

研究課題別評価

1 研究課題名:新規な腸管出血性大腸菌感染症治療薬の創製

2 研究者氏名:西川 喜代孝

技術員:猪飼 桂 (研究期間 H.15.1.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

O157:H7 などの腸管出血性大腸菌の感染は出血性大腸炎をひき起こすばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS)や脳症を併発させ、むしろこれらの合併症が患者を死にいたらしめる大きな原因となっている。Shiga toxin (Stx; ベロ毒素)は腸管出血性大腸菌の産生する主要な病原因子であり、血中に侵入した Stx による腎や脳の微小血管内皮の障害が上記合併症の原因と考えられている。従って、腸管内で産生された Stx を強力に吸着して Stx の血中への侵入を阻害する Stx 吸着剤や、すでに血中に侵入したごく微量の Stx に結合してその作用を阻害する Stx 中和剤は、本感染症の有効な治療薬になると期待される。本研究では、Stx に対する結合ユニット、およびそれを集積させる核構造を独自に開発し、新規な Stx 吸着剤および Stx 中和剤を開発することを目的とする。

4 研究成果:

背景

Stx は Stx1, 2 の 2 つのファミリーに分類されるが、重篤な合併症を引き起こすのは Stx2 産生菌による場合がほとんどであり、臨床的には Stx2 のほうがより重要である。本研究では Stx2 に対する阻害活性を指標に開発を行った。Stx の B サブユニットペンタマーは、標的細胞上の受容体である糖脂質 Gb3 の糖鎖部(グロボ 3 糖)を特異的に認識する。B サブユニットモノマー上にはサイト 1-3 の 3 種のグロボ 3 糖結合サイトが存在しており、B サブユニットペンタマーはこれらのサイトを介して Gb3 とマルチバレントな結合を形成し、著しく結合親和性を高めている。従って、ある核構造にグロボ 3 糖を集積させた化合物は高親和性で Stx B-サブユニットに結合しその毒性を阻害する、Stx 阻害剤になると期待される。我々はこれまでに、カルボシランデンドリマーを核構造としてグロボ 3 糖部を集積させた一連の化合物、SUPER TWIG を用い、グロボ 3 糖を 6 個もつ SUPER TWIG が血中で Stx2 の毒性を強力に阻害することを見出し、SUPER TWIG(1)6 と名付けた。SUPER TWIG(1)6 は、マウスを用いた O157:H7 感染実験において有効性が証明された初めての Stx 中和剤である(K.Nishikawa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 7669-7674, 国際出願 RTC/JP01/05717)。

結果と考察

1) SUPER TWIG の最適構造の決定

これまでにグロボ 3 糖を 12 個有する SUPER TWIG(1)12 を合成しているが、SUPER TWIG(1)12 は *in vitro* では SUPER TWIG(1)6 よりも強い Stx2 阻害活性を示すにもかかわらず、血中での Stx 中和剤としての作用は非常に弱い。このことは、血中で有効に働くためには何らかの最適構造が存在することを意味する。本研究では、末端のグロボ 3 糖数や核構造が異なる一連の SUPER TWIG を合成し、*in vitro* および *in vivo* での阻害作用を比較し、血中で有効に作用するため最適構造条件を決定した。この知見に基づき、SUPER TWIG(1)6 よりも優れた化合物、SUPER TWIG(2)18 を同定することができた(文献 2)。また、一連の Stx2 B-サブユニット mutant を用いて、これら SUPER TWIG は 3 種類あるグロボ 3 糖結合サイトのうち、サイト 3 にのみ特異的に結合していることを見出した。これまで Stx の標的細胞への結合にはサイト 1 あるいは 2 が重要な役割を果たしていると考えられていたが、この結果はサイト 3 が創薬の優れた標的になりうることを初めて示すものである。

2) Stx 吸着剤、Gb3 ポリマーの開発

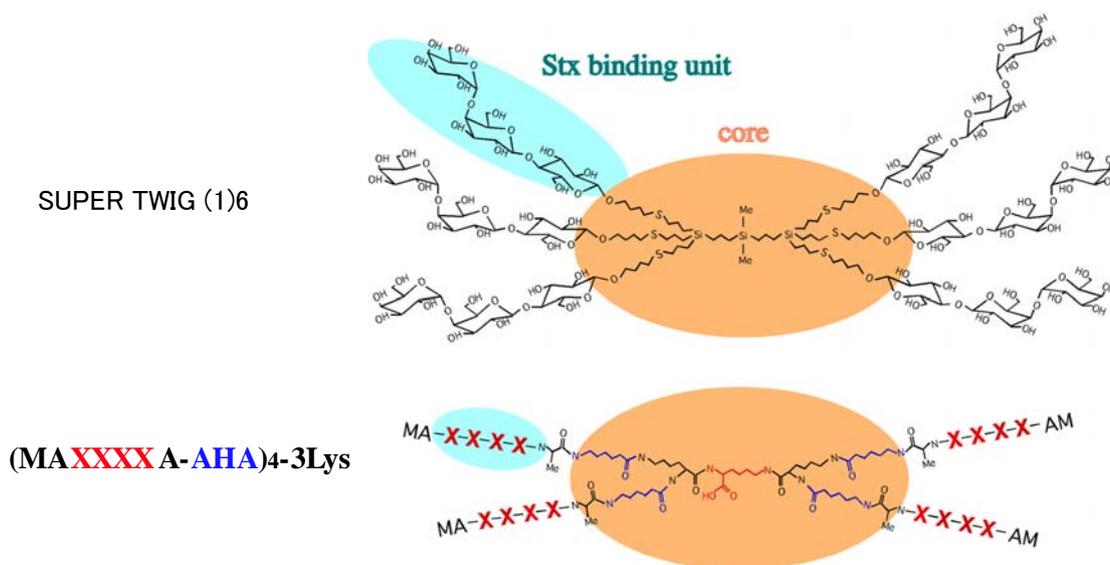
腸管内で作用することを目指した Stx 吸着剤は、経口投与が可能であることから治療的にはもちろん、予防的にも非常に重要な位置をしめており、その開発が待たれていた。しかしながら、これまで感染実験において有効性が確認された合成 Stx 吸着剤は開発されていなかった。我々は本研究において、ポリアクリルアミドポリマーを核構造としスパーサーを介してグロボ 3 糖を高密度に集積させた化合物、Gb3 ポリマーを開発した。Gb3 ポリマーは Stx に高親和性に結合し、Stx の細胞毒性を顕著に抑制した。また、Gb3 ポリマーはマウスを用いた O157:H7 感染実験において、経口投与で非常に高い治癒率を示した。Gb3 ポリマーは感染実験での有効性が確認された初めての合成 Stx 吸着剤である(文献 4; 特願 2004-108483)。また、Stx2 B-サブユニットは、Gb3 ポリマーの末端グロボ 3 糖と核構造をつないでいるスパーサー長を厳密に認識しており、スパーサー長が短くなると結合親和性が著しく低下すること、一方このような要求性は Stx1 では全く観察されないことが示された(文献 1)。本知見は、臨床的により重要な Stx2 を阻害するためには、特異的な構造が必要であることを明確に示している。

3) 新規ペプチド性 Stx 阻害剤の開発

上記 SUPER TWIG および Gb3 ポリマーの開発により、グロボ 3 糖集積型の合成化合物が本感染症の静脈投与型ならびに経口投与型治療薬となり得ることを初めて証明することができた。一方で、Stx 結合ユニットとしてグロボ 3 糖を用いることに関してはいくつかの問題点がある。すなわち、生理的リガンドとはいえグロボ 3 糖単独での Stx との親和性(Kd)は 10^{-3} M と必ずしも高くはないこと、またグロボ 3 糖ならびにグロボ 3 糖含有化合物の化学合成は非常に困難であること、の 2 点である。これらの問題がこれら化合物の臨床応用の大きな障害となっている。本研究では、臨床応用可能な Stx 阻害剤を開発するため、グロボ 3 糖よりも合成が容易で、かつ結合親和性に優れた新規 Stx 結合ユニットの同定を試みた。

3-1) マルチバレントペプチドライブラリー法

我々はこれまでに、protein kinase の触媒部位などの機能ドメインに対して直接基質モチーフあるいは結合モチーフを決定する方法、ペプチドライブラリー法を開発してきた(K.Nishikawa, et al., *J. Biol. Chem.* 272, 952-960, 1997; K.Nishikawa, et al., *J. Biol. Chem.* 273, 23126-23133, 1998; K. Nishikawa et al., *Mol. Cell*, 6, 969-, 2000; U.S. Patent Publication No. US-2003-0148377-A1)。本研究では、B サブユニットペンタマーと Gb3 との高親和性結合には糖鎖クラスター効果が存在することに着目し、ペプチドライブラリー自体を多価にするという全く新たな概念に基づいたマルチバレントペプチドライブラリーを開発した(特願 2004-295405、国際出願 PCT/JP2005/012286)。マルチバレントペプチドライブラリーの核構造は1)で決定した、Stx2 との高親和性結合に要求される SUPER TWIG の最適核構造条件を全て満たすようにデザインした(下図)。Stx2 B サブユニットペンタマーに対する高親和性結合を指標に本ライブラリーのスクリーニングを行い、4 種類の新規 Stx 結合モチーフを同定した(特願 2004-189801、国際出願 PCT/JP2005/012286)。得られたモチーフはすべて、Stx 結合ユニットとしてグロボ 3 糖よりも優れていることが Biacore を用いた結合実験から明らかとなった。



3-2) 多価型ペプチド性 Stx 阻害剤

得られたモチーフを、上記マルチバレントペプチドライブラリーの核構造に結合させて、以下の多価型ペプチド性 Stx 阻害剤を作製した(特願 2004-189801)。

PPR-tet; (MA-PPRRNRR-AU)₄-3Lys
 PPP-tet; (MA-PPRRRRR-AU)₄-3Lys
 KRR-tet; (MA-KRRNPRR-AU)₄-3Lys
 FRR-tet; (MA-FRRNRRN-AU)₄-3Lys

本 Stx 阻害剤は、いずれも Stx2 B-サブユニットおよび holo Stx2 に高親和性に結合すること、かつ Vero 細胞に対する Stx2 の細胞毒性を効率良く阻害することが示された。さらに、4 種のうち細胞毒性阻害活性が最も高かった PPP-tet, PPR-tet について、マウスを用いた O157 感染実験における効果を検討したところ、治療的に経口投与した場合にも非常に高い治癒効率を示すことが明らかとなった。これら多価型ペプチド性 Stx 阻害剤は、グロボ 3 糖集積型阻害剤の問題点をすべてクリアすることから、臨床応用への可能性が極めて高いと期待される。

5 自己評価:

本研究の目標は以下の2点である。

- 1) 糖鎖含有型 Stx 阻害剤の開発。
- 2) 糖鎖に代わる全く新しいタイプの Stx 阻害剤の開発。

1)については、我々がすでに世界にさきがけて開発した SUPER TWIG について、その最適構造を同定し、さらにその Stx 阻害メカニズムを分子論的に明らかにすることができた。また、経口投与可能な糖鎖含有型 Stx 吸着剤については、合成化合物としては世界で初めて感染実験において有効性が確認された、Gb3-ポリマーを開発することができた。Gb3-ポリマーについては *J. Infect. Dis.* 誌に掲載され、掲載号にトピックスとして紹介された。また Gb3-ポリマーの合成法、ならびにその作用に関し国内特許を申請した。以上から本項目の目的は十分に達成されたと考えられる。

2)については、1)で得られた成果を十分に活用し、糖鎖に代わる新しいペプチド性 Stx 結合ユニットを世界にさきがけて開発した。本ペプチド性 Stx 結合ユニットは糖鎖ユニットで大きな問題となっていた、結合親和性の低さ、高い合成コスト、の2つの問題点を解決する画期的なユニットである。また、この際開発した新しい技術、マルチバレントペプチドライブラリー法を、国内特許2件、国際特許1件として申請することができた。さらにこのユニットを用いた全く新しいタイプの Stx 阻害剤、多価型ペプチド性 Stx 阻害剤を開発し、本化合物が感染実験において極めて優れた作用を示すことを証明した。本阻害剤は現在もっとも臨床応用に近い化合物と考えられることから、本項目についても極めて高いレベルでその目標が達成できたと考えられる。

6 研究総括の見解:

本研究は、腸管出血性大腸菌(病原性大腸菌 O157)が産生する志賀毒素(Stx)に対する結合ユニットおよびそれを集積させる核構造を開発し、新しい Stx 吸着剤および中和剤を開発することを目的として行った。その結果、まず糖鎖含有型 Stx 阻害剤を開発しその最適構造を同定するとともに阻害メカニズムを分子論的に明らかにした。また、経口投与可能な糖鎖含有型 Stx 吸着剤を合成し感染実験においてその有効性を確認した。更に、糖鎖に代わる新しいペプチド性 Stx 結合ユニットの合成に成功し、このユニットを用いて多価型ペプチド性阻害剤を開発した。本化合物は感染実験において極めて優れた Stx 阻害作用を示すことを証明した。これらの成果は、当初の研究目標をはるかに超えるものであり、特に多価型ペプチド性 Stx 阻害剤は、臨床応用に大きな期待が持たれている。

7 主な論文等:

論文5件

1. Watanabe M., Igai K., Matsuoka K., Miyagawa A., Watanabe T., Yanoshita R., Samejima Y., Terunuma D., Natori Y., and Nishikawa K., Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues., *Infect. Immun.*, in press.
2. Nishikawa K., Matsuoka K., Watanabe M., Igai K., Hino K., Hatano K., Yamada A., Abe N., Terunuma D., Kuzuhara H., and Natori Y., Identification of the optimal structure for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation., *J. Infect. Dis.*, 2005, 191, 2097-2105.
3. Yamamoto E. T., Mizuno M., Nishikawa K., Miyazawa S., Zhang L., Matsuo S., and Natori Y., Shiga Toxin-1 causes direct renal injury in rats., *Infect. Immun.*, 2005, 73, 7099-7106.
4. Watanabe, M., Matsuoka, K., Kita, E., Igai, K., Higashi, N., Miyagawa, A., Watanabe, T., Yanoshita, R., Samejima, Y., Terunuma, D., Natori, Y., and Nishikawa, K., Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections., *J. Infect. Dis.*, 2004, 189, 360-368.
5. Yamasaki, C., Nishikawa K., Zeng, X., Komatsu N, Oda T., and Natori Y., Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin., *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1671, 44-50.

特許等4件

1. 国際出願番号;PCT/JP2005/012286, 発明人;西川喜代孝,名称;STX 阻害剤ペプチドとペロ毒素中和剤並びに毒素中和性ペプチドのスクリーニング方法, 出願日;2005年6月28日
2. 出願番号;特願 2004-295405, 発明者;西川喜代孝, 名称;毒素中和性ペプチドのスクリーニング方法, 出願日;2004年10月7日
3. 出願番号;特願 2004-189801, 発明者;西川喜代孝, 名称;STX2 阻害性ペプチドとペロ毒素中和剤, 出願日;2004年6月28日
4. 出願番号;特願 2004-108483, 発明者;西川喜代孝, 松岡 浩司、照沼 大陽、喜多英二、幡野 健、名取泰博、渡邊美帆, 名称;ペロ毒素中和剤, 出願日;2004年3月31日

招待講演等；海外1、国内3

- 1) Nishikawa, K., THERAPEUTIC AGENTS WITH CLUSTERED CARBOHYDRATES FOR TREATMENT OF STEC INFECTIONS., 5th International Symposium on 'Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections', 2003, Symposium.
- 2) テーマ「細菌感染症と病原性」
演題名－新規 O157 感染症治療薬
西川喜代孝、特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」細菌領域若手部会、東京大学医科学研究所、2005/10/6-10/7
- 3) テーマ「多様化する感染症と立ち向かう基盤的研究」
演題名－抗腸管出血性大腸菌剤の創製。
西川喜代孝、第 15 回感染研シンポジウム、2005/5/23。
- 4) テーマ「病原因子の解明と医療への応用」
演題名－ベロ毒素阻害剤の開発－腸管出血性大腸菌感染症治療薬をめざして。
西川喜代孝、第 87 回日本細菌学会関東支部総会、2004/11、シンポジウム