

200400192B

厚生労働省科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

糖鎖担持カルボシラン dendリマー製剤の

設計技術開発に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 照沼 大陽

平成17(2005)年 4月

分担研究者 名取 泰博  
西川 喜代孝  
平野 弘之  
松岡 浩司  
幡野 健

目 次

I. 総合研究報告

糖鎖担持カルボシラン dendリマー製剤の設計技術開発に関する研究  
照沼大陽 ..... 1

(資料) 平成16年度 J S T 委託開発申込書

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 52

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 64

## I. 総合研究報告

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

### 総合研究報告書

#### 糖鎖担持カルボシラン dendリマー製剤の設計技術開発に関する研究

主任研究者 照沼 大陽 埼玉大学 教授  
分担研究者 松岡 浩司 埼玉大学 助教授  
分担研究者 幡野 健 埼玉大学 助手  
森 知紀 医療機器センター 博士研究員

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター研究所 部長  
分担研究者 西川喜代孝 国立国際医療センター研究所 室長  
分担研究者 平野 弘之 株式会社ジーエスプラッツ 部長

#### 研究要旨

これまで、病原菌大腸菌 0157:H7 が産生するペロ毒素中和剤として構造が明確な化合物はまったく知られていない。我々は、グロボ三糖を担持したカルボシラン dendリマー化合物を考案し実際に分子設計・合成を行い、個体（マウス）に対して治療薬として有効な化合物を初めて見いだした（1998年）。本プロジェクトではペロ毒素中和剤の構造最適化、作用機構の解明、実用生産の可能性について検討し、さらに、種々の糖鎖を担持したカルボシラン dendリマーを合成してこのコンセプトの適用範囲の拡大をはかることを目的とした。

まず、グロボ三糖を担持するカルボシラン dendリマーの構造がペロ毒素中和活性に与える効果を調べるため、糖鎖担持数、dendリマーのサイズ等を変えた化合物群を系統的に設計・合成した。これら化合物の生物学的評価について検討した結果、担持するグロボ三糖数が4以上で *in vitro* 活性を示し、*in vivo* 活性を得るためには担持数6以上が必要であることが分かった。さらに、ペロ毒素に対するグロボ三糖の認識・接着機構に関して、結合サイト1, 2が強い効果を発揮するとの通説とは異なり、結合サイト3が重要な役割を果たしていることを見いだした。また、ペロ毒素に対するグロボ三糖の認識部位である先端二糖部分をカルボシラン dendリマーに導入し、その効果について評価を行った。一方、本コンセプトの適用範囲拡張を目指してインフルエンザウイルスに対して接着能を有するシアリルラクトースの合成を行った。さらに、高マンノース型模倣体としてマンノースおよび Deng 熱ウイルスに接着するラクト-N-ネオテトラオース担持カルボシラン

デンドリマーの合成・評価を行った。

さらに、これら機能性糖鎖を企業レベルで大量合成する可能性についても合わせて検討した。

これらの結果、今回我々が提案する機能性糖鎖およびカルボシランデンドリマーを用いる、構造と形状を精密に制御した薬剤開発の有効性を示すことが出来た。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素/志賀毒素やコレラ菌の産生するコレラ毒素など、ある種の細菌性腸管感染症の病原因子は糖脂質を受容体とする菌体外毒素である。これらの毒素は毒性の本体である酵素活性を担うAサブユニットと、受容体結合活性を有するBサブユニット5量体からなり、Bサブユニット5量体が標的細胞の表面にある糖脂質に結合することが毒性発揮に必須である。またBサブユニット5量体には最大15個までの糖脂質結合サイトの存在が報告され、これらのサイトのいくつかが細胞表面の糖脂質クラスターに結合することが、毒素が強く細胞に結合するために重要と考えられている。このことから、分子内に複数の糖鎖を有する化合物（クラスター構造を有する化合物）はこれらの毒素と強く結合し、標的細胞への毒素の結合を阻害する可能性が考えられ、このアイデアによりいくつかの毒素中和剤が合成され、その活性について報告された。しかし現在に至るまで、実際に薬剤として開発が進んでいる化合物はない。

腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは体

内に浸入したペロ毒素が引き起こす。従って同菌感染後でも体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発されれば、重症例や死亡例の減少が期待される。また我が国を始めとする先進国ではコレラによる死者がほとんどいないのに対して、ペロ毒素の方は平成8年の堺など我が国各地で起きた腸管出血性大腸菌感染症の集団発生を契機とし、昨年には宇都宮での集団発生で我が国最悪の死者9名が出たこともあって、国民への大きな脅威となっている。

ペロ毒素を認識する糖鎖はグロボ三糖 (Gb3) であることが知られており、グロボ三糖を集積化することによるクラスター効果を期待してポリマー担持物等が合成されその効果について検討がなされてきた。しかし、前述のごとく、これまでペロ毒素を個体中で効果的に中和できる明確な構造を有する化合物は見いだされていない。

我々はこれまで特異な構造を有し、これまでに知られていない機能を発揮することが期待されるカルボシランデンドリマーに着目し、グロボ三糖をカルボシランデンドリマーに担持してまったく新しいタイプのクラスター化合物を創製した。カルボシランデンドリマーはその構造を自由に設計で

きることから、担持する糖鎖数、分子のサイズなどを自由に構築でき、さらに担持されたすべての糖鎖を同一環境下に配置することも大きな特徴である。これらのことから対称性の高いペロ毒素Bサブユニットに対する認識・接着物質としペロ毒素中和剤の開発に有効であることが期待できると考え、実証してきた。さらに、このコンセプトは他の糖鎖（インフルエンザウイルスを認識・接着するシアリルラクトースおよ

び Deng 熱ウイルスに接着するラクトー N-ネオテトラオース）にも応用が可能と考えられることから、それらの化合物について設計・合成を計画した。

本プロジェクトが発足する以前、我々は以下の成果をあげていた。

1. グロボ三糖担持カルボシランの合成を行い、ペロ毒素中和活性について検討した（図1）。
2. グロボ三糖を担持するカルボシランデ

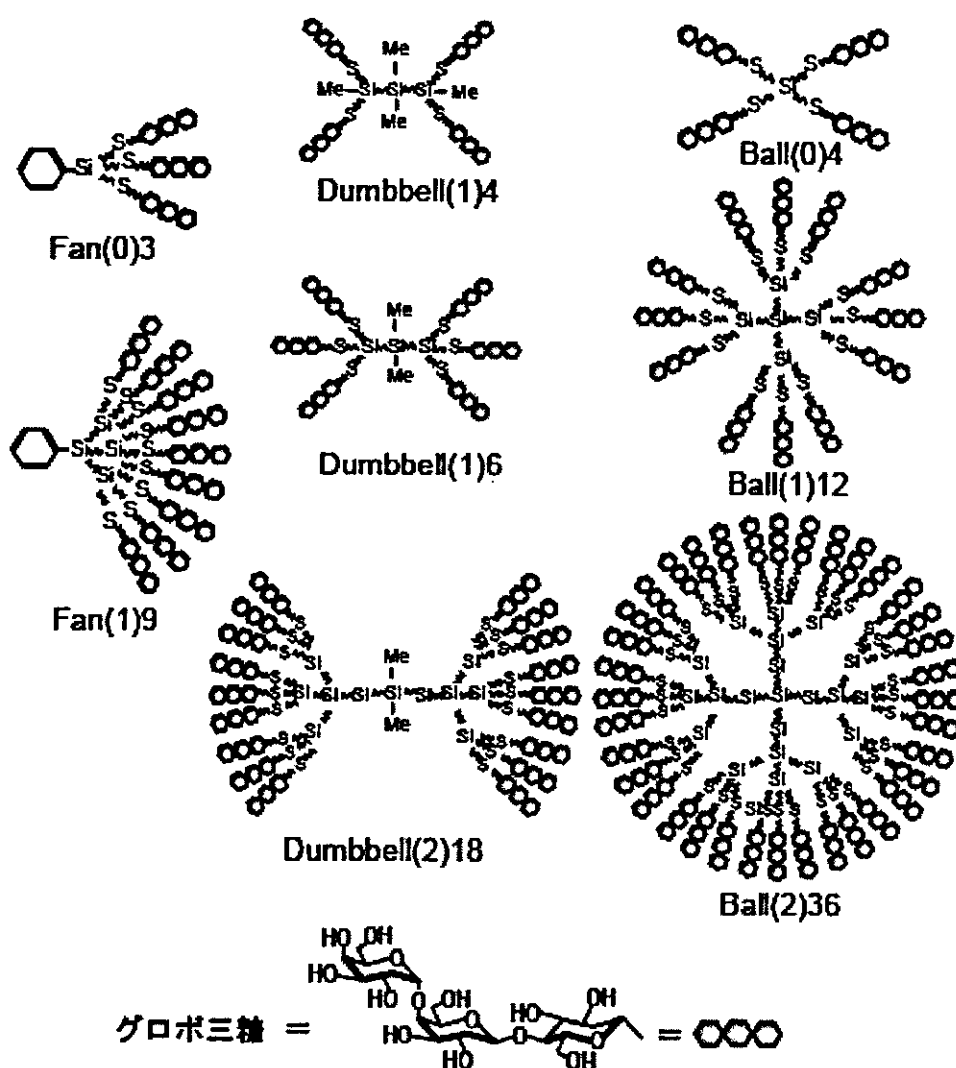


図1. グロボ三糖カルボシラン dendリマー

ンドリマーの構造と *in vitro* および *in vivo* におけるペロ毒素中和活性には強い相関がある。

3. *In vitro*の活性と *in vivo*の活性は必ずしも一致しない。
4. 我々が Dumbbell (1) 6 と呼称する化合物 (図 2) はマウスを用いた実験で、治療薬とし強い効果を発揮する (図 2)。

これらの成果をもとに、本プロジェクトの研究計画を以下のように定めた。

1. これまで *in vivo* においてもっとも生物活性が高いことが認められた Dumbbell (1) 6 をリード化合物として、ペロ毒素中和剤の最適構造について検討する。
2. Dumbbell (1) 6 を中心としてペロ毒素中和について生体内での作用機構について検討する。
3. ペロ毒素に対する治療薬として使用できる可能性について、医学的および実生産の立場からそれぞれ検討する。
4. 本コンセプトを他の糖鎖に応用し、その適用範囲を拡大する。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センター研究所における動物実験に際しては同研究所実験動物運営規定にのっとり、動物愛護に充分配慮して実験をおこなっている。また、評価を委託する各研究機関においても同様な配慮を行って実施している。

## B. 結果および考察

### B-1. グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの系統的合成・ペロ毒素中和活性および大量合成

これまで我々は、ペロ毒素のレセプターであるグロボ三糖をいくつかの基本的な骨格のカルボシランデンドリマーに導入し、ペロ毒素の生理活性評価を行ってきた。その結果、ペロ毒素中和能がカルボシランデンドリマー骨格の形状や末端グロボ三糖の数に強く関与している事が分かってきた。そこで、これまでに合成したグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの中で *in vivo* 試験でもっとも生理活性が高いことが認められた Dumbbell (1) 6 をリード化合物として、デンドリマー骨格の最適化を行う

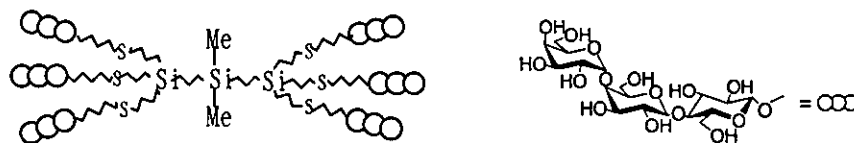


図 2. Dumbbell (1) 6

こととした。

現在では X 線構造解析によりペロ毒素構造が明らかにされており、これによるとグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーが接着する B サブユニットのサイズは 62 Å であることが分かっている。一方、*in vivo* 試験でもっとも生理活性が高いことが認められた Dumbbell (1) 6 は分子モデル計算によると全長 47 Å しかない。Dumbbell (1) 6 が B サブユニットの結合サイトに接着した状態の分子シミュレーションでは Dumbbell (1) 6 のデンドリマー骨格はほぼ完全に伸長したコンフォメーションをとっていることが示唆されている。

そこで、本プロジェクトでは標的としているペロ毒素の B サブユニットサイズにより効果的に接着するグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを探索するため、Dumbbell (1) 6 をリード化合物とした新規なカルボシランデンドリマー骨格を設計し、

系統的に合成することにした。この系統的な新規カルボシランデンドリマー骨格の開発は、主に 3つのカテゴリーに分類できる。グループ 1 はカルボシランデンドリマーの分岐数を調整し、担持糖鎖数の異なる糖鎖カルボシランデンドリマーを分子設計した。グループ 2 では、カルボシランデンドリマーの中央部の鎖長を、また、グループ 3 では分岐ケイ素から糖鎖までの鎖長を延ばした構造のカルボシランデンドリマー骨格を分子設計した。本研究では、これらのグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを実際にすべて合成し、担持糖鎖数、中央部鎖長、および末端部鎖長がペロ毒素中和活性能に与える影響について調査する事とした (図 3)。その後、得られたペロ毒素中和活性とカルボシランデンドリマーの構造の関係を解析し、グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの最適構造を分子設計する方針である。

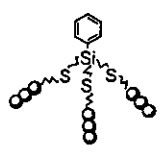
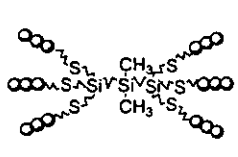
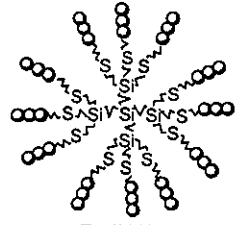
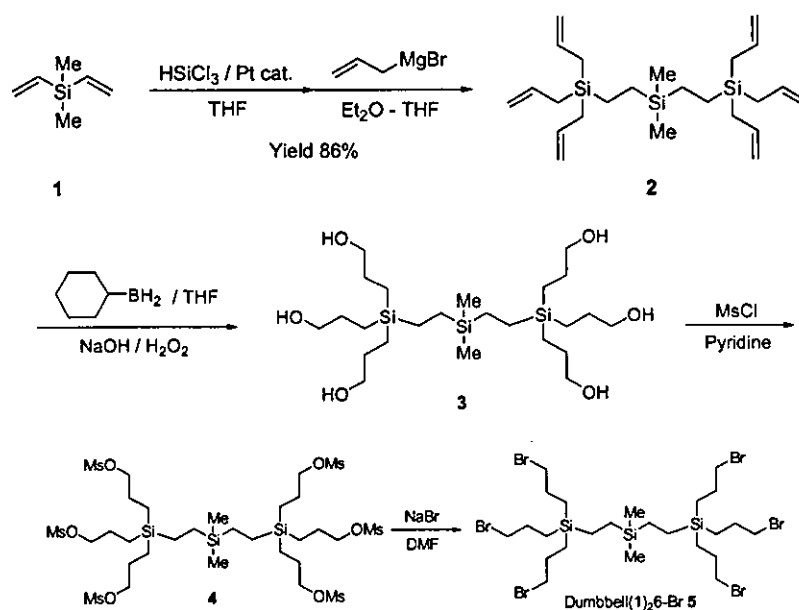
			
	Fan(0)3	Dumbbell(1)6	Ball(1)12
<i>In vitro</i> IC <sub>50</sub> (mg/mL)	>100	2.3	1.3
<i>In vivo</i>	×	◎	×

図 3. グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーのペロ毒素中和活性

B-1-1. グロブ三糖担持カルボシラン dendro-  
 ドリマーの系統的合成

新規なカルボシラン dendro-  
 合成は、すでに確立されている  
 Dumbbell (1)<sub>6</sub> 骨格の合成方法と同様に行っ  
 た。カルボシラン dendro-  
 ドリマーは分子設計  
 が比較的自由であり、合成が容易であるこ  
 とが特徴の一つである。カルボシラン dendro-  
 ドリマー骨格は、ヒドロシリル化反応とそ

れに続く Grignard 反応の繰り返して構築  
 することが可能である。従って、例えば、  
 中央部鎖長を Dumbbell (1)<sub>6</sub> より短くした  
 Dumbbell (1)<sub>2</sub>,<sub>6</sub> (2) の合成は、用いる  
 Grignard 試薬に炭素鎖長の短い物に変更す  
 るのみで、その他の反応試薬など一切変更  
 することなく容易に合成することが出来た  
 (式 1、図 4 および図 5)。



式 1. カルボシラン骨格の合成と官能基の導入



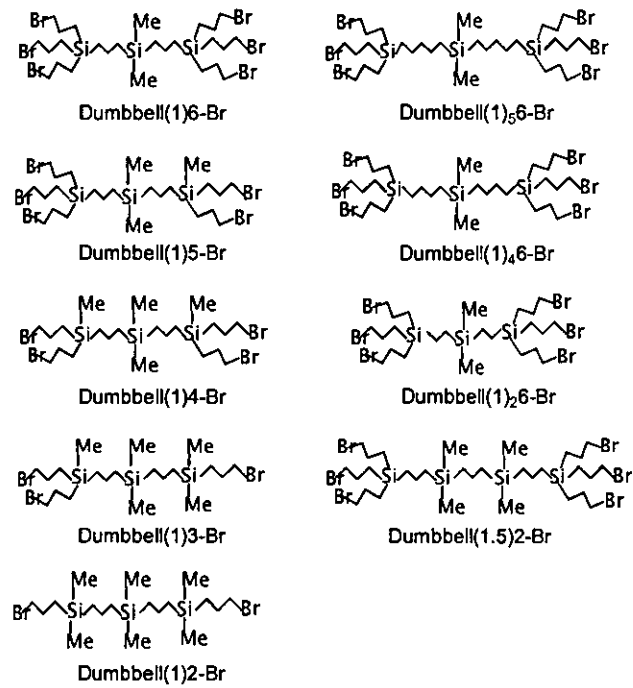


図4. 合成したカルボシラン dendritic 誘導体

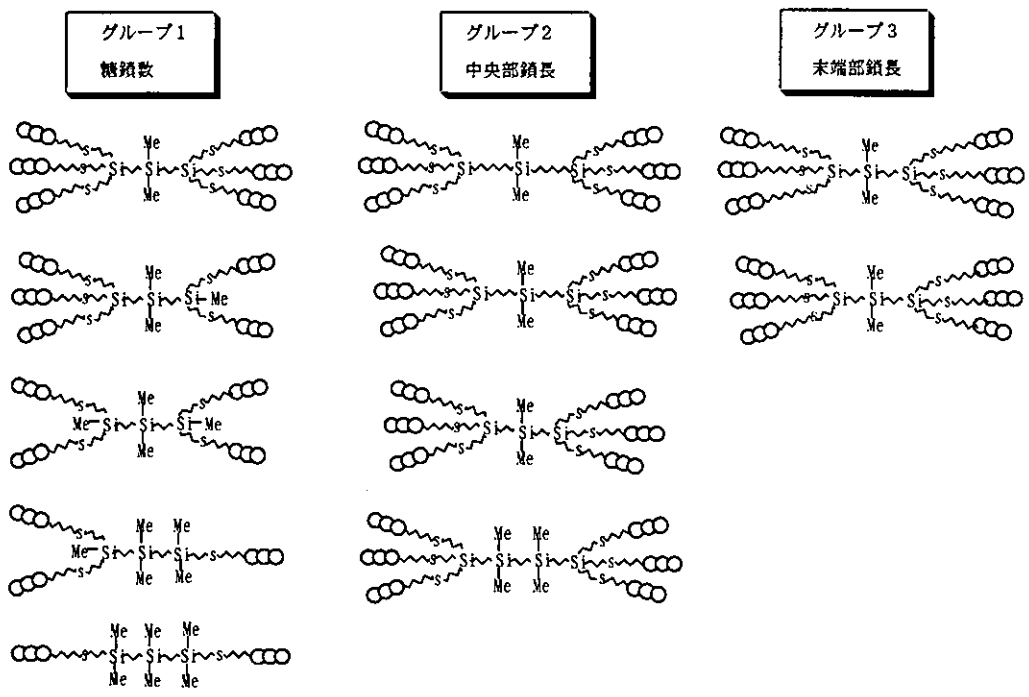
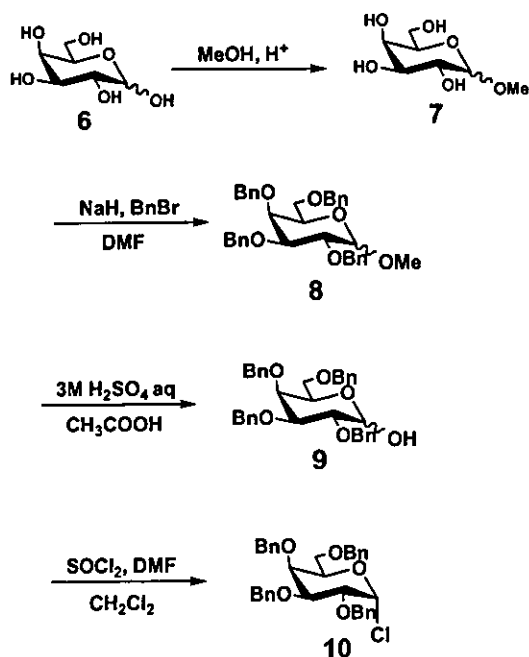


図5. Dumbbell(1)6 をリード化合物とする誘導体

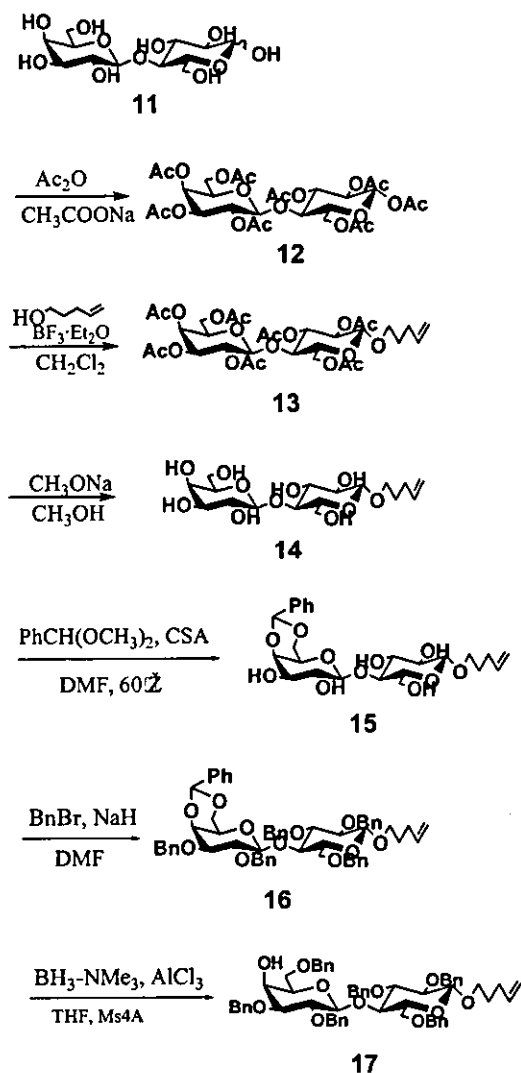
グロボ三糖の合成とカルボシランデンドリマーにグロボ三糖を導入する反応について Dumbbell(1)6 を例として概略を以下に示す。

D-ガラクトース (6) を出発原料としグリコシルドナー (10) を合成した (式 2)。この合成法に関してはすでに当研究室で確立された方法に従って行った。



式 2. グリコシルドナー (10) の合成

一方、グロボ三糖合成の受容体となるベンジル誘導体 17 の合成を行った (式 3)。この反応もこれまで当研究室でアグリコンメチレン数 4 個の誘導体の合成法に準じて行うことができた。

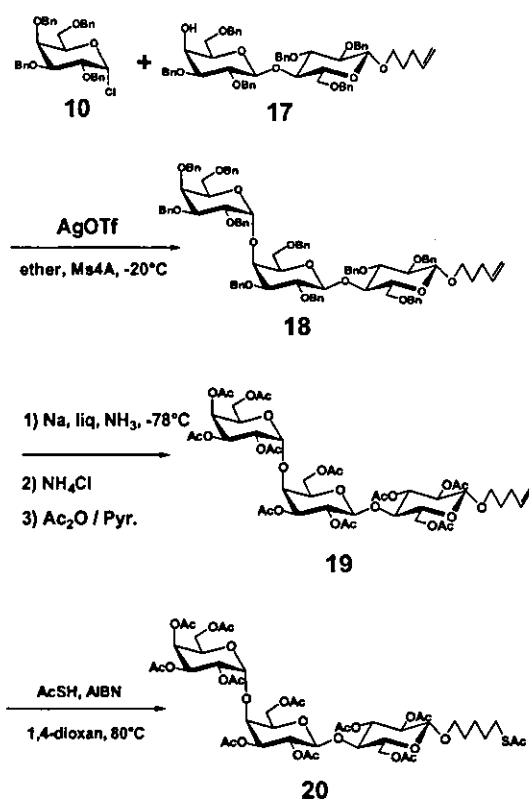


式 3. グロボ三糖受容体 17 の合成

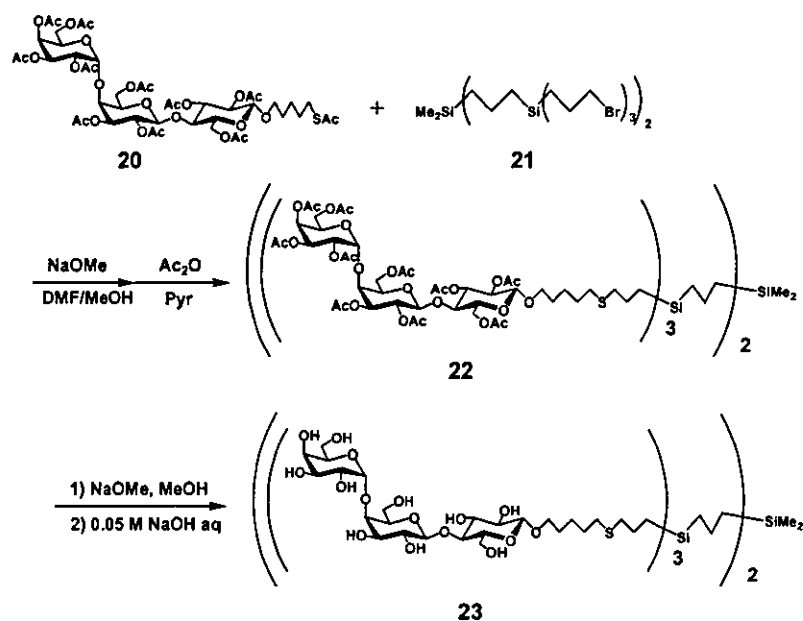
こうして得た供与体 10 を受容体 17 に作用させてアグリコンメチレン鎖数 5 個のグロボ三糖誘導体を合成し、さらにメチレン鎖末端にチオアセチル基を有する化合物 20 を合成した (式 4)。

次に、別途合成した Dumbbell (1) 6-Br (21) に化合物 20 を作用させて、目的物であるアグリコンメチレン鎖数 5 個のグロボ三糖担持カルボシランデンドリマー 23 を得ることができた (式 5)。

同様の経路により図 5 に示したすべてのグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを合成し (埼玉大学)、生物学的評価を行った (国立国際医療センター)。



式 4. グロボ三糖誘導体 20 の合成



式 5. グロボ三糖担持カルボシランデンドリマー (23) の合成

## B-1-2. 糖鎖担持カルボシランデンドリマーの生理活性評価及び病理学的解析

分担研究者 国立国際医療センター研究所  
臨床薬理研究部 名取泰博

本研究では新しいタイプの薬剤の創生を究極の目標にして、腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療薬としての糖鎖担持カルボシランデンドリマーの至適構造の同定と、その有用性に関する評価とを行った。これまで我々は、腸管出血性大腸菌の主要病原因子・ペロ毒素/志賀毒素 (Stx) の中和剤として、Stx 受容体である中性糖脂質・Gb3 の糖鎖部分を分子内に 3、6、及び 12 個有する 3 種類のデンドリマーを創製し、そのうち 6 個及び 12 個の糖鎖を有するデンドリマーが Stx に強く結合し、培養細胞に対する Stx の毒性を中和することを明らかにした。そこで本研究ではさらに多種類のデンドリマーについて調べ、培養細胞レベルにおいては 4 個の糖鎖を有するデンドリマーでも強い Stx 結合阻害活性を有すること、その活性には糖鎖間のスペーサーの長さが重要であること、マウス個体における中和活性には培養細胞レベルとは異なり Dumbbell 型の構造で 6 個以上の糖鎖が必要であることがわかった。また個体レベルで中和活性を示すデンドリマーは、マクロファージによる Stx の取込みを促進したことから、中和剤としての至適構造には、Stx と強く結合するだけでなく、マクロファージによる Stx 取込みを促進する活性が重要であることが示唆され

た。また Dumbbell 型デンドリマーが、Stx1 及び Stx2 の B サブユニット中の 3 種類の Gb3 結合サイトのうちのどのサイトを利用して Stx と結合するかについて、これらサイトの 1 つ、2 つあるいは全てのサイトの Gb3 結合活性を失わせたミュータント B サブユニットを用いて調べた結果、Stx1 及び Stx2 のどちらの場合も、Dumbbell 型デンドリマーはサイト 3 に特異的に結合することがわかった。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素/志賀毒素 (Stx) やコレラ菌の産生するコレラ毒素など、ある種の細菌性腸管感染症の病原因子は糖脂質を受容体とする菌体外毒素である。これらの毒素は毒性の本体である酵素活性を担う A サブユニットと、受容体結合活性を有する B サブユニット 5 量体からなり、B サブユニット 5 量体が標的細胞の表面にある糖脂質に結合することが毒性発揮に必須である。また B サブユニット 5 量体には最大 15 個までの糖脂質結合サイトの存在が報告され、これらのサイトが細胞表面の糖脂質クラスターに結合することが、毒素が強く細胞に結合するのに重要と考えられている。このことから、分子内に複数の受容体糖鎖を有する化合物はこれらの毒素と強く結合し、標的細胞への毒素の結合を阻害する可能性が考えられ、このアイデアによりいくつかの毒素中和剤が合成された。しかし現在に至るまで、実際に薬剤として開発が進んでいる化合物はな

い。

腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは体内に侵入した Stx が引き起こす。従って同菌感染後でも体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発されれば、重症例や死亡例の減少が期待される。また我が国を始めとする先進国ではコレラによる死者がほとんどいないのに対して、Stx の方は平成 8 年の堺など我が国各地で起きた腸管出血性大腸菌感染症の集団発生を契機として、国民への大きな脅威となっている。従って糖脂質を受容体とする菌体外毒素を標的として治療薬の開発を行うには、Stx が最もふさわしいと考えられる。

このような背景からこれまで我々は、共同研究者の照沼、松岡らとともに、Stx 受容体である中性糖脂質 Gb3 (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$  $\rightarrow$ ceramide) の糖鎖(グロボ 3 糖)を分子内に含有するカルボシラン dendriマーの Stx 中和剤としての有効性を検討してきた。グロボ 3 糖の糖鎖を各々 3、6、12 個結合させた計 3 種類の dendriマー (Super Twig と命名)の活性を調べたところ、糖鎖 6 及び 12 個の化合物が Stx に対して強い結合性を示し、培養細胞に対して毒性中和活性を示すことを発見した。さらにこのうち、糖鎖を 6 個有する化合物、Dumbbell (1)6 (括弧内の数字は世代数=分枝点の数を表す)はマウスに対する Stx の致死活性を完全に抑制した。また Super Twig 投与で死を免れたマウスでは毒素の脳への沈着が減少し、脳の病理学的

な所見が抑制されていたことから、ヒトの腸管出血性大腸菌感染症では脳症が死因となることが多いことを考え合わせると、Super Twig が臨床的にも有望であると期待されている。

これらの知見に踏まえて本研究では、新しいタイプの薬剤としての dendriマー化合物の有用性とその作用機序を明らかにすることを旨とした。具体的には、様々な種類の dendriマー化合物の細胞及び個体レベルにおける Stx の中和活性を測定することにより至適構造を同定し、またその活性発現において dendriマー化合物が Stx とどのように結合するかを調べた。

## B. 研究方法

世代数が 0 から 2、糖鎖の数が 3 から 36 までの以下の dendriマー、Fan (0) 3, Ball (0) 4, Dumbbell (1) 4, Dumbbell (1) 6, Fan (1) 9, Ball (1) 12, Dumbbell (2) 18, Ball (2) 36 の計 8 種類の、培養ペロ細胞への Stx の結合に対する阻害活性、ペロ細胞及びマウス個体への Stx の毒性に対する中和活性について調べた。結合阻害活性は、<sup>125</sup>I 標識 Stx を細胞と 4℃にて 30 分間インキュベーションさせる際に上記 dendriマーを種々の濃度で共存させ、細胞に結合した <sup>125</sup>I の放射活性を測定することにより調べた。またマクロファージによる Stx の取込み、分解への作用は <sup>125</sup>I 標識した Stx を用いて行った。

Stx との結合実験には、糖鎖担持カルボシラン dendriマー化合物として活性が最

も強かった Dumbbell (2) 18 を用い、ヒスチジンタグを付加した種々の Stx B サブユニット変異体に対する結合を調べた。

### C. 研究結果

世代数ゼロで糖鎖を4個有する化合物 Ball (0) 4 は  $ID_{50}$  が 10  $\mu\text{g/ml}$  以上と結合阻害活性が弱く、以前に報告した Fan (0) 3 とほぼ同程度の活性しか示さなかった。一方、世代数1の化合物は Dumbbell (1) 4 から Ball (1) 12 まで  $ID_{50}$  が 0.1 - 1  $\mu\text{g/ml}$  とほぼ同程度であり、同じカルボシランデンドリマー骨格を有するこれら世代数1の化合物は、糖鎖の数にかかわらず、ほぼ同じ阻害活性を示すことがわかった。この結果から、*in vitro*における Stx の結合阻害には、デンドリマー内の糖鎖の数が4個で十分であることが明らかになった。また Ball (0) 4 に比べて、Dumbbell (1) 4 が強い結合阻害活性を示したことから、この活性は糖鎖の数のみでは規定されず、糖鎖間の距離も重要であることがわかった。さらに世代数2の化合物、Dumbbell (2) 18 及び Ball (2) 36 はいずれも Ball (1) 12 とほぼ同じ結合阻害活性を示したことから、4個以上に糖鎖の数を増加させてもその阻害活性はあまり強くないことがわかった。以上の結果から、Stx の標的細胞への結合を阻害する活性を指標にした場合、Dumbbell (1) 4 の化合物が、活性を示す最も単純な構造であることが明らかとなった。

培養ペロ細胞への Stx の毒性に対する中和活性は、上記の結合阻害活性の結果とほ

ぼ一致した。すなわち、世代数ゼロで糖鎖を4個有する化合物 Ball (0) 4 は Stx の細胞毒性に対する中和活性を全く示さず、世代数1の化合物は Dumbbell (1) 4 から Ball (1) 12 まで、Stx1 及び Stx2 の細胞毒性に対する  $IC_{50}$  は 0.1 - 0.5  $\mu\text{g/ml}$  とほぼ同程度であった。一方、世代数2の化合物、Dumbbell (2) 18 及び Ball (2) 36 を比較したところ、前者は Stx1 及び Stx2 のいずれに対しても前述の世代数1の化合物とほぼ同程度の中和活性を示したのに対し、後者は2桁以上弱い活性を示した。このことから、糖鎖数が多い Ball 型の化合物は結合阻害活性は強いが、中和活性はかえって低くなることが示唆された。

次に世代数1及び2の化合物について、マウス個体への Stx の毒性に対する効果を調べた。その結果、Dumbbell (2) 18 は以前報告した Dumbbell (1) 6 と同じく、Stx の毒性を完全に中和することがわかった。これに対して Dumbbell (1) 4 は弱い活性を示し、Fan (1) 9 及び Ball (2) 36 は全く中和活性を示さなかった。この結果は、以前に報告したように、Ball (1) 12 が細胞レベルでは強い中和活性を示すのに個体レベルでは非常に弱い活性しか示さなかったこととよく一致し、個体での中和活性には Ball 型や Fan 型の構造より Dumbbell 型の方が適することが明らかとなった。また Dumbbell 型の化合物について、細胞レベルでは糖鎖が4個で十分に強い活性を示したが、個体レベルでは活性が弱かったことから、個体における中和には糖鎖が6個以上必要と考えられ

た。

これまで報告したように、個体における Super Twig の Stx 中和能には、マクロファージによる Stx の取込み、分解に対する促進活性が重要であり、個体レベルで中和活性のある Dumbbell (1) 6 は、個体中和活性の弱い Ball (1) 12 と比べて、マクロファージの Stx 取込みに対する促進活性が強いことがわかっている。そこで、マクロファージによる Stx 取込みに対する上記 Super Twig の影響を調べた。その結果、個体レベルで中和活性を示した Dumbbell (2) 18 は Dumbbell (1) 6 と同等の取込み促進活性があるのに対して、Dumbbell (1) 4、Fan (1) 9、Ball (2) 36 は取込み促進活性が弱いことがわかった。これらの結果から、以前の結果からも推測されたように、個体レベルでの Stx 中和活性能にはマクロファージによる Stx 取込み促進活性が重要であることが示唆された。

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、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、3 カ所の糖鎖結合サイトのうち、1 つ、2 つあるいは全てのサイトの Gb3 結

合活性を失わせた Stx1 及び Stx2 のミュータント B サブユニットを調製し、Stx における結合部位の同定を試みた。

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 変異体のうち、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かった。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、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 dend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り、特に、臨床的に重要な Stx2 の場合には、 dendリマー上の糖鎖はサイト3特異的に結合することがわかった。

#### D. 考察

これまで報告したように、我々が開発した Super Twig は Stx への強い結合活性を有し、さらに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する。すなわち、グロボ3糖を6個有する Dumbbell (I) 6 は培養細胞及びマウスに対する Stx の毒性を強力に阻害する。さらにこの Dumbbell (I) 6 は体内においてマクロファージによる Stx の代謝を促進して無毒化するという、抗体による毒素中和の機構に類似した活性を示した。従って Super Twig は、これまでにない全く新しいタイプの腸管出血性大腸菌感染症の治療薬として有望と考えられる。

Stx の糖鎖結合活性を担う B サブユニットは5量体構造を有し、また B サブユニットモノマーには3種類の糖鎖結合サイトが

あることから、この5量体構造中には計15個存在することが報告されている。従って、Stx と標的細胞表面の Gb3、あるいは Stx と Super Twig のようなグロボ3糖の糖鎖クラスターを分子内に有する化合物との十分に強い結合には、各々最大15個のサイトによって結合する可能性が考えられる。本研究の結果から示されたように、細胞レベルにおける活性には Super Twig の分子内の糖鎖数が4個で十分であることから、これらのサイトの一部に結合することで結合阻害や毒性中和の活性を示すことがわかった。一方、個体レベルにおいては、Dumbbell (I) 4 の中和活性は弱く、またマクロファージによる Stx 取込み促進活性も弱いことから、個体レベルで中和剤として作用させるには糖鎖数が4つでは不足であり、6個以上の糖鎖の存在が重要であることが明らかとなった。また個体レベルでは Dumbbell 型であることが重要であり、それはマクロファージによる Stx 取込み促進に必要であるためと考えられた。

上述のように、Super Twig のが Stx 中和活性を示すには、Stx B サブユニット中の糖鎖結合サイトの全てに結合する必要はなく、その一部にのみ結合することにより、Stx の Gb3 糖鎖への結合を阻害する。そこで次に本研究では、糖鎖担持カルボシラン dend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。他の Stx 中和剤に関する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い。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い。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。

また細菌毒素の中にはコレラ毒素や大腸菌易熱性毒素など、Stx と同じく B サブユニットがペンタマー構造を有し、糖脂質糖鎖を受容体とするものがある。従って、これらの毒素と受容体糖脂質との結合様式は類似していることが想像される。本研究で用いた Gb3 糖鎖の代わりに例えばコレラ毒

素の受容体である GM1 糖鎖を結合させた化合物はコレラ毒素の中和剤として有効であることが十分に考えられる。また本研究は、糖鎖に結合するウイルスにも応用できる可能性があり、さらには糖鎖の代わりにペプチドのクラスターを含有するデンドリマーは、例えば3量体構造を有する腫瘍壊死因子など、多量体構造の生体内タンパク質に強く結合する可能性もあり、その応用範囲の広がりが期待される。

## E. 結論

Stx 中和剤としてのカルボシランデンドリマー化合物の構造活性相関を調べた結果、細胞レベルでは形状はいずれの型でもよく、世代数が1、グロボ3糖の糖鎖数が4個が十分条件であるが、個体レベルにおいては Dumbbell 型の基本骨格を有し、グロボ3糖の糖鎖数が6個以上必要であることがわかった。また個体レベルでの中和活性には、マクロファージによる Stx 取込み促進活性が重要であることを示唆した。カルボシランデンドリマーのグロボ3糖は、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とがわかった。本研究から新しい創薬の手法が開拓され、クラスター構造が重要な様々な毒素やウイルスが関与する疾患に対しても有効な対応策が開発されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara : A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:7669-7674, 2002.

2. M. Watanabe, K. Matsuoka, E. Kita, K. Igai, N. Higashi, A. Miyagawa, T. Watanabe, R. Yanoshita, Y. Samejima, D. Terunuma, Y. Natori, K. Nishikawa: Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. J Infect Dis 189:360-368, 2004.

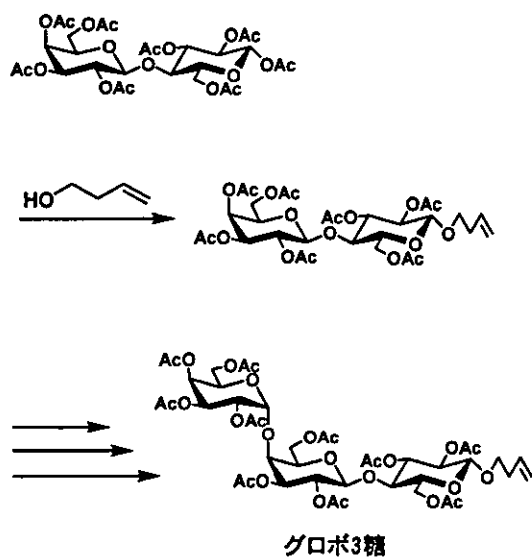
3. K. Nishikawa, K. Matsuoka, M. Watanabe, K. Igai, K. Hino, D. Terunuma, H. Kuzuhara, Y. Natori: Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. J Infect Dis in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

### B-1-3. グロボ三糖大量合成法の開発

本研究室でこれまで確立したグロボ三糖の合成経路は、ラクトース受容体の合成初期段階にブテニルアルコールやペンテニルアルコール等のアルコールを用いて、末端2重結合をもつアグリコンを導入したのち、三糖を合成するという経路で行っている(式6)。



式6. 現在の合成方法

しかし、この合成経路は大量合成を目的とする場合以下の難点がある。

1. 初期段階に非常に高価なアルコールを多量に用いる
2. 化合物の結晶性が悪く、ほぼすべての段階においてカラムクロマトグラフィーによる精製が必要となる。

3. アグリコンに2重結合を含むため、ベンジル保護基を除去する際 Birch 還元を用いている。

ここでは上記難点を解決するため新たな合成経路の確立に向けて検討を行った。もっとも改善が必要とされる点は、カラムクロマトグラフィーによる精製を可能な限り少なくすること、および脱ベンジル反応において Birch 還元に代えて水素添加反応を使用できるようにする点にある。

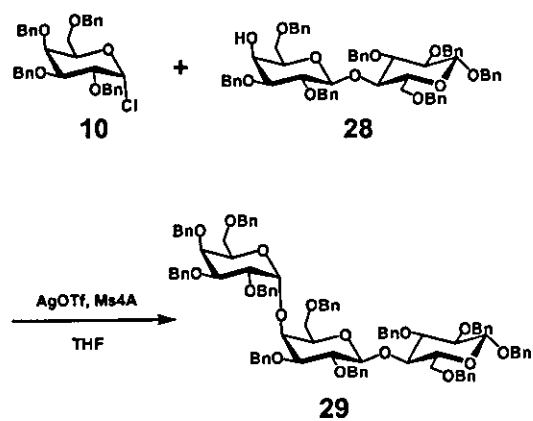
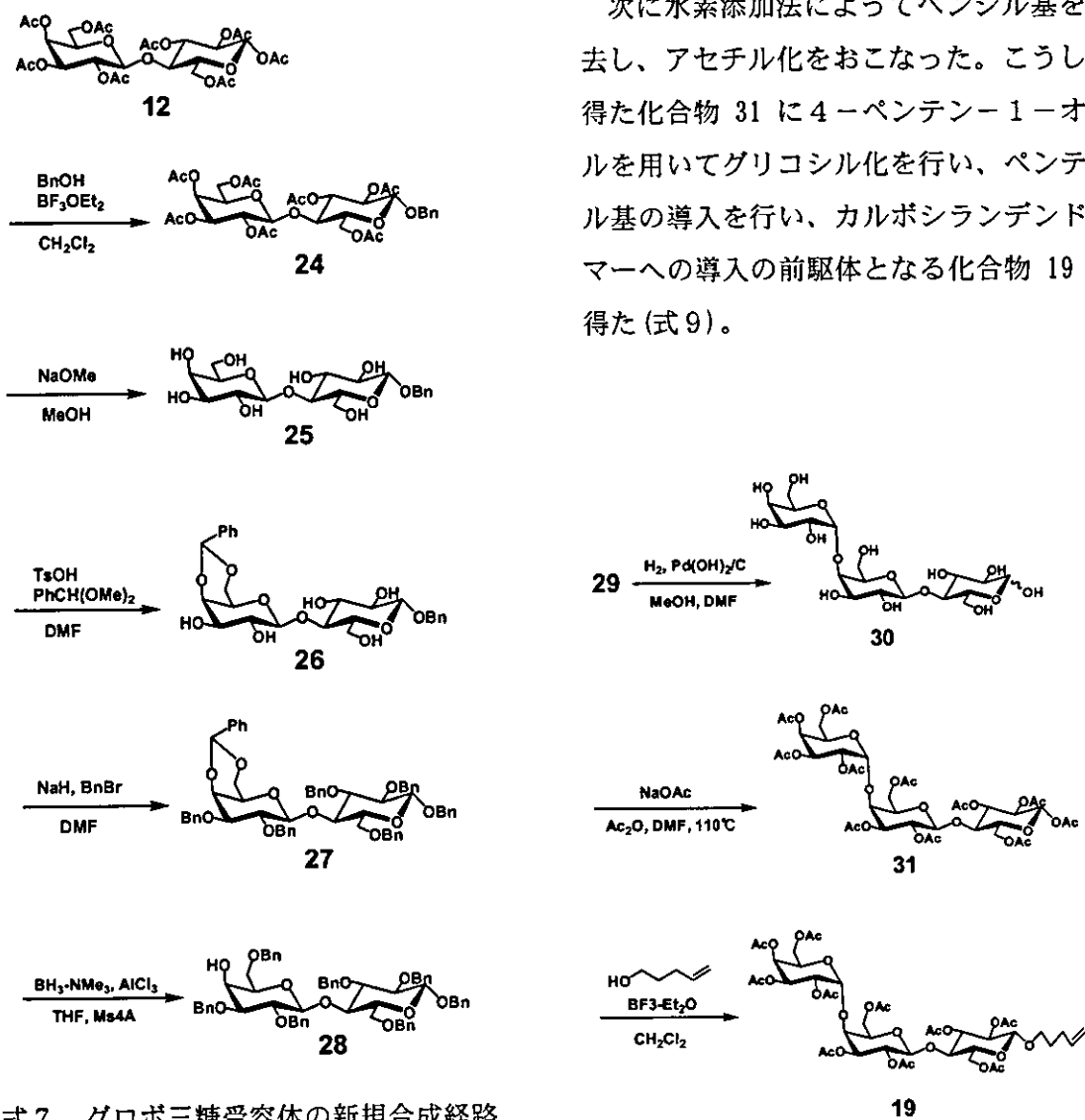
これらの問題を解決するため、結晶性の高い誘導体を与えることが期待されるベンジル基を保護基として用い、オレフィンを含むアグリコン部分を合成の最終段階で導入することとした。

以下、具体的な反応経路について述べる。

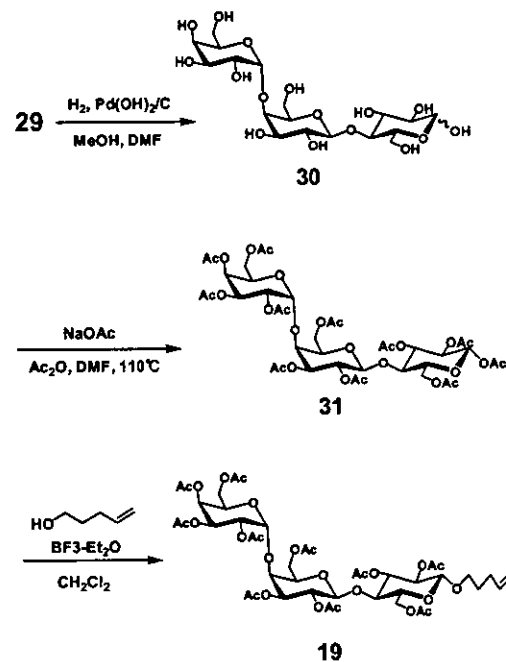
まず、12 を出発物質としてアノマー位水酸基をベンジル基で保護し化合物 27 を得た。ついで、4' 位に無保護な水酸基を残し他のすべての水酸基をベンジル基で保護した化合物 28 を得た (式7)。

以上の結果、ここまでの段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを使わず、すべて再結晶で精製する経路を確立した。12 から5ステップでの収率は18.1%であった。

次に別途合成した10と受容体28を用いてグリコシド化反応を行った。ここではシリカゲルクロマトグラフィーで精製を行いベンジル保護体29を得た(式8)。



次に水素添加法によってベンジル基を除去し、アセチル化をおこなった。こうして得た化合物 31 に 4-ペンテン-1-オールを用いてグリコシル化を行い、ペンテニル基の導入を行い、カルボシランデンドリマーへの導入の前駆体となる化合物 19 を得た (式 9)。



以上の結果、受容体の合成において精製はすべて再結晶化で行え、これにより、旧経路に比べ、容易に受容体を合成できるようになった。また、Birch 還元にて代えて水素添加反応を利用することが可能となり、大量合成の反応経路を確立することができた。