

201131037A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリン  
グに即応した実践的集団感染制圧システムの構築

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 美帆

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリン  
グに即応した実践的集団感染制圧システムの構築

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 美帆

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告		
腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリングに即応した実践的集団感染制圧システムの構築		
高橋 美帆 (同志社大学)	-----	3
II. 分担研究報告		
1. 臨床および環境分離STEC株の分離同定に関する研究		
山崎 伸二 (大阪府立大学)	-----	10
2. Stxによる細胞死誘導機構と細胞死制御分子の開発		
内藤 幹彦 (国立医薬品食品衛生研究所)	-----	13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
（総括）研究報告書

腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリングに即応  
した実践的集団感染制圧システムの構築

研究代表者 高橋 美帆 同志社大学生命医科学部医生命システム学科 助教

研究要旨

腸管出血性大腸菌感染症（STEC 感染症）の主な病原因子である Shiga toxin (Stx)は AB5 型の毒素で、Stx1 と Stx2 のファミリーからなり、それぞれが複数のバリエーションをもつ。我々はこれまでに Stx の細胞内輸送を阻害することで Stx の毒性を抑制する新規ペプチド性 Stx 阻害薬を開発し、Stx の細胞内輸送制御が本感染症治療に直結するという全く新しい概念を見出した。本研究では本概念に立脚し、1) 家畜牛、流通食品、臨床現場から STEC 株を単離し、産生されるすべての Stx ファミリーならびにバリエーションを同定すること、2) 各 Stx の細胞内輸送を阻害し、Stx の毒性を抑制する一連のペプチド性 Stx 阻害薬を同定すること、3)得られたペプチド性阻害薬の阻害メカニズムの解明を行うこと、さらに 4) 各 STEC 株の産生毒素プロファイリングに応じ、最も有効な阻害薬の組み合わせを同定し、感染実験における効果を評価すること、を目的とした。本年度は、1)市販牛肉、患者から STEC を単離し、その STEC 血清型、Stx 遺伝子、Stx バリエーションの同定を行い、1)で蓄積された情報をもとに、2) 独自に開発した多価型ペプチドライブラリー法ならびに新たに確立した多価型ペプチドシート合成技術を併用し、Stx2 バリエーションに対する阻害ペプチドモチーフの開発を行った。また 3) Stx 阻害ペプチドの阻害メカニズムの解析を行った。その結果、1) 市販牛肉、臨床検体から新たに 10 株の STEC 分離株が得られた。また stx2 バリエーションの stx2d、stx2e、stx20188 が実際に分離された。2)最終的に、Stx2d に強く結合し、Stx2 よりも Stx2d に対して高い阻害活性を有する多価ペプチドを 2 種類同定することに成功した。3)THP1 細胞を用いて Stx のアポトーシス誘導機構に対する阻害ペプチドの効果を検討したところ、Stx2 阻害ペプチドの PPP-tet、MMA-tet は Stx によるアポトーシス誘導に関わる分子の活性化を阻害しないこと、つまり全く新たな阻害機構を有している可能性があることが示された。現在、マウスを用いた各種臨床分離 STEC 感染実験を開始しており、Stx 阻害ペプチドの活性評価を随時行う予定である。本研究により、各 STEC 株の産生毒素

に対応して阻害ペプチドを組み合わせることで最適化された新規治療法を確立することができる」と期待される。

#### 分担研究者

山崎伸二 大阪府立大学大学院  
生命環境科学研究科 教授  
内藤幹彦 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部 教授  
研究協力者  
日根野谷淳 大阪府立大学大学院  
生命環境科学研究科 助教

#### A. 研究目的

大腸菌 O157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌(STEC)による感染は、下痢や出血性大腸炎ばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS)や脳症等、重篤な合併症を併発する。Shiga toxin (Stx)は STEC が産生する主要な病原因子であり、血中に侵入した Stx が腎臓や脳などの標的臓器を障害し、上記合併症を引き起こす。Stx は AB5 型の毒素で、Stx1、Stx2 の 2 つのファミリーから構成される。Stx にはさまざまなバリエーションが存在しており、臨床分離株によっては、複数の異なったタイプの Stx を産生し、このことが症状の重篤化に関係していることが明らかになりつつあるが、その詳細については不明である。Stx は標的細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3(gal-gal-glc-ceramide)に結合し、そ

の B サブユニット 5 量体は Gb3 のグロボ 3 糖部を特異的に認識する。B サブユニット 1 分子には 3 種類のグロボ 3 糖結合部位 (サイト 1-3) が存在し、5 量体では最大 15 分子のグロボ 3 糖が結合し、結合親和性を著しく亢進させている。この現象をクラスター効果という。我々はこれまでに、それ自体がクラスター効果を発揮する多価型ペプチドライブラリー法を独自に開発し、本法を用いて Stx2 の毒性を抑制する新規ペプチド性阻害薬 (PPP-tet) を同定した (PCT/JP2005/012286、K.Nishikawa et.al., FASEBJ.,2006)。興味深いことに、PPP-tet は、Stx2 の標的細胞への結合を阻害せず、その細胞内輸送、特にゴルジ体から小胞体への逆行輸送を特異的に阻害する。マウスの O157:H7 感染実験では PPP-tet は Stx によるマウスの致死性を著しく抑制した。本研究では Stx の細胞内輸送の制御が本感染症治療に直結するという全く新しい概念に立脚し 1)近畿地方の食肉牛、食品、臨床現場、それぞれから STEC 株を分離し、STEC 血清型、Stx 遺伝子、Stx バリエーションを同定すること、2) 1)で得られた情報をもとに、多価型ペプチドライブラリー法と、

新たに確立した多価型ペプチドシート合成技術(特願 2010-019731)を併用し、各 Stx バリエーションに対する特異的阻害ペプチドモチーフを開発すること、3)さらに同定された Stx 阻害ペプチドの Stx 毒性阻害機構の解析を行うことを目的とする。従来の技術では Stx の阻害薬開発自体が非常に困難であったため、本研究により新規治療法の確立が可能になると期待される。

## B. 研究方法

### 1) 臨床および環境分離 STEC 株の分離同定

小児下痢症患者便検体からの STEC の分離は SMAC を用いて培養後、食肉検体は、TSB または mEC で増菌培養後、PCR 法で *stx* 遺伝子の有無を確認した。*Stx* 遺伝子のスクリーニングは、*stx1/stx2* を検出できる共通プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法で行った。PCR で陽性となった検体は、<sup>32</sup>P で標識した *stx1/stx2* 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法で *stx* 陽性菌を分離した。分離菌が大腸菌であることを生化学的性状試験で確認した。血清型は 173 種類の O 抗血清と 53 種類の H 抗血清を用いて決定した。

### 2) 各 Stx バリエーション特異的制御分子の開発—多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用した Stx2 バリエーション特異的なペプチド性阻害薬の同定—

Stx2dB サブユニット上の受容体結合部位であるサイト 1 に対する阻害ペプチドを同定するため、ヒスチジンタグサイト 1 変異体 N16A(N16ABH)と、ヒスチジンタグ Stx2dB サブユニット(2dBH)を用いて多価型ペプチドライブラリースクリーニングを行った。

Intavis 社のペプチド合成機 ResPepSLD を用い、専用セルロースシート上に 56 個の多価既知配列ペプチドをスポット合成した。125I 標識した Stx2B サブユニット(2BH)と 2dBH を用いて、シート上の既知配列ペプチドとの結合活性を検討した。4 価 Stx 阻害ペプチドを合成し、ベロ細胞を用いて Stx 細胞障害活性阻害効果を検討した。マウスの STEC 感染実験は、5 週齢の雄 BALB/C と、STECO157V17 株 (Stx1/Stx2) を用いて行った。

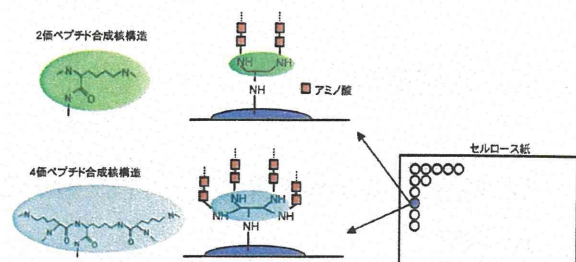


図1 多価型ペプチドシート合成技術

### 3) Stx阻害ペプチドのStx毒性阻害機構の解析—Stxによる細胞死誘導機構と細胞死制御分子の開発—

THP1細胞をStxで処理し、細胞の形態観察及び色素排除法等で24時間以内に細胞死を起こす細胞株を探索した。Stx処理細胞のCell Lysateを調製し、各種タンパク質の発現及びカスペーゼ活性化等をウェスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究代表者ならびに研究分担者の所属する大学・研究所における組換えDNA実験に際しては、各大学・研究所の組換えDNA実験安全管理委員会規定にのっとり、安全に十分配慮して実験を行う。研究代表者が行うStx1, 各種Stx2変異体の調製については、遺伝子組換え生物などの第二種使用などをする間に執る拡散防止措置の確認を行い、文部科学大臣確認の上、実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) 臨床および環境分離STEC株の分離同定

小児下痢症患者便検体から分離し

たEHEC3株のうち、1株は0111 (Stx1/Stx2陽性)、2株は0103 (Stx1陽性)であった。牛肉17検体(赤身6、ミンチ3、内蔵肉8検体)から7株のSTECを分離した。2株はOUT (1株は型別できないStx1とStx2-0118陽性、1株はStx1陽性)、1株は08 (Stx2e陽性)、3株は066 (型別できないStx1とStx2-0118陽性、2株はStx2陽性)、1株は088 (Stx1, Stx2, Stx2vhb陽性)であった。

### 2) 各Stxバリエーション特異的制御分子の開発

—多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用したStx2バリエーション特異的なペプチド性阻害薬の同定—

Stx2dB上のサイト1結合部位特異的阻害ペプチドを同定するために、サイト1変異体N16ABHとのサブトラクションによる多価型ペプチドライブラリースクリーニングを行った。ライブラリーは(MA-XXXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXXRXXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXRXXRXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXXRRRR-AU)<sub>4</sub>-3Lysをそれぞれ用いた(U=アミノヘキサ酸、XはCysを除く19種類のアミノ酸を示す)。その結果、いずれのライブラリーを用いた場合でも、Xの各ポジショ

ンには塩基性アミノ酸 (Arg または His) が強く選択されることがわかった。次に、多価型ペプチドシート合成技術を用い、計 56 個の既知配列多価ペプチドに対する  $^{125}\text{I}$  標識 2dBH、N16A、2BH の結合活性を検討した。その結果、2dBH に対し強い結合活性をもち、かつ 2BH、N16A と比較し結合特異性が高い多価ペプチドモチーフを 8 種類同定した (配列出願準備中)。次に、得られた 8 種類の多価ペプチドモチーフについて、Stx2、Stx2d のベロ細胞障害活性に対する阻害効果をそれぞれ検討したところ、4 種類のペプチドモチーフは、Stx2d 存在下ベロ細胞生存率が 80% 以上上昇した。とくに 2 種類のペプチドモチーフについては、Stx2 よりも Stx2d に対して強い阻害活性を示すことが明らかとなった(図 2)。次に、個体レベルでの阻害ペプチドの効果を検討するために、マウス O157 感染実験系の確立を行った。マウスに O157V17 株を投与後、マイトマイシン C 投与したところ、10 日以内に 50% 以上のマウスが死亡した。現在、阻害ペプチド投与に向けて準備中である。

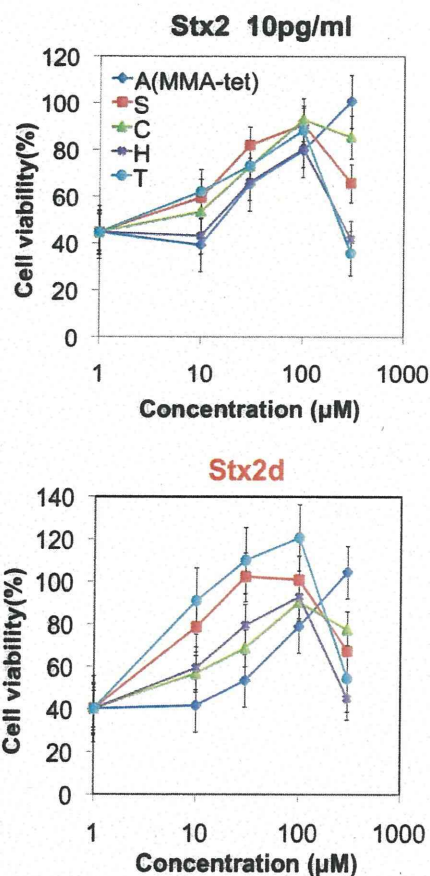


図 2 多価ペプチドの Stx 細胞障害活性阻害効果

### 3) Stx 阻害ペプチドの Stx 毒性阻害機構の解析—Stx による細胞死誘導機構と細胞死制御分子の開発—

THP1 細胞を用いて Stx1、Stx2 による細胞死誘導の影響を検討した。その結果、Stx1、Stx2 いずれも低濃度 (5pg/ml) で 6 時間以内に THP1 細胞に細胞死を誘導すること、このときカスパーゼ 3 の活性化と PARP の切断がおこることがわかった。また、



Stx1, Stx2 処理により細胞死阻害タンパク質の FLIP が速やかに消失すること、プロテアソーム阻害剤の MG132 により FLIP の消失および THP1 細胞のアポトーシスは強く阻害されることがわかった。次に、これまでに我々が開発したペプチド性 Stx2 阻害剤 PPP-tet, Stx1/Stx2 阻害剤 MMA-tet の Stx による THP-1 アポトーシス誘導に対する効果を検討した。その結果、Stx による THP1 細胞のアポトーシスは MMA-tet, PPP-tet によって阻害されなかった。

#### D. 考察

前年度からの結果を含め、家畜牛糞便、市販牛肉、臨床から得られた STEC 株は、そのほとんどが stx1, stx2 両陽性株または stx2 単独陽性株であった。また今回、食肉から型別できない sxt1 遺伝子を持った STEC や stx2-0118 という珍しい stx2 バリエント遺伝子が見つかった。今後これらの情報をもとに随時バリエントに対する阻害ペプチドの同定を試みる予定である。

2)では、多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用し、Stx2d B サブユニットの受容体結合サイト特異的なモチーフ解析を行った。Stx2dB サブユニットは Stx2B サブユニットと比べて 2 アミノ酸異なるにすぎない。それにもか

かわらず、Stx2 と Stx2d では一連のペプチドモチーフに対し、異なった結合活性を示すことが明らかとなった。すなわち、Stx2dB に強く結合し、かつ Stx2 よりも Stx2d に対し高い阻害活性を有するペプチドモチーフを同定することができた。このことは、本法を用いてバリエント間の微細な構造の相違を認識する特異性の高い阻害ペプチドを取得することが可能であることを示している。

また最近、これまでに同定された Stx2 阻害ペプチド PPP-tet が、サルにおいても Stx2 の致死毒性を顕著に抑制することが証明された (Steams-Kurosawa D.J, et., *Pediatr. Nephrol.*, 2011)。今後、PPP-tet を含め、その他の Stx 阻害ペプチドの臨床応用が期待される。

#### E. 結論

市販牛肉、臨床から STEC 株を新たに計 10 株単離した。分離された STEC 株から stx2 バリエントである stx2d, stx2e, stx2-O188 が実際に分離された。

多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術の併用により、バリエント Stx2d に対する阻害ペプチドを最終的に 2 種類同定した。

Stx 阻害ペプチドの Stx 阻害作用は Stx によるアポトーシス関連分子の活性化の阻害によらない新たな作用機構の可能性がある。

なし

2. 実用新案登録

なし

## F. 健康危険情報

特になし

3. その他

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 三井貴瑛、章白浩、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝；、バリエント特異的 Stx 阻害薬開発のための新規スクリーニング法の開発. 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011 年 7 月 15 日、大阪

2) 三井貴瑛、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝；バリエント特異的 Stx 阻害ペプチドの新規スクリーニング法の確立. 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎

3) 山本洋、高橋美帆、濱端崇、西川喜代孝；受容体結合部位を標的とした新規コレラ毒素阻害薬の開発. 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

臨床および環境分離 STEC 株の分離同定に関する研究

分担研究者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授  
研究協力者 日根野谷 淳 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 助教

研究要旨

小児下痢症由来の 3 株の EHEC のうち、1 株が 0111 (*stx1/stx2*)、2 株が 0103 (*stx1*) であった。牛肉 17 検体から 7 株の EHEC を分離し、2 株が OUT (1: *ut*[untypable]-*stx1/stx2*-0118, 2: *stx1*)、1 株が 08 (*stx2e*)、3 株が 066 (1: *ut-stx1/stx2*-0118, 2: *stx2*, 3: *stx2*)、1 株が 088 (*stx1/stx2/stx2v-hb*) であった。マウスを用いてペプチド性阻害薬の評価を行った。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) /志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) /Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) は、志賀毒素/Vero 毒素 (Stx/VT) を産生することにより下痢症のみならず、生死に関わる溶血性尿毒症症候群や脳症等を引き起こす。Stx には、免疫学的に異なる Stx1 と Stx2 さらにそれらのバリエーションがある。本研究では、家畜、食肉及び患者から STEC を分離し、分離された STEC の毒素型別及び細菌学的性状を解析し、さらに Stx に対するペプチド性阻害薬の *in vitro* における評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

菌株 : STEC 0157:H7 堺株 (Stx1/Stx2)、STEC 091:H21 (Stx2vha/Stx2vhb)、STEC 0139 (Stx2e)、STEC 0157:H- (Stx2c) 及び *E. coli* C600 株をそれぞれ陽性及び陰性コントロールとして用いた。

培養及び *stx* 遺伝子の検出: 小児下痢症患者便検体からの STEC の分離は SMAC を用いて培養後、食肉検体は、TSB または mEC で増菌培養後、PCR 法で *stx* 遺伝子の有無を確認した。Stx 遺伝子のスクリーニングは、*stx1/stx2* を検出できる共通プライマーを用いたマ

ルチプレックス PCR 法で行った (Pal A *et al.*, Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。

**菌株の単離、同定及び性状解析:** PCR で陽性となった検体を L-agar に植菌し、<sup>32</sup>P で標識した *stx1/stx2* 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法で *stx* 陽性菌を分離した。分離菌が大腸菌であることを生化学的性状試験で確認した。血清型は 173 種類の O 抗血清と 53 種類の H 抗血清を用いて決定した。*Stx* 遺伝子の型別は、Beutin ら (Appl. Environ. Microbiol., 73:4769-4775, 2007) が報告した PCR-RFLP 法によって行った。**マウスによるペプチド性阻害薬の評価:** 動物実験は、Asahara ら (Microb. Pathog., 35:1-9, 2003) の方法に従い 5 週齢の雄 BALB/C と STEC 0157 V17 株 (*Stx1/Stx2*) を用いて、複数のペプチド性阻害薬を投与して行った。

(論理面への配慮)

小児下痢症患者検体について本学の倫理委員会の承認を得て、患者の個人情報に配慮して行った。

## C. 研究結果

1) 患者由来 EHEC : 小児下痢症患者便検体から分離した EHEC 3 株、1 株は 0111 (*Stx1/Stx2* 陽性)、2 株は 0103

(*Stx1* 陽性) であった。

2) 食肉由来の STEC : 牛肉 17 検体 (赤身 6、ミンチ 3、内蔵肉 8 検体) から 7 株の STEC を分離した。2 株は OUT (1 株は型別できない *Stx1* と *Stx2*-0118 陽性、1 株は *Stx1* 陽性)、1 株は 08 (*Stx2e* 陽性)、3 株は 066 (型別できない *Stx1* と *Stx2*-0118 陽性、2 株は *Stx2* 陽性)、1 株は 088 (*Stx1*、*Stx2*、*Stx2vhhb* 陽性) であった。

3) ペプチド性阻害薬の評価 : マウスに EHEC 0157 を投与後、マイトマイシン C 投与で 10 日以内に 50% 以上のマウスが致死する系を確立できたが、ペプチド性阻害薬を投与した実験は現在進行中である。

## D. 考察

食肉から型別できない *sxt1* 遺伝子を持った STEC や *stx2-0118* という珍しい *stx2* バリエント遺伝子が見つかった。今後ペプチド性阻害薬の評価を様々な *Stx2* バリエントに対して行う必要がある。

## G. 研究発表

### 17. 論文発表

(1) N. Sugimoto, K. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, A. Matsuhisa, H. Watanabe, and S. Yamasaki. Evaluation of a PCR-Restriction Fragment Length

Polymorphism (PCR-RFLP) Assay for  
Molecular Epidemiological Study of  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J.  
Vet. Med. Sci.**, 73: 859-867, 2011.

## 2. 学会発表

(1) 日根野谷 淳、島 綾香、向澤奈津子、丹羽裕子、四良丸 幸、西川明芳、朝倉昌博、山崎伸二：市販牛肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月、大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

## Stx による細胞死誘導機構と細胞死制御分子の開発

分担研究者 内藤 幹彦 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 教授

### 研究要旨

腸管出血性大腸菌（STEC）に産生される Shiga toxin（Stx）は、THP1 細胞に速やかにアポトーシスを誘導した。このアポトーシスに先立って、アポトーシス阻害タンパク質 Mcl1、FLIP が著しく減少した。またプロテアソーム阻害剤 MG132 により Mcl1、FLIP の減少を阻害する事により、Stx による THP1 細胞のアポトーシスは強く抑制された。これらの結果から、プロテアソーム阻害剤は Stx によるアポトーシスや急性毒性を軽減できる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（STEC）に産生される Shiga toxin（Stx）は、A サブユニット1分子と B サブユニット5分子から構成される複合体であり、B サブユニットが細胞表面の CD77 に結合して細胞内に取り込まれると逆行性小胞輸送によってゴルジ体に輸送され、その後 A サブユニットだけが細胞質に放出される。A サブユニットは 28S リボソーム RNA の脱アデニル化を引き起こし、タンパク質合成を阻害する事により細胞毒性を示すと考えられている。しかし Stx が細胞死を誘導する分子機構はあまりよくわかっていない。本研究では Stx による細胞死の誘導機構を明らかにし、細胞

死を制御する分子及び方法を開発する事を目的とした。

### B. 研究方法

THP1 細胞等の各種培養細胞を Stx で処理し、細胞の形態観察及び色素排除法等で 24 時間以内に細胞死を起こす細胞株を探索した。Stx 処理細胞の Cell Lysate を調製し、各種タンパク質の発現及びカスパーゼ活性化等をウェスタンブロット法により解析した。

### C. 研究結果

Stx 処理により細胞死を起こしやすい細胞を探索した結果、ヒト単球系細

胞株 THP1 が Stx による細胞死誘導に高い感受性を示した。用量依存性及び時間経過を調べた結果、Stx1、Stx2 共に 5 pg/ml という微量でも 6 時間以内に THP1 細胞に細胞死を誘導する事がわかった。この THP1 細胞の細胞死に伴ってカスパーゼ 3 の活性化と PARP の切断が観察され、カスパーゼ阻害剤 ZVAD によって Stx 処理による THP1 細胞の細胞死は強く抑制された事、一方ネクロシス阻害剤 Necrostatin1 は Stx による細胞死を全く阻害しなかった事等から、Stx は THP1 細胞にアポトーシスを誘導している事が明らかになった。

次にアポトーシス制御タンパク質の量的変化をウェスタンブロット法により解析した。その結果、Stx 処理により XIAP、Apollon、Mcl1、FLIP 等のアポトーシス阻害タンパク質が著しく減少することがわかった。これらの中で、XIAP、Apollon の減少はカスパーゼ阻害剤 ZVAD 添加により強く抑制されたが、Mcl1、FLIP の減少は ZVAD で全く抑制されなかった。これらの結果から、Mcl1、FLIP の減少はカスパーゼ活性化とアポトーシスの進行に先立っておこっている可能性が示唆された。Mcl1、FLIP はいずれも半減期の短いタンパク質であることが知られている。そこで、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミド処理に

よりこれらタンパク質の減少を調べた結果、Stx 処理と同様な時間経過でタンパク質が減少することがわかった。また小胞輸送を阻害する BrefeldinA は、Stx による Mcl1、FLIP の減少を抑制した。これらの結果は、Stx の A サブユニットによりタンパク合成が阻害され、半減期の短い Mcl1、FLIP が減少した可能性を強く示唆している。Mcl1、FLIP は主にユビキチン・プロテアソーム系によって分解される事が知られている。そこで Stx と共にプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理した結果、Stx による Mcl1、FLIP の減少とアポトーシスは強く抑制された。

#### D. 考察

Stx 処理により THP1 細胞では Mcl1、FLIP の減少とアポトーシスが見られ、プロテアソーム阻害剤 MG132 は、Stx による Mcl1、FLIP の減少と THP1 細胞のアポトーシスを強く阻害した。これらの結果から、アポトーシス阻害タンパク質 Mcl1、FLIP の減少が Stx による THP1 細胞のアポトーシスに重要であることが示唆された。しかしシクロヘキシミド処理によりこれらのタンパク質を減少させただけでは Stx 処理のようなアポトーシスはおこらないことから、

Stx はこれらのアポトーシス阻害タンパク質を減少させる事に加えて、Death Inducing Signaling Complex等のカスパーゼ活性化複合体の形成に影響を与えている事が推測された。

## E. 結論

プロテアソーム阻害剤でアポトーシス阻害タンパク質の減少を阻止することにより、Stxによる細胞死や急性毒性を抑制できる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M. & Kurihara, M.: Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. **Bioorg Med Chem Lett** 22, 1793-1796 (2012)
- 2) Okuhira, K., Ohoka, N., Sai, K., Nishimaki-Mogami, T., Itoh, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y. & Naito, M.: Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. **FEBS Lett** 585, 1147-1152 (2011).
- 3) Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Sato, S., Naito, M. & Hashimoto, Y.:

Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. **Bioorg Med Chem** 19, 3229-3241 (2011)

### 2. 学会発表

- 1) 服部 隆行, 大岡 伸通, 高橋 美帆, 西川 喜代孝, 内藤 幹彦: シガトキシンBサブユニットによる細胞死誘導機構 日本薬学会第132年会 (2012. 3) (札幌)
- 2) 奥平 桂一郎, 出水 庸介, 大岡 伸通, 柴田 識人, 服部 隆行, 最上 (西巻) 知子, 栗原 正明, 奥田 晴宏, 内藤 幹彦: プロテインノックダウン法によるエストロゲンレセプターの分解 第70回日本癌学会学術総会 (2011. 10、名古屋)
- 3) 内藤 幹彦: 抗がん剤、がん分子標的治療薬の作用機序と薬剤耐性の分子機構 第55回日本薬学会関東支部大会 (2011. 10、船橋)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
(1) N. Sugimoto, K. Shima, <u>A. Hinenoya</u> , M. Asakura, A. Matsuhashi, H. Watanabe, and <u>S. Yamasaki</u> .	Evaluation of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay for Molecular Epidemiological Study of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> .	<b>J. Vet. Med. Sci.</b>	73	859-867	2011
Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., <u>Naito, M.</u> & Kurihara, M.	Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy.	<b>Bioorg Med Chem Lett</b>	22	1793-1796	2012

Okuhira, K., Ohok a, N., Sai, K., Ni shimaki-Mogami, T., Itoh, Y., Ishik awa, M., Hashimo to, Y. & <u>Naito, M.</u>	Specific degradation of CR ABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.	<b>FEBS Lett</b>	585	1147-11 52	2011
Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Sato, S., <u>Naito, M.</u> & Hashimo to, Y.	Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown.	<b>Bioorg Med Chem</b>	19	3229-32 41	2011



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

# Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy

Yosuke Demizu<sup>a</sup>, Keiichiro Okuhira<sup>b</sup>, Hiromi Motoi<sup>a</sup>, Akiko Ohno<sup>a</sup>, Takuji Shoda<sup>a</sup>, Kiyoshi Fukuhara<sup>a</sup>, Haruhiro Okuda<sup>a</sup>, Mikihiko Naito<sup>b,\*</sup>, Masaaki Kurihara<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Division of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 November 2011

Revised 18 November 2011

Accepted 21 November 2011

Available online 28 November 2011

#### Keywords:

Estrogen receptor

Protein knockdown

Tamoxifen

Ubiquitin-proteasome system

### ABSTRACT

We designed and synthesized estrogen receptor (ER) degradation inducers **5**, **6**, and **7**, which crosslink the ER and the cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1). Compounds **5**, **6**, and **7** induced cIAP1-mediated ubiquitylation of ER $\alpha$  resulting in its proteasomal degradation.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

Breast cancer is the most common form of cancer in women, and its incidence is increasing year by year. Estrogen receptors (ERs) are often overexpressed in the tissues of breast cancer patients, which promotes the estrogen-dependent proliferation of cancer cells.<sup>1–3</sup> Therefore, ER antagonistic drugs, such as tamoxifen, a non-steroidal selective estrogen receptor modulator, are effective at treating breast cancer.<sup>4,5</sup> Tamoxifen is metabolized by CYP2D6 and CYP3A4 into 4-hydroxytamoxifen, which has 30–100 times more affinity for the estrogen receptor than tamoxifen itself.<sup>6</sup> Tamoxifen is the most frequently prescribed drug for the treatment of all stages of breast cancer,<sup>7</sup> and it is also used to prevent the disease in women who are at high risk of developing breast cancer.<sup>8</sup> However, tamoxifen has agonistic effects on ER in uterus cancer cells and increases the risk of endometrial cancer.<sup>9,10</sup> Furthermore, tamoxifen activates the protein kinase B (Akt) signaling pathway by binding to a particular ER variant, resulting in the inhibition of apoptosis in cancer cells.<sup>11,12</sup>

Recently, we reported a protein knockdown strategy for inducing the degradation of a target protein using the ubiquitin-proteasome system (UPS).<sup>13–18</sup> To degrade proteins of interest, we developed SNIPER (Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein Erasers), hybrid molecules composed of bestatin (BS), an inhibitor of the cellular apoptosis protein 1 (cIAP1), and a ligand for the target protein.<sup>13–15</sup> These molecules cross-link cIAP1 and the target protein

to induce ubiquitylation and subsequent proteasomal degradation of the target protein.

In this study, we applied this methodology to the selective degradation of ER $\alpha$  in breast cancer cells. We designed SNIPER(ER) hybrid molecules **5**, **6**, and **7**, which induce the selective poly-ubiquitylation of the ER to cause proteasomal degradation. Molecules **5**, **6**, and **7** contain two biologically active scaffolds: one is a tamoxifen derivative, which is used to bind to the ER, and the other is a BS moiety, which binds to cIAP1 to induce the ubiquitylation and subsequent proteasomal degradation of the target protein (Fig. 1). Molecules with different length linkers **5**, **6**, and **7** were designed based on the X-ray structure (PDB ID: 3ERT) of the complex formed between 4-hydroxytamoxifen and ER $\alpha$ ,<sup>19</sup> and BS was ligated to the dimethylamino moiety of 4-hydroxytamoxifen (red circle in Fig. 2a) via an alkyl linker (Fig. 2b).

The ligated molecules **5**, **6**, and **7** were synthesized as follows (Scheme 1). First, (*E/Z*)-endoxifen (**1**)<sup>20,21</sup> was condensed with several acids to afford amides **2**, **3**, and **4**. After deprotection of one of the *N*-Boc protecting groups of **2**, **3**, and **4**, the generated amines were reacted with *N*-Boc bestatin,<sup>11</sup> and the subsequent deprotection of another of the molecules' *N*-Boc protecting groups gave ligated compounds **5**, **6**, and **7**, respectively.<sup>22</sup>

Then, we evaluated the effects of compounds **5**, **6**, and **7** on ER $\alpha$  protein degradation in MCF-7 breast cancer cells by examining the treatment dose (Fig. 3).<sup>23</sup> The protein expression of ER $\alpha$  was increased by treatment with (*E/Z*)-endoxifen (lane 3), which was consistent with the findings of a previous report demonstrating that (*E/Z*)-endoxifen induced the accumulation of ER $\alpha$  protein in

\* Corresponding authors. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail addresses: [miki-naito@nihs.go.jp](mailto:miki-naito@nihs.go.jp) (M. Naito), [masaaki@nihs.go.jp](mailto:masaaki@nihs.go.jp) (M. Kurihara).

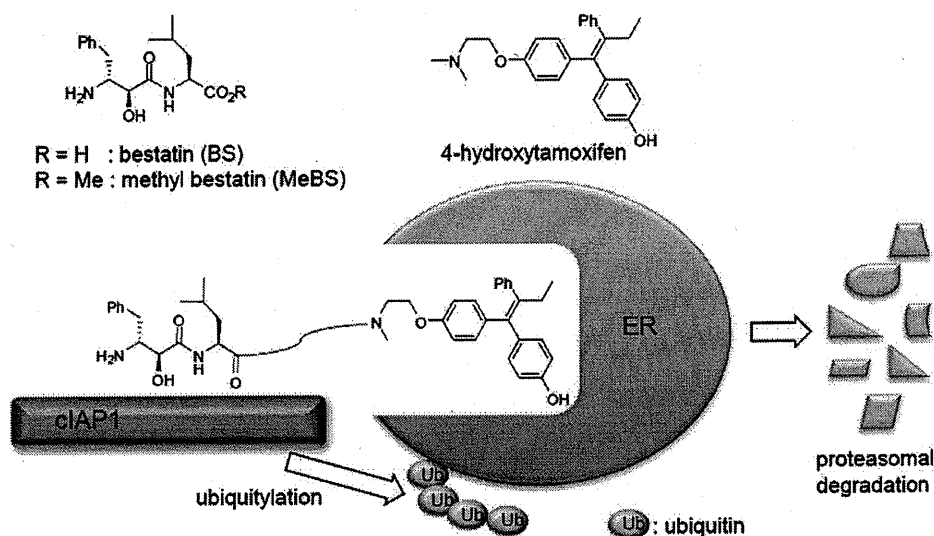


Figure 1. Estrogen receptor degradation strategy using a ligated hybrid molecule.

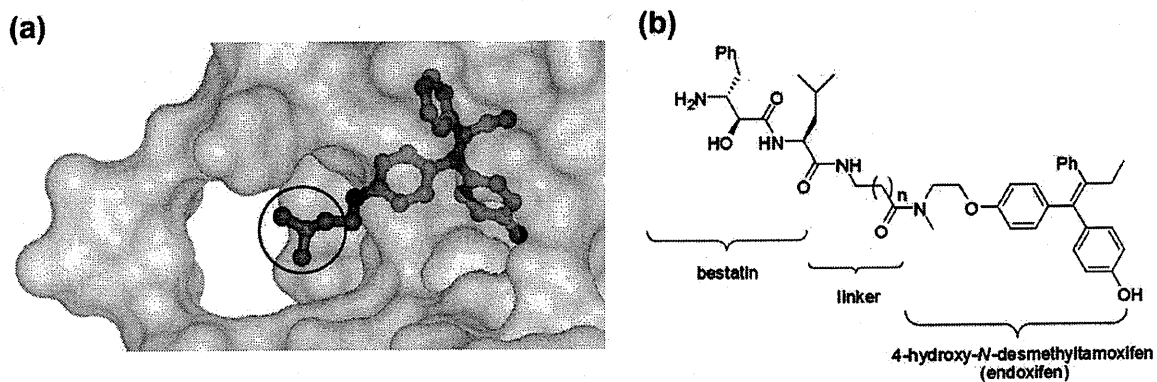
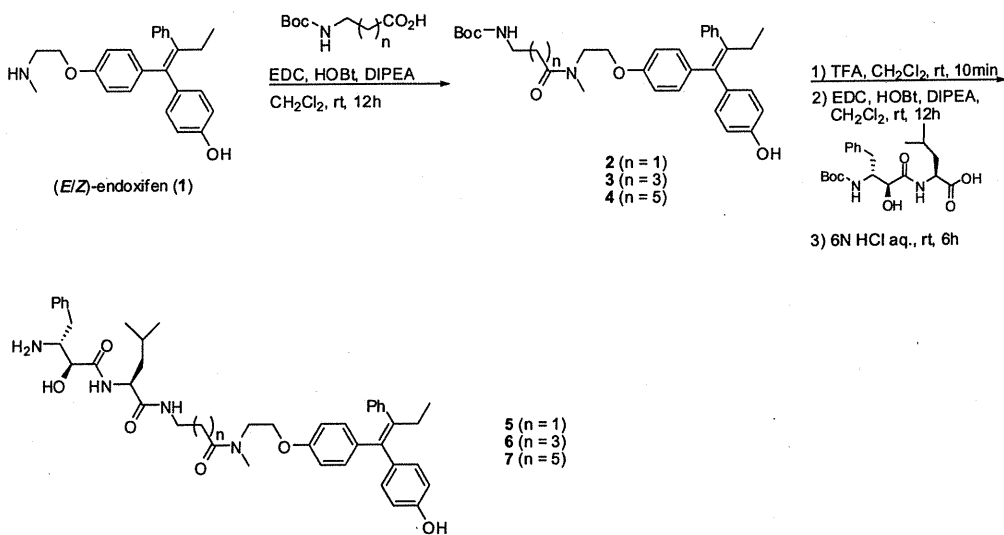


Figure 2. (a) X-ray structure of the complex formed between 4-hydroxytamoxifen and ER $\alpha$ (3ERT). (b) Design of the SNIPER(ER) ER degradation inducer.



Scheme 1. Synthesis of ligated compounds 5, 6, and 7.