RNAアプタマーを用いた分子標的医薬の開発

特集 バイオ素材による創薬とDDS

宮川 伸・藤原将寿・西山道久*

Development of RNA aptamers for therapeutics

In recent years, RNA aptamers have been regarded as the next generation of antibody therapeutic drugs. RNA aptamers are selected by *in vitro* selection referred to as SELEX and after going through truncation and modification, they become candidates for therapeutic drugs. PEGylation is used for substantial improvement of pharmacokinetics. An aptamer itself is potentially a therapeutic drug, but it can also be used as a drug delivery agent by conjugating it with an agent such as an anti-cancer agent. In this review, developmental processes and typical properties of aptamer therapeutic drugs will be reviewed. vWF aptamer, which is now in phase II clinical studies, and MK aptamer, which is being developed by RIBOMIC Inc., will be also reviewed.

近年、RNA アプタマーが抗体医薬の次世代分子標的薬として注目されている。RNA アプタマーは SELEX 法を用いて取得され、短鎖化および安定化ののちに医薬品候補品となる。PEG を付加することで体内動態特性が顕著に改善される。アプタマーはそれ自身が医薬品となりうるが、抗がん剤などを付加することでデリバリー剤としても利用可能である。本稿では、アプタマー医薬の作製方法と特性を概説するとともに、臨床試験中の vWF アプタマーとリボミック社が開発中の MK アプタマーに関して説明する。

Shin Miyakawa · Masatoshi Fujiwara · Michihisa Nishiyama*

key words : aptamer, SELEX, vWF, midkine, aptamer-siRNA chimera

近年、RNA アプタマーが抗体医薬に代わる次世代分子標的薬として注目されている。2004 年 12 月に加齢黄斑変性症の治療薬として VEGF アプタマー (Macugen) がアメリカで承認され、その医薬品としての実用性が証明された。RNA アプタマーとは、蛋白質などの標的分子に特異的に結合する核酸のことで、その特異性や結合力は抗体を上回るものがいくつも報告されている。

核酸は二本鎖の場合、安定なヘリックス構造をとるが、一本鎖の場合は塩基配列に依存して多様な構造をとる。そのなかに標的分子にぴったりと結合できるものが存在するのである。そのアプタマーを選別する技術が SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法¹⁾で、1990 年にコロラド大学の Gold らによって開発された¹⁾。SELEX 法で得られる第一世代のアプタマーは長くて安定性が低いため、医薬品にするためには短鎖化

と安定化を行う必要がある。一般に、抗体は数アミノ酸のエピトープを認識して、いわゆる“点”で結合する。そのため、蛋白質を変性させても結合できる場合が多く、ウエスタンブロッティングなどのプローブとして使用されている。一方、アプタマーはより広い面積で標的分子に接触し、その立体構造を認識して結合する場合が多く、このことが高い特異性と結合力に関係していると考えられる。

RNA アプタマーは蛋白質を標的にすることができるので、それが細胞内因子でも細胞外因子でも標的となる。たとえば筆者らは、細胞内に存在する種々の翻訳開始因子に対するアプタマーを作製し、そのアプタマーが翻訳を抑制することを示した^{2,3)}。しかし、実際の医薬品開発を考えた場合、細胞内に核酸を導入することは容易ではない。ペプチドやコレステロールなどを付加することで細胞内への導入効率を上げることができるが、*in vivo*において特定の臓器や組織の細胞内へ核酸をデリバリーすることは難しい。また、細胞内に核酸を導入することが

* RIBOMIC Inc. 株式会社リボミック

できた場合でも、細胞内には Toll-like receptor (TLR) や RIG-I などの分子による核酸の認識機構があるため、重篤な副作用を引き起こす可能性がある。よって現時点では、細胞外に存在するサイトカインや細胞外受容体を標的にした医薬品の開発が好ましいと考えられる。他の核酸医薬品であるアンチセンスや siRNA は、メッセンジャー RNA を標的としているので、細胞内にそれらの薬物を導入しなければならず、そのことが医薬品開発において大きな障壁となっている。

細胞外因子を標的にした分子標的薬の代表は抗体医薬である。TNF- α に対するレミケードや HER2 に対するハーセプチンなど、すでに約 20 種類の抗体医薬が上市され、世界中で激しい開発競争が繰り広げられている。しかし、抗体医薬は必ずしも万能とはいえない。たとえば、抗体医薬にはキメラ抗体やヒト化抗体が使われるが、マウス抗体の一部が残っているために免疫排除を受ける場合がある。また、Fc 部分を介して抗体依存性細胞性細胞傷害や補体依存性細胞傷害に起因する副作用が問題となる場合がある。一方、素材の異なる RNA アプタマーは、細胞内に取り込まれなければ免疫系に認識されにくいと考えられている。このように、RNA アプタマーは抗体医薬とは異なる性質を持っており、新しい分子標的薬として期待されている。

アプタマーは、一剤で高い医薬品としてのポテンシャルを持っている一方で、抗がん剤や抗体医薬との併用も検討されている。VEGF を標的にした加齢黄斑変性症の治療薬として Macugen につづき抗体医薬である Lucentis が上市されたが、これらの薬物の長所を生かすために、ある期間 Lucentis を使用し、その後 Macugen を使用することが検討されている。また、同じ標的分子に対する siRNA とアプタマーを併用するとその阻害効果が高まるとの報告もある。

アプタマーをデリバリー剤として利用することも考えられている。たとえば、ある膜蛋白質に対して高い特異性を有するアプタマーに抗がん剤を結合した薬剤などである。アプタマーは化学合成できるので、このようなタイプの薬剤は抗体医薬よりも容易に作製できるはずである。筆者らは、IgG の Fc 部

分に強く結合するアプタマーを抗体医薬の分離精製剤として開発中であるが⁴⁾、この IgG アプタマーも抗体を簡便に標識するツールとして使用できる可能性がある。本稿では、アプタマーをデリバリー剤として利用した siRNA を紹介する。

世界でアプタマー医薬を作製できる技術を有している企業は数少ない。SELEX 法の基本特許を有している Archemix 社(アメリカ)、REG1 を開発中の Regado Biosciences 社(アメリカ)、第二世代のトロンビンアプタマーを開発中の Nuvelo 社(アメリカ)、鏡像異性体を利用した Spiegelmer を開発中の NOXXON 社(ドイツ)、そしてリボミック社(日本)である。リボミック社(ホームページ: <http://www.ribomic.com>)は、東京大学医科学研究所の中村義一教授が発見した分子擬態、すなわち RNA は蛋白質の構造および機能を擬態することができるという概念に基づいた、アプタマー創業に特化した大学発ベンチャーである。

本稿では、アプタマー医薬の作製方法、体内動態、デリバリー剤としての利用法、臨床試験中の vWF(von Willebrand 因子)アプタマー、そしてリボミック社が開発中の MK(ミッドカイン)アプタマーに関して説明する。

アプタマー医薬の作製方法

アプタマーは、SELEX 法¹⁾とよばれるスクリーニング法を用いて取得される。SELEX 法とは、 10^{14} 程度の巨大核酸ライブラリーから、ある任意の標的分子に特異的に結合する核酸を選別する方法である(図 1)。一本鎖の核酸はその塩基配列に依存して、ステム・ループ構造や G-カルテット構造など多様な構造をとることができる。そこで、40 ヌクレオチド程度の長さのランダム配列の両端に PCR 用のプライマー配列を付加した核酸を用意し、多様な三次元構造の核酸ライブラリーを準備する。この核酸ライブラリーに標的分子を加え、ニトロセルロース膜などを用いて標的分子に結合する核酸のみを回収する。ここで回収された核酸は極微量であり、通常分析法では解析不可能であるが、核酸の場合は PCR 法を用いて増幅することができる。増

図1 SELEX 法のご概図

幅した核酸は標的分子と混ぜ、再度セレクションを行う。この作業を10回程度行うことで、結合力および特異性の高いアプタマーを取得することができる。

このようにして得られた第一世代のアプタマーは80ヌクレオチド程度の長さであるが、医薬品にするためには、これを30ヌクレオチド程度まで短くする必要がある。長鎖の核酸は医薬品グレードの合成が困難であるとともに、非特異結合による毒性の懸念があるからである。そこで、結合活性や生理活性を指標に第一世代アプタマーの短鎖化の作業を行う。ちなみに、Macugenは27ヌクレオチド、RB006は30ヌクレオチドのアプタマーである。

天然のRNAはヌクレアーゼにより容易に分解され、血清中での安定性は数十秒程度ときわめて短い。したがって、RNAアプタマーを医薬品にするためには高度に修飾を加える必要がある。エキソヌクレアーゼ耐性を付与するためにinverted dT(idT)などの末端修飾を、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するためにリボースの2'位にO-メチル基(OMe)やフルオロ基(F)の修飾を加える。アンチセンスやsiRNAではホスホロチオエートやLNA(locked nucleic acid)が使われる場合があるが、アプタマーではあまり一般的ではない。

SELEX後にアプタマーに修飾を加えると活性が低下する場合がある。そのため、できるだけ修飾を加えた状態でSELEXを行うことが望ましい。

SELEXでは転写、逆転写、PCRなどの酵素を必要とする作業が含まれる。したがって、これらの酵素が認識できる修飾NTP(三リン酸リボヌクレオチド)を用いる必要がある。RNAアプタマーの場合、ピリミジンヌクレオチドのリボースの2'位にF基やNH₂基の修飾を加えたNTPを使用することができる。転写効率を上げるためにT7ポリメラーゼにY639Fの変異を導入したものが用いられる。また、4種類のヌクレオチドすべてにOMe修飾を加えたSELEXも行われている⁵⁾。この場合、Y639FとH789Aの二つの変異が入ったT7ポリメラーゼが使われる⁶⁾。

ドイツのNOXXON社は、鏡像異性体の技術を用いてSpiegelmerとよばれるアプタマーの開発を行っている。自然界に存在するヌクレオチドはD体で、アミノ酸はL体である。非天然のD体アミノ酸でできた標的蛋白質を化学合成し、それに対して天然のD体RNAアプタマーを作製する。その後、化学合成でこのD体をL体につくり変え、天然のL体蛋白質に結合できるようにする。L体アプタマーは非天然なのでヌクレアーゼ耐性である。この技術の一つの弱点は活性のある標的蛋白質の合成にある。このため、ペプチドをターゲットにしたSELEXが主に行われている。NOXXON社の代表的な開発品の一つは、日本で発見された成長ホルモン分泌促進ペプチドであるグレリンに対するSpiegelmer(NOX-B11)で、摂食抑制作用を促す肥満防止剤として開発されている。

アプタマーの体内動態

アプタマーの血中半減期は、ポリエチレングリコール(PEG)を末端に付加することで調節可能である。すでに上市されているMacugenには40kDaの枝分かれしたPEGが、phase II臨床試験中のvWFアプタマーには20kDaの直鎖状のPEGが5'末端に付加されている。アプタマーの分子量は10kDa程度なので、アプタマーよりも大きなPEGが付いていることになる。こうすることで腎排泄や肝代謝を顕著に抑制できる。

Healyらは、種々の末端修飾を加えたアプタマー

表1 体内動態パラメーター(ラット 1mg/kg iv)類

No.	末端修飾	分子量 (kDa)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	t _{1/2} (hr)
1	なし	11	3.6	5	4.9
2	20kDa PEG	31	150	31	7.2
3	40kDa PEG	51	110	14	12
4	コレステロール	11	0.78	1.7	1.8
5	Tat ペプチド	13	4.2	13	4.9
6	Ant ペプチド	14	6.2	16	6.9
7	Arg ₇ ペプチド	12	4	5.6	16
8	2'-OMe	12	2	3.6	-
9	NX213	11	2.5	-	0.8
10	DAG-NX213	12	3.4	-	1.1
11	DAG-NX213-L	-	8.9	-	1.9

TGF- β アプタマー (1~7): 5'-mGrGmGmGfUfUmAfUfUrAfCrAmGmAmGfUfCfUmGfUmAfUmAmGfCfUmGfUrAfCfCfC-idT-3' (mN: 2'-OMe スクレオチド, fN: 2'-F スクレオチド, rN: 天然リボスクレオチド, idT: inverted dT)

Tat: HIV Tat ペプチド (RKKRRQRRPPQC)

Ant: antennapedia 由来ペプチド (RQIKIWFQNRRMKWKKGCC)

Arg₇: RRRRRRRRC

8: すべて 2'-OMe 化されている TGF- β アプタマー

NX213 アプタマー (9~11): 5'-dT^sdT^sdT^smAaCaCaCaU rGrAaUmGrGaUmAmGrAaCmGaCaCmGmGmGmGaUmGdT^sdT^sdT^sdT^s-3' (s: ホスホロチオエート結合, aN: 2'-NH₂ スクレオチド, dN: 天然デオキシリボスクレオチド), dT はエキソスクレアーゼ耐性のために付加された。

DAG: ジアルキルグリセロール, L: リボソーム

をラットに静脈内投与 (1 mg/kg) し, その体内動態への影響を詳しく調べた⁷⁾。その結果, コレステロール付加体やペプチド付加体に比較して, PEG 付加体の体内滞留時間が著しく長いことが明らかとなった (表 1)。アプタマーの血中濃度は後述するハイブリダイゼーション法により求められた。

Healy らは, さらにトリチウムにより放射性ラベルされたアプタマーを用いて臓器分布を調べている。その結果, アプタマーのほとんどが腎臓と肝臓に蓄積されること, PEG 化することで腎臓への蓄積が軽減されることが明らかとなった。また, トリチウムラベルされたアプタマーを投与したマウスのオートラジオグラムも報告されており, PEG 化されたアプタマーが体内に蓄積される様子が示された⁸⁾。さらに, 陽電子放射断層撮影 (PET) を用いたリアルタイムな測定も試みられている。フランスと

ドイツのグループは, Spiegelmer をヒヒに投与した場合の PET の結果を報告している⁹⁾。これらの結果では, 脳からわずかな放射線が検出されているが, 一般的にはアプタマーは血液脳関門を通過できないと考えられている。

血中半減期を向上させる他の方法として, リボソームの利用や poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) などの徐放剤を用いた方法が検討されている。Willis らは, VEGF アプタマーの末端にジアルキルグリセロールを付加してリボソームを作製した¹⁰⁾。リボソームの直径は 50~65 nm で, 一つのリボソームに 34~60 個のアプタマーが含まれると見積もられた。アプタマーは, リボソームの外側に出ているものと内側に出ているものが混在していることを示す結果を得ている。このアプタマーリボソームは VEGF に結合して血管新生を阻害した。ハイブリダイゼーション法により測定された薬物動態パラメーターを表 1 に示した。これらの結果から, アプタマーリボソームより PEG アプタマーのほうが薬物体内動態がすぐれているようにみえるが, はっきりと結論づけるには, さらなる詳細な検討が必要と考える。

Carrasquillo らは, PLGA を用いた徐放剤について報告している¹¹⁾。VEGF アプタマー (EYE001) を包含した PLGA 粒子 (ϕ 10~20 μm) を PBS 中で保持したところ, 20 日間くらいかけてアプタマーが徐々に放出された。放出されたアプタマーは VEGF に依存する HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の細胞増殖を抑制した。徐放剤としてはこのほか, 高研社のアテロコラーゲン, メドジェル社のゼラチン, ガレニサーチ社のヒドロキシアパタイト, Napa Jenomics 社の多糖シゾフィランなどいろいろなものが考えられる。一方で, アプタマーは三次元構造が重要であるので, 放出されたアプタマーから完全にマトリクスが取り除かれ活性型になる必要がある。アプタマーの一部にマトリクスが付着した状態 (不活性型) で長時間血中に存在すると, 活性型になる前にスクレアーゼにより分解される可能性がある。また, マトリクスを使用することで非特異的な細胞内への取り込みが多くなる可能性があり, 副作用の危険性が高まる。

図2 ハイブリダイゼーション法の概念図

アプタマーは水溶性が高く、修飾方法により異なるが数10～数100 g/L 水に溶ける。リン酸ジエステル結合を含むため、その精製方法に依存して H^+ 型や Na^+ 型となりpHが異なる。注射剤としての製剤化は比較的容易であるが、経口剤は難しいとされている。Macugenの溶解度は40 g/Lで、PBSに溶解して眼球に直接注入する。上述のような徐放製剤にして皮下に埋め込むことも考えられるが、そのようなコンセプトのアプタマー医薬はいまのところ開発されていない。

最近、ISIS Pharmaceuticalsのグループが、アンチセンス薬の経口剤のヒトでの臨床試験の結果を公表した¹²⁾。TNF- α に対するアンチセンス薬(ISIS104838, 100 mg/錠)をsodium caprate (C10, 660 mg/錠)を用いて錠剤化し、健常ボランティアに500～700 mg投与した。その結果、約1時間後に血中にアンチセンスが検出され、約3時間後に最高濃度数 $\mu\text{g/mL}$ が検出された。AUCは約 $3 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ で、oral bioavailabilityは約10%であった。

アプタマーの体内動態を考える場合、代謝や排泄のほかにヌクレアーゼによる分解も考慮に入れる必要がある。アプタマーのヌクレアーゼ耐性はその修飾法によって大きく異なる。一本鎖の場合、安定性は $\text{RNA} \ll 2'-F \approx \text{DNA} \ll 2'-\text{OMe}$ の順に安定であり、天然のRNA(リボヌクレオチド)が残っているアプタマーはヌクレアーゼ耐性が低くなる。逆に、

意図的に天然のRNAを含めることで血中半減期を短くすることができる。

アプタマーの血中濃度は、ハイブリダイゼーション法により測定することができる。ハイブリダイゼーション法とは、核酸が相補鎖と二本鎖を形成する特性を利用するもので、その原理を図2に示す。アプタマーの半分の配列と相補的な配列を固定用プローブ、残りの半分の配列を検出用プローブとして用いる。測定には特別な前処理は必要なく、血漿サンプルを適度に希釈するだけで測定することができる。検出限界は 0.3 ng/mL 程度で、HPLC(高速液体クロマトグラフィ)による260 nmのUV吸収を利用した測定よりも高感度である。ただし、数ヌクレオチド短い配列でもプローブが結合できるので、分解物も検出される可能性がある。

デリバリー剤としてのアプタマー

アプタマーはそれ自身が治療薬としてのポテンシャルを有しているが、一方で、その特異性の高さから、臓器特異的デリバリー剤としての利用が考えられている。デューク大学のグループは、*PLK1*または*BCL2*遺伝子に対するsiRNAにprostate-specific membrane antigen(PSMA)に対するアプタマーを結合し、前立腺がん特異的なsiRNAの新規デリバリー法を提案した¹³⁾。*PLK1*と*BCL2*は、がん細胞で発現が向上している細胞死の負の制御因子であり、これらの遺伝子をノックダウンすることでアポトーシスを誘導することができる。PSMAは、前立腺がんにおいて発現が高い膜蛋白質である。PSMAアプタマーは、LNCaP細胞(ヒト前立腺がん細胞)に発現しているPSMAに結合することで細胞内に取り込まれることが知られている^{14,15)}。デューク大学のグループは、ヌードマウスの皮下にLNCaP細胞を移植する実験で、aptamer-siRNAキメラ体を投与することで腫瘍の増大が顕著に抑制されることを示した。一方、PSMAを発現していないPC3細胞(ヒト前立腺がん細胞)に対しては効果を示さなかった。また、*in vitro*でIFN- β の誘導確認実験を行ったが、aptamer-siRNAキメラ体はLNCaP細胞に導入しても炎症反応を引き起こさな

図3 アプタマーを siRNA のデリバリー剤として用いた場合の概念図

いことが確認された。Aptamer-siRNA キメラ体は細胞内に取り込まれると、dicer により siRNA の部分が切り出され、RNAi が誘導されることが示唆された。アプタマーをデリバリー剤に用いたときの概念図を図3に示す。

同様の実験がテキサス大学のグループによって行われた¹⁶⁾。PSMA アプタマーに lamin A/C または GAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素) に対する siRNA が結合した aptamer-siRNA キメラ体を用いられ、有効性が確認された。

Zhou らは、HIV-1 のエンベロープ蛋白質である gp120 に対するアプタマーに、tat または rev に対する siRNA を結合した aptamer-siRNA キメラ体を作製し、HIV-1 の複製阻害活性の有無を検討した¹⁷⁾。Tat 蛋白質は転写活性因子で、TAR 配列に結合してウイルス遺伝子の転写を促進する。Rev 蛋白質は転写された RNA を核から細胞質へ輸送するときに作用する。gp120 に結合した aptamer-siRNA キメラ体は、HIV-1 が細胞に感染するときに細胞内に取り込まれ、siRNA の部分が感染細胞の dicer によって切り出され、RNAi を誘導すると考えられた。この aptamer-siRNA キメラ体を用いることで HIV-1 の複製が抑制されることが示され

た。

同様のことが低分子化合物に対しても適応できる。アプタマーは化学合成できるので、比較的容易に低分子化合物との複合体を合成することができる。イギリスの Antisoma 社は、がん細胞で発現が高いスクレオリンという蛋白質に対する DNA アプタマーの phase II 臨床試験を行っている。スクレオリンに結合した DNA アプタマーは細胞内に取り込まれ、DNA の複製を阻害することでがん細胞を細胞死に導くと考えられている。がん患者に対する phase I 臨床試験では良好な結果を得ているが、投与量は 22 mg/kg にまで及んだ。筆者らは、スクレオリンのアプタマーに抗がん剤を結合すれば投与量をかなり下げることができると予想する。

低分子化合物のデリバリー法としてリポソームやナノ粒子が活発に研究されている。リポソームやナノ粒子にアプタマーを結合することで、臓器特異的なデリバリー法が実現できるであろう。実際、Farokhzad らは、PEG 化した PLA ナノ粒子に PSMA アプタマーを結合し、そのデリバリー剤としての有効性を報告している¹⁵⁾。

以上の説明と同様のことが抗体でも考えられている。抗体に対するアプタマーの優位性は、上述したとおりであるが、特に、化学合成できる点と分子量が 1/10 程度であることはデリバリー剤として魅力的である。今後、医薬品同様、デリバリー剤としても激しい開発競争が行われることと思われる。

世界のアプタマー医薬開発状況

アプタマー医薬には、すでに日米欧で承認された加齢黄斑変性症の治療薬である Macugen のほか、臨床試験中のものはいくつか存在する。

イギリスの Antisoma 社は、抗がん剤として AS1411 とよばれるアプタマーを開発中で、現在 phase II 臨床試験が行われている。AS1411 は、がん細胞表面に発現するスクレオリンを標的とした DNA アプタマーである¹⁸⁾。また、Regado Biosciences 社は、抗血液凝固剤として REG1 を開発しており、phase I 臨床試験を終了した。REG1 は、RB006 と RB007 という 2 種類の核酸のセットである。RB006

表2 ARC1779の薬物動態パラメーター. Phase I 臨床試験データより (Gilbert JC et al., 2007)²¹⁾

Parameter	0.1 mg/kg	1 mg/kg
$t_{1/2\beta}$ (hr)	1.6	1.8
T_{max} (hr)	0.6	0.5
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	2.3	21.2
AUC (hr $\cdot$ $\mu\text{g/mL}$)	4.1	79.4
CL (mL/hr $\cdot$ kg)	22.6	12.9
V_{ss} (mL/kg)	47.3	39.5

の結果, 重篤な副作用は認められなかった. ELISA 法で活性型 vWF を測定したところ, アプタマー投与後数時間の間 vWF の活性は抑制され, その後, 数時間かけて活性が回復することが明らかとなった. また, 血小板機能分析器 (PFA-100) を用いて血小板凝集を測定したところ, アプタマー投与後数時間の間血小板の凝集はみられず, その後8時間程度で正常な状態に回復することが示された. このように, PEG の大きさを適当なものにすることでアプタマーの血中半減期を適当な長さに調節し, 出血リスクの低い治療薬をつくることができる.

抗血液凝固剤の分野におけるアプタマー医薬の開発は精力的に行われている. 最初に phase I 臨床試験を行ったのは Archemix 社が開発したトロンビンに対するアプタマー (ARC183) である. 冠動脈バイパス手術 (CABG) 時の抗血液凝固剤として開発された. 15 ヌクレオチドの DNA アプタマーで, 血液凝固抑制効果のオン・オフが早いことが特徴であったが, 投与量が非常に多くなってしまい開発が断念された. その後, Nuvelo 社が第二世代のトロンビンアプタマー (NU172) を開発し, phase I 臨床試験を開始したようである.

このほか, 上述した factor IXa に対するアプタマーや factor VIIa²²⁾, P-セレクトイン²³⁾ に対するアプタマーも取得されている. Factor VIIa と組織因子 (TF) の複合体形成は, 血栓形成の最初のステップであると考えられている (図5). Factor VIIa に結合するアプタマーは, factor VIIa と TF の結合を阻害することで, factor X の活性化を阻害する. P-セレクトインは, 血小板の α 顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade body の顆粒膜に存在する. 血小

図5 抗血液凝固剤としてのアプタマー医薬の開発状況

板や血管内皮細胞が活性化された際に膜表面に発現し, 白血球との接着に参与する. 白血球からは血小板活性化因子 (PAF) が放出され, 血小板凝集が促進される. Parma ら²³⁾ は, P-セレクトインに結合するアプタマー ($K_d=16\sim710$ pM) を作製し, このアプタマーが活性化血小板と白血球の接着を阻害することを示した. また, このアプタマーは P-セレクトインに特異的で, E-セレクトインや L-セレクトインに対する結合力は弱いことを示した.

2. ミッドカインに対するアプタマー

筆者らは, 創薬標的分子として, 成長因子 (サイトカイン) の一種であるミッドカインに着目した. ミッドカインは, 細胞の生存や遊走を促進することで, がんの進行, 炎症性疾患の発症, さらに傷害を受けた組織の保存・修復など, さまざまな生命現象に深く関与していると考えられている.

名古屋大学の錫村らは, ミッドカイン欠損マウスで多発性硬化症の病態モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態が改善すること示した²⁴⁾. また, 同マウスの二次リンパ器官で調節性 T 細胞 (Treg) の $CD4^+$ T 細胞に占める割合が増加することを発見し, ミッドカインが Treg に抑制的に作用することで EAE の病態を悪化させるとする作用機序を提案した. これはミッドカイン阻害剤が多発性硬化症の新しい治療薬となりうることを示唆している. 多発性硬化症は, 脳, 脊髄, 視神経のミエリ

図6 RBM-MK001-5を投与したEAEモデルマウスの臨床スコア

野生型EAEモデルマウス(C57BL, ♀, 8週齢)に対して1 mg/kg(黒三角)および0 mg/kg(黒丸)のRBM-MK001-5を腹腔内投与した。投与はMOG₃₅₋₅₅投与後14日まで2日に1回の間隔で計8回, その後1日に1回の間隔で計13回行った。Y軸は臨床スコア(0:症状なし, 1:尾が垂れる, 2:仰向けにして起き上がれない, 3:不安定歩行, 4:軽度の後肢麻痺, 5:重度の後肢麻痺, 6:死亡)の平均値をあらわす。*: p<0.01 Dunnett test

ン鞘に対する自己免疫反応によってミエリン鞘の脱髄が起こり, 視力障害, 四肢の麻痺, 感覚および運動障害といった神経症状があらわれる疾患であり, 再発と寛解を繰り返すことが特徴である。

筆者らは多発性硬化症を対象疾患とした, ミッドカインアプタマーの作出を試みた。ミッドカインを標的にSELEXを実施した結果, リード化合物として約20種の配列の違うアプタマーを取得した。*In vitro*でミッドカインの生理活性阻害を指標に短鎖化と安定化を行い, 最終的にRBM-MK-001-5を創製した。つぎに, RBM-MK-001-5が, EAEマウスにおいて薬効を示すか否かの検討を行った。RBM-MK-001-5をEAEマウスに投与した結果, 1 mg/kgの用量においてコントロール群に比較し, 有意に病態抑制効果を認めた(図6)。また, *in vitro*でTregをRBM-MK-001-5と共培養すると, CD4⁺T細胞中のTregの割合が増加することが示された。

このように, RBM-MK-001-5はミッドカインの生理活性を阻害し, その結果, Tregの割合を増加させる作用を示すことから, 新規な作用機序を持つ多発性硬化症治療薬になりうると考えられる。RBM-MK-001-5は, 近い将来, GLP安全性・毒性

試験へ進む予定である。

最後に

以上述べたように, アプタマーの創薬マテリアルとしての可能性は計り知れないものがある。2004年12月にMacugenがFDAの承認を受け, アプタマー医薬の現実性が証明された。欧米ではすでに大手製薬企業がアプタマー開発に多額の資金を投入しはじめている。日本では2007年, 武田薬品がArchemix社とアプタマー開発の共同研究を開始した。

日本は抗体医薬の分野でアメリカに大きく出遅れた。その反省に立ち返りアプタマー医薬の分野では欧米に先んじられないように研究開発を進めるべきである。筆者らは, 東京大学医科学研究所で培われた技術を基盤に, 日本発のアプタマー医薬を現実のものとし, 医薬品の分野で人類の健康に貢献したいと考えている。

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) Oguro A, Ohtsu T, Svitkin YV, Sonenberg N, Nakamura Y : RNA aptamers to initiation factor 4A helicase hinder cap-dependent translation by blocking ATP hydrolysis. *RNA* 9 : 394-407, 2003.
 - 3) Miyakawa S et al. : RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA* 12 : 1825-1834, 2006.
 - 4) Miyakawa S et al. : Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA* 14 : 1154-1163, 2008.
 - 5) Burmeister PE et al. : Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem Biol* 12 : 25-33, 2005.
 - 6) Padilla R, Sousa R : A Y639F/H784A T7 RNA polymerase double mutant displays superior properties for synthesizing RNAs with non-canonical NTPs. *Nucleic Acids Res* 30 : e138, 2002.
 - 7) Healy JM et al. : Pharmacokinetics and biodistribution on novel aptamer compositions. *Pharm Res* 21 : 2234-2246, 2004.
 - 8) Boomer RM et al. : Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides* 15 : 183-195, 2005.
 - 9) Boisgard R et al. : In vivo biodistribution and pharmacokinetics of 18F-labelled Spiegelmers : a new class of oligonucleotidic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 : 470-477, 2005.
 - 10) Willis MC et al. : Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjugate Chem* 9 : 573-582, 1998.
 - 11) Carrasquillo KG et al. : Controlled delivery of the anti-VEGF aptamer EYE001 with poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 290-299, 2003.
 - 12) Tillman LG, Geary RS, Hardee GE : Oral delivery of antisense oligonucleotides in man. *J Pharmaceutical Sci* 97 : 225-236, 2008.
 - 13) McNamara II JO et al. : Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotech* 24 : 1005-1015, 2006.
 - 14) Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS : Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 62 : 4029-4033, 2002.
 - 15) Farokhzad OC et al. : Nanoparticle-aptamer bioconjugates : a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 64 : 7668-7672, 2004.
 - 16) Chu TC, Twu KY, Ellington, AD, Levy M : Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34 : e73, 2006.
 - 17) Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, Rossi JJ : Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther* 16 : 1481-1489, 2008.
 - 18) Ireson CR, Kelland LR : Discovery and development of anticancer aptamer. *Mol Cancer Ther* 5 : 2957-2962, 2006.
 - 19) Dyke CK et al. : First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology. *Circulation* 114 : 2490-2497, 2006.
 - 20) 宮川 伸, 藤原将寿, 中村義一 : アプタマー創薬. *放射線生物研究* 42(3) : 312-326, 2007.
 - 21) Gilbert JC et al. : First-in-human evaluation of anti-von Willebrand Factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* 116 : 2678-2686, 2007.
 - 22) Rusconi CP, Yeh A, Lysterly HK, Lawson JH, Sullenger BA : Blocking the initiation of coagulation by RNA aptamers to Factor VIIa. *Thromb Haemost* 84 : 841-848, 2000.
 - 23) Jenison RD, Jennings SD, Walker DW, Bargatze RF, Parma D : Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8 : 265-279, 1998.
 - 24) Wang J et al. : Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 3915-3920, 2008.