

主 題 ○腸管出血性大腸菌感染症の治療

O 157 感染症に対する次世代治療薬の開発

西川 喜代孝*

はじめに

わが国における O 157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) の感染者数は、1996 年のアウトブレイク以降も年間約 3,000~4,000 人で推移しており、現在に至るまで全く減少の傾向はみられていない。STEC 感染は下痢や出血性大腸炎などの消化管障害を引き起こす一方で、感染者の 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至らしめる大きな原因となっている。これら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 Shiga toxin (Stx) である。特に、血中に侵入した Stx による腎臓や脳の微小血管内皮細胞の障害が上記の重篤な合併症の原因と考えられている。したがって、腸管内で大量に産生された Stx を強力に吸着して血中への侵入を阻害する薬剤や、すでに血中に侵入したごく微量の Stx に結合してその作用を阻害する薬剤は、STEC 感染症の有効な治療薬になると期待される。

Stx は標的細胞上に存在している中性糖脂質 Gb3 (globotriaosylceramide) を受容体とし、その糖鎖部 (グロボ3糖部) を特異的に認識する。この点に着目し、グロボ3糖を高密度に集積させた種々の化合物が Stx 阻害薬として合成されている。本稿では、Stx 阻害薬開発の基本コンセプトである Stx の糖鎖認識機構、ならびにこれまでの Stx 阻害薬開発の現状とその問題点を概説するとともに、最近われわれが開発したグロボ3糖に代

わるペプチド性 Stx 結合ユニットの開発戦略、さらに本結合ユニットを用いた新規 Stx 阻害薬の効果について紹介する。

I. Stx の構造と Gb3 糖鎖認識機構

Stx は Stx 1, Stx 2 の 2 つのファミリーから構成され、Stx 1 ファミリーには赤痢菌が産生する志賀毒素と全く同じ構造を有する Stx 1 とそのバリエーションが、Stx 2 ファミリーには Stx 1 と約 60% の相同性を有する Stx 2 とそのバリエーションが各々存在する。このうち Stx 2 が重篤な合併症の発症と密接なかわりをもつことが疫学的、ならびに実験的に指摘されており^{1,2)}、Stx 2 阻害薬の開発が急務である。

Stx は毒素活性を担う A-サブユニット 1 分子 (32 kDa) と、標的細胞への結合を担う B-サブユニット (8 kDa) 5 分子から構成される。A-サブユニットは N-グリコシダーゼ活性を有し、28 S rRNA の 5' 末端から 4,324 番目のアデノシンの N-グリコシド結合を加水分解することによってリボゾーム 60 S-サブユニットを失活させ、蛋白質合成を阻害する。

Stx は標的細胞表面に存在する Gb3 (Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-Glc β 1-Ceramide) を受容体として細胞内に侵入する。B-サブユニットペンタマーは Gb3 のグロボ3糖部 (Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-Glc-) を介して、一度に複数の Gb3 分子と結合する。これまでに、Stx 1 B-サブユニット 1 分子には、サイト 1, 2, 3 の 3 種類のグロボ3糖結合サイトが存在していること、したがって B-サブユ

* 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部
(〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1)

ニットペンタマーでは計15個のグロボ3糖が結合しうることが結晶構造解析から示されている³⁾。Stx 2については、現在までにStx 2 B-サブユニットとグロボ3糖との共結晶化像は得られていないが、最近報告されたStx 2の結晶構造解析からStx 1と同様3種類のグロボ3糖結合サイトの存在が予想されている⁴⁾。この多価型の相互作用が、StxとGb3との結合親和性を著しく亢進させており、この現象はクラスター効果と呼ばれている。

II. グロボ3糖を集積させたStx阻害薬

B-サブユニットペンタマーは一度に複数のグロボ3糖を認識することによりGb3との結合親和性を著しく亢進させていることから、グロボ3糖を高密度に集積させた構造を有する化合物は、B-サブユニットに強く結合しStxの標的細胞への侵入を阻止する、Stx阻害薬になると期待される。このコンセプトのもとで、すでにいくつかの化合物が開発されている。

1. 血中で働くStx阻害薬

血中に侵入したStxに対して阻害作用を発揮するStx阻害薬は、Stxに高い親和性をもちつつ、かつ構造がコンパクトであることが要求される。Kitovらは、グルコースを核として、その5つの水酸基すべてにスペーサーを介してグロボ3糖が結合した化合物(STARFISH)を開発した⁵⁾(図1)。スペーサーは途中で枝分かれし、STARFISH 1分子には計10個のグロボ3糖が結合している。STARFISHは*in vitro*において、Stx 1およびStx 2に対してその細胞障害活性を低濃度で阻害する。しかしながらその後、STARFISHはマウス皮下に同時投与したStx 1の致死性を効率よく阻害するものの、Stx 2に対しては全く効果を示さないことが明らかとなった⁶⁾。

松岡らは、ケイ素原子を分岐点にもつ樹枝状化合物(カルボシラン dendリマー)を基本骨格とし、スペーサーを介してその末端にグロボ3糖を結合させた一連の化合物(SUPER TWIG)を合成した⁷⁾(図1)。われわれは、末端にグロボ3糖を6個有するSUPER TWIG(1)6が高親和性でStx 1およびStx 2に結合し、その細胞毒性を数

$\mu\text{g/ml}$ という低濃度で抑制すること、さらにマウスに静脈投与したStx 2の致死性を完全に阻害することを見出した⁸⁾。マウスを用いたO157:H7感染実験に対する効果を調べたところ、SUPER TWIG(1)6は感染成立が確認されてから静脈投与した場合にも、顕著にその致死性を抑制することが示された。SUPER TWIG(1)6は、血中で作用するStx阻害薬として感染実験での有効性が証明されたはじめての化合物である。

われわれは、生体内におけるSUPER TWIG(1)6の作用機構についても検討を行い、SUPER TWIG(1)6は少なくとも2つのメカニズムを介して作用していることを明らかにした⁸⁾。一つは、血中でStxに強固に結合し、腎臓や脳などの標的細胞へのStxの侵入を阻害するという機構であり、2つめは、脾臓、肝臓などの網内系組織に存在するマクロファージが関与する機構である。これらのマクロファージは通常Stxをほとんど結合しないが、StxがSUPER TWIG(1)6と結合し複合体を形成すると非常に効率よく取り込み、かつ取り込み後は速やかにStxを分解することが明らかとなった。SUPER TWIG(1)6は生体内でこの2つの機構を効率よく働かせることで、非常に強いStx阻害能力を発揮していると考えられる。われわれは、種々の核構造ならびにグロボ3糖数を有する一連のSUPER TWIGを合成し、血中でのStx阻害活性を指標として構造活性相関を検討し、SUPER TWIGの最適構造を決定した⁹⁾。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分子全体としては、疎水的な核構造の両側に対称的にグロボ3糖が集積した構造、いわゆるダンベル型をしていること。

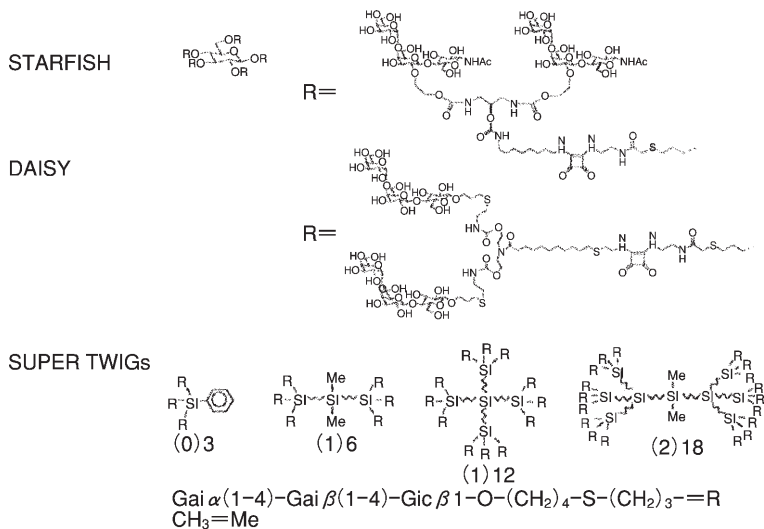
②グロボ3糖は片側3個、全体で6個以上必要である。

③分岐点となる両末端のSi原子間の距離は10Å以上離れていること。

④逆に、分岐点となるSi原子とグロボ3糖間の距離は末端の糖鎖密度を保つために10Å以内でなければならない。

特に①、②の条件は、マクロファージによるStxとSUPER TWIGとの複合体の認識、ならび

血中で働く Stx 阻害薬



腸管内で働く Stx 阻害薬

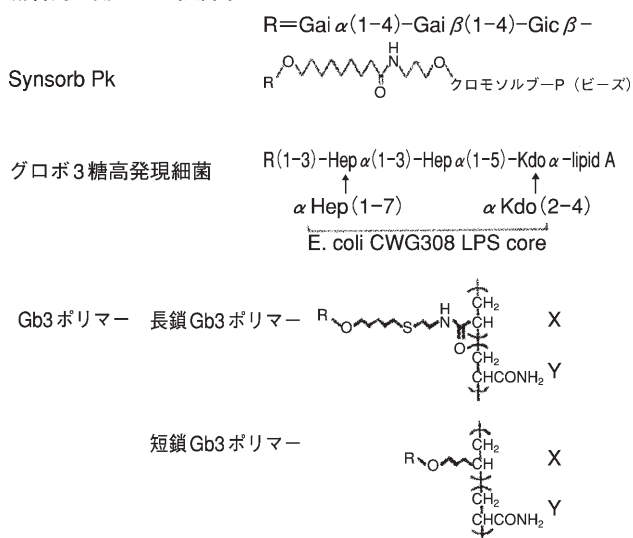


図1 グロボ3糖含有型 Stx 阻害薬の構造

Hep, L-glycero-D-manno-heptose ; Kdo, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid

に取り込み分解に必須であることが示された。われわれは最近、以上の構造要求性をすべて満たし、SUPER TWIG(1)6よりも優れた化合物、SUPER TWIG(2)18を同定した⁹⁾(図1)。

STARFISHを作製したグループはSUPER TWIGの報告から約1年後に、STARFISHの改良型化合物Daisyを開発した⁶⁾(図1)。Daisyはマ

ウス皮下に同時投与したStx 2に対しても阻害作用を示し、かつ感染実験でも延命効果を示す。主な改良点はグルコースの核と末端のグロボ3糖を結ぶアルキルスペーサーの長さを炭素5個分長くしたことである。この点SUPER TWIGに要求される疎水的な核構造の存在と合致している。

2. 腸管内で働く Stx 阻害薬

腸管内で働く Stx 阻害薬は、腸管内に大量に存在する Stx を強力に吸着し、その血中への侵入を妨げる働きをしなければならない。このためより多くの Stx をより高い親和性で吸着する能力が要求される。これまでに、珪藻土ビーズにスパーサーを介してランダムにグロボ3糖を結合させた化合物、Synsorb Pk (Pk は P 式血液型としての Gb3 糖鎖の名称) が作製されている^{10,11)} (図1)。Synsorb Pk は、Stx 1 および Stx 2 に対して吸着能を有し、臨床第 I 相試験でもそれ自体には毒性がないことが確認されている。しかしながら、その後臨床第 II 相、第 III 相試験が行われたが、STEC 感染後の HUS の発症に対する十分な有効性は証明されず¹²⁾、現在開発は中断されている。

Paton らは、大腸菌の菌体表面を覆っているリポ多糖に注目し、その糖鎖末端にグロボ3糖を高発現させた組み換え大腸菌を作製した¹³⁾ (図1)。まず、リポ多糖の糖鎖末端にグルコースを有する大腸菌を作製し、さらにこの先に Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-の糖鎖を付加すべく、 α および β の2種のガラクトース転移酵素を遺伝子導入した。その結果、得られた菌体は *in vitro* において Stx を強力に吸着することが確認された。さらに、マウスを用いた STEC 感染モデルにおいて、STEC 感染直後からこの組み換え菌体を1日2回12日間経口投与すると、致死活性が抑制されることが示された。また、ホルマリン固定した死菌でも同様の効果が観察されている¹⁴⁾。

われわれは、ポリアクリルアミド骨格にスパーサーを介してグロボ3糖を集積した化合物、Gb3 ポリマーを開発した¹⁵⁾ (図1)。興味深いことに、長鎖アルキルスパーサーをもつ Gb3 ポリマーは、Stx 1 および Stx 2 両方に対して高親和性に結合しその細胞毒性を強力に阻害するのに対し、短鎖アルキルスパーサーをもつ Gb3 ポリマーでは Stx 1 に対する高親和性結合は保持されるものの、Stx 2 に対する結合活性が著しく低下することが明らかとなった¹⁶⁾。以上の知見は、Stx 2 はポリマー骨格とグロボ3糖をつなげているスパーサー長を厳密に認識していることを示唆している。

Gb3 ポリマーは水溶性が高く、容易に経口投与が可能である。長鎖アルキルスパーサーをもち、かつ最も高いグロボ3糖密度を有する Gb3 ポリマー (図1中の X:Y=1:0) を用いてマウスの STEC 感染実験を行ったところ、感染成立後から1日2回4日間治療的に経口投与した場合でも、感染による致死性を完全に抑制する作用を有することが示された¹⁵⁾。Gb3 ポリマー投与群では、血中の Stx 濃度が検出限界以下にまで低下していたことから、本化合物は腸管内で Stx を吸着し血中への毒素侵入を阻害することで作用を発揮していると考えられた。本 Gb3 ポリマーは、感染実験において経口投与で有効性が確認されたはじめての合成化合物である。

III. グロボ3糖に代わる Stx 結合ユニットをもつ新規 Stx 阻害薬

先述の Stx 阻害薬は例外なくグロボ3糖を Stx 結合ユニットとして使用している。しかしながら、これらの Stx 阻害薬を臨床応用するにはいくつかの問題点がある。最大の問題は、グロボ3糖の化学合成は非常に困難でありコストがかかること、クラスターを形成させる前のグロボ3糖モノマーの Stx に対する Kd 値は 10^{-3} M 程度にすぎず、決して高親和性結合とは言えないこと、の2点である。したがって、臨床応用可能な治療薬開発のためには、グロボ3糖よりも結合親和性に優れ、かつ合成の容易な新たな Stx 結合ユニットの開発が必須である。最近われわれは、多価型ペプチドライブラリー法という独自の技術を開発し、グロボ3糖に代わるペプチド性の新規 Stx 結合ユニットを開発することに成功した。

1. 多価型ペプチドライブラリー法の開発

われわれはこれまでに、キナーゼなどの酵素の触媒部位に対して特異的に結合するペプチドモチーフ、すなわち活性阻害ペプチドを同定する方法 (ペプチドライブラリー法) を開発している¹⁷⁾。以下に簡単に本法の原理を説明する。ペプチドライブラリーは図2に示す構造をしており、X はシステイン以外の19種類のアミノ酸のミックスチャーであることを示す。したがって X が4個の場合、理論的にこのライブラリーは 19^4 種類のペ

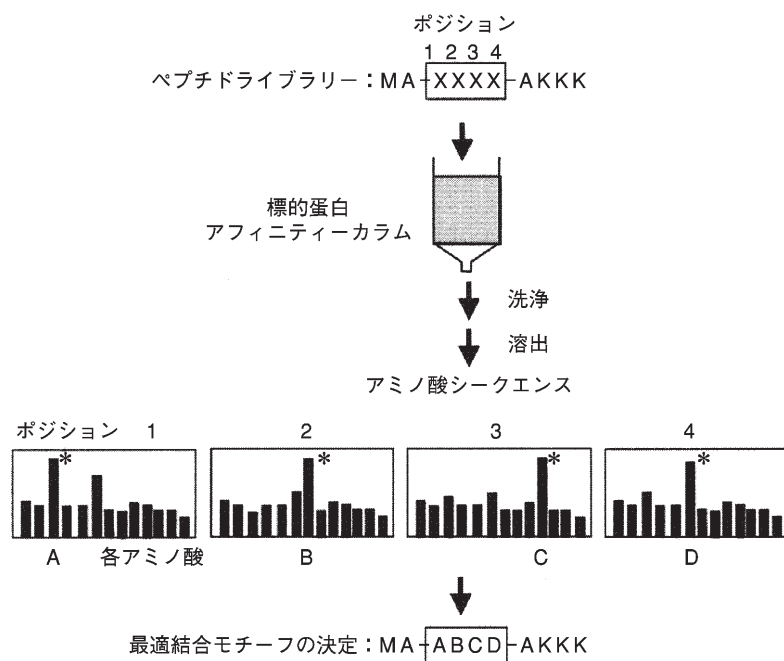


図2 ペプチドライブラリー法の概要

XはCys以外の19種のアミノ酸のミックスチャーであることを示す。N末端のMet-AlaおよびC末端側のAlaは、アミノ酸シーケンスがサイクルごとに確実に行われていることを確認するために導入している。C末端側のLys-Lys-Lysはライブラリー自体の水溶性を高めるために導入する。A, B, C, Dは各ポジションで最も強く選択されたアミノ酸をそれぞれ示している。

ペプチドのミックスチャーで構成されることになる。このライブラリーを標的蛋白のアフィニティーカラムに結合させ、洗浄後、特異的に結合した画分を分取し、アミノ酸シーケンスを行う。その結果、各々のXのポジションについてどのアミノ酸がどの程度強く選択されたかのランキングがつかうことになり、各ポジションで最も強く選択されたアミノ酸を並べた配列がベストの結合モチーフを与えるはずである。本法を用いて、T細胞の活性化において中心的な役割を果たしているチロシンキナーゼ、ZAP 70 に対して、基質モチーフとは全く異なる配列を有する活性阻害ペプチドを同定している¹⁷⁾。

われわれは、本ペプチドライブラリー法を用いてStx Bサブユニットのグロボ3糖結合部位に対する結合モチーフをとることを試みたが、全く結合モチーフを得ることができなかった。その原因として、このライブラリーはモノマーであるためクラスター効果が発揮できず、結果的にStx Bサブユニットに対する結合が著しく低下しているためであると考えられた。そこで、クラスター効果を発揮させるため、ペプチドライブラリー自体を多価にするという新たな概念に基づいたライブ

ラリーを作製することにした。

ライブラリーを集積させるための核構造については、先述したようにすでにSUPER TWIGを用いてStx阻害薬としての最適構造条件①～④を決定しているの、これらすべての条件を備えた核構造をデザインすることにした。なお、末端のStx結合ユニットの数については、Stxへの高親和性結合には片側2個ずつ、計4個で十分であるという結果を得ていたため、ライブラリーは最低4価であることを条件にした。最終的に、図3に示すようにリジンが3個つながった構造を核とし、スペーサーを介して4個のライブラリーをもつ多価型ペプチドライブラリーを作製した。得られたライブラリーはStxに高親和性に結合するための最適構造をすべて満たしていることになる。

2. Stx 結合モチーフのスクリーニング

標的としては重篤な合併症の発症と関連の深いStx 2を用いることにした。われわれはこれまでに、グロボ3糖結合部位に変異を有する種々のミュータントを作製し、SUPER TWIG(1)6はStx 2 Bサブユニットのサイト3に特異的に結合することを見出している⁹⁾。このことはサイト3が優れた創薬の標的となりうることを意味してい

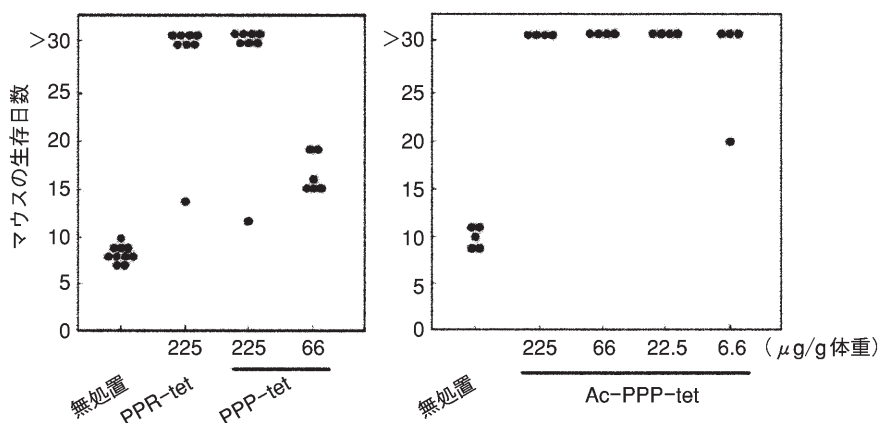


図4 ペプチド性Stx阻害薬のO157感染実験における効果

マウスにO157:H7を経口感染後、2日目から1日2回、4日間、図中に示す用量の各ペプチド性Stx阻害薬を治療的に経口投与した。対照群には生理的食塩水を投与した。黒点は各マウス個体の生存日数を表す。PPP-tetはPPRRRRRを、PPR-tetはPPRRNRNをそれぞれ4個もつ化合物を示す。Ac-PPP-tetはPPP-tetのN末端のアセチル化体を示す。

ることを示している。

次に、これら4種の化合物のうちPPP-tet (PPRRRRRを4個もつ化合物)とPPR-tet (PPRRNRNを4個もつ化合物)を用いて、マウスでの*E. coli* O157:H7感染実験における効果を検討した。菌体感染後、感染成立が確認できる2日目からこれらの化合物を1日2回、4日間、225 $\mu\text{g/g}$ 体重を治療的に経口投与したところ、非常に高い治癒率を示すことが明らかとなった¹⁸⁾(図4左)。一般にペプチドを経口投与した場合、消化管で蛋白質分解酵素による分解を受けると考えられる。そこでPPP-tetを用いて、消化管での安定性を増すための種々の化学修飾の効果を検討した。その結果、末端の4つのメチオニンのアミノ基をすべてアセチル化(Ac-PPP-tet)すると、O157:H7感染実験での効果が約30倍増加することを見出した(図4右)。75%の治癒効果を示すAc-PPP-tetの用量は、70kgの人に換算すると0.5gとなる。このことは、Ac-PPP-tetがSTEC感染に対する強力な経口治療薬となる可能性を示している。

おわりに

Stx阻害薬はSTEC感染が確定してから治療的に使用されることを前提として開発が進められ

てきた。最近では、診断技術の向上によって早期での診断が可能となりつつあり、脳症やHUSなどの重篤な合併症の発症抑制におけるStx阻害薬の重要性が一段と高まっている。その一方で、感染拡大の阻止を目的として、感染が確認される前あるいは感染の危険が予想される段階における積極的な対応が強く求められている。本稿で紹介したペプチド性Stx阻害薬は合成が容易で(すべての合成操作がペプチド合成装置を用いて可能)、かつ経口投与が可能であることから、治療的にはもちろん予防的に広範の対象に適用することが可能であり、STEC感染対策において重要な一翼を担うと期待される。また、本感染症の治療に関して欧米では一般に抗生物質の使用には懐疑的であり、WHOでもその使用は検討課題とされているが、これらStx阻害薬と併用することによって、その効力ならびに適用範囲を格段に拡大できるものと期待される。

本稿で紹介した多価型ライブラリー法は、1対1の相互作用では非常に結合親和性が低いが、マルチ対マルチの多価型の結合をすることによって著しく結合親和性が亢進する現象、いわゆるクラスター効果を示す分子に対して容易に応用可能である。クラスター効果はStxに限らず、コレラ毒素や炭疽菌毒素などの細菌毒素、インフルエンザウ

イルスの HA 蛋白質, 癌細胞の転移・白血球の遊走に関与しているセレクトリンなど, 極めて多くの疾患関連分子に幅広く観察される. 本法を用いてこれら分子群に対する阻害薬を開発することにより, 関連疾患の治療に役立てることが可能になると期待される.

文 献

- 1) Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, et al : Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O 157 : H 7 infections. J Infect Dis 160 : 994-998, 1989
- 2) Tesh VL, Burris JA, Owens JW, et al : Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. Infect Immun 61 : 3392-3402, 1993
- 3) Ling H, Boodhoo A, Hazes B, et al : Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb 3. Biochemistry 37 : 1777-1788, 1998
- 4) Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, et al : Structure of shiga toxin type 2 (Stx 2) from *Escherichia coli* O 157 : H 7. J Biol Chem 279 : 27511-27517, 2004
- 5) Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, et al : Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. Nature 403 : 669-672, 2000
- 6) Mulvey GL, Marcato P, Kitov PI, et al : Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. J Infect Dis 187 : 640-649, 2003
- 7) Matsuoka K, Terabatake M, Esumi Y, et al : Synthetic assembly of trisaccharide moieties of globotriaosyl ceramide using carbosilane dendrimers as cores. A new type of functional glyco-material. Tetrahedron Lett 40 : 7839-7842, 1999
- 8) Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, et al : A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O 157 : H 7. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 7669-7674, 2002
- 9) Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, et al : Identification of the optimal structure for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. J Infect Dis 191 : 2097-2105, 2005
- 10) Armstrong GD, Fodor E, Vanmaele R : Investigation of Shiga-like toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. J Infect Dis 164 : 1160-1167, 1991
- 11) Takeda T, Yoshino K, Adachi E, et al : *In vivo* assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. Microbiol Immunol 43 : 331-337, 1999
- 12) Trachtman H, Cnaan A, Christen E, et al : Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children : a randomized controlled trial. JAMA 290 : 1337-1344, 2003
- 13) Paton AW, Morona R, Paton JC : A new biological agent for treatment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. Nature Med 6 : 265-270, 2000
- 14) Paton JC, Rogers TJ, Morona R, et al : Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxinogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 69 : 1389-1393, 2001
- 15) Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, et al : Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections. J Infect Dis 189 : 360-368, 2004
- 16) Watanabe M, Igai K, Matsuoka K, et al : Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues. Infect Immun 74 : 1984-1988, 2006
- 17) Nishikawa K, Sawasdikosol S, Fruman DA, et al : A peptide library approach identifies a specific inhibitor for the ZAP-70 protein-tyrosine kinase. Mol Cell 6 : 969-974, 2000
- 18) Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, et al : A multivalent peptide-library approach iden-

tifies a novel Shiga toxin-inhibitor that induces aberrant cellular transport of the

toxin. FASEB J 20 : 2597-2599,2006

* * *