

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 血液凝固因子を標的とする中和可能な核酸アプタマー創薬基盤技術の開発
Development of neutralizable nucleic acid aptamer-based drug discovery platform
technology targeting a blood coagulation factor

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名： 吉本 敬太郎
Keitaro Yoshimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
The University of Tokyo, Graduate School of Arts and Sciences, Associate Professor

II 研究開発の概要

核酸アプタマーの分子認識能の維持と生体適合性の向上を両立できる汎用性の高い“非共有結合型化学修飾法を確立するとともに、循環器内科等の医療現場の幅広いニーズに対応できる薬効（抗凝固）/中和制御システムを *in vivo* にて構築することを最終目標とする。

本核酸アプタマーの実態は凝固因子トロンビンに対する阻害剤である。その適応として最も相応しい病気に“ヘパリン依存性血小板減少症（HIT）”を挙げる。HITとは、世界で500万人を超える腎不全患者が透析時に用いるヘパリン投与の副作用で発症する。近年のCOVID-19に由来するパンデミック下、コロナ感染における重篤患者は血栓症を合併しやすいため、ヘパリンが予防・治療的に投与されておりことから結果的にHIT患者の数は激増している。

HITはヘパリンと血小板の複合体に対する抗体産生を介し、結果的にトロンビンの活性化シグナルが起ることで致命的な血栓症を誘発する。よって、臨床ではトロンビン阻害剤低分子薬である「アルガトロバン」やペプチド型トロンビン阻害剤である「ビバルルジン」を用いる。しかし、過剰作用に起こる出血時に対応する中和剤が存在しないため、患者のQOLを著しく損なっていた。そこで核酸アプタマーが相補鎖と結合すると薬効を消失する（中和可能）という特性を生かし、既存のHIT薬に変わる薬剤として核酸アプタマーを基盤とした薬効（抗凝固）/中和制御システムを開発することにした。

(1) 非共有結合型アプローチによるアプタマーの生体適合性の向上と *in vitro* 評価

本研究では、まず我々が過去に見出した高い抗凝固作用を有する DNA アプタマーA を *in vivo* (マウス中) でより高い薬効を発揮させるため、「二量化」戦略をとった。二量化のためのリンカーは、配座自由度の高いポリチミンリンカー、及び剛直な二重鎖を検討した。特に後者の二重鎖をリンカー部位に持つ二量化は一本鎖をアニーリングするだけで nick を 1 つ持つ擬似環状二量体とも言える核酸のアニーリング特性を生かした二量化法を用いた (計画②: 酵素反応が不要なアプタマーの擬環状二量化※)。また先の DNA アプタマーA とはトロンビンへの結合部位が異なる DNA アプタマーB をも使い、A のホモ二量体 (LinA-A, LinA-B)、A-B のヘテロ二量体 (PseA-A, PseA-B) の 4 種のダイマーを設計した。

合計 4 種の核酸アプタマーA を含む二量体は SPR の結果、単量体である A と比較してそれぞれ 100 倍以上高いトロンビン結合性を有しており、またヒトトロンビン、マウストロンビンでもその結合親和性の向上は顕著であった。

また臨床で患者血漿中に残存する抗血液凝固薬の活性試験に用いられる活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) を用いてトロンビン阻害活性試験を行った。aPTT の伸びに比例して凝固阻害活性が増大するが、各種二量体核酸アプタマーと既存薬剤アルガトロバン、ビバルリジンと比較して aPTT が顕著に伸びており、二量体核酸アプタマーは既存薬よりも抗凝固活性が強いことが示唆された。

※二量化アプタマー調製において、当初計画していた酵素を用いた nick を酵素的にライゲーションして環状化する手法 (計画①)、及びリンカー二重鎖を三重鎖形成させ酵素耐性を持たせる計画 (計画③) はそれぞれ *in vivo* での半減期延長が望めないため、検討を中止し、ダイマーの調製が最も効率的な計画②を二量化の手法を優先して *in vivo* の検討を行うことにした。

計画④環状アプタマーと合成高分子との静電的相互作用を利用する複合体形成

血液凝固阻害作用を持つ核酸アプタマーに高分子ポリマーを非共有結合的に結合させ、アプタマーの血中滞留性を向上させることを目的としたが、ポリマーと核酸アプタマーA との結合は確かに A の血清耐性を向上させたが、トロンビン阻害作用を失う結果となったことから中止し、他項目を優先した。

計画⑤核酸結合性タンパク質との複合体形成

血液凝固阻害作用を持つ核酸アプタマーに二重鎖認識性タンパク質 Transposase を特異的に、且つ非共有結合的に結合させ、アプタマーの血中滞留性を向上させることを目的としていたが、免疫原性と二重鎖に選択性が低かったことからタンパク質を変更した。現在、選択したタンパク質を血中内在性タンパク質に切り替え、アプタマーA の結合を検討している。

(2) Toehold 型配列を導入した短鎖中和相補配列の作製と *in vitro* 機能評価

核酸アプタマーA と核酸アプタマーB をポリチミンリンカー (toehold に相当) で結合させたヘテロダイマーがポリアデニンリンカーを持つ相補鎖で効率的にその薬効を中和できることを明らかにした (論文発表済、RPTH, 2020)。さらに、マウス中で高い血液凝固阻害作用を示した擬環状二量化核酸アプタマーPseA-B に対する短鎖中和相補配列を設計し、血漿中における PseA-B の抗血液凝固活性が相補鎖により中和 (キャンセル) できることを確認している。さらにヘパリンの既存の中和薬でもある硫酸プロタミン (ポリペプチド) を用いても PseA-B の活性を消失させることが判明し、中和剤に相補鎖かポリペプチドというモダリティの選択肢があることをも明らかとなった (論文投稿中)。

(3) MACE-SELEX を利用する血液凝固因子に対するアプタマーの試験管内選抜

トロンビンよりも上流の凝固因子に対する DNA アプタマーを獲得し、併用することで抗凝固能の相乗効果を狙ったものである。現在複数の血液凝固因子を標的とする核酸アプタマーを見出している。

(4) 二光子励起蛍光イメージングを利用するアプタマー/中和剤の *in vivo* 機能評価

(1) ②で設計・調製した鎖状、及び擬環状二量体アプタマーの *in vivo* での活性を試験した。まず、マウスにアルガトロバン、核酸アプタマーA 及び4種のダイマーを投与し、採血を行い、その活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) を調べたところ、擬環状二量体アプタマーPseA-B が最も高い抗血液凝固作用を示し、その効果は既存薬のアルガトロバンを圧倒した。さらに、PK を調べたところ、モノマーである核酸アプタマーA に比較しダイマーは消失時間の α 相で代謝を受けにくいことがわかり、このことから二量体形成による分子量の増加が代謝安定性に寄与し *in vivo* で薬効を高める要因になることが新たに示唆された。

さらに、二光子励起蛍光顕微鏡を用いてアプタマーの *in vivo* における機能評価を行った。顕微鏡を用いてマウス体内での血栓形成・止血能の評価システムを構築した。同システムを用いた予備実験から、単量体アプタマーA の抗血液凝固効果が *in vivo* で発現する事をリアルタイムに確認することに成功した。

総括：本研究で開発した擬環状二量体抗トロンビンアプタマーPse08-29 は従来の薬剤(アルガトロバン、ビバリルジン)より薬効が優れ、且つ中和可能なことが確認されており、中和可能な次世代型抗血液凝固薬のリード化合物として HIT に対する有望な治療薬候補と見込まれる。本結果は現在特許出願中であり、企業への導出準備を進めている段階である。

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a complication caused by administering the anticoagulant heparin. Although the number of patients with HIT has drastically increased due to the coronavirus 2019 (COVID-19), the currently used thrombin inhibitors for HIT therapy don't have antidotes to arrest severe bleeding that occurs as their side effect; therefore, the establishment of safer treatments for HIT patients is imperative. Here, we devised a potent thrombin inhibitor based on bivalent aptamers with a higher safety profile via a combination with the antidote. With a promising anti-thrombin DNA aptamer "A", its homodimer and heterodimer with DNA aptamer "B" linked by a conformationally flexible linker or a rigid duplex linker were designed. The dimerized "A"-based aptamers had about 100-fold times increasing binding affinities to both human and mouse thrombin compared to the monomer counterparts. Administrating these bivalent aptamers into mice revealed that the anticoagulant activity of the dimers significantly surpassed that of an approved drug for HIT treatment, argatroban. Moreover, adding protamine sulfate as an antidote against the most potent bivalent aptamer completely suppressed the anticoagulant activity of the dimer. Emerged potent and neutralizable anticoagulant aptamers will be a promising candidate for HIT treatment with a higher safety profile.