

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素 中和剤の開発

所属 国立国際医療センター研究所 臨床薬理研究部
研究者 西川 喜代孝

要旨

ペロ毒素は血中にごく微量存在するだけで生体に対し強力な致死性を発揮する。ケイ素原子を分岐核とする一連の新規化合物（カルボシラン dendリマー）を用い、血中のペロ毒素と強固に結合し、その細胞障害活性、致死活性を有効に中和するペロ毒素中和剤を開発した。

1. 研究目的

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、その 3-10% 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。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、血中に侵入した極微量のペロ毒素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、血中でペロ毒素に非常に高い親和性をもって結合しその毒性を中和するような、全く新しいコンセプトにそった薬剤の開発がこれら合併症の発症抑制に必須であると考えられる。しかしながらこのような中和剤はこれまで全く開発されていない。ペロ毒素は A-B 型の毒素で、B サブユニットが細胞膜上の受容体、Gb3(globotriaosylceramide) に結合することにより細胞内に取り込まれる。取り込まれた A サブユニットはその N-グリコシダーゼ活性によりリボゾームを失活させ、蛋白質合成を阻害することにより強い細胞毒性を示す。ペロ毒素による細胞障害活性を阻害するには、最初のステップである B サブユニットと Gb3 との結合を阻害することが肝要と考えられる。本研究では、ケイ素原子を分岐核とする樹脂状高分子（カルボシラン dendリマー）を担持骨格として持ち、末端に Gb3 の糖鎖部分（グロボ 3 糖）を高度に集積させた新規化合物（SUPER TWIG）を用い、血中にごく微量存在するペロ毒素に対し高い特異性と親和性をもって結合し、かつその細胞障害活性、致死活性を有効に中和するペロ毒素中和剤を開発することを目的とする。

2. 研究方法

1) SUPER TWIG は、ケイ素原子を分岐点とした世代拡張によって、末端官能基（グロボ 3 糖）の数、配置を厳密に制御した種々の誘導体を作成することができるという非常にすぐれた特徴を有する。これまでに、末端にグロボ 3 糖を 3、6、12 個結合させた SUPER TWIG（各々 SUPER TWIG(0)3, (1)6, (1)12 と称する）の合成を完了している（Figure1）。

2) 血中に存在するペロ毒素に対する中和活性

致死量の Stx2(0.25 ng/ g of body weight)を、各 SUPER TWIG の存在または非存在下で ICR マウスの尾静脈より投与し、生存日数を比較した。

3) ペロ毒素の体内局在性の変化

放射標識した Stx2(0.25 ng/ g of body weight)を、各 SUPER TWIG の存在または非存在下で ICR マウスの尾静脈より投与し、1 時間後の各臓器に存在している放射活性を γ カウンターにより定量した。

4) 培養細胞におけるペロ毒素の取り込みと分解

マクロファージはマウスの腹腔より調製した。マクロファージまたは Vero 細胞を、放射標識した Stx2(1.0 μ g/ml) と、SUPER TWIG(1)6 の存在または非存在下で 4 時間培養した。細胞を洗浄後、血清を含まない培地に交換し、各時間での培養液中、及び細胞内の標識 Stx2 のプロセッシング、分解を、SDS-PAGE により検討した。

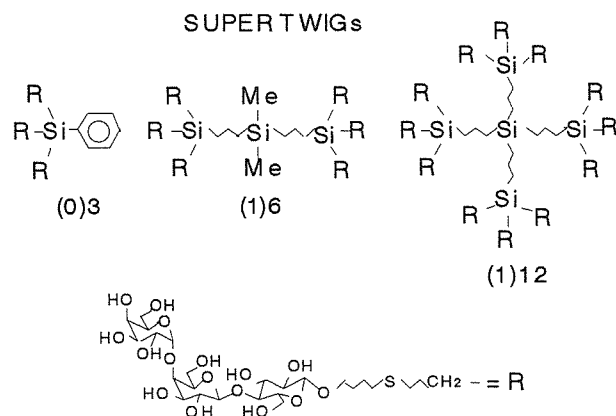


Figure 1 Structures of SUPER TWIGs

Structures of SUPER TWIG (0)3 (MW: 2006, trisaccharide: 1.50×10^{-3} mol/g), (1)6 (MW: 4001, trisaccharide: 1.50×10^{-3} mol/g) and (1)12 (MW: 7913, trisaccharide: 1.52×10^{-3} mol/g), carrying 3, 6, and 12 trisaccharides of Gb3, respectively. The numbers in the parentheses indicate the generation numbers of the SUPER TWIGs, corresponding to their core structures.

3. 結果と考察

これまでに、各 SUPER TWIG のペロ毒素の標的細胞への結合に対する阻害活性、ペロ毒素による細胞障害活性に対する中和能を比較検討している。その結果、SUPER TWIG(1)6 および (1)12 は SUPER TWIG(0)3 に比し、両活性について 400-500 倍の効果を有すること、一方 SUPER TWIG(1)6 および (1)12 の間では数倍の違いしか認められないこと、を明らかにしている。また表面プラズモン共鳴を利用した分子間相互作用解析により、SUPER TWIG(1)6 および (1)12 は、 $K_d = 10^{-6} \sim 10^{-7}$ M オーダーという高い親和性でペロ毒素に直接結合することを明らかにしている。本研究ではこれら化合物の血中でのペロ毒素中和活性について比較検討を行い、生体での機能発現に必要な最適構造を決定すること、さらにその作用機構を明らかにすることを試みた。

1) 血中にごく微量存在するペロ毒素に対する中和活性の検討

1-1) 血中でのペロ毒素中和活性発現に必要な SUPER TWIG の最適構造の決定

各 SUPER TWIG を致死量のペロ毒素と共にマウスに静脈投与したところ、SUPER TWIG(0)3 では全く効果が見られないのに対し、SUPER TWIG(1)6 は完全にペロ毒素の致死活性を抑制することを見出した (Figure2)。興味深いことに、SUPER TWIG (1)12 はインビトロでは SUPER TWIG(1)6 よりも強いペロ毒素結合活性を示すにもかかわらず、ペロ毒素投与マウスに対してわずかな延命効果しか示さなかった。以上の結果は、インビトロでのペロ毒素に対する結合活性は必ずしも血中でのペロ毒素中和活性の強さと相関しないこと、血中でのペロ毒素中和活性の発現に要求される構造にはグロボ3糖数が重要であり、かつその数には最適値が存在すること、を示している。

1-2) SUPER TWIG(1)6 前投与の効果

SUPER TWIG(1)6 は少なくともペロ毒素投与 6 時間前の投与であれば、同時投与の場合と同様完全にペロ毒素の致死活性を抑制する能力を保持することが判った。

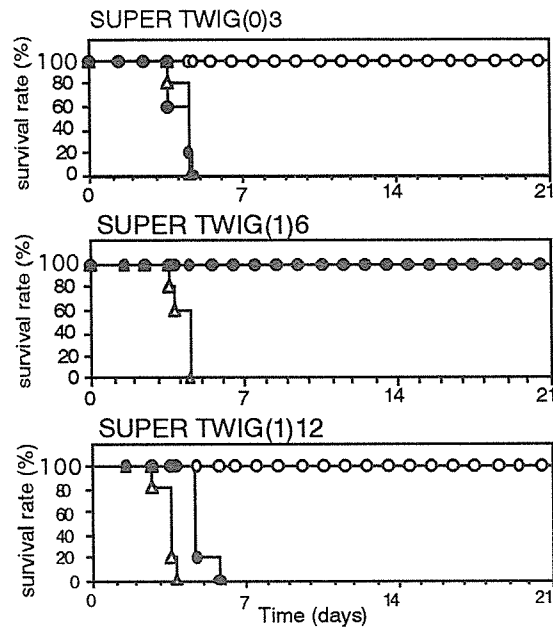


Figure 2 Inhibitory effect of SUPER TWIGs on the lethality of Stx2 in mice. A lethal dose of Stx2 (0.25 ng/g of body weight) was administered to mice with (closed circle) or without (open triangle) SUPER TWIG (0)3, (1)6 or (1)12 (50 µg/g of body weight). Data of the first three weeks are shown. Open circle indicates SUPER TWIGs only. The data are representative of three to five independent experiments.

1-3) SUPER TWIG(1)6 による脳血管障害の抑制

動物モデルでは、ペロ毒素は中枢神経系において多発性の血管障害をひき起こし、これが致死性に密接に関連していると考えられている。SUPER TWIG(1)6 はマウスへのペロ毒素投与によりひき起こされるペロ毒素の脳血管内皮への沈着、およびそれに伴う鬱血や出血を顕著に軽減することが明らかとなった。

2) SUPER TWIG(1)6 の血中でのペロ毒素中和活性発現機構

2-1) SUPER TWIG(1)6 によるペロ毒素の体内局在性的変化

標識ペロ毒素をマウスに静脈投与しその体内分布を調べると、速やかに胃などの消化管、肝臓、その他脳、腎臓などのペロ毒素の標的として良く知られている臓器、等に局在することがわかった。SUPER TWIG(1)6 の同時投与により、標識ペロ毒素の体内分布は劇的に変化し、肝臓、脾臓など網内系の発達した臓器への分布が著しく亢進した。さらにペロ毒素は SUPER TWIG(1)6 依存的に肝臓、脾臓などで速やかに分解を受けていることが示唆された。

2-2) マクロファージによる SUPER TWIG(1)6 依存的なペロ毒素の取り込みと分解

肝臓、脾臓など網内系の発達した臓器ではマクロファージが豊富に存在することが知られている。そこで培養マクロファージを用い、ペロ毒素の取り込みを検討したところ、マクロファージは SUPER TWIG(1)6 非存在下ではペロ毒素を全く取り込まないのに対し、SUPER TWIG(1)6 存在下では非常に効率良くペロ毒素を取り込み、低分子量分解産物へと代謝し、培養液中に放出するようになることが明らかとなった。

4. まとめ

SUPER TWIG(1)6 は血中に存在する微量なペロ毒素に対して顕著な中和活性が示された初めての化合物であるばかりでなく、これまでに報告されているペロ毒素中和剤のなかでも最もコンパクトな構造を有する。SUPER TWIG(1)6 は血中に存在するペロ毒素を、以下の2つの作用機構によって非常に効率良く解毒していることが明らかとなった。1：ペロ毒素に直接強固に結合し、受容体を介した標的細胞、標的臓器へのペロ毒素の取り込みを強力に阻害する。2：SUPER TWIG(1)6 とペロ毒素との複合体形成を介して、肝臓、脾臓など網内系のマクロファージによるペロ毒素の取り込みと分解を著しく促進する。今後は今回得られた情報を基に、さらに核構造、グロボ3糖数を至適化し、血中ペロ毒素に対して顕著な中和活性を発現するための最小最適構造を決定していく予定である。

5. 研究発表

該当なし

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社