

一昨年及び昨年の本研究において我々は、世代数が0から2、糖鎖の数が3から36までの計8種類の Super Twig を作成し、それらの Stx 結合阻害活性を調べた結果、Stx の結合阻害及び細胞レベルにおける Stx の毒性中和には Fan 型, Ball 型, Dumbbell 型のいずれも世代数が1以上でグロボ3糖の糖鎖数が4個で充分であるが、マウス個体レベルにおける毒性中和には Dumbbell 型で糖鎖の数が6以上必要であること、個体レベルにおける活性はマクロファージによる Stx 代謝促進活性と関連することを明らかにした。

Stx1 とグロボ3糖類似体の共結晶の X 線解析の結果から、Stx1 の B サブユニットには3カ所の糖鎖結合サイトが同定され、変異体を用いた研究などからそれらのサイトに関与するアミノ酸が同定されている。一方、臨床的に重要とされる Stx2 については、X 線解析から Stx1 の各サイトに対応する部位が見いだされているが、共結晶や変異体による研究はなく、詳細は不明である。そこで今年度は、臨床的に重要な Stx2 も含め、糖鎖担持カルボシランデンドリマーの Stx 中和作用の分子機構を明らかにするために、Stx における結合部位の同定を試みた。

B. 研究方法

本研究では糖鎖担持カルボシランデンドリマー化合物として、これまでの解析で Stx 結合活性が最も強かった Dumbbell(2)18 を用いた。

各 Stx B サブユニット変異体の調製は以下のように行った。Stx1 B サブユニットの3カ所の糖鎖結合サイトについては既報に基づき、各サイト特異的な変異体を2種類ずつ(サイト1変異体: D17E, F30A、サイト2変異体: A56Y, G62A、サイト3変異体: W34A, D18E)、2カ所のサイトの変異体(サイト1と2: D17E/G62A, F30A/G62A、サイト1と3: D17E/W34A, F30A/W34A、サイト2と3: G62A/W34A)及び3カ所全ての変異体(D17E/G62A/W34A, F30A/G62A/W34A)を調製して用いた。また Stx2 B サブユニットについては各々 Stx1 と対応するアミノ酸を置換した変異体を調製した。またいずれの Stx B サブユニットも C 末端にヒスチジンタグを結合した。

野生型及び変異型 Stx B サブユニットとデンドリマー化合物あるいは Gb3 含有脂質

ベジクルとの結合の解析には、ニッケルイオンを介してセンサーチップに結合させた Stx B サブユニットを用いた Biacore システムで行った。

C. 研究結果

最初に、各 Stx 変異体について、Gb3 含有脂質ベジクルとの結合を調べた。Stx1 については既報の結果とほぼ一致し、いずれの糖鎖結合サイトを失活させた変異体も野生型より弱い結合活性を示し、脂質二重膜に存在する Gb3 と Stx1 との結合には3カ所の糖鎖結合サイトともに関与することが確認された。一方、Stx2 についてはサイト1あるいはサイト3を失活させた変異体はほとんど結合活性を示さなかったのに対して、サイト2を失活させた変異体は野生型と同程度の強い結合活性を示した。これらの結果から、Stx1 と Stx2 が脂質二重膜に存在する Gb3 と結合する様式は異なることが示唆された。

次に糖鎖担持カルボシランデンドリマーと各 Stx 変異体との結合活性を解析した。各糖鎖結合サイトを1カ所のみを失活させた Stx1 変異体について、サイト1あるいはサイト2変異体は野生型 Stx1 とほぼ同程度の結合活性を示したのに対し、サイト3変異体の結合活性はやや弱い傾向を示した。また、サイト1及び2の2カ所を失活させた Stx1 変異体は野生型と同程度の結合活性を有していたが、サイト3を含む2カ所の変異体の結合は非常に弱かった。これらの結果から、Stx1 と糖鎖担持カルボシランデンドリマーとの結合にはサイト3が重要であり、サイト1+サイト2でも比較的強い結合活性を示すことがわかった。

Stx2 の各種変異体を用いて同様の実験を行った結果、Stx1 と同様にサイト1あるいはサイト2変異体、及びサイト1とサイト2の両方を失活させた変異体は野生型 Stx2 とほぼ同程度の結合活性を示したが、サイト3のみを失活させた変異体の結合は非常に弱かった。

以上の結果から、糖鎖担持カルボシランデンドリマー化合物が Stx に結合する際には、Stx1、Stx2 のいずれの場合にも、グロボ3糖がサイト3と相互作用することにより強い結合活性を示すことが明らかとなった。

D. 考察

我々はこれまで、個体レベルにおいて Stx の毒性を中和する化合物を、世界で初めて開発し、報告してきた。すなわち Stx 受容体であるグロボ 3 糖を分子内に複数有するカルボシランデンドリマーのうち、Dumbbell(1)6 及び Dumbbell(2)18 は Stx1 及び Stx2 と *in vitro* で強く結合するだけでなく、細胞レベル及びマウス個体レベルにおいて Stx の致死活性を完全に中和した。また昨年までの本研究により、我々は、この中和活性発現に糖鎖担持カルボシランデンドリマーのどのような構造が必要かを明らかにした。これらの研究により、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬の候補として、生体内で Stx を中和し得る化合物の持つべき構造の条件が明らかとなったと考えている。

本研究では、糖鎖担持カルボシランデンドリマーの Stx への結合及び中和という活性をより詳細に調べるために、Stx 全体ではなく、Stx の有する 3 カ所の糖鎖結合サイト各々への結合を調べた。これまでの報告ではサイト 1 やサイト 2 の重要性は指摘されていたが、サイト 3 についてはあまり重要視されていなかった。ところが本研究により、糖鎖担持カルボシランデンドリマーはサイト 3 に選択的に結合することが明らかとなった。特にこれまで研究が遅れていた Stx2 については、サイト 3 特異的とも言える反応性を示したことから、今後、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬という点で、特にサイト 3 を標的とした中和剤の開発が有効となる可能性が示された。

糖鎖担持カルボシランデンドリマーはその分子構造から、生体内において *inert* であると考えられるが、実際の治療薬としてヒトに投与するには今後の安全性の検討が

必要である。またこの中和剤の調製においては、グロボ 3 糖の合成がボトルネックとなり、大量合成が容易ではなかった。我々は現在、これらの課題を克服するために、糖鎖を含まない新たな Stx の中和剤開発を試みており、その研究においてはサイト 3 への結合を特に注目して実験を組み立てている。これまでの予備実験では、極めて有望な結果が得られていることから、本研究の成果の応用が単なる希望的観測ではなく、実際に有効なものとなると考えている。

E. 結論

糖鎖担持カルボシランデンドリマーは、Stx1 及び Stx2 B サブユニットの 3 カ所の糖鎖結合サイトのうち、サイト 3 を介して強く結合し、その Stx 中和活性を発揮する。この知見は今後の Stx 中和剤開発に有用な情報であり、この成果をもとに現在、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬としてより実用的な Stx 中和剤開発を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, Igai K, Higashi N, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K: Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *J Infect Dis* 189:360-, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

II-2. 平成16年度 厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

糖鎖担持カルボシラン dendリマー実用化のための調査報告

分担研究者 : 平野 弘之 (株式会社ジーエスプラッツ事業部長)
住所 東京都中央区日本橋 1-7-11 日本橋東ビル7階

検討内容

①事業化検討

糖鎖担持カルボシラン dendリマーおよびポリマー (ナノメディシン) の製造技術開発を検討する中で、特に課題となるグロブ3糖の工業的生産の事業化検討を行い。科学技術振興機構の委託開発事業へ応募した。

技術内容が評価され面接審査をおこなった (別添 面接審査用資料) 最終評価として、株式会社ジーエスプラッツが開発するのではなくライセンスビジネスを行うという事業であるた採択には至らなかった。

②文献調査

【ベロトキシンの吸着剤に関する最近の報告】

STN CAPLUS ファイル検索

L10 ANSWER 1 OF 4 CAPLUS

COPYRIGHT 2005 ACS on STN

Full Text

AN 2004:602922 CAPLUS

DN 141:202386

TI Development of device using glyco-polymer for treatment of infection by

Escherichia coli O157

TIJP 感染治療に大腸菌 O157 でグリコ高分子を使用する装置の発達 [機械翻訳]

AU Miyagawa, Atsushi; Hatanaka, Kenichi

CS Inst. Ind. Sci., The Univ. Tokyo, Japan

SO Seisan Kenkyu (2004), 56(3), 227-231

CODEN: SEKEAI; ISSN: 0037-105X

PB Tokyo Daigaku Seisan Gijutsu Kenkyusho

DT Journal; General Review

LA Japanese

AB A review on physiol. roles of glycolipids, pathogenic E. coli O157, hemodialysis, and oligosaccharides which specifically interact with verotoxin (Shiga-like toxin).

L10 ANSWER 2 OF 4 CAPLUS

COPYRIGHT 2005 ACS on STN

Full Text
 AN 2004:139099 CAPLUS
 DN 140:180678
 TI Verotoxin-attenuating compositions
 extracted from Lactococcus lactis
 cremoris and functional foods
 containing them
 IN Okami, Yoshiro; Kikuchi, Toshihiko;
 Iinuma, Hironobu
 PA Microbiochemical Research
 Foundation, Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 15 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND
DATE APPLICATION NO.	
DATE	
-----	----
-----	-----

PI JP 2004051581 A2
 20040219 JP 2002-213302
 20020723
 PRAI JP 2002-213302
 20020723

AB The compns., which attenuate
 cytotoxicity of verotoxins to Vero cells
 and
 are useful for treating, relieving, or
 preventing food poisoning by
 enterohemorrhagic Escherichia coli
 and for treating disorders due to
 verotoxins, are manufd. by extg.
 culture of Lactococcus lactis cremoris

with EtOAc or BuOH and are
 adsorbed by weakly-basic or
 strongly-basic
 anion exchange resins. Functional
 foods contg. the compns. are also
 claimed. The compns. may contain
 substances which are prepd. by removing
 EtOAc or BuOH from the above ext.,
 dissolving the residue in H2O, passing
 the soln. through a column packed
 with adsorbent polymer or activated C,
 and eluting with org. solvents, and
 lactic acid.

L10 ANSWER 3 OF 4 CAPLUS
 COPYRIGHT 2005 ACS on STN

Full Text
 AN 2000:205707 CAPLUS
 DN 132:248269

TI Highly sensitive immunological
 method for detecting and quantitating
 microorganism (bacteria, fungi, virus,
 microorganism-produced substance)
 IN Kariyama, Hidesato
 PA UMA K. K., Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 16 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND
DATE APPLICATION NO.	
DATE	
-----	----
-----	-----

PI JP 2000088854 A2
 20000331 JP 1998-295968
 19980911
 PRAI JP 1998-295968
 19980911
 AB A highly sensitive immunol. method is described for detecting and quantitating microorganism (e.g., Salmonella, Escherichia coli O-157, vibrio, Campylobacter) via an amplification with enzyme-labeled secondary antibody capable of binding with primary antibody in a high ratio after the microorganism is adsorbed onto a solid matrix (e.g., membrane filter). The method comprises a step for sepg. microorganism by the phys. or immunol. adsorption onto a solid matrix, a reaction with the primary antibody capable of recognizing the microorganism, a washing step, a reaction with the enzyme-labeled secondary antibody capable of recognizing the primary antibody, a washing step, and a step for measuring the enzyme activity on the solid matrix by the double amplification.

L10 ANSWER 4 OF 4 CAPLUS
 COPYRIGHT 2005 ACS on STN
 Full Text

AN 1999:130729 CAPLUS
 DN 130:172725
 TI Water purification filter and water purifier using the filter

IN Shimizu, Takashi
 PA Life Tech Surply Co., Ltd., Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 FAN.CNT 1

DATE	PATENT NO.	APPLICATION NO.	KIND
DATE	-----	----	
-----	-----	-----	

PI JP 11047732 A2
 19990223 JP 1997-221902
 19970804
 PRAI JP 1997-221902
 19970804
 AB This water purifn. filter is a layer of an org. material contg. ceramic particles and in which the org. material is held in a manner that the material can be fluidized. This water purifier comprises an adsorbent layer and such a filter. The filter may be nonwoven fabric made of org. material fibers or filled with the org. material or coated with metal ions having high potential. Bacteria propagation is satisfactorily suppressed and water is disinfected with metal ions in amts. sufficiently lowered within allowable ranges.

受付番号 _____

委託開発事業開発課題申込書

提出日 平成16年 月 日

開発を希望する 新技術の名称	糖鎖担持カルボシラン dendリマー・ポリマー(ナノメディシン)の製造技術開発
-------------------	---

新技術の所有者 例1 (機関の場合)	機関名	独立行政法人 科学技術振興機構	
	代表者名	役職名 氏名	印
	所在地	〒 埼玉県川口市本町4丁目1番8号	
	担当者役職・氏名		
	担当者連絡先	郵便宛先:〒 TEL: Fax: E-mail:	

新技術の所有者 例2 (個人の場合)	氏名	印		
	所属機関名・部署 役職			
	連絡先	所属機関	住所:〒 TEL: Fax: E-mail:	
		自宅	住所:〒 TEL: Fax: E-mail:	

*新技術の所有者とは特許(申請中を含む)の出願人(共同出願の場合、全出願人)をいいます。締め切り日までに
出願を終えていることが申込要件となります。

新技術の所有者には、少なくとも国公立研究機関、大学、特殊法人、財団等の研究機関又は当該機関に所属
する個人(又は発明時に当該機関に所属していた個人)が含まれていることが必要です。新技術の所有者が「機
関」の場合は例1を「個人」の場合は例2の様式で記入押印願います。新技術の所有者(出願人)が複数の場合は
適宜枠を増やして記入押印して下さい。

開発 実施 企業	企業名	株式会社ジーエスプラッツ
	代表者名	役職名 代表取締役 氏名 樽井茂樹 代表者印
	所在地	〒103-0027 東京都中央区日本橋1-7-11
	担当者役職・氏名	事業部長 平野 弘之
	担当者連絡先	〒103-0027 東京都中央区日本橋1-7-11 TEL:03-3276-3021 FAX :03-3276-3022 E-mail:h-hirano@gs-platz.com
	経理・財務担当者 役職・氏名	事業部主事 小阪 かおり
	担当者連絡先	〒103-0027 東京都中央区日本橋1-7-11 TEL:03-3276-3021 FAX :03-3276-3022 E-mail:k-kosaka@gs-platz.com

該当する企業の分類を○で囲んで下さい。

中堅中小企業	上場企業
新規企業	非上場企業

【実施料】

実施料の対象製品に対する希望する実施料率を記載して下さい。

実施料対象製品	糖鎖担持カルボシラン dendリマー・ 糖鎖担持ポリマー(ナノメディスン) 原料糖鎖
売上高に対する料率	3%

実施料の対象製品と料率は、新技術の所有者と開発実施企業の意向を踏まえて決定します。(ガイドラインとしては、対象製品の売上高の3%程度)

【優先実施期間】

希望する優先実施期間を記載して下さい。

優先実施期間	5年
--------	----

優先実施期間は、原則5年とするが、原権利者と開発実施企業の意向を踏まえて決定します。

(p /)

新技術の代表発明者 (大学、国研等の代表的な発明者を記入下さい。代表発明者が新技術の所有者と重複する場合は省略可。)

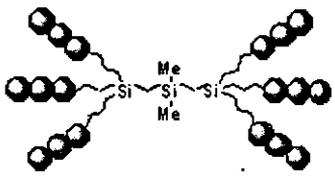
氏名	照沼 大陽	印
所属機関名・部署・役職	埼玉大学工学部 機能材料工学科 機能生体分子講座教授	
連絡先	住所: 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保255 TEL 048-858-3427 FAX 048-858-3701 e-mail teru@fms.saitama-u.ac.jp	

課題の該当分野 (適当と思われるものを1つを「主」の欄に選択して記入して下さい。また、他にも該当する場合は、「副」に2つまで記入して下さい。)

【ライフサイエンス】 10ゲノム科学 11細胞生物学 12医学・医療技術 13食品科学・技術 14脳科学 15バイオインフォマティクス 16その他	【情報通信】 20ネットワーク高度化技術 21高度コンピューティング技術 22ヒューマンにターフェース技術 23デバイス技術 24ソフトウェア技術 25その他
【環境】 30循環型社会システム技術 31化学物質評価・管理技術 32地球温暖化対策技術 33その他	【ナノテクノロジー・材料】 40物質・材料技術 41安全空間創成材料技術 42情報デバイス技術 43医療技術 44バイオロジー 45その他
【エネルギー】 50新エネルギー技術 51省エネルギー・エネルギー利用高度化技術 52核融合技術 53次世代の革新的原子力技術 54原子力安全技術 55その他	【製造技術】 60高精度技術 61精密部品加工技術 62高付加価値極限技術 63環境負荷最小化技術 64品質管理・製造現場安全確保技術 65先進的ものづくり技術 66医療・福祉機器技術 67その他
【社会基盤】 70地震防災科学技術 71防災・危機管理関連技術 72情報通信技術を利用した社会基盤技術 73その他	【フロンティア】 80宇宙開発 81海洋開発 82その他

課題の技術分野	主	12	副	66	43
---------	---	----	---	----	----

開発を希望する新技術の概要(総括表)

開発を希望する新技術の名称	(新技術の名称) 糖鎖担持カルボシランデンドリマー・ポリマー(ナノメディシン)の製造技術開発			
代表発明者	(所属・氏名) 埼玉大学工学部 機能材料工学科 機能生体分子講座教授 照沼 大陽			
開発実施企業	(企業名) 株式会社ジーエスブラッツ			
<p>1. 新技術の概要</p> <p>ナノメディシン(糖鎖カルボシランデンドリマー)は細菌毒素の標的となる糖鎖をナノメートル単位の精密さで設計した炭素とケイ素の樹状化合物に結合させたものである。</p> <p>O-157のペロ毒素をはじめとする細菌毒素の多くは細胞表面の糖鎖を標的として細胞に結合・進入し毒性を発現する。投与された糖鎖カルボシランデンドリマーは細菌毒素の細胞への吸着、進入をし阻害し、毒性を中和する効果を示す。種々の骨格を持つ糖鎖カルボシランデンドリマーの中で十分な救命効果を示すDumbbell型化合物が見出されている。</p>				
 <p>Dumbbell型</p>				
<p>2. 新技術の特徴</p> <p>ペロ毒素の糖鎖吸着をターゲットとした医薬品開発は従来技術でも検討されていたが、経口投与、全身投与において十分な救命効果のあるものは得られていなかった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 本技術の提供する糖鎖カルボシランデンドリマーや糖鎖担持ポリマーは経口および全身投与において、ラットを用いた試験で十分な救命効果を示している。 ・ ペロ毒素は複数のグロボ3糖と結合するサイトをもつ多価のリガンドであり、吸着する糖鎖がナノメートル単位の精密さで集積していること(クラスタリング効果)が必要である。 <p>樹状鎖の長さや分枝など骨格の異なる糖鎖カルボシランデンドリマーが合成され糖鎖のクラスタリング効果を検討している。</p>				
<p>3. 新技術の用途、利用分野</p> <p>医薬 O-157など出血性大腸菌感染の治療 ペロ毒素の中和薬剤 診断剤 医療分野、食品・畜産の分野において出血性大腸菌の検出は必要であり、従来の大腸菌の表面抗原による検査キットではなく、毒素を直接検出するために糖鎖カルボシランデンドリマーを利用することができる</p>				
<p>4. 開発における解決すべき問題点と成否の認定基準(案)</p> <p>糖鎖カルボシランデンドリマーの実用化のためには、糖鎖の工業的な生産方法の確立がボトルネックとなっている。原体の規格設定(物性・分析および生物学的評価) 原体の安全性評価・薬物動態の検討を行うためにも、数Kg程度の糖鎖生産をGMP基準に準拠して実施することが求められている。</p>				
成否の認定基準(案)				
技術的項目	成否の認定基準(案)	市場が要求している値	応募申込者が現在得ているチャンピオンデータ	備考
グロボ3糖の工業的生産	製造コスト試算 暫定規格設定	数万円/Kg 3LotX3	:数グラムまでの試験的生産 毒素吸着・細胞障害の阻害 効果などの評価方法	

新技術の名称：

糖鎖担持カルボシラン dendリマー・ポリマー(ナノメディシン)の製造技術開発

1. 新技術の概要

病原性大腸菌O157:H7が産生するベロ毒素に対して、十分な救命効果を有する治療薬を提供する。病原性大腸菌O157:H7が産生するベロ毒素は細胞表面上に多数存在する糖鎖グロボトリアオシルセラミドの中の5つのグロボ三糖部分を認識・接着する事により感染するとされている。ベロ毒素に対し、グロボトリアオシルセラミドより強く接着するグロボ三糖担持物質を創製すれば、O157による被害を押さえる事が可能と期待され、樹状の化合物 dendリマーの末端にグロボ三糖を導入した糖鎖担持 dendリマーが考案された。 dendリマーには、中性分子であり合成が容易、かつ生理活性のないカルボシラン dendリマーを選んだ。カルボシラン dendリマーの末端は互いに隣接しており、糖鎖の集積化に適している。

種々の骨格を持つ糖鎖カルボシラン dendリマーの中で十分な救命効果を示す Dumbbell型化合物が見出されている。

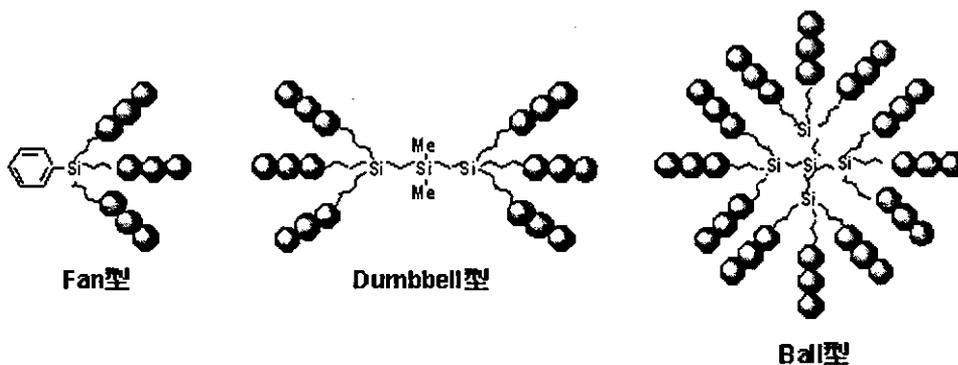
2. 新技術の特徴

ベロ毒素は複数のグロボ三糖と結合するサイトをもつ多価のリガンドであり、吸着する糖鎖がナノメートル単位の精密さで集積していること(クラスタリング効果)が必要である。

カルボシラン dendリマーは

- ①分子設計が自由で合成が容易
- ②構造が柔軟でサイズの定まった高分子
- ③安定で生理作用が少ない

という特徴をもっており、形状とサイズを制御した糖鎖の集積化の検討ができた。



ラットを用いた試験では、Dumbbell型構造の糖鎖担持 dendリマーが強力な効果を発揮し、ラットに対し100%の救命効果が現れた。ファン型やボール型では顕著な延命効果は見られなかった。これは単にグロボ三糖を集積させた吸着体であれば良いだけではなく、 dendリマー構造による糖鎖の集積効果もまたベロ毒素吸着能に大きく関与している事を示唆された。

Dumbbell型構造の糖鎖担持 dendリマーの企業化検討が現段階の課題である。

3. 新技術の用途、利用分野

医薬品、医薬デバイス、診断薬、食品安全性領域(畜産)

医薬品 O-157など出血性大腸菌感染の治療 ベロ毒素の中和薬剤

診断剤 医療分野、食品・畜産の分野において出血性大腸菌の検出は必要であり、従来の大腸菌の表面抗原による検査キットではなく、毒素を直接検出するために糖鎖カルボシラン dendリマーを利用することができる。

4. 実用化開発における解決すべき問題点

糖鎖カルボシラン dendリマーの実用化のためには、糖鎖の工業的な生産方法の確立がボトルネックとなっている。原体の規格設定(物性・分析および生物学的評価) 原体の安全性評価・薬物動態の検討を行うためにも、数Kg程度の糖鎖生産をGMP基準に準拠して実施することが求められている。

5. 開発目標(実用化レベル)

糖鎖カルボシラン dendリマーを臨床で用いられるようにするためには、医薬品また医療デバイスとしての臨床開発が必要である。現在の糖鎖カルボシラン dendリマーでは基礎的評価で優れた毒素中和効果を認めているが実用化の段階に移るためには、前臨床(非臨床)試験と医薬品基準の原体供給方法を確立しなければならない。

そのためグロボ3糖の工業的生産を実施し製造技術の確立と糖鎖カルボシラン dendリマーの初期の安全性、代謝・薬物動態の評価を実施する。以下の3点の開発目標の達成によって糖鎖カルボシラン dendリマーの実用化への道を開く。

1. 糖鎖の工業的生産

GMPに準拠し数百g~Kg程度のパイロット生産、Kg単位で3Lot以上の生産
製造コストの試算(実生産段階で数万円/Kg達成の可能性判断)
暫定規格設定

2. 製造されたグロボ3糖を用いた糖鎖カルボシラン dendリマーの合成

毒素吸着・細胞障害阻害効果の評価
初期安全性(単回投与 4W・13W連続投与)
代謝・薬物動態

3. 臨床開発候補化合物としてのライセンス

製造技術の確立、初期の安全性、代謝・薬物動態が評価された臨床開発候補品としてライセンスを行う。

(p /)

6. 背景及び技術動向

現在のO-157の治療治療薬・臨床開発状況

現在、様々な方面から研究開発が進められているが、まだ、臨床で使用できる薬剤の開発は完了していない。先行しているものにはO157が産生するベロ毒素を中和する治療用の「モノクローナル抗体」の臨床開発がアメリカですすめられている。

ア) 開発する技術を投入しようとする市場分野の概要 (300字以内)

O-157:H7に代表される出血性大腸菌(他にO26、O111、O128およびO145などがある)、同じ糖鎖を標的とする赤痢菌などの感染症

O-157:H7、出血性大腸菌の感染源となる医薬、食品、畜産分野での診断薬、検出機器が本技術の糖鎖カルボシラン dendリマーまた、糖鎖、糖鎖を集積化した化合物の利用市場と考えられる。

イ) 市場の規模 (300字以内)

既存の市販薬がなく、出血性大腸菌感染症の患者数は少ないためオーファンラッグ(希少疾患用薬)とされている。しかしながら O157を含む腸管出血性大腸菌感染症(無症状病原体保有者を含む)の発生状況は、平成12年は3,638件、平成13年 46都道府県から1,195名の報告がなされ、海外でも感染の発生が続いている。世界保健機関(WHO)の専門家の会議でも広範な食品が感染の原因となっており、注意が必要と指摘されている。感染による死亡者も報告されているため十分な救命効果を有する薬剤が求められている。

(厚生労働省ホームページ<http://www1.mhlw.go.jp/o-157/o157q a/>)

ウ) 市販技術の到達点・問題点 (300字以内)

市販されているO-157感染症治療薬はまだない。先行しているものにはベロ毒素を中和する治療用モノクローナル抗体(ヒト化抗体)があり、帝人株式会社によりアメリカで臨床試験が行われている。治療用ヒト化抗体は一般に治療コストが高く、規模の大きい感染患者に対応するには量的に保存配備することは難しいことが考えられる。O-157感染は疫学的検討や予防対策がとられてはいるが、様々な規模での感染の報告があり世界的には低コストで配備保管できる薬剤が必要とされている。

エ) 求められている技術レベル、成功した場合のインパクト (200字以内)

O-157感染症治療薬として十分な治療効果が得られる薬剤が求められている。またコスト・保存性についても世界的に配備され、使用可能なレベルの製剤が必要であり、実現できればグローバルにO-157感染症治療薬の第一選択薬剤となりうる。

オ) ①他社の商品化及び開発動向

国内外の商品化・開発状況を③で述べる。

②大学等での研究動向

グロボ3糖またグロボ2糖をベロ毒素の吸着に用いる研究では、我々の研究グループの他に名古屋大 工学部 小林一清教授; 岐阜薬科大学 微生物学 森浩志教授; 静岡大学農学部 碓氷泰市教授 財団法人 野口研究所のグループがポリアクリルアミドポリマーに糖鎖を担持させた化合物で検討している。

<http://dokusym.fujita-hu.ac.jp/51th-abstract/L8abstract.html>

③海外での商品化及び研究開発動向

1. シンソルブ(SYNSORB Pk)

O-157のペロ毒素中和剤として1996年よりカナダのSYNSORB Biotechが開発 国内では武田薬品が開発 2001年にSYNSORB Biotechは開発を中断(US FDAは臨床評価の観点を変更して臨床を継続) Adis R&D insight

2. ペロ毒素ヒト化抗体(TMA-15)

ペロ毒素特に毒性の高いStx2に効果のあるヒト化抗体である。帝人株式会社の発表によればアメリカでの臨床開発段階にある。Phase-II(2003)

<http://www.teijin.co.jp/japanese/investors/page/2003/Info030307.pdf>

7. 本新技術の内容

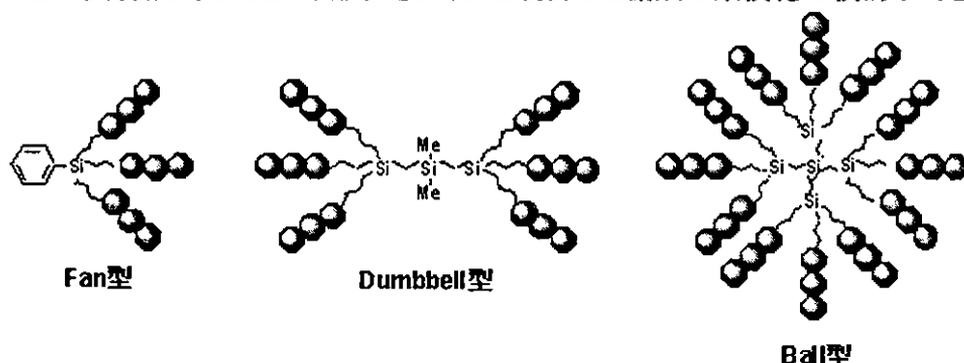
病原性大腸菌O157:H7が産生するペロ毒素に対して、十分な救命効果を有する治療薬を提供する。

ペロ毒素は複数のグロボ三糖と結合するサイトをもつ多価のリガンドであり、吸着する糖鎖がナノメートル単位の精密さで集積していること(クラスティング効果)が必要である。

カルボシランデンドリマーは

- ①分子設計が自由で合成が容易
- ②構造が柔軟でサイズの定まった高分子
- ③安定で生理作用が少ない

という特徴をもっており、形状とサイズを制御した糖鎖の集積化の検討ができた。



ラットを用いた試験では、Dumbbell型構造の糖鎖担持デンドリマーが強力な効果を発揮し、ラットに対し100%の救命効果が現れた。ファン型やボール型では顕著な延命効果は見られなかった。これは単にグロボ三糖を集積させた吸着体であれば良いだけでなく、デンドリマー構造による糖鎖の集積効果もまたペロ毒素吸着能に大きく関与している。様々なデンドリマー化合物を製造しこの集積効果を検討している。

Dumbbell型構造の糖鎖担持デンドリマーの企業化検討が現段階の課題である。

8. 従来技術との比較表

比較項目	従来技術		新技術
糖鎖による毒素中和剤	ペロ毒素の標的糖鎖	集積効果を考慮しない担持体を用いる	集積効果を考慮した担持体(カルボシランデンドリマー)
抗体による毒素中和剤	ペロ毒素に対するヒト化抗体	量的、保存性が懸念材料	量的、保存性の優位性が期待できる
販売価格	ヒト化抗体では高コスト		大量合成により低コスト化
市場規模	先進医療が可能領域		世界的に第一選択薬として使用される

(p /)

9. 研究成果

糖鎖を含有するカルボシラン dendrimer 化合物を合成し、糖鎖を標的とする病原体の中和効果を検討し、基本的な特許が国際出願(国際公開WO 02/02588)されている。
 病原体と糖鎖の関係ではグロボ3糖によるペロ毒素に対する中和活性、シアリルラクトースを含有するものではインフルエンザウィルスの感染を防止する効果を認めている。

10. 研究の経過・成果

dendrimer とは樹木状の意味で1984年D.A.Tomaliaらによりその概念が提唱され、多くの dendrimer の合成あるいは物性評価がなされてきた。 dendrimer は単一の分子量を有し溶解性が大きく末端に機能性基を導入した場合それらの機能性基がすべて分子表面に同一の環境下に配置される巨大分子という特徴を持っている。中でもカルボシラン dendrimer は中性で適度な安定性を有し、樹木状の分岐数が3から1の範囲で選択可能なことからより広範囲で精密な構造の設計ができる長所を持っている。

埼玉大学(工)機能材料工学科の機能分子設計グループでは、カルボシラン dendrimer が代謝など生体への影響が少ないことに着目し、糖鎖分子をカルボシラン dendrimer に導入することで安全性が高く他のグループでは着想できない独創的な生体機能分子を設計することを目指して研究が開始された。

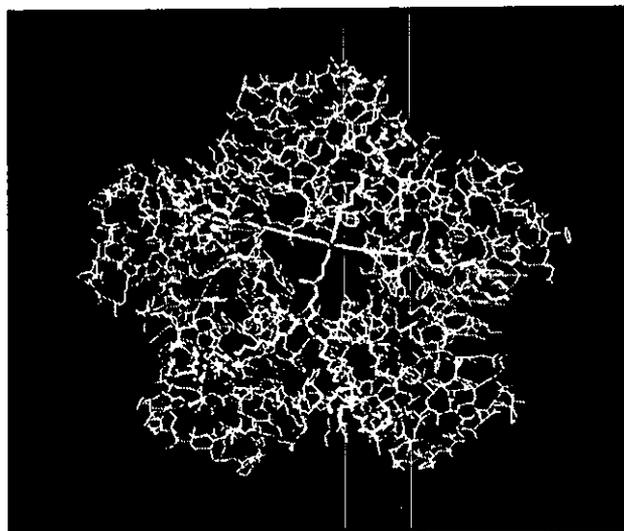
糖鎖カルボシラン dendrimer としてはペロ毒素に接着能を有するグロボ3糖誘導体を選定し合成を開始した。様々な分子構造をもつカルボシラン dendrimer 化合物を合成し、国立国際医療センターとの共同研究でペロ毒素中和能を評価した。

ペロ毒素中和能の評価

	Fan型	Dumbbell型	Ball型
細胞を用いる評価 (in vitro 試験) IC50(mg/mL)	100	0.19	0.16
マウスを用いる評価 (in vivo 試験) SUPER TWIGとペロ毒素を同時に静脈投与	4日目まで生存	2ヶ月以上生存	5日目まで生存

コントロールマウスは4日以内にすべて死亡

ペロ毒素とDumbbell型化合物のドッキングシミュレーション



評価結果からもグロボ3糖を集積させた吸着体であれば良いだけでなく、 dendrimer 構造による糖鎖の集積効果(分子サイズと形状)が重要であることが実証された。

11. 実用化した場合の用途、市場動向、成果実施の見通し

11-1 実用化した場合の用途、市場動向

グロボ3糖の生産を実用化できれば、糖鎖カルボシランデンドリマーまた、糖鎖を集積化した化合物(ポリマー担持体など)に利用することができ、

O-157:H7に代表される出血性大腸菌、グロボ3糖を標的とする赤痢菌などの感染症治療薬

O-157:H7、出血性大腸菌の感染源となる医薬、食品、畜産分野での診断薬、検出機器が本技術の市場と考えられる。

11-2 成果実施の見通し

グロボ3糖の合成方法および糖鎖集積化のためのカルボシランデンドリマーの合成技術は埼玉大学工学部の発明者らが研究を重ねており、化合物の規格化に必要な毒素中和効果の生物評価は国立国際医療センターの発明者らが実施している。糖鎖カルボシランデンドリマー、糖鎖集積化合物の有用性は基礎的に認められており、その生産技術と薬物の安全性、代謝など一部の前臨床項目の実施により医薬品開発へ見通しがつくと考えている。

11-3 成果実施の条件

糖鎖カルボシランデンドリマーを臨床で用いられるようにするためには、医薬品また医療デバイスとしての臨床開発が必要である。現在の糖鎖カルボシランデンドリマーでは基礎的評価で優れた毒素中和効果を認めているが実用化の段階に移るためには、前臨床(非臨床)試験と医薬品基準の原体供給方法を確立しなければならない。

そのためグロボ3糖の工業的生産を実施し製造技術の確立と糖鎖カルボシランデンドリマーの初期の安全性、代謝・薬物動態の評価を実施する。以下3点の開発目標の達成が成果物(糖鎖カルボシランデンドリマー)の実用化の条件である。

1.糖鎖の工業的生産

GMPに準拠し数百g~Kg程度のパイロット生産、Kg単位で3Lot以上の生産
製造コストの試算(実生産段階で数万円/Kg達成の可能性判断)
暫定規格設定

2.製造されたグロボ3糖を用いた糖鎖カルボシランデンドリマーの合成

毒素吸着・細胞障害阻害効果の評価
初期安全性(単回投与 4W・13W連続投与)
代謝・薬物動態

3.臨床開発候補化合物としてのライセンス

製造技術の確立、初期の安全性、代謝・薬物動態が評価された臨床開発候補品としてライセンスを行う。

12. 開発実施企業

①開発実施企業の業界での地位、特徴等。

ゲノム情報に基づく新薬探索研究を行うベンチャー企業として、2000年6月に設立
ジーエスプラッツの機能はポストゲノム技術など新たに進展した先端技術を集約して新薬探索研究を実施し、その成果物(新規技術、知的財産権)のライセンス、技術移転を行うことである。独自の研究施設を有せず国内外の大学、研究機関、ベンチャー企業との共同または委託研究によりプロジェクトを実施する。

②本新技術に関連して

②-1 開発実施企業が有する技術的ポテンシャル(試作・新技術の所有者との共同研究等)

厚生労働省 萌芽的先端医療技術推進研究事業(ナノメディシン分野)において平成13年より3年間分担研究者として参画しており、本技術に関連する調査、糖鎖合成の企業化の委託先検討を実施してきた。

②-2 研究実績

設立以来、新薬探索研究に関する先端的技術の評価を行い、製薬企業の要求に応じた共同・委託研究を企画してきた。自らの研究施設は有しないが、合成委託・生物評価系の構築を行った実績はある。

②-3 商品化開発実績

研究成果の製薬会社へのライセンス、また研究過程で得られた化合物評価情報をインシリコスクリーニングを実施する企業へライセンスする契約を締結し、研究成果を収益としている。

②-4 開発実施企業の経済的優位性(営業力、コスト競争力)

同様のビジネスモデルをもつ競合他社はないが、ベンチャー企業としては基盤する技術の先進性が重要であり、顧客である製薬企業の要求に即応することが営業的、ライセンスの対価に対するコスト(研究費)など経済的な優位性にもつながると考えている。研究施設を有していない点で研究費にしろる固定費は少ないというメリットはある。

③開発実施企業の代表的な研究開発製品 (1500字以内)

当社ジーエスプラッツは新薬探索研究の企画と実施を受託事業を製薬企業を対象として行っている。新薬探索ターゲット、新規作用機序にかかわるスクリーニング系の構築 薬物動態に關与するトランスポーターの高速スクリーニング技術などを共同開発してきた。現在これらの研究を基盤として、化合物ライブラリの合成による独自の薬探索プログラムも企画、実施している。

当社は、研究機関が保有する新規技術のインキュベーションから製薬企業が技術評価できる段階の研究開発を担当しており成果はライセンス・技術移転として行っている。

13. 本新技術に関連した国、特殊法人、公共団体等からの助成金等

13-1 発明者が受けた助成金等

- ・ 厚生労働省科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業(ナノメディシン分野)
H14-ナノ-015 平成14年～平成16年 3年間
- ・ (財)ヒューマンサイエンス振興財団 創薬等ヒューマンサイエンス研究 [若手研究者奨励研究]
平成12年度研究課題 国立国際医療センター 西川 喜代孝

13-2 開発実施企業が受けた助成金

- ・ 厚生労働省科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業(ナノメディシン分野)
H14-ナノ-015 平成14年～平成16年 3年間
平野弘之(分担研究者として参加)

14. 本新技術以外に関連して、開発実施企業が受けた国、特殊法人、公共団体等からの助成金等 無し

(p /)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nisikawa K., Matsuoka K., Watanabe M., Igai K., Hino K., Hatano K., Yamada A., Abe N., Terunuma D., Kuzuhara H., Natori Y.	Identification of The Optimal Structure Required for a Shiga Toxin Neutralizer Oriented Carbohydrates to Function in The Circulation,	<i>The Journal of Infectious Diseases.</i>	in press		2005
Mori T., Hatano K., Matsuoka K., Esumi Y., Eric J.Toone, Terunuma D.	Synthesis of Carbosilane Dendorimers Having Peripheral Mannose and Mannobiose	<i>Tetrahedron</i>	61	2751-2760	2005
Miyagawa A., Kurosawa H., Watanabe T., Koyama T., Terunuma D., Matsuoka K.	Synthesis of glycoconjugate polymer carrying globotriaose as artificial multivalent ligand for Shiga toxin-producing <i>Escherichia coil</i> O157:H7	<i>Carbohydrate Polymers</i>	57	441-450	2004
(参考論文) Mohamed A Karmli	Prospects for Preventing Serious ystemic Toxemic Complications of Toxin-Producing <i>Escherichia coil</i> Infections Using Shiga Receptor Analogues	<i>Editorial Commentary</i>	189	355-359	2004
Matsuoka K., Onaga T., Mori T., Sakamoto J., Koyama T., Sakairi N., Hatano K., Terunuma D.	Synthesis of a useful lauryl thioglycoside of sialic acid and its application	<i>Tetrahedron Lett.</i>	45-51	9383-9386	2004
Watanabe M., Matsuoka K., Kita E., Igai K., Higashi N., Miyagawa A., Watanabe T., Yanoshita R., Samejima Y., Terunuma D., Natori Y., Nishikawa K.	Oral Therapeutic Agents with Highly Clustered Globotriose for treatment of Shiga Toxigenic <i>Escherichia coli</i> infections	<i>J. Infect. Dis.</i>	189	360-368	2004

学術講演に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K.Hatano, A.Yamada, T.Tetsuo, K.Matsuoka, D.Terunuma, Y.Esumi, K.Nishikawa, Y.Natori, K.Hidari Y.Suzuki	Advantages of Carbosilane Dendrimer as a Carbohydrate Scaffold – Application to Artificial Receptor of E. Coli, Influenza and Dengue Virus –	14th International Symposium on Organosilicon Chemistry 3rd Organosilicon Days Wurzburg.			2005.8
A.Yamada, K.Hatano, K.Matsuoka, Y.Esumi, C.Aoki, K.Hidari, Y.Suzuki. D.Terunuma.	Syntheses and Biological Assay of a Series of Lacto- <i>N</i> -neotetraose Cluster using Carbosilane Dendrimer Scaffolds.	14th International Symposium on Organosilicon Chemistry 3rd Organosilicon Days Wurzburg.			2005.8
黒澤 直, 小山哲夫, 江角保明, 幡野 健, 照沼大陽, 松岡浩司	チオグリコシド型グロブ3糖誘導体の合成研究(2)	日本化学会第85回春季年会予稿集	2A2-10		2005.3
山田明宏, 幡野 健, 松岡浩司, 江角保明, 西川喜代孝, 名取泰博, 照沼大陽	糖鎖含有カルボシラン dendrimer の合成研究 (VII) – dendrimer 中心元素の変化によるペロ毒素阻害活性への効果 –	日本化学会第85回春季年会予稿集	2C5-16		2005.3
松山恭子, 鈴木美穂, 小山哲夫, 幡野 健, 照沼大陽, 松岡浩司	<i>N</i> -結合型糖ペプチドの基礎的な合成研究	日本化学会第85回春季年会予稿集	3F2-02		2005.3
金子礼奈, 小山哲夫, 江角保明, 幡野 健, 照沼大陽, 松岡浩司	糖鎖 dendrimer の合成と酵素による糖鎖伸長反応の検討	日本化学会第85回春季年会予稿集	3F2-14		2005.3
坂本純一, 小山哲夫, 江角保明, 幡野 健, 照沼大陽, 松岡浩司	新規ノイラミニダーゼ阻害剤の合成研究 (I)	日本化学会第85回春季年会予稿集	3F2-15		2005.3

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
森 知紀, 幡野 健, 松岡浩司, 江角保明, 左 一八, 鈴木康夫, 照沼大陽	インフルエンザウイルス阻害能を指向したシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成	日本化学会第85回春季年会予稿集	3F2-16		2005.3
Watanabe M., Nishikawa K., Matsuoka K., Terunuma D., Natori Y.,	Structural Analysis of the Interactions between Gb3-Containing Linear Polymers That Neutralize Shiga Toxins and the Toxin B-Subunits				
照沼大陽 松岡浩司	糖鎖担持カルボシランデンドリマー製剤の設計技術開発に関する研究			5-6	2005.2
K.Matsuoka, A.Miyagawa, K.Nishikawa, M.Watanabe, Y.Natori, E.Kita, T.koyama K.Hatano, D.Terunuma	Synthesis and Biological Evaluation of Glycopolymer as Shiga toxin Neutralizar.	Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Reseach,		1194	2004.1
T.Mori, K.Hatano, K.Matsuoka, Y.Esumi, Eric J.Toon D.Terunuma.	Synthesis and Property of Carbosilane Dendorimers Functionalizing Peripheral Mannose Moieties.	Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Reseach.		1093	2004.1
森 知紀, 幡野 健, 松岡浩司, 江角保明, 左 一八, 鈴木康夫, 照沼大陽	シアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成	第9回ケイ素化学協会シンポジウム要旨集	P49	79	2004.1
山田明宏, 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽, 江角保明, 左 一八, 鈴木康夫, 西川喜代孝, 名取泰博	糖鎖含有カルボシランデンドリマーの合成研究 (VII)	第9回ケイ素化学協会シンポジウム要旨集	P95	125	2004.1

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小山哲夫, 山田明宏, 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽, 名取泰博, 西川喜代孝	グロボ三糖含有カルボシランデ ンドリマーライブラリの構築	第86回有機合成シ ンポジウム講演要 旨集	P-4	122-123	2004.1
松山恭子, 小山哲夫, 幡野 健, 照沼大陽, 松岡浩司	N-結合型糖ペプチドの基礎的な 合成研究	第86回有機合成シ ンポジウム講演要 旨集	P-7	128-129	2004.11
森 知紀, 幡野 健, 松岡浩司, 江角保明, 左 一八, 鈴木康夫, 照沼大陽	シアリルラクトサミン担持 カルボシランデンドリマーの合 成研究	第53回高分子学会 予稿集	53(2)	5278	2004.9
松岡浩司, 宮川 淳, 幡野 健, 照沼大陽, 西川喜代孝, 渡邊美帆, 名取泰博, 喜多英二	多価型ベロ毒素中和剤の開発	第53回高分子学会 予稿集	53(2)	5416- 5417	2004.9
幡野 健, 森 知紀, 大田和拓己, 松岡浩司, 江角保明, 照沼大陽, 左 一八, 鈴木康夫	N-アセチルラクトサミン担持 カルボシランデンドリマーの合 成	第53回高分子学会 予稿集	53(1)	1885	2004.5
森 知紀, 幡野 健, 松岡浩司, 江角保明, 照沼大陽, Eric J.Toone	マンノースおよびその二糖に よって機能化したカルボシラン デンドリマーの合成と性質	第53回高分子学会 予稿集	53(1)	1887	2004.5
山田明宏, 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽, 青木千恵, 左 一八, 鈴木康夫, 江角保明	糖鎖含有カルボシランデンドリ マーの合成研究 (VI) ーデングウイルス阻害剤の合成 と生物学的評価ー	第53回高分子学会 予稿集	53(1)	1888	2004.5