今回の逆相 HPLC 分析では、いずれも 96%以上の純度(両ジアステレオマーを合算して算出)を示した。上述の通り、本分析においては 260 nm における紫外吸収を指標とした際の各ピーク面積を基準に異性体の生成比並びに純度の算出を行っている。異性体比については両異性体間でモル吸光係数に違いがないと考えられることから、正確な比率を算出できているものと判断できるが、一方で純度評価に関しては、260 nm における紫外吸収を示す化合物(目的化合物であるアミダイト体及びその他不純物)のみが検出対象となる。すなわち、クロモフォアを含まない不純物については評価対象外となる点には留意が必要である。

2)人工核酸 AmNA アミダイト体の ³¹P-NMR 分析

次に、AmNA アミダイト体の ³¹P-NMR 分

析を実施した(図 2-a~d)。逆相 HPLC 分析において確認されたリン原子の立体化学が異なる 2 種のジアステレオマーの存在については、今回の ^{31}P -NMR 分析においても明確に検出された。すなわち、各アミダイト体は 150ppm 付近にジアステレオマー由来の 2 本のシングレットシグナルを与えた。 ^{31}P -NMR のシグナル強度(シグナルの積分値)からその存在比を決定することは一般的ではないが、今回測定を行った 4 種の AmNA アミダイト体について、 ^{31}P -NMR のシグナル積分値から両ジアステレオマーの存在比を算出したところ、AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 71 : 29$ (HPLC では $70 : 30$)、AmNA-mC では $a : b = 73 : 27$ (HPLC では $74 : 26$)、AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ (HPLC では $56 : 44$) 及び $a : b = 59 : 41$ (HPLC では $58 : 42$) という結果を与え、いずれも逆相 HPLC 分析での結果と良い一致を示した。

また、今回の ^{31}P -NMR 測定において、各アミダイト体に由来する 150 ppm 付近のシグナル以外に、高磁場側に複数のシグナルが観測されている(図 2-e,f)。これらシグナルがどのような構造の不純物に由来するものかは現時点で同定できていないが、いずれのシグナルもそのケミカルシフト値が目的とするアミダイト体と大きくずれていることから、リン原子近傍の化学構造に比較的大きな変化があるものと推察される。

3) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^1H -NMR

分析

ほぼ全ての有機化合物にはプロトンが存在するため、 ^1H -NMRは対象とする化合物の構造同定、特性解析に有力な手法である。しかしながら定量下限の問題から、医薬品並びにその原料の不純物分析には用いられることが少ない。ここでは、AmNAアミダイト体の ^1H -NMR測定を行い、その特性解析並びに不純物分析の可否について検証を行った(図3-a~d)。

今回測定を行った各アミダイト体は、高磁場側から低磁場側の比較的広い領域に特徴的なシグナルを与えた。特に、3.8 ppm付近に見られるDMTr基由来の強いシングレットシグナルや5.5 ppm付近の1'位水素原子に由来するシングレットシグナル等が特徴的である。またその他にも、アミド窒素原子上のメチル基やT又はmC塩基の5位メチル基など、特徴的なシングレットシグナルが観測されている。先述の通り、アミダイト体はジアステレオマー混合物であるため、各シグナルはそれぞれのジアステレオマー存在比に応じた強度で観測されており、比較的複雑なチャートを与えるが、今回の試料のように比較的純度が高い場合には、ほぼ全てのシグナルを帰属することが可能であり、構造同定、特製解析には十分利用可能であると言える。一方で、純度分析という観点からこのチャートを検証した場合、 ^1H -NMR測定はアミダイト体の純度を正確に判断する分析法であるとは言い難いことがあらためて確認された。

D. 考案

I. 各AmNAアミダイト体の品質管理に向けた分析手法について

今回、核酸医薬の製造原料となるAmNAアミダイト体を、逆相HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMRにより分析した。アミダイト体には、クロモフォアとして核酸塩基や5'位の保護基であるDMTr基等が存在するため、紫外吸収により高感度検出が可能である。そのため、逆相HPLCによる分析は高い検出力をもって行うことができ、純度確認においても高い有効性を示すことが確認された。一方で、紫外吸収を示さない不純物の検出には他の分析手法の利用が必要となる。今回は検証を行っていないが、例えばLC-MSのように質量分析を併用する手法はその候補の一つであろう。また、アミダイト体の化学合成過程を鑑みて、リン原子を含む不純物の混入にも注意を払う必要がある。

今回、³¹P-NMR分析により、逆相HPLC分析に匹敵する精度で、各アミダイト体のジアステレオマー比を算出可能であることが示された。今回は、³¹P-NMRの定量下限を精査するには至らなかったため、本法がアミダイト体の純度試験にどの程度利用可能かは十分に検証できていないが、今後純度試験への利用の可否について検討する価値があると考えられる。また、³¹P-NMRでは化合物に含まれるリン原子の環境の違い（リンの酸化状態、リン原子に結合した原子種等）を検出できることから、構造解析において強力な分析手法であることが確認された。

一方で、今回の検討から¹H-NMR分析は比較的純度の高いアミダイト体の構造同定、特性解析には有効であるものの、純度試験には適さないことがあらためて確認された。これは、アミダイト体自身に数多くのプロトンが存在することに加えて、アミダイト体がジアステレオマー混合物であることに起因する。

今回の結果から、高度に官能基化され、その構造中にクロモフォアやリン原子を含むアミダイト体の品質管理においては、その構造特性に応じた分析手法を単独であるいは複数組み合わせることが重要であることがわかる。また、今回は詳細な検証に至らなかったが、高純度に精製されたアミダイト体にも含まれる不純物の構造同定を進めることで、核酸医薬の製造における課題を原料の純度という観点から議論することが望まれる。

E. 結論

本研究では、我々が検討を進めているPCSK9をターゲットとした核酸医薬の原薬となる人工核酸AmNA搭載型オリゴヌクレオチドの製造原料（アミダイト体）の品質を検証するために、逆相HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMRによる分析を実施し、それぞれの分析手法の有効性、適用範囲等について検証を行った。今回得られた知見に加えて、アミダイト体に含まれる不純物の構造同定が今後進むことによって、核酸医薬製造における

種々の課題を原料の純度という観点から議論することが可能になるものと考えられる。

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.

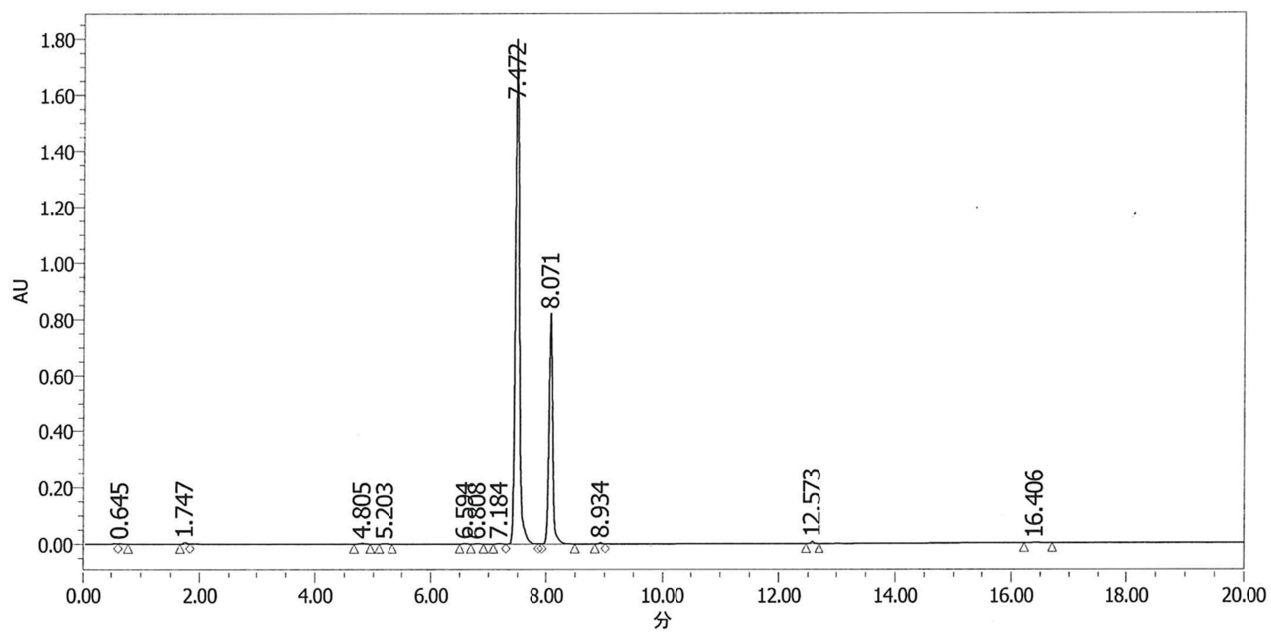


図 1-a. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析

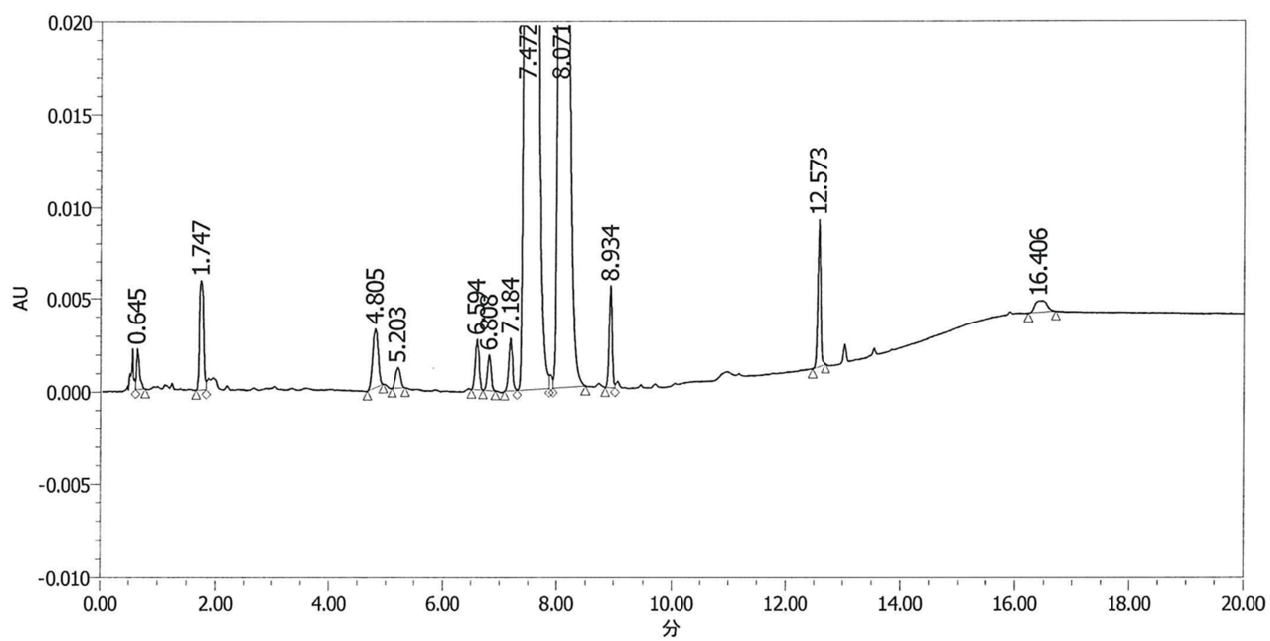


図 1-b. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

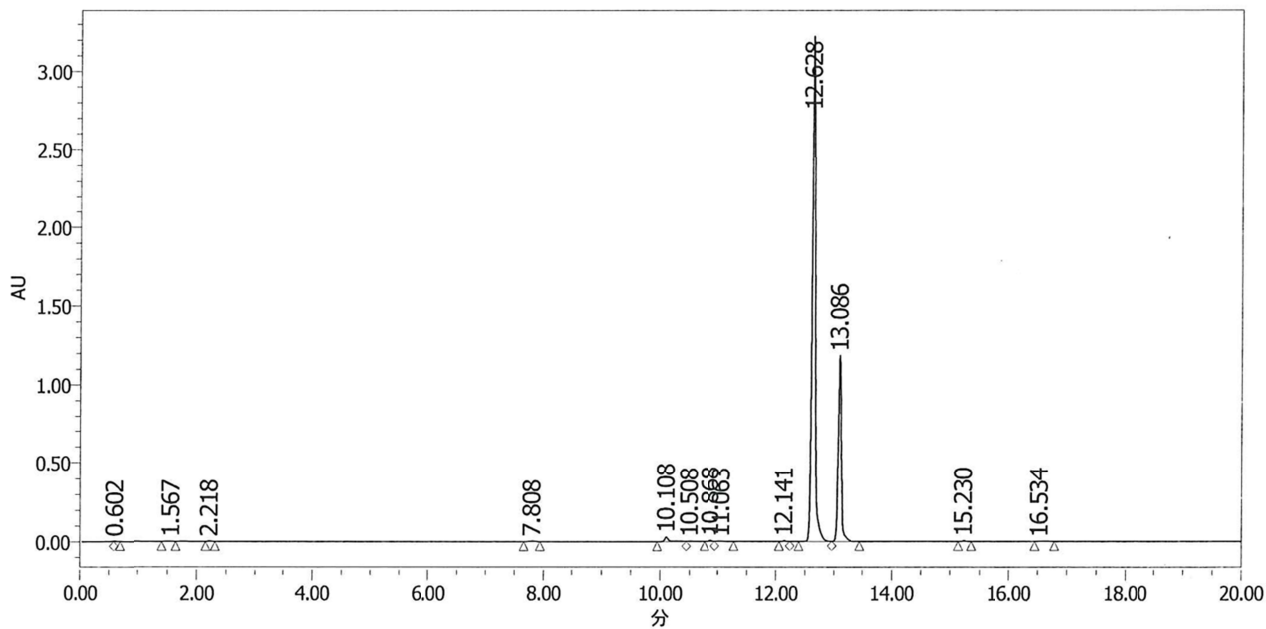


図 1-c. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析

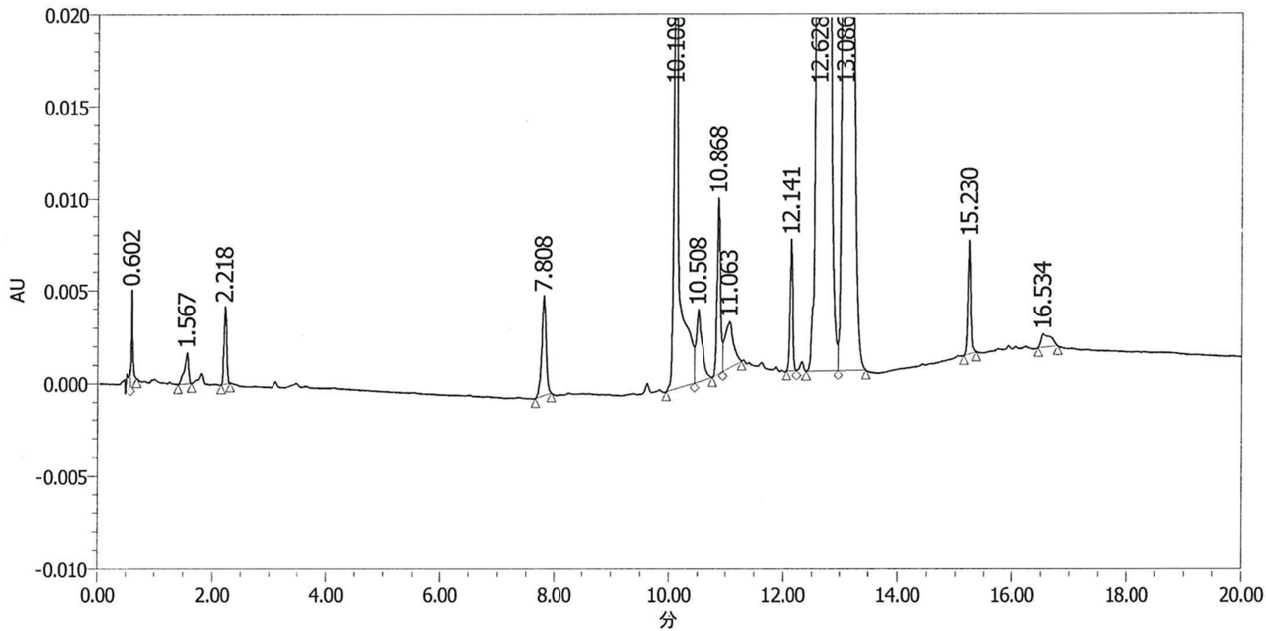


図 1-d. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

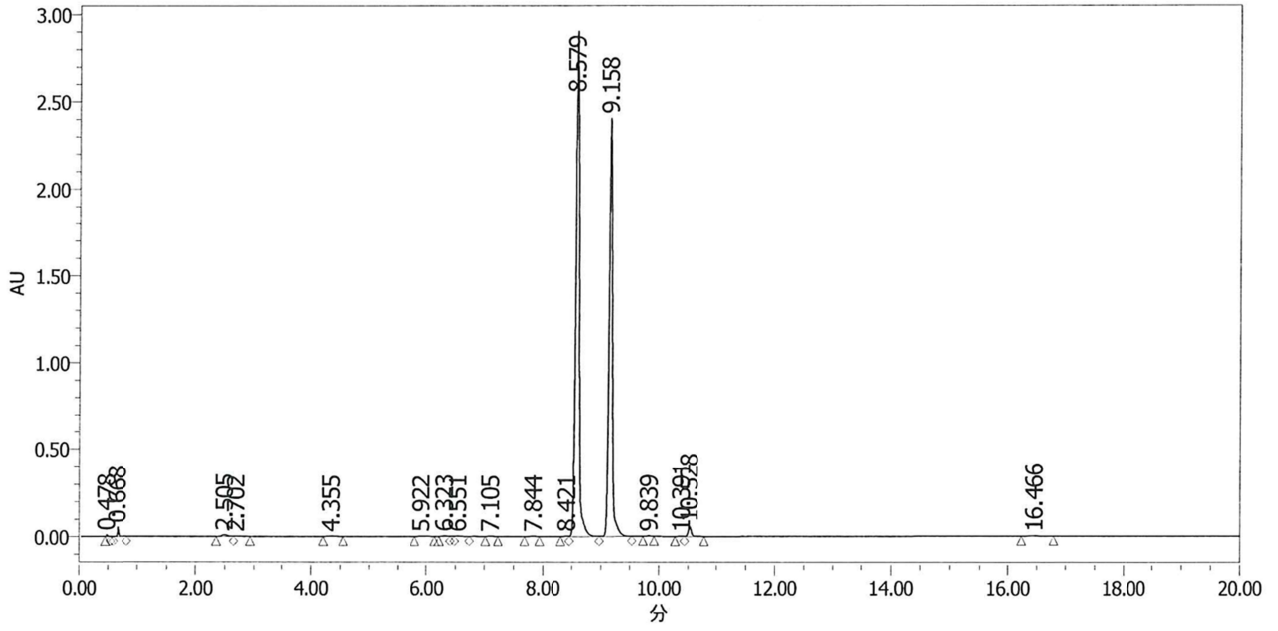


図 1-e. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析

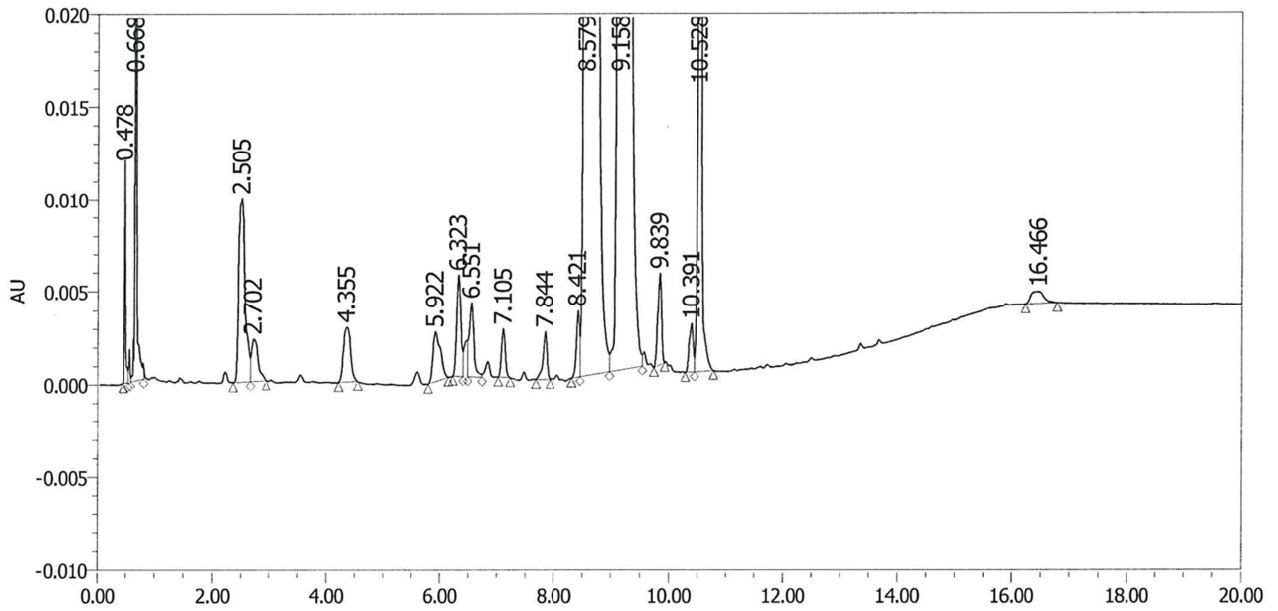


図 1-f. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

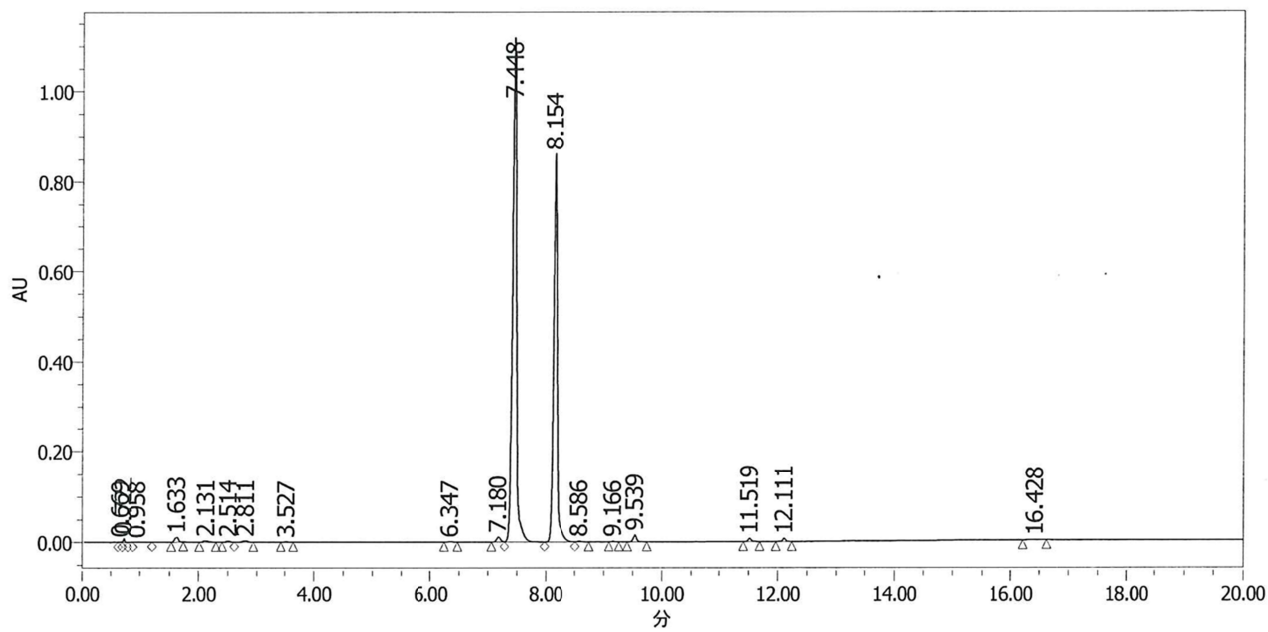


図 1-g. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析

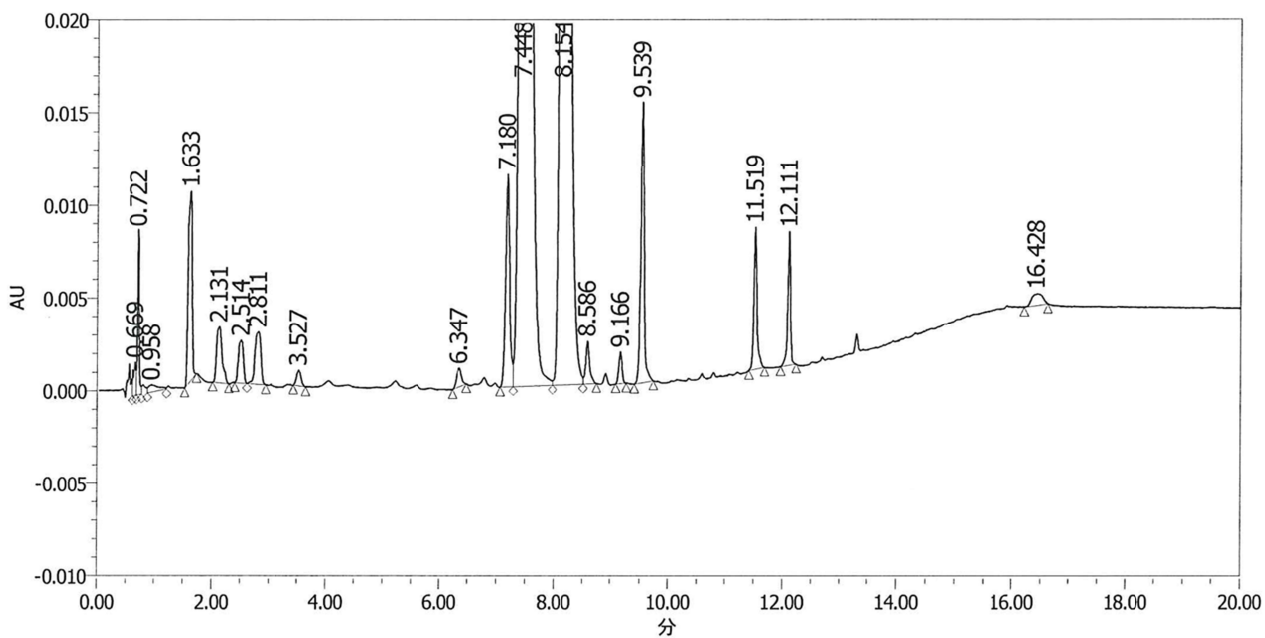


図 1-h. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

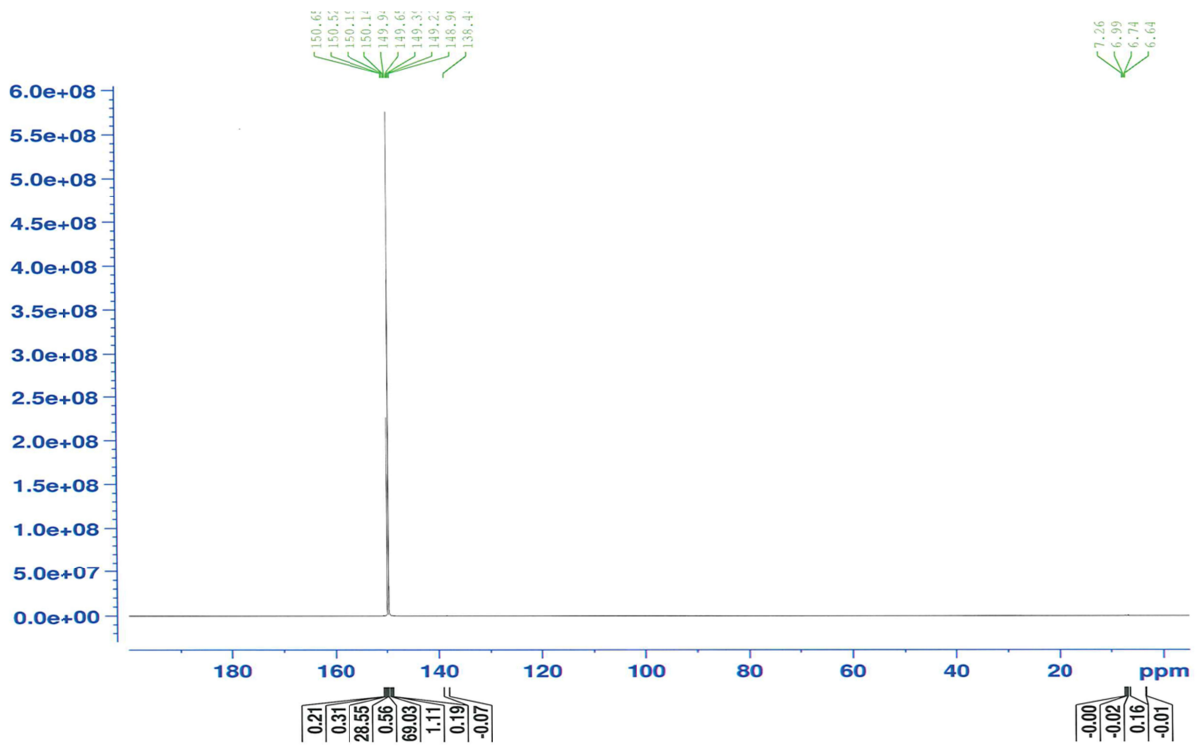


図 2-a. AmNA-T アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

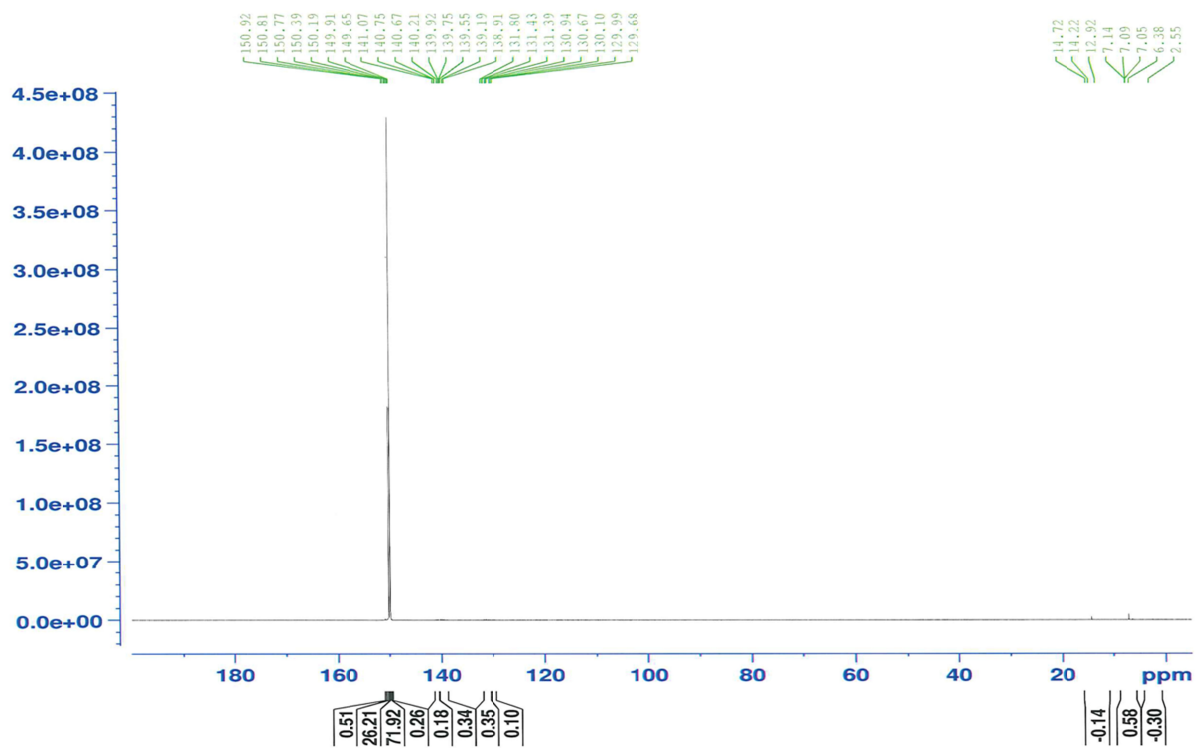


図 2-b. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

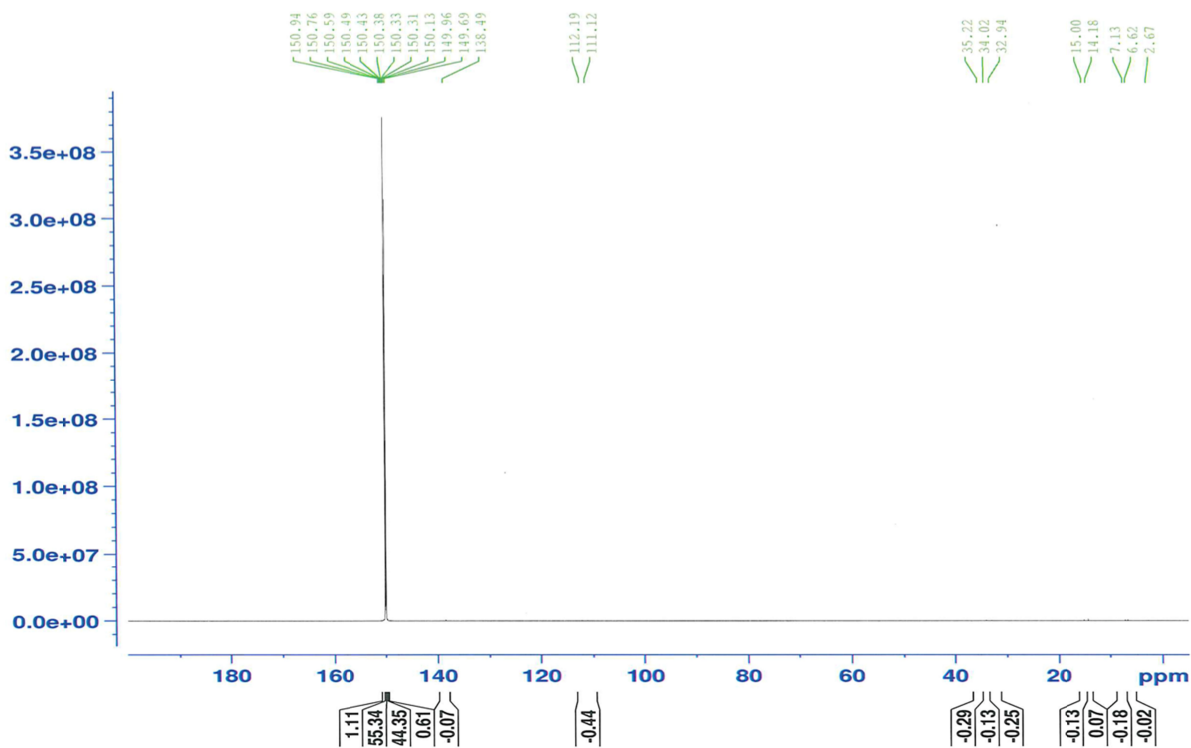


図 2-c. AmNA-A アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

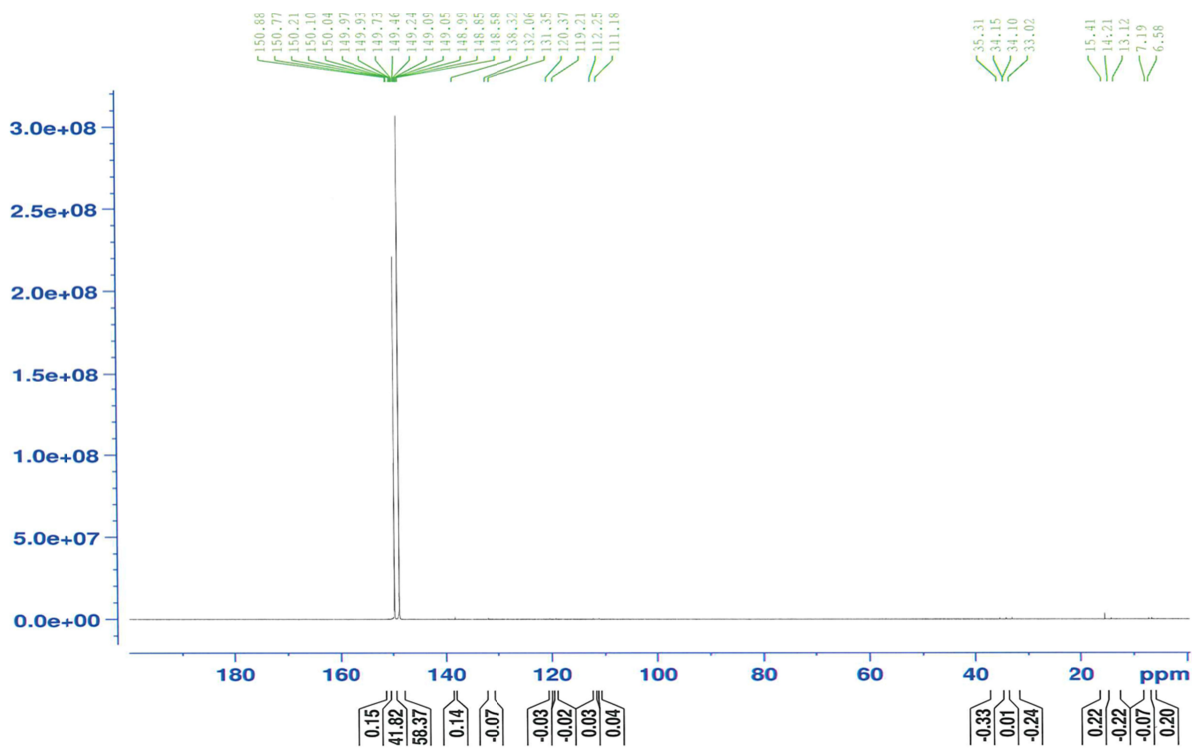


図 2-d. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

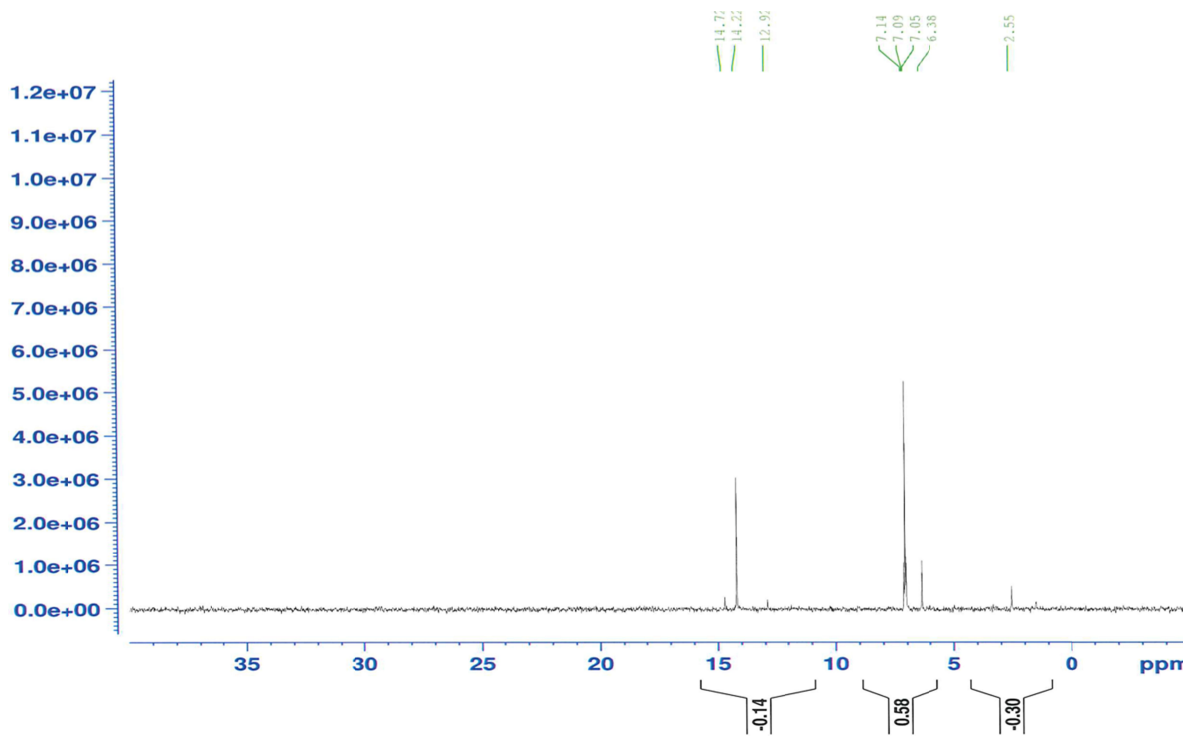


図 2-e. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

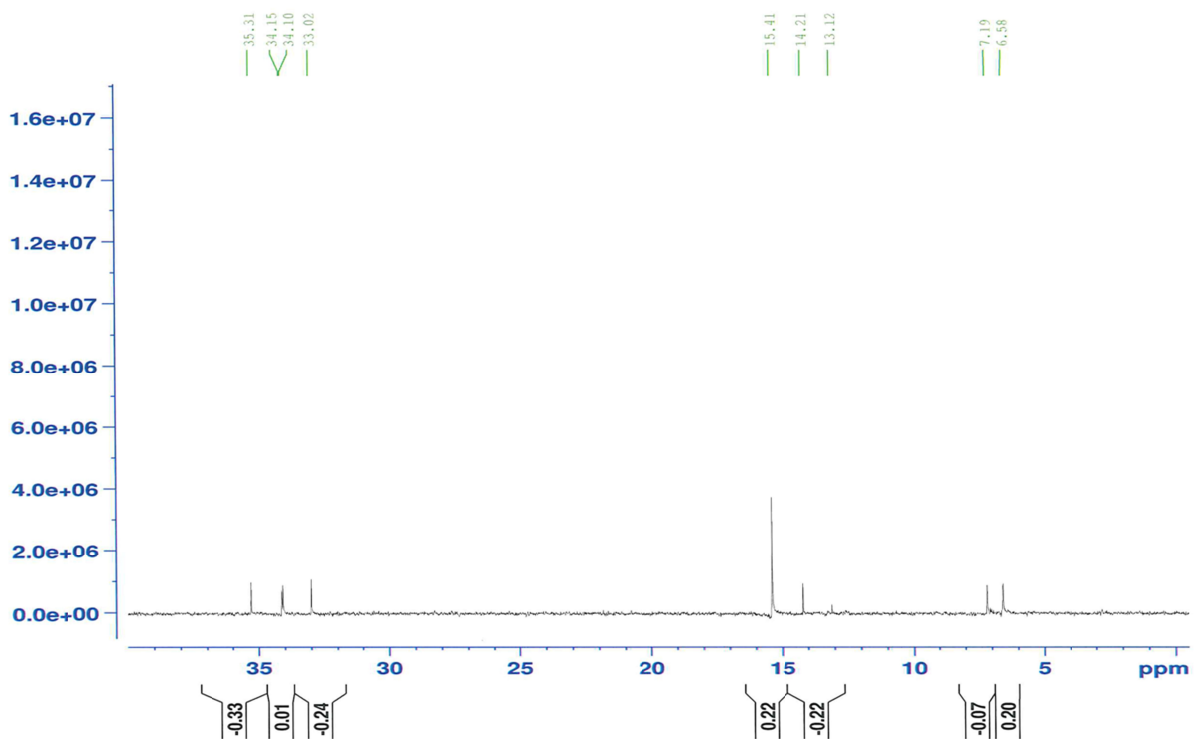


図 2-f. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

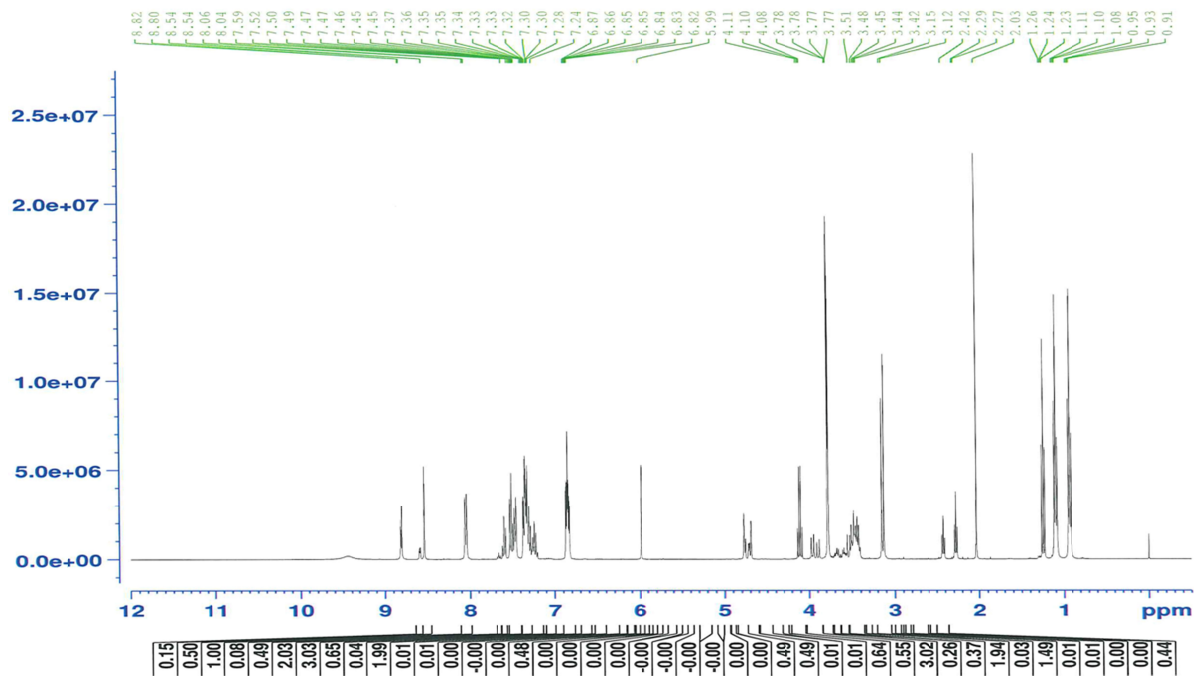


図 3-c. AmNA-A アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

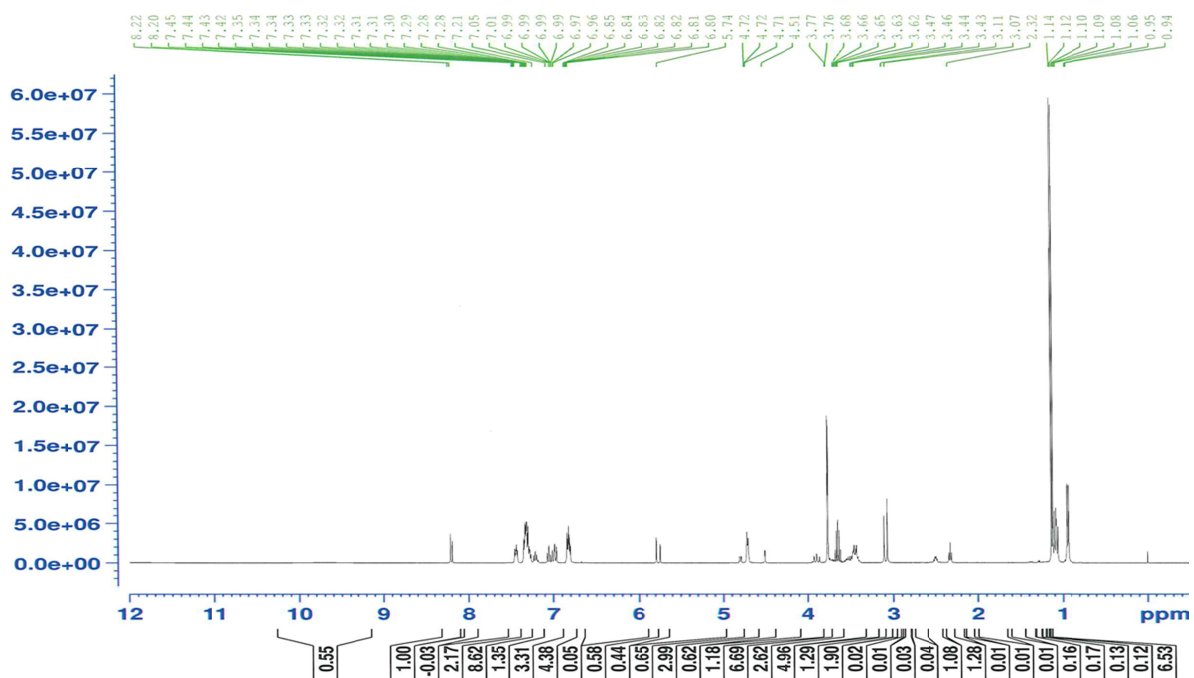


図 3-d. AmNA-G アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

厚生労働科学研究委託費 (医療技術実用化研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))
委託業務成果報告(業務項目)

PCSK9 標的型アンチセンスの臨床試験へ向けたヒト初回投与量の検討

- げっ歯類における毒性検討試験および分析法のバリデーション -

担当責任者 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

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)は LDL 受容体の分解活性を有し、この遺伝子の機能獲得型変異は血中 LDL-C 値が高値を示し、家族性高コレステロール血症 (FH) の原因の一つであることが明らかとなっている。また、FH 患者などの重症高コレステロール血症では若年性冠動脈疾患 (CAD) の予防のためにスタチン等の脂質低下薬により LDL-C をコントロールしているが、これらの薬剤は LDL-C を一定程度低下させる一方で、PCSK9 の発現を上昇させるために薬剤効果が十分ではなく、イベントを何度も引き起こす例が少なくない。これまでに我々は、PCSK9 を標的としたアンチセンス医薬の開発を進めてきており、PCSK9 阻害薬の概念の実証およびアンチセンス分子の最適化において成果をあげている。本研究では、得られた PCSK9 標的型アンチセンス分子の臨床化に向けて非臨床試験を行うことを目的としている。初年度である本年度は、計画通り、げっ歯類による毒性検討試験および分析法のバリデーションを実施した。臨床試験の投与量を 1 mg/kg と想定し、中間用量に 10 mg/kg、高用量には 50 倍量の 50 mg/kg としてマウスに対して単回尾静脈投与をした。アンチセンス医薬で最も懸念されている肝毒性についての評価を行い、細胞実験から算出された IC50 と高用量における ALT の値から、三種の候補のうち 1 種の開発候補および 1 種のバックアップを選定した。また、分析法に関しては、開発候補を高感度で検出可能なハイブリダイゼーション ELISA 法の構築を構築し、バリデーションを実施した。現在、GLP 施設への試験法移管を行っている。

次年度では、本年度得られたデータをもとに試験計画を立案し、一般毒性試験の急性毒性試験を 2 種の動物種を用いて実施する。

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 泰正
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

本邦において動脈硬化が原因となる脳心血管疾患死は、悪性新生物に続いて多く、全体の4分の1を占める。動脈硬化の予防には、そのリスクをコントロールすることに主眼が置かれている。スタチンの登場は、冠動脈疾患の予防において革命的なものであり、世界中の公衆衛生に貢献してきた。ストロングスタチンの開発により、特に動脈硬化のリスクが高いことで知られている家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体に対しても、冠動脈疾患の予防に効果を示す報告がなされている。一方、家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体はスタチンやその他の脂質低下薬を併用しても、ターゲットとされているLDL-C値に到達で

きない例も少なくない。また、スタチンはその主な作用は細胞内でコレステロール合成を抑制し、転写因子である SREBP2 を活性化して最終的にLDL受容体を活性化することによりLDL-Cの低下活性を示す一方で、LDL受容体の分解活性を有する Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)の発現を上昇させてしまうため、FHホモ接合体に対しての効果は極めて少ない。PCSK9の機能獲得型変異は、家族性高コレステロール血症(FH)の原因となる遺伝子変異のなかでLDLRやAPOBに次いで3番目に同定された変異である。LDL受容体はLDL-Cを代謝するために肝臓へと取り込む受容体であるが、PCSK9にはLDLRと結合し分解へと誘導する働きがあるため、機能獲得型変異を保有する患者では血中LDL-C値は高値を示す。また、PCSK9に機能欠失型変異を有すると健常人と比較し、血中LDL-C値は約40%低く、心血管イベントの発症率も88%低いということが臨床調査より示されている。このような背景から、PCSK9は創薬ターゲットとして非常に注目を集めているが、PCSK9は活性中心を持たないために小分子薬の開発が困難とされており、現在上市している薬剤はない。このような背景のもと、我々は標的を厳密に制御できるアンチセンス分子を用いたPCSK9阻害薬の開発に着手した。アンチセンス医薬は従来、*in vitro*では有効でも、*in vivo*での効果を得るのが困難であると考えられていた。アンチセンスが体内で分解されやすいこと、標的mRNAとの結合親和性が低いことなどが

問題であった。これまでに我々は、アンチセンスに糖部架橋型人工核酸 2',4'-BNA 修飾を施すことにより、これらの欠点を改善し、体内で著効を示すことを見出し、既に高脂血症モデル動物に対する治療実験に成功しており、また、PCSK9 を標的としたアンチセンス分子の最適化を行ってきた。本研究においては、これまでに得てきた知見や BNA 類縁体である AmNA 修飾を導入した候補化合物をベースとして PCSK9 を標的とした新規核酸医薬の臨床化に向けて非臨床試験を行うことを目的としている。

初年度である本年度は、研究計画通りに *in vitro* スクリーニングから選択された 3 種の候補化合物の *in vivo* 毒性検討試験と定量法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 投与実験

被験動物とし 8 週齢のマウス C57BL/6J (: 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 (10, 50 mg/kg/回)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。投与開始より 7 日後に、採血および、肝臓、腎臓の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、-80 保存した。

2. 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 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

3. 相同遺伝子検索

3 種の候補化合物の塩基配列と相補的な遺伝子もしくは non-coding RNA を BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いてヒトおよびマウスを対象に検索を行った。

4. Hybridization-ELISA によるアンチセンス分子の定量

アンチセンス分子に相補的な 3'ピオチン化した templateDNA、5'位および 3'位をそれぞれジゴキシゲニン化した DNA を probe DNA とした。これらの修飾 DNA は株式会社ジーンデザインから購入した。Reacti-Bind Strept Avidine Coated 96well black plates をサーモフィッシャーより購入した。TemplateDNA をバッファー (60 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 0.9 M NaCl, and 0.24%Tween 20) に溶解し、100 nM とした。Probe DNA 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 MgCl₂, 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を 1:5000 の割合で Superblock

blocking buffer を用いて希釈した。アルカリフォスファターゼの基質として AttoPhos[®] Fluorescent AP Substrate System を使用した。

C. 研究結果

1. マウスにおける毒性検討試験

ヒト肝臓癌由来細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* スクリーニングから得られた候補化合物の一般毒性試験のための予備検討として、マウスを用いた毒性検討試験を行うこととした。ただし、ヒト PCSK9 を標的として最適化された配列であるため、今回の試験では、アンチセンス分子のオンターゲット効果による毒性は考慮されていない。用量設定については、臨床試験の投与量を 1 mg/kg と想定し、中間用量に 10 mg/kg、高用量には 50 倍量の 50 mg/kg として単回尾静脈投与を行い、7 日後の血液生化学値の測定を行った (表 1)。候補 3 種のうち HsPCSK9-1771-AM(14) は重度の肝毒性を示し、50 mg/kg は致死量であることが分かった。また、マウスおよびヒトの遺伝子および non-coding RNA (ncRNA) を対象に BLAST を用いてホモロジー検索を行ったところ、マウスにおいて HsPCSK9-1771-AM(14) は細胞内の種々の機能調節に関与する ADP-ribosylation factor に属する ADP-ribosylation factor-like 4C (Arl4c) などのような重要な遺伝子の一部と完全一致する塩基配列を有していた (表 2, 3)。重度の肝毒性が配列依存的な現象であった場合、HsPCSK9-1771-AM(14) はヒトや

本研究の被験動物であるアカゲザルにおいても同遺伝子に一致する配列が含まれていることから、多少の肝毒性が懸念される。また、50 mg/kg の用量で投与した際の ALT 値と細胞実験から得られた IC50 の積をとり、もっとも低い値をとる分子が総合的に優れていると考え、この値から HsPCSK9-1131-AM(14) を開発候補とし、HsPCSK9-1091-AM(14) をバックアップとした (表 4)。なお、HsPCSK9-1131-AM(14) は標的である PCSK9 以外のヒト遺伝子との相同性がもっとも低いことから配列依存的な肝毒性の可能性は低いと考えられる。

2. 定量法の構築

核酸医薬は、現在の医薬品で多くを占めている小分子薬と異なり、塩基配列の確認が重要であるため簡便な LC/MS などといった質量分析計による検出が困難である。従って、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay を改良した配列特異的かつ定量的なアンチセンス分子の定量法を構築した (図 1)。本ハイブリダイゼーション ELISA (HELISA) 法の同時再現性を検証すべく、表 5 に示す各種オリゴ DNA を用意した。アンチセンス分子 (P20B) を段階希釈し、マウス肝臓由来のタンパク質を一定量加え、HELISA 法を用いて、蛍光強度を測定した。サンプル濃度と蛍光強度をそれぞれ対数化し、直線性の高い濃度領域における検量線を作成した (図 2)。また、同じ理論値のサンプル (n=8) を用いて測定を行い、その結果から真度と精度を求めた (表 6)。分析測定

法において検量線サンプルの真度が 80～120% (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの真度は 75～125%)、検量線サンプルの精度が 20%以下 (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの精度が 25%以下) であることが望ましいとされており、本検討結果は良好であったと言える。

また、HELISA 法の選択性について検証すべく、16 塩基長のアンチセンス分子を基準として 20 および 10 塩基長のものを用意し (表 5)、検出を行った (図 3)。結果、濃度の高い領域においてより選択的に 16 塩基長の検出が可能であることが示された。

D. 考案

本研究は、PCSK9 を標的とした新規核酸医薬の臨床化に向けて、非臨床試験を行うことを目的として研究を進めている。初年度は、研究計画に沿って候補化合物の毒性検討試験およびその定量法の構築を行った。アンチセンス医薬は、その副作用として肝毒性が問題視されているが、その詳細は明らかになっていない。しかしながら、近年、バイオインフォマティクスを駆使した手法で、アンチセンス分子中の塩基配列で肝毒性を惹起する可能性の高いモチーフが見出されている [Nucleic Acids Res, 42, 8, 2014]。今回の毒性検討試験において、HsPCSK9-1771-AM(14)が重度の肝毒性を示したが、結果で示した配列由来のオフターゲット効果の他に、この配列中には毒性惹起モチーフの一つとされる TCC の配列を含

んでいることも一つの原因と考えられる。また、毒性惹起モチーフには TCC の他にも TGC が挙げられているが、開発候補にはこのようなモチーフは含まれていない。

また、現在、核酸医薬は上市している薬剤が極めて少ないため、定量法については様々な方法が試みられている。小分子薬の定量においては検出が簡便である質量分析計を用いるのが一般的であるが、核酸医薬などのような活性が配列に依存するような薬剤の定量は困難である。一方で、同じように配列依存的な活性が特徴であるペプチド製剤などについては、現在、質量分析計を用いた手法が最適化されつつあり、核酸医薬も将来的には質量分析計を用いた簡便な定量法が開発されるかもしれない。本研究では、検出過程が多少煩雑である一方で、検出下限が小さく、選択性が高い ELISA 法を改良した HELISA 法を構築し、真度および精度ともに良好な結果が得られている。この結果から、開発候補の定量法にも本手法を採用するとして、開発候補を選択的に検出 DNA プローブの作成している (表 7)。

E. 結論

初年度である本年度は、研究計画通りに毒性検討試験および定量法の構築を行った。多方面から安全性の担保できる開発候補を選定し、現在は、HsPCSK9-1131-AM(14)のアカゲザルへの投与実験を遂行している。また、定量法に関しては HELISA 法の構築と定量法としての評価を行い、良好な結果が

得られたことから、GLP施設への技術移管を実施している。

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 & Bionolecular 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, Kitagwa 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⁺ 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 - 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 - 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 - 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 - 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 2nd 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, 9th 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, 82nd 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, 82nd 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, 82nd 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- 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- 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, 槇野久士, 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, 内瀉安子, 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, 椽谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 槇野久士, 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) Horii 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, 内瀉安子, 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

表 1. 候補化合物投与 7 日後の血液生化学値

	ALT (U/L)		AST (U/L)		BUN (mg/dL)	
	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
Saline	18 ± 3.9		38 ± 3.1		32 ± 4.4	
HsPCSK9-1091-AM(14)	27 ± 6.6	62 ± 26.8	47 ± 13.5	77 ± 13.7	32 ± 2.4	31 ± 4.3
HsPCSK9-1131-AM(14)	19 ± 2.0	22 ± 5.9	40 ± 3.1	49 ± 4.4	32 ± 4.9	28 ± 1.3
HsPCSK9-1771-AM(14)	281 ± 55.1	1325	123 ± 11.5	1595	27 ± 0.6	39

表 2. BLAST による候補化合物と相司的なマウス遺伝子の検索結果

ASOID	Number of mismatch sequence	Gene name	
HsPCSK9-1091-AM(14)	0	Mus musculus myc-like oncogene, s-myc protein (Mycs), mRNA Mus musculus desmocollin 2 (Dsc2), transcript variant X1, mRNA Mus musculus breast carcinoma amplified sequence 1 (Bcas1), mRNA	
	1	Mus musculus breast carcinoma amplified sequence 1 (Bcas1), mRNA Mus musculus predicted gene 10768 (Gm10768), long non-coding RNA Mus musculus desmocollin 2 (Dsc2), mRNA	
	HsPCSK9-1131-AM(14)	1	Mus musculus zinc finger and SCAN domain containing protein 4F-like (LOC100862415), mRNA Mus musculus RIKEN cDNA, A630007B06 gene (A630007B06R&c), mRNA Mus musculus family with sequence similarity 210, member A (Fam210a), mRNA Mus musculus carboxypeptidase N polypeptide 2 (Cpr2), mRNA Mus musculus ataxia telangiectasia and Rad3 related (Atr), mRNA Mus musculus dihydropyrimidinase-like 5 (Dpyl5), mRNA Mus musculus spastic paraplegia 11 (Spg11), misc_RNA Mus musculus WD repeat domain 77 (Wdr77), mRNA
		0	Mus musculus nuclear factor of activated T cell, cytoplasmic, calcineurin dependent 2 (Nfat2), mRNA Mus musculus ADP-ribosylation factor-like 4C (Arl4c), mRNA
		1	Mus musculus family with sequence similarity 172, member A (Fam172a), transcript variant X8, mRNA Mus musculus vaccinia related kinase 1 (Vrk1), transcript variant X10, mRNA Mus musculus oxysterol binding protein-like 5 (Osbp5), transcript variant X3, mRNA

表 3. BLAST による候補化合物と相司的なマウス遺伝子の検索結果

ASOID	Number of mismatch sequence	Gene name
HsPCSK9-1091-AM(14)	0	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mRNA Homo sapiens ring finger protein 40, E3 ubiquitin protein ligase (RNF40), mRNA Homo sapiens protein tyrosine kinase 7 (PTK7), mRNA
	1	Homo sapiens uncharacterized LOC102723370 (LOC102723370), ncRNA Homo sapiens capain 1, (mu1) large subunit (CAPN1), transcript variant X1, mRNA Homo sapiens GTP21 repeat domain containing 1 (GTP21RD1), transcript variant X1, mRNA Homo sapiens sirutin 3 (SIRT3), transcript variant X1, mRNA
	0	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mRNA Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1 (ALDH18A1), mRNA
	1	Homo sapiens meiosis 1 associated protein 1 (M1AP), mRNA Homo sapiens zinc finger, AN1-type domain 1 (ZFAND1), non-coding RNA Homo sapiens transmembrane protein 109 (TMEM109), mRNA
HsPCSK9-1771-AM(14)	0	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mRNA Homo sapiens variable charge, Y-linked 1B (VCY1B), mRNA Homo sapiens ADP-ribosylation factor-like 4C (ARL4C), mRNA
	1	Homo sapiens variable charge, X-linked 3A (VCX3A), mRNA Homo sapiens CD180 molecule (CD180), transcript variant X1, mRNA Homo sapiens solute carrier family 45, member 3 (SLC45A3), mRNA Homo sapiens mab-21-like 3 (C. elegans) (MAB21L3), mRNA Homo sapiens TMEM9 domain family, member B (TMEM9B), mRNA Homo sapiens Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 (RASGRF2), mRNA Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1, beta (LMD1B), transcript variant 2, mRNA Homo sapiens valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (VARS2), transcript variant 1, mRNA Homo sapiens CD180 molecule (CD180), mRNA

表 4. 候補化合物の IC50 と ALT 値の積

	ALT(U/L)		IC ₅₀ (nM)	ALT(50mg/kg)*IC50
	10 mg/kg	50 mg/kg		
Saline	18 ± 3.9			
HsPCSK9-1091-AM(14)	27 ± 6.6	62 ± 26.8	7.7	479.8
HsPCSK9-1131-AM(14)	19 ± 2.0	22 ± 5.9	8.0	176.8
HsPCSK9-1771-AM(14)	281 ± 55.1	1325	6.2	8170.2

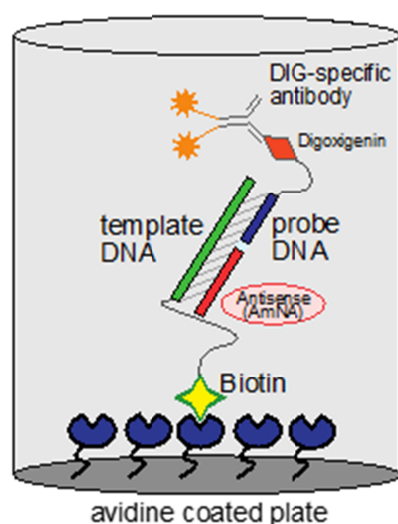


図 2. HELISA 法概要図

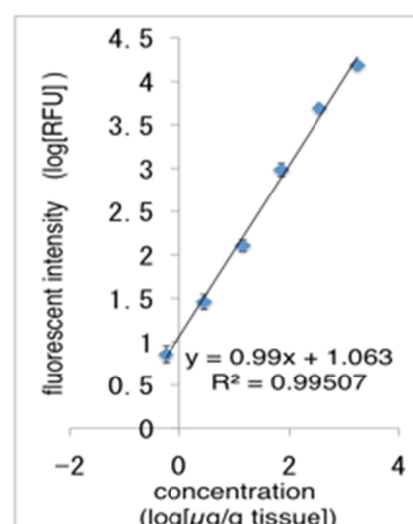


図 1. HELISA 法の検量線

表 5. HELISA 法検討用各種 DNA

Sequence ID	Sequence	Length (mer)
P20B	GggCTCatagcaCaTTaTCc	20
tem plate P20B	Gaatagcaggataatgtctatgagccc	29
AB20B	TTCAGcattggattCAG TG	20
AB16B	CAG cattggatTCAG	16
AB10B	CattggatT	10
tem plate AB16	Gaatagcgactgaataccaatgctg	25
probe DNA	Tcgtattc	9

Upper case: 2',4'-BNA, Lower case: DNA, P: リン酸塩, DIG: ジギトキシゲニン, BIOTIN: ビオチン

表 6. HELISA 法の真度と精度について

	ULQC	HQC	MQC1	MQC2	LQC	LLQC
検出量 ($\mu\text{g/g protein}$)	1770	354	70.8	14.2	2.83	0.566
検出限界: ($\mu\text{g/g protein}$)	1410	536	110	12.5	2.44	0.698
	1320	483	118	13.5	2.81	0.408
	1310	484	81.7	11.8	2.47	0.771
	1380	402	104	9.81	2.7	0.801
	1560	483	91.9	8.72	3.4	0.641
	1410	420	82.2	6.87	1.77	0.654
	1350	437	116	12.6	2.34	0.577
1750	489	68	12.7	3.05	0.413	
平均値 ($\mu\text{g/g protein}$)	1430	467	96.5	11.1	2.62	0.62
標準偏差 ($\mu\text{g/g protein}$)	149	43.9	18.2	2.34	0.492	0.148
回収率 (%)	80.2	128	126	82.1	92.5	115
誤差 (%)	6.91	8.98	14.1	16.8	14.8	11.1

表 7. 開発候補(HsPCSK9-1131-AM(14))検出用 DNA

	Sequence (5' → 3')
HsPCSK9-1131-AM(14)	GTgacacaaagCAg
Template DNA	gaatagcgactgctttg tgcac-BIOTIN
Probe DNA	P-tcgctattc-DIG

Upper case: AmNA, Lower case: DNA, P: リン酸化, DIG: ジコキシゲニン, BIOTIN: ビオチン

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, <u>Harada-Shiba</u> M, <u>Obika S</u>	Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides <i>in vivo</i>	Org. Biomol. Chem			2015年
Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, <u>Harada-Shiba M</u>	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年
Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada H, <u>Harada-Shiba M</u> , <u>Obika S</u>	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年
Yamamoto T, <u>Obika S</u> , Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, <u>Shibata MA</u> , <u>Harada-Shiba M</u>	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年
Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, <u>Harada-Shiba M</u>	Proeomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis	Ther Apher Dial	18 (1)	93-102	2014年
Mori K, Kodama T, <u>Obika S</u>	Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety	Bioorg. Med. Chem	23	33-37	2015年
Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, <u>Obika S</u>	Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance	Org. Lett	16	5640-5643	2014年

Mori S, Morihiro K, <u>Obika S</u>	C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability	Molecules	19	5109-5118	2014年
Morihiro K, Kodama T, Mori S, <u>Obika S</u>	Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand	Org. Biomol. Chem	12	2468-2473	2014年
Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, <u>Obika S</u>	Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides in Vitro	Nucleic Acids Res	42	8174-8187	2014年