

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：糖モジュール法による中分子糖鎖クラスターによる毒素タンパク質阻害剤の開発
Development of glycocluster for protein toxin inhibitor by glycomodule
method

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：三浦 佳子
Yoshiko Miura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
九州大学大学院工学研究院化学工学部門 教授
Department of Chemical Engineering Graduate School of Engineering,
Kyushu University, Professor

II 研究開発の概要

糖鎖とタンパク質の相互作用は、糖鎖を集合させた糖クラスターによって、多価効果を発揮し、大幅に増強されることが知られている。糖鎖は、種々の生命現象の分子認識を担っていると同時に、感染症のリガンドとしても機能している。細菌毒素である、志賀毒素、コレラ毒素は AB5 構造のタンパク質であり、糖鎖結合サイトが密集した構造を有しており、糖鎖リガンドを強く認識することが知られている。重合性の糖誘導体を利用し、糖鎖を機能モジュール構造に分解して疑似生理活性糖クラスターを合成することで、簡便に優れた分子認識能を発現できる。本研究では重合性の糖を利用して糖クラスターを調製し、細菌毒素阻害剤に対して強い相互作用を発揮する糖クラスターの創製を行った。細菌感染症では、消化管が病原性細菌によって侵され、毒素タンパク質が体内に取り込まれる。糖クラスターが阻害剤として、毒素タンパク質を吸着することができれば、細菌感染症の治療効果を発揮し得る。そこで、糖クラスターの合成、生理活性、治療法、生体安全性などを検討し、糖クラスターを利用した細菌感染症の創薬について検討を行った。

(1) グロボ糖クラスター化合物による、腸管出血性大腸菌感染症治療法の開発

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は *E. coli* O-157 : H7 などの病原性大腸菌による感染症で、志賀毒素が病原体である。志賀毒素のリガンドは Gb3 (グロボ) 糖脂質であり、グロボ糖の糖クラスターによる、志賀毒素阻害剤の開発が可能である。

まず、グロボ糖のビニル誘導体を、合成する手法を確立し、プロトコル化した。合成したグロボ糖ビニル誘導体は、疎水性基やアミノ基を有するビニル誘導体、その他の重合性化合物とともにラジカル重合し、Gb3 糖クラスターを調製した。Gb3 糖クラスターの粒径制御法、再現性のよい合成方法を確立し、Gb3 糖クラスター

の物性の取得を行った。

Gb3 糖クラスターを利用した、志賀毒素 1 型、2 型の中和能について、EHEC の破砕液を用いて、ベロ細胞を用いた中和能の測定を行った。グロボ糖と疎水性官能基を持つ Gb3 糖クラスターについて、志賀毒素に対する強い中和効果を有していた。組成の異なる糖クラスターについて検討すると、グロボ糖、疎水基、アミノ基を一定の含有率で有する特定の糖クラスターが強い毒素中和能を有していた。志賀毒素のリガンドであるグロボ糖だけでなく、疎水基、アミノ基といった他の官能基も含めた精密な分子の調整、また粒子の大きさが志賀毒素の中和には重要あることが示唆された。水晶発振子 (QCM) を用いて、Gb3 糖クラスターと志賀毒素 1 型 2 型の結合を測定したところ、それぞれ抗体に匹敵する強い結合を有していることがわかった。志賀毒素を含まない大腸菌破砕液を加えた場合には殆ど結合が観察されず、Gb3 糖クラスターの結合は志賀毒素に特異的で強いことが示された。

次に、Gb3 糖クラスターを用いた EHEC の中和作用と治療法について病原性細菌に感染させたモデルマウスを利用して検討した。EHEC に感染した無菌マウスに対して Gb3 糖クラスターを自由飲水により投与した。EHEC の感染はマウスに対して強い毒性を発揮し、全例死亡に至った。一方で、Gb3 糖クラスターを摂取したマウス群は明確に致死率が低下し、明らかな有意差が認められた。Gb3 糖クラスターが志賀毒素と結合して、毒素を捕捉して中和することで、治療効果が認められた。また、EHEC に感染させたマウスの解剖による腸管の出血性病変は、対照群では全例に十二指腸から回腸にかけて出血性病変と水分の貯留が観察されたが、Gb3 糖クラスター投与群では、出血性病変が殆ど観察されなかった。また、抗生物質を併用した治療法について検討を行った。抗生物質を投与すると細菌の死滅によって、細胞内から毒素タンパク質の過剰な放出を招き、志賀毒素発現誘導剤になる。抗生物質のみを投与した群では、志賀毒素の放出によって、マウスの致死率は高かった。Gb3 糖クラスターを同時に摂取したマウスでは、放出された志賀毒素が吸着され、明確な致死率低下を示し、優れた治療効果を発揮した。また、体内の EHEC の数を調べたところ、抗生物質の投与によって、体内の EHEC の菌数は大幅に減少した。Gb3 糖クラスターのみを投与した群でも EHEC への治療効果があるが、菌数を減じることはできない。このように Gb3 糖クラスターと抗生物質を併用することで抗生物質による毒素放出の副作用を抑制し、病原細菌に対する滅菌作用を発揮することが可能で、迅速な治療法が開発できることを示唆していた。また、Gb3 糖クラスターの濃度を変化させて、生体毒性をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) によって、検討した。一定の濃度まで、細胞生存率は低下せず、マウスで治療効果を示した濃度域では生体毒性が認められないことを明らかにした。

Gb3 糖クラスターの体内分布を放射ラベルし、マウスに経口投与して体内動態を測定した。3H-ラベル化した、重合性分子を用いて、グロボ糖誘導体と共にラジカル重合して放射ラベル Gb3 糖クラスターを調製した。このラベル化糖クラスターを経口投与した後、24 時間後の体内動態分布を調べた。多くの糖クラスターは生体外に排出されており、臓器への蓄積は殆ど見られず、肝臓に微量の糖クラスターの蓄積が観測されたが、全体の投与量の 1%程度と微量であった。肝臓以外の臓器への集積は殆ど認められなかった。さらに、Gb3 糖クラスターに含まれる、電荷、疎水基の含有量を変化させて、消化管からの吸収を検討し、官能基の違いで消化管からの吸収を減少させることができることを明らかにした。加えて、Gb3 糖クラスターをポリエチレングリコールで表面を被覆する方法を開発して動態を測定したところ、消化管からの吸収を一層減少させる方法についても明らかにした。このことから、Gb3 糖クラスターを経口投与すると、消化管で糖クラスターが作用しても、腸管から取り込まれて血中に移行しないことが明らかになった。

Gb3 糖クラスターは志賀毒素の中和剤として有意な効果が観測され、抗生物質との併用も含めた新しい治療法が示唆された。ヒト細胞による生体毒性は治療濃度域では低く、体内動態の測定からは腸管からの血中への取

り込みが殆どないことを示唆していた。Gb3 糖クラスターは有効性と安全性が高い新規な中和剤として作用することを明らかにした。

(2) GM1 ミミック糖クラスターによるコレラ毒素阻害剤の検討

GM1 の非還元末端であるガラクトース (Gal) とノイラミン酸 (Neu5Ac) を共重合した糖クラスターは GM1 と類似した機能を発揮し得ることを研究代表者は報告してきた。

Gal と Neu5Ac の含有率、及び疎水性官能基を種々変化させた糖クラスターを酸素耐性のある光電子移動ラジカル重合法を利用した重合法によって、ライブラリー合成して、最適組成について設計した。30 種類以上の糖クラスターを検討して、最適組成の GM1 様の糖クラスターを決定した。この GM1 糖クラスターについては、GM1 をリガンドとする、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) との結合スクリーニングを表面プラズモンイメージング (SPR-I) によって測定した。Gal と Neu5Ac の含有量によって、CTB の結合量は大幅に変化し、最も優れた糖含有率を決定することで、結合量は 8 倍程度の増強できることがわかった。解離定数は、抗体に匹敵する強さであり、GM1 を添加した阻害実験によって、CTB の GM1 結合部位と同じ糖結合ドメインに結合することがわかった。Gal の糖クラスターについて、疎水性基を加えた糖クラスターについても合成して、分子認識能を観察したところ、CTB の結合が増強された。また、GM1 ミミックのマイクロ粒子についてもライブラリーを合成し、CTB との結合を最大化させた。

GM1 糖ミミックについて、CHO-K1 細胞を用いて、コレラ毒素の中和活性を検討した。GM1 糖ミミックで中和活性が認められるものの、天然糖脂質 (GM1) に比べるとやや不十分であることが明らかになった。金微粒子を支持体として、糖クラスターを結合させた集合体を調製して、同様にコレラ毒素の中和活性を測定した。集積体では、コレラ毒素との相互作用が見られたものの、糖クラスター集積体の細胞への取り込みなどの異なる作用が観測され、中和活性は十分に測定されなかった。GM1 糖クラスターについては、中和剤について更なる分子の検討が必要であることが示唆された。

The saccharide protein interactions are greatly enhanced by the multivalent effect. Saccharides are responsible for molecular recognition of various biological phenomena and also function as ligands for infectious diseases. Bacterial toxins, such as Shiga toxins and cholera toxin strongly bind saccharides as ligands. By using polymerizable sugar derivatives, novel glycoclusters were prepared for the bacteria toxin inhibitors.

(1) Globosaccharide cluster for inhibitor of enterohemorrhagic *E. coli* infection

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) is an infectious disease caused by pathogenic *E. coli* such as *E. coli* O-157:H7, and Shiga toxin is the pathogen. The ligand of Shiga toxins are Gb3 (globo) glycolipid. Globosaccharide clusters were prepared for inhibitors of Shiga toxins.

A globosaccharide vinyl derivative was synthesized by a six-step reaction. Gb3 glycoclusters were prepared by radical polymerization together with other vinyl monomers. The polymerization conditions were investigated to determine to control Gb3 glycocluster properties. The neutralizing effect of Gb3 glycoclusters to Shiga toxin -1 and -2 were investigated with Vero cells and quartz crystal microbalance (QCM). In the neutralizing assay with Vero cells, the strong and specific binding of Gb3 glycoclusters to Shiga toxins were observed. In the QCM experiments, the quantitative binding of a Gb3 glycocluster to Stxs were measured, and strong and specific interactions comparable to that of antibodies were observed. The EHEC treatment using Gb3 glycoclusters was examined with EHEC infected mice. The mice group with Gb3 glycoclusters showed a clear reduction in lethality. The administration of simultaneous antibiotics and Gb3 glycoclusters were also investigated to show a significant reduction in lethality and of the number of bacteria. The cytotoxicity of the Gb3 glycocluster in the therapeutic concentration range was examined with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and it was found that there was almost no toxicity. The distribution of Gb3 glycoclusters in the body was studied by the radiolabeled compounds. Most of the Gb3 glycoclusters were little accumulation in organs. The distribution of the glycoclusters in the body changed depending on the functional groups and polymer coating. The Gb3 glycocluster was effective as a new neutralizer of Shiga toxin, suggesting a new therapeutic approach.

(2) GM1 mimic glycocluster for cholera toxin inhibitor

Our group has reported that the copolymers with galactose (Gal) and neuraminic acid (Neu5Ac), the non-reducing end of GM1, mimicked the function of glycolipid GM1. The optimal composition was designed by synthesizing a library of glycoclusters with various ratios of Gal and Neu5Ac and hydrophobic functional groups. The optimal composition of the GM1-mimic glycocluster was determined by examining more than 30 different sugar clusters. The GM1-mimic glycocluster was screened for binding to the cholera toxin B subunit (CTB), the ligand for GM1, by surface plasmon imaging (SPR-I). The binding amount could be enhanced by about 8-fold and the dissociation constant was found in the order of 10^{-8} M.

The neutralizing activity of GM1 mimics against cholera toxin was examined using CHO-K1 cells, and it was found that the neutralizing activity of GM1 mimics was observed, but was slightly less than that of natural glycolipids (GM1). The GM1-mimic glycoclusters were assembled on the gold nanoparticle to increase the affinity cholera toxins. However, different effects such as cellular uptake of the sugar cluster aggregates were observed and the neutralizing activity was not sufficiently measured, suggesting that further molecular investigation of the neutralizing agent is needed for GM1 sugar clusters.