

# 新規な腸管出血性大腸菌感染症治療薬の創製

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

西川 喜代孝

国立国際医療センター研究所 臨床薬理研究部 室長

## 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; ペロ毒素)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。

## 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。しなしながら、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ペ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

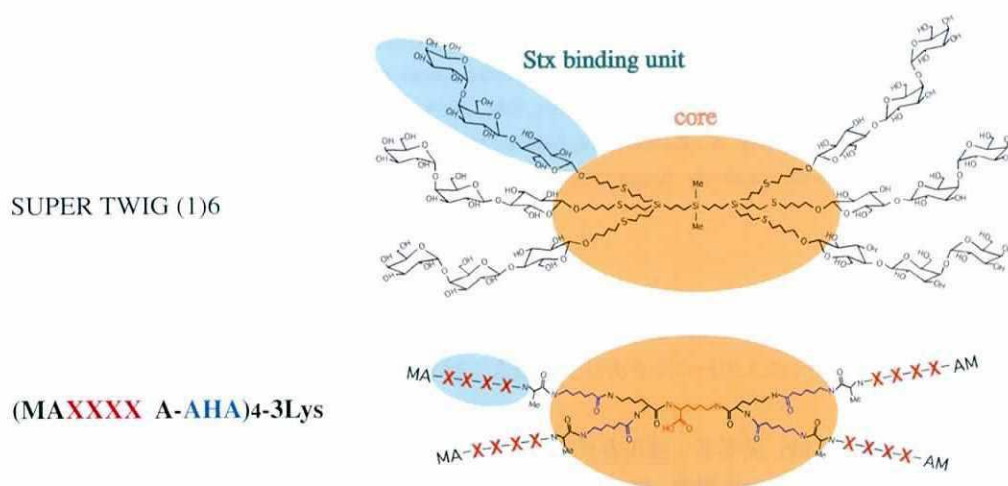
常に高い治癒率を示した。Gb3 ポリマーは感染実験での有効性が確認された初めての合成 Stx 吸着剤である（文献 4: 特願 2004-108483）。また、Stx2 B-サブユニットは、Gb3 ポリマーの末端グロボ3糖と核構造をつないでいるスパーサー長を厳密に認識しており、スパーサー長が短くなると結合親和性が著しく低下すること、一方このような要求性は Stx1 では全く観察されないことが示された（文献 1）。本知見は、臨床的に重要な Stx2 を阻害するためには、特異的な構造が必要であることを明確に示している。

### 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)<sub>4</sub>-3Lys  
PPP-tet; (MA-PPPRRRR-AU)<sub>4</sub>-3Lys  
KRR-tet; (MA-KRRNPRR-AU)<sub>4</sub>-3Lys  
FRR-tet; (MA-FRRNRRN-AU)<sub>4</sub>-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。

## 今後の展望

本研究で得られた多価型ペプチド性 Stx 阻害剤は現在最も臨床応用に近い化合物である。本化合物が非常に強く Stx に結合するのは、グロボ3糖結合部位のみでなく同時に効率よく他のエリアも占有するためであることが生化学的結果から示唆されている。今後、得られたペプチドモチーフと Stx2 との共結晶化を行うことによりその結合様式を明らかにすることができれば、より安定かつ低分子の Stx 結合ユニット開発のための重要な知見を提供するものと期待される。またマルチバレントペプチドライブラリー法は、Stx に限らずコレラ毒素やインフルエンザウイルス、あるいは炎症・癌細胞の転移に関与しているセレクチンなど、糖鎖クラスター効果に基づく高親和性結合を形成する種々の分子に対する薬剤開発にも応用可能であり、今後の発展が期待される。

## 主要論文リスト

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-I 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

1. 国際出願番号；PCT/JP2005/012286. 発明人；西川喜代孝 (100%). 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. 出願人；JST(100%). 出願日；2005/06/28. 出願対象国；米、加、英、仏、独、日
2. 出願番号；特願 2004-295405. 発明者；西川喜代孝 (100%). 名称；毒素中和性ペプチドのスクリーニング方法. 出願人；独立行政法人科学技術振興機構. 提出日；2004年10月7日. 出願日；2005/06/28
3. 出願番号；特願 2004-189801. 発明者；西川喜代孝 (100%). 名称；STX2 阻害性ペプチドとペロ毒素中和剤. 出願人；独立行政法人科学技術振興機構. 提出日；2004年6月28日
4. 出願番号；特願 2004-108483. 発明者；西川喜代孝 (30%)、松岡 浩司 (15%)、照沼 大陽 (15%)、喜多英二 (15%)、幡野 健 (10%)、名取泰博 (10%)、渡邊美帆 (5%). 名称；ペロ毒素中和剤. 出願人；独立行政法人科学技術振興機構、奈良県. 提出日；2004年3月31日