

氏名（本籍）	渡 邊 美 帆	（神奈川県）
学 位 の 種 類	博士(薬学)	
学 位 記 番 号	甲 第111号	
学位授与年月日	平成18年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	腸管出血性大腸菌感染症治療薬の開発	

論 文 審 査 委 員	主 査	教 授	高 橋 典 子
	副 査	教 授	福 井 哲 也
	副 査	教 授	辻 勉

論文内容の要旨

O157 などの腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) の感染は下痢や出血性大腸炎などの消化管障害だけでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの重篤な合併症を引き起こす。特に高齢者や幼児が重症化しやすく、重症化すると死に至ることもある。我が国では、毎年 3000～4000 人の感染者が発生している。しかしながら現在でも O157 感染に対する治療は、抗生物質の投与のみである。O157 感染に伴う種々の病態を引き起こす主要な病原因子の一つが、STEC の産生するベロ毒素 (Shiga toxin; Stx) である。重篤な合併症を引き起こす原因は、腸管から血中に侵入したごく微量の Stx が、腎臓や脳などの標的臓器の微小血管内皮細胞を障害するためと考えられている。従って、腸管内で大量に産生された Stx を吸着して、そ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微量の Stx に結合し、その毒性を阻害する Stx 中和剤は、腸管出血性大腸菌感染症の有効な治療薬になると考えられる。

Stx は Stx1 と Stx2 の二つのファミリーから構成される。疫学的には Stx2 産生菌の感染と重篤な合併症の併発に強い関連性があると言われている。Stx の構造は A-subunit 1 分子と B-subunit 5 分子からなり、A-subunit が毒素活性をもち、B-subunit 5 分子は標的細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3 (globotriaosyl ceramide: Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) との結合を担っている。また、Stx B-subunit と Gb3 のグロボ 3 糖との複合的な相互作用が Stx と Gb3 との高親和性結合を著しく亢進させている (別紙:図 A)。従って、グロボ 3 糖を高度に集積させた化合物は Stx に対し強固に結合し、その毒性を阻害する Stx 阻害剤となると考えられる。このコンセプトのもと、これまで腸管、または

血中で作用する種々の Stx 阻害剤の開発が行われている。腸管で Stx を吸着する Stx 吸着剤は、治療的ばかりでなく、予防的に投与した場合でも、感染初期において効率的に Stx の毒性を阻害できるという点で非常に有益であると考えられる。しかしその重要性に関わらず有効な経口剤は存在していない。そこで、本研究の 1 つ目のテーマとして、腸管で作用する経口投与型 Stx 阻害剤を開発することにした。

一方、血中で作用するタイプの Stx 中和剤については、我々のグループがこれまでに、ケイ素原子を分岐核とする樹枝状化合物（カルボシランデンドリマー）を骨格とし、グロブ 3 糖を集積させた化合物 SUPER TWIGs を開発している（図 B）。末端にグロブ 3 糖を 3, 6, 12 個集積させた化合物 SUPER TWIG (0)3, (1)6, (1)12（括弧内の数字は核構造の Si の世代数、括弧外の数字はグロブ 3 糖数）を合成し、それぞれの Stx1, 及び Stx2 に対する阻害効果を検討した。その結果、マウスを用いた O157 感染実験において、SUPER TWIG (1)6 を静脈投与した場合、Stx の致死性が顕著に抑制された。従って、SUPER TWIG (1)6 が静脈投与型の STEC 感染治療薬となりうることが示された。興味深いことに、SUPER TWIG (1)12 は *in vitro* において、SUPER TWIG (1)6 とほぼ同程度の Stx 阻害活性を示したが、致死量の Stx2 と SUPER TWIG(1)12 をマウスに静脈投与したところ、若干の延命効果を示すだけであった。このことから、血中で SUPER TWIGs が Stx 阻害活性を示すためには、SUPER TWIGs 中のグロブ 3 糖の数を増やし、集積させるだけでは有効性は示されず、SUPER TWIG (1)6 に見られるようなある最適な構造が要求されることが考えられた。そこで、本研究の 2 つ目のテーマとして、SUPER TWIGs の最適構造の同定を試みた。

1) 腸管で作用する経口投与型 Stx 吸着剤 Gb3-polymer の開発

本研究では、ポリアクリルアミドを基本骨格にもち、スペーサーを介してグロブ 3 糖を種々の密度で集積した一連の化合物、Gb3-polymer を合成した（図 C）。各ポリマーの Stx B-subunit に対する解離定数 (K_D 値)を BIAcore を用いて測定し、各ポリマーの Stx の標的細胞への結合阻害活性、ならびに Stx の細胞障害活性を測定した。またマウスを用いた O157 感染実験における Gb3-polymer の効果も検討した。その結果、ポリマー上に最もグロブ 3 糖を集積させた化合物 Gb3-polymer 1:0 は Stx 1B-subunit, Stx 2B-subunit 両方に対し高親和性に結合することが明らかとなった。また、Gb3-polymer 1:0 は Stx1, Stx2 の標的細胞への結合、及び細胞障害活性を低濃度で阻害した。また興味深いことに、いずれの系においても Stx1 よりも Stx2 に対して、ポリマー上のグロブ 3 糖の集積度が、その阻害活性に大きく影響していることがわかった。マ

ウスを用いた 0157 感染実験において、Gb3-polymer 投与群はいずれも顕著に 0157:H7 感染による致死性を抑制することが明らかとなった。感染後 4 日目において、糞便中および血清中の Stx 濃度を測定したところ、Gb3-polymer 投与群では糞便中では約半分、血清中では検出限界以下に減少していた。以上のことから、Gb3-polymer は腸管内において、Stx1 だけでなく Stx2 にも強力に吸着し、血中への侵入を阻害することで、感染に伴う致死的な障害を抑制していることが考えられた。従って、Gb3-polymer は経口投与可能な治療薬として STEC 感染の予防および治療のための臨床応用が十分期待できることが示唆された。

2) カルボシランデンドリマーを核構造とした Stx 中和剤 SUPER TWIGs の最適構造の決定

本研究では、新たに数種類の SUPER TWIGs を合成し、各 SUPER TWIG について、Stx B-subunit に対する解離定数 (K_D 値) を BIAcore を用いて測定し、各 SUPER TWIG の Stx 結合阻害活性、Stx 細胞障害活性阻害効果をそれぞれ検討した。さらに臨床上、重篤化と関連の深い Stx2 について、マウスに致死量 Stx2 と各 SUPER TWIG を静脈投与し、SUPER TWIGs の血中における Stx2 阻害効果を検討した。その結果、以下に示す厳密な構造要求性が存在することが明らかとなった。1) 疎水的な核構造の両側に対照的にグロボ 3 糖数が集積した構造 (ダンベル型) をもち、核構造の間の距離は少なくとも 11 Å 必要であること、2) グロボ 3 糖は片側 3 個以上、全体で 6 個以上必要であること、3) 分岐点となる Si 原子とグロボ 3 糖の間の距離は、末端の糖鎖密度を保つために 10 Å 以内であること、が示された (図 D-1)。そして、これら全ての条件を満たす SUPER TWIG (2)18 を同定した (図 D-2)。

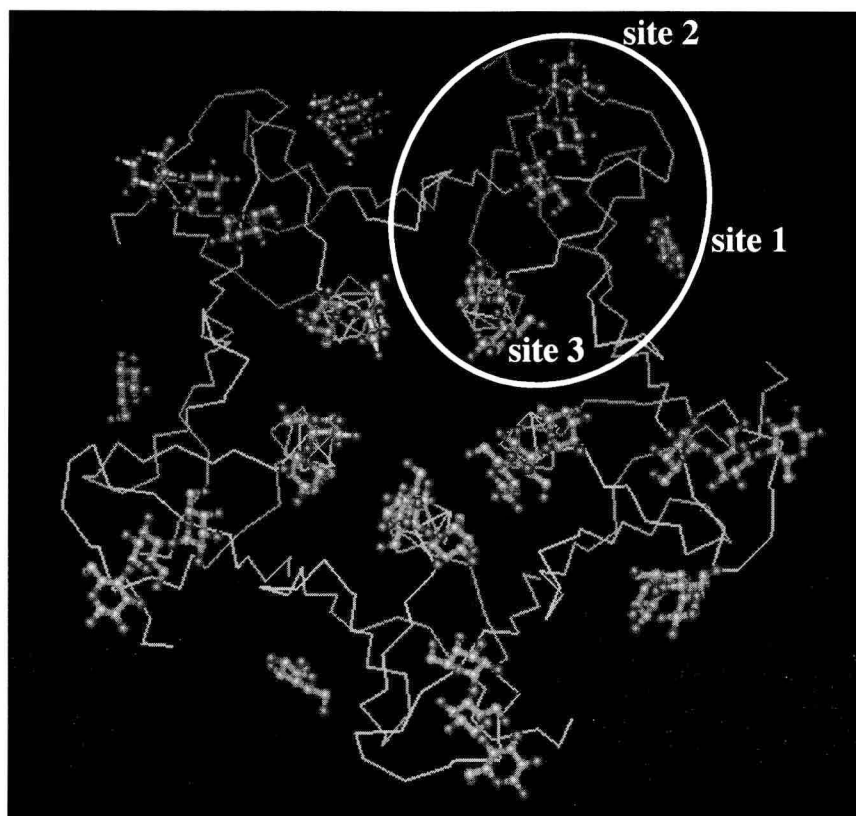
これまでの研究より、SUPER TWIG (1)6 と Stx2 が複合体を形成すると、肝臓や脾臓などの網内系組織に存在するマクロファージへの取り込みが亢進することがわかっている。そこで、ヒト単球系細胞 U937 細胞を用いて、各 SUPER TWIG 存在下、 ^{125}I -Stx2 の細胞内取り込みを検討したところ、SUPER TWIG (1)6、及び(2)18 において、 ^{125}I -Stx2 の取り込みが亢進していることがわかった。また U937 細胞での Alexa 488-Stx2 と SUPER TWIG (2)18 の細胞内局在を確認したところ、SUPER TWIG (2)18 を共存させた細胞では、あきらかに Alexa-Stx2 の細胞内への取り込みが亢進していた。また Alexa-Stx2 と lysosome マーカーである lysotracker がマージしていたことから、Alexa-Stx2 は lysosome に運ばれ、分解される可能性が考えられた。以上のことから、SUPER TWIGs の構造に要求される上記の条件は、マクロファージの取り込み、分解に

必要な構造であることが考えられた。また、血中の Stx2 阻害活性を示すのは SUPER TWIG (1)6 と(2)18 のみであることから、マクロファージが関与する分解機構は、強い Stx 阻害能力を発揮するために必須の機構であると考えられた。

次に、最適構造を有する SUPER TWIG (2)18 と Stx B-subunit との結合様式について検討を行った。Stx B-subunit には、1 分子あたりサイト 1-3 の 3 カ所、5 量体で計 15 カ所のグロボ 3 糖結合サイトが存在している (図 A 丸印)。そこで、各サイトに変異を有する一連の変異体を用いた検討を行った。その結果、SUPER TWIG(2)18 は、Stx 1B-subunit との結合にはサイト 3 またはサイト 1+2、Stx 2B-subunit との結合にはサイト 3 を必須とすることが明らかとなった。このことから、SUPER TWIGs が Stx2 の毒性を抑制するためには、ダンベル型で両端にグロボ 3 糖を集積した構造の SUPER TWIGs が Stx 2 B-subunit に対しサイト 3 を介して結合することが必須であり、このとき形成される特徴的な構造がマクロファージによる Stx2-SUPER TWIG 複合体の認識に関与している可能性が考えられた。

以上より、SUPER TWIG の最適構造を同定したことで、今後、従来よりもはるかに低いコストで、より強力な阻害剤を開発することができると考えられる。

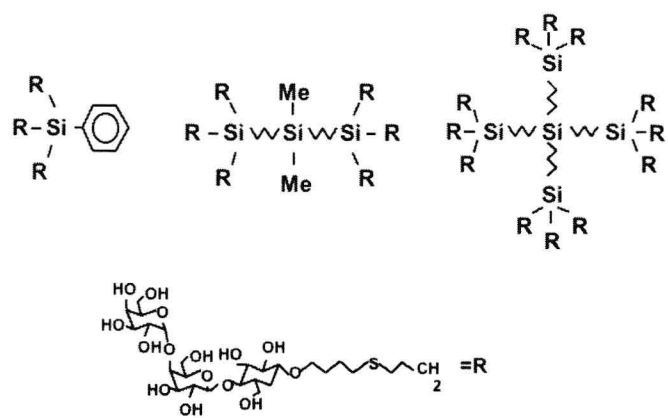
(図 A) Stx 1B-subunit 5 量体。緑がグロボ 3 糖



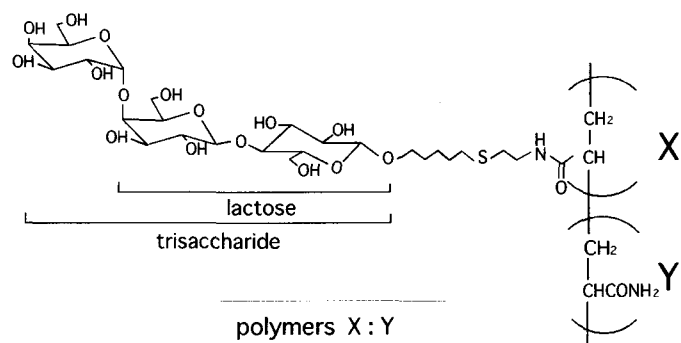
(0)3

(1)6

(1)12



(図 C) Gb3-polymer



Gb3-polymer 1:0

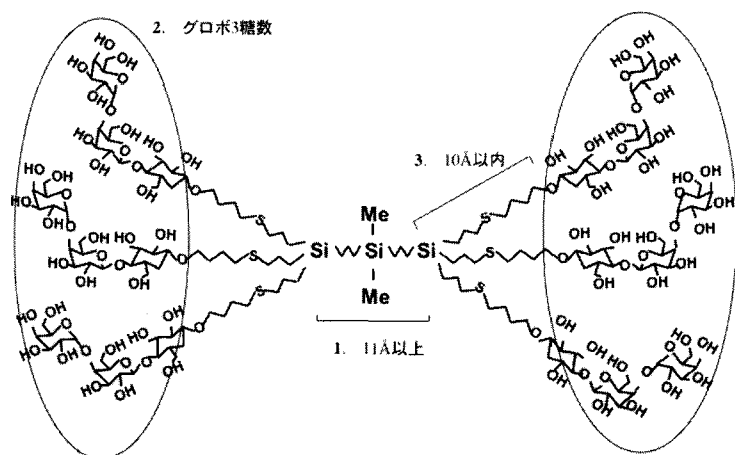
2:17

1:11

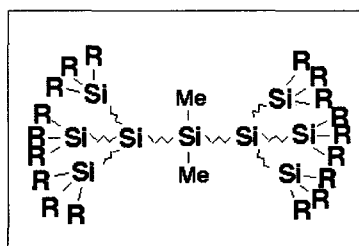
1:12

Lac-polymer 1:0

(図 D) 1)



2)



(2)18

論文審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は O157 として社会的によく知られ、10 年前に大規模な集団感染が起こり死亡者も多数出た。それ以降、わが国では毎年約 4000 人以上の患者が発生し続けている。O157 感染の脅威は、消化管障害のみならず、溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症を引き起こし、致死性のある点である。ホスホマイシンなどの抗生物質が治療に使用されているが、有効な治療薬は存在していないのが現状であり、新しい治療薬の開発が社会的に切望されている。そこで、学位申請者は、主要な病原因子である EHEC の産生するベロ毒素 (Shiga toxin: Stx) が腸管から血中に侵入するのを阻止する、即ち Stx に強力に結合する薬物 (Stx 吸着剤)、および、すでに血中に侵入してしまった微量の Stx に結合し、標的細胞に侵入するのを阻害する薬物 (Stx 中和剤) を検討し、EHEC 感染症の有効な治療薬の開発を試みた。

本研究では、Stx1 と Stx2 の二つのファミリーから成る Stx の内、疾患との関連がより深い Stx2 について特に詳細な検討を行った。Stx は毒素活性を担う A-subunit 1 分子と、標的細胞上の受容体との結合に関与する B-subunit 5 分子から構成されている。B-subunit の 5 量体が標的細胞膜上に存在する受容体の糖脂質 Gb3 (globotriaosyl ceramide: Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) を認識して結合し、Stx は細胞内に取り込まれる。その際、Gb3 のグロボ 3 糖と Stx の複合的な相互作用により、高親和性結合を形成すると考えられている。この点に着目し、Stx に結合するグロボ 3 糖を持った化合物を種々合成し、Stx 阻害剤 (Stx 吸着剤、Stx 中和剤) としての可能性を検討した。

本研究では、まず、腸管で作用する経口投与型 Stx 吸着剤の開発を行った。次に、既にグロボ 3 糖を 6 個もつケイ素化合物 SUPER TWIG (1)⁶ が O157 感染実験において静脈投与した場合に有効であることが見出されていたので、さらに優れた作用を持つ化合物の開発を行うため SUPER TWIG の構造最適化条件を検討した。本研究で得られた結果の要約は、以下のとおりである。

まず、グロボ 3 糖の支持体としてポリアクリルアミドを基本骨格として用い、これにスペーサーに繋がったグロボ 3 糖を結合させ、種々の集積密度を持つ一連の化合物 (Gb3-polymer) を合成した。そして、各 Gb3-polymer の Stx の標的細胞への結合阻害活性 および Stx の細胞障害活性阻害効果を測定し、また O157 感染実験における Gb3-polymer の効果も調べた。その結果、最もグロボ 3 糖を

集積させた Gb3-polymer 1:0 が、低濃度で Stx の標的細胞への結合 および 細胞障害活性を阻害した。マウスを用いた O157 感染実験では、集積密度には非依存的に、いずれの Gb3-polymer 投与群も顕著に O157:H7 感染による致死性を抑制した。これらの結果から、Gb3-polymer、その中でも特にグロボ 3 糖を高密度に集積させた Gb3-polymer 1:0 は経口投与可能な O157 感染症治療薬として臨床応用が大いに期待できることが明らかとなった。

次に、ケイ素化合物 SUPER TWIGs を基本骨格にして、末端のグロボ 3 糖数や核構造の異なる一連の化合物を合成し、血中における Stx の標的細胞への結合活性、細胞障害活性、感染による致死性の阻害を指標に、SUPER TWIGs の構造最適化を行った。その結果、最適条件は、1) 疎水的な核構造の両側に対照的にグロボ 3 糖数が集積した構造 (ダンベル型) を有し、核構造間の距離は少なくとも 11ナであること、2) グロボ 3 糖は片側に 3 個以上、全体で 6 個以上存在すること、3) 分岐点となるケイ素原子とグロボ 3 糖との間の距離は、末端の糖鎖密度を保つために 10ナ以内であること、であった。SUPER TWIGs の内、SUPER TWIG (2)18 はこれら全ての条件を満たしており、Stx に対し強力な阻害作用を示した。

SUPER TWIGs の Stx B-subunit への結合により、Stx B-subunit が標的細胞に結合できなくなり、SUPER TWIGs が Stx の毒性を阻害する。そこで、SUPER TWIGs と Stx B-subunit の結合様式について、遺伝子工学的に改変した変異体を用い検討したところ、SUPER TWIGs の結合には、Stx1 B-subunit のサイト 3 または サイト 1+2、Stx2 B-subunit のサイト 3 が必須であることが明らかとなった。また、最適構造を有する SUPER TWIGs は、マクロファージの取り込み、分解に必要な構造であることを示した。以上の結果から、最適構造を決定したことで、従来より低コストで、強力な阻害剤を開発することが可能となり、SUPER TWIG (2)18 はこの条件を全て満たすことから、静脈投与型 O157 感染症治療薬として臨床適用できる可能性が示唆された。

以上、腸管、血中において Stx の毒性を抑制する有効な O157 感染症治療薬として、Gb3-polymer および SUPER TWIGs を開発することに成功した。

本研究で得られた成果は、Stx の毒性機構を理解するために重要な情報を提供し、より有効な O157 感染症治療薬の開発のための基礎的な知見を与え、従来から極めて開発が困難であった経口投与型・静脈投与型 Stx 阻害剤を見出した。従って、本研究は、O157 感染症撲滅に大きく貢献をするものと考えられ、博士(薬学)の学位を授与するに十分な価値のあるものと判定した。