

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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
2. 研究開発代表者： 国立研究開発法人国立循環器病研究センター 研究所 病態代謝部 部長 斯波 真理子（当該年度3月31日時点の所属）
3. 研究開発の成果

本研究開発は、高中性脂肪（TG）血症の原因因子の一つとされているアポリポタンパク質 C3（apoC-III）を標的とした革新的核酸医薬の創成を目的とする。ターゲットとする疾患は、重症の高 TG 血症患者であり、フィブラート等の薬剤でも効果が十分でない患者である。リポ蛋白質リパーゼ遺伝子欠損のため、著明な高 TG 血症とともに膵炎を繰り返し、現在治療法がないとされている極めて重症例も対象とする。

本研究開発では、アンチセンス DNA タイプ（ASO）の核酸を用いることとした。研究開発開始時、標的を効率的に発現抑制する ASO の最適な構造は見出されていなかったため、この構造最適化と POC の取得を行った。ASO の作用機序には DNA-RNA 二重鎖のうち RNA 鎖のみを切断する RNaseH への認識が最重要となるため、ASO の構造の一部には天然型 DNA の導入が必要となる。一方、天然型 DNA の場合、その生体内安定性は非常に乏しく動物個体に対する効果は期待できない。そのため、天然型核酸のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオエート結合をベースに、小比賀ら開発の RNA 捕捉能を飛躍的に向上させた糖部架橋型人工核酸（BNA）を数箇所を導入した構造を数多設計した。*in vitro* 系で活性の優れたもののマウスに対する投与試験では、標的組織である肝臓において apoC-III mRNA の有意な減少と、それに伴う血中 apoC-III タンパク質及び血中 TG 値の低下、TG を豊富に含むカイロミクロンや VLDL の顕著な減少、肝臓への脂肪蓄積の抑制という効果が得られた。また病理学的に顕著な組織障害は認められなかったことから、高 TG 血症の優れた治療法であることが示唆された。

ASO の治療効果は示された一方で、医薬品化を考慮した場合には ASO の *in vivo* 活性については条件の最適化を必要とした。そこで、以上の検討より最も高い効果を示す構造を持つ、apoC-III mRNA の全領域を網羅した約 100 種の ASO を設計、合成し、スクリーニングを行った。このスクリーニングによって apoC-III mRNA の 3' UTR が ASO 高活性領域であることが明らかになり、さらに、得られた分子は従来型のものと比較し 3~4 倍の高い *in vivo* 活性を有するものであった。また、既存の TG 低下薬かつ apoC-III 低下効果のあるフィブラートとの比較実験から、ASO は apoC-III 特異的阻害により十分な TG 低下作用を発揮することが明らかとなった。

他方で、将来の臨床化を見据え、より安全性を高めるため、ASO の動態を制御することでさらなる投与量の削減を図った。まずは、肝臓に多く発現する LDL 受容体を標的とすることで ASO を肝臓へ送達すべく、ASO に対してコレステロール修飾を施した。実際に肝臓への蓄積は 4~5 倍程度増加したものの活性の向上には至らなかった。この原因が、肝実質細胞よりも非実質細胞への蓄積がイメージングにより示唆されたため、この問題を克服すべく肝実質細胞表面に特異的に発現するアシアロ糖タンパク質受容体を標的として N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）を ASO へと修飾することとした。GalNAc の修飾位置やリンカー構造の最適化、修飾数を検討した結果、非修飾 ASO と比較して 8-10 倍の *in vivo* 活性の向上に成功し、医薬品化の際には大幅な治療コストの削減を可能にした。

以上の検討から、apoC-III を標的とした ASO の臨床化を視野に入れ、ヒト apoC-III を標的とした ASO の最適及び毒性検討試験を実施した。また、非臨床試験に先立って ASO の原料及び原薬の品質管理に関する検討、GLP 安全性試験に供するグレードの製造スケールアップ検討を完了しており、スムーズに非臨床試験へと移行可能であると考えられる。