

カルボシランデンドリマー・糖鎖複合材料の開発

―大腸菌 O157 の産生するベロ毒素中和剤への応用―

Development of Carbosilane dendrimer–Carbohydrate Composite Materials : Application for Neutralizer of Vero Toxin producing *E. Coli*

幡野健、松岡浩司、照沼大陽

Ken HATANO, Koji MATSUOKA and Daiyo TERUNUMA

Carbosilane dendrimer periphery bearing globotriaose were synthesized by S_N2 reaction of thiolate anion at aglycon of globotriaose and brominated carbosilane dendrimer. Binding assay of tree shapes of carbosilane dendrimers [Fan(0)3, Dumbbell(1)6 and Ball(1)12] were carried out. Vero toxin classified into two closely related subgroups, Stx1 and Stx2. Dumbbell(1)6 and Ball(1)12 markedly inhibited the cytotoxic activity of both Stx1 (0.22 and 0.16 $\mu\text{g/ml}$ respectively) and Stx2 (2.3 and 1.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively) toward Vero cells; whereas the IC_{50} of Fan(0)3 was more than 100 $\mu\text{g/ml}$. The result of the binding assay of these toxins suggested that Dumbbell(1)6 and Ball(1)12 bind to both Stx1 and Stx2 with high affinities. Furthermore, inhibitory effects of these dendrimers on the lethality of intravenously administered Stx2 in mice were investigated. Dumbbell(1)6 completely suppressed the lethal effect of Stx2 when administered along with the toxin. The dendrimer treated mice survived more than 2 months without any pathological symptoms.

Keywords: Carbosilane dendrimer, Carbohydrate, Globotriaose, *E. Coli*, Vero toxin

1. 緒言

1.1 研究背景

平成9年に起きた堺市での集団感染から現在に至るまで O157 による感染はほぼ毎年のように発生している。旧浦和市の幼稚園での感染のように、O157 による感染が原因で死に至る場合もある。しかし、その治療法はまだ確立されていないのが実状である。大腸菌 O157 自体は抗生物質の投与により死滅させることが可能である。しかし、大腸菌 O157 は死滅する間に大量のベロ毒素を放出する性質があり、

治療にあたる医師が抗生物質投与に踏み切れないのが現状である。このような現在の状況を背景として、ベロ毒素を効率よく中和する医薬品の開発が強く望まれている。ベロ毒素中和剤については、マウスを用いるヒト化抗体が臨床段階との報道がある。また一方で、お茶あるいはホップに含まれるカテキン類などが有効との記事がマスコミにより報道されたが、明確な構造を有する化合物が生体中で効果を発揮することが認められた例はまったく無い。

1.2 開発のコンセプト

ベロ毒素の模式的な構造を図1に示した。¹⁾ ベロ毒素は毒素を含有する A サブユニットと細胞表層の糖鎖を認識する部位である B サブユニットに分類することができる。B サブユニットは生体内の細胞表

埼玉大学 工学部 機能材料工学科

Department of Fundamental Materials Science,
Faculty of Engineering, Saitama University, 255
Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan

層に存在するグロボ三糖セラミド (図 2)²⁾ の糖鎖部分に特異的に結合することが知られている。ベロ毒素の細胞表層への接着後、毒性を発揮する A サブユニットが細胞内に進入することによって O157 に感染する。

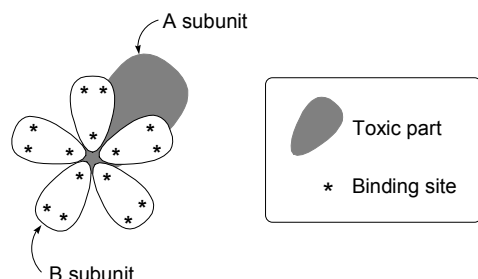


Fig. 1 View of showing frame a format of Vero toxin.

図 1 に示したように B サブユニットは花卉のような 5 つ部位からなり、それぞれの部位に 3 つ、計 15 個の結合サイトを持っている。一般に、このような多価の結合サイトを有する毒素には局在化した複数の糖鎖を担持した化合物がより強く結合することが知られており、この効果は「糖鎖クラスター効果」³⁾ と呼ばれている。

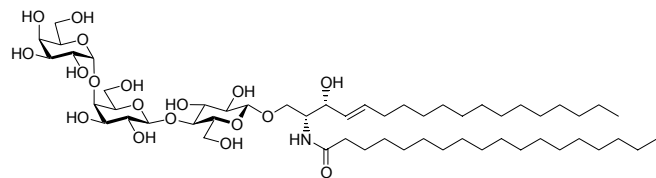


Fig.2 Structure of globotriaosyl ceramide.

糖鎖クラスター効果を利用したベロ毒素中和剤の開発指針として、グロボ三糖のポリマー等への集積化させた化合物の開発がこれまで種々検討されてきた。⁴⁾ しかし、これまで *in vitro* で効果を示す化合物は数例報告されてるが、*in vivo* で効果を示す化合物は無かった。

1.3 カルボシランデンドリマー

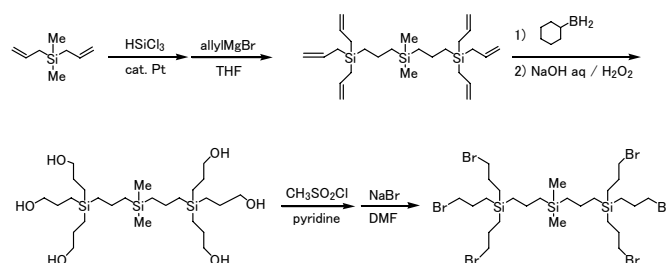
カルボシランデンドリマーの合成が最初に報告されてから、その世代数を増すための研究が続き、現在はその表面あるいは内部に機能性分子を導入し、新たな機能性材料の創製が検討されている。⁵⁾ 通常、カルボシランデンドリマーの世代拡張はコア分子の

2 重結合へのヒドロシレーション反応、次いでアルケニル化反応を繰り返すことにより行われる。ヒドロシレーション反応の際、用いるヒドロシランとして Me_2SiHCl , MeSiHCl_2 , あるいは HSiCl_3 を使い分けることによって各世代における分岐数を 1 から 3 まで選択することが可能である。更に、分岐のケイ素間の長さは用いるアルケニル化剤の炭素鎖により調節可能である。従って、世代拡張に用いるヒドロシラン、およびアルケニル化剤の選択により、カルボシランデンドリマーの形状、サイズ、更には分岐数までもコントロールできることになる。これは、カルボシランデンドリマーを機能性糖鎖の担体として用いる際にはきわめて好都合で、担体の形状および担持糖鎖数を望み通りに作り上げること (テーラーメイド) が可能となる。従って、ベロ毒素等の受容体部分に適するサイズならび担持糖鎖数を備えたカルボシランデンドリマーの分子設計が可能となる。加えて医薬品としての利用を考えた場合、ポリ (アミドアミン) 系のデンドリマーのような窒素原子を分岐点とする塩基性デンドリマー⁶⁾ とは異なり、カルボシランデンドリマーは中性で生体内物質との相互作用が少ないことが長所として挙げられる。

2. 結果と考察

2.1 デンドリマー構造と生物活性の相関

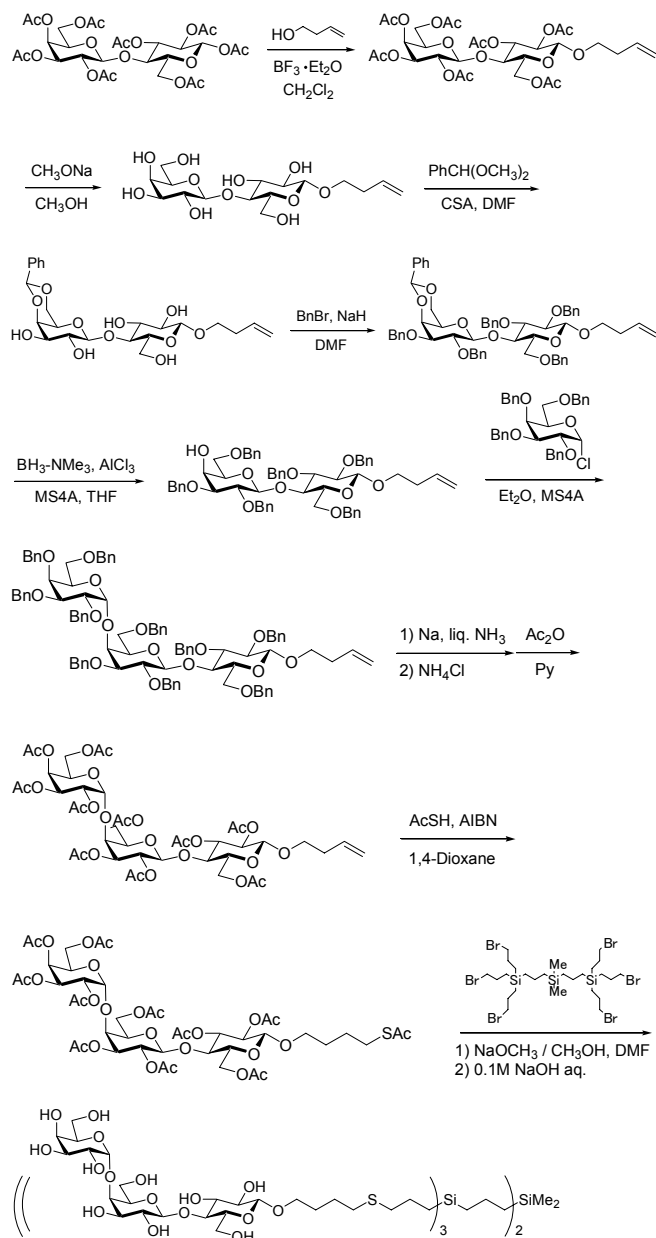
まず、グロボ三糖を導入するために末端を臭素化したカルボシランデンドリマーの合成経路の一例を式 1 に示した。



Scheme 1 Preparation of brominated carbosilane dendrimer.

また、グロボ三糖 (Gb3) の合成経路とそのカルボシランデンドリマーへの導入経路を式 2 に示す。

カルボシランデンドリマーと結合するアグリコン部分にはスルフィドアニオンの強い求核性を利用することを念頭に、その前駆体としてチオベンジル基あるいはチオアセチル基を糖鎖のアグリコン末端に導入した化合物を合成した。⁷⁾



Scheme 2 Synthesis of Dumbbell(1)6.

これらカルボシランデンドリマーとグロボ三糖誘導体を組み合わせることにより一連のグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを合成し、それらを SUPER TWIG と命名した。その代表例として3つの化合物、Fan(0)3, Dumbbell(1)6 および Ball(1)12

(括弧内は世代数、末尾は糖鎖担持数)を示す(図3)。SUPER TWIG の分子サイズを計算した(持田製薬、黒川博士、松末両氏に依頼)ところ Fan(0)3 は伸びきった状態で 38 Å、Dumbbell(1)6 および Ball(1)12 はそれぞれ 47 Å、および 53 Å と評価された。一方、標的とするペロ毒素の分子サイズは 62 Å であることが知られている(図4)。

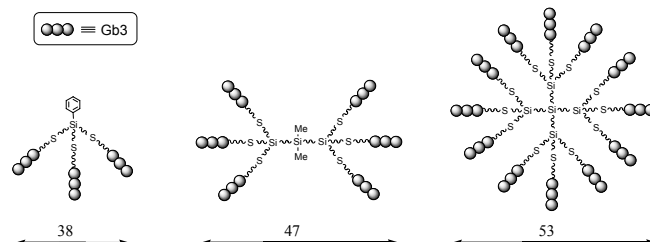


Fig. 3 Structure and molecular size of Fan(0)3, Dumbbell(1)6 and Ball(1)12.

1 分子のペロ毒素に 1 分子の SUPER TWIG が結合すると仮定した場合、Dumbbell(1)6 および Ball(1)12 は複数の受容サイトに同時に結合可能であり、Fan(0)3 はそれが困難であると推測される。ちなみに、ペロ毒素の結合サイト 1 (図1) に Dumbbell(1)6 のグロボ三糖を結合させた後、最適化を行うと図4の構造が得られた。もちろん、実際の結合状態は結合した状態での結晶化・X線構造解析によらなければ決定できないことは言うまでもない。

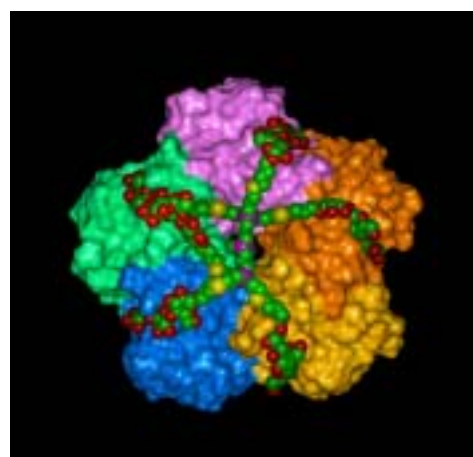


Fig. 4 Docking model of Dumbbell(1)6 and B subunit.

2.2 生理活性評価

合成した SUPER TWIG のペロ毒素中和能に関する評価を、国立国際医療センター研究所、名取、西

川岡博士に行っていただいた。上記3つの SUPER TWIG についてベロ毒素中和効果の測定結果について以下に述べる。⁸⁾

Table 1. Binding assay of SUPER TWING for Vero toxin (IC₅₀: µg/mL).

	Fan(0)3	Dumbbell(1)6	Ball(1)12
Stx1	43	0.22	0.16
Stx2	>100	2.3	1.3

人体に悪性な作用をするベロ毒素には Stx1 および Stx2 と標記される2種類があり、特に Stx2 は強い作用を示す。したがって、Stx2 に対する強い中和活性を示す薬剤の開発が望まれている。まず、SUPER TWIG; Fan(0)3, Dumbbell(1)6, Ball(1)12, のベロ毒素に対する結合阻害活性試験 (*in vitro*) の結果を表1に示す。Fan(0)3 は Stx1 および Stx2 共に効果が低く、Dumbbell(1)6 および Ball(1)12 は効果が高いことが見て取れる。特に、Stx2 に対する効果に着目すると、Fan(0)3 の IC₅₀ は 100 以上でありベロ毒素中和に多量の Fan(0)3 が必要であることを示している。それに対して Dumbbell(1)6 および Ball(1)12 の IC₅₀ は、それぞれ 2.3 および 1.3 とほぼ同等の高い効果を示し、さらに Fan(0)3 のそれに比べると2桁小さいことが分かった。これらの IC₅₀ の値を、直接、これまで報告されているポリマーあるいはデンドリマーを担体としてグロブ三糖を担持した化合物の IC₅₀ と比較することは、それぞれの研究で使用している評価方法が異なるため厳密な意味では困難であるが、いずれもほぼ同等の値と推測される。しかし、これらすでに報告されているポリマー等に集積化した化合物は、*in vivo* でのベロ毒素中和活性を示していなかった。

今回得た、Fan(0)3, Dumbbell(1)6, および Ball(1)12 それぞれについてベロ毒素と SUPER TWIG を同時にマウスに投与する実験を行った。その結果を表2に示す。Fan(0)3 は *in vitro* の結果から予想されたとおり、コントロールマウスとほとんど同じ結果であった。一方、Dumbbell(1)6 はきわめて強い中和活性を示し、すべてのマウスを完全に救

命する結果を与えた。これは明確な構造を有する物質が生体に対して中和効果を発揮することを見いだした最初の例である。しかし、不思議なことに Dumbbell(1)6 と同等以上の IC₅₀ を示した Ball(1)12 は1日程度の延命効果はあるものの弱い中和効果しか示さなかった。

Table 2. Neutralization test (*in vivo*) of Vero toxin utilized SUPER TWIG.¹⁾

Fan(0)3	Dumbbell(1)6	Ball(1)12
Dead within 4 days	Alive over 2 months	Dead within 5 days

¹⁾ Intravenous injection of the each dendrimer together with *E. coli* on mice. All of control mice were dead within 4 days

Fan(0)3 の効果が低いことは分子サイズが小さいことが理由として考えられるが、*in vitro* で IC₅₀ がほぼ同等の Dumbbell(1)6 と Ball(1)12 の間に著しい効果の違いが発現する理由は明らかではない。

以上、ベロ毒素の中和作用に対してカルボシランデンドリマーの構造が強い影響を与えることを明らかとすることが出来た。更に、*in vivo* で強い活性を示すことが分かった Dumbbell(1)6 の治療薬としての効果を測定するため、奈良県立医科大学教授・喜多博士に依頼してベロ毒素に感染させたマウスを用いて、感染後3日目から4日間 Dumbbell(1)6 の投与を行った。その結果、コントロールマウスは14日後にすべて死に至ったが Dumbbell(1)6 を投与したマウスはすべて生存し続けることが分かった。この結果は Dumbbell(1)6 がベロ毒素感染後の治療薬として有効であることを示している。

3. まとめ

有機ケイ素化学の観点からみれば、カルボシランデンドリマーは中性の物質で、非結晶性で比較的柔軟な構造を有し、合成が容易でもある。また、カルボシランデンドリマーはそのサイズ、形状および末端官能基数を自在に調整可能である。グロブ三糖担持カルボシランデンドリマーを実際に医薬品として使用するためには、グロブ三糖担持カルボシランデンドリマーの生体内での挙動を確認し毒性等につい

での厳密な調査が必要ではあるが、今回の研究により新たな薬剤開発への基本的コンセプトの一つを提案し得たものと考えている。

一方、最近、種々の糖鎖が生体内で毒素あるいはウイルスの感染作用において特異的かつ重要な機能を果たしていることが明らかにされつつある。したがって、カルボシランデンドリマーは、その末端に機能性糖鎖を担持することによって、標的とする毒素あるいはウイルス等にサイズ・形状などを合目的に分子設計するための担体として、研究的あるいは実用的観点から優れた材料であると考えられ、今後の発展が期待される。

謝辞

本研究は機能材料工学科、葛原弘美（元）教授の発案で始められました。ここに記して感謝致します。本研究は平成14年度から厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）を受けて国立国際医療センター研究所部長、名取泰博博士、同室長、西川喜代孝博士、ジーエスプラッツ（株）部長、平野弘之氏との共同研究として実施されました。マウスを用いる実験を行って頂きました奈良県立医科大、喜多英二教授に感謝致します。多くのご助言とベロ毒素とカルボシランデンドリマーの接着状態に関する計算をして頂きました持田製薬（株）黒川美佐男博士、松末朋和氏に感謝致します。本研究を推進するにあたり、協力していただきました埼玉大学大学院博士後期・前期課程の学生諸氏に感謝いたします。また、本研究は平成16―18年度埼玉大学総合研究機構研究プロジェクト補助金を継続的に受けて実施しております。

参考文献

- 1) a) E. Stein, A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton, and R. J. Read, *Nature*, **355**, 748; 1992. b) H. Ling, A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton, and R. J. Read, *Biochemistry*, **37**, 1777, 1998
- 2) A. Kiarash, B. Boyd, and C. A. Lingwood, *J. Biol. Chem.*, **269**, 11138, 1994; b) B. Boyd, G. Magnusson, Z. Zhiuyan, and C. A. Lingwood, *Eur. J. Biochem.*, **223**, 873, 1994
- 3) C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 199, 1983
- 4) G. D. Armstrong, E. Fodor, and R. Vanmaele, *J. Infect. Dis.*, **164**, 1160, 1991; b) Y. Nishida, H. Dohi, H. Uzawa, and K. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8681, 1998; c) H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, M. Shinkai, T. Kobayashi, T. Takeda, H. Uzawa, and K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2053, 1999; d) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, and D. R. Bundle, *Nature*, **403**, 669, 2000; e) G. L. Mulvey, P. Marcato, P. I. Kitov, J. M. Sadowska, D. R. Bundle, and G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.*, **187**, 640, 2003
- 5) a) Zeng and S. C. Zimmerman, *Chem. Rev.*, **97**, 1681, 1997; b) K. Lorenz, D. Holter, B. Stuhn, R. Mulhaupt, and H. Frey, *Adv. Mater.*, **8**, No.5, 414, 1996; c) 土田隆樹、島崎智恵美、幡野健、松岡浩司、青木良夫、野平博之、江角保明、照沼大陽、*高分子論文集*, **60**, 561, 2003
- 6) a) D. A. Tomaria, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym. J.*, **17**, 117, 1985; b) K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules*, **28**, 5391, 1995
- 7) a) K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Esumi, D. Terunuma, and H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7839, 1999; b) K. Matsuoka, H. Kurosawa, Y. Esumi, D. Terunuma, and H. Kuzuhara, *Carbohydrate Res.* **329**, 765, 2000; c) 照沼大陽、松岡浩司、幡野健、21世紀の有機ケイ素化学 ―機能性物質の科学の宝庫―、シーエムシー出版、258, 2004
- 8) 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, Y. Natori, *PNAS*, **99**, 7669, 2002