

# 博士論文

微粒子支援型キャピラリー電気泳動による抗トロンビン  
アプタマーの獲得と血液凝固制御システムへの応用

和久井 幸二

## 目次

第 1 章	本研究の背景と目的.....	4
1.1.	血液凝固と血栓症.....	5
1.2.	抗凝固薬と副作用.....	8
1.3.	核酸アプタマー.....	9
1.4.	アプタマーの獲得法 (SELEX 法).....	12
1.5.	キャピラリー電気泳動の原理.....	14
1.6.	キャピラリー電気泳動 SELEX の課題.....	17
1.7.	本研究の目的.....	21
1.8.	本論文の構成.....	22
第 2 章	微粒子支援型キャピラリー電気泳動による天然・非天然 核酸アプタマーの高速濃縮法の開発	23
2.1.	序論.....	24
2.2.	実験方法.....	27
2.3.	結果と考察.....	36
2.4.	結論.....	64
第 3 章	抗凝固活性を有するアプタマーの同定と多価化による活性強化.....	65
3.1.	序論.....	66
3.2.	実験方法.....	69
3.3.	結果と考察.....	75
3.4.	結論.....	89
第 4 章	トーホールド介在鎖交換反応を用いる効率的な中和剤の設計.....	90
4.1.	序論.....	91
4.2.	実験方法.....	94

4.3. 結果と考察 .....	96
4.4. 結論 .....	107
第5章 総括 .....	108
謝辞 .....	111
参考文献 .....	112

## 第1章

### 本研究の背景と目的

## 1.1. 血液凝固と血栓症

血液凝固による止血は、生命の恒常性維持を担う重要な生体機構の一つである。血液凝固は、主に血小板と凝固因子タンパク質群によって協奏的に進行する。例えば図 1 に示すように、血管内皮細胞が損傷を受けると、内皮下基質タンパク質であるフォンヴィレブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) とコラーゲンが血液に暴露する。そこに VWF 受容体とコラーゲン受容体を発現する血小板がリクルートされて凝集し、血小板血栓を形成する。さらに、凝固因子トロンビンの活性化によって、不溶性のフィブリンゲルネットワークが形成され、より強固な血栓ができる<sup>1</sup>。最終的に、凝固反応における連鎖的な凝固因子の活性化は、アンチトロンビンや、活性化プロテイン C、組織因子経路インヒビターなどの抗凝固因子によって抑制され、止血が完了する (図 2)<sup>2</sup>。このように様々な凝固因子と抗凝固因子が、互いに正あるいは負のフィードバックをしながら血流の恒常性が保たれている。

しかし、この血液凝固系の均衡の乱れは、静脈血栓塞栓症などの罹患率と致死率の高い重篤な疾患を引き起こしうる。2017 年の報告によれば、米国では毎年約 90 万人が静脈血栓塞栓症に罹患しており、そのうち 6-10 万人が死に至っている<sup>3</sup>。血栓塞栓症の原因は、先天性の抗凝固因子 (アンチトロンビン, プロテイン C, またはプロテイン S) 欠乏症, 先天性の遺伝子変異 (凝固第 V 因子ライデン変異, プロトロンビン G20210A 変異), 炎症や外傷または外科手術による組織傷害, 長時間同じ姿勢でいることによる血流障害など多岐にわたり<sup>4,6</sup>, 誰もが罹患リスクを抱えているといっても過言ではない。

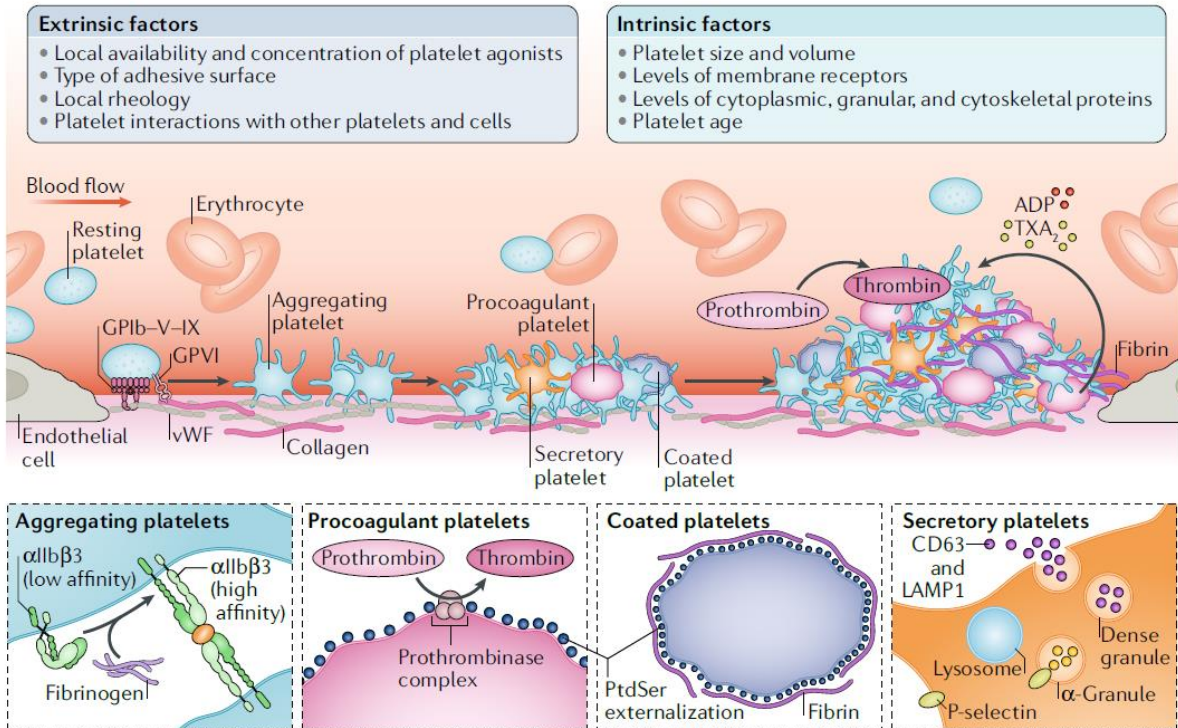


図 1 血管内皮損傷時の血小板と凝固因子トロンビンによる止血メカニズム

参考文献 1 ; van der Meijden, P. E. J. & Heemskerk, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* (2018). doi:10.1038/s41569-018-0110-0 より引用.

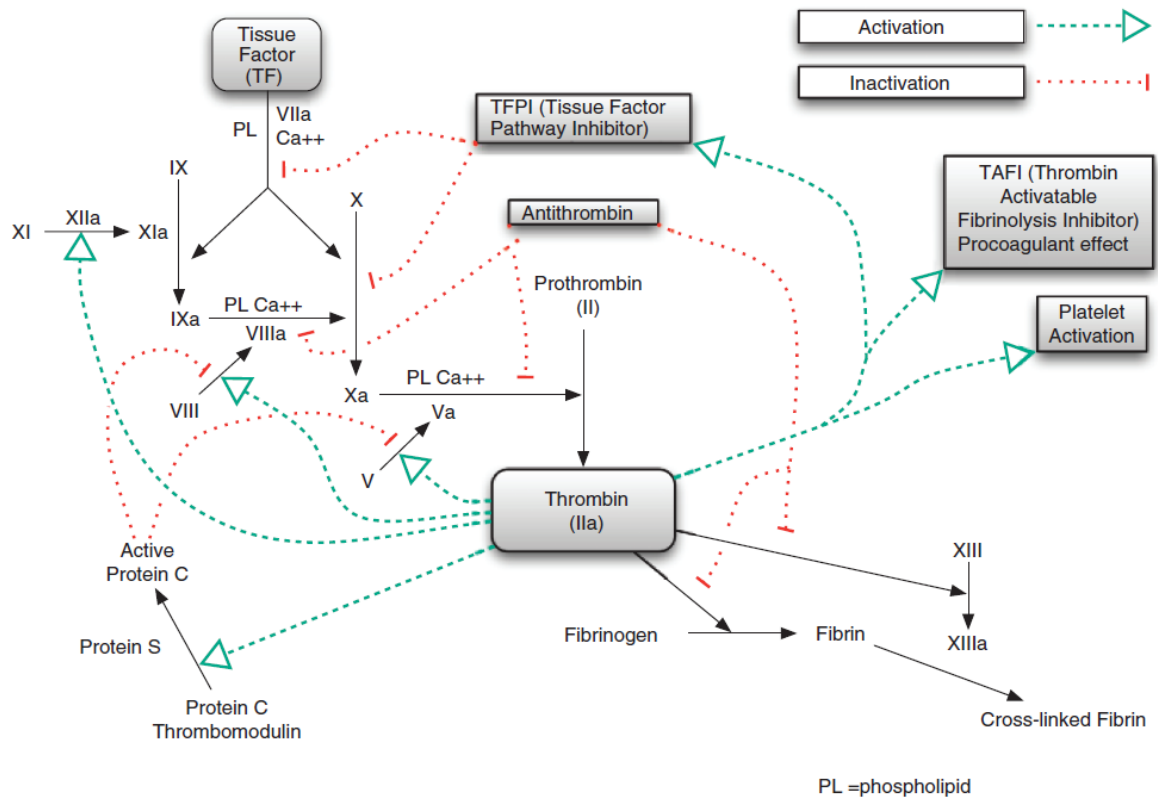


図 2 トロンビンの活性化と阻害経路

参考文献 2 ; Licari, L. G. & Kovacic, J. P. Thrombin physiology and pathophysiology. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19, 11–22 (2009)より引用.

## 1.2. 抗凝固薬と副作用

これまでに、血栓塞栓症に対する治療薬、すなわち抗凝固薬が多数開発されている。例えば、ヒト由来の血漿分画製剤であるアンチトロンビン III 製剤<sup>7</sup>や活性化プロテイン C 製剤<sup>8</sup>、遺伝子組み換えタンパク質製剤の可溶性トロンボモジュリン製剤<sup>9</sup>、ブタ腸粘膜由来の多糖類であるヘパリン製剤<sup>10</sup>、さらにダビガトランやエドキサバンなどの合成低分子薬剤が挙げられる<sup>11</sup>。

しかし、これらの薬剤には以下のような安全性に関する課題がある。まず、ヒト血漿分画製剤はドナー由来のウイルス感染を完全に排除できない<sup>12</sup>。また、遺伝子組み換えタンパク質製剤に関してはアナフィラキシーショックというタンパク質製剤に共通の副作用が生じうる<sup>13</sup>。ヘパリン製剤については血小板の異常減少による血栓形成という副作用がある<sup>14</sup>。合成低分子薬剤には上述のリスクは少ないが、血が止まらない、すなわち「出血リスク」という抗凝固薬に共通する重篤な副作用が存在する<sup>15</sup>。

これまで、ダビガトランやエドキサバンに対して、緊急時に薬効を制御するための特異的中和剤が開発されており、安全な血栓症治療に寄与している<sup>16</sup>。しかしながら、この中和剤は組み換えタンパク質製剤であるため、上述のアナフィラキシーショックという、さらなる副作用を無視できない<sup>13</sup>。

したがって、非動物由来かつ非組み換えタンパク質であり、緊急時に薬効を抑制するための中和剤を有する抗凝固薬を開発できれば、より安全性に優れた血栓症治療法が確立できる可能性がある。



### 1.3. 核酸アプタマー

本研究では、前項で述べた「非動物由来かつ非組み換えタンパク質」、「特異的中和剤の存在」という条件を満たす抗凝固薬の候補として、核酸アプタマー（以下アプタマー）製剤に着目した。

アプタマーとは、特定の分子に対して高い特異性と親和性を有する一本鎖DNAまたはRNAである。代表的な核酸の高次構造として、ワトソン・クリック塩基対からなる二重らせん構造が挙げられる<sup>17</sup>。実際は、局所的なワトソン・クリックあるいはフーグスティン塩基対の形成を介して、より複雑な高次構造をとることが明らかとなっている（図3）<sup>18</sup>。つまり、一本鎖核酸は配列次第で特定の分子の捕捉構造を形成し、抗体のような分子認識能を獲得可能であり、これを特にアプタマーと呼ぶ。さらに、アプタマーに対する相補的なDNA/RNA鎖は、アプタマー固有の捕捉構造を崩す特異的中和剤として機能しうることが報告されている<sup>19-22</sup>。

また、アプタマーは、「変異」、「選択」、「複製」といった進化の過程を模した人工的な手法によって獲得される。1990年に、Tuerkらは世界で初めて Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)というアプタマーの取得法を開発し、バクテリオファージの T4 DNA polymerase と相互作用する新規の RNA 配列を同定した<sup>23</sup>。T4 DNA polymerase は、自身の mRNA 上の shine-dalgarno 配列近傍の領域が形成するループ構造と結合することで、自己の発現制御をおこなっている。Tuerkらは、どの塩基が T4 DNA polymerase との結合、すなわち自身の発現制御に重要であるかを明らかにするために、mRNA のループ部位の配列をランダム化した RNA ライブラリーを合成した（変異）。そして、T4 DNA polymerase と RNA ライブラリーを混合して結合能をもった変異体 RNA を抽出した（選択）。抽出した RNA の逆転写とポリメラーゼ連鎖反応法（Polymerase Chain Reaction, PCR）によって cDNA を作製し、cDNA の転写によって新たな RNA ライブラリーを調製した（複製）。人為的に「選択」と「複

製」を繰り返すことで、T4 DNA polymerase と強く結合する RNA 配列の割合を指数的に増加させ、野生型と異なるが同等の結合能をもつ変異体の獲得に成功した。

時を同じくして、Ellington らは *in vitro* selection と呼ばれる SELEX と同様の原理に基づいた手法によって、有機色素に対する RNA アプタマーの獲得に成功した<sup>24</sup>。細胞や動物の免疫反応を利用して獲得する抗体とは異なり、アプタマーの選抜は *in vitro* でおこなわれるため、低分子化合物などの抗体の取得が難しい分子にも適用できるという特長がある。

したがって、アプタマーは人工的に選抜と化学合成が可能なポリヌクレオチドであり、「非動物由来かつ非組み換えタンパク質」という条件を満たす分子認識素子である。同時に、アプタマーに対する相補鎖は「特異的中和剤」となりうる。ゆえに、トロンビンなどの凝固因子に対するアプタマーとその相補鎖は、より安全な抗凝固/中和剤の候補となりうる。

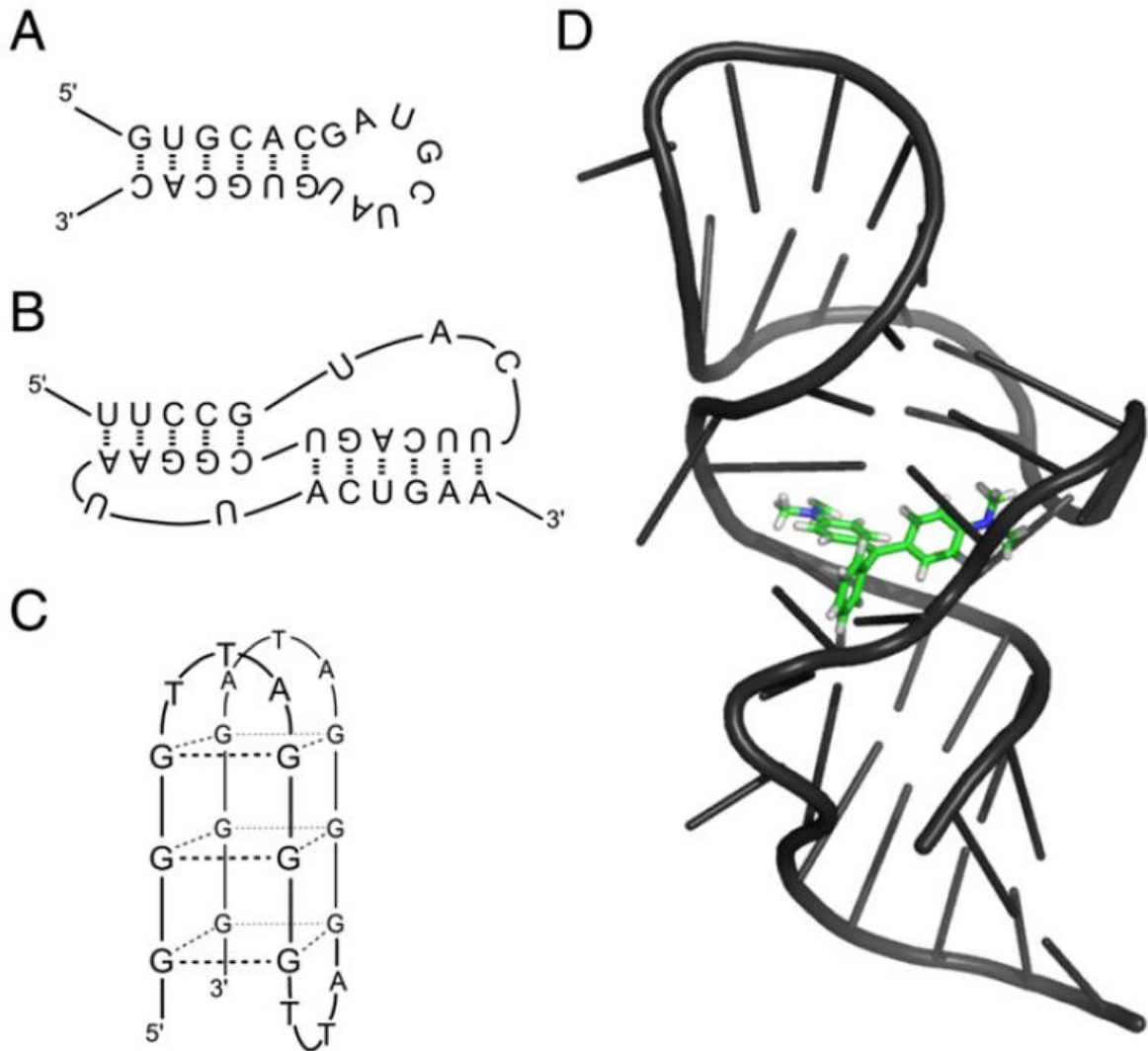


図 3 一本鎖 DNA/RNA の多様な高次構造と分子認識

参考文献 18 ; Radom, F., Jurek, P. M., Mazurek, M. P., Otlewski, J. & Jeleń, F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1260–1274 (2013)より引用.

## 1.4. アプタマーの獲得法 (SELEX 法)

本項では、有望な薬剤候補であるアプタマーの取得法と課題について述べる。アプタマーは DNA アプタマーと RNA アプタマーの 2 種類に大別されるが、ここでは特に DNA アプタマーの取得法について述べる。SELEX では、固相合成法などによって化学合成した一本鎖 DNA (single-strand DNA, ssDNA) を初期 ssDNA ライブラリーとして用いる。一般に、ssDNA ライブラリーは 20-80 塩基ほどのランダム配列からなる。つまり、A, T, G, C の 4 種類の塩基を用いる場合、理論上は  $4^{20}$ - $4^{80}$  種類に及ぶ配列が得られる。すなわち  $4^{20}$ - $4^{80}$  通りの構造をとりうるため、様々な分子に対する結合能の獲得が期待できる。PCR によって結合した DNA を増幅するために、ランダム配列の両端に、20 ヌクレオチドほどの primer 結合配列を設定する。ssDNA ライブラリーを標的分子と混合し、標的分子に結合した ssDNA のみを分離して PCR によって指数的に増幅する。得られた PCR 産物を一本鎖化し、次の選抜に用いる ssDNA ライブラリーとする。この一連の操作 (ラウンド) を複数回繰り返すことで、目的のアプタマー候補配列を濃縮していく (図 4)。しかし、一般的な SELEX では、アプタマー獲得まで 10-20 ラウンドに及ぶ操作を繰り返す必要があり<sup>25-27</sup>、この選抜工程の長期化がアプタマー普及のボトルネックとなっていた。

この問題を解決するために、アプタマーの各選抜工程にあらゆる改良がなされてきた<sup>25-27</sup>。特に「標的分子に結合した ssDNA の分離」は、SELEX における最も重要な工程である。Mendonsa らは、最も優れた分離技術の一つであるキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis; CE) を SELEX に適用し、従来の SELEX では 10-20 ラウンドを要する選抜操作を 2-4 ラウンドにまで短縮することに成功した<sup>28</sup>。本研究では、この CE-SELEX と呼ばれる手法に着目した。

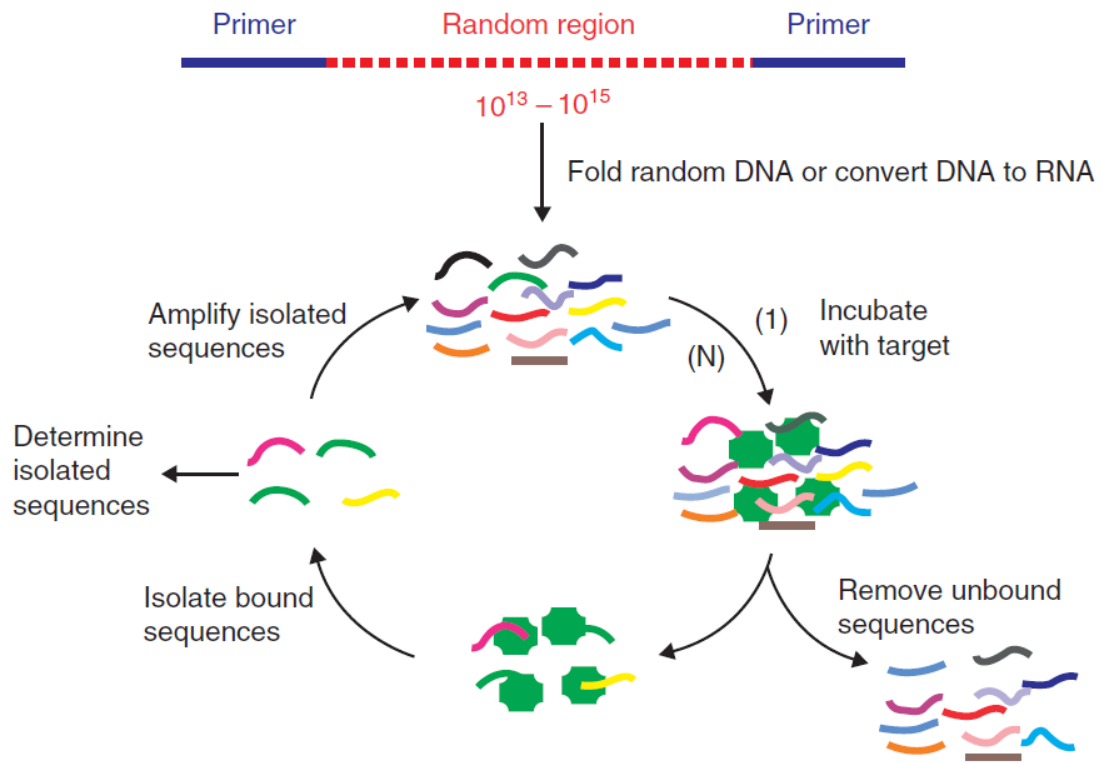


図 4 アプタマー獲得法である SELEX の原理

参考文献 27 ; Yang, X., Li, N. & Gorenstein, D. G. Strategies for the discovery of therapeutic aptamers. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 75–87 (2011)より引用.

## 1.5. キャピラリー電気泳動の原理

キャピラリー電気泳動 (CE) は、内径 10-100  $\mu\text{m}$  ほどの細い石英ガラスキャピラリーを用いる高速かつ高分離能の電気泳動法であり、金属イオンから、ペプチド、タンパク質、核酸といった生体高分子に至るまで、あらゆる分子種の検出、定量、分取に利用されている<sup>29,30</sup>.

CE システムは主に、石英ガラスキャピラリー、高圧電源、電極、検出器 (吸光度検出器、蛍光検出器、電気化学検出器、質量分析器) から成る (図 5)。泳動用緩衝液で満たしたキャピラリーに微量 (nl- $\mu\text{l}$ ) の分析試料を注入し、石英ガラスキャピラリー両端を陽極槽と陰極槽に浸して高電圧 (~30 kV) をかけることで電気泳動をおこなう。細い石英ガラスキャピラリーは電気抵抗が高く、単位体積あたりの表面積も大きい。ゆえにジュール熱が発生しにくく、高電圧の適用が可能である。分離能は引加電圧に比例するため、CE では優れた分離を実現することができる。CE における分子の移動は、分子固有の電気泳動に加えて電気浸透流 (electroosmotic flow; EOF)<sup>31</sup> によって駆動される。石英ガラスキャピラリー内壁は、シラノール基 (酸解離定数  $\text{pKa} = 5.3-6.3$ ) で覆われているため、中性から塩基性の溶液中において、キャピラリー内壁は負電荷を帯びている。これを中和するように溶液中の正電荷イオンがキャピラリー内壁に集まることで、電気二重層というイオンの層が形成される。電気二重層を形成した状態で高電圧を引加すると、整列した正電荷に引きずられるように溶液全体が陰極に移動する。この現象を電気浸透流と呼ぶ (図 5)。溶液中の電荷を有する分子の電気泳動移動速度  $v_{ep}$  は以下の式で表される。

$$v_{ep} = \mu_{ep}E, (\mu_{ep} = q/6\pi\eta r) \quad \dots \quad (1)$$

$\mu_{ep}$  は電気泳動移動度、 $E$  は電場強度、 $q$  は分子の電荷、 $\pi$  は円周率、 $\eta$  は溶液の粘性率、 $r$  は分子半径を表す。式(1)から、分子の電気泳動移動度は、電場強度と分子の電荷に比例し、溶

液の粘性率と分子半径に反比例することがわかる。

また、溶液中の電気浸透流速度  $v_{osm}$  は以下の式で表される<sup>32</sup>。

$$V_{osm} = \mu_{osm}E, (\mu_{osm} = -\epsilon\zeta/\eta) \quad \cdots (2)$$

$\mu_{osm}$  は電気浸透流移動度、 $E$  は電場強度、 $\epsilon$  は溶液の誘電率、 $\zeta$  はゼータ電位、 $\eta$  は溶液の粘性率を表す。(2)式より、電気浸透流速度はゼータ電位に比例する。ゼータ電位はキャピラリー内壁の電気二重層内のすべり面（イオンの固定層と拡散層の界面）における電位であり、キャピラリー内壁のシラノール基の荷電状態に依存する。実際に、電気浸透流速度は溶液の pH に大きく依存し、pH7 以上において比較的早い電気浸透流が観測されている<sup>33</sup>。

キャピラリー電気泳動における分子の移動速度  $v_{ap}$  は、電気泳動速度  $v_{ep}$  と電気浸透流速度  $v_{osm}$  の和であり、(1)、(2)式より以下のように表される。

$$v_{ap} = v_{ep} + v_{osm} = (\mu_{ep} + \mu_{osm})E \quad \cdots (3)$$

pH7 以上の溶液条件下においては、概して電気浸透流速度は電気泳動速度よりも十分に大きくなるため、(3)式の  $v_{ap} > 0$  となる。したがって、CE においては、分子の荷電状態に依らずにすべての分子が一定方向に泳動されるため、同時に様々な分子を高速で分析することが可能である<sup>32</sup>。

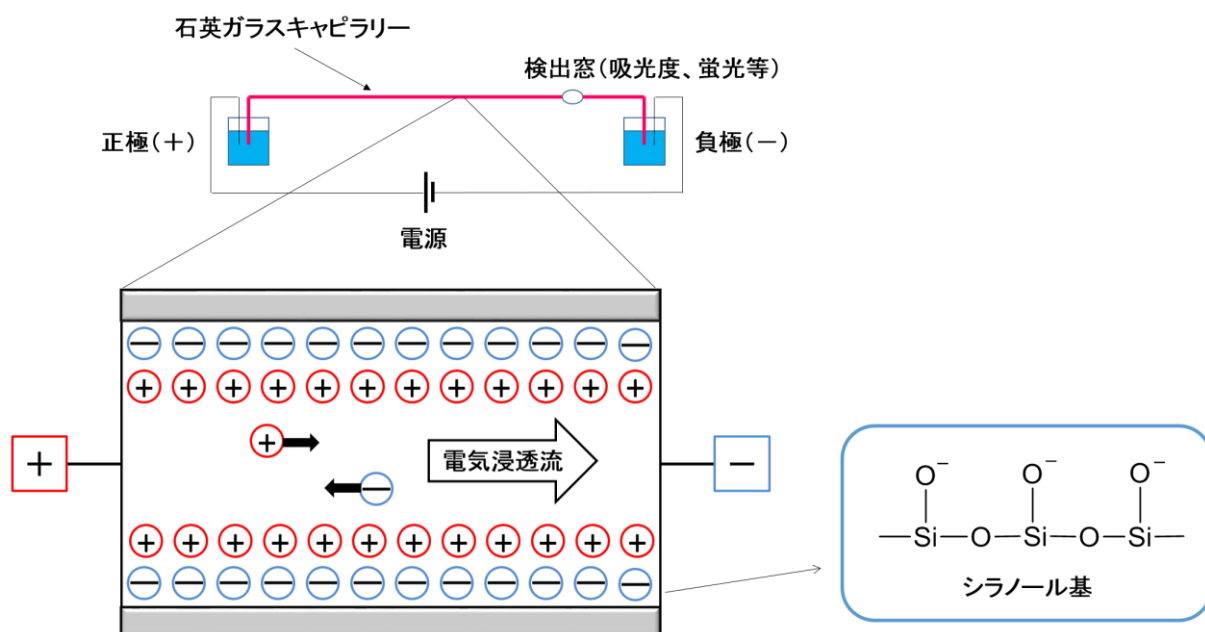


図 5 CE 装置の概略図

CE 装置は、石英ガラスキャピラリー、高圧電源、電極、検出器（吸光度検出器、蛍光検出器、電気化学検出器、質量分析器）から基本的に構成される。石英ガラスキャピラリー内壁は、シラノール基による負電荷を帯びている。これを中和するように溶液中の正電荷イオンがキャピラリー内壁に集まることで、電気二重層というイオンの層が形成される。電気二重層を形成した状態で高電圧を引加すると、電気浸透流という早い流れによって、分子の荷電状態に依らずにすべての分子が陰極に向かって移動する。この時の移動速度は、電気泳動速度と電気浸透流速度の和となる。



## 1.6. キャピラリー電気泳動 SELEX の課題

CE-SELEX は一般的な SELEX と比べて低ラウンド数でアプタマーを獲得することができる優れた手法である (図) <sup>28,34,35</sup>. しかしながら, CE-SELEX には以下のような技術的課題があると考えられる.

まず, アプタマー候補すなわち標的分子/アプタマー複合体分取の不確実性が挙げられる. 標的分子としてタンパク質を選択した場合の例を挙げる. 核酸は一般的なタンパク質よりも負電荷密度が高いため, 標的タンパク質と核酸ライブラリーが複合体を形成した場合, 負電荷密度の序列以下のような傾向にある.

核酸ライブラリー > 複合体 > 標的タンパク質

したがって, 項目 1.5 で述べたキャピラリー電気泳動の原理に従えば, 移動速度の序列は以下のようなと考えられる.

標的タンパク質 > 複合体 > 核酸ライブラリー

核酸は, 配列の違いによる電荷密度の差がほとんどないため, 核酸ライブラリーは概してひとつのピークとして検出される <sup>36</sup>. したがって, タンパク質, 複合体, 核酸ライブラリーの 3 つのピークが検出されると考えられる. 理論上は複合体ピークの領域を分取すればアプタマーを得ることができる. しかしながら, 非平衡状態の泳動条件下において, 複合体を形成している核酸配列は徐々に標的タンパク質から解離していくため <sup>37</sup>, 一般に現在の技術では検出できないほどの量の複合体しか残らない. MutS (DNA 修復酵素) のような元来 DNA と相互作用しやすい標的分子であり, かつ蛍光検出器などの高感度の検出器を用いない限り, 初期ラウンドで複合体の検出は難しい <sup>38</sup>. ゆえに, 標的タンパク質のピークから核酸ライブ

ラリーのピークの直前までを分取するのが一般的な分取領域の設定法である (図 7) <sup>34,39,40</sup>.

しかし、この分取領域には泳動途中で解離した結合能が低い核酸配列も多分に含まれているため、高親和性の核酸配列のみを濃縮することは難しいと考えられる。実際に、分取領域が複合体ピークに近いほど、より結合能が優れたアプタマーが獲得されることが報告された <sup>41</sup>.

また、CE-SELEX に適用可能な標的分子には制約がある。上述のように、CE-SELEX では標的分子と核酸の結合時に生じる CE 移動度の差を利用して、目的のアプタマー候補のみを分離・分取する。小さな分子を標的とする場合、アプタマーとの結合時の CE 移動度の変化は小さく、複合体ピークと核酸ライブラリーピークを分離することは極めて困難となる。つまり、CE-SELEX における標的分子は、アプタマーとの結合時に大きく CE 移動度に変化するような分子である必要がある。

したがって、CE-SELEX において最も重要な要素である「複合体の確実な検出」と「複合体の大きな CE 移動度変化」を満たす系は未だ構築されていない。

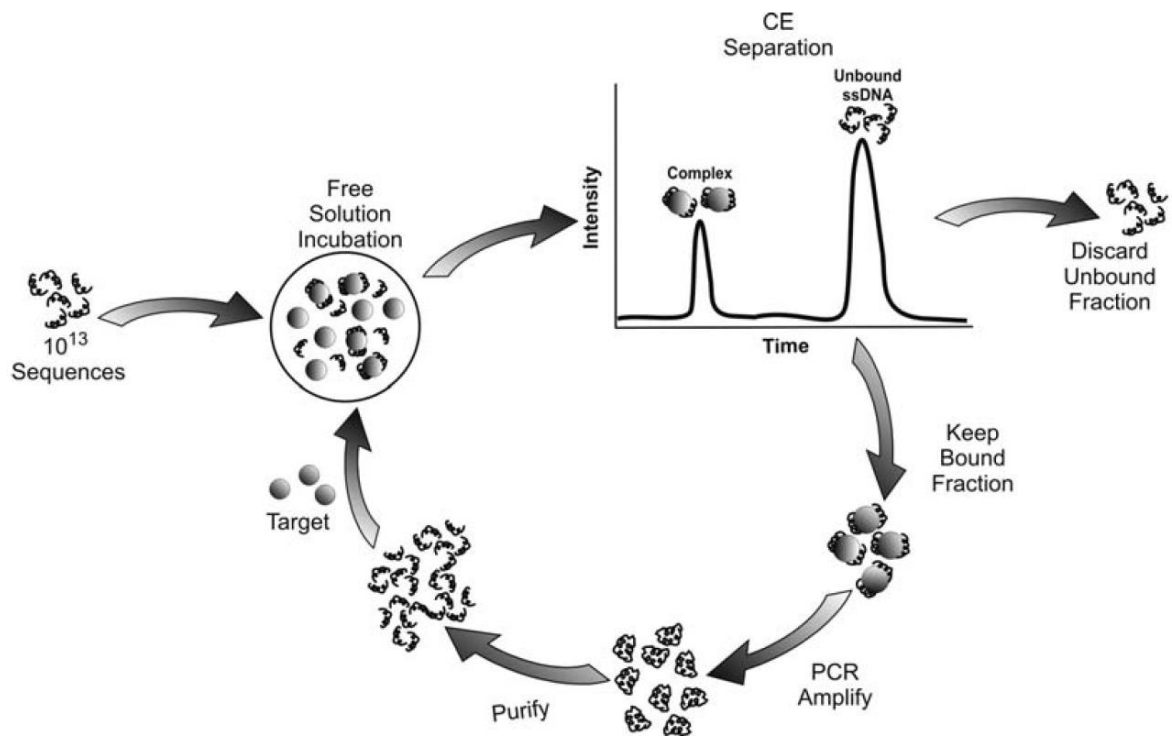


図 6 CE-SELEX の概略図

参考文献 35 ; Mosing, R. K. & Bowser, M. T. Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). in *Methods in Molecular Biology* **535**, 33–43 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009)より引用.

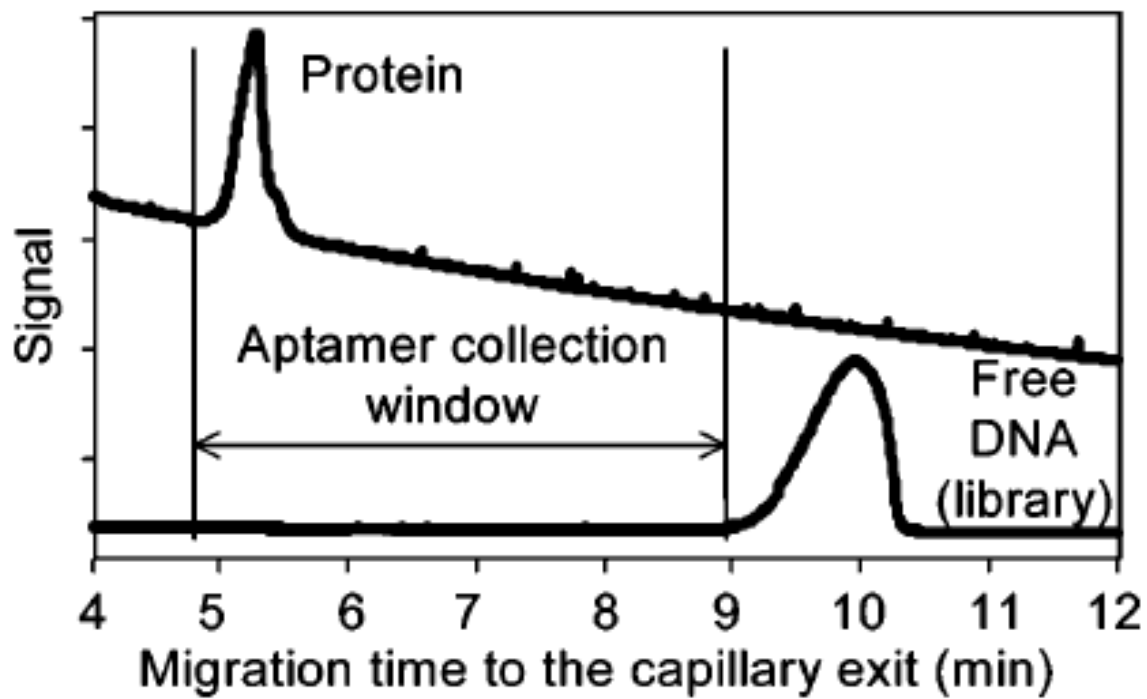


図 7 CE-SELEX における一般的な分取領域の設定の例

参考文献 34 ; Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A. & Krylov, S. N. Non-SELEX selection of aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1410–1411 (2006) より引用.

## 1.7. 本研究の目的

本研究では、血栓塞栓症のより安全な治療薬候補の創出を目的とした。具体的には、新たな抗凝固剤と、緊急時に薬効を抑制するための特異的中和剤の取得を目的とした。この目的を達成するために、核酸アプタマーという分子に着目した。アプタマーは抗体に匹敵する標的分子特異性や親和性をもちながら、非動物由来かつ非組み換えタンパク質であるため、感染症やアレルギー反応のリスクが低いという特長がある。さらに、抗凝固薬に共通の副作用である「出血リスク」に備えた中和剤の設計が比較的容易であるという利点がある。しかしながら、アプタマーの取得には多大な労力と時間を要するという課題があった。

したがって、本研究の目的を果たすための第一段階として、高親和性アプタマーの迅速な獲得技術の確立を試みた。この技術により、血液凝固反応におけるキーエンザイム、すなわちトロンビンを標的としたアプタマー群を迅速に濃縮した。第二段階として、トロンビンの活性を強力に阻害するアプタマーのスクリーニングと改良をおこなった。最後に、獲得した抗凝固アプタマーに対する高効率な中和剤を設計した。

## 1.8. 本論文の構成

第 2 章では、独自のアプタマー選抜法であるマイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX) の確立について報告する。ここでは、従来の CE-SELEX との比較結果を示した。さらに、天然核酸アプタマーだけではなく、非天然核酸アプタマーに対する MACE-SELEX の適用可能性も検討した。

第 3 章では、前章で獲得した抗トロンビンアプタマー群の中から、優れた抗凝固活性を有するもののスクリーニングと配列最適化、抗凝固アプタマーの活性向上のための多価化に関して報告する。ここでは主に、臨床に進んだ抗凝固アプタマーとの比較結果を示した。

第 4 章では、前章で同定、最適化した抗凝固アプタマーの安全な投与を目指し、高効率な中和剤の設計法について報告する。ここでは、トーホールド配列置換反応を中和剤に応用した例を示した。

第 5 章では、総括として上記の研究成果のまとめと今後の展望について述べる。

## 第2章

### 微粒子支援型キャピラリー電気泳動による天然・非天然 核酸アプタマーの高速濃縮法の開発

## 2.1. 序論

アプタマーとは、分子認識能を有する一本鎖 DNA/RNA のことである。これまでに、金属イオン<sup>42,43</sup>、低分子化合物<sup>44-47</sup>、ペプチド<sup>48-52</sup>、タンパク質<sup>53-55</sup>、細胞<sup>56-58</sup>といった多様な分子種に対して特異的に結合するアプタマーが報告されている。アプタマーは作用機序の類似性から「化学抗体」と称されるが、標的分子の多様性、化学合成・修飾の容易さ、ロットの再現性、保存性の高さ、立体構造の可逆性、免疫原性の低さという点において抗体に勝る<sup>59,60</sup>。さらに、相補的な一本鎖 DNA/RNA を添加することで分子捕捉構造を崩せる、すなわち比較的容易に機能の不活性化が可能という特長がある<sup>19-22</sup>。したがって、アプタマーは、より安価かつ安全な次世代の分子標的薬としての可能性を秘めている。

実際に、1990年に初めてアプタマーが報告されてから、いくつかのアプタマー製剤の臨床開発が進められてきた<sup>61</sup>。例えば、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) を標的とした macugen は、加齢黄斑変性症の治療薬として FDA に認可されている<sup>62</sup>。また血液凝固因子の一つである第IX因子を標的としたアプタマーとその中和剤 (REG1 システム) は臨床試験第 III 相まで進んだ<sup>19,63</sup>。さらに、特に重要なアプタマー製剤の標的分子として、 $\alpha$  トロンビン (以下トロンビン) が挙げられる。トロンビンは血栓形成反応の最下流にある因子であり<sup>64</sup>、その機能亢進によって重篤な血栓塞栓症を引き起こす。これまでに HD1<sup>54</sup>、NU172<sup>65</sup>、RE31<sup>66</sup>、RA36<sup>67</sup> 等のトロンビンを標的とした抗凝固アプタマーが多数報告されている。なかでも HD1 と NU172 は、冠動脈バイパス手術時に使用する抗凝固薬として臨床第 I 相と第 II 相に進んだ実績があるが、未だ上市には至っていない<sup>61</sup>。よって、これらの既存のアプタマーを超える性能をもつ配列が同定できれば新規薬剤候補となりうる。

しかしながら、アプタマーの取得には多大な労力と時間を要する。アプタマーは、systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) あるいは *in vitro* selection と呼ばれる人工的な分子進化工学的アプローチによって獲得される<sup>68,69</sup>。SELEX 法の基本工程は、(1) 標的



分子とランダム核酸ライブラリーの混合, (2) 標的分子に結合するアプタマー候補の分離と抽出, (3) PCR による結合したアプタマー候補の指数的増幅, (4) 配列解析によるアプタマー候補配列の同定からなる. (1)-(3)までの手順を 1 ラウンドとすると, 一般にアプタマー獲得まで 10-20 ラウンドに及ぶ選抜工程を要する<sup>26</sup>. アプタマー獲得までの期間と労力を最小化するために, 上述の各基本工程を改良した SELEX 法が多数報告されている; たとえば(1) 核酸ライブラリーに疎水性官能基や疎水性人工塩基対を導入することによるアプタマーの結合能の向上<sup>70-75</sup>, (2) キャピラリー電気泳動 (CE) やマイクロ流路の適用によるアプタマー候補の分離効率向上<sup>28,76-83</sup>, (3) エマルジョン PCR の導入による配列依存的な PCR 増幅バイアスの抑制<sup>84</sup>, (4) 次世代 (ハイスループット) シーケンサーを適用による解析可能な配列数の拡大といった工夫によって<sup>85-88</sup>, SELEX の成功率向上や必要ラウンド数の最小化がなされて来た.

上述 (2) の「アプタマー候補配列の分離効率の向上」は, 特にアプタマーの濃縮効率に直結する要素である. 数ある SELEX 法のなかで, CE-SELEX は最も優れた分離性能を誇るアプタマー選抜法の一つであるが, いくつか技術的な課題がある. 一つはアプタマー候補分取の不確実性が挙げられる. CE-SELEX は, 結合前後の CE 移動度変化を利用してターゲット/アプタマー複合体 (以下, 複合体) のみを分取する手法である. 実際は, 内径 10-100 nm ほどの細いキャピラリーを通るわずかな複合体の検出は困難である. よって, 核酸は一般的なタンパク質よりも負電荷密度が高く, 複合体は核酸分子単独よりも負電荷密度が下がる, すなわち溶出が早くなるという仮定のもと, 一般には図 7 のように広い分取領域を設定する<sup>34,39,40</sup>. しかし, この分取領域は途中で解離した結合が弱いあるいは非結合性の配列も含むため, 優れたアプタマーのみを濃縮することが困難であると考えられる. 実際には, 分取領域が複合体ピークに近いほど, より高親和性のアプタマーが濃縮されることが報告されている<sup>41</sup>. もう一つの課題として, CE-SELEX に適用可能な標的分子の制約が挙げられる. 上述のように結合時に生じる CE 移動度の差を利用して, 目的のアプタマー候補のみを分離・分取する. つまり, CE-SELEX における標的分子は, 核酸との結合時に大きく CE 移動度に変化するような分子に限られる. 以上から, CE-SELEX で高親和性アプタマーを迅速に濃縮するには, 「複合体の

正確な検出」と「複合体形成時の大きな CE 移動度シフト」の両方を満たす必要があるといえる。

本章では、新規抗凝固アプタマー薬剤を獲得するための第一段階として、上述の CE-SELEX の課題である「複合体の正確な検出」と「複合体形成時の大きな CE 移動度シフト」を同時に満たす、高親和性アプタマーの高速選抜法の開発について報告する。本研究で開発したマイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX) では、核酸ライブラリーと標的分子固定化マイクロ粒子(直径 1  $\mu\text{m}$ ) の混合溶液を CE によって直接分離する。これにより、複合体はマイクロ粒子の光散乱由来の吸光度変化によって高感度に検出を可能にした。さらに、マイクロ粒子と非結合核酸ライブラリーの移動度には十分な差があり、複合体の確実な CE 分離・分取を可能にした。結果として、CE-SELEX と比較して、MACE-SELEX ではより高い親和性の抗トロンビンアプタマー群を低ラウンド数で十分に濃縮することに成功した。さらに、MACE-SELEX は非天然塩基アプタマーの取得技術にも応用可能であることを示した。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 試薬リスト

Thrombin from human plasma (Sigma-Aldrich, USA)

Apo-transferrin (Sigma-Aldrich, USA)

Bovine serum albumin (BSA; Wako, Japan)

Oligo DNAs (Sigma-Aldrich, USA)

2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES; Wako, Japan)

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimido hydrochloride (EDC; Wako, Japan)

Dulbecco's PBS (-) (PBS; Wako, Japan)

10% tween 20 solution (Bio-Rad Laboratories, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Wako, Japan)

Hydrochloric acid (HCl; Wako, Japan)

1 M sodium chloride solution (NaCl; Wako, Japan)

1 M magnesium chloride solution (MgCl<sub>2</sub>; Wako, Japan)

1 M sodium hydroxide solution (NaOH; Agilent Technologies, USA)

0.5 M borate buffer at pH 8.5±0.2 (Polyscience, USA)

PrimeSTAR HS (Takara Bio, Japan)

Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (Wako, Japan)

Boric acid (Wako, Japan)

37.5:1 (40%, w/v) acrylamide/bis solution, 2.6% C (Serva Electrophoresis, Germany)

Ammonium persulphate (APS; Bio-Rad Laboratories, USA)

*N,N,N',N'*-tetramethylethylene (TEMED; Bio-Rad Laboratories, USA)

Acetic acid (Wako, Japan)

Sodium Acetic acid (Wako, Japan)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidehydrochloride (EDC; GE healthcare, UK)

N-Hydroxysuccinimide (NHS; GE healthcare, UK)

1.0 M Ethanolamine-HCl pH 8.5 (GE healthcare, UK)

Loading buffer (Wako, Japan)

25 bp DNA step ladder (Wako, Japan)

GelStar (Lonza, Switzerland)

### 2.2.2. トロンビン固定化マイクロ粒子の調製

表面にカルボキシ基を有する磁性マイクロ粒子 (Dynabeads MyOne™ Carboxylic Acid, 1 μm diameter; Invitrogen, USA) を担体として、標的タンパク質であるトロンビンをアミンカップリングにより固定化した。まず、マイクロ粒子溶液 (10 mg/ml) をボルテックスミキサー (Present Mixer 2011; TAITEC, Japan) により 30 秒間攪拌し、50 μl ずつ 2 本の 1.5 ml チューブに移してマグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 2 分間静置後、上清を除去した。各チューブに 15 mM MES buffer (pH 6.0) を 1 ml ずつ加え、ボルテックスミキサー (Present Mixer 2011; TAITEC, Japan) により 5-10 秒間攪拌した。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) にチューブを 2 分間静置後、上清を除去した。再度 1 ml の 15 mM MES buffer (pH 6.0) を添加し、5-10 秒間攪拌後に上清を除去した。100 μl の 15 mM MES buffer (pH 6.0) をずつ添加し、ボルテックスミキサー (Present Mixer 2011; TAITEC, Japan) により 5-10 秒間攪拌した。さらに 10 mg/ml EDC 水溶液を 100 μl ずつ添加し、ローテーター (Intelli-Mixer™ RM-2; ELMI, Latvia) を用いて室温で 30 分間攪拌しながらインキュベートした。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 2 分間静置後、上清を除去した。15 mM MES バッファーで調製した 200 μl の 3.2 μM トロンビン溶液を、一方のチューブに直ちに添加した。もう一方のチューブには、比較のために 15 mM MES バッファーを 200 μl 添加した。ローテーター (Intelli-Mixer™ RM-2; ELMI, Latvia) で攪拌しながら 3 時間以上室温でインキュベートし、カップリング反応を完了させた。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 2 分間静置した後、上清を除去した。Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて上清中の未反応トロンビン濃度を測定することで固定量を推定した。1 ml の PBS-T (PBS, 0.05% v/v tween20) を添加し、ローテーター (Intelli-Mixer™ RM-2;

ELMI, Latvia) を用いて 10 分間室温で攪拌することでマイクロ粒子を洗浄した。PBS-T による洗浄は計 3 回繰り返した。最後にサンプルバッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% v/v tween20]を 50 µl 添加し, 10 mg/ml の磁性粒子ストック溶液として 4°C で保存した。

### 2.2.3. PCR による分取サンプルの増幅

1.5 ml チューブに PrimeSTAR HS を 400 µl, 超純水を 192 µl, 4 µM の forward primer (表 1) を 80 µl, 4 µM の 5'-biotinylated reverse primer (表 1) を 80 µl 混合し, 8 つの 200µl PCR チューブに 94 µl ずつ分注した。6 つのチューブに分取サンプルを 6 µl ずつ添加し, 残りの 2 つのチューブにはポジティブ及びネガティブコントロールとして 1-10 pM ssDNA ライブラリーと超純水をそれぞれ 6 µl ずつ添加した。サーマルサイクラー (Takara Bio, Japan) を用いて, 始めに 94°C で 1 分間加熱した後, 「94°C/15 s, 55°C/5 s, 72°C/20 s」という操作を 23-28 回繰り返した。PCR 終了後は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) によって目的のサイズの DNA が増幅されているかどうかを調べた。適当なサイズのビーカーに 40%アクリルアミドゲル溶液を 2 ml, 5 × TBE buffer を 2 ml, 超純水を 5.8 ml, 10% w/v APS 溶液を 200 µl, TEMED を 5 µl 順番に混ぜながら加えた後, ゲル作成用ガラス版セット (ゲルの厚さ 1 mm) の中に注ぎ, コームを挿して室温で 30 分以上静置することで, 8%ポリアクリルアミドゲルを作製した。電気泳動装置にゲルをセットして 1 × TBE buffer で満たした後, PCR 産物と loading buffer を 1:1 の割合で混合した溶液を, 1 µl ずつ各ウェルに添加した。同様に, 25 bp DNA step ladder を添加した。50 mA 負荷で 18 分間の電気泳動をおこなった。100 ml の 1 × TBE buffer に GelStar を 5 µl 加えて染色液とした。電気泳動後のゲルを染色液に浸し, 10 分間振盪した。UV 照射器 (Digi-Gel Shot; Takara Bio, Japan) によって, 染色後の DNA のバンドを検出した。

#### 2.2.4. PCR 産物の精製と一本鎖化

Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Japan)を用いたカラム精製によって、PCR 産物から残存プライマーやプライマーダイマー等の副産物を除いた。操作は付属のプロトコルに従った。100 × 6 μl (計 600 μl) の PCR 産物は、精製後に 30 × 6 μl (計 180 μl) の tris-EDTA (pH 8.0) バッファーによって溶出した。次に、ストレプトアビジン固定化磁性粒子である magosphere MS300/Streptavidin (Invitrogen, USA) を用いて、DNA を一本鎖化した。磁性粒子溶液をボルテックスミキサー (Present Mixer 2011; TAITEC, Japan) によって 15-30 秒間懸濁し、5 μl を 1.5 ml チューブに移した。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 1 分間静置後、上清を除いた。200μl の 1 × binding buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.05 % Tween20] を添加し、5 秒間ボルテックスミキサー (Present Mixer 2011; TAITEC, Japan) によって懸濁した。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 1 分間静置後、上清を除いた。再度 1 × binding buffer によって磁性粒子を洗浄後、180μl の 2 × binding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.1 % Tween20] と 180 μl の精製 PCR 産物を添加し、ローターで 20 分間攪拌しながらインキュベートした。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 1 分間静置後、上清を除いた。1 × binding buffer による洗浄操作を 3 回、2 × binding buffer による洗浄を 1 回おこなった。直前に調整しておいた 0.1 M NaOH を 50 μl 添加し、10-15 回ゆっくりとピペッティングした後、4 分間室温で静置した。マグネットスタンド (Takara Bio, Japan) に 2 分間静置した後、上清を透析チューブ (Xpress Micro Dialyzer MD100, 100μl, MWCO 6-8kDa; Scienova, Germany) に移し、1 ml のサンプルバッファーが入った 2ml チューブに浸して 30 分間室温で静置した。30 分毎にサンプルバッファーを計 3 回交換して、計 2 時間透析した。透析チューブから新しいチューブに ssDNA 溶液を移し、次のセレクションあるいは配列解析まで 4°C で保存した。

#### 2.2.5. 次世代シーケンサーによる配列解析

Ion PGM system (Life technologies, USA)を用いた配列解析では、まずエマルジョン PCR によ

って油中水滴エマルジョン内で解析する DNA をビーズ上でモノクローナルに増幅する。モノクローナルに増幅された DNA を有する各々のビーズは、半導体チップ内のウェルにロードされ、1種類ずつ添加される dNTP を消費して DNA ポリメラーゼによる伸長反応が起こる。伸長反応の際のプロトンの放出によって生じる pH 変化を検出することで、塩基配列が読まれる。つまり、配列解析のためには、エマルジョン PCR の際にビーズ上に目的配列を捕捉するためのアダプター配列と、伸長反応に必要な sequencing primer と相補的な配列、さらに複数のサンプルを識別するためのバーコード配列を、読みたい配列に付加する必要があった。したがって、tag\_primer\_F と tag\_primer\_R (表 1) を用いた PCR により必要な配列を付加した。PCR 溶液は、PrimeSTAR HS を 10  $\mu$ l, 超純水を 4  $\mu$ l, 0.3  $\mu$ M tag\_primer\_F を 2  $\mu$ l, 0.3  $\mu$ M tag\_primer\_R を 2  $\mu$ l, 1-3 nM ssDNA ライブラリー (ラウンド毎に精製したもの) を 2  $\mu$ l ずつ混合して調製した。サーマルサイクラー (Takara Bio Inc., Japan) を用いて、始めに 94°C で 1 分間加熱した後、「94°C/15 s, 66°C/5 s, 72°C/20 s」という操作を 13-14 回繰り返した後、PAGE によって目的のサイズの DNA が増幅されているかを確認した。tag\_primer\_F (63 mer) と tag\_primer\_R (43 mer) は長さ (Tm 値) が異なるため、増幅効率はよくない。したがって、十分な量の DNA サンプルを得るために、得られた PCR 産物をテンプレートとして更なる PCR をおこなった。tag\_primer\_F\_short, tag\_primer\_R\_short (表 1) という短いプライマーを用いた。PCR 溶液は、PrimeSTAR HS を 25  $\mu$ l, 超純水を 10  $\mu$ l, 5  $\mu$ M tag\_primer\_F\_short を 5  $\mu$ l, 5  $\mu$ M tag\_primer\_R を 5  $\mu$ l, 10-20 倍希釈 PCR 産物 (tag\_primer\_F と tag\_primer\_R によって増幅したもの) を 5  $\mu$ l ずつ混合して調製した。サーマルサイクラー (Takara Bio, Japan) を用いて、始めに 94°C で 1 分間加熱した後、「94°C/15 s, 55°C/5 s, 72°C/20 s」という操作を 10-11 回繰り返した後、PAGE によって目的のサイズの DNA が増幅されているかを確認した。Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Japan) によって、PCR 産物のカラム精製をおこなった。すべてのサンプルは 26 pM に希釈し、Ion OneTouch™ 2 system (Life technologies, USA) と Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life technologies, USA) を用いてエマルジョン PCR とビーズ精製をおこなった。操作は付属のプロトコル (Publication Number MAN0007220, Rev.5.0) に従った。エマルジョン

PCR 後の精製ビーズを用いて, Ion PGM system (Life technologies, USA)と半導体チップ Ion 314 chip と Ion 318 chip (Life technologies, USA), Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (Life technologies, USA)を用いた配列解析をおこなった. 操作は付属のプロトコル(Publication Number MAN0007273, Rev.3.0)に従った. シーケンスデータは FASTAQ ファイルとして出力し, CLC Genomics Workbench (CLC bio, Denmark)で DNA ライブラリーの固定配列を除き, 28-32 mer のランダム配列のみを抽出した. さらに重複配列のカウント数を調べた.

#### 2.2.6. 表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance, SPR) 法による相互作用解析

Biacore X100 (GE healthcare, UK)を用いて, トロンビンとアプタマーの相互作用解析をおこなった. サンプル・ランニングバッファーとして, HBS-P buffer [10 mM HEPES (pH = 7.4) 150 mM NaCl, 0.05 % v/v surfactant P20](GE healthcare Co., Little Chalfont, UK)を用いた. カルボキシメチルデキストラン修飾された CM5 sensor chip (GE healthcare Co., Little Chalfont, UK)を流路にセットし, 10  $\mu$ l/ min の流速で EDC/NHS 溶液を 7 分間流し, センサーチップ上のカルボキシ基を活性化した. 10 mM acetic acid/sodium acetate buffer, pH 6.0 で希釈した 10-20  $\mu$ g/ ml トロンビン溶液を 7 分間流した. 最後に 1.0 M ethanolamine-HCl (pH 8.5)を 7 分間流してカップリング反応を完了させた. 1300-3800 RU の範囲のトロンビン固定化量で測定した. アプタマーを, サンプルバッファーを用いて 2-4  $\mu$ M に希釈し, サーマルサイクラー(Takara Bio Inc., Japan)を用いて 95°Cで 2 分間加熱した後, 0.1°C/s の速さで 25°Cまで冷却することアニーリングした. アニーリング後, サンプルバッファーで希釈系列を調整した. 測定中は 10-30  $\mu$ l/ min の流速でサンプルを流した. 再生溶液として, 1 M NaCl 溶液を用いた. 1 M NaCl 溶液で再生できなかったアプタマーについては, シングルカイネティクスモード (途中に再生の工程をばさない) で測定し, それ以外はマルチカイネティクスモードで測定した. Biacore X100 evaluation software (GE healthcare Little Chalfont, UK)を用いて, 解離定数を算出した.



### 2.2.7. アプタマーの特異性評価

Agilent 7100 (Agilent technologies Inc., CA, USA)を用いた。キャピラリーは長さ 49.7 cm, 有効長 41.5 cm の 50  $\mu\text{m}$  内径バブルセルフェーズドシリカキャピラリー (Agilent technologies, USA) を用いた。インレット側 (注入口, 陽電極側) とアウトレット側 (溶出口, 陰極側) の電極の間から, 等しい長さのキャピラリーが出るようにキャピラリーをカセットにセットした。カセット内の温度は 25°C に設定した。前処理のために 0.1 M NaOH 水溶液を約 1 bar の圧力適用によって 10 分間流した。同様に, 泳動バッファー [100 mM borate (pH 8.5)] を 10 分間流した。タンパク質とアプタマーは, サンプルバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% v/v tween20] で溶解または希釈した。アニーリングのためにサーマルサイクラー (Takara Bio, Japan) によってアプタマー溶液を 95°C で 2 分間加熱した後, 0.1°C/s の速さで 25°C まで冷却した。アニーリング後, サンプルバッファーで調製したトロンビン溶液, アポトランスフェリン, あるいはウシ血清アルブミンと各アプタマーを混合し, 30 分間室温 (25°C) でインキュベートした。タンパク質の終濃度は 1  $\mu\text{M}$ , アプタマーの終濃度は 0.5  $\mu\text{M}$  とした。ターゲット/アプタマー混合溶液は, 圧力適用によりキャピラリーのインレット側から注入した。注入量は, 20 nl と予測された。50  $\mu\text{l}$  の泳動バッファーが入ったバイアルをインレット側 (注入口, 陽極側) とアウトレット側 (溶出口, 陰極側) 両方にセットし, 30 kV の定電圧を引加した。電気泳動中は, ダイオードアレイ検出器によって 195, 260, 280, 550 nm における吸光度を経時的に測定した。

### 2.2.8. アプタマーのキャピラリー壁への吸着評価

蛍光検出器付きの Agilent 7100 (CE-LIF, Agilent technologies Inc., CA, USA) を用いた。キャピラリーは長さ 30.2 cm, 有効長 20.0 cm の 50  $\mu\text{m}$  内径 CEP コーティングキャピラリー (Agilent technologies, USA) を用いた。コーティングキャピラリーを用いると電気浸透流は抑制されるため, フェーズドシリカキャピラリーを用いた系の電極の向きを反転させた。インレット側 (注入口, 陰極側) とアウトレット側 (溶出口, 陽極側) の電極の間から, 等しい長さのキ

キャピラリーが出るようにキャピラリーをカセットにセットした。カセット内の温度は 25°C に設定した。前処理のために泳動バッファー[10 mM phosphoric acid, 5 mM KCl (pH = 7.7)]を 10 分間流した。タンパク質とアプタマーは、サンプルバッファー[10 mM phosphoric acid, 5 mM KCl (pH = 7.7)]で溶解または希釈した。アニーリングのためにサーマルサイクラー (Takara Bio, Japan) によってアプタマー溶液を 95°C で 2 分間加熱した後、0.1°C/s の速度で 25°C まで冷却した。アニーリング後、サンプルバッファーで調製したトロンビン溶液と 5' 末端を 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) で修飾した各アプタマーを混合し、30 分間室温 (25°C) でインキュベートした。タンパク質の終濃度は 200 nM, アプタマーの終濃度は 100 nM とした。ターゲット/アプタマー混合溶液は、圧力適用によりインレット側から注入した。注入量は、50 nl と予測された。50 µl の泳動バッファーが入ったバイアルをインレット側 (注入口, 陰極側) とアウトレット側 (溶出口, 陽極側) 両方にセットし、-10 kV の定電圧を引加した。

### 2.2.9. 統計解析

マイクロ粒子の CE 検出時間, アプタマーのトロンビンに対する解離定数, トロンビン/アプタマー複合体の CE 検出時間は、最低 3 回繰り返し測定した値の平均値±標準誤差で示した。また、CE-SELEX と MACE-SELEX 各手法で獲得したアプタマー群の複合体 CE 移動度の標準偏差を一元配置分散分析法によって算出した。

表1 オリゴ DNA 配列表

ID	配列 (5'→3')
ssDNA ライブラリー	AGCAGCACAGAGGTCAGATG-N(30)-CCTATGCGTGCTACCGTGAA
forward primer	AGCAGCACAGAGGTCAGATG
5'-biotinylated reverse primer	Biotin-TTCACGGTAGCACGCATAGG
tag_primer_F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATA GCAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATA GCAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATAG CAGCACAGAGGTCAGATG
tag_primer_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTACGGTAGCACGCATAGG
tag_primer_F_short	CCATCTCATCCCTGCGTGTC
tag_primer_R_short	CCTCTCTATGGGCAGTCGGT

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. MACE 分離による抗トロンビンアプタマー候補配列の濃縮

本研究の目的は、血液凝固カスケードの最下流に位置するトロンビンを標的とした新たな抗凝固アプタマー製剤の獲得である。そのために、まずは薬剤候補となりうる高親和性のアプタマー群を効率的に取得する必要がある。アプタマー選抜法の第一選択肢として CE-SELEX が挙げられるが、序論で述べたように技術的制約が多く CE の分離性能を十分に発揮できていない。もしこの制約をクリアできれば、抗トロンビンアプタマー候補群の迅速な濃縮のみならず、他のターゲットに対しても応用できる堅牢なアプタマー取得基盤の確立につながると考えた。

図 8 に本研究で開発したマイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX) の概略図を示す。MACE-SELEX の工程は、(1) 核酸ライブラリーとターゲット固定化マイクロ粒子(直径 1  $\mu\text{m}$ ) の混合、(2) CE によるマイクロ粒子すなわちターゲット/アプタマー複合体の非結合性核酸ライブラリーからの分離と分取、(3) 分取したアプタマー候補の PCR による増幅、(4) 一本鎖化による核酸ライブラリーの再構成といった一連の操作を繰り返すことで、アプタマー候補配列を濃縮する。この MACE-SELEX の性能を評価するために、従来型の CE-SELEX による選抜も並行しておこなった。

はじめに、ターゲットであるトロンビンをマイクロ粒子に固定した。核酸ライブラリー非特異的な相互作用を抑制するために、表面が負電荷のカルボキシ基で覆われたマイクロ粒子 (Dynabeads MyOne™ Carboxylic Acid, 1  $\mu\text{m}$  diameter; Invitrogen, USA) を担体として使用した。EDC を用いたアミンカップリング法により、トロンビン内の一級アミンを介してマイクロ粒子に固定した結果、トロンビン固定化反応の前後でマイクロ粒子の CE 移動度が変化した(図 9)。この CE 移動度の変化はトロンビン分子の固定化量に依存するということが分かった(図 10)。

これは、カルボキシ基がアミド結合に変化したことで粒子表面の電荷密度が低下、すなわち粒子表面のゼータ電位が変化したためであると考えられる。したがって、CE 移動度変化の観測により、トロンビンが粒子上に固定化されていることを確認した。

次に、マイクロ粒子に対する核酸ライブラリーの非特異的な相互作用の有無を調べた。トロンビン固定化マイクロ粒子と非固定化マイクロ粒子をそれぞれ核酸ライブラリーと混合し、CE によって粒子由来のピーク範囲を分取した (図 9C, D)。それぞれの分取サンプル中に含まれる ssDNA 量を、PCR 増幅後の PAGE によって間接的に比較した。結果、レーン I のトロンビン非固定化マイクロ粒子の分取サンプル由来の DNA バンドはほとんど検出されなかったのに対し、レーン II のトロンビン固定化マイクロ粒子のものではバンドが検出された (図 11)。以上の結果から、核酸ライブラリーとマイクロ粒子はほとんど非特異的な相互作用をしないことを確認した。

ターゲット分子や核酸ライブラリー濃度、バッファー組成等の実験条件を統一し、CE-SELEX と MACE-SELEX によるアプタマー候補の分離と濃縮を開始した。CE 分離においては、核酸ライブラリー由来のピークがおおよそ  $t = 11.6 \text{ min}$  に検出されたが、目的の複合体を検出することはできなかった (図 12A)。したがって、先行研究にならい、核酸ライブラリーピークの直前までの広い範囲 ( $t = 6.0\text{-}10.9 \text{ min}$ ) を分取した (図 12A)<sup>34,39,40</sup>。一方 MACE 分離においては、マイクロ粒子、すなわち複合体由来のピークが高感度に検出された (図 12B)。この粒子由来のピーク範囲のみ ( $t = 6.8\text{-}7.8 \text{ min}$ ) を正確に分取することで、解離が早く親和性の低い核酸を排除できると仮定した。

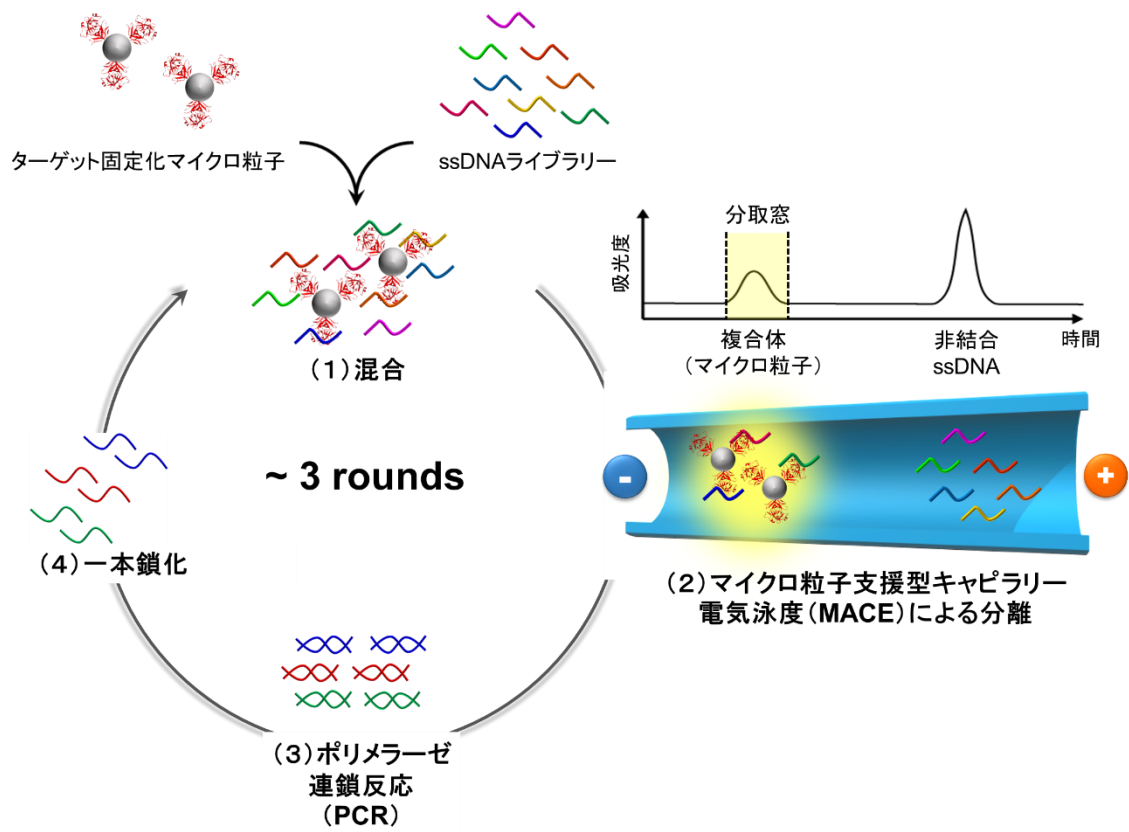


図 8 マイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis systematic evolution of ligands by exponential enrichment; MACE-SELEX) の概略図

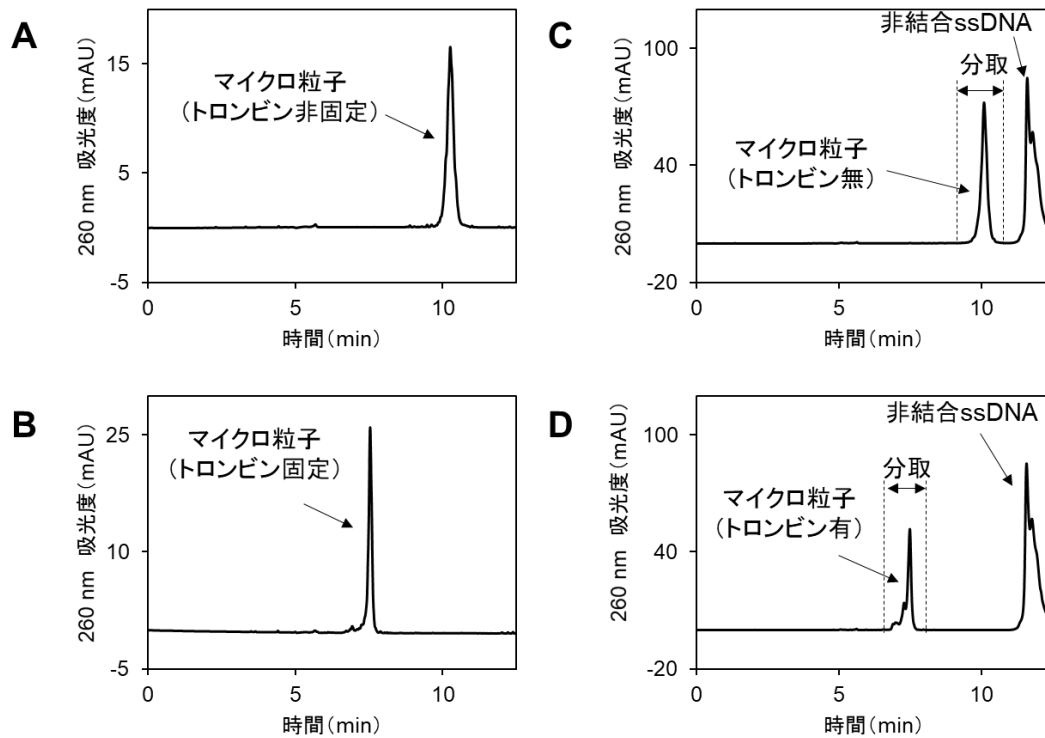


図 9 マイクロ粒子と DNA ライブラリーの MACE 分離における電気泳動フェログラム

注入サンプル：(A) トロンビン非固定ビーズ，(B) トロンビン固定化ビーズ，(C) トロンビン非固定マイクロ粒子と ssDNA ライブラリーの混合溶液，(D) トロンビン固定化マイクロ粒子と ssDNA ライブラリーの混合溶液．注入量：(A, B) 32 nL, (C,D) 65 nL．終濃度：[マイクロ粒子] = 1.0 mg/mL ( $7-9 \times 10^8$  beads/mL); [トロンビン] = 1  $\mu$ M, [ssDNA ライブラリー] = 10  $\mu$ M．サンプルバッファー組成：20 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>．泳動バッファー組成: 100 mM borate (pH = 8.5)．

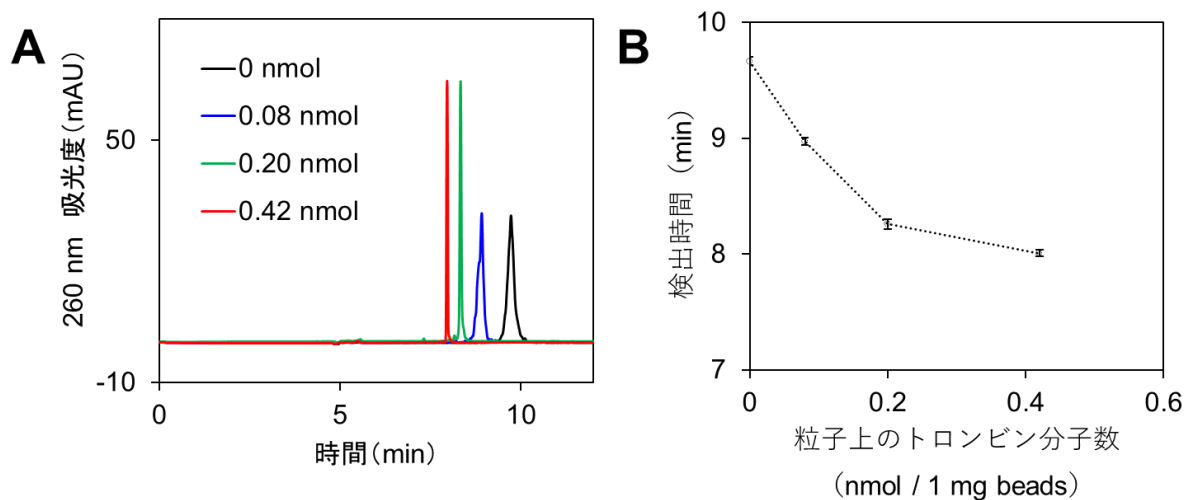
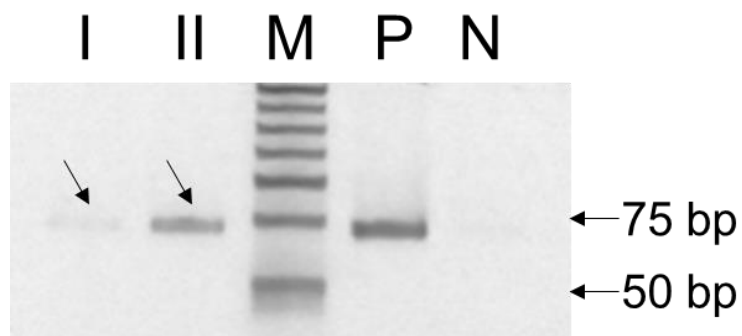


図 10 トロンビン固定後のマイクロ粒子の CE 移動度変化

(A) 異なる濃度のトロンビンを固定化した時のマイクロ粒子の CE フェログラム. (B) マイクロ粒子の検出時間のプロット (mean  $\pm$  SE, n=3). 注入量: 32 nL, 終濃度: [マイクロ粒子] = 1.0 mg/mL ( $7.9 \times 10^8$  beads/mL), サンプルバッファー組成: 20 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 泳動バッファー組成: 100 mM borate (pH = 8.5).





**図 11 MACE 分離によって回収した ssDNA サンプルの PCR 産物のポリアクリルアミド電気泳動**

テンプレート：(レーン I) 図 9C のトロンビン非固定マイクロ粒子ピーク領域の分取サンプル，(レーン II) 図 9D のトロンビン固定化マイクロ粒子ピーク領域の分取サンプル，(レーン P) ポジティブコントロールとして 10pM ssDNA ライブラリー，(レーン N) ネガティブコントロールとして超純水．レーン M にはマーカーとして 25 bp DNA step ladder をアプライした．矢印は目的 PCR 産物を示す．

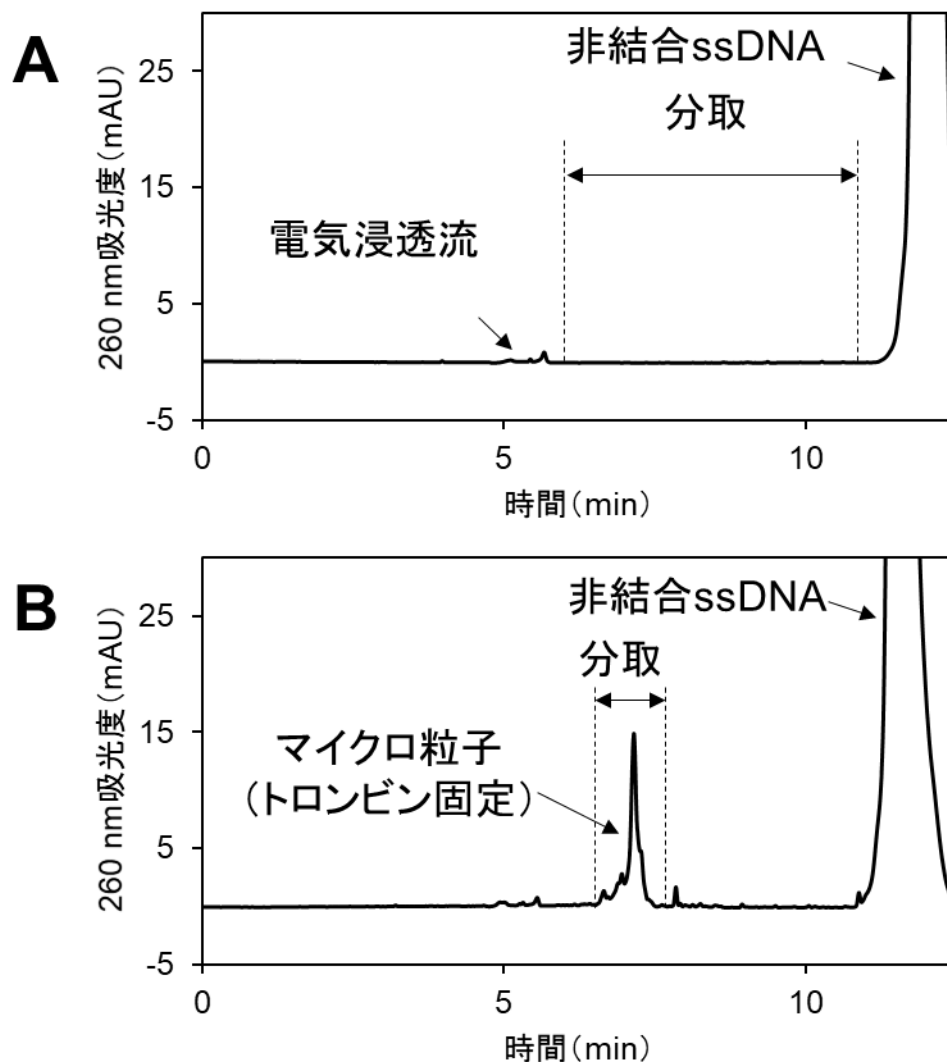


図 12 CE-SELEX と MACE-SELEX におけるアプタマー候補 ssDNA の分取領域

泳動サンプル：(A) ssDNA ライブラリーとトロンビンの混合溶液。(B) ssDNA ライブラリーとトロンビン固定化マイクロ粒子の混合溶液. 終濃度：[マイクロ粒子]= $0.1 \text{ mg/mL} = 7.9 \times 10^7 \text{ beads/mL}$  , [トロンビン]= $200 \text{ nM}$  , [ssDNA ライブラリー]= $10 \text{ }\mu\text{M}$ . 分取領域：(A) CE-SELEX= $6.0\text{-}10.9 \text{ min}$  , (B) MACE-SELEX= $6.8\text{-}7.8 \text{ min}$ . サンプルバッファー組成： $20 \text{ mM Tris-HCl (pH = 7.4)}$  ,  $10 \text{ mM NaCl}$  ,  $1 \text{ mM MgCl}_2$ . 泳動バッファー組成： $100 \text{ mM borate (pH = 8.5)}$ .

### 2.3.2. 抗トロンビンアプタマー候補の配列解析

計3ラウンドのCE-SELEXとMACE-SELEXで得られたそれぞれのアプタマー候補配列を、ハイスループットシーケンサー (Ion PGM system, Life technologies, USA) によって解析した。ラウンド毎におよそ90000-800000配列を読むことに成功した。サンプル間のリード数のばらつきを補正するため、存在率を下式(6)のように定義して算出した。

$$\text{存在率} = (\text{各配列のカウント数} / \text{総リード数}) \times 100 (\%) \cdots (6)$$

一般的に、存在率が高い、すなわち濃縮されている配列ほど親和性が優れているアプタマーである可能性が高い。そこで、各選抜法で得られた最終3ラウンド後のアプタマー候補配列のうち、存在率が上位10個の配列について解析を進めることにした。配列名を、C01-10 (CE-SELEXで獲得)、M01-10 (MACE-SELEXで獲得)とした。表2は各選抜法で得られた上位10配列と存在率を示す。これらの配列と、最もよく知られている既報の抗トロンビンアプタマーHD1<sup>54</sup>とHD22<sup>89</sup>を比較したところ、M04とM05はHD22と非常に類似した配列を含むことが分かった(図13)。それ以外の配列で特に既報のアプタマーと類似した配列はなかったが、HD1やHD22と同様にグアニン(G)リッチであるという共通点があった。また、各選抜法で最も濃縮されていた配列の存在率は、CE-SELEXが0.16%、MACE-SELEXが43%であった(表2)。BowserらのCE-SELEXを用いた抗VEGFアプタマーの取得に関する報告によれば、4ラウンド目終了時点で存在率は最大0.8%程度であり<sup>83</sup>、本研究のCE-SELEXで得られた結果と同等のオーダーである。一方、MACE-SELEXによる選抜で得られた上位配列の存在率に関しては、CE-SELEXで得られたものと比べて200倍以上高い値を示しており、先行研究とは異なる濃縮傾向を示していた点は興味深い。MACE-SELEXにおいて高い濃縮が得られた原因としては、分取領域の違いが考えられる。CE-SELEXの分取領域には標的分子と結合しているssDNAに加え、途中で解離した比較的結合能の低い配列が含まれる<sup>36</sup>。すなわち、多様な結合特性をもつ配列が一度に分取されやすい。一方で、MACE-SELEXの分取領

域は複合体のみが存在する限定的な領域であり，理論上は途中で解離した比較的結合能が低い配列は分取され難い．ゆえに，MACE-SELEX では特定の配列が濃縮されやすい条件であると考察した．

表 2 3 ラウンドの CE-SELEX と MACE-SELEX で獲得された存在率上位 10 配列

ID	配列 (5' → 3', 下線部はランダム領域)	存在率 (%)
CE-SELEX	C01 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTTTGGGTGGTTAGGTGTTGACCTGGGATG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.16
	C02 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GAGTCGGGTGGCTATTGGGTATGGACCGTG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.16
	C03 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GATGGTGTAGGTTGGGAGAGGCTCAGTGCC</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.064
	C04 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>TTGGTGGGTGGCTTTGGGTATTTACTTGG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.047
	C05 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTTGGATTGGGTGGATTGGTATGAACAG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.043
	C06 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTTGGGTAGGCTTGGATAGGGGCAAGTAGA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.043
	C07 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTTGACTATTATGGTGTGGTGGTATGGT</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.042
	C08 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTTGGGTGGTGTGGGTAGTGATCCCTGTG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.037
	C09 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>TGGATTGGTTGGATTGGGGTGTGACTGTG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.033
	C10 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>TCGGGTGGATTGGTTGGCTTAAACTATGT</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.022
MACE-SELEX	M01 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>TTAGGGTTGGCAGGGTGGCTGACTAATGTA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	43
	M02 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>AAGAGGGTGGAGTGGTTGGCTTCACAATGG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	19
	M03 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GTGGTCGGGGTGGTGGGATGAGGGTCTGA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	7.1
	M04 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GCGTGGTAGGGCAGGTGGGGTCCATGTTG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	4.0
	M05 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GCCGTGGTAGGGTAGGTTGGGGTGCCATGA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	2.1
	M06 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>ATGGAGGTTGGTCGGGTGGGCAATCATTC</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	1.7
	M07 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>TTAGGGTTGGGAGGGTGGCTGACTAATGTA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	1.7
	M08 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>ATGGGGATGGGGGTTGGAGGAATGGATGA</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.84
	M09 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>GGGTTGGATTGGGTGGCGGTGTGAACATATG</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.60
	M10 AGCAGCACAGAGGTCAGATG <u>AGCCGGGTTGGGGGGGTGGAGGAGCTCGTT</u> CCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.54



図 13 アライメントによる配列比較

ClustalW を用いて既報のアプタマーHD1,HD22 と本研究で獲得したアプタマー群の配列を比較した.

### 2.3.3. 抗トロンビンアプタマーの親和性と特異性

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) センサーを用いて、表 2 の本研究で獲得した配列のトロンビンに対する親和性を評価した。アプタマーの性能を客観的に評価するために、既報の抗トロンビンアプタマーである HD1, HD22, NU172, Thr-08 の解離定数  $K_d$  と比較した。HD1 は世界で初めて報告された抗トロンビンアプタマーであり、最もよく知られている<sup>54</sup>。HD22 も最もよく知られているアプタマーの一つであり、HD1 に勝る親和性をもつ<sup>89</sup>。NU172 は、抗凝固トロンビンアプタマー製剤として唯一臨床第 II 相に進んだ実績がある<sup>65</sup>。Thr-08 (Thrombin 03) は、近年報告された HD1 や HD22 を上回る親和性をもつアプタマーである<sup>90,91</sup>。比較の際の懸念点として、核酸アプタマーの解離定数  $K_d$  は、測定法や条件に大きく依存するということが挙げられる (表 3)。よって本研究では、全く同じ実験条件で測定した既報のアプタマーの親和性と比較することにした。結果として、CE-SELEX で獲得した C01-10 の親和性は  $K_d = 57 \pm 7.3$  から  $5278 \pm 1019$  nM であったのに対し、MACE-SELEX で獲得した M01-10 は  $K_d = 4.5 \pm 0.4$  から  $231 \pm 66$  nM であった (図 14)。前述の仮説通り、MACE-SELEX では CE-SELEX より最大で 10 倍以上優れたアプタマーが濃縮されていた。特に、MACE-SELEX で獲得されたアプタマーのうち半数 (M03, M04, M05, M06, M08) が、HD1, HD22, NU172 (それぞれ  $K_d = 118 \pm 12, 13 \pm 1.6, 12 \pm 1.7$  nM) を上回り、かつ Thr-08 ( $K_d = 2.9 \pm 0.7$ ) と同オーダーであった。

次に、本研究で獲得したアプタマーのトロンビンに対する特異性を、CE によって定性的に評価した。具体的には、トロンビン以外の血中タンパク質であるウシ血清アルブミンやアポトランスフェリンと各アプタマーを混合し、CE によって分離した。結果、標的以外のタンパク質を混合しても、複合体由来のピークの検出や非結合アプタマー由来のピークの減少が観測されない、すなわち相互作用しないことから、これらはトロンビン特異的なアプタマーであることがわかった。

表 3 HD1 を例にした測定条件による解離定数  $K_d$  値の違い

ID	測定法	バッファー組成	$K_d$ (nM)	文献
HD1	SPR (aptamers were immobilized on the chip)	PBS	1.19	92
	Binding assay using nitrocellulose filter	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mM Tris acetate (pH 7.4)	75-100	89,93
	Binding assay using microtiter wells	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mM Tris acetate (pH 7.4)	1.4-6.2	89,94
	ITC	20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub>	31.25	95
	Capillary electrophoresis	20 mM Tris-HCl (pH 8.3) 5 mM KCl and 1 mM MgCl <sub>2</sub>	240	96



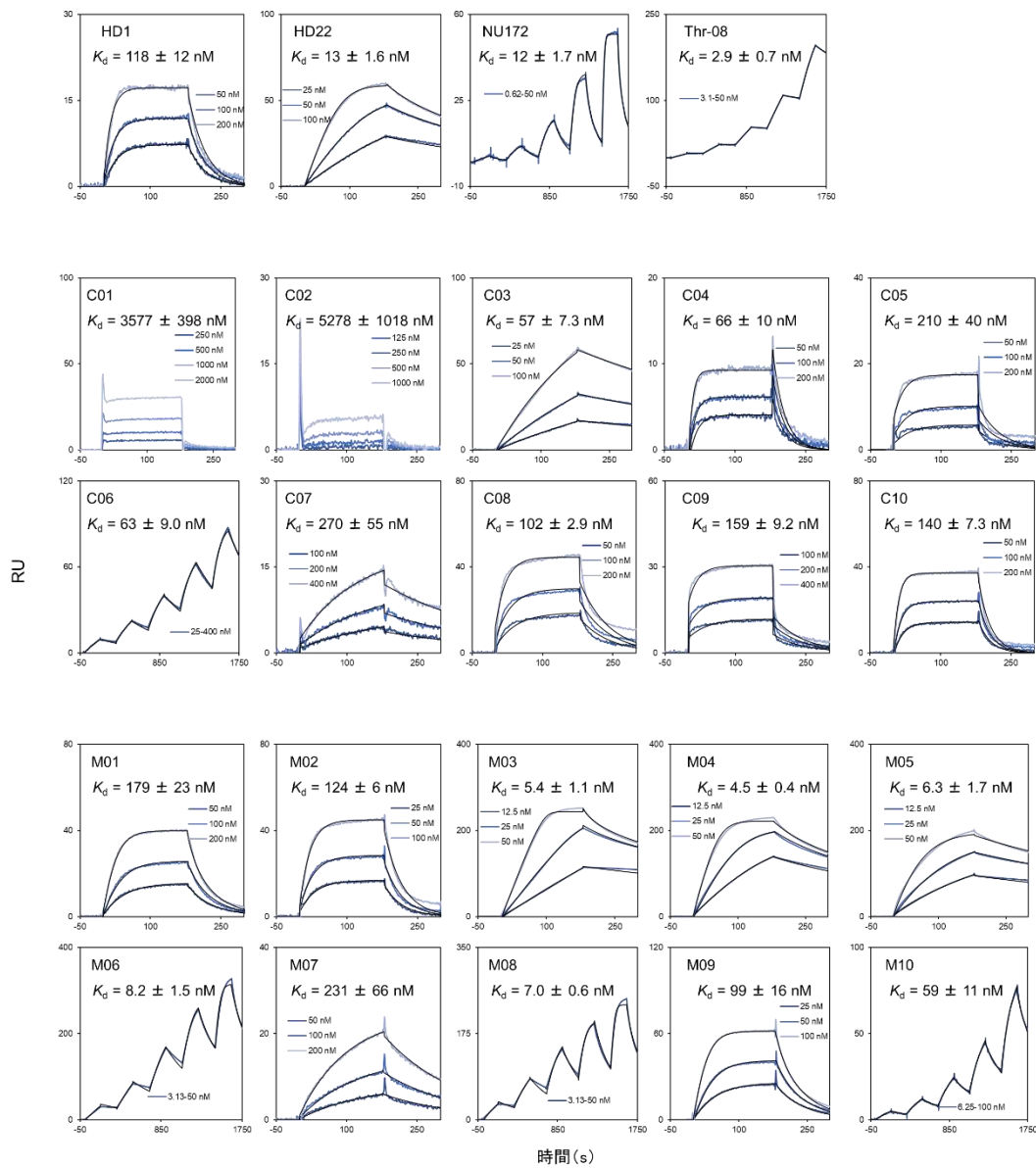


図 14 トロンビンアプタマーの解離定数  $K_d$  測定における表面プラズモンセンサグラム

バッファー : 10 mM HEPES (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% surfactant P20 (v/v).  $K_d = \text{mean} \pm \text{SE}$ , n=3.

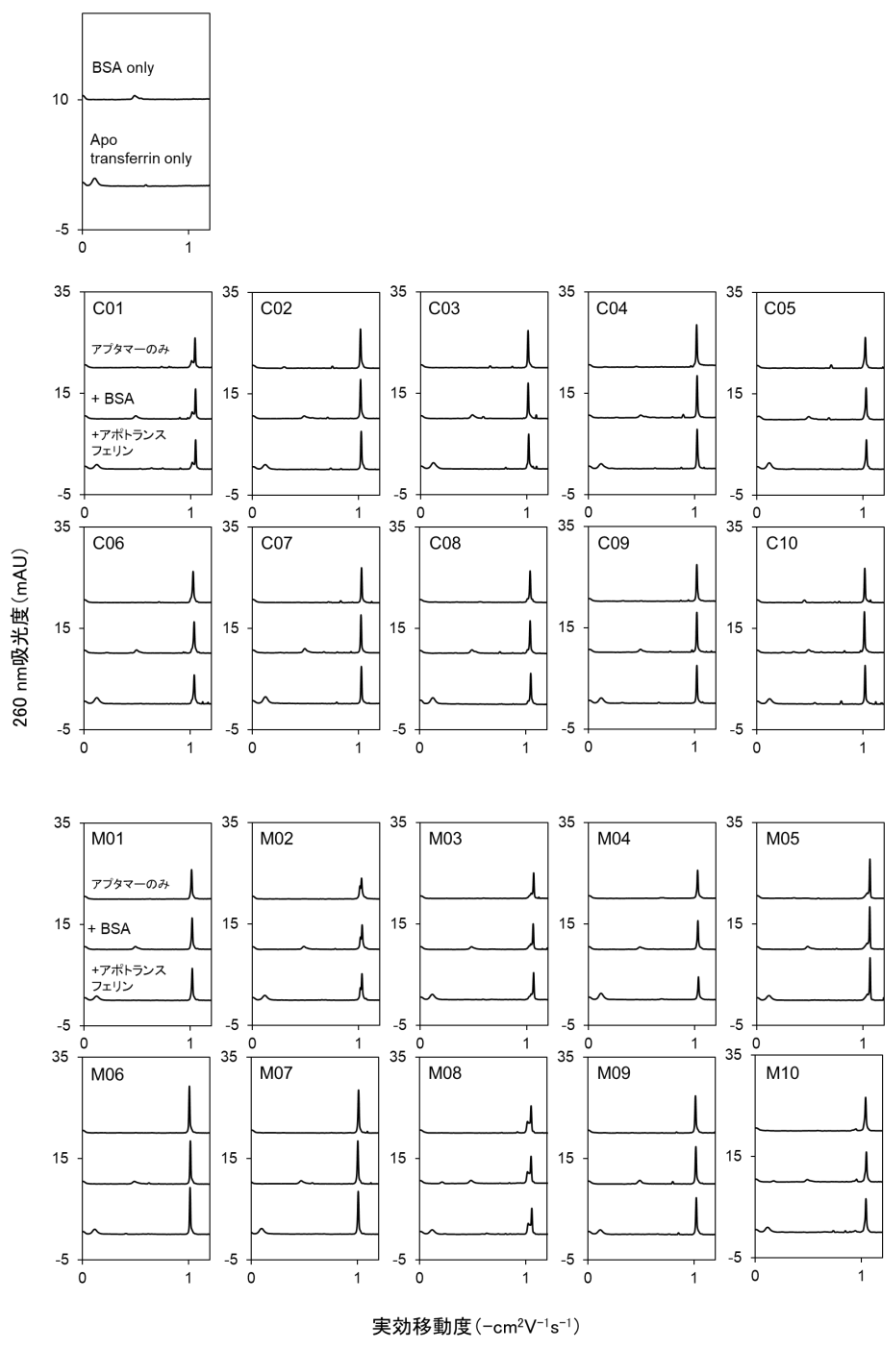


図 15 CEによるトロンビンアプタマーの特異性評価

泳動サンプルとして、500 nM アプタマーのみ、500 nM アプタマーと 1  $\mu$ M BSA (+ BSA) または アポトランスフェリン (+ アポトランスフェリン) の混合溶液を用いた。注入量：20 nL。サンプルバッファー：20 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.01% tween 20 (v/v)。泳動バッファー：100 mM borate (pH = 8.5)。

#### 2.3.4. 抗トロンビン/アプタマー複合体の CE 移動度

本項では、MACE-SELEX で獲得したアプタマーが形成する複合体のユニークな CE 挙動についての報告する。理論上、フューズドシリカキャピラリーを用いた CE では、複合体が核酸ライブラリーよりも早く溶出すると予想される。したがって、CE-SELEX で設定した核酸ライブラリー前方の広い分取領域 (図 12A) 内に複合体が存在するはずである。実際に CE-SELEX で獲得したアプタマー C01-10 とトロンビンの混合溶液を CE 分離すると、複合体由来のピークが非結合アプタマーピークの手前に検出された (図 16 上段)。一方で、MACE-SELEX で獲得した M01-02 と M06-10 については、非結合アプタマーピークが大きく減少、すなわち複合体を形成しているにも関わらず、複合体由来のピークは検出されなかった (図 16 下段)。この複合体が検出されなかった原因として、複合体とキャピラリー壁が強く相互作用して溶出が遅れている可能性が考えられた。この仮説を検証するために、タンパク質が吸着しにくい親水性のポリマーによって内壁がコートされたキャピラリーを用いて複合体の検出を試みた。結果、すべてのアプタマーで非結合アプタマーよりも CE 実行移動度が低い複合体ピークが検出された (図 17)。つまり、M01-02 と M06-10 は複合体形成時に疎水性が高まり、キャピラリー壁に吸着していた可能性が高く、CE-SELEX の分取法では獲得できないアプタマーであると予想される。また、図 18 に示すように複合体の移動度をプロットすると、CE-SELEX で獲得したアプタマー群は均一 ( $SD = 0.031$ ) であったのに対し、MACE-SELEX で獲得したアプタマー群は大きくばらついていた ( $SD = 0.259$ )。以上の結果より、MACE-SELEX では複合体の CE 移動度に依存せずにアプタマーが濃縮可能であるといえる。言い換えれば、CE-SELEX では M06 や M08 のような多くの高親和性アプタマーを取りこぼしている可能性が示唆された。この差は、複合体単独に比べてマイクロ粒子の CE 移動度が支配的であることに起因すると考えられる。

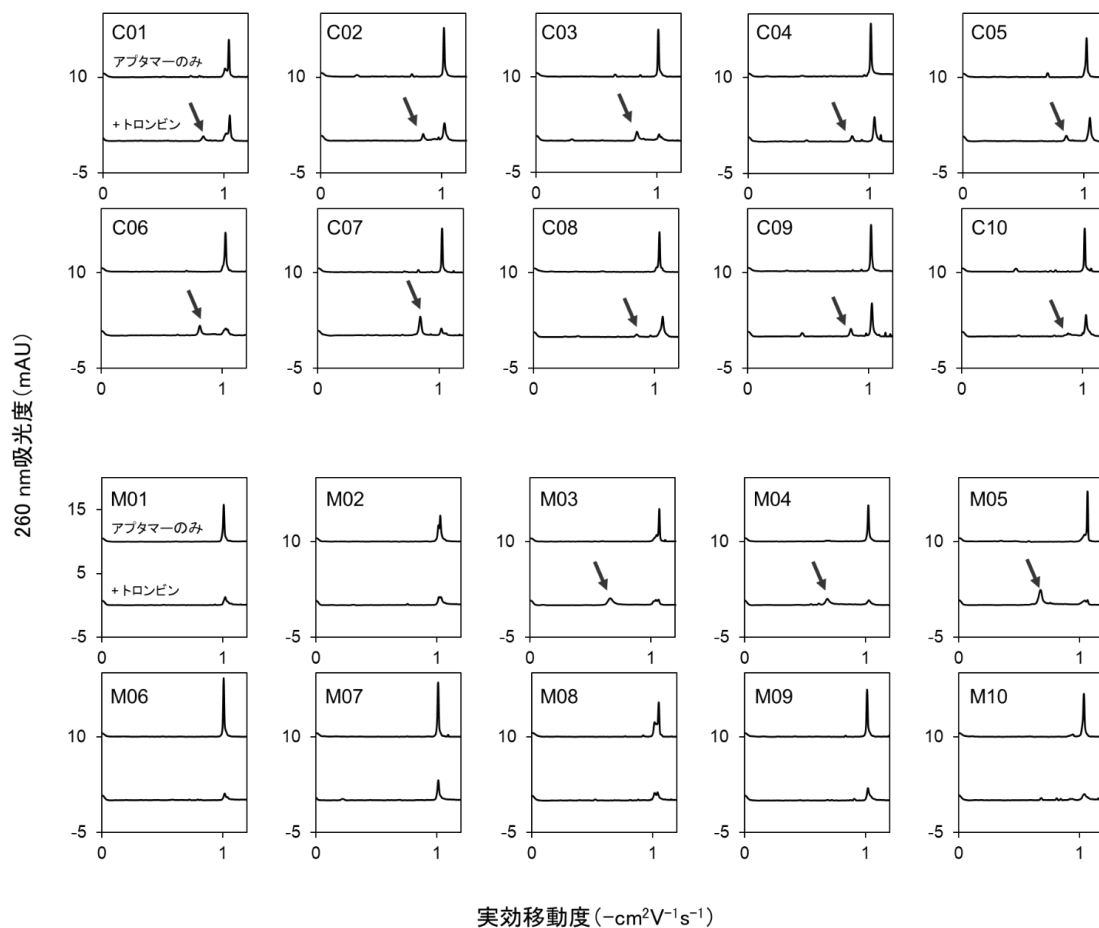


図 16 アプタマー/トロンビン複合体の CE 挙動 (フェーズドシリカキャピラリー)

矢印は複合体由来のピークを示す. 泳動サンプルとして, 泳動サンプルとして, 500 nM アプタマーのみ, 500 nM アプタマーと 1  $\mu$ M トロンビン (+ トロンビン) の混合溶液を用いた. 注入量: 20 nL. サンプルバッファー: 20 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , and 0.01% tween 20 (v/v). 泳動バッファー: 100 mM borate (pH = 8.5).

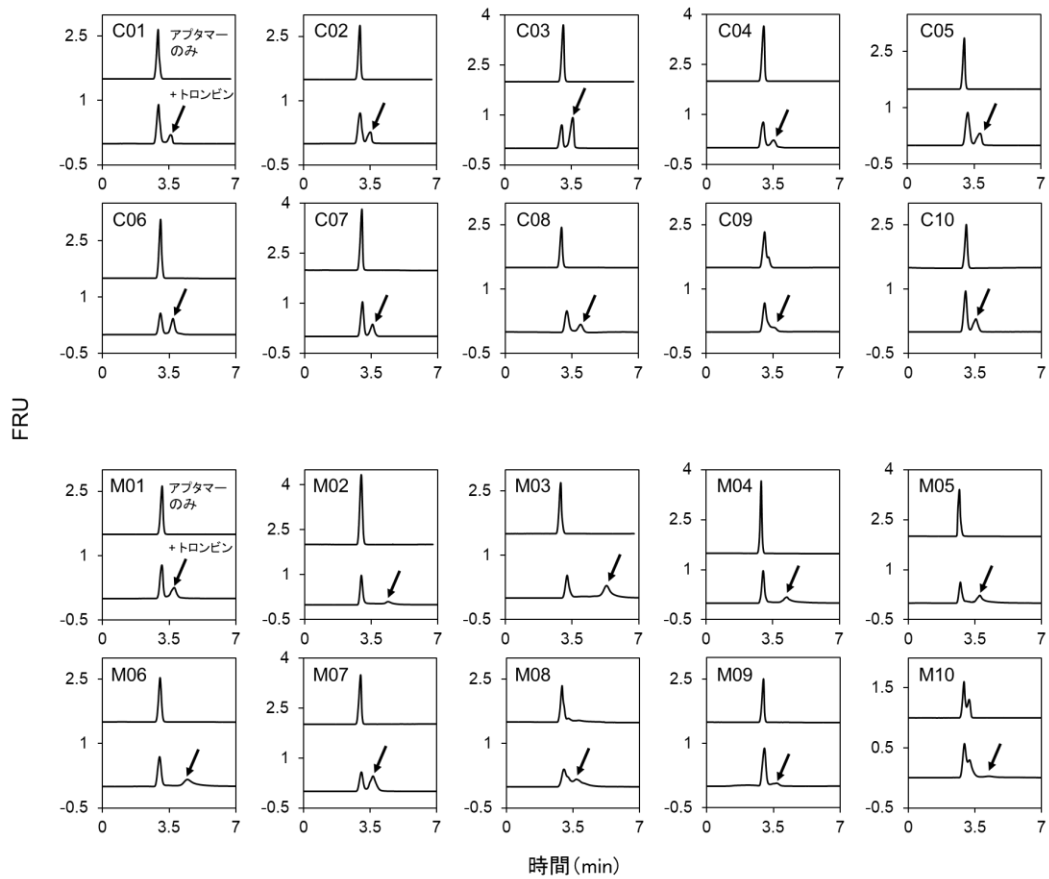


図 17 アプタマー/トロンビン複合体の CE 挙動 (CEP コーティングキャピラリー)

矢印は複合体由来のピークを示す。泳動サンプルとして、100 nM アプタマーのみ、100 nM アプタマーと 200 nM トロンビン(+ トロンビン) の混合溶液を用いた。注入量：20-50 nL。サンプル&泳動バッファー：10 mM phosphoric acid, 5 mM KCl (pH = 7.7)。

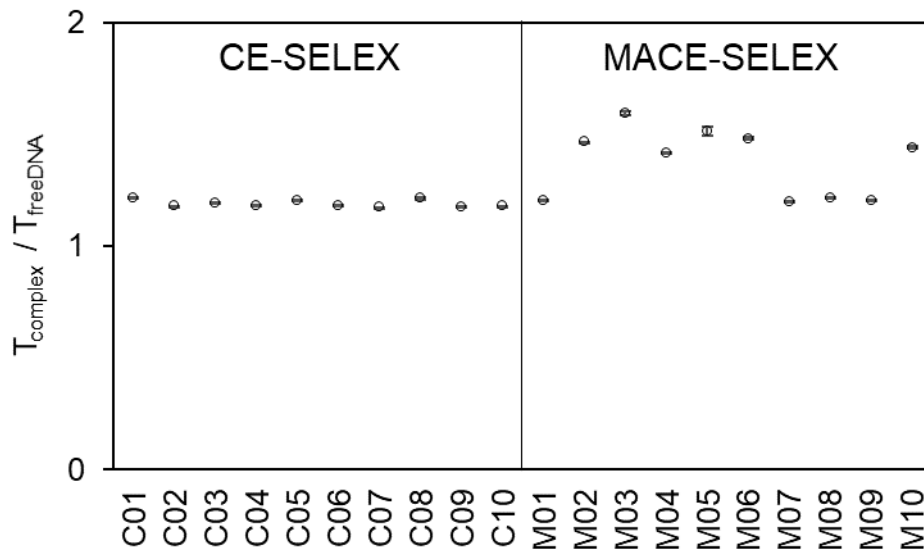


図 18 アプタマー/トロンビン複合体の移動度比較

複合体の検出時間 ( $T_{\text{complex}}$ ) と非結合 DNA の検出時間 ( $T_{\text{freeDNA}}$ ) の比をプロットした (mean  $\pm$  SE, n=3). 一元配置分散分析の結果, C01-10 と M01-10 各グループの値の標準偏差はそれぞれ 0.031, 0.259 であった.

### 2.3.5. MACE-SELEX の非天然アプタマー獲得技術への応用

前項までに、MACE-SELEX による天然塩基アプタマーの迅速な取得技術について報告した。本項では MACE-SELEX の適用範囲を、非天然修飾塩基アプタマーの獲得法まで拡張した結果について報告する。天然塩基アプタマーの構成要素は A, T, G, C というわずか 4 種類に限定されるため、天然抗体の 20 種類のアミノ酸と比較すると分子の化学的多様性の乏しさは否めず、アプタマーを獲得可能なターゲットタンパク質は全体の 30%未満と見積もった報告がある<sup>73</sup>。これまで、塩基、糖およびリン酸等のヌクレオチドの各構成部位に対して様々な修飾が加えられ、アプタマーの親和性や酵素耐性の向上がなされてきた<sup>97</sup>。特に、疎水性のアミノ酸側鎖様の修飾を塩基に加えた SOMAmers (Slow Off-rate Modified Aptamers) と呼ばれるアプタマー取得技術により、SELEX の成功率は 30%未満から 90%以上に向上したとされている<sup>73</sup>。

非天然塩基の導入は強力なアプタマー取得技術であるが、ただでさえ時間と手間のかかる SELEX の工程に、修飾塩基ライブラリーの調製や PCR 増幅及び配列解析時の工夫といった新たな工程が加わることになる。ゆえに、非天然塩基アプタマーを低ラウンド数で獲得する技術は、天然塩基アプタマー以上に価値があるといえる。

そこで、これまでに開発した MACE-SELEX を非天然修飾塩基アプタマーの獲得法に適用することを試みた。本研究では、クリック反応を利用した修飾塩基ライブラリー調製技術を MACE-SELEX に適用した (図 19)<sup>74,75</sup>。まず、先行研究にならって選抜に用いる indole 修飾塩基ライブラリーを調製した<sup>75</sup>。核酸ライブラリーの構成塩基のうち dT を 5-ethynyl-deoxyuridine (EdU)に変換したライブラリーに、合成した 3-(2-azidoethyl)indole をクリック反応によって付加した。3-(2-azidoethyl)indole や indole 修飾塩基ライブラリーの合成効率は<sup>1</sup>H-NMR や HPLC によって評価した (図 20, 図 21)。

調製した indole 修飾塩基ライブラリーを用いて、計 3 ラウンドの MACE-SELEX により、抗トロンビン修飾塩基アプタマー候補を濃縮した。天然塩基ライブラリーの同様に、indole 修飾塩基ライブラリーでも MACE 分離による複合体の高感度な検出と正確な分離が可能で

あった (図 22). 表 1 は 3 ラウンド後の配列解析によって獲得された存在率が上位の配列であり, 最も濃縮された配列の存在率は 4%であった. ターゲットは異なるものの, 同じく indole 修飾塩基ライブラリーを用いた先行研究で 4%の濃縮に 15 ラウンドを要していたことから<sup>74</sup>, MACE-SELEX の濃縮効率の高さがうかがえる.

さらに, 本研究で得られたアプタマーのカイネティクス解析の結果, 既報の天然塩基アプタマーである HD1<sup>54</sup>, HD22<sup>89</sup>, NU172<sup>65</sup> と比べて解離速度が 4-72 倍遅いという特徴があった (図 23). これは, indole 修飾によるアプタマー/標的分子間の疎水性相互作用の増強と, MACE 分離による解離が早い核酸配列の排除効果によるものと考察した. しかしながら, 結合速度も同様に遅く, 解離定数 ( $K_d = 49\text{-}247\text{ nM}$ ) は既報のアプタマーを下回った (図 24). したがって, より高親和性のアプタマーを獲得するためには, 異なる修飾官能基の検討などのさらなる工夫が必要であると考えられる.



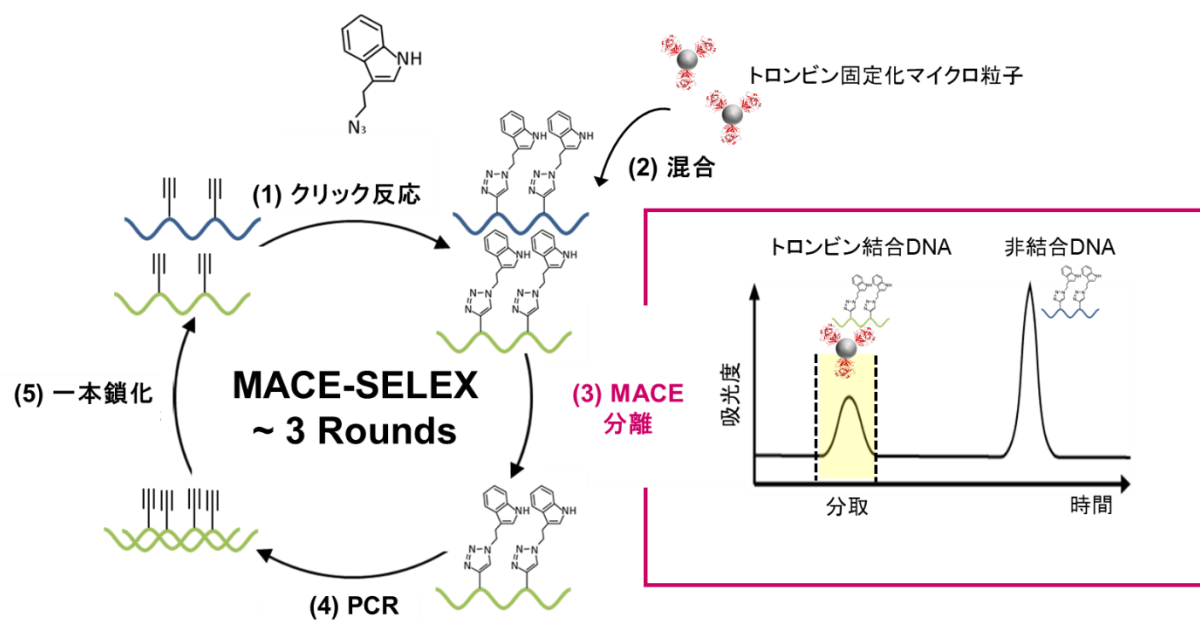


図 19 MACE-SELEX による修飾塩基アプタマー選抜法の概略図

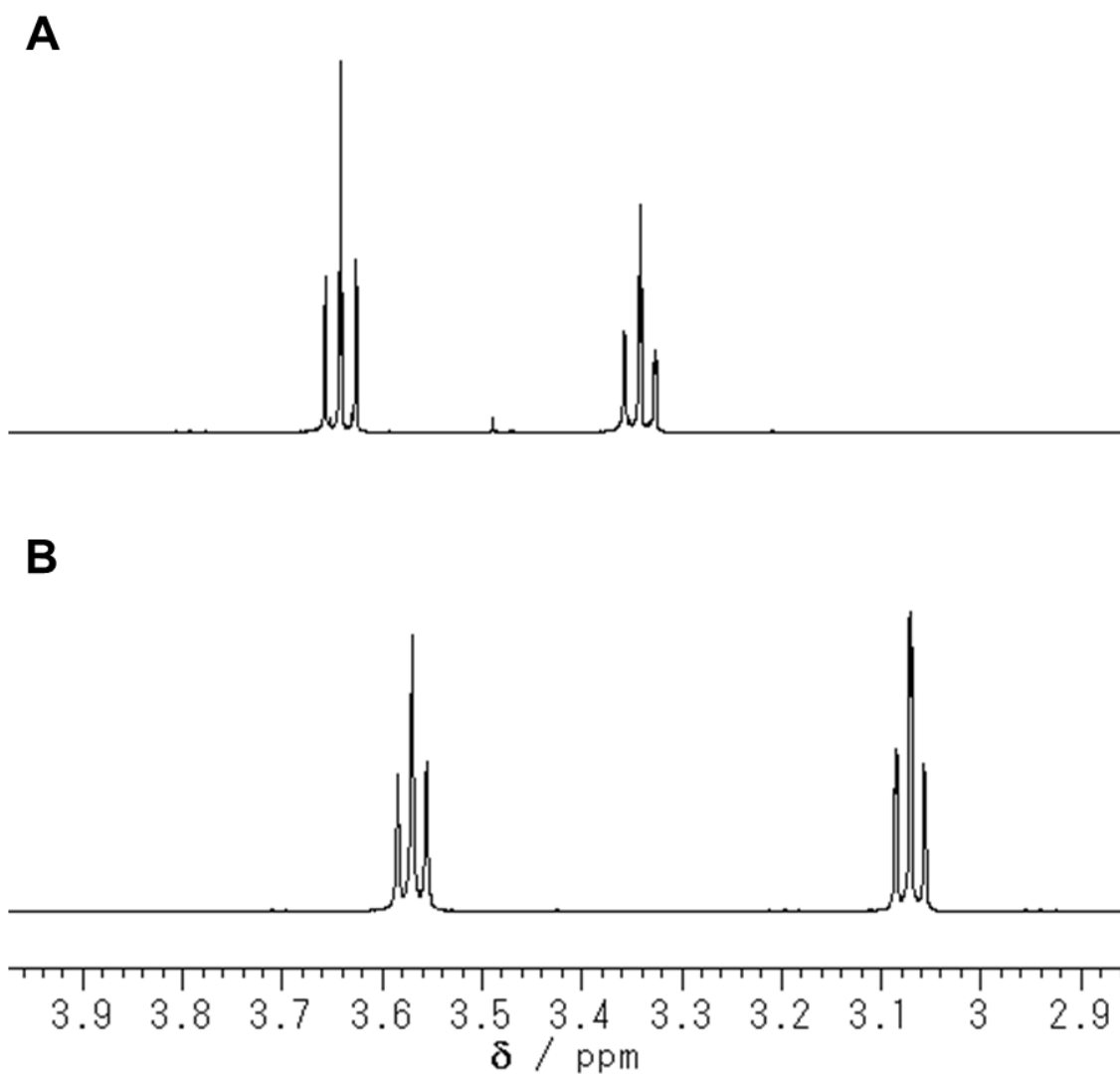


図 20 3-(2-azidoethyl)indole 合成反応前後の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

(A) 3-(2-Bromoethyl)indole と(B) 3-(2-azidoethyl)indole と予想される合成産物のスペクトル。

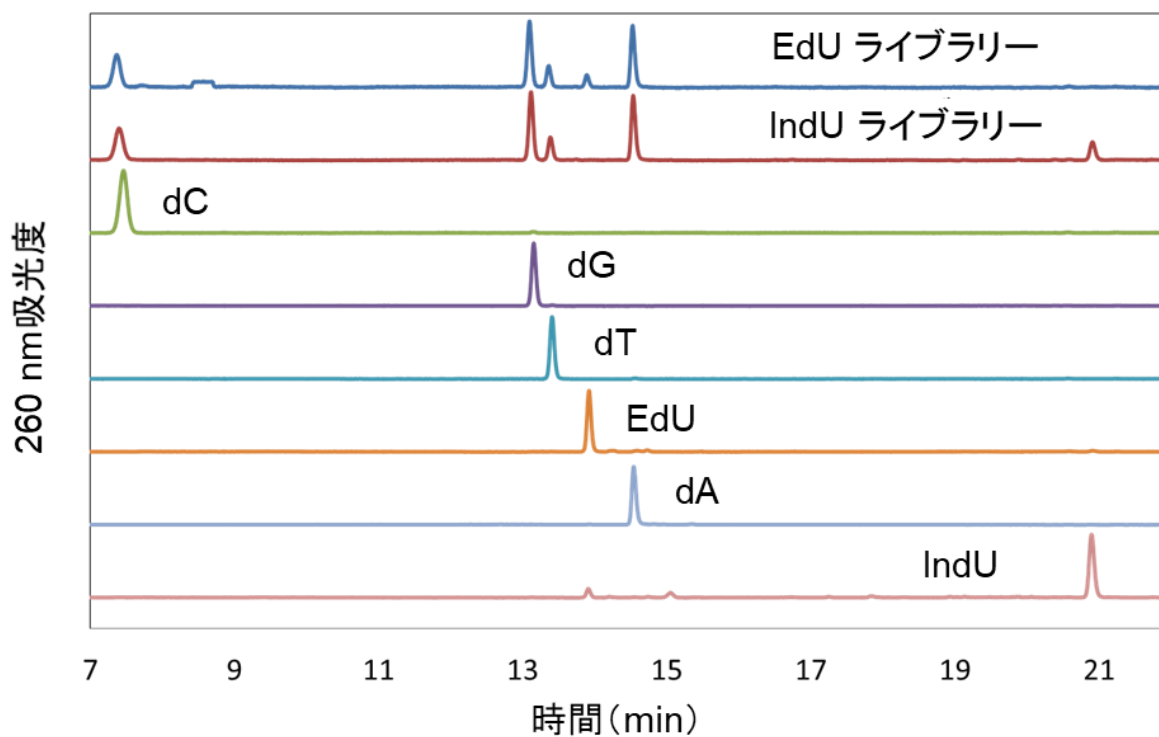


図 21 修飾塩基ライブラリーの SI ヌクレアーゼ分解産物 HPLC クロマトグラム  
 比較のために各ヌクレオシド (dA, dT, dG, dC, EdU, IndU) のクロマトグラムも並べた。  
 共同研究者である阿部氏の修士論文 (2017) <sup>98</sup>より引用。

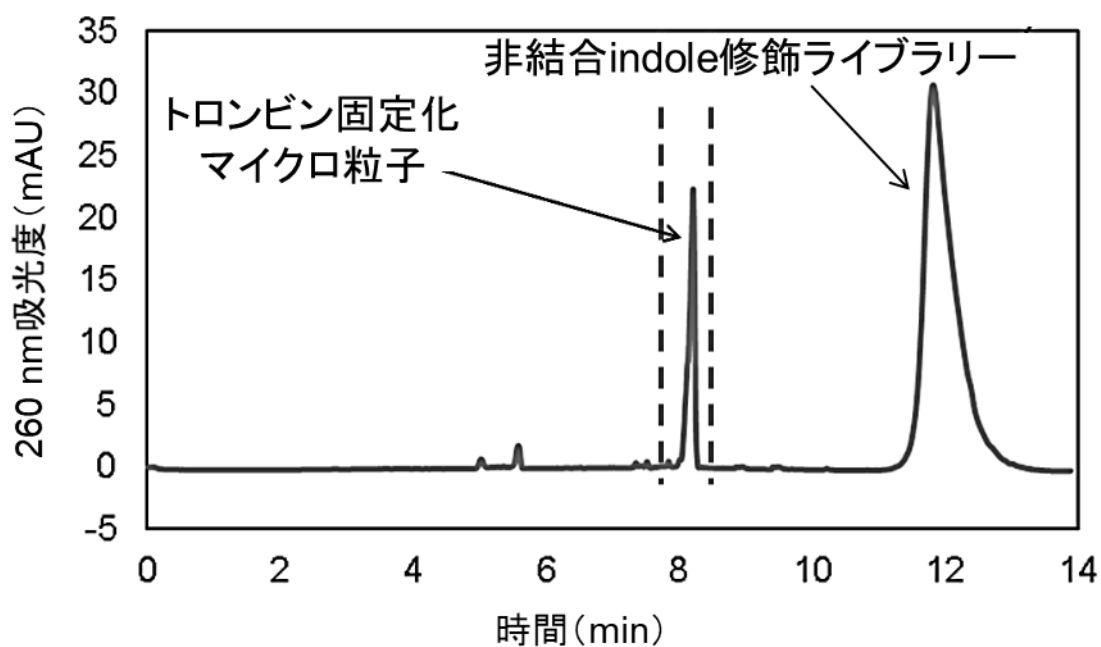


図 22 MACE 分離によるアプタマー候補の分取

Indole 修飾ライブラリーとトロンビン固定化マイクロ粒子の混合溶液の CE フェログラム.  
 終濃度 : [Indole 修飾ライブラリー]=2  $\mu$ M, [マイクロ粒子]=0.2 mg/ml. 注入量 : 65 nl. 分  
 取領域 : 7.8-8.4 min. 共同研究者である阿部氏の修士論文 (2017) <sup>98</sup> より改変引用.

表 4 3 ラウンド終了後の存在率上位 10 配列  
 (共同研究者である阿部氏の修士論文 (2017) <sup>98</sup> より改変引用)

ID	ランダム領域の配列 (5'→3') Ind = X	存在率 (%)		
		R1	R2	R3
Apt.1	ACAGAGAGAGAAAXCACAGACGCGGACAGCXXAACACXAG	0	0.04	4.24
Apt.2	GCGGXXXCXCAXXGCGAGCGAGGGGXCGGACGGCXAGCXG	0	0.01	3.22
Apt.3	GCGXCGGXGGXCGGGGCAGXCXCGGCGGCCGAGAGCXGGGA	0	0.01	2.16
Apt.4	AGGXGXGGXXAXGXAGAXCCGAAAACGAGCCGGCCGCCAC	0	0.01	1.63
Apt.5	CGCGXXXXXCACGXACGAAAAGAACXXCCXGCGXCAAGCG	0	0.01	1.57
Apt.6	CCAAAGXCGAAGGGXCAGGAXCGGXGXCAGCXAXAACCCXAG	0	0.01	1.45
Apt.7	AAAGCGCXXXCAXCXCGCGACACGGCXAGAGGCXGGCGAG	0	0.01	1.07
Apt.8	AAAACGACAGAAAGGGXXAGGCCGGACAGCXXAACACXAG	0	0.00	0.88
Apt.9	AAAGACCXXXCAXCXAAAGACCXGCGGGCAXGAAGAXCA	0	0.00	0.82
Apt.10	CAGGGAAAAACACXAAGCGACGACACXGXACXGCCXXGXG	0	0.01	0.78

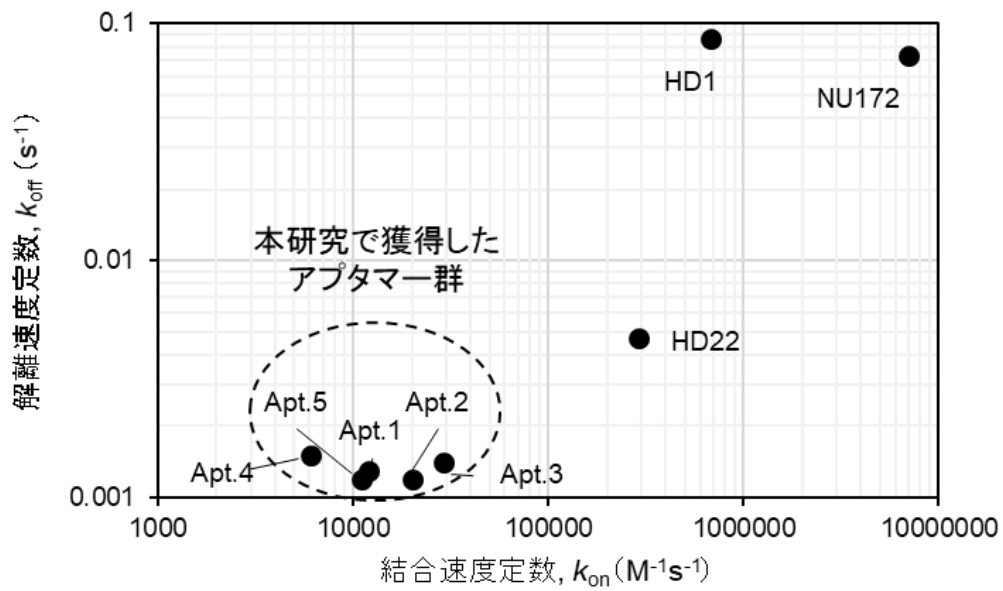


図 23 既報天然アプタマーとのカイネティクス比較

本研究で獲得した indole 修飾アプタマー (Apt.1-5) と既報の天然アプタマー (HD1,HD22,NU172) の結合速度定数 ( $k_{on}$ ) と解離速度定数 ( $k_{off}$ ) の散布図.

共同研究者である阿部氏の修士論文 (2017) <sup>98</sup> より改変引用

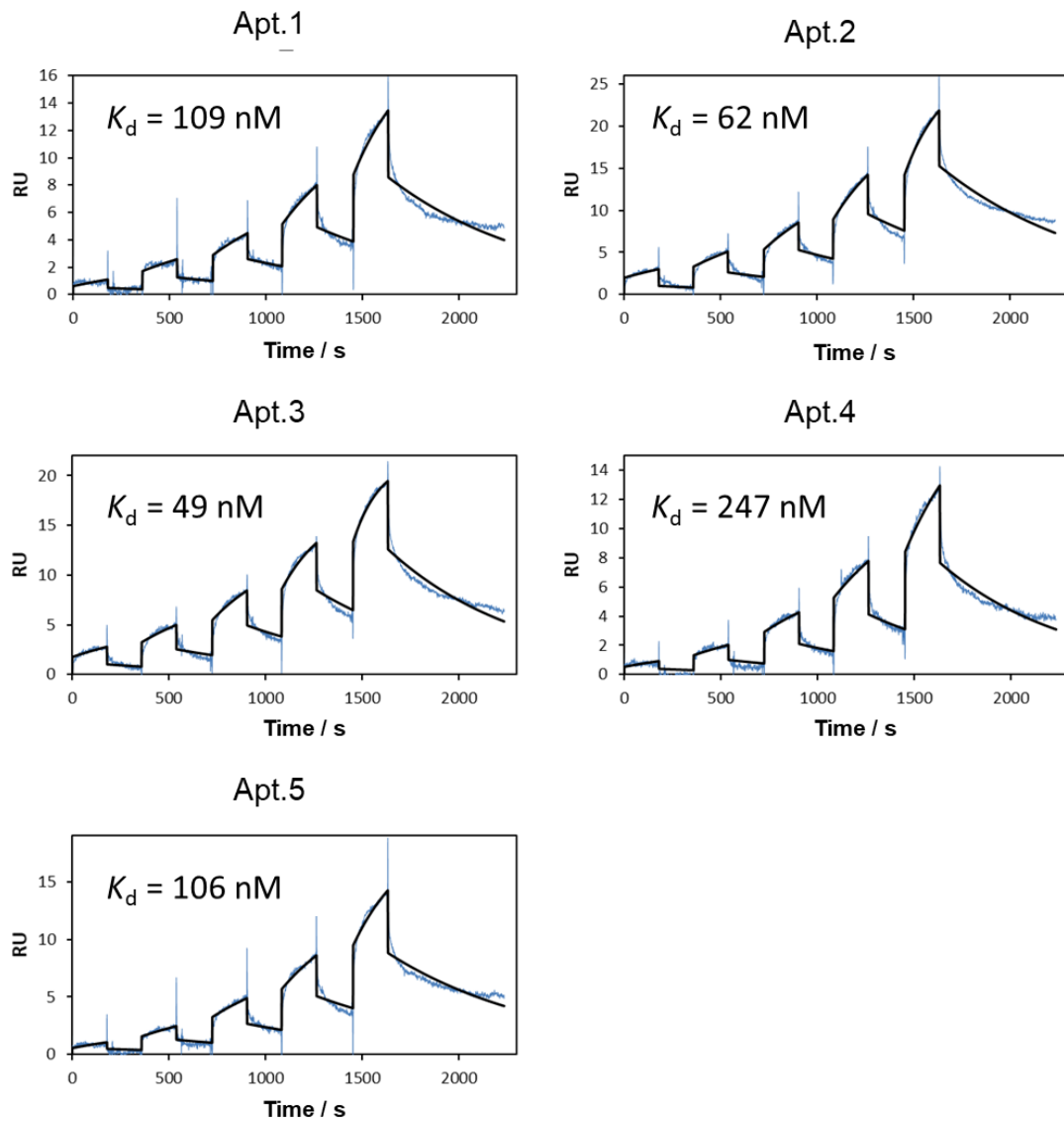


図 24 Indole 修飾アプタマーの解離定数測定における表面プラズモンセンサグラム  
 バッファー：10 mM HEPES (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% v/v surfactant P20.  
 共同研究者である阿部氏の修士論文 (2017)<sup>98</sup>より改変引用.

## 2.4. 結論

本章の研究では、トロンビンを標的とした新たな抗凝固アプタマー製剤の獲得の第一段階として、マイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX) という独自の核酸アプタマーの高速選抜法を樹立した。

ターゲットを固定化した微粒子ごと CE によって分離することで、従来の CE-SELEX の課題であった「複合体の正確な検出」と「複合体形成時の大きな CE 移動度シフト」を達成した。結果として、わずか3ラウンドの MACE-SELEX により、既報の抗トロンビンアプタマーである HD1, HD22, NU172 を上回る親和性のアプタマー群を十分に濃縮することに成功した。興味深いことに、MACE-SELEX で濃縮されたアプタマーの少なくとも 70%以上は、従来の CE-SELEX の分取法では獲得できない可能性が高いことが明らかとなった。言い換えれば、CE-SELEX では M06 や M08 のような多くの高親和性アプタマーを取りこぼしている可能性が示唆された。さらに、マイクロ粒子の支配的な CE 移動度により、MACE-SELEX では複合体の CE 移動度に依存せずにアプタマーが濃縮可能であることを明らかにした。この MACE-SELEX は、粒子に固定化さえできれば、トロンビン以外のあらゆる標的分子に対して適用できる可能性がある。

また、MACE-SELEX は天然塩基アプタマーのみならず、修飾塩基アプタマーの迅速な濃縮にも有効であることを示した。非天然核酸のライブラリーへの導入はしばしば PCR 効率を下げうる<sup>99</sup>。よって、必要ラウンド数の最小化は、労力や選抜期間のみならず、アプタマーの質を低下させる PCR バイアスの抑制にも有用であると考えられる。また、原理上は SOMAmer<sup>73,100</sup>, XNA<sup>101</sup>, spiegelmer<sup>102</sup>, Ds-DNA アプタマー<sup>71</sup> といった他の非天然核酸アプタマーの選抜にも MACE-SELEX を適用できる可能性がある。



### 第3章

## 抗凝固活性を有するアプタマーの同定と多価化による活性強化

### 3.1. 序論

前章では、MACE-SELEX という新規アプタマー取得技術を開発し、既報の抗トロンビンアプタマーを超える親和性のアプタマー群を獲得した結果について報告した。

本章ではさらに、獲得したアプタマー群の中から優れた抗凝固活性を有するアプタマーを選抜あるいは設計することを試みた。

トロンビンは、血液凝固反応カスケードの最下流に存在する多機能型セリンプロテアーゼである<sup>64</sup>。血栓形成の主要な因子であるフィブリンゲルは、トロンビンが基質のフィブリノーゲンを分解することで産生される。このトロンビンの活性に重要なドメインとして、活性中心 (active site)、エキソサイト I (exosite I)、エキソサイト II (exosite II) が挙げられる (図 25)<sup>103</sup>。フィブリノーゲンはトロンビンのエキソサイト I に結合したのち活性中心で切断を受ける。つまり、エキソサイト I あるいは活性中心に結合するアプタマーが獲得できれば、直接的な抗凝固剤として機能する可能性が高い。実際に、臨床に進んだ HD1<sup>54</sup> はエキソサイト I に対するリガンドである<sup>103,104</sup>。エキソサイト II は第 V または第 VIII 因子の活性化に関わるとされている。したがって、エキソサイト II に対する既報のアプタマー HD22 は、間接的に抗凝固活性を示すことがわかっている<sup>89</sup>。しかしながら、HD1 は十分な抗凝固活性を示さなかったため、臨床試験第 I 相で開発は中止された<sup>105</sup>。

そこで、異なる部位を認識する HD1 と HD22 を連結して多価化することで、親和性と抗凝固活性を向上させる試みがなされている (図 26)<sup>21,106,107</sup>。この多価化によって、アプタマーの親和性を 10-50 倍、抗凝固活性を 3-30 倍向上させることに成功した<sup>21,106,107</sup>。この手法を本研究で獲得したアプタマーに対しても適用することで、更なる抗凝固活性の向上が期待できる。

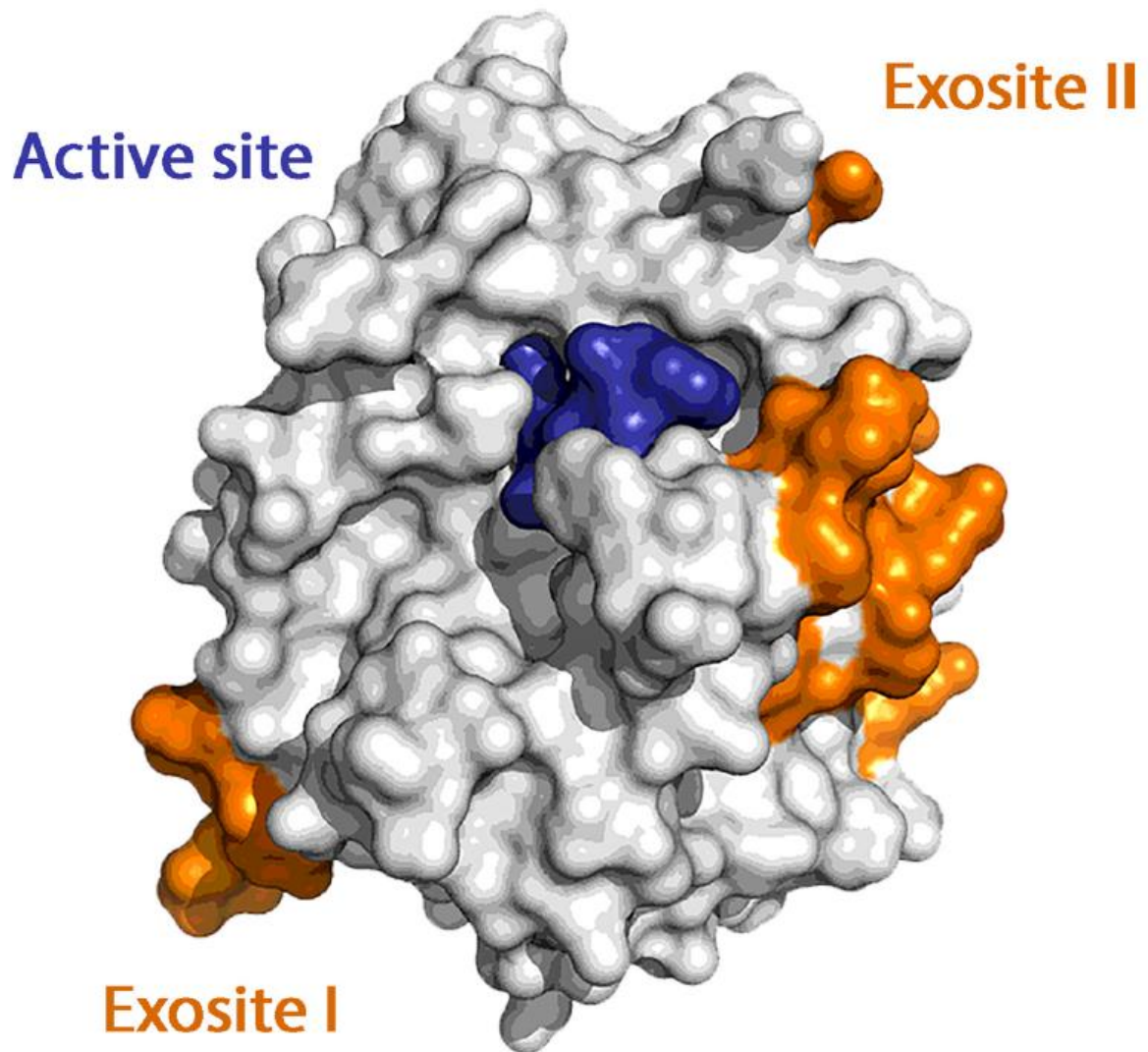


図 25 トロンビンの立体構造

参考文献 103 ; Pica, A. *et al.* Through-bond effects in the ternary complexes of thrombin sandwiched by two DNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* **45**, 461–469 (2017)より引用.

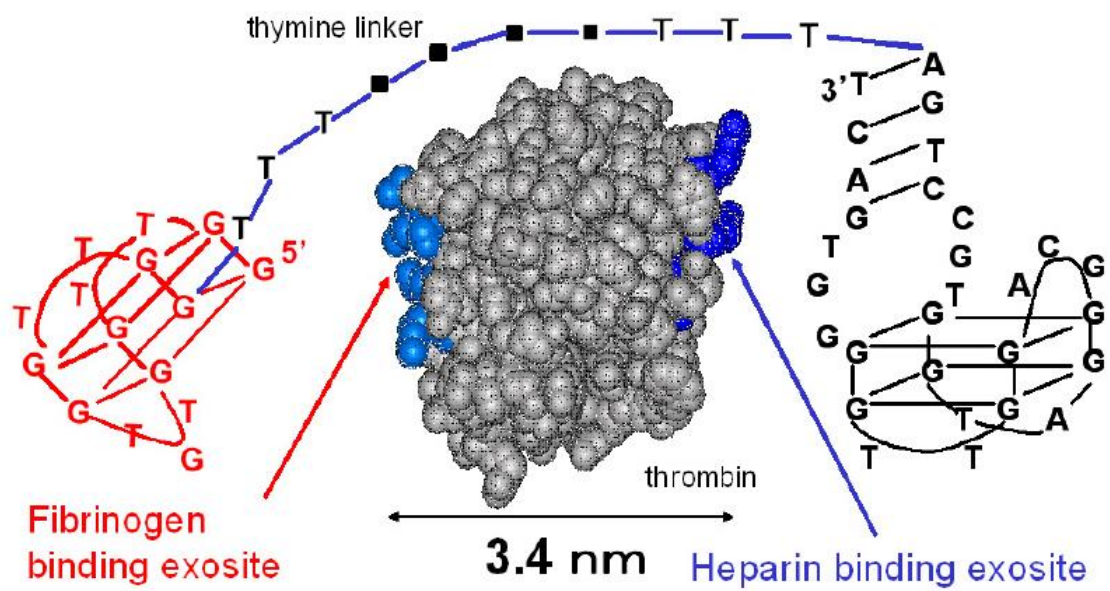


図 26 HD1 と HD22 を連結させた多価アプタマー

参考文献 106 ; Hasegawa, H., Taira, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. *Sensors* **8**, 1090–1098 (2008)より引用.

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 試薬リスト

Thrombin from human plasma (Sigma-Aldrich, USA)

Fibrinogen (Wako, Japan)

Oligo DNAs (Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's PBS (-) (Wako, Japan)

10% tween 20 solution (Bio-Rad Laboratories, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Wako, Japan)

1 M sodium chloride solution (Wako, Japan)

Acetic acid (Wako, Japan)

Sodium Acetic acid (Wako, Japan)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidehydrochloride (EDC; GE healthcare, UK)

N-Hydroxysuccinimide (NHS; GE healthcare, UK)

1.0 M Ethanolamine-HCl pH 8.5 (GE healthcare, UK)

Liquid paraffin (Wako, Japan)

### 3.2.2. フィブリノーゲン凝固系を利用した抗凝固活性測定

フィブリンゲル形成の観測には Cytation 1 (BioTek, USA)または Viento Nano (BioTek, USA)と付属の Gen5 ソフトウェアを用いた。トロンビン、フィブリノーゲン、アプタマーの混合し、350 nm における吸光度の経時的な増大を測定することで凝固曲線を得た。このフィブリンゲルの観測波長は先行研究に従った<sup>108</sup>。タンパク質とアプタマー溶液は PBS (-)で調製した。まず、アプタマー溶液をサーマルサイクラー(Takara Bio Inc., Japan)を用いて 95°Cで2分間加熱した後、0.1°C/s の速さで 25°Cまで冷却することでアニーリングした。アニーリング後、20 µl の 10 µM アプタマーと 20µl の 1 µM トロンビンを 280 µl の PBS (-)と混合し、15分間室温で静置した。これを 80 µl ずつ Corning® 96 Well Half-Area Microplateclear flat bottom,

polystyrene, bag of 25, non-sterile, lid: no (Corning, USA) の各ウェルに分注した。20  $\mu$ l の 2 mg/ml フィブリノーゲンを各ウェルに添加・混合し、測定を開始した。終濃度はトロンビンが 50 nM, アプタマーが 500 nM, フィブリノーゲンが 0.4 mg/ml とした。内部標準として、常に HD1 を添加したウェルを用意して凝固曲線を記録した。抗凝固活性の比較のために、HD1 以外の既報のトロンビンアプタマー (表 5) も同様に測定した。また、抗凝固活性の濃度依存性の評価系では、内部標準としてアプタマー非添加のウェルの凝固曲線を常に記録した。この時の終濃度は、トロンビンが 20 nM, アプタマーが 20, 50, 100, 250, 500, 1000 nM, フィブリノーゲンが 0.4 mg/ml とした。さらに、二価アプタマーの抗凝固活性の評価系では、内部標準としてアプタマー非添加のウェルの凝固曲線を常に記録し、終濃度はトロンビンが 2.5 nM, アプタマーが 2.5 nM, フィブリノーゲンが 0.4 mg/ml とした。

### 3.2.3. 凝固時間の算出

抗凝固活性の指標として、3.2.2.で取得した凝固曲線のデータから凝固時間  $t_c$  を算出した。トロンビンによるフィブリンゲルの形成のより、図 27 で示すような凝固曲線が得られる。 $t = 0$  における吸光度を  $A(0)$ , 凝固曲線の接線の傾きが最大値を  $\Delta A_m$ , 凝固曲線の接線の傾きが最大となる時間を  $t_m$ ,  $t = t_m$  における吸光度を  $A(t_m)$  とすれば、凝固時間  $t_c$  は下式(7)で定義することができる<sup>108</sup>。

$$t_c = t_m - [A(t_m) - A(0)]/\Delta A_m \quad \cdots (7)$$

$\Delta A_m$  は Origin 7.0 ソフトウェアを用いて凝固曲線を一次微分することで算出した。

### 3.2.4. Mfold によるアプタマーの二次構造予測

Zuker によって開発された Mfold という DNA/RNA の二次構造予測ソフトを用いた<sup>109</sup>。アプタマーの配列を入力後、DNA タイプが linear, フォールディング温度が 25°C,  $[Na^+] =$

137 mM という条件で二次構造を出力した。

### 3.2.5. 表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance, SPR) 法による相互作用解析

Biacore X100 (GE healthcare, UK)を用いて、トロンビンとアプタマーの相互作用解析をおこなった。サンプル・ランニングバッファーとして、HBS-P buffer [10 mM HEPES (pH = 7.4) 150 mM NaCl, 0.05 % v/v surfactant P20](GE healthcare, UK)を用いた。カルボキシメチルデキストラン修飾された CM5 sensor chip (GE healthcare, UK)を流路にセットし、10  $\mu$ l/min の流速で EDC/NHS 溶液を 7 分間流し、センサーチップ上のカルボキシ基を活性化した。10 mM acetic acid/sodium acetate buffer, pH 6.0 で希釈した 10-20  $\mu$ g/ml トロンビン溶液を 7 分間流した。最後に 1.0 M ethanolamine-HCl (pH 8.5)を 7 分間流してカップリング反応を完了させた。2000-2500 RU の範囲のトロンビン固定化量で測定した。アプタマーを、サンプルバッファーによって 2-4  $\mu$ M に希釈し、サーマルサイクラー(Takara Bio Inc., Japan)を用いて 95°Cで 2 分間加熱した後、0.1°C/s の速さで 25°Cまで冷却することでアニーリングした。アニーリング後、サンプルバッファーでさらに希釈系列を調整した。測定中は 30  $\mu$ l/min の流速でサンプルを流し、シングルキネティクスモードにより測定した。再生溶液として、1 M NaCl 溶液を用いた。Biacore X100 evaluation software (GE healthcare Little Chalfont, UK)を用いて、キネティクスパラメーターを算出した。

### 3.2.6. 円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定

Jasco J-1500 CD spectrometer (JASCO, Japan)を用いて、アプタマーの CD スペクトルを測定した。測定には光路長 1 cm のキュベットを用いた。1/2 x PBS (-)でアプタマーを 2  $\mu$ M に希釈し、サーマルサイクラー (Takara Bio, Japan) によって 95°Cで 2 分間加熱した後、0.1°C/s の速さで 25°Cまで冷却することでアニーリングした。測定温度：25°C，データ取込間隔：0.5 nm，測定波長：220-320 nm，解像度：0.5 nm，バンド幅：1.0 nm，レスポンス：2 s，走査速度：100 nm/min，積算回数：5 回という条件でスペクトルを取得した。ブランクとして 1/2 x PBS (-)

のスペクトルを測定し、ベースラインの補正とスムージングをおこなった。

### 3.2.7. 融解温度 (T<sub>m</sub> 値) 測定

UV-2450 (SHIMAZU, Japan)を用いて、アプタマーの温度依存的な吸光度変化を測定した。アプタマーを PBS (-)で 4 μM に調製し、サーマルサイクラー (Takara Bio Inc., Japan)を用いて 95°Cで 2 分間加熱した後、0.1°C/s の速さで 4°Cまで冷却することで、アニーリングをおこなった。アニーリング後、光路長 1 cm の 8 SERIES MICRO MULTI-CELL (SHIMAZU, Japan)に各サンプルを 110 μL 添加し、さらに 40 μL の Liquid paraffin で覆った。サンプルを 4°C までセル内で冷却した後、10 分間 4°C を維持し、0.5 °C /min の昇温速度で 80°C まで加熱した。先行研究にならい、グアニン四重鎖構造の融解曲線観測のために、295 nm の波長における吸光度を測定した<sup>110</sup>。



表 5 抗凝固活性比較に用いた既報のトロンビンアダマー

ID	配列 (5'→3')	文献
HD1	GGTTGGTGTGGTTGG	54
HD22	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA	89
NU172	CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG	65
RE31	GTGACGTAGGTT GGTGTGGTTGGGGCGTCAC	66
RA36	GGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG	67
Thr-08	AGCAGCACAGAGGTCAGATGCAGCGCTAGGGCTTTTAGCGTAATGGGTAGGGTGGTGC	90,91
	ATATCGGAATTGGTGCCTATGCGTGCTACCGTGAA	

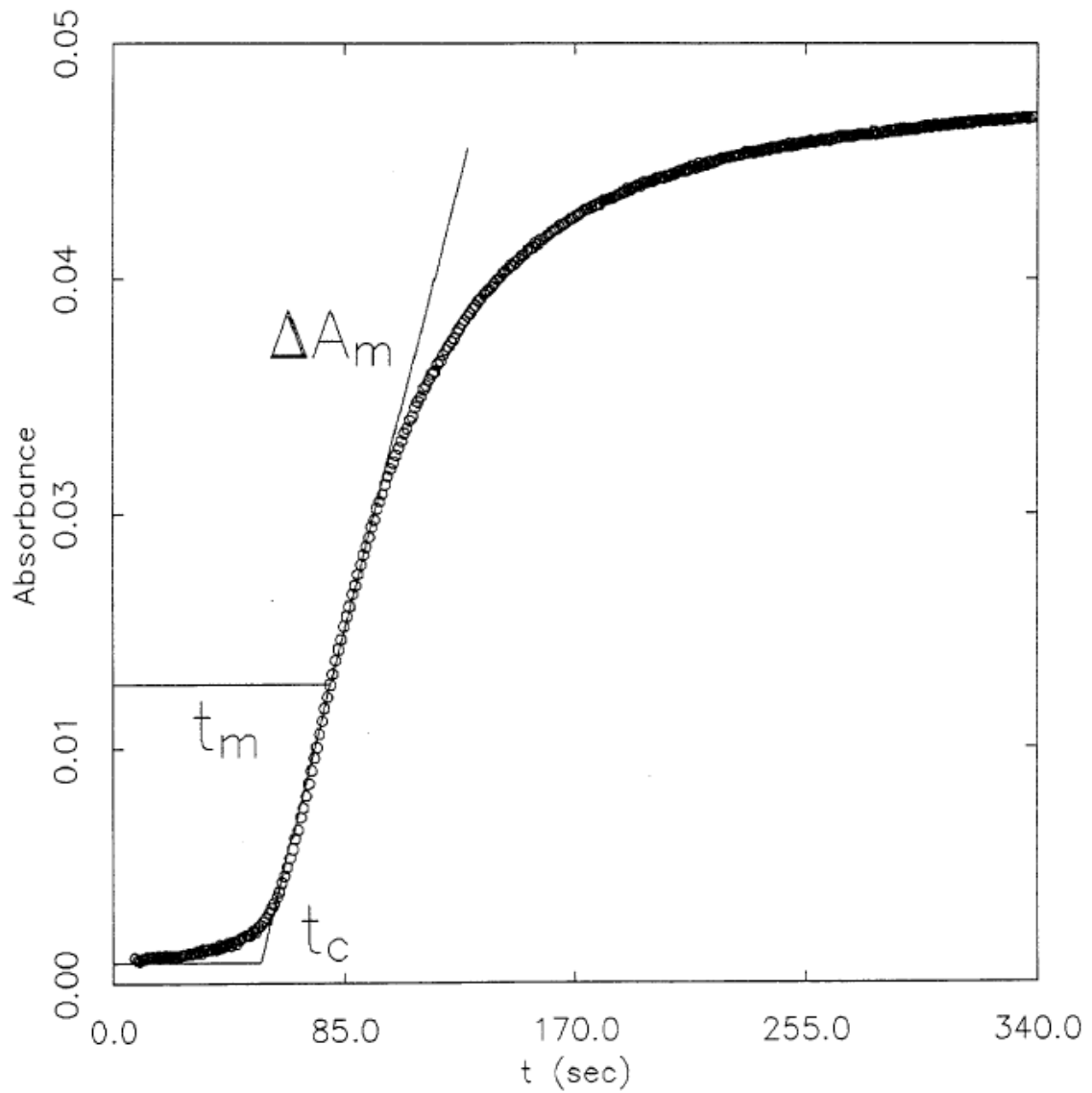


図 27 吸光波長 350 nm における典型的な凝固曲線と各現象論的パラメーター

参考論文 108 ; De Cristofaro, R. & Di Cera, E. Phenomenological analysis of the clotting curve. *J. Protein Chem.* **10**, 455–468 (1991)より引用.

### 3.3. 結果と考察

#### 3.3.1. 抗トロンビンアダプターのアプタマーの抗凝固活性

本研究の目的である新たな抗凝固アダプター製剤の獲得のために、第2章で獲得した抗トロンビンアダプターの中から、優れた抗凝固活性を示すアダプターのスクリーニングを試みた。トロンビンによる凝固反応、すなわち不溶性フィブリンゲルの形成は可視光の光散乱によって観測することができる<sup>108</sup>。この凝固曲線から、抗凝固活性の指標となる凝固時間を算出することができる。アダプターがトロンビンの機能を阻害、すなわち凝固時間をどれほど延長するか検証した。

表2のアプタマーC01-10, M01-10の性能を評価するために、臨床試験に進んだHD1<sup>54</sup>とNU172<sup>65</sup>に加え、HD22<sup>89</sup>, RE31<sup>66</sup>, RA36<sup>67</sup>, Thr-08<sup>90,91</sup>といった既報の抗トロンビンアダプターの抗凝固活性も調べた。HD1はフィブリノーゲンの認識サイトであるエキソサイトIに結合し、抗凝固作用を示すことが知られている<sup>54</sup>。HD1と比較すると、図28Aに示すようにNU172, RE31, Thr-08は1.5-3.0倍に凝固時間を延長した。一方で、HD22はほとんど凝固時間を延長しなかった。これはHD22がフィブリノーゲンの分解に直接関与しないエキソサイトIIに結合するためであると考えた<sup>103</sup>。同様の理由で、HD22と非常に類似した配列を含むM04とM05(図13)は凝固時間をほとんど延長しなかったと推測される。驚くべきことに、M08はHD1の20倍以上に凝固時間を延長した。図28Bの凝固曲線からも、M08はその他の既報のアプタマーを上回る阻害活性を有することがわかる。さらに、抗凝固活性のアプタマー濃度依存性を調べたところ、より低濃度のアプタマー存在下においてもM08はHD1やNU172より優れた阻害活性を示した(図29)。したがって、有望な新規抗凝固アダプター製剤の候補分子となりうるM08というアダプターの特定に成功した。

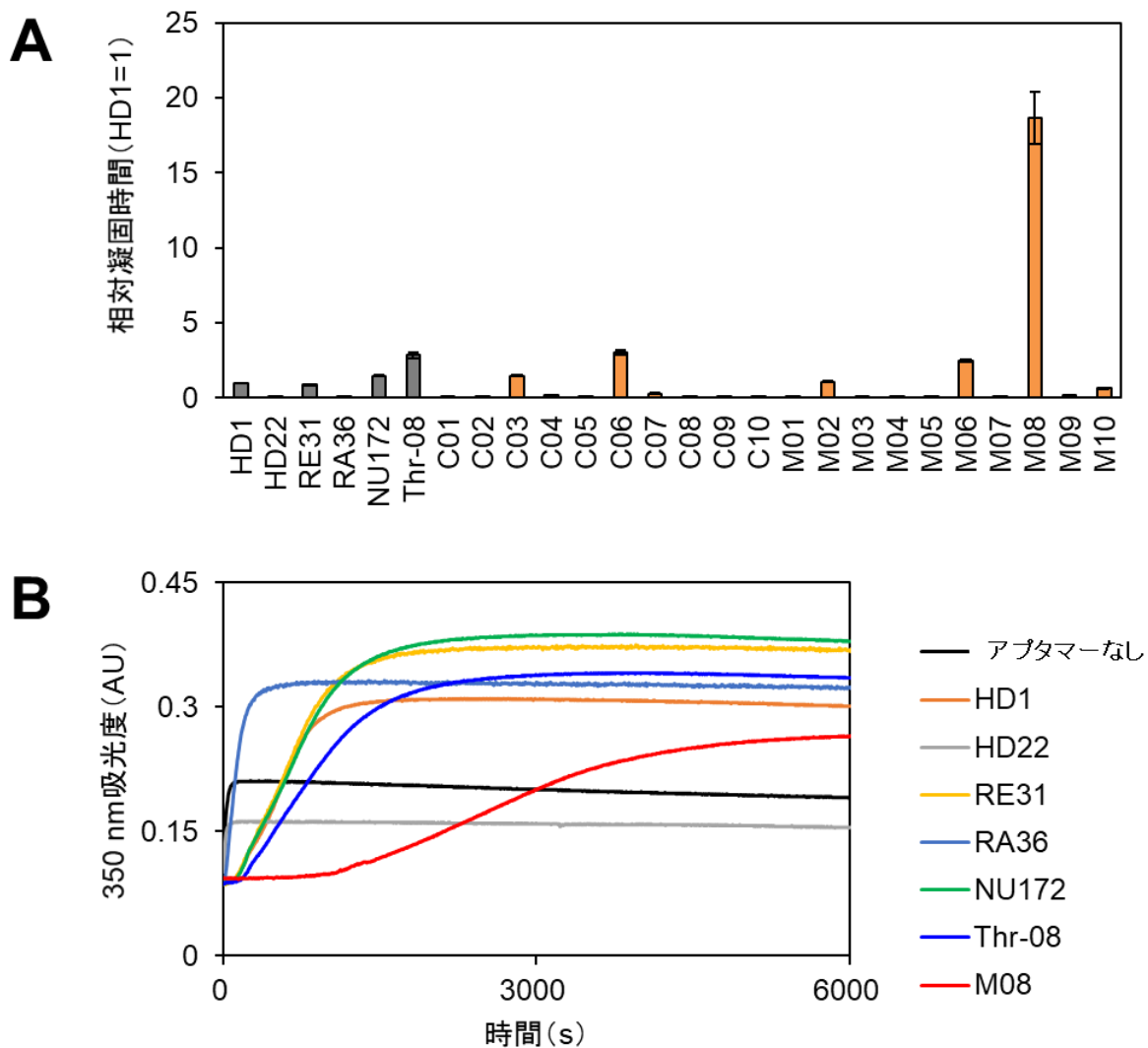


図 28 トロンビンアプタマーの抗凝固活性比較

(A) 本研究で獲得されたアプタマー (橙色) と既報のアプタマー (灰色) の凝固時間比較. HD1 の凝固時間を 1 として相対凝固時間を算出した (mean  $\pm$  SE, n=3). (B) M08 と既報のアプタマーの凝固曲線. 終濃度: [アプタマー] = 500 nM, [トロンビン] = 50 nM, [フィブリノーゲン] = 0.4 mg/ml, バッファー: PBS(-).

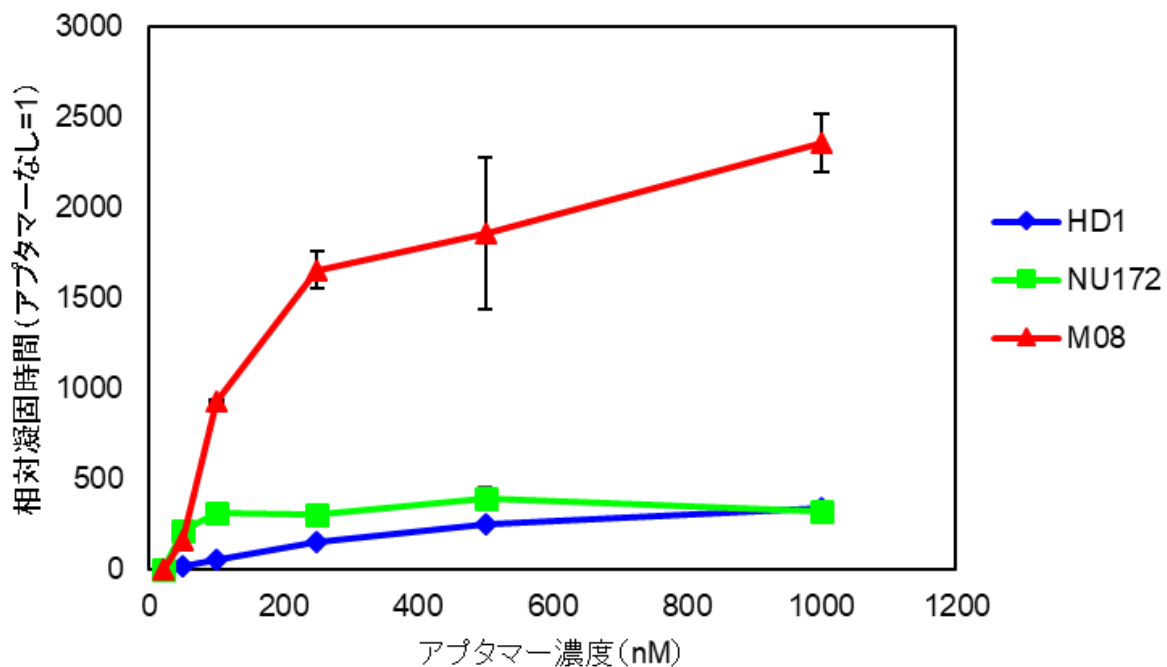


図 29 抗凝固活性のアプタマー濃度依存性

アプタマー非添加時における凝固時間を 1 とした相対凝固時間 (mean  $\pm$  SE, n=3). 本研究で獲得した M08 と, 比較のために臨床に進んだ既報のアプタマー NU172 と HD1 についても同様の実験をおこなった. 終濃度: [アプタマー] = 20, 50, 100, 250, 500, 1000 nM, [トロンビン] = 20 nM, [フィブリノーゲン] = 0.4 mg/ml, バッファー: PBS(-).

### 3.3.2. 抗トロンビンアプタマーM08の最適化

続いて、前項で強力な抗凝固活性を示した M08 に着目し、多価化等の次なる応用のために配列の最適化をおこなった。Mfold ソフトウェア<sup>109</sup>を用いて M08 の二次構造を推定した結果、長いヘアピンループと小さなバルジループ構造をとることが示唆された (図 30A)。先行研究から、ステム構造よりもループ内のヌクレオチドがターゲット分子との相互作用において、特に重要な役割を果たす例が多数報告されていることから<sup>111</sup>、このヘアピンループがトロンビンとの結合部位であると仮定した。実際に、M08 のバルジループ近傍までステム構造を短縮化したもの (M08s-1, 43-mer, 5'-AGG TCA GAT GAT GGG GAT GGG GGG TTG GAG GAA TGG ATG ACC T-3', 図 30A) は、元の M08 と同等の親和性と抗凝固活性を保持していた。一方で、ヘアピンループだけを残したもの (M08s-2, 31-mer, 5'-GAT GAT GGG GAT GGG GGG TTG GAG GAA TGG A-3', 図 30A) では著しい機能低下が観測された (図 30B, C)。この大きなヘアピンループの構成塩基はグアニンリッチであることから、既報のトロンビンアプタマーである HD22, RE31, NU172 と同様にステム構造とグアニン四重鎖構造が共存した構造をとっている可能性が高いと予想した<sup>112</sup>。グアニン四重鎖 (G カルテット) 構造のトポロジーは、パラレル型、アンチパラレル型、ハイブリッド型という三種類に大別され (図 31)、これらは円二色性偏光スペクトル解析によって推定可能である<sup>113,114</sup>。図 30D に示すように、M08 と M08s-1 の CD スペクトルにおいて、295 nm でアンチパラレル型由来の正の極大ピークが観測された。一方、M08s-2 では 295 nm で正の極大ピークが消失し、典型的なパラレル型由来の 240 nm で負、260 nm で正の極大ピークという典型的なパラレル型由来のシグナルが観測された。さらに、295 nm における温度依存的な吸光度変化を測定することで、グアニン四重鎖の融解温度 ( $T_m$ ) を測定した<sup>110</sup>。興味深いことに、パラレル型の M08s-2 のグアニン四重鎖の熱力学的安定性が最も高いということが明らかとなった (図 32)。つまり、図 33 に示すように、M08 または M08s-1 の非パラレル型グアニン四重鎖は、ステム構造によって安定化されていることが示唆された。したがって、M08 または M08s-1 のステム構造は、トロンビンとの相互作用と機能阻害に必須のループ内のトポロジー保持に寄与していることを

明らかにした。以後，本項で最適化した M08s-1 を用いて次の研究を進める。

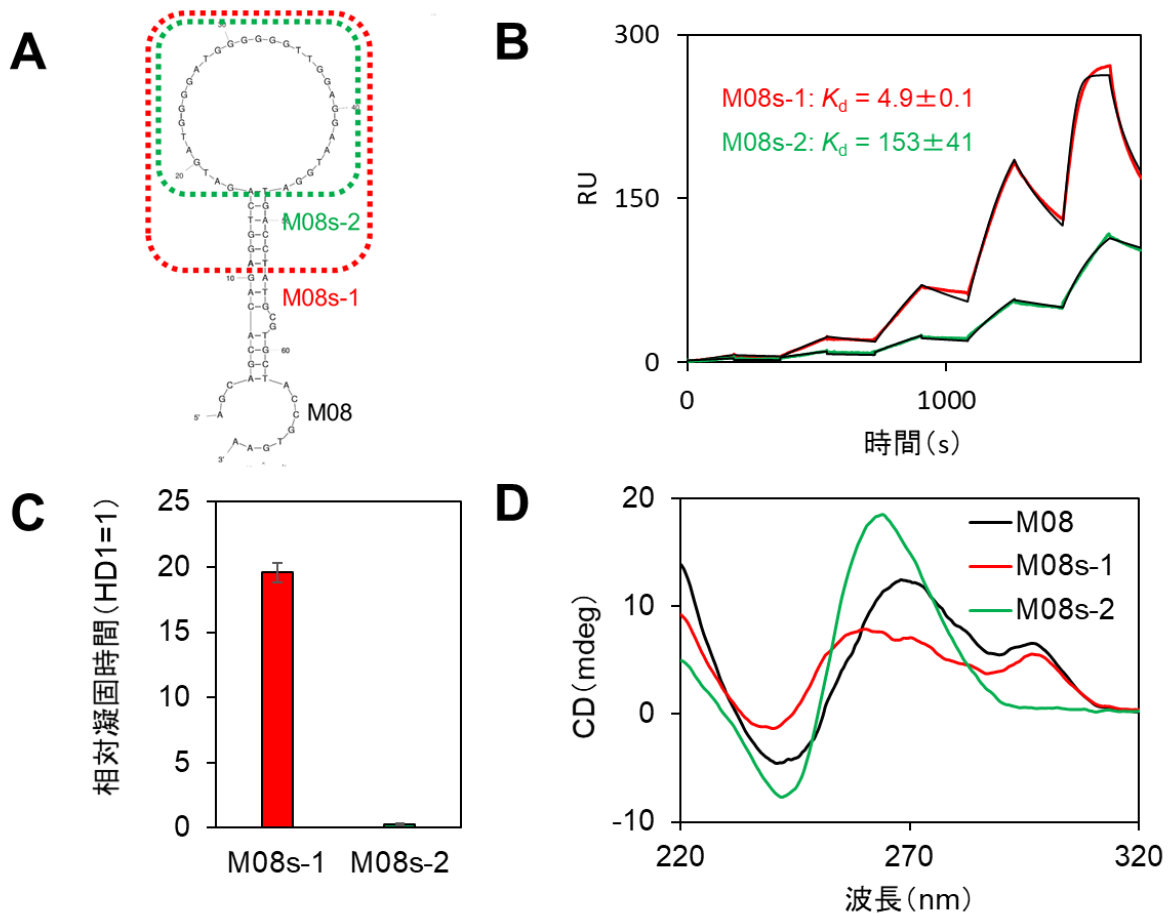


図 30 アプタマーM08 の最適化

(A) mfold による M08 の二次構造. M08 を短縮化したアプタマーを M08s-1 (43 mer), M08s-2 (31 mer) とした. (B) 短縮化 M08 の SPR による結合能測定 ( $K_d = \text{mean} \pm \text{SE}$ ,  $n=3$ ). バッファー: 10 mM HEPES (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% surfactant P20 (v/v). (C) 短縮化 M08 の抗凝固活性. HD1 の凝固時間を 1 として相対凝固時間を算出した ( $\text{mean} \pm \text{SE}$ ,  $n=3$ ). 終濃度: [アプタマー] = 500 nM, [トロンビン] = 50 nM, [フィブリノーゲン] = 0.4 mg/ml, バッファー: PBS(-). (D) M08 とその短縮化配列の CD スペクトル. バッファー:  $1/2 \times \text{PBS}(-)$ .



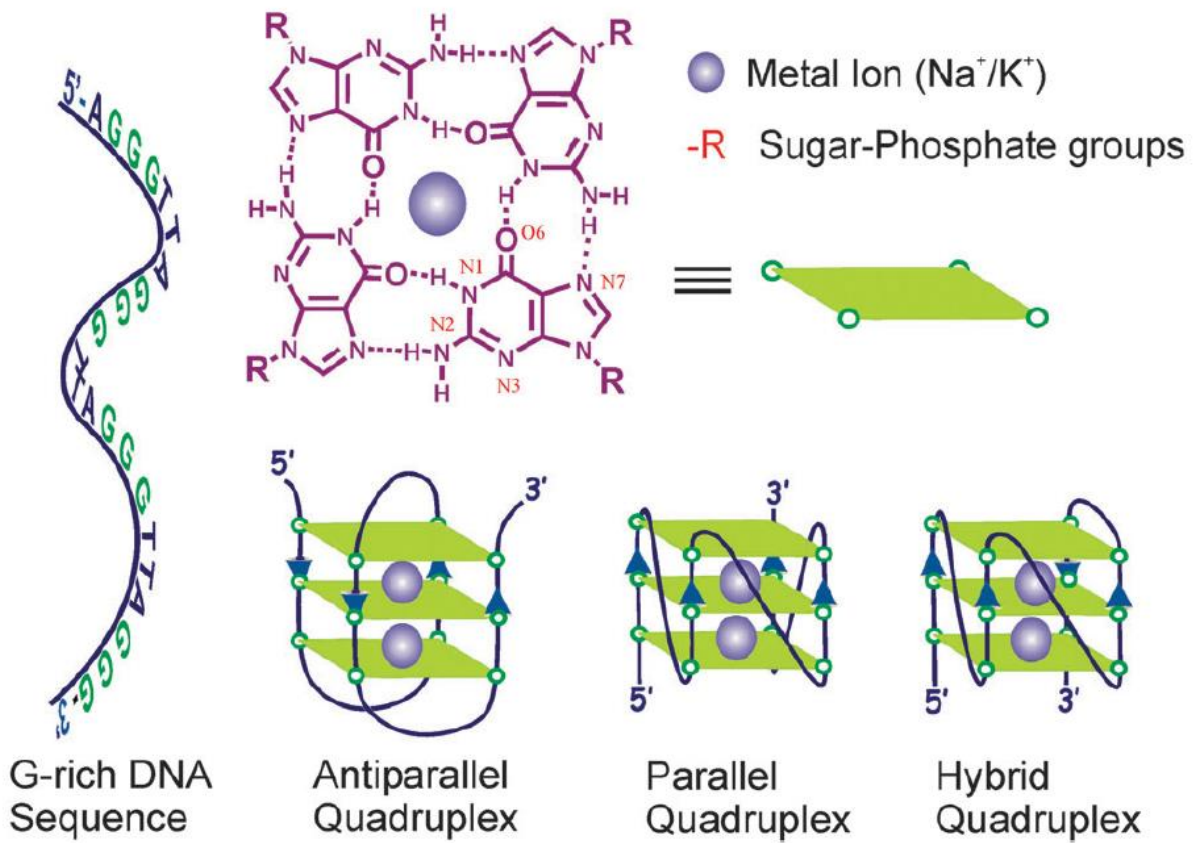


図 31 Gカルテット構造の様々なトポロジー

引用文献114 ; Bhasikuttan, A. C. & Mohanty, J. Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors. *Chem. Commun.* **51**, 7581–7597 (2015)より引用.

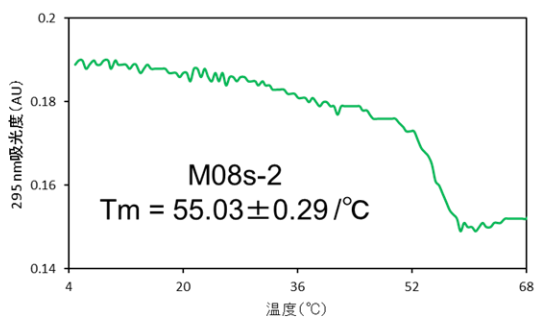
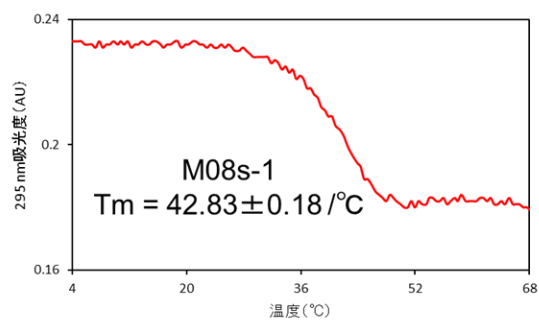
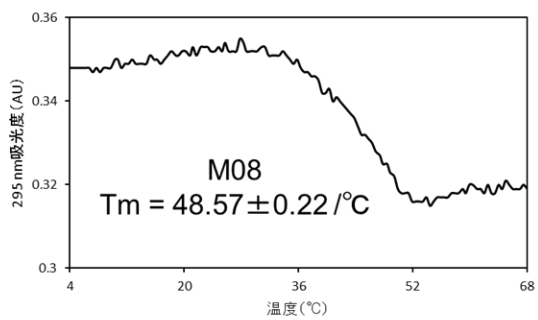
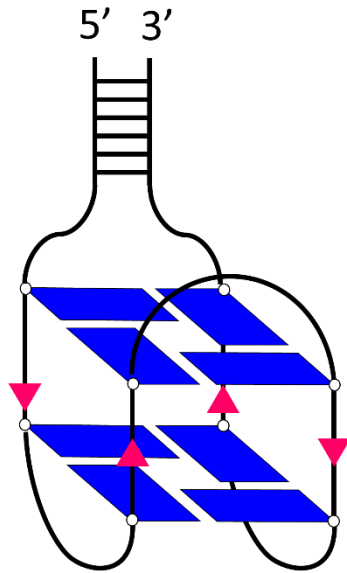
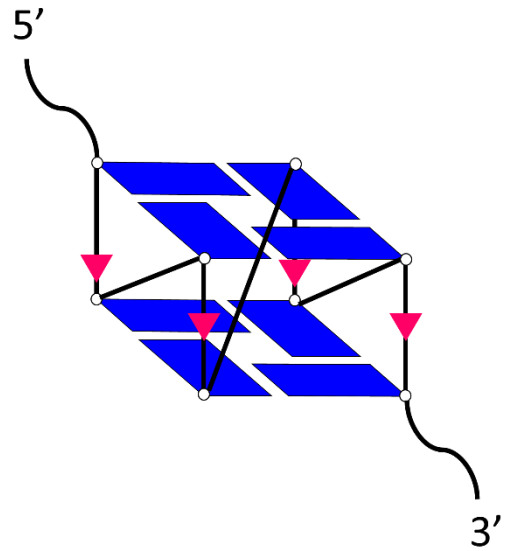


図 32 M08/M08s-1/M08s-2 のグアニン四重鎖融解曲線と融解温度 ( $T_m$ )

終濃度 : [アプタマー] = 4  $\mu\text{M}$ , バッファー : PBS(-).  $T_m = \text{mean} \pm \text{SE}$ ,  $n=3$ .



M08/M08s-1  
 ステム構造あり  
 アンチパラレル/ハイブリッドG4



M08s-2  
 ステム構造なし  
 パラレルG4

図 33 想定されるアプタマーM08/M08s-1/M08s-2 の立体構造の一例

グアニン四重鎖の熱力学的安定性は平行型の M08s-2 が最も高いが、M08 または M08s-1 のステム構造により、機能発現に重要な非平行型が安定化されていると推測された。

### 3.3.3. 二価トロンビンアダプター設計

HD1 と HD22 の二価アダプターの例にあるように<sup>21,106,107</sup>, 本研究で獲得したアダプターも多価化することで, さらなる抗凝固活性の向上が期待できる. 前項までに, M08 (M08s-1) は HD1 の 20 倍ほどの抗凝固活性をもつことを明らかにした. つまり, この M08s-1 は, HD1 と同様にエキソサイト I あるいは活性中心と相互作用している可能性が高く, エキソサイト II に結合する HD22 とは競合しないと考えられる. したがって, M08s-1 と HD22 を連結させた二価アダプターの開発を試みた.

アダプターの活性への影響を最小限にするために, 高次構造を形成しにくいと予想されたポリ A またはポリ T 配列をリンカーとして用いた. ssDNA の一塩基当たりの平均長が 0.68 nm であることを考えると<sup>115</sup>, トロンビンのエキソサイト I とエキソサイト II の直線距離 3.4 nm を満たすには<sup>106</sup>, 5 塩基 (直線距離) と 8 塩基 (タンパク質半球の迂回距離) の和, すなわち 13 塩基ほどのリンカー長が必要であると大まかに見積もれる. 実際には, アダプターの大きさや結合様式によりリンカー長は前後すると考えられたため, 0, 5, 10, 15, 20, 25 塩基という様々なリンカー長の二価アダプターを設計した (表 6). さらに, リンカー長だけではなく, アダプターの連結順序によって活性に差が生まれるという報告がある<sup>116</sup>. よって, M08s-1 を 5'末端と 3'末端側, それぞれに配置した二価アダプターについても同時に検討した (表 6).

抗凝固活性を比較することで最適な二価アダプター配列の同定を試みた (図 34). 既報の HD1 と HD22 の二価アダプター (HD1-T16-HD22, HD1-A15-HD22)<sup>107,117</sup> の抗凝固活性も同様に調べた. 驚くべきことに, M08s-1 は, 既報の二価アダプターの抗凝固活性を単独で上回ることが分かった. さらに, 連結前の M08s-1 と HD22 を同時に添加すると, M08s-1 単独のものに比べて凝固時間が 1.3 倍ほどに延長した. これは, HD22 がエキソサイト II に結合することでトロンビンの構造が変化し, M08s-1 のトロンビンに対する親和性が向上したことを示唆している. このアロステリック効果は他の抗トロンビンアダプターでも同様に報告されている<sup>118</sup>. さらに, M08s-1 と HD22 の二価アダプターについては, M08s-T15-HD22 (M08s = M08s-1)

の活性が最も高いということが分かった。本条件では、既報の HD1 と HD22 ビバレントの 4-5 倍ほどの凝固時間の延長が観測された。興味深いことに、M08s が 5'末端側か 3'末端側かによらず、ポリ A リンカーの場合は 10 塩基のもの、ポリ T リンカーの場合は 15 塩基のものがそれぞれ最適であった。これは、ポリ A はポリ T と比べて、塩基スタッキング相互作用が強固であり、高分子鎖の曲がりにくさの指標である持続長が長いためであると考えられる<sup>119</sup>。したがって、ポリ A の方がより短いリンカー長で、多価アプタマーを設計できることを明らかにした。

表 6 二価アダプターの配列

ID	配列 (5'→3', リンカー配列: 赤)
HD1-T16-HD22 (既報アダプター)	GGTTGGTGTGGTTGGTTTTTTTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD1-A15-HD22 (既報アダプター)	GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-A5-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-A10-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-A15-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-A20-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-A25-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-T5-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-T10-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-T15-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-T20-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
M08s-T25-HD22	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-A5-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAAAAAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-A10-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAAAAAAAAAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-A15-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-A20-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-A25-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-T5-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT

HD22-T10-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAG GAATGGATGACCT
HD22-T15-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTTAGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGT TGGAGGAATGGATGACCT
HD22-T20-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGTCAGATGATGGGGATGG GGGGTTGGAGGAATGGATGACCT
HD22-T25-M08s	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGTCAGATGATGGG GATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT

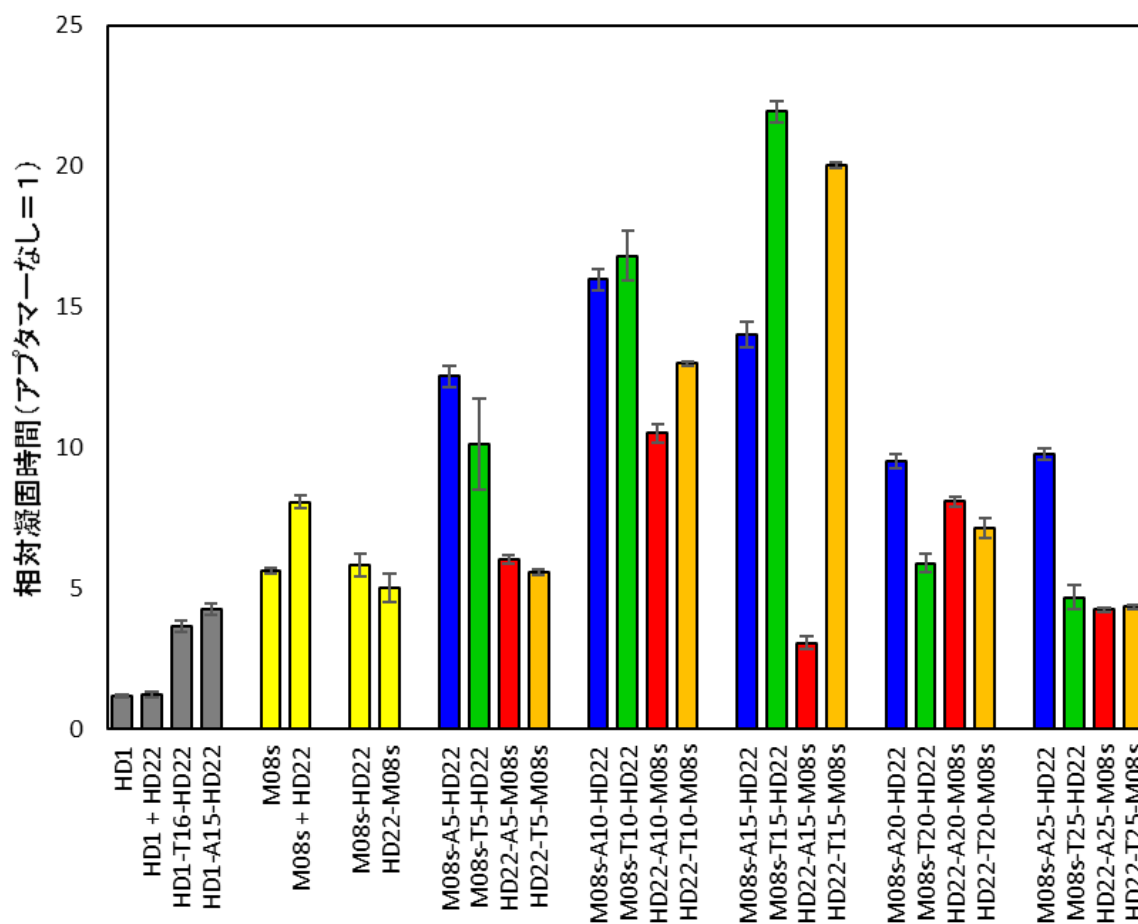


図 34 抗凝固活性の比較による M08s-1/HD22 二価アプタマーのリンカー検討

アプタマー非添加時における凝固時間を 1 とした相対凝固時間 (mean ± SE, n=3). 終濃度 : [アプタマー] = 2.5 nM, [トロンビン] = 2.5 nM, [フィブリノーゲン] = 0.4 mg/ml, バッファー : PBS (-). 二つのアプタマーの同時添加系 (HD1 + HD22, M08s + HD22) では, 各々のアプタマーの終濃度を 2.5 nM とした.



### 3.4. 結論

本章の研究では、前章で獲得した抗トロンビンアプタマー群の中から、臨床試験に進んだ抗トロンビンアプタマーの抗凝固活性を、10-20倍上回るアプタマーM08の同定に成功した。

二次構造予測とCDスペクトル解析の結果、M08はグアニン四重鎖を形成する大きなヘアピンループを形成している可能性が高いことがわかった。さらにM08短縮化配列(M08s-1, M08s-2)の機能解析の結果、5塩基対ほどのステム構造が、M08の機能発現のためのグアニン四重鎖のトポロジー維持に不可欠であることを明らかにした。

さらに、M08s-1とHD22を連結させることで、既報の二価アプタマーの4-5倍の抗凝固活性をもつ新規二価アプタマーの設計に成功した。また、二価アプタマーを結ぶリンカー配列検討の過程で、ポリAとポリTリンカーでは最適なリンカー長に違いがあることを明らかにした。

## 第4章

トーホールド介在鎖交換反応を用いる効率的な中和剤の設計

## 4.1. 序論

前章では、MACE-SELEX によって獲得した高親和性アプタマー群の中から、優れた抗凝固活性を有するアプタマー M08 の同定と最適化に成功した。

本章では、最適化した M08 すなわち M08s-1 の、より安全な投与を目指した中和剤の設計について報告する。

抗凝固薬に共通する致命的な副作用として出血リスクが挙げられ<sup>15</sup>、特異的中和剤の存在は抗血栓療法に不可欠になりつつある。近年、直接トロンビン阻害剤であるダビガトランに対する特異的中和抗体が開発され、臨床において効果を発揮している<sup>16</sup>。しかしながら、この中和剤は組み換えタンパク質製剤であるため、アナフィラキシーショックという重篤な副作用を伴う可能性がある。

他の分子標的薬とアプタマーを差別化する特長として、非動物由来かつ非組み換えタンパク質であること、相補的な DNA/RNA 鎖の導入によりアプタマーの薬効を特異的に抑制できることが挙げられる<sup>19-22</sup>。実際に、活性化第 IX 因子に対するアプタマーと中和剤 (REG1 抗凝固システム, 図 35) が、経皮的冠動脈形成術時に使用する薬剤として臨床第 III 相まで進んでいる<sup>19,63</sup>。しかしながら、薬効の抑制のために多量の中和剤を繰り返し投与する必要があり<sup>19,63</sup>、コストと患者の負担を軽減させるために高性能な中和剤の開発が望まれる。特に、本研究で獲得した M08 のように、グアニン四重鎖構造などの高次構造をもつアプタマーに対する中和剤 (相補鎖) の効率の悪さが指摘されている<sup>120</sup>。

そこで本研究では、トールホルド介在鎖交換の原理をこの中和剤に導入することを考案した。「トールホルド」と呼ばれる短い一本鎖末端配列は、核酸の鎖交換反応を最大  $10^6$  倍に加速することが知られており (図 36)<sup>121-124</sup>、アプタマーの中和反応の促進にも有効であると仮定した。

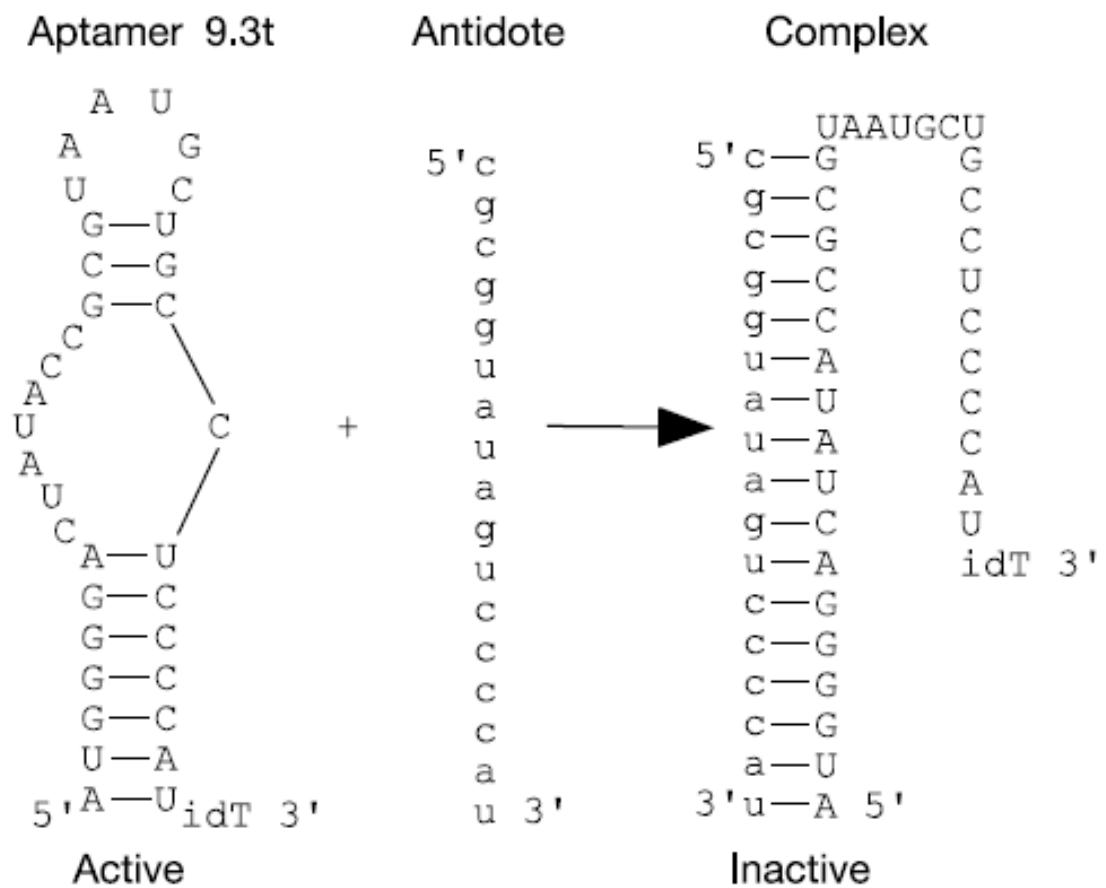


図 35 第 IX 因子に対する RNA アプタマーとその中和剤

参考文献 19 ; Rusconi, C. P. *et al.* RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa.

*Nature* **419**, 90–94 (2002)より引用

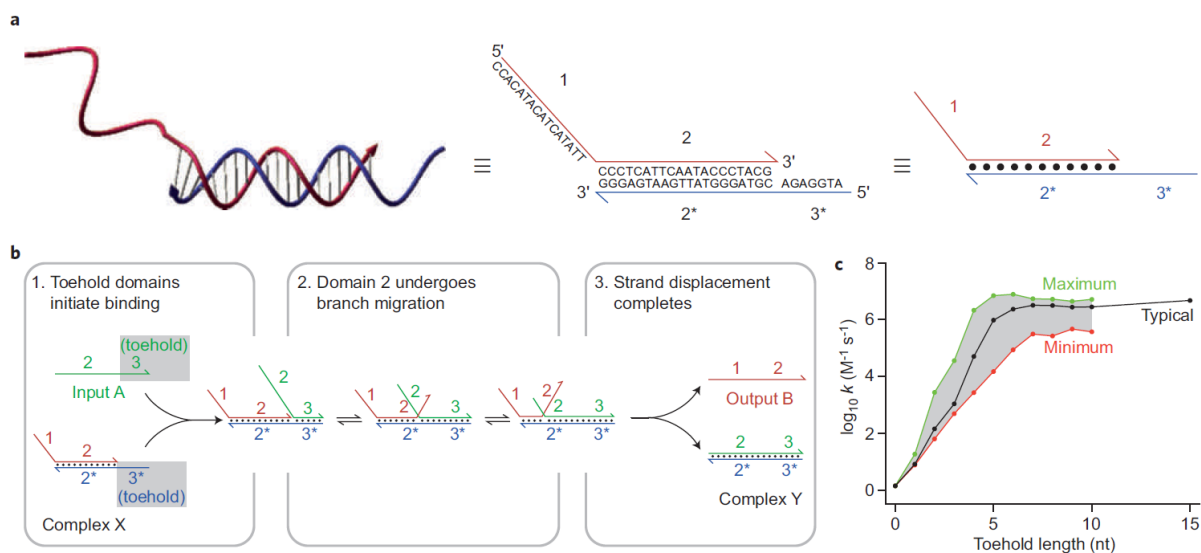


図 36 トーホールド介在鎖交換反応の原理

参考文献 124 ; Zhang, D. Y. & Seelig, G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat. Chem.* **3**, 103–113 (2011)より引用.

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. 試薬リスト

Thrombin from human plasma (Sigma-Aldrich, USA)

Fibrinogen (Wako, Japan)

Oligo DNAs (Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's PBS (-) (Wako, Japan)

### 4.2.2. 中和剤添加によるトロンビンの活性回復反応測定

フィブリンゲル形成の観測には Cytation 1 (BioTek, USA) または Viento Nano (BioTek, USA) と付属の Gen5 ソフトウェアを用いた。トロンビン、フィブリノーゲン、アプタマーに対して、中和剤を添加あるいは非添加時における凝固曲線を測定した。350 nm における吸光度の経時的な増大を測定することで凝固曲線を得た<sup>108</sup>。タンパク質、アプタマー、中和剤溶液は PBS (-) で調製した。まず、アプタマーまたは中和剤溶液をサーマルサイクラー (Takara Bio Inc., Japan) を用いて 95°C で 2 分間加熱した後、0.1°C/s の速さで 25°C まで冷却することでアニーリングした。アニーリング後、15  $\mu$ l の 10  $\mu$ M アプタマーと 15  $\mu$ l の 1  $\mu$ M トロンビンを 120  $\mu$ l の PBS (-) と混合し、15 分間室温で静置した。これを 50  $\mu$ l ずつ Corning® 96 Well Half-Area Microplate clear flat bottom, polystyrene, bag of 25, non-sterile, lid: no (Corning, USA) の各ウェルに分注した。50  $\mu$ l の 0.8 mg/ml フィブリノーゲンと 0, 1, 2, 4  $\mu$ M 中和剤の混合溶液を各ウェルに添加・混合し、測定を開始した。終濃度はトロンビンが 50 nM, アプタマーが 0.5  $\mu$ M, フィブリノーゲンが 0.4 mg/ml, 中和剤が 0, 0.5, 1, 2  $\mu$ M とした。

### 4.2.3. 凝固時間の算出

第 3 章 3.2.3. で示した方法と同様に、取得した凝固曲線のデータから凝固時間  $t_c$  を算出した。トロンビンによるフィブリンゲルの形成のより、図 27 で示すような凝固曲線が得られ

る<sup>108</sup>.  $t = 0$  における吸光度を  $A(0)$ , 凝固曲線の接線の傾きが最大値を  $\Delta A_m$ , 凝固曲線の接線の傾きが最大となる時間を  $t_m$ ,  $t = t_m$  における吸光度を  $A(t_m)$  とすれば, 凝固時間  $t_c$  は, 第3章 3.2.3. で示したように以下の式(7)で定義することができる<sup>108</sup>.

$$t_c = t_m - [A(t_m) - A(0)]/\Delta A_m \quad \cdots (7)$$

$\Delta A_m$  は Origin 7.0 ソフトウェアを用いて凝固曲線を一次微分することで算出した.

## 4.3. 結果と考察

### 4.3.1. ポリ A トーホールド配列付加による中和反応効率の向上

直接トロンビン阻害剤は、大出血のように重篤な合併症を引き起しうる<sup>125</sup>。したがって、緊急時に副作用を抑えるための、効果的な中和剤の設計は特に重要性である。アプタマー製剤は相補鎖を加えることによって薬効をコントロールできる可能性が高い。本研究で獲得した M08s-1 についてこれを立証するために、完全相補鎖を用いてアプタマーの抗凝固活性を中和することができるか検証した。まず、トロンビン、M08s-1 およびフィブリノーゲンの混合溶液に、途中で中和剤を添加した際の凝固曲線の推移を調べた。図 37 に示すように、アプタマーに対して 5 倍濃度の中和剤を添加したにもかかわらず、緩やかな散乱の増加が観測され、凝固曲線の最大勾配 ( $\Delta Am$ ) に達するまでに約 200 秒を要した。HD1 と HD22 の二価アプタマーに対して同様の実験をした結果では、わずか数秒で中和が完了していることを考えると<sup>21</sup>、明らかに中和効率は劣っている。この緩慢な中和反応は、強固な M08s-1/トロンビン相互作用とアプタマー分子内の高次構造に起因した平衡エネルギー障壁によるものであると考察した。

この中和反応効率を向上させるために、トーホールド介在鎖交換の原理を中和剤に応用することにした<sup>121-123</sup>。トーホールド配列をアプタマーの末端に付加し、それに対する相補鎖を中和剤として用いることで、アプタマーの機能抑制を早めることができると仮定した(図 38)。この仮定を検証するために、まず 15 塩基のポリ A トーホールド配列を付加した M08s-1 (Toehold-M08s-1) とそれに対する中和剤を設計した(表 7)。Antidote-1 は、アプタマードメインに対する相補配列である。Antidote-2-4 は、アプタマーおよびトーホールド配列ドメイン双方に対する相補配列である。図 39 には各中和剤の効率を示した。Antidote-1 及び Antidote-3 の処理によって、凝固時間は、それぞれ 32-79%、および 79-91%まで減少した。さらに  $\Delta Am$  は、それぞれ約 1.3-3.1 倍、5.4-11 倍に増加した。以上の結果より、ポリ A トー



ホールド介在鎖置換は、アプタマーに対する中和剤の性能向上に寄与した。

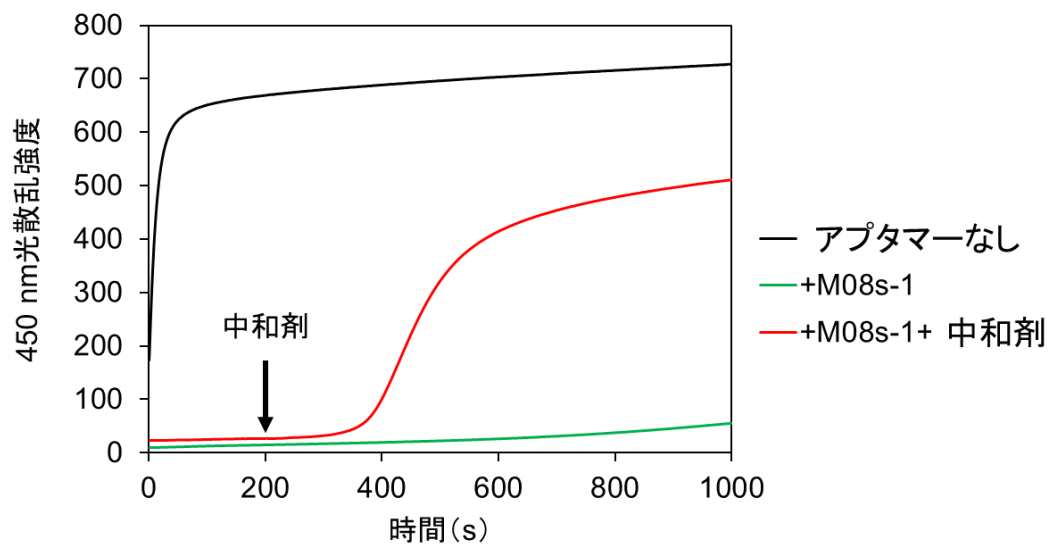


図 37 相補鎖の添加による抗凝固アプタマーの中和作用

アプタマー非添加時 (黒), M08s-1 添加時 (緑), M08s-1 添加かつ反応開始 200 s 後で完全相補鎖 (中和剤) 添加時 (赤) の凝固曲線. 終濃度: [フィブリノーゲン]= 0.4 mg/ml, [トロンビン]= 50 nM, [アプタマー]= 500 nM, [中和剤]= 2.5  $\mu$ M, バッファー: PBS (-).

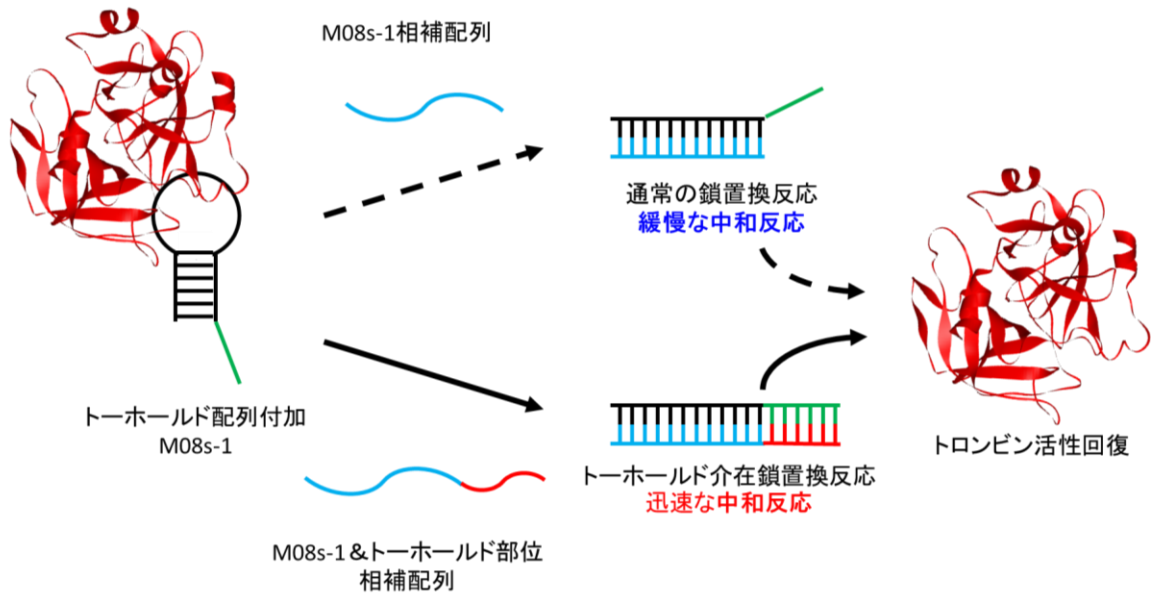


図 38 トーホールド介在鎖置換反応を利用した中和剤の概略図

アプタマー末端に短い足掛かり配列（トーホールド配列）を付加することで，迅速な中和反応を駆動可能であると仮定。

表 7 ポリ A トーホールド配列付加アダマーとポリ T トーホールド相補配列付加中和剤

ID	配列 (5' → 3')
Toehold-M08s-1	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCT <span style="color: green;">AAAAAAAAAAAAAAAA</span>
Antidote-1	<span style="color: cyan;">AGGTCATCCATTCCCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT</span>
Antidote-2	<span style="color: red;">TTTTT</span> <span style="color: cyan;">AGGTCATCCATTCCCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT</span>
Antidote-3	<span style="color: red;">TTTTTTTTTT</span> <span style="color: cyan;">AGGTCATCCATTCCCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT</span>
Antidote-4	<span style="color: red;">TTTTTTTTTTTTTTTT</span> <span style="color: cyan;">AGGTCATCCATTCCCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT</span>

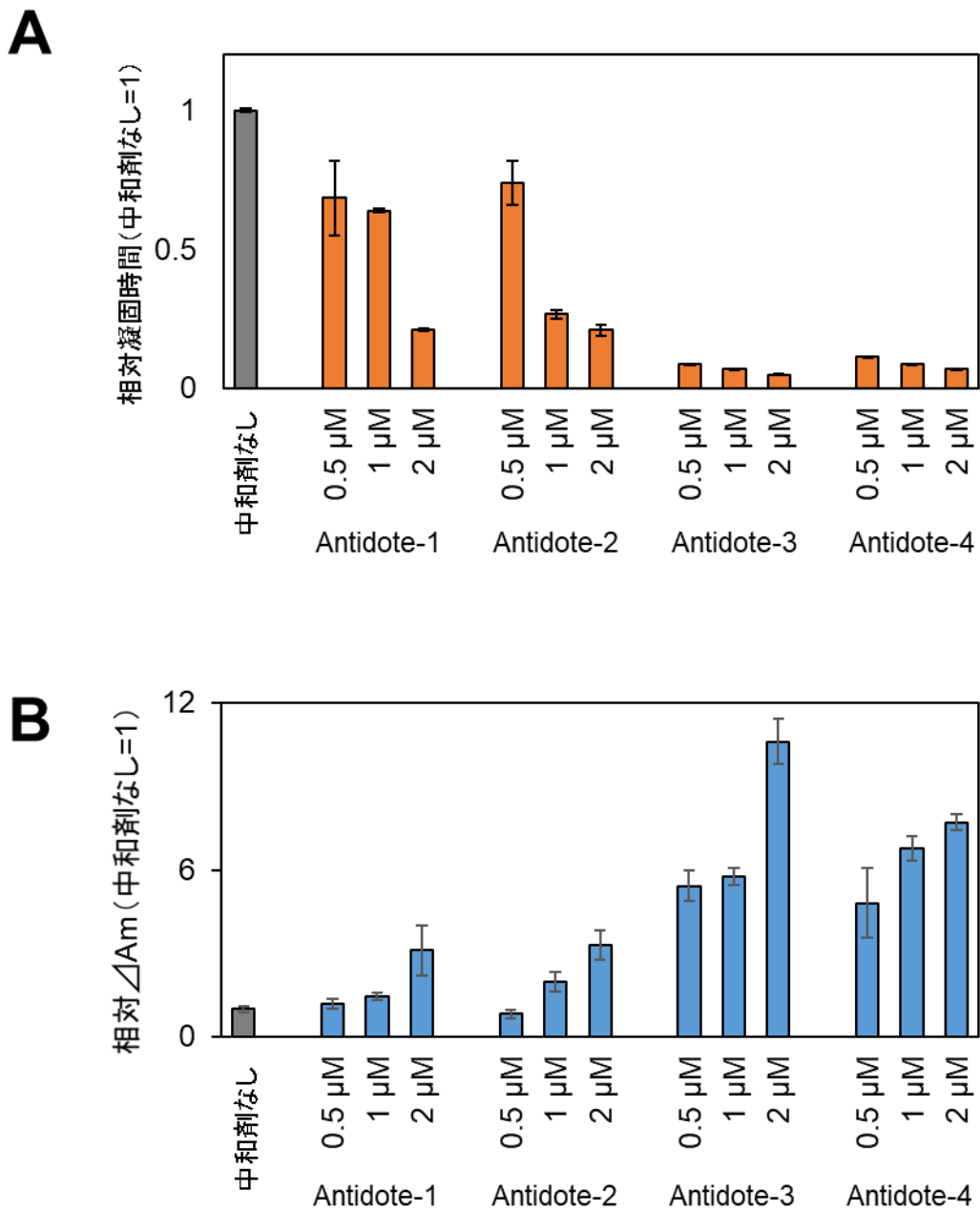


図 39 トーホールド相補配列部位を有する中和剤添加時の凝固時間の短縮効果

中和剤非添加時の値を 1 とした (A) 相対凝固時間と (B) 相対  $\Delta Am$ .  $\Delta Am$  は凝固曲線の最大値を示す (mean  $\pm$  SE, n=3). 終濃度: [フィブリノーゲン]= 0.4 mg/ml, [トロンビン]= 50 nM, [アプタマー]= 0.5  $\mu$ M, [中和剤]= 0, 0.5, 1, 2  $\mu$ M, バッファー: PBS (-).

### 4.3.2. トーホールド配列の最適化

より短くかつ活性の優れたトーホールド配列の同定により、生産コスト、投与量、元のアダプタマーの活性への影響の最小化が期待できる。前項のポリ A トーホールド配列アダプタマーを用いた結果では、10塩基のトーホールド相補配列を含む中和剤が最も優れた中和効率を示した。本項では、A/T/G/C または A/T または G/C からなる 10塩基のトーホールド配列を付加したアダプタマーを用いて、ポリ A を上回る中和促進作用を有するトーホールド配列の特定を試みた (表 8)。仮説では、熱力学的に安定な二本鎖を形成する G/C トーホールド配列が、最も効率が良くと推測された<sup>123</sup>。しかし、G/C トーホールドアダプタマーでは、中和剤の濃度依存的な中和反応の促進が観測されるのみで、トーホールド相補配列の有無とは無関係であった (図 40, 図 41)。これは、アダプタマーの配列内にグアニンが多いため、トーホールド配列や中和剤のトーホールド相補配列が、目的外のアダプタマー配列部位、あるいはその相補配列部位と相互作用し、トーホールド配列が機能していなかった可能性がある。A/T トーホールドアダプタマーでは、ポリ A トーホールド配列の時と同様に、10塩基のトーホールド相補配列を含む中和剤の効果が最も高く、5塩基という短いトーホールド相補配列では中和反応の促進が観測されなかった (図 40, 図 41)。一方、A/T/G/C トーホールド配列では、5塩基という短いトーホールド相補配列にも関わらず、アダプタマーと等量 (0.5  $\mu$ M) の中和剤の添加で 76%の凝固時間の短縮と、13 倍の  $\Delta Am$  の増加が観測された。これは、A/T/G/C 配列が、ポリ A または A/T 配列よりも二本鎖形成時の安定性が高く、かつ G/C 配列の時のような目的配列以外との相互作用が少なかったためであると考えられる。

最も活性が高かった A/T/G/C トーホールド配列を 5塩基にまで短縮したアダプタマーを用いて (A/T/G/C-Toehold-M08s-1-5nt, 表 8) 同様の中和反応実験をおこなった。結果として、アダプタマーと等量 (0.5  $\mu$ M) の中和剤の添加で 83%の凝固時間の短縮と、12 倍の  $\Delta Am$  の増加が観測された (図 42)。先行研究の REG-1 システムでは、類似の *in vitro* 系において、80%の酵素活性回復にアダプタマー濃度の 10 倍以上の中和剤を要している<sup>19</sup>。このことから、本研究で設計した中和剤の性能の高さがうかがえる。

表 8 A/T/G/C 比率の異なるトーホールド配列を付加したアダマーとその中和剤

ID	配列 (5' → 3')
A/T/G/C-Toehold-M08s-1-10nt	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTACTGCATGTC
A/T-Toehold-M08s-1-10nt	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTATTTATTATA
G/C-Toehold-M08s-1-10nt	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTCGCGCCGCCG
A/T/G/C-Toehold-M08s-1-5nt	AGGTCAGATGATGGGGATGGGGGGTTGGAGGAATGGATGACCTACTGC
Antidote-0nt (Antidote-1)	AGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
A/T/G/C-Antidote-5nt	GCAGTAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
A/T/G/C-Antidote-10nt	GACATGCAGTAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
A/T-Antidote-5nt	TAAATAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
A/T-Antidote-10nt	TATAATAAATAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
G/C-Antidote-5nt	GCGCGAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT
G/C-Antidote-10nt	CGGCGGCGCGAGGTCATCCATTCTCCAACCCCCCATCCCCATCATCTGACCT

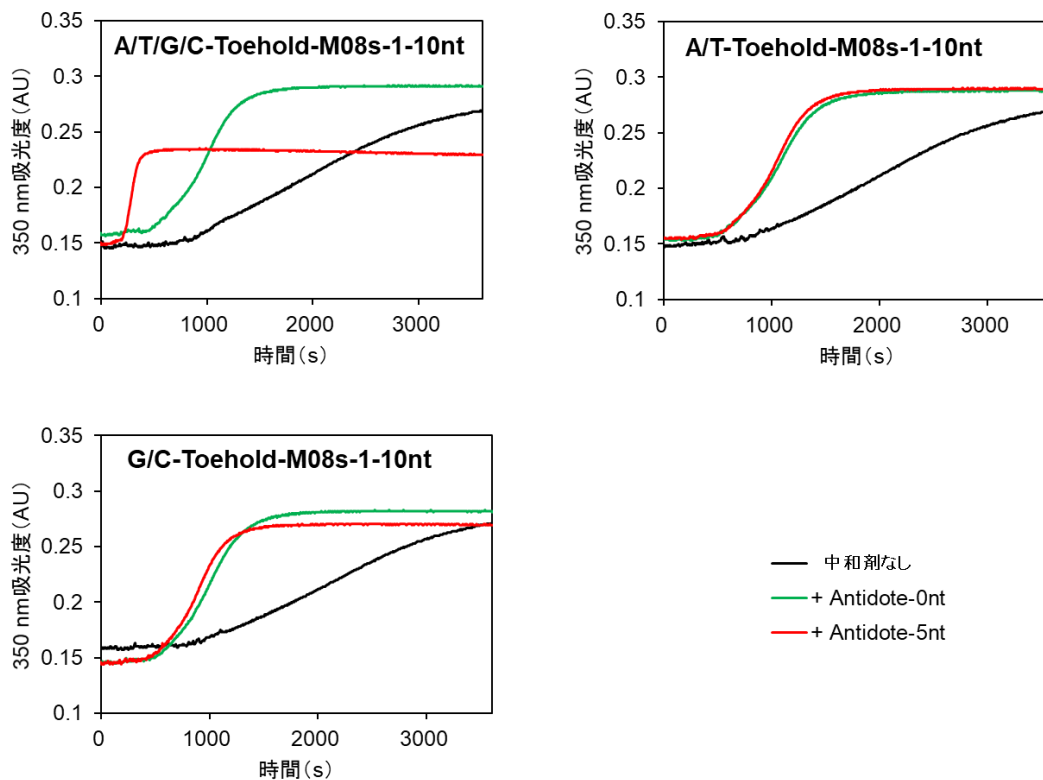


図 40 トーホールド配列の違いによる中和反応効果の違い

アプタマーと中和剤添加・非添加時の凝固曲線. A/T/G/C 等比率, A/T リッチ, G/C リッチな 10 塩基のトーホールド配列付加アプタマー (A/T/G/C-Toehold-M08s-1-10nt, A/T-Toehold-M08s-1-10nt, G/C-Toehold-M08s-1-10nt), 中和剤として, 5 塩基のトーホールド相補配列を付加したもの (A/T/G/C-Antidote-5nt, A/T-Antidote-5nt, G/C-Antidote-5nt) と, 比較のためにトーホールド相補配列をもたないもの (Antidote-0nt) を用いた. 終濃度: [フィブリノーゲン]= 0.4 mg/ml, [トロンビン]= 50 nM, [アプタマー]= 0.5  $\mu$ M, [中和剤]= 0.5  $\mu$ M, バッファー: PBS (-).



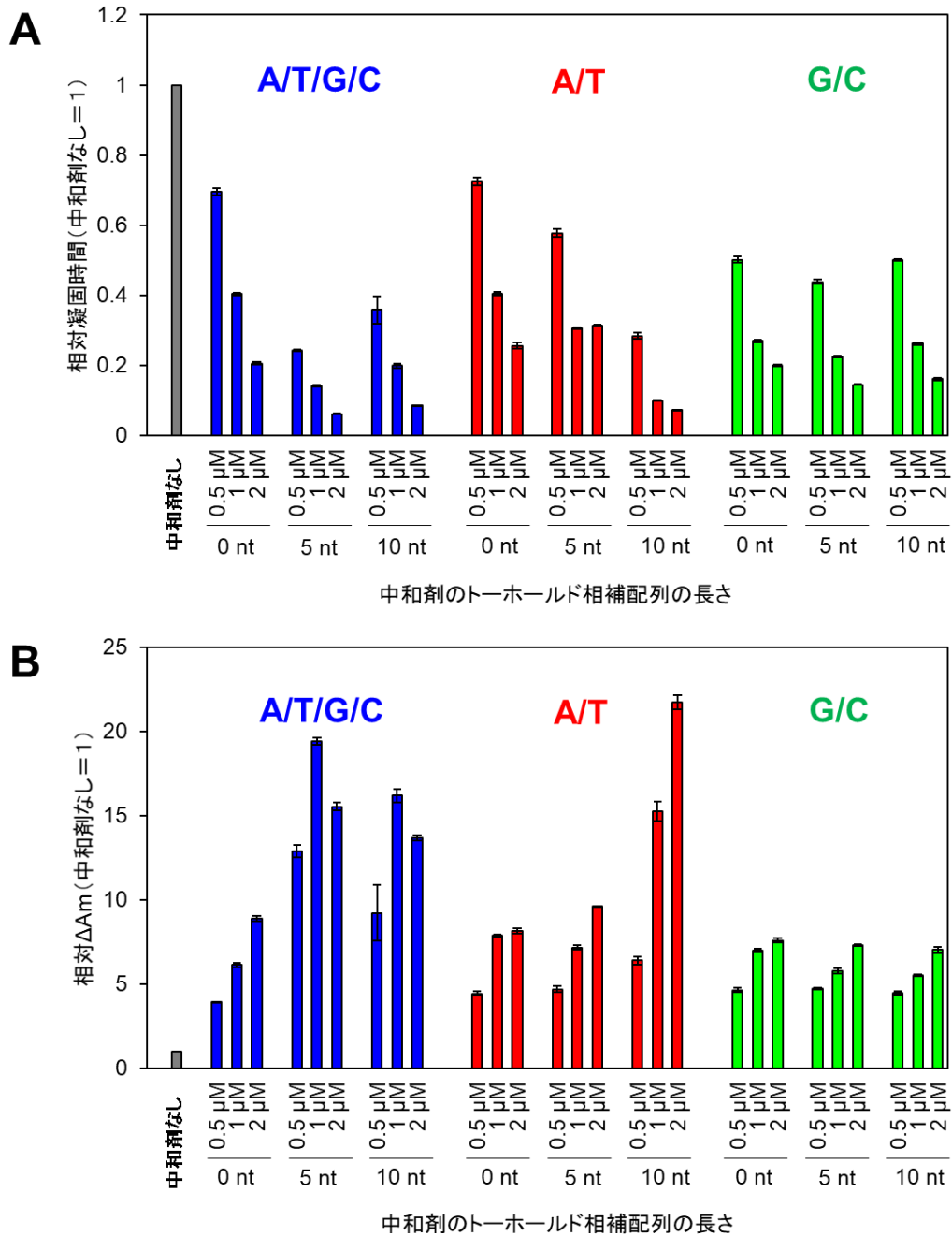


図 41 トーホールド配列，中和剤の濃度，トーホールド相補配列の長さの違いによる中和反応効果の違い

中和剤非添加時の値を1とした (A) 相対凝固時間と (B) 相対  $\Delta Am$  (mean  $\pm$  SE, n=3). A/T/G/C 等比率, A/T リッチ, G/C リッチな 10 塩基のトーホールド配列付加アプタマー (A/T/G/C-Toehold-M08s-1-10nt, A/T-Toehold-M08s-1-10nt, G/C-Toehold-M08s-1-10nt), 中和剤として 5, 10 塩基のトーホールド相補配列を付加したもの (A/T/G/C-Antidote-5/10nt, A/T-Antidote-5/10nt, G/C-Antidote-5/10nt) と, 比較のためにトーホールド相補配列をもたないもの (Antidote-0nt) を用いた. 終濃度: [フィブリノーゲン]=0.4 mg/ml, [トロンビン]=50 nM, [アプタマー]=0.5  $\mu$ M, [中和剤]=0.5, 1, 2  $\mu$ M, バッファー: PBS (-).

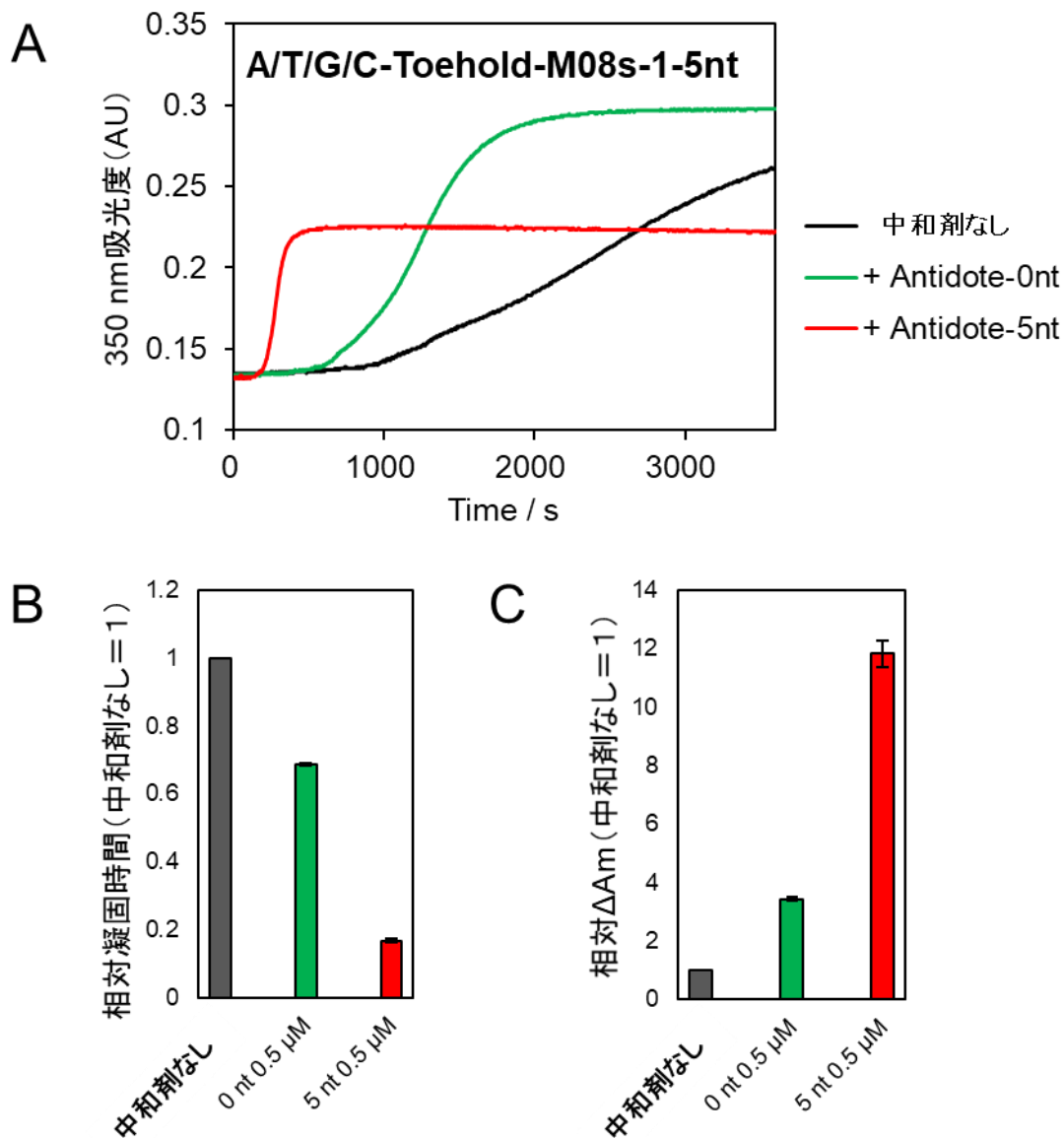


図 42 短い A/T/G/C トーホールド配列の中和剤性能評価

(A) アプタマーと中和剤添加・非添加時の凝固曲線. 5 塩基の A/T/G/C トーホールド配列付加アプタマー (A/T/G/C-Toehold-M08s-1-5nt), 中和剤として, 5 塩基のトーホールド相補配列を付加したもの (A/T/G/C-Antidote-5nt) と, 比較のためにトーホールド相補配列をもたないもの (Antidote-0nt) を用いた. 中和剤非添加時の値を 1 とした (B) 相対凝固時間と (C) 相対  $\Delta Am$  (mean  $\pm$  SE, n=3). 終濃度: [フィブリノーゲン]=0.4 mg/ml, [トロンビン]=50 nM, [アプタマー]=0.5  $\mu$ M, [中和剤]=0.5  $\mu$ M, バッファー: PBS (-).

## 4.4. 結論

本章では、優れた抗凝固活性をもつ M08s-1 に対する、高効率な特異的中和剤の設計について報告した。M08s-1 はステム/グアニン四重鎖構造という安定な高次構造をもつこと、トロンビンと強固な相互作用をすることから、単純な完全相補鎖による中和効率が低かった。

そこで、トーホールド配列という短い一本鎖末端配列をアプタマーに導入した結果、より低濃度の中和剤で迅速なアプタマーの機能抑制に成功した。

さらに、生産コスト、投与量、元のアプタマーの活性への影響の最小化のために、トーホールド配列を最適化した結果、高効率な中和反応を駆動するわずか 5 塩基という短いトーホールド配列の同定に成功した。本研究で得られた知見や短いトーホールド配列は、他のアプタマーの中和剤設計にも転用できる可能性がある。

## 第5章

### 総括

血液凝固系は生命の恒常性維持を担う重要な生体システムの一つであるが、先天的あるいは後天的な機能亢進によって、血栓塞栓症などの致死率が高い疾患を引き起こしうる。これまで、血栓塞栓症の予防あるいは治療薬として、血漿分画製剤や組み換えタンパク製剤、低分子化合物薬剤をはじめとした多様な抗凝固薬が開発されてきた。しかしながら、ウイルス感染症やアレルギー、さらには「出血リスク」などの重篤な副作用をとめない、安全性に対する懸念があった。人工的に化学合成と選抜が可能な「化学抗体」と称されるアプタマーは、優れた標的分子特異性や親和性をもちながら、上述の副作用のリスクが低いという特長がある。さらに、抗凝固薬に共通の副作用である「出血リスク」に備えた中和剤の設計が比較的容易であるという利点がある。しかし、アプタマー取得に多大な労力と時間を要するという根本的な課題が未解決なままであった。

そこで、私は本博士課程研究において、高親和性アプタマーの迅速な獲得技術の確立を図るとともに、新規抗凝固アプタマーの同定と改良に取り組んだ。結果として、第 2 章では独自のアプタマー選抜法であるマイクロ粒子支援型キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX) を樹立し、従来の SELEX 法の 1/5 から 1/10 の選抜工程で、既存の抗トロンビンアプタマーの親和性を上回るアプタマー群の特定に成功した。さらに、MACE-SELEX は天然核酸アプタマーだけではなく、非天然核酸アプタマーの迅速な取得にも有効であることを示した。第 3 章では、獲得した候補配列群の中から、既存の抗トロンビンアプタマーの 10-20 倍の抗凝固活性を有するアプタマー M08 の同定、そして配列最適化と多価化による活性向上に成功した。第 4 章では、前章で同定・最適化した抗凝固アプタマー M08s-1 の安全な投与を実現するために、高効率な特異的中和剤の設計に成功した。最適化したトールホールド配列を導入することで、より低濃度の中和剤で迅速にアプタマーの機能抑制が可能であることを示した。

本研究で開発した抗トロンビンアプタマーと特異的中和剤を臨床応用するためには、*in vivo* における更なる機能解析が必要であると考えられる。アプタマー製剤に共通の課題としては、血中滞留性の乏しさが挙げられる。本研究で獲得したアプタマー M08 は、グアニン四重鎖の

ような高次構造を形成するため、比較的優れたエンドヌクレアーゼ耐性があると予想される<sup>126,127</sup>。しかし用途次第では、環状化や化学修飾による、更なるヌクレアーゼ耐性の付与が必要となるかもしれない<sup>99,128</sup>。さらに、アプタマーを高分子ミセル化することで、腎排出が抑制による血中滞留性の向上が期待できる<sup>129</sup>。

また、アプタマーは抗体などのタンパク質に比べて免疫原性が低いとされているが<sup>130</sup>、CpG配列を含むDNAまたはRNAがToll-like receptorを介して免疫反応を引き起こすことがわかっている<sup>131</sup>。幸い、本研究で開発したM08s-1やその中和剤はCpG配列を含まないため、このような免疫反応は起きにくいと考えられる。

本研究で確立したMACE-SELEXの原理は、アプタマーの獲得のみならず、mRNAペプチド複合体ライブラリーやDNAコード化合物ライブラリーといった<sup>132,133</sup>、核酸ベースのライブラリーを用いる他のリガンド獲得技術にも適用できる可能性がある。さらに、MACEによる高精度な分離技術は、リポソームといった他の粒子にも適用できる可能性がある。したがって、基礎研究から創薬にいたるまで重要な標的とされてきた、膜タンパク質に対するリガンドの迅速な取得技術への展開も考えられる。

以上より、本研究で得られた知見や技術は、新たな抗凝固薬候補の創製のみならず、アプタマーをはじめとした分子標的リガンドの効率的な獲得と性能向上、そして安全性に優れたアプタマー製剤の利用につながるものと期待する。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始、私の意見やアイデアを尊重しながら、適切かつ熱心なご指導を戴いた、東京大学大学院 総合文化研究科 吉本敬太郎准教授に深く感謝致します。日々の助言から研究費に至るまで多大なるご支援を戴きました。

東京大学大学院 総合文化研究科 吉富徹助教には、日頃の実験から学会発表、論文執筆と投稿に至るまで、あらゆる場面で丁寧なご指導を戴きましたことに感謝致します。

埼玉大学 理工学研究科 物質科学部門 齋藤伸吾教授には、キャピラリー電気泳動に関するご指導をはじめ、ディスカッションを通して実験データの解釈に関する多くの洞察を戴きましたことに感謝致します。

東京大学大学院 総合文化研究科 陶山明教授、新井宗仁教授、佐藤守俊教授、浅井禎吾准教授には、大変お忙しいところ、博士論文の審査員を快くお引き受け戴きましたことに感謝致します。

日産化学工業株式会社 古性均博士には、シーケンサーをはじめとした様々な実験設備の利用や特許出願に関して、多大なご支援とご指導を戴きましたことに感謝致します。

吉岡純矢氏をはじめとした研究室の同期、先輩、後輩、秘書、技術補助員の皆様には、研究から私生活に至るまで、あらゆる場面でサポート戴きましたことに感謝致します。

最後に、三年間という長い間、精神的にも経済的にも私を支えて下さった、和久井正樹氏、和久井フキエ氏、和久井未紀氏、和久井終壺氏に感謝致します。

## 参考文献

1. van der Meijden, P. E. J. & Heemskerk, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* (2018). doi:10.1038/s41569-018-0110-0
2. Licari, L. G. & Kovacic, J. P. Thrombin physiology and pathophysiology. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **19**, 11–22 (2009).
3. Rao, P. S. S. & Burkart, T. Advances in oral anticoagulation therapy – What’s in the pipeline? *Blood Rev.* **31**, 205–211 (2017).
4. Martinelli, I., De Stefano, V. & Mannucci, P. M. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 140–156 (2014).
5. Jackson, S. P. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* **17**, 1423–1436 (2011).
6. Abas Osman, A., Ju, W., Sun, D. & Qi, B. Deep venous thrombosis: a literature review. *Int J Clin Exp Med* **11**, 1551–1561 (2018).
7. Buller, H. R. & Cate, J. W. T. Acquired antithrombin III deficiency: Laboratory diagnosis, incidence, clinical implications, and treatment with antithrombin III concentrate. *Am. J. Med.* **87**, S44–S48 (1989).
8. Dreyfus, M. *et al.* Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1565–1568 (1991).
9. Asakura, H. *et al.* Post-marketing surveillance of thrombomodulin alfa, a novel treatment of disseminated intravascular coagulation - Safety and efficacy in 1,032 patients with hematologic malignancy. *Thromb. Res.* **133**, 364–370 (2014).
10. Mulloy, B., Hogwood, J., Gray, E., Lever, R. & Page, C. P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol. Rev.* **68**, 76–141 (2015).
11. Joppa, S. *et al.* A Practical Review of the Emerging Direct Anticoagulants, Laboratory Monitoring, and Reversal Agents. *J. Clin. Med.* **7**, 29 (2018).
12. Amiral, J. & Seghatchian, J. Blood derived products in pediatrics: New laboratory tools for optimizing potency assignment and reducing side effects. *Transfus. Apher. Sci.* **56**, 107–117



- (2017).
13. Baker, M. P., Reynolds, H. M., Lumicisi, B. & Bryson, C. J. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self/Nonsel* - *Immune Recognit. Signal.* **1**, 314–322 (2010).
  14. Lovecchio, F. Heparin-induced thrombocytopenia. *Clin. Toxicol.* **52**, 579–583 (2014).
  15. Shoeb, M. & Fang, M. C. Assessing bleeding risk in patients taking anticoagulants. *J. Thromb. Thrombolysis* **35**, 312–319 (2013).
  16. Levy, J. H., Douketis, J. & Weitz, J. I. Reversal agents for non-vitamin K antagonist oral anticoagulants. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 273–281 (2018).
  17. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
  18. Radom, F., Jurek, P. M., Mazurek, M. P., Otlewski, J. & Jeleń, F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1260–1274 (2013).
  19. Rusconi, C. P. *et al.* RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **419**, 90–94 (2002).
  20. Stoll, H. *et al.* Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes. *Molecules* **22**, (2017).
  21. Kim, Y., Cao, Z. & Tan, W. Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5664–5669 (2008).
  22. Müller, J., Freitag, D., Mayer, G. & Pötzsch, B. Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 2105–2112 (2008).
  23. Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y. & Coffey, D. S. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* **62**, 4029–4033 (2002).
  24. Ota, K. *et al.* T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* **346**, 183–187 (1990).
  25. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. & Ruml, T. Current approaches in SELEX: An

- update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161 (2014).
26. Zhuo, Z. *et al.* Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2142 (2017).
  27. Yang, X., Li, N. & Gorenstein, D. G. Strategies for the discovery of therapeutic aptamers. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 75–87 (2011).
  28. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 20–21 (2004).
  29. Quigley, W. C. & Dovichi, N. J. Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers. *Anal. Chem.* **76**, 4645–4658 (2004).
  30. Timerbaev, A. R. Element speciation analysis using capillary electrophoresis: Twenty years of development and applications. *Chem. Rev.* **113**, 778–812 (2013).
  31. Rice, C. L. & Whitehead, R. Electrokinetic Flow in a Narrow Cylindrical Capillary. *J. Phys. Chem.* **69**, 4017–4024 (1965).
  32. Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Anal. Chem.* **53**, 1298–1302 (1981).
  33. Lukacs, K. D. & Jorgenson, J. W. Capillary zone electrophoresis: Effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation. *J. High Resolut. Chromatogr.* **8**, 407–411 (1985).
  34. Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A. & Krylov, S. N. Non-SELEX selection of aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1410–1411 (2006).
  35. Mosing, R. K. & Bowser, M. T. Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). in *Methods in Molecular Biology* **535**, 33–43 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009).
  36. Berezovski, M. *et al.* Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: A universal tool for development of aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3165–3171 (2005).
  37. Berezovski, M. & Krylov, S. N. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures - A single experiment reveals equilibrium and kinetic parameters of protein-DNA interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13674–13675 (2002).
  38. Berezovski, M. *et al.* Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of

- candidate oligonucleotides. *Nat Protoc* **1**, 1359–1369 (2006).
39. Tok, J., Lai, J., Leung, T. & Li, S. F. Y. Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **31**, 2055–2062 (2010).
  40. Ashley, J. & Li, S. F. Y. Three-dimensional selection of leptin aptamers using capillary electrophoresis and implications for clone validation. *Anal. Biochem.* **434**, 146–152 (2013).
  41. Drabovich, A. P., Berezovski, M., Okhonin, V. & Krylov, S. N. Selection of smart aptamers by methods of kinetic capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **78**, 3171–3178 (2006).
  42. Ueyama, H., Takagi, M. & Takenaka, S. A novel potassium sensing in aqueous media with a synthetic oligonucleotide derivative. Fluorescence resonance energy transfer associated with guanine quartet-potassium ion complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14286–14287 (2002).
  43. Ciesiolka, J., Gorski, J. & Yarus, M. Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>2+</sup>. *RNA* **1**, 538–50 (1995).
  44. Huizenga, D. E. & Szostak, J. W. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **34**, 656–665 (1995).
  45. Kalash, R. *et al.* Differences in irradiated lung gene transcription between fibrosis-prone C57BL/6NHsd and fibrosis-resistant C3H/HeNHsd mice. *In Vivo* **28**, 147–171 (2014).
  46. Spiga, F. M., Maietta, P. & Guiducci, C. More DNA-aptamers for small drugs: A capture-SELEX coupled with surface plasmon resonance and high-throughput sequencing. *ACS Comb. Sci.* **17**, 326–333 (2015).
  47. Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4928–4931 (2001).
  48. Xu, W. & Ellington, A. D. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7475–7480 (1996).
  49. Jarosch, F., Buchner, K. & Klussmann, S. In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Res.* **34**, e86 (2006).
  50. Amaya-González, S. *et al.* Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: influence of immobilization and labeling tags. *Anal. Chim. Acta* **873**, 63–70 (2015).

51. Williams, B. A. R., Lin, L., Lindsay, S. M. & Chaput, J. C. Evolution of a histone H4-K16 acetyl-specific DNA aptamer. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6330–6331 (2009).
52. Proske, D., Fliger, M. H., Sö Ll, R. M., Beck-Sickinger, A. G. & Famulok, M. A Y2 receptor mimetic aptamer directed against neuropeptide Y. *J. Biol. Chem.* **277**, 11416–11422 (2002).
53. Yunn, N. O. *et al.* Agonistic aptamer to the insulin receptor leads to biased signaling and functional selectivity through allosteric modulation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 7688–7701 (2015).
54. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. a, Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564–566 (1992).
55. Nonaka, Y. *et al.* Affinity improvement of a VEGF aptamer by in silico maturation for a sensitive VEGF-detection system. *Anal. Chem.* **85**, 1132–1137 (2013).
56. Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'Donoghue, M. B. & Tan, W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat. Protoc.* **5**, 1169–1185 (2010).
57. Morris, K. N., Jensen, K. B., Julin, C. M., Weil, M. & Gold, L. High affinity ligands from in vitro selection: Complex targets. *Biochemistry* **95**, 2902–2907 (1998).
58. Saito, S. *et al.* Rapid acquisition of high-affinity DNA aptamer motifs recognizing microbial cell surfaces using polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Chem. Commun.* **52**, 461–464 (2015).
59. Banerjee, J. & Nilsen-Hamilton, M. Aptamers: Multifunctional molecules for biomedical research. *J. Mol. Med.* **91**, 1333–1342 (2013).
60. Lee, J. O. *et al.* Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1023–1032 (2008).
61. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181–202 (2016).
62. Ng, E. W. M. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123–32 (2006).
63. Lincoff, A. M. *et al.* Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): A randomised clinical

- trial. *Lancet* **387**, 349–356 (2016).
64. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258–264 (2000).
  65. Waters, E., Richardson, J., Schaub, R. & Kurz, J. *Effect of NU172 and bivalirudin on ecarin clotting time in human plasma and whole blood-Posters. J. Thromb. Haemost.* **7**, (2009).
  66. Ikebukuro, K., Okumura, Y., Sumikura, K. & Karube, I. A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1–7 (2005).
  67. Savchik, E. Y. *et al.* Aptamer RA36 inhibits of human, rabbit, and rat plasma coagulation activated with thrombin or snake venom coagulases. *Bull. Exp. Biol. Med.* **156**, 44–48 (2013).
  68. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
  69. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
  70. Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S. & Hirao, I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotechnol.* **31**, 453–457 (2013).
  71. Matsunaga, K. I., Kimoto, M. & Hirao, I. High-affinity DNA aptamer generation targeting von Willebrand factor A1-domain by genetic alphabet expansion for systematic evolution of ligands by exponential enrichment using two types of libraries composed of five different bases. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 324–334 (2017).
  72. Davies, D. R. *et al.* Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19971–6 (2012).
  73. Gold, L. *et al.* Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One* **5**, e15004 (2010).
  74. Pfeiffer, F. *et al.* Identification and characterization of nucleobase-modified aptamers by click-SELEX. *Nat. Protoc.* **13**, 1153–1180 (2018).
  75. Tolle, F., Brändle, G. M., Matzner, D. & Mayer, G. A Versatile Approach Towards

- Nucleobase-Modified Aptamers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 10971–10974 (2015).
76. Lou, X. *et al.* Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2989–94 (2009).
77. Hybarger, G., Bynum, J., Williams, R. F., Valdes, J. J. & Chambers, J. P. A microfluidic SELEX prototype. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 191–198 (2006).
78. Cho, M. *et al.* Quantitative selection and parallel characterization of aptamers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18460–5 (2013).
79. Mosing, R. K., Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal. Chem.* **77**, 6107–6112 (2005).
80. Dong, L. *et al.* Screening and Identifying a Novel ssDNA Aptamer against Alpha-fetoprotein Using CE-SELEX. *Sci. Rep.* **5**, 15552 (2015).
81. Kasahara, Y. *et al.* Capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment selection of base- and sugar-modified DNA aptamers: Target binding dominated by 2'-O,4'-C-methylene-bridged/locked nucleic acid primer. *Anal. Chem.* **85**, 4961–4967 (2013).
82. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9382–9383 (2005).
83. Jing, M. & Bowser, M. T. Tracking the emergence of high affinity aptamers for rhVEGF165 during capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment using high throughput sequencing. *Anal. Chem.* **85**, 10761–10770 (2013).
84. Yufa, R. *et al.* Emulsion PCR significantly improves nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures-based aptamer selection: Allowing for efficient and rapid selection of aptamer to unmodified ABH2 protein. *Anal. Chem.* **87**, 1411–1419 (2015).
85. Bawazer, L. A. *et al.* Efficient selection of biomineralizing DNA aptamers using deep sequencing and population clustering. *ACS Nano* **8**, 387–395 (2014).
86. Ditzler, M. A. *et al.* High-throughput sequence analysis reveals structural diversity and improved potency among RNA inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1873–1884 (2013).
87. Takahashi, M. *et al.* High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the

- influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency. *Sci. Rep.* **6**, 33697 (2016).
88. Riley, K. R. *et al.* Combining capillary electrophoresis and next-generation sequencing for aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 1527–1532 (2015).
  89. Tasset, D. M., Kubik, M. F. & Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.* **272**, 688–698 (1997).
  90. Wang, J. *et al.* Particle display: A quantitative screening method for generating high-affinity aptamers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 4796–4801 (2014).
  91. Ahmad, K. M. *et al.* Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. *PLoS One* **6**, e27051 (2011).
  92. Trapaidze, A., Héroult, J. P., Herbert, J. M., Bancaud, A. & Gué, A. M. Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma. *Biosens. Bioelectron.* **78**, 58–66 (2016).
  93. Macaya, R. F. *et al.* Structural and Functional Characterization of Potent Antithrombotic Oligonucleotides Possessing both Quadruplex and Duplex Motifs. *Biochemistry* **34**, 4478–4492 (1995).
  94. Tsiang, M., Gibbs, C. S., Griffin, L. C., Dunn, K. E. & Leung, L. L. K. Selection of a suppressor mutation that restores affinity of an oligonucleotide inhibitor for thrombin using in vitro genetics. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 19370–19376 (1995).
  95. Ouellet, E., Lagally, E. T., Cheung, K. C. & Haynes, C. A. A simple method for eliminating fixed-region interference of aptamer binding during SELEX. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 2265–2279 (2014).
  96. Berezovski, M., Nutiu, R., Li, Y. & Krylov, S. N. Affinity analysis of a protein-aptamer complex using nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *Anal. Chem.* **75**, 1382–1386 (2003).
  97. Lipi, F., Chen, S., Chakravarthy, M., Rakesh, S. & Veedu, R. N. In vitro evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies. *RNA Biol.* **13**, 1232–1245 (2016).
  98. 阿部朗人. エチニルデオキシウラシルを導入した 核酸ライブラリーの調製とアプタマ

- 一選抜. 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系修士論文. (2017).
99. Lapa, S. A., Chudinov, A. V. & Timofeev, E. N. The Toolbox for Modified Aptamers. *Mol. Biotechnol.* **58**, 79–92 (2016).
  100. Gawande, B. N. *et al.* Selection of DNA aptamers with two modified bases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 2898–2903 (2017).
  101. Pinheiro, V. B. *et al.* Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science (80-. )*. **336**, 341–344 (2012).
  102. Helmling, S. *et al.* Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13174–9 (2004).
  103. Pica, A. *et al.* Through-bond effects in the ternary complexes of thrombin sandwiched by two DNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* **45**, 461–469 (2017).
  104. Troisi, R., Napolitano, V., Spiridonova, V., Russo Krauss, I. & Sica, F. Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer. *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky990
  105. Schwienhorst, A. Direct thrombin inhibitors - A survey of recent developments. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 2773–2791 (2006).
  106. Hasegawa, H., Taira, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. *Sensors* **8**, 1090–1098 (2008).
  107. Müller, J., Wulffen, B., Pötzsch, B. & Mayer, G. Multidomain Targeting Generates a High-Affinity Thrombin-Inhibiting Bivalent Aptamer. *ChemBioChem* **8**, 2223–2226 (2007).
  108. De Cristofaro, R. & Di Cera, E. Phenomenological analysis of the clotting curve. *J. Protein Chem.* **10**, 455–468 (1991).
  109. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
  110. Mergny, J. L., Phan, A. T. & Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **435**, 74–78 (1998).
  111. Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K. & Ikebukuro, K. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules* **21**, (2016).



112. Krauss, I. R. *et al.* Duplex/quadruplex oligonucleotides: Role of the duplex domain in the stabilization of a new generation of highly effective anti-thrombin aptamers. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 1697–1705 (2018).
113. Karsisiotis, A. I. *et al.* Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 10645–10648 (2011).
114. Bhasikuttan, A. C. & Mohanty, J. Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors. *Chem. Commun.* **51**, 7581–7597 (2015).
115. Chi, Q., Wang, G. & Jiang, J. The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **392**, 1072–1079 (2013).
116. Tian, L. & Heyduk, T. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. *Biochemistry* **48**, 264–275 (2009).
117. Ahmad, K. M., Xiao, Y. & Tom Soh, H. Selection is more intelligent than design: Improving the affinity of a bivalent ligand through directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11777–11783 (2012).
118. Nimjee, S. M. *et al.* Synergistic effect of aptamers that inhibit exosites 1 and 2 on thrombin. *RNA* **15**, 2105–2111 (2009).
119. Mills, J. B., Vacano, E. & Hagerman, P. J. Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of Poly(dT) and Poly(dA). *J. Mol. Biol.* **285**, 245–257 (1999).
120. Oney, S. *et al.* Development of universal antidotes to control aptamer activity. *Nat. Med.* **15**, 1224–1228 (2009).
121. Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P., Simmel, F. C. & Neumann, J. L. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature* **406**, 605–608 (2000).
122. Yurke, B. & Mills, A. P. Using DNA to Power Nanostructures. *Genet. Program. Evolvable Mach.* **4**, 111–122 (2003).
123. Zhang, D. Y. & Winfree, E. Control of DNA strand displacement kinetics using toehold exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17303–17314 (2009).

124. Zhang, D. Y. & Seelig, G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat. Chem.* **3**, 103–113 (2011).
125. Schwienhorst, A. Direct thrombin inhibitors – a survey of recent developments. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2773–2791 (2006).
126. Park, J. Y. *et al.* Gemcitabine-Incorporated G-Quadruplex Aptamer for Targeted Drug Delivery into Pancreas Cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **12**, 543–553 (2018).
127. Cao, Z., Huang, C. C. & Tan, W. Nuclease resistance of telomere-like oligonucleotides monitored in live cells by fluorescence anisotropy imaging. *Anal. Chem.* **78**, 1478–1484 (2006).
128. Kuai, H. *et al.* Circular bivalent aptamers enable in vivo stability and recognition. *J. Am. Chem. Soc.* jacs.7b04547 (2017). doi:10.1021/jacs.7b04547
129. Roloff, A., Carlini, A. S., Callmann, C. E. & Gianneschi, N. C. Micellar Thrombin-Binding Aptamers: Reversible Nanoscale Anticoagulants. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16442–16445 (2017).
130. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 537–550 (2010).
131. Bruno, J., Bruno & G., J. Potential Inherent Stimulation of the Innate Immune System by Nucleic Acid Aptamers and Possible Corrective Approaches. *Pharmaceuticals* **11**, 62 (2018).
132. Ishizawa, T., Kawakami, T., Reid, P. C. & Murakami, H. TRAP display: A high-speed selection method for the generation of functional polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5433–5440 (2013).
133. Shi, B., Zhou, Y., Huang, Y., Zhang, J. & Li, X. Recent advances on the encoding and selection methods of DNA-encoded chemical library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 361–369 (2017).