

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 和久井 幸二

【研究背景と目的】 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。しかし、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¹⁻³、これまでに、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⁴⁻⁶。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」といった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⁷⁻⁹。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。本研究では、この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。「化学抗体」と称されるアプタマーは Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) という手法によって人工的に獲得が可能であり¹⁰、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、アプタマー選抜工程の長期化や成功率の低さが課題となっていた。SELEX 法の基本工程は、(1) 核酸ライブラリーと標的分子の混合、(2) 結合性の核酸の分離、(3) 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築に大別され、この一連の操作を繰り返すことで目的の核酸アプタマー候補分子を濃縮していく。特に (2) のアプタマー/標的分子複合体の分離効率は SELEX の成功を左右する因子であり、高い分離性能を誇るキャピラリー電気泳動を用いる Capillary Electrophoresis-SELEX (CE-SELEX) は、最も高速な核酸アプタマーの取

得法の一つである¹¹。しかしながら、検出感度の限界によりアプタマー/標的分子複合体の CE 分取が不確実、アプタマーとの結合時に十分な CE 移動度シフトを起こす標的分子に限られるといった課題があった。

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、そのための第一段階として、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確立を試みた。この手法により、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。次に、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、より安全な投与を実現するために、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。

【結果】 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 μm) の混合溶液を CE によって直接分離する (図 1)。これにより、粒子由来の光散乱由来の吸光度変化を利用した複合体の高感度な検出を可能にした。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 (図 2)。計 3 ラウンド後の選抜操作後の大規模シーケンス解析の結果、MACE-SELEX では、CE-SELEX の約 200 倍の濃縮がかかっていることを確認した。また、表面プラズモンセンサーによって解離定数 (K_d) を算出した結果、従来法の 1/5-1/10 ほどのラウンド数にも関わらず、既報のアプタマー (HD1¹², HD22¹³, NU172¹⁴) よりも優れた新規アプタマー配列群の同定に成功した。さらに、MACE-SELEX を非天然塩基アプタマーの取得技術に応用した結果、計 3 ラウンドの MACE-SELEX により、既報の天然塩基アプタマーである HD1, HD22, NU172 と比べて解離速度が 4-72 倍遅い抗トロンビン修飾塩基アプタマー候補の濃縮に成功した。

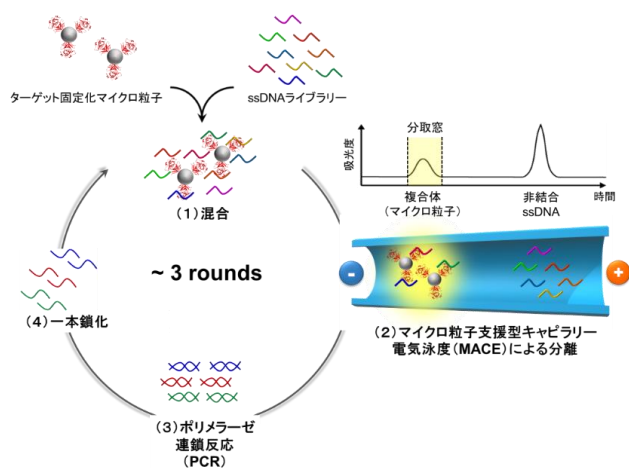


図 1 MACE-SELEX 概略図

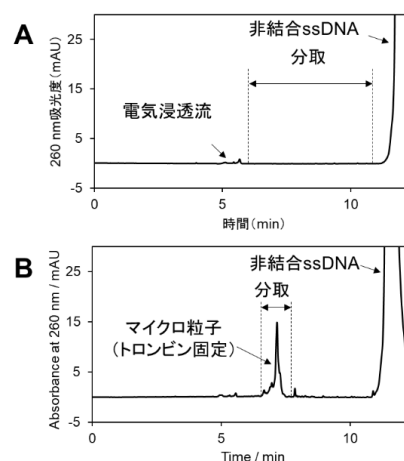


図 2 アプタマー候補の CE 分取
(A) CE-SELEX (B) MACE-SELEX

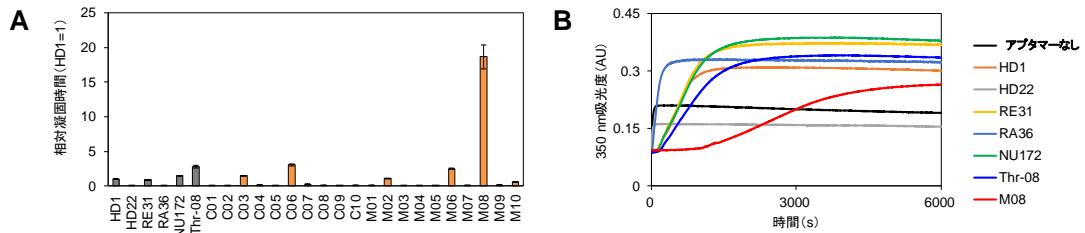


図3 トロンビンアプタマーの抗凝固活性 (A) 凝固時間 (B) 凝固曲線

次に、獲得した抗トロンビンアプタマーの中から、優れた抗凝固活性を示すアプタマ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し，抗凝固活性の指標となる凝固時間を算出した（図3）。臨床試験に進んだHD1とNU172などの既報の抗トロンビンアプタマ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¹²。結果として，HD1の20倍以上に凝固時間を延長するM08というアプタマーの特定に成功した。さらに，M08の配列最適化と多価化によって，抗凝固活性を高めることにも成功した。

最後に，緊急時に抗凝固アプタマーの効果を抑えるための，効率的な中和剤の設計を試みた。M08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（図4）。

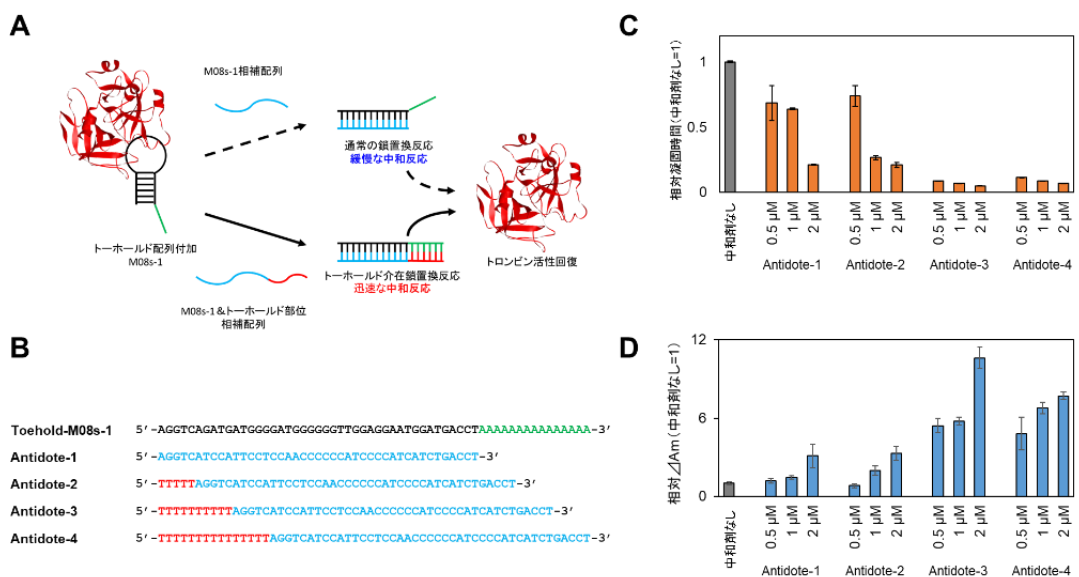


図4 トーホールド介在鎖置換反応を利用した中和剤の効果

(A) 概念図 (B) アプタマー/中和剤の配列 (C) 中和剤添加時の凝固時間と (D) 凝固曲線の傾き最大値 ΔAm

【結論】 私は本研究において、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、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 1/5-1/10 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。また、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。同定・最適化した抗凝固アプタマーの安全な投与を実現するための、高効率な特異的中和剤の設計に成功した。本研究で獲得した抗凝固アプタマーとその中和剤は、新たな血栓塞栓症の治療薬候補としての応用が期待できる。また、本研究で開発した MACE による分離技術は、核酸ベースのライブラリーを利用する、他の分子標的リガンドの獲得技術への応用も期待できる。

【参考文献】

1. Martinelli, I., De Stefano, V. & Mannucci, P. M. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 140–156 (2014).
2. Jackson, S. P. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* **17**, 1423–1436 (2011).
3. Abas Osman, A., Ju, W., Sun, D. & Qi, B. Deep venous thrombosis: a literature review. *Int J Clin Exp Med* **11**, 1551–1561 (2018).
4. 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).
5. 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).
6. Joppa, S. *et al.* A Practical Review of the Emerging Direct Anticoagulants, Laboratory Monitoring, and Reversal Agents. *J. Clin. Med.* **7**, 29 (2018).
7. 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).
8. 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).
9. Shoeb, M. & Fang, M. C. Assessing bleeding risk in patients taking anticoagulants. *J. Thromb. Thrombolysis* **35**, 312–319 (2013).
10. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
11. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 5387–5392 (2004).
12. 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).
13. Tasset, D. M., Kubik, M. F. & Steiner, W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.* **272**, 688–698 (1997).
14. 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).