

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17838

研究課題名（和文）新規von Willebrand因子阻害アプタマーの血栓形成阻害効果の多面的検討

研究課題名（英文）Inhibitory effect on platelet thrombosis formation of a novel DNA aptamer with artificial nucleic acid bases that binds to the von Willebrand factor A1 domain

研究代表者

酒井 和哉（Sakai, Kazuya）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：60790384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：VWF A1ドメインを標的とするDNAアプタマー製剤（TAGX-0004）について、静止条件および流体条件における血栓形成阻害効果を既存の抗体薬（カブラシズマブ）・アプタマー製剤（ARC1779）と比較した。TAGX-0004はいずれの条件下においてもARC1779よりも高く、カブラシズマブと同等の抗血栓形成作用を発揮した。また、それぞれのVWF A1ドメインへの結合部位を検討したところ、共通の結合部位としてR1395およびR1399が推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致命的な動脈血栓を引き起こす血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）において、最近抗体薬であるカブラシズマブが新規治療薬剤として米国・EUで承認された。この新薬はTTPにおける急性期の血栓死亡率を大幅に改善させることができる反面、抗体薬であることから非常に効果であり、ロット間の有効性のバラツキなどの欠点が存在する。今回検討した新規VWF A1ドメインアプタマーはカブラシズマブと同等の抗血栓効果を発揮するとともに、化学合成が容易であり、品質の均一性が担保できる、アレルギーなどの免疫学的反応を回避できるなどのメリットを有している。臨床応用されれば、TTP患者の治療が低コストで安全になりうる。

研究成果の概要（英文）：The antithrombotic effect of TAGX-0004, a DNA aptamer targeting the VWF A1 domain, was compared with that of an existing antibody (caplacizumab) and aptamer (ARC1779) under both static and flow conditions. TAGX-0004 indicated stronger antithrombotic effect in both condition compared to ARC1779. TAGX-0004 and caplacizumab had similar pharmacological effect in both condition. The VWF A1 binding sites of these agents were examined, and R1395 and R1399 were presumed to be the common binding sites.

研究分野：血液学・血栓止血領域

キーワード：アプタマー創薬 von Willebrand factor 血小板凝集阻害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

von Willebrand 因子 (以下: VWF) は外傷などによって生じた血管損傷部位に血小板の凝集反応を起こして止血反応の初期相に関与する多量体タンパクである。先天的な VWF の量的・質的異常である von Willebrand disease では出血症状が問題となる。一方で、本邦の死因上位を占める心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症では、VWF-血小板からなる血小板血栓の過剰な形成が病因と考えられている。そして、VWF A1 阻害薬は VWF の A1 と血小板の GP1b との結合を直接阻害することで、従来の抗血小板薬とは作用機序が異なる新規治療薬として期待されている。(図1)実際に致死的な血栓症である血栓性血小板減少性紫斑病では、VWF A1 ドメインに対する新規抗体薬である Caplacizumab が米国・EU で承認され、急性期の血栓症を予防する効果が高く評価されている。核酸アプタマーは分子内で塩基対を形成することで三次元構造をとるユニークな一本鎖核酸であり、標的分子の立体構造を認識・結合することにより、その生理活性を制御する。核酸アプタマー ARC1779 は VWF A1 阻害薬として第二相臨床試験まで開発が進められた有効性および安全性が報告された薬剤である。Caplacizumab は有効性が高いものの、培養系に依存した製品であり、ロット間の薬効のばらつき、薬剤費用が非常に高いなどの課題を有している。

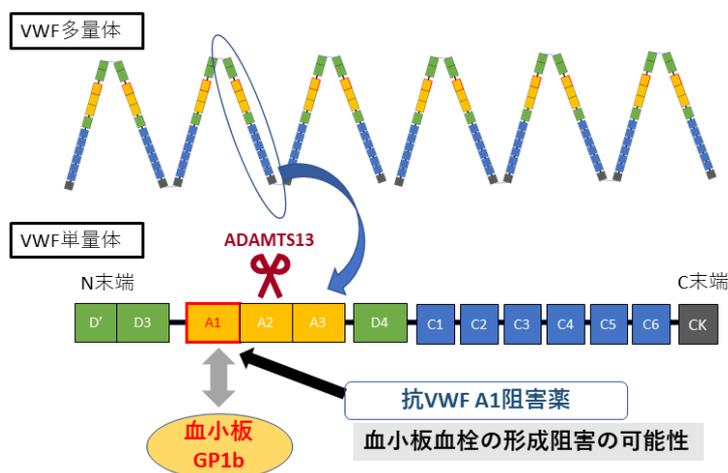


図1. VWF A1 と血小板 GP1b の関係

2. 研究の目的

本研究の目的は国内ベンチャー企業であるタグシクス・バイオ社が開発を進める、新規抗 VWF A1 アプタマー (開発コード; TAGX-0004) の VWF A1 ドメイン結合部位の同定並びに血小板血栓形成に対する抑制効果の確認である。既存の VWF A1 阻害薬である ARC1779 や Caplacizumab と比較することにより、その結合阻害様式・作用機序の詳細を明らかにし、薬理学的効果との関連性を解明する。さらには新規治療薬としての TAGX-0004 の有効性・安全性を検証する (表1)

表1 表1 抗 VWF A1 阻害薬の比較

	Caplacizumab	ARC1779	TAGX-0004
製剤種	抗体 (ナノボディ)	修飾RNAを含む DNA アプタマー	DNA アプタマー
分子量	28kDa	13kDa + PEG 20kDa	16kDa + PEG 40kDa
精製方法	大腸菌発現	化学合成	化学合成
臨床試験	Phase 3	Phase 2 保留	非臨床試験
結合親和性	Kd報告なし	Kd: 2nM (RI dot-blot)	Kd: 61.3pM (SPR)
投与経路	静脈内投与 皮下投与	静脈内投与	未確定
副作用	重篤な出血なし	重篤な出血なし	
免疫原性	一般的な抗体薬よりは低い	なし	なし
血中半減期	22-27時間 (ヒト)	2時間 (ヒト)	

3. 研究の方法

1) TAGX-0004 の血小板凝集抑制効果の評価

血小板凝集能の抑制効果は、静的条件である血小板凝集惹起物質を用いた血小板凝集試験および、動的条件である血栓形成能解析システム T-TAS の 2 種類の血小板血栓形成の評価方法を採用する。いずれの検査も健常人の血液を使用する測定系である。血小板凝集試験では緩い遠心条件で作製したヒト多血小板血漿 (PRP) に VWF 依存的な凝集惹起物質である Ristocetin および Botrocetin を投与し透過性の変化を凝集率として換算する。血栓形成能解析システム T-TAS では微小血管を模してヒトコラーゲンで覆われた毛細管チップを駆出用ポンプに連結し、ヒト全血サンプルを強制的に駆出することで毛細管チップ内の血小板血栓の形成過程をビデオモニターおよび内圧波形から観察できる。ヒト全血サンプルに有効濃度の VWF A1 阻害薬を添加し、血栓形成が完全に阻害されれば、圧波形は変動しない。上記 2 種類の測定系を用いて、TAGX-

0004/ARC1779/Caplacizumab の 50%および 90%阻害濃度を検討する。これらの結果より、静的および動的条件下における各種 VWF A1 阻害薬の濃度依存的な効果を評価・比較した。

## 2)各 VWF A1 阻害薬の VWF A1 結合部位の同定

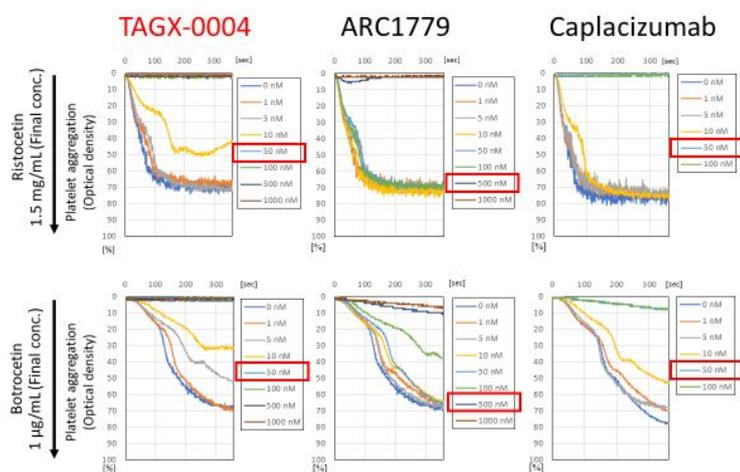
既知の VWF A1 ドメインの立体構造より、結合に重要と考えられる 16 のアミノ酸残基についてアラニン 1 アミノ酸残基置換法による変異体 VWF A1 ドメインを発現精製した。野生型 VWF A1 と変異体 VWF A1 について各 VWF A1 阻害剤との Binding Assay を行った。結合性が著しく低下した変異体 VWF A1 について置換したアミノ酸が結合に関与すると推定した。

## 4 . 研究成果

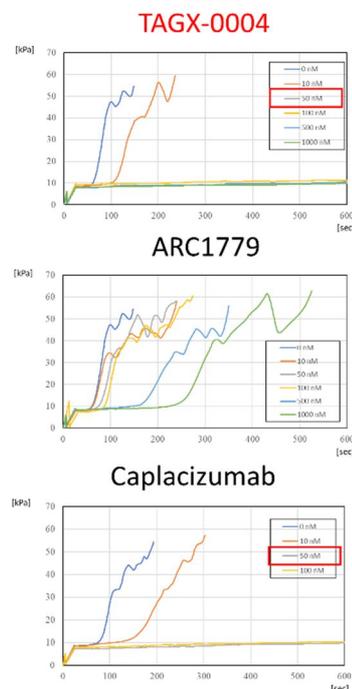
### 1) TAGX-0004 の血小板凝集抑制効果の評価

静止系の Ristocetin および Botrocetin 血小板凝集試験では、TAGX-0004 は ARC1779 よりも強く、Caplacizumab と同等の血栓形成阻害能を示した。同様に、流体系の T-TAS でも TAGX-0004 は Caplacizumab と同等の優れた血栓性型阻害能を有することを証明した。

### 1. 血小板凝集阻害能の評価



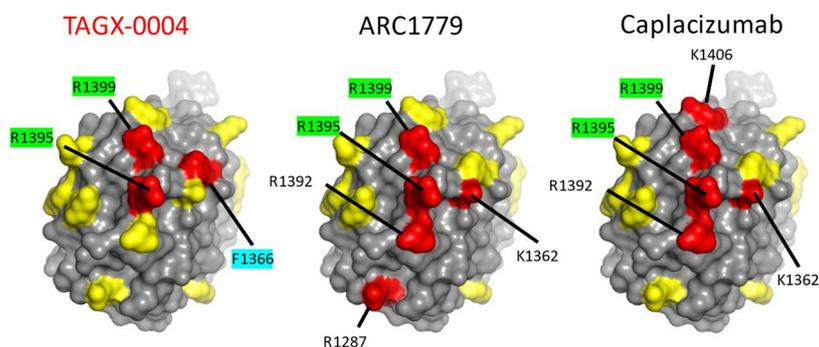
### 2. 血栓形成阻害能の評価



## 2)各 VWF A1 阻害薬の VWF A1 結合部位の同定

下図のように、各 VWF A1 阻害薬の VWF A1 結合アミノ酸残基を同定した。共通する結合部位として R1395 および R1399 が同定された。TAGX-0004 については疎水アミノ酸残基である F1366 が特有の結合部位として推測され、自身が有する疎水塩基である Ds 基とスタッキング効果による結合増強が得られている可能性が示唆された。

### VWF A1阻害薬の結合部位まとめ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai Kazuya, Someya Tatsuhiko, Harada Kaori, Yagi Hideo, Matsui Taei, Matsumoto Masanori	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel aptamer to von Willebrand factor A1 domain (TAGX-0004) shows total inhibition of thrombus formation superior to ARC1779 and comparable to caplacizumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2019.235549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The 61th American Society of Hematology (ASH) Annual Meetings and Exposition, Orland, USA.	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------