

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：次世代人工塩基 DNA アプタマー作成・製造技術の開発
3. 研究開発代表者：タグシクス・バイオ株式会社

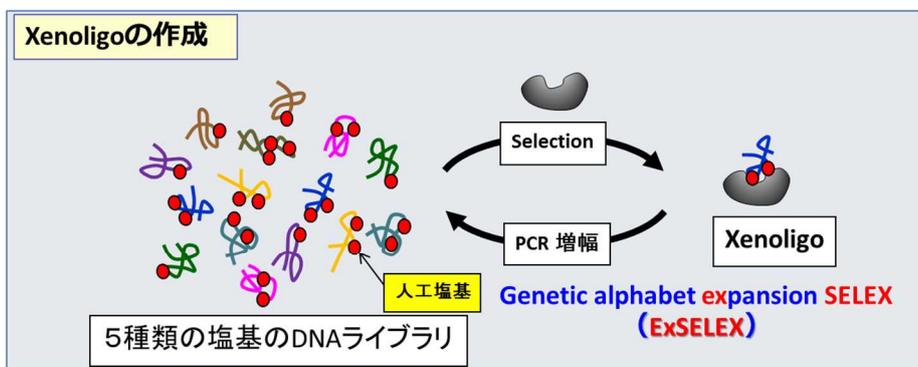
代表取締役社長 平尾一郎（平成 27 年 10 月まで）

代表取締役社長 原田洋子（平成 27 年 11 月から）

### 4. 研究開発の成果

抗体に代わる医薬品として期待されている核酸アプタマーの作製技術（SELEX 法）が生み出されて 20 年以上が経過しているにもかかわらず、これまでに認可されている核酸アプタマー医薬品は加齢黄斑変性症（AMD）の治療薬としての修飾 RNA アプタマー（マクジェン）のみに留まっている。このアプタマー創薬の現状を打破するためには、現状のアプタマーの利点（SELEX 法による短時間での作成、アプタマーの標的タンパク質に対する高選択性）を維持して、その短所である標的タンパク質に対する結合能と体内での安定性の改善が必須であった。タグシクス・バイオでは、すでに独自の人工塩基 DNA アプタマーの作成技術（ExSELEX 法：Genetic Alphabet **Expansion SELEX**）（*Nature Biotechnology*, 31, 453-457 (2013)、特許出願済）と非常に安定な特殊な DNA（ミニヘアピン DNA）によるアプタマーの安定化技術（*Nucleic Acids Res.*, 22, 576-582 (1994)、特許出願済）を開発しているため、これらを組み合わせることにより、新規 DNA アプタマーの作成技術を確立し、高機能核酸アプタマー医薬品の高品質で安価な製造・生産技術の確立をめざした。

人工塩基 DNA アプタマー（タグシクス・バイオでは、この高機能アプタマーのことを Xenoligo™ と呼んでいる）の作成には、まずは、人工塩基を含む特殊 DNA の巨大ライブラリ（ $10^{14}$ ~ $10^{15}$  分子）を準備する。そのライブラリの中から疾患の原因となる標的物質に選択的に強く結合する分子を、ExSELEX 法を用いて

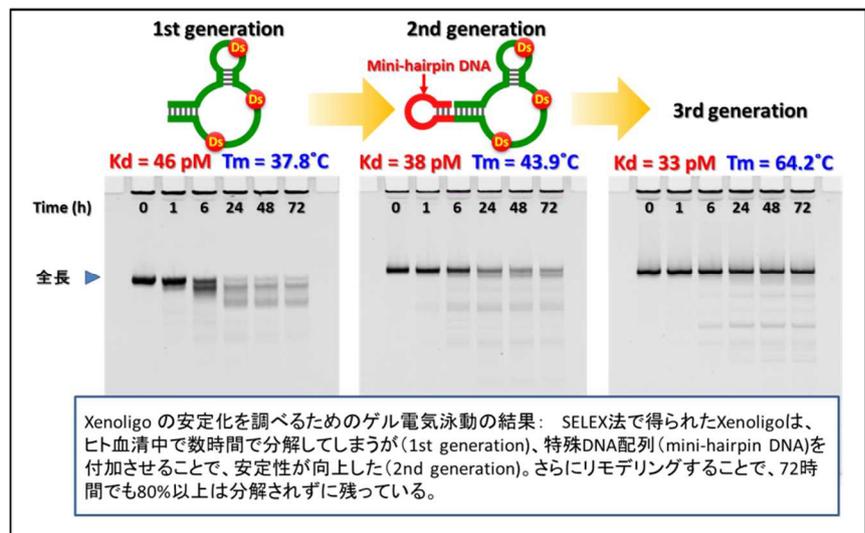


タグシクス・バイオのオリジナルの技術（特許出願済）でXenoligoを作製。Xenoligoは、標的物質にこれまでのアプタマーよりも100倍近い結合力を有し、高い選択性を示す

選択する。セレクションと PCR 増幅という操作を繰り返すことにより結合力の高い分子を選択することができる。本プロジェクトでは、まずは、ExSLEEX 手法の最適化を行った。人工塩基を含む DNA ライブラリを新たに数種類デザインし、これまで行ってきたプレデターミン法に加えて、人工塩基を含む 5 種類の塩基の完全ランダムで行う手法を確立した。これは、人工塩基を含むために、通常のクローニング、シークエンスができないため、完全ランダムライブラリーから人工塩基の位置を特定するために、特殊な手法を開発した。さらに、標的の性質などにより、ゲルシフトやセルソーターによりアプタマーと標的分子の複合体を選別する別の手法も開発して、以前使用していたビオチン化の手法と組み合わせる手法も確立して最適化を図った。

一旦アプタマーが作成できたとしても、そのままでは核酸分解酵素により容易に分解されてしまうため、

候補配列について、ドープセクションを行い、二次構造を予測後、短鎖化した。引き続き、特殊 DNA 配列(mini-hairpin DNA)を付加させ、本プロジェクトでは、さらなる配列の入れ替え(リモデリング)をして、血清中においても数日間は安定な Xenoligo が完成させることに成功した。このタグシクス独自の手法により、安価で簡便にアプタマーを安定化できるようになった。これは、どの核酸



アプタマーにも応用が可能であるため、今後の核酸医薬品開発には大きなメリットとなる(特許出願中)。

従来のアプタマーが直面してきた、安定化するために塩基の修飾をすることで結合力が低下してしまうことや、それに伴うコスト高という致命的な問題点を、当社の Xenoligo の作製技術で、克服することができた。

さらに、一旦、Xenoligo が作成できてしまえば、Xenoligo は、高次構造を取りやすく、凍結乾燥品をそのまま溶液(緩衝液)に溶かしただけで、高次構造を形成していることが確認することができた。この研究は、理化学研究所の NMR 施設を利用し、2次元の NMR の NOESY でイミノプロトン測定をすることにより、凍結乾燥後、ホールディング操作を行わずとも、高次構造をとることを確認した。今後、大量に Xenoligo を調製した際にも、凍結乾燥品で輸送ができ、使う際には、溶液に溶かすのみで煩雑な操作は一切不要であることは、品質管理・大量調製の大きなメリットである。

#### まとめ

本プロジェクトでは、アプタマーの要素技術をさらに向上させることができ、血中においても数日間は安定性を維持できる安価で簡便な方法を確認することができた。また、輸送の際は凍結乾燥品で問題がなく、ホールディングの操作や煩雑な手間もなく、溶液に溶かすだけで高次構造を取ることを確認することができた。核酸医薬品を創出する技術としての基盤技術は確立できたので、タグシクス・バイオでは、今後、核酸医薬品の実用化に向けて、協力企業と提携しながら事業を展開していく予定である。