

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 和久井 幸二

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。しかしながら、先天的あるいは後天的な機能亢進によって、血栓塞栓症などの罹患率と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、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。このような背景のもと、本研究では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、安全性に優れた新規抗凝固製剤候補の同定と改良を目的としている。

本論文は 5 つの章から構成されている。第 1 章では、本研究の背景として血液凝固と血栓症、抗凝固薬と副作用、核酸アプタマーとその獲得法 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment; SELEX) についてまとめ、従来の技術が抱える課題を明確に整理したうえで、本研究の目的を述べている。

第 2 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、従来のキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis; 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している。本研究で開発してい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) 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 によって直接分離している。同アプローチにより、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ができる。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・分取を可能である。結果として、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結果を示している。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ている。

第 3 章では、獲得した候補配列群の中から、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ている。アプタマーの性能を客観的に評価するために、臨床試験に進んだ HD1 と NU172 に加え、HD22, RE31, RA36, Thr-08 といった既報の抗トロ

ンビンアプタマーの抗凝固活性も評価し比較している。結果として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 の同定に成功している。さらに、配列最適化と多価化による活性向上に成功している。

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ついて述べている。トールド配列と呼ばれる短い配列をアプタマーに導入・最適化することで、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見出している。

第 5 章では、本研究の総括として前章までの内容を要約し、具体的に今後の課題と展望について述べている。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* における血中滞留性や安全性に関する解析が必要であると述べ、具体的な対応策についても提案している。また、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、核酸タグを有するライブラリーを用いる他のリガンド分子を獲得技術にも適用できる可能性があることを述べている。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ことから、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将来的な展開についても言及している。

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につながる、有用性、拡張性ともに優れた大変意義深いものである。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。