

血液凝固因子の分子結合能を模倣するバイスペシフィック核酸アプタマーの設計と機能評価

吉本敬太郎

東京大学 大学院総合文化研究科

【研究の背景】

血液凝固は多数の血液凝固因子の連鎖的反応で完成する。第 V 因子 (FV) 欠乏症は FV の欠乏による先天性凝固障害である。100 万人に一人の希少疾患であり、皮下や筋肉内、時として脳内にも出血を起こす。治療には新鮮凍結血漿の輸血が行われるが、患者は生涯にわたり出血リスクが高く、生活の質が著しく低下する。また、輸血は感染リスクや免疫原性も大きな問題となる。例えば、活性化第 V 因子 (FVa) は血液凝固を促進する二価結合性タンパク質で、活性化第 X 因子 (FXa)、プロトロンビンと複合体を形成し、FXa によるプロトロンビンの活性化を促進させ、トロンビンを生成させることで凝固反応を進める。しかし、FVa が欠乏または機能低下している患者は一般的に血液凝固能が低下する。

本研究では、血液凝固因子欠乏症の新たな治療薬として、核酸アプタマーに注目した。分子認識型核酸である核酸アプタマーは、(1) ホモ・ヘテロ連結二量体の設計と作製が容易、さらに (2) 相補鎖を用いて薬理活性の中和が可能という、血液疾患治療の作動薬として大きな魅力・特長をもつ分子である。DNA アプタマーは化学合成で安価に作製でき、常温輸送が可能で保存性が高く、感染症リスクや免疫原性が低いという特長をもつ。

【目 的】

本研究課題では、申請者がこれまでに培った核酸アプタマー選抜法・設計法に関する技術と知見を最大限活かし、血液凝固活性化第 FVIII 因子 (FVIIIa) および FVa の分子認識能を模倣するバイスペシフィック核酸アプタマーの創製に挑戦し (図 1)、新規血友病治療薬としての潜在能力の検証を行った。

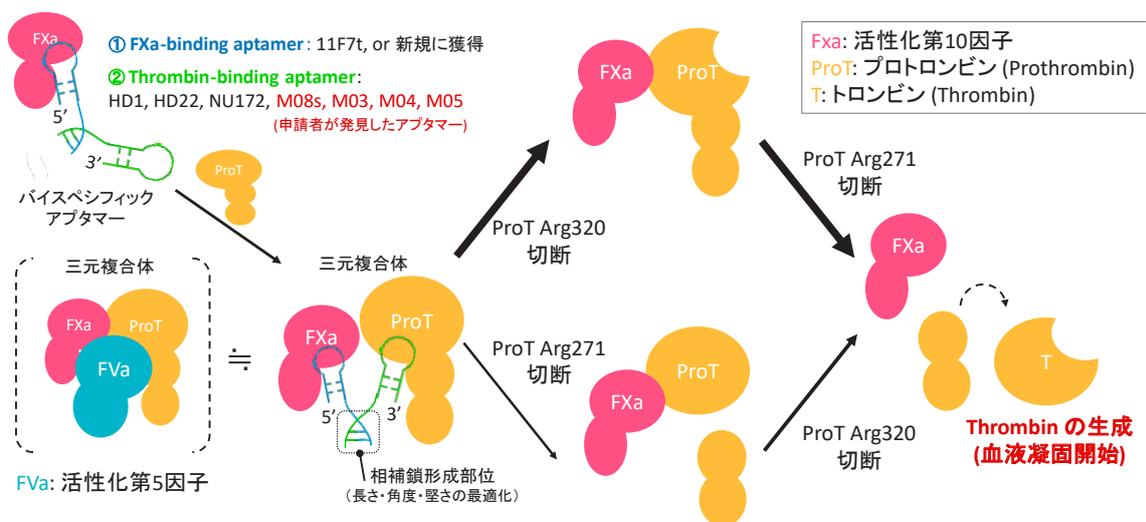


図 1 本研究で開発を試みた血液凝固第 5 因子 (FVa) の分子結合能を模倣するバイスペシフィックアプタマーの血液凝固反応における予想作用機序

【方 法】

既報の FXa 結合性アプタマーである 11F7t¹⁾ に相補鎖形成部位を導入した 11F7t-D を新規に設計した。次に、既報のトロンビン結合性アプタマー4 種²⁻⁴⁾として、11F7t-D との相補鎖形成部位を導入した hy-HD1、hy-HD22、hy-M08s-1、hy-M08s-2 を新規に設計し、プロトロンビンに対する結合親和性と、11F7t-D との相補鎖形成を Native-PAGE により確認を行った。さらに、作製したバイスペシフィックアプタマーのトロンビン生成能を、発色基質 S-2238 を用いる吸光度測定により評価した。

【結 果】

Native-PAGE におけるバンドの移動度の変化から、設計したトロンビン結合性アプタマー4 種のうち、hy-HD1、hy-M08s-1、hy-M08s-2 の3 種が、トロンビンだけでなくプロトロンビンとも結合すること、さらに、11F7t-D と相補鎖を形成することを確認した。

トロンビンと反応することで呈色する発色基質 S-2238 を用いた吸光度測定を行い、構築したバイスペシフィックアプタマーのトロンビン生成能を評価した。その結果、作製したバイスペシフィックアプタマー hy-Tn-M08s-2 がトロンビン生成を促進する FVa 様の活性をもつことを見出した(図 2)。加えて、バイスペシフィックアプタマーの結合部位間距離をチミン Spacer で変化させることで、活性が調節可能であることが明らかとなった。

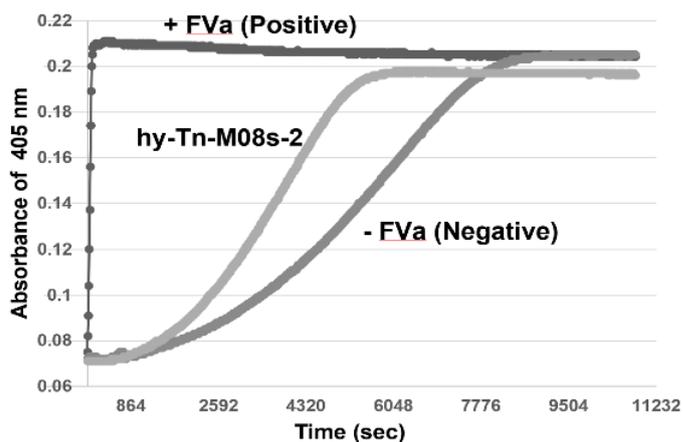


図2 バイスペシフィックアプタマーを用いたトロンビン生成試験

【考 察】

本研究では、FVa の分子認識能をバイスペシフィックアプタマーにより模倣し、トロンビン生成を促進させるという新たな二価性分子の創成に成功し、バイスペシフィックアプタマーが FVa の代替となり得る新規な分子であることを明らかとした。しかし、構築したバイスペシフィックアプタマーのトロンビン生成促進量は FVa のトロンビン生成量と比較して極めて低く、FVa に匹敵する活性を得るためにはバイスペシフィックアプタマーの構造最適化が必要であるため、継続して本研究課題を進める。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究課題をさらに進め、血友病に対して新たな治療選択肢を提供することができれば、臨床的意義・臨床への貢献度は極めて高い。分子骨格が非アミノ酸である核酸アプタマーは、既存の血友病治療薬の課題である低い保存安定性やインヒビター発生の回避が可能で、さらに、相補鎖核酸を中和剤として用いることで副作用である血栓形成を防ぐことが期待できる。例えば、現在血友病 A 治療薬として FVIII 製剤とバイスペシフィック抗体があるが、FVIII 製剤はインヒビターが 30% 程度の確率で発生し、抗体は凝固活性が低いために急性出血の際止血ができない。また、第 V 因子組換えタンパク質の安定性は著しく低いことから、治療薬として新鮮凍結血漿しか選択肢がない。上述した特長に加え、研究開発コストが著しく抑えられる核酸アプタマーは、製薬メーカーが手を出しにくい希少血液疾患領域の薬剤開発に適している。

【参考・引用文献】

- (1) Sai, K. B. et al., JBC, 285, 5212-5223 (2010). (2) Bock, L. C. et al., Nature, 355, 564-566 (1992). (3) Diane M. T., et al., J. Mol. Biol., 272, 688-698 (1997). (4) Wakui, K. et al., Mol. Ther-Nucl. Acids, 16, 348-359 (2019).