

抗凝固薬としての核酸アプタマー

吉本敬太郎^{1,2*}, 坂田飛鳥³, 稲見有希²

Nucleic acid aptamers as an anti-coagulant drug

Keitaro YOSHIMOTO, Asuka SAKATA, Yuuki INAMI

Key words: nucleic acid, aptamer, thrombin, anti-coagulant, bivalent

1. 核酸アプタマーと SELEX 法

核酸アプタマーは標的分子に対して結合親和性をもつ一本鎖核酸であり, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) という試験管内における進化分子工学的手法で獲得することができる。抗体は動物や細胞を使って製造するため, ロット差による性能のバラつきは避けられず, 発現させる細胞が異なれば翻訳後修飾も変化する可能性がある。また, 抗体製造には細胞培養や動物を飼育する設備や施設が必要であるため, 製造コストを抑えるにも限界がある。一方, 核酸アプタマーは化学合成で製造できる。分解酵素などが混入しない適切な環境下で保管すれば, 常温で長期間の保管が可能である。品質のバラつきも少ないため, 抗体と比較して製造面で大きなアドバンテージがある。一本鎖核酸であるアプタマーは, 配列が同定済であれば PCR 用のプライマーを購入するのと同じ方法で受託合成会社から入手することができる。10~20 塩基程度の短い核酸であれば, Web で注文した塩基配列が翌日に安価に手に入る時代である。核酸アプタマーには RNA を用いたものと DNA を用いたものがあるが, RNA アプタマーは分解されやすいために糖鎖部

位や末端部位の化学修飾を行うことで分解耐性を付与するアプローチが一般的である。

1990 年に二つの研究グループが SELEX 法を用いて核酸アプタマーを獲得し, ほぼ同時期に論文誌上で報告した。Tuerk と Gold は DNA ポリメラーゼに結合する RNA アプタマーの選抜を¹⁾, Ellington と Szostak はアデノシン三リン酸 (ATP) に結合する RNA アプタマーの選抜を行った²⁾。SELEX 法の原理を確認するための Proof of Concept 的な実験であったため, 両者とも最初の標的分子として選んだ分子は核酸との相互作用が期待できる核酸関連分子であった。両論文の発表の後, 核酸非関連分子も含めた低分子, タンパク質, 細胞, 菌などに結合するアプタマーが続々と報告されることになる。血液凝固因子に対する核酸アプタマーの獲得も精力的に行われている。

2. 承認済の核酸アプタマー薬

2024 年 5 月の時点で承認済の核酸アプタマー薬は 2 品目で, 両薬剤共に眼疾患に対する局所投与型の薬である³⁾。2004 年に米国で承認された Macugen と, 2023 年に米国で承認された Izervay は, 両薬剤とも RNA アプタマーで, 対象疾患は加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration: AMD) という眼疾患である。AMD は, 主に高齢者に発症する網膜の中心部である黄斑の退行性疾患で, 視力低下や視野中心が見えにくくなる症状をきたす疾患である。AMD には, 滲出型 (湿性 AMD) と萎縮型 (乾性 AMD) の 2 種類があり, 世界全体では滲出型が全体の 10% を占めており, 残りの 90% が萎縮型である。

¹ 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

² 株式会社リンクバイオ

³ 奈良県立医科大学血栓止血医薬生物学

*責任者連絡先:

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

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Tel: 03-5454-6580, Fax: 03-5454-6580

E-mail: ckeitaro@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Aptamer	Type	Target	Stage
ARC183 (HD1)	DNA	Thrombin (exosite 1)	Phase I
NU172	DNA	Thrombin (exosite 1)	Phase II
REG1	RNA	Factor IX and IXa	Phase III
REG2	RNA	Factor IX and IXa	Phase I
ARC1779	DNA	Von Willebrand Factor	Phase II
BAX499	DNA	Tissue Factor Pathway Inhibitor	Phase I

図1 治験ステージに進んだ血液凝固因子に結合する核酸アプタマー

しかし、興味深いことに、患者数が少ない滲出型 AMD の市場は乾性 AMD よりも大きく、2024 年までに 104 億ドルに達する見込みであるが、同市場は競合薬が多い⁴⁾。Macugen の標的分子は VEGF（血管内皮増殖因子）で、対象疾患は市場規模が大きく、競合薬が多い滲出型 AMD である。一方、Izervay の標的は補体系の分子で、対象疾患は萎縮型 AMD である。萎縮型 AMD は、現時点では滲出型 AMD に比べて市場規模は小さいが治療薬が少なく、Izervay を含めても 2 品目程度しかない。眼内投与薬剤は少ない投与量に加え、細い注射針で投与する必要があるため粘性が高い薬液は不適である。アニオン性ポリマーである核酸の水に対する高い溶解度、さらに高濃度溶液であっても粘性が低いという特長は、眼内投与薬剤として適している。

3. 血液凝固因子に結合する核酸アプタマー

核酸アプタマーの特長の一つに“相補鎖配列がある”ことが挙げられる。核酸塩基間の水素結合やスタッキングなどの非共有結合が駆動力となり、相補鎖同士はワトソン・クリック塩基対で二重鎖を形成する。核酸アプタマーの分子認識能は、一本鎖核酸が形成する高次構造に由来するため、アプタマーの塩基配列と相補な一本鎖配列を添加すると、アプタマーの高次構造は崩れ、二重鎖核酸を形成する。すなわち、核酸アプタマーの相補鎖は、アプタマーを標的分子から解離させ、薬理作用の停止（中和）を可能とする。核酸アプタマーの場合、塩基配列から相補塩基配列の設計は容易に可能であるため、ある標的分子に結合する核酸アプタマーが取れた時点で中和剤も一緒に獲得できることになる。現在のメ

インの創薬モダリティは低分子化合物やタンパク質であるが、相補鎖で薬効を制御できる点は、他のモダリティにはない核酸アプタマーが誇る大きな特長である。例えば、抗凝固薬利用時に懸念される出血リスクを低減する、安全性の高い血栓症治療の開発も可能である。核酸アプタマー薬の相補鎖による中和効果に気が付いた研究者らは、血栓症治療薬としての核酸アプタマー薬の開発に精力的に取り組むことになる。Liu らの総説⁵⁾に、血液凝固因子に対して獲得された核酸アプタマーがまとめられている。同総説内にある治験ステージまで開発が進んだ核酸アプタマーリストの一部を抜粋し、図1にまとめた。これ以外にも多くの血液凝固因子に対する核酸アプタマーが獲得され、血液凝固関連疾患の治療薬としての研究や開発が行われている。

4. 抗トロンビン DNA アプタマー

トロンビンはセリンプロテアーゼであり、基質であるフィブリノーゲンを限定分解して、不溶性のフィブリンを生成することで血栓形成に寄与する。トロンビンとフィブリノーゲン間の結合を阻害する薬は、血栓症の予防・治療薬となる。トロンビンに結合する DNA アプタマーは、1992 年に Bock らのグループによって 15 塩基配列からなる HD1 が SELEX 法で獲得され、抗凝固薬として研究開発が開始された。残念ながら Phase I で開発中止となったが、その後、トロンビンに対する結合親和性が大きく改善された NU172 が設計された。両アプタマーはともに分子内にある四重鎖構造部位でトロンビンの exosite 1 と結合する点は同じであるが、トロンビンに対する結合親和性は NU172 の方が HD1 よりも約 10 倍程度高

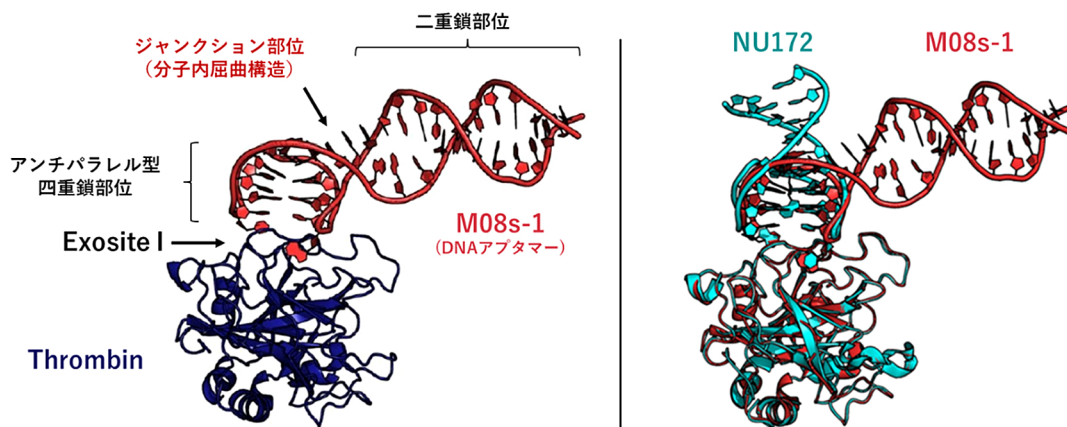


図2 M08s-1 の分子構造 (左) と NU172 との重ね合わせ (右)

い、2013年にNU172は抗凝固薬としてPhase IIの治療がスタートしたが、残念ながらその後の進捗については報告がない⁶⁾。トロンビンを標的とする抗凝固薬としての核酸アプタマーは、現時点では上市に至っていない。

著者らの研究グループは、核酸アプタマー群を効率よく獲得する独自技術MACE®-SELEX法を開発し(東京大学と(株)リンクバイオの共同特許技術, WO2017126646A1), これまでにタンパク質や低分子に結合する複数のDNAアプタマーの獲得に成功している⁷⁻¹⁰⁾。なかでも、トロンビンに対して結合親和性をもつ10個のDNAアプタマー群・Mシリーズの獲得に成功し、抗トロンビンDNAアプタマー史上最高の抗凝固作用を示すM08を発見した。興味深いことに、M08のトロンビンに対する結合親和性はNU172と同程度であったが、*vitro*における抗凝固活性はNU172を凌駕していた。同アプタマーの高い抗凝固活性の要因を明らかにするため、イタリア・ナポリ大学のグループと共同でX線結晶構造解析を行ったところ、M08の短鎖化体(M08s-1)とトロンビンとの複合体の構造が明らかとなり、M08s-1は既報の抗トロンビンDNAアプタマーにはないユニークな分子内屈曲構造をもつことが明らかとなった(図2)。既報アプタマーNU172と我々が獲得したM08s-1の構造を重ね合わせた図(図2右)からわかるように、NU172の構造が図の上方向に伸びているのに対し、M08s-1は図の右方向に比較的大きな二重

鎖構造をもつことがわかる。つまり、M08s-1が形成するユニークな分子内屈曲構造の先にある二重鎖構造が立体障害となり、フィブリノーゲンのトロンビンへの結合を抑制することが明らかとなった¹¹⁾。トロンビンに対する結合親和性に加え、アプタマーのユニークな高次構造が高い薬理活性を生み出す珍しいケースであった。

5. M08s-1の多価化と*ex vivo*評価

著者らの研究グループは、既存薬が利用できない血栓症や指定難病の血栓症に対する抗凝固薬としてM08s-1の二価性アプタマーの開発を現在進めている¹²⁾。アプタマーの結合親和性を向上させる手段として、多価化は常套手段の一つであり、塩基配列を設計して合成機で化学的に製造するため、二重特異性抗体のように精製の工程で大きな労力を割く必要がない。例えば、既報抗トロンビンアプタマーの場合、トロンビンのエキソサイトIに結合するHD1とエキソサイトIIに結合するHD22を柔軟な一本鎖DNAで連結したものや、剛直な二本鎖型DNAで連結したものが報告されており、ともに単量体アプタマーよりも高い結合親和性と薬理活性が発現していた。この知見に基づき、我々は、図3に示すM08s-1を含む4種類のバイスペシフィックアプタマーをリンカー種とアプタマーの組み合わせを変えて設計したところ、ヒトトロンビン、およびマウストロンビ

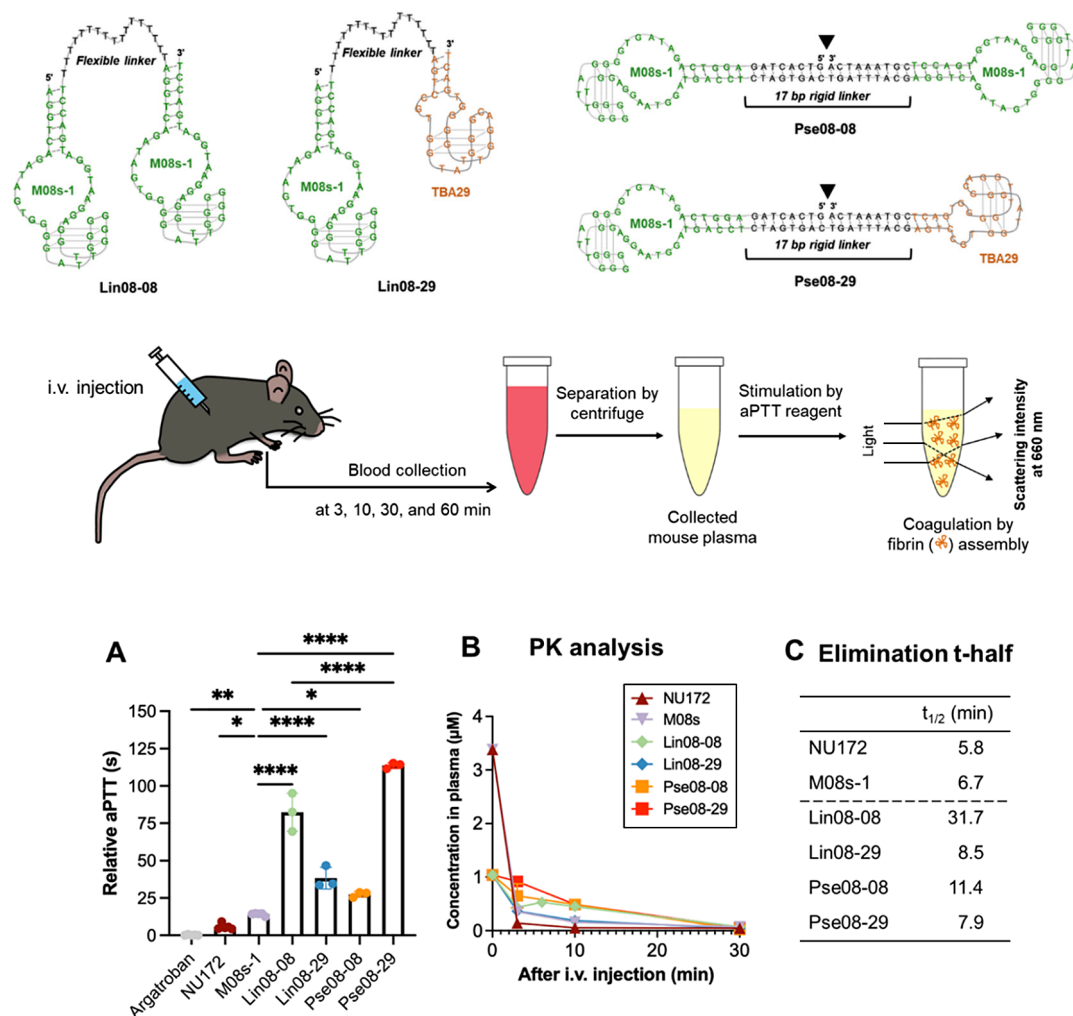


図3 M08s-1を含む二価アプタマー（上）と *ex vivo* 実験の結果（下）

ンに対する結合親和性は、4種類すべてが単量体アプタマーM08s-1よりも約100倍向上することが明らかとなった。

図3のA～Cに、マウスを用いて行った動物実験の結果を示す。ヘパリン起因性血小板減少症（heparin-induced thrombocytopenia: HIT）の承認薬アルガトロバン、単量体アプタマー、バイスペシフィックアプタマーを等モル量マウスに静脈投与した後、回収した血漿を用いて抗凝固活性を比較した。その結果、バイスペシフィックアプタマーがアルガトロバンや既報の臨床候補アプタマーであるNU172の抗凝固活性を大幅に上回っていること、なかでもLin08-08とPse08-29はM08s-1の7倍から10倍高い薬理活性をマウスの体内で発現していることが明

かとなった（図3A）。興味深いのは、2つの単量体アプタマーNU172およびM08s-1は、3分後の分布段階で血中濃度が急速に減少しているが、二量体では急速な減少は観測されていない（図3B）。最も高い抗凝固活性を示したのは二種のアプタマーを連結したPse08-29であったが、最も長い血中半減期を示したのはM08s-1を二つ連結したLin08-08であり、単量体アプタマーの5倍の長さの半減期であった（図3C）。これまでMacugenやIzervayのように、末端にPEGを化学修飾することが半減期を延ばすための常套手段として利用されてきたが、我々の結果は、多価化が核酸アプタマーの短い半減期を改善するもう一つの手段となり得る可能性を示唆している。

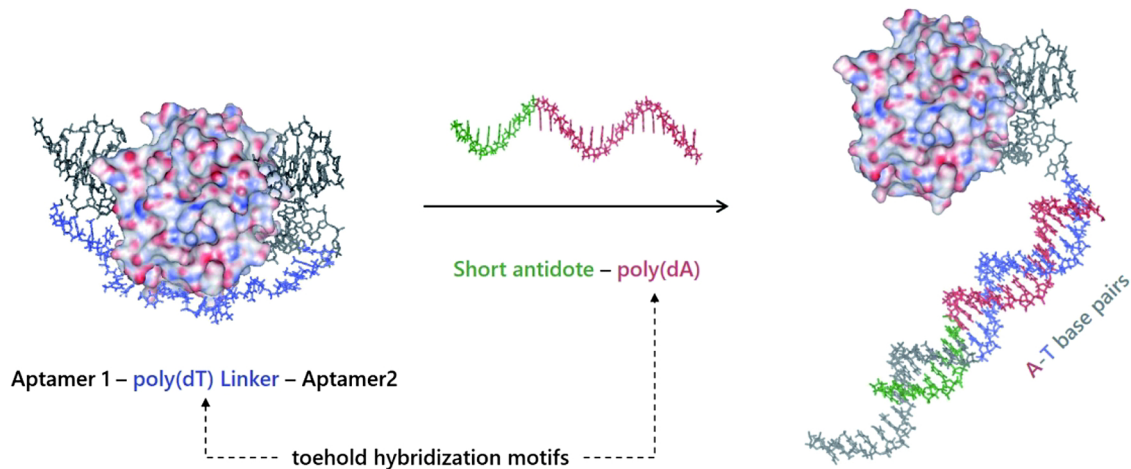


図4 トロンビンから二価アプタマーの一部を中和用一本鎖核酸が解離する模式図
(文献¹³⁾より引用)

6. まとめと展望

本稿では、核酸医薬品のカテゴリーの一つである核酸アプタマー薬について、トロンビンに結合するアプタマーを中心に、著者らの研究成果も交えて解説を行った。独自に開発した核酸アプタマー選抜法で獲得したユニークな高次構造をもつM08が、既存トロンビンアプタマーよりも高い薬理作用を示すこと、さらに二価化することで薬理作用の向上と半減期の大幅な改善が可能であることを研究成果として得ている。核酸アプタマーの特長をまとめると、①製造コストが安価、②高い保存安定性（輸送・保管時の低温管理が不用）、③多価化が容易、④相補鎖で薬効の調節（中和）が可能、などが挙げられる。なかでも④の特長は、他の創薬モダリティにはない核酸アプタマー特有のもので、抗凝固薬利用時に懸念される出血リスクを低減することができ、安全性の高い血栓症治療の開発に繋がる。読者の理解を助けるために、二価アプタマーのうち、片方のアプタマーを短い相補鎖核酸で標的分子から解離する模式図を図4に示す。

しかし、未だ抗凝固薬としての核酸アプタマーは治験の壁を越えることができていない。最も開発が進んだ抗凝固アプタマーは、図1にリストした血液凝固第九因子（FIX）に結合して活性を阻害するREG1である。相補鎖も併せてPhaseIIIまで治験が進

んだが、REG1もMacugenやIzervayと同じくPEGが末端に修飾されたRNAアプタマーであったため、pre-existing PEG抗体を保有する患者でアナフィラキシー様反応が発生してしまい、2014年に治験が中止となった^{14, 15)}。核酸アプタマー薬は承認実績がまだ少ないため、比較的若いモダリティである核酸アプタマーに化学修飾は開発リスクが高いと予想する。可能であれば化学修飾や人工核酸を導入せずに、毒性のリスクが低いシンプルな分子設計で核酸アプタマー薬の承認実績を積み上げる時期ではないかと考える。我々が進めているM08s-1の二価アプタマーは、REG1のようなリスクを避けるため、化学修飾を一切行わずに多価化で基本性能を向上させつつ、長い半減期を必要としない急性期の点滴薬を市場参入の入口として設定している。Macugenが承認されてからIzervayが承認されるまで約20年の時間が経過しており、この間に創薬モダリティとしての核酸アプタマーの印象は大きく低下した。核酸アプタマー薬の研究開発を活性化させ、短期間で上市を成功させる確率を高めるためには、産官学協力による研究資金の確保に加え、シンプルな分子設計および創薬戦略が鍵となる可能性が高い。血液凝固疾患分野から第三の核酸アプタマー薬が生まれることを祈念し、本稿を閉じる。

著者全員の利益相反 (COI) の開示：

吉本敬太郎：役員・顧問職・社員など (リンクバイオ), エクイティ (株など) (リンクバイオ), 研究費 (受託研究, 共同研究, 寄付金等) (リンクバイオ)
坂田飛鳥：企業などが提供する寄附講座 (中外製薬)
稲見有希：役員・顧問職・社員など (リンクバイオ)

文献

- 1) Tuerk C, Gold L: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505–510, 1990.
- 2) Ellington AD, Szostak JW: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818–822, 1990.
- 3) Hristodorov D, Lohoff T, Luneborg N, et al.: Investing in vision: Innovation in retinal therapeutics and the influence on venture capital investment. *Prog Retin Eye Res* **99**: 101243, 2024.
- 4) <https://www.psmarketresearch.com/market-analysis/wet-age-related-macular-degeneration-market>
- 5) Liu M, Zaman K, Fortenberry YM: Overview of the therapeutic potential of aptamers targeting coagulation factors. *Int J Mol Sci* **22**: 3897, 2021.
- 6) <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00808964>
- 7) Wakui K, Yoshitomi T, Yamaguchi A, et al.: Rapidly neutralizable and highly anticoagulant thrombin-binding DNA aptamer discovered by MACE SELEX. *Mol Ther Nucleic Acids* **16**: 348–359, 2019.
- 8) Wakui K, Abe A, Yoshitomi T, et al.: High enrichment of nucleobase-modified aptamers in early selection rounds by microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX. *Analytical Sciences* **35**: 585–588, 2019.
- 9) Nagano M, Oguro T, Sawada R, et al.: Accelerated discovery of potent bioactive anti-TNF α aptamers by microbead-assisted capillary electrophoresis (MACE)-SELEX. *Chembiochem* **22**: 3341–3347, 2021.
- 10) Nagano M, Toda T, Makino K, et al.: Discovery of a highly specific anti-methotrexate (MTX) DNA aptamer for antibody-independent MTX detection. *Analytical Chemistry* **94**: 17255–17262, 2022.
- 11) Troisi R, Napolitano V, Rossitto E, et al.: Steric hindrance and structural flexibility shape the functional properties of a guanine-rich oligonucleotide. *Nucleic Acids Research* **51**: 8880–8890, 2023.
- 12) Nagano M, Kubota K, Sakata A, et al.: A neutralizable dimeric anti-thrombin aptamer with potent anticoagulant activity in mice. *Mol Ther Nucleic Acids* **33**: 762–772, 2023.
- 13) Yoshitomi T, Wakui K, Miyakawa M, et al.: Design strategy of antidote sequence for bivalent aptamer: Rapid neutralization of high-anticoagulant thrombin-binding bivalent DNA aptamer-linked M08 with HD22. *Res Pract Thromb Haemost* **5**: e12503, 2021.
- 14) Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, et al.: Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *J Allergy Clin Immunol* **137**: 610–1613.e7, 2016.
- 15) Povsic TJ, Lawrence MG, Lincoff AM, et al.: Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer. *J Allergy Clin Immunol* **138**: 1712–1715, 2016.