

B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発

所属 熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野
研究代表者 満屋 裕明
研究協力者 鎌田 伸好

研究要旨：本研究は日本と世界で広く用いられている B 型肝炎ウイルス (HBV) の核酸系逆転写酵素 (RT) 阻害剤である entecavir (ETV) 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロフィールが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない (又は著しく遅延させる) 新規の薬剤をデザイン・合成・同定し、臨床開発へと進めようとするものである。本プロジェクトは新規の HBV 感染症治療薬の臨床開発に特化、焦点を定め、新規の候補薬の合成・探索・同定を一義的な目的とし、HBV をトランスフェクトした肝癌細胞株によるハイスループットな薬剤評価系を開発、HBV 各遺伝子型感染肝炎モデル動物を用いてリード化合物を評価、要に応じて特許申請等を行いながら、最適化 (optimization) を進め、PK/PD 及び安全性の検討を同時的に行い、前臨床、早期臨床試験を視野に入れたプロジェクトとし、実用化に繋ぐ。

A. 研究目的

本研究では抗 HBV 活性を有する新規化合物のデザイン・合成を目途 (もくと) として、結晶解析学などを駆使した HBV の逆転写酵素の活性部位の微細構造の解明に着手する。既に満屋研究グループは未発表誘導体を始めとして 100~150 個のヌクレオシド誘導体を手にしており、少なくともその一部は HIV-1 の RT に対して一定の阻害能を有している事を確認している。本プロジェクトではヌクレオシド系 RT 阻害剤に必ずしも限定せず、必要に応じて抗 HIV 剤として既に確立されている非ヌクレオシド系 RT 阻害剤で HBV 活性を有する物質をも対象として探索・デザイン・合成・同定を進める。研究代表者 (満屋) は既に 3 種類の HIV の逆転写酵素 RT 阻害剤の臨床応用に成功しており、

HBV の RT 阻害剤の初期開発の経験も有することから実薬の開発に成功する可能性は高いと期待される。また第二世代のプロテアーゼ阻害剤で HIV 感染症/AIDS のファーストライン治療薬として世界中で汎用されている darunavir の開発にも成功しており、本プロジェクトによって RT 阻害剤とは異なったクラスの実薬開発に成功する可能性も低くないと期待される。そのようなリード化合物が同定されれば、HBV ウイルス変異株をヒト肝細胞キメラマウスに感染させた肝炎モデルを用いて、HBV 遺伝子型や各種変異体における新規抗ウイルス薬の評価を行い、劇症肝炎や肝線維、肝発癌などの病態に与える影響についても検討を重ねる。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価：抗

HIV-1活性の評価には実験室内野生株である HIV-1_{LAI}株およびヒトT細胞由来MT2細胞を用いたMTTアッセイ法を用いた。また各化合物の細胞毒性は、MT2細胞及びヒト肝癌由来の細胞株であるHuh-7細胞を用いたMTTアッセイにより評価した。

1) 検討中の化合物の抗HBV活性評価：抗HBV活性の評価には、研究分担者である田中博士より譲与頂いたHep2.2.15.7細胞を用いた。Ficoll-Paqueを用いてHep2.2.15.7細胞のviabilityを高めた後、 4×10^3 個ずつ96穴プレートに播き、day 3, 5で化合物を含む液体培地と上清を交換し、day 7で無血清培地に交換した後に2日おいて培養上清を回収し、直接もしくはviral DNAを抽出した後、Primerdesign社のqPCR detection kit およびIllumina社のPCR機器を用いたreal time PCR法に使用する事で各化合物の抗HBV活性を評価した。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当するIRBで倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。他方で臨床応用に必要な検討事項についても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果

B型肝炎の治療薬、lamivudine (3TC; Zeffix®)、tenofovir (TDF)、entecavir (ETV)、更に最近我々が同定して初期開発に成功、米国メルク社に導出して臨床開発途上にある、野生型と多剤耐性HIV-1株の双方に強力な活性を発する次世代型逆転写酵素阻害剤4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)のHBV及びHIVに対する活性を定量して次のよ

うな結果を得た。

3TCとTDFはHBVとHIVの双方に対して中等度の活性を発揮したが、ETVはHBVに強力な活性を示すものの、HIVには殆ど活性を示さなかった。対してEFdAはHIVに対して強力な活性を発揮するが、HBVには殆ど活性を発揮しなかった。このようなデータは(i) HIVのRTの活性部位(結晶解析データあり)の構造がHBVのRTの構造(結晶構造は知られていない)とは可成り異なること、更に(ii)これ迄にHIVに対する活性が低い事でdeep freezerに「保存」されたままになっているcompoundsのある種のもものがHBVに対して強力な活性を発揮する可能性がある事を示唆した。次いで我々は抗HBV活性と抗HIV-1活性を有すると期待される新規に合成されたヌクレオシド誘導体67種類(分子量:239.2-455.3)について、MT2細胞を標的細胞としたMTT assay法により野生株(HIV-1_{LAI})に対する抗HIV活性、及びヒトT細胞由来の細胞株であるMT2細胞に対する細胞毒性、加えてヒト肝癌由来の細胞株であるHuh-7細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、67化合物中23化合物が野生HIV-1株に対し1 μ M未満のEC₅₀値を有し、実測値はEC₅₀:0.0001-0.9104 μ Mであった。また、67化合物中52化合物はMT-2細胞に対してCC₅₀(50% cytotoxicity concentration:50%細胞毒性濃度)値が100 μ Mを超え、明らかな毒性を示さなかった。また、37化合物中24化合物はHuh-7細胞に対して明らかな毒性を示さなかった。これら新規の核酸アナログ候補化合物のうち、その化学構造特性や抗HIV-1活性を考慮した上で15種類を選択し、本研究分担研究者である田中博士のグループにより試験管内での抗HBV活性について検討した結果、2種類の化合物において抗HBV活性が確認できた。また、残りの

52 化合物について研究代表者満屋、研究分担者天野・青木、研究協力者鋤田により抗 HBV 活性の検討を行っているが、現時点までに少なくとも 2 種類の化合物について、real-time PCR 法で HBV DNA の合成阻害活性を見出した。また研究分担者原口博士のグループが合成した 15 化合物のうち、8 化合物について抗 HBV 活性評価を終了したが、明らかな HBV DNA 合成阻害活性を認めなかった。

D. 考察

我々（満屋研究グループ）は未発表誘導体を始めとして 150~200 個のヌクレオシド誘導体を手にしており、少なくともその一部は HIV-1 の RT に対して一定の阻害能を有している事を確認している。本研究ではヌクレオシド系 RT に必ずしも限定せず、必要に応じて抗 HIV 剤として既に確立されている非ヌクレオシド系 RT 阻害剤で HBV 活性を有する物質も対象として探索・デザイン・合成・同定を進めていくが、既に候補化合物群において抗 HBV 活性を示す複数の化合物を同定し得た。今後本研究において得られるであろう HBV RT の微細立体構造の知見も基にしながら、これら hit 化合物の構造最適化・合成展開を図り、更に強力な抗 HBV 感染症治療薬の開発に推進していく。

E. 結論

近年に至って、C 型肝炎ウイルス (HCV) による肝炎の治療は長足の進歩を遂げて、現在開発中の抗 HCV 薬が臨床で使用可能となると、殆どの HCV 感染者で「治癒」が得られると期待される。しかし、HBV に対する新規の治療薬の開発は遅々として進まず、HBV を体内から除去するという意味での「治癒」をもたらす治療法は極めて困難とされており、また現在使用され

ている治療薬に対しても耐性を獲得した HBV 変異株の出現が大きく懸念されている。本プロジェクトで、これ迄より強力で HBV の耐性獲得に抵抗する新規の治療薬の開発が成功すれば、現在日本国内に 150 万人存在すると推定される HBV 保有者に大きく裨益すると思われる。殊にそうした保有者の 5% が慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症するとされるので、QOL のみならず救命も可能となり、国民衛生に大きく資する事となると期待される。また本プロジェクトでは HBV 逆転写酵素の活性部位の微細構造の解明をも併せて行い、HBV の生物学を明らかにする事で、HBV の更に効果的な制御をも視野に入れており、他のウイルス感染症の制御の方途を探る上でも貢献するものと期待される。また本プロジェクトではキメラマウスを用いた B 型肝炎モデルを作製する事で、HBV 変異株に対する新規薬剤の作用の観察が可能となることで新規治療薬の開発のタイムスケールの大幅短縮が期待され、将来の HBV の新規の治療薬開発にも大きく貢献すると強く期待される。

F. 研究発表

論文発表 (当該年度のみ)

1. Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gómez PM, Campbell JR, Das D, Aoki M, Xu CX, Rao KV, Ghosh AK, Mitsuya H. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5):2036-46. 2013.
2. Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano H, Ide K, Koh Y, Mitsuya H. Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396. 2012.
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311. 2012.
4. Yarchoan, R. and Mitsuya, H. (2012) Development of the first AIDS drugs: AZT and other dideoxynucleosides. In Human Immuno deficiency Virus Reverse Transcriptase (ed. S.DeGrice) Springer 2012 (in press)
5. Ghosh AK, Anderson DD, Weber IT, Mitsuya H. (2012) Enhancing protein backbone binding--a fruitful concept for combating drug-resistant HIV. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(8): 1778-802
6. Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348i, a connection subdomain drug resistant HIV-1 reverse transcriptase mutant. *Cell. Mol. Biol.* 58:187-95. 2012.
7. Ndongwe TP, Adedeji AO, Michailidis E, Ong YT, Hachiya A, Marchand B, Ryan EM, Rai DK, Kirby KA, Whatley AS, Burke DH, Johnson M, Ding S, Zheng YM, Liu SL, Kodama E, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK, Mitsuya H, Parniak MA, Singh K, Sarafianos SG. Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 40:345-59. 2012.
8. Sohl, C.D., Singh, K., Kasiviswanathan, R., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., Anderson, K.S. Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase γ with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:1630-4. 2012.
9. Murphey-Corb, M., Rajakuma, P., Michael., H., Nyaundi, J., Didier, P.J., Reeve, A.B., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., and Parniak MA. Response of simian immunodeficiency virus to the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:4707-12. 2012.
10. Maeda, K., Das, D. Nakata, H., and Mitsuya, H. CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges. *Expert Opin Emerging Drugs* 17:135-45. 2012.

11. Sohl, C.D., Kasiviswanathan, R., Kim, J., Pradere, U., Schinazi, R.F., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Baba, M., Anderson, K.S. Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Pharmacol.* 82:125-33. 2012.

学会発表 (国際学会・当該年度のみ)

1. **Hiroaki Mitsuya.** 4'-Ethyneyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA), a Translocation Defective Reverse Transcriptase Inhibitor with Highly Potent Activity against Diverse Multi-Drug-Resistant HIV-1 Variants. HIV DART 2012; Frontiers in Drug Development for Antiretroviral Therapies. December 4-7, 2012, San Diego, CA, USA.
2. **Hiroaki Mitsuya.** Structure Guided Development of AIDS Therapeutics: Successes, Challenges, and Opportunities. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.
3. Hiroto Nakata, D Das, K Maeda, K V. Rao, A K. Ghosh, **H Mitsuya.** GRL-007: a Novel Small Molecule CCR5 Antagonist Potent Against a Wide Spectrum of HIV-1. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.
4. Masayuki Amano, Y Tojo, M Aoki, S G. Pedro-Miguel, J R. Campbell, A K. Ghosh, **H Mitsuya.** A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI)

GRL-0519A Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.

5. Manabu Aoki, H Hayashi, H Aoki-Ogata, C D. Martyr, A K. Ghosh, **H Mitsuya.** GRL-01511A: a Novel HIV-1 Protease Inhibitor Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1s. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods
Date of Issuance: December 30, 2008
US Patent Number: 7,470,506
Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), **Mitsuya; Hiroaki** (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)
Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.
Appl. No.: 09/720,276
Filed: June 23, 1999
PCT Filed: June 23, 1999
PCT No.: PCT/US99/14119
371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001
PCT Pub. No.: WO99/67417
PCT Pub. Date: December 29, 1999
- (2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2'-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP);

Hiroshi Ohrui, Sendai (JP); Eiichi Kodama,

Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP);

Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

- (3) The Name of the Patent: CCR5 modulators for
treating HIVUSPTO Application No.:
61/315,669. Arun K. Ghosh (West Lafayette,
IN), **Hiroaki Mitsuya** (Chevy Chase, MD),
Assignee: Purdue Research Foundation, PCT
Filed: March 18, 2011

2. 実用新案登録

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等 研究事業）
分担研究報告書

PK/PDの解析と毒性評価に関する研究

分担研究者 小田切 優樹 崇城大学薬学部・教授

研究要旨

新規薬物の開発段階で、吸収・分布・代謝・排泄をはじめとした薬物動態特性の詳細を明らかにすることは、薬物の薬効や安全性の予測を可能にするとともに、さらには至適投与設計を行う上において有用な情報につながる。そのため、薬物動態試験は前臨床、臨床試験段階において必要不可欠な検討項目の一つである。近年、分析機器の進化に伴い、ラジオアイソトープ法に加え、質量分析計を用いた新規薬物の体内動態解析が行われるようになってきている。本研究事業においても、候補化合物の薬物動態試験は定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システム (Waters) を用い、前臨床、臨床試験と解析を行っていく予定である。そこで今年度は、体内動態実験に必要な定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システムの測定条件設定を行った。

A. 研究目的

臨床試験に新規薬物が進むためには、前臨床試験での製剤化・薬物動態・薬理・安全性試験など数多くの試験をクリアする必要がある。中でも、新規薬物の開発段階で、実験動物において、吸収・分布・代謝・排泄をはじめとする薬物動態特性を明らかにすることは、臨床試験における投与設計やヒトにおける安全性の予測につながるため必要不可欠な検討項目の一つである。これまでの体内動態実験は新規化合物に³Hや¹⁴Cなどのラジオアイソトープを全合成によって組み込んだ放射活性標識化合物を作成し、新規化合物の吸収・分布・代謝・排泄を明らかにする方法が標準的な体内動態試験であった。しかしながら、近年、分析機器の進化に

伴い質量分析計を用いた新規薬物の体内動態解析が行われるようになってきている。質量分析計を用いた体内動態検討はラジオアイソトープを用いた体内動態検討に比べ、(i) アイソトープ施設などの特殊な実験施設が不必要、(ii) 被ばくの危険性が無い、(iii) 放射活性標識化合物の新たな全合成が不必要で比較的安価、などの利点を有している。その反面、質量分析計を用いた体内動態実験では、新規化合物一つ一つに対しての適切な測定条件を構築する必要がある。

本研究事業においては、定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システム (Waters) により前臨床、臨床試験と体内動態解析を行っていく。今年度は体内動態実験に必要な定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システ

ムのセットアップと新規化合物中にその一部が含有されると推定される化合物X (グアノシン5'-リン酸; Figure 1) の測定条件設定を行った。

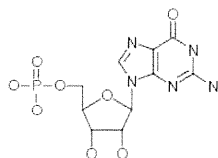


Figure 1

Chemical structure of compound X

B. 研究方法

推定類似体Xの検出条件は以下の条件で行った。

【LC条件】

- ・ サンプル温度 ; 5°C
- ・ 注入量 ; 1 uL
- ・ 洗浄溶媒 ; メタノール
- ・ カラム ;

ACQUITY UPLC HSS T3

(1.8 um, 2.1 x 100 mm)

- ・ 移動相A ; 0.1% ギ酸水溶液
- ・ 移動相B ; アセトニトリル
- ・ グラジエント

Time (min)	A (%)	B (%)	Curve
initial	99	1	—
1	99	1	6
8	1	99	6
12	1	99	6
12.1	99	1	6

※Curve 6 = リニアグラジエント

- ・ Run Time ; 15分
- ・ 流速 ; 0.4 uL/min

- ・ カラム温度 ; 40°C

【MS条件】

- ・ イオン化モード ; ESIネガティブ
- ・ 測定モード ; Resolution Mode
- ・ キャピラリー電圧 ; 2.5 kV
- ・ コーン電圧 ; 20 V
- ・ 脱溶媒ガス ; 1000 L/hr (650°C)
- ・ コーンガス ; 50 L/hr
- ・ イオン源ヒーター ; 150°C
- ・ 測定範囲 ; m/z 70 – 1,200
- ・ スキャン時間 ; 0.5 sec
- ・ コリジョンエネルギー ; 20 eV
- ・ Lock Mass ; Leucine Enkephalin
[M-H]⁻ 554.2615

C. 研究結果

上述した測定条件により新規化合物中にその一部が含有されると推定される化合物X (グアノシン5'-リン酸)の測定を行った。その結果、推定類似体Xと2つの推定類似体X由来 (分解物または代謝物)のピークが検出された (Figure 2)。

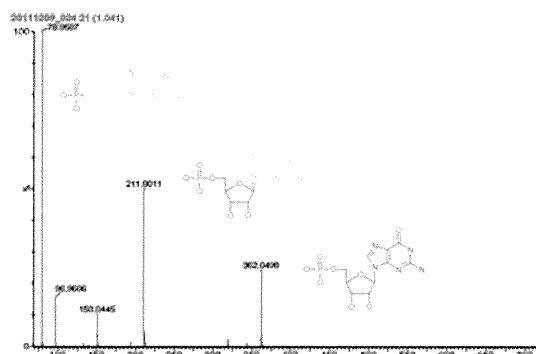


Figure 2

Representative chromatogram of compound X

D. 結論

今回、定量用質量分析計Xevo G2 TOF システムのセットアップと新規化合物中にその一部が含有されると推定される化合物X(グアノシン5'-リン酸)の測定に成功した。平成25年度は、候補化合物の新規合成が成されることが予想される。新規化合物が完成し次第、定量用質量分析計Xevo G2 TOFでの測定条件の設定と体内動態実験を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka KI, Mizushima T, **Otagiri M**, Maruyama T. Long-acting human serum albumin- thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) *in press*
2. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (2013) *in press*
3. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin

domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830:2917-23.

4. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* (2013) *in press*
5. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, **Otagiri M**, Kawai K. Pharmacokinetic Alteration of (99m)Tc-MAG3 using Serum Protein Binding Displacement Method. *Nucl Med Biol.* (2013) *in press*
6. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* (2013) *in press*
7. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome

- P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41:141-8.
8. Kadowaki D, Sumikawa S, Arimizu K, Taguchi K, Kitamura K, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**, Hirata S. Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats. *Life Sci.* (2012) 91:1304-8.
 9. Taguchi K, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, **Otagiri M**. A Fourteen-Day Observation and Pharmacokinetic Evaluation after a Massive Intravenous Infusion of Hemoglobin- Vesicles (Artificial Oxygen Carriers) in Cynomolgus Monkeys. *J Drug Metab Toxicol.*, (2012) 3, 1000128
 10. Ishima Y, Hara M, Kragh-Hansen U, Inoue A, Suenaga A, Kai T, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models. *J Control Release.* (2012) 164:1-7.
 11. Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.* (2013) 27:391-8.
 12. Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, **Otagiri M**, Sakai H, Yaegashi N. Liposome- encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model. *Life Sci.* (2012) 91:420-8.
 13. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, **Otagiri M**, Maruyama T. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochem Pharmacol.* (2012) 84:1207-14.
 14. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, **Otagiri M**, Maruyama T. α (1)-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *J Biol Chem.* (2012) 287:30688-700.
 15. Kaneko K, Chuang VT, Ito T, Suenaga A, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Arginine 485 of human serum albumin interacts with the benzophenone moiety of ketoprofen in the binding pocket of subdomain III A and III B. *Pharmazie.* (2012) 67:414-8.

16. Taguchi K, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications. *J Pharm Sci.* (2012) 101:3033-46.
17. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos.* (2012) 40:1423-8.
18. Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci.* (2012) 101:3222-9.
19. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life.* (2012) 64:450-4.
20. Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Characterization of hepatic cellular uptake of α 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: involvement of hemoglobin β -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* (2012) 101:1607-15.
21. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, **Otagiri M**. S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconjug Chem.* (2012) 23:264-71.
22. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Characterization of the hepatic cellular uptake of α (1) -acid glycoprotein (AGP), part 1: a peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* (2012) 101:1599-606.
2. 学会発表
(主な国際発表)
1. Watanabe H, Honda D, Miyamoto Y, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Tanaka M, Tanaka H, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the

- activation of NADPH oxidase. (49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012. 2012/5/24-27)
2. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VTG, Sato K, Otagiri M, Maruyama T. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress. (49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012. 2012/5/24-27)
 3. Otagiri M, Ishima Y, Maruyama T, Chuang VTG. Human serum albumin as a nanomedicine carrir. (Nanoformulation 2012. 2012/5/28-6/1)
 4. Otagiri M. The potential of albumin for use as a nanomedicine carrier. (Montreal 2012 international forum on enviroment and medicine. 2012/7/24-25)
- (主な国内発表)
1. 井上 亜希, 異島 優, 方 軍, 前田 浩, 小田切 優樹, 渡邊 博志, 丸山 徹. S-ニトロソ化アルブミンダイマーはEPR効果を増強する (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
 2. 濱崎 慶輔, 渡邊 博志, 弥永 直樹, 國安 明彦, 異島 優, 小田切 優樹, 丸山 徹. アルギニンペプチドを利用した細胞膜透過型アルブミンの設計と評価 (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
 3. 弥永 直樹, 渡邊 博志, 濱崎 慶輔, 國安 明彦, 異島 優, 小田切 優樹, 丸山 徹. In vivoファージディスプレイ法を用いた新規腎送達ペプチドの探索 (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
 4. 渡辺 佳織, 異島 優, 赤池 孝章, 澤智 裕, 黒田 照夫, 小川 和加野, 渡邊 博志, 甲斐 俊哉, 小田切 優樹, 丸山 徹. S-ニトロソ化に伴う α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (第12回日本NO学会学術集会 2012/6/29-30)
 5. 異島 優, 品川 拓也, 米重 梓二, 甲斐 俊哉, 赤池 孝章, 小田切 優樹, 丸山 徹. S-ニトロソ化アルブミンにより抗アポトーシス効果を付与した改良型臓器保存液の開発 (第12回日本NO学会学術集会 2012/6/29-30)
 6. 小田切 優樹, 蓑毛 藍, 異島 優, 成底 徹, 諏訪 喜昭, 渡邊 博志, 森岡 弘志, 丸山 徹. ヒト血清アルブミンドメインIIによるビリルビン尿中排泄促進作用 (第28回日本DDS学会学術集会 2012/7/4-5)
 7. 大柿 滋, 田口 和明, 渡邊 博志, 丸山 徹, 小田切 優樹. 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素付加型赤血球の肝地とクロームP450保護効果 (第19回日本血液代替物学会年次

大会 2012/10/25-26)

8. 南雲 恒平, 杉森 剛志, 山田 尚之, 久保田 和幸, 渡邊 博志, 異島 優, 田元彦, 佐々木 裕, 丸山 徹, 小田切 優樹. ESI-TOF/MSを用いたシステイン付加型ヒト血清アルブミンの検出と機能相関—慢性肝疾患の影響— (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)

9. 田口 和明, 酒井 宏水, 堀之内 宏久, 小林 紘一, 丸山 徹, 小田切 優樹. 細胞型人工酸素運搬体 ヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投与の結果からみた実効性 (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)

10. 丸山 徹, 田口 和明, 氏平 隼人, 渡邊 博志, 新井 愛美, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠, 小田切 優樹. 血小板代替物 H12 (ADP) リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症の影響 (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)

11. 太田 英伸, 李 コウ, 加賀麻衣子, 田口 和明, 大柿 滋, 泉 仁美, 稲垣 真澄, 土屋 滋, 岡村 洲博, 小田切 優樹, 酒井 宏水, 八重樫伸生. ラット妊娠母体におけるヘモグロビン小胞体の胎盤通過性 (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)

12. 渡辺 佳織, 異島 優, 赤池 孝章, 澤智裕, 黒田 照夫, 小川 和加野, 渡邊

博志, 甲斐 俊哉, 小田切 優樹, 丸山 徹. S-ニトロソ化に伴う α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012/11/15-16)

13. 宮本 洋平, 渡邊 博志, 本田 大輔, 門脇 大介, 異島 優, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山 徹. 尿毒症物質p-クレジル硫酸のレドックス特性と腎障害、心血管疾患発症機序解明 (第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012/11/15-16)

14. 大柿 滋, 田口 和明, 前田 仁志, 異島 優, 渡邊 博志, 小田切 優樹, 丸山 徹. 一酸化炭素付加赤血球によるクッパー細胞の不活化は輸血誘発肝チトクローム P450機能障害を保護する (第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012/11/15-16)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

臨床試験データマネージメントに関する研究

研究分担者 新保 卓郎 国立国際医療研究センター
臨床研究センター 医療情報解析研究部長
研究協力者 田中康博、鈴木知子 (同 JCRACデータセンター)

要旨：当研究部内でJCRACデータセンターを運用しており、多施設共同研究のデータマネージメントを実施し信頼性の高い臨床研究の実施に寄与している。本研究班活動で、創薬を目指した臨床試験を円滑に実施できるよう、過去にデータマネージメントの対象となった臨床研究をレビューし、業務上の課題について検討した。過去12年間にデータマネージメントを実施した、または現在実施中の44研究について、データマネージメントの内容と特徴を分析した。対象疾患や研究規模は多様であった。実施したデータマネージメント業務の内容は、データクリーニング、セントラルモニタリング、データセット作成業務は90%以上を占めたが、プロトコール作成支援は50%、CRF作成は77%であった。SOPに関しては、内容について討議されたSOPが24件、新規に作成が検討されたものが11件に及んだ。この結果も踏まえ、品質管理の体制を平成25年1月に整えた。品質管理を強化するために、SOP検討責任者が品質管理に専念できる体制とした。そしてSOPの制定、改定と、SOPを遵守したデータマネージメントを行っているか、必要な記録文書を残しているか、予定通りに業務が進められているか等の確認を行うこととした。今後、自己点検や安全性情報について報告する体制の一層の整備を検討している。

A. 研究目的

当研究部内でJCRACデータセンターを運用している。ここでは多施設共同研究のデータマネージメントを実施し、信頼性の高い臨床研究の実施に寄与してきた。本研究班活動で、創薬を目指した臨床試験を円滑に実施できるよう、過去にデータマネージメントの対象となった臨床研究をレビューし、業務上の課題について検討した。

B. 研究方法

過去12年間にデータマネージメントを実施した、または現在実施中の44研究について、データマネージメントの内容と特徴を分析し、今後の取り組みについて検討を行った。

また業務の標準化や品質管理のために必要な標準業務手順書 (SOP) について再検討を行い、不足部分については新たにこれを作成した。

(倫理面への配慮)

患者個人を対象とする研究ではない。

C. 研究結果

多施設共同研究は全研究の95%、前向き研究は41%、ランダム化比較試験は34%を占めた。目標症例数別

では100症例未満の研究 (14%) から1万症例以上の

研究 (16%) と研究規模は多様であった。また、研究対象疾患も多分野にわたっていたが、循環器系研究32%、糖尿病を含む内分泌代謝系23%と生活習慣病関連が全体の59%を占めた。実施したデータマネージメント業務は図1の通りである。

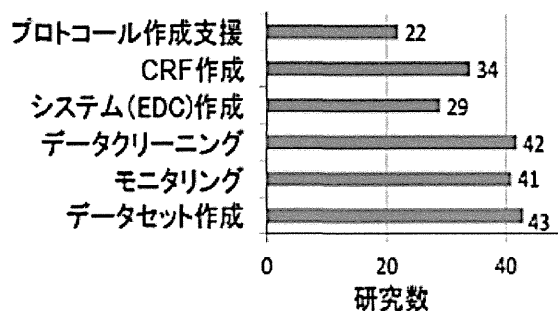


図1：データマネージメント実施内容

データクリーニング、セントラルモニタリング、データセット作成業務は90%以上を占めたが、プロトコール作成支援は50%、CRF作成は77%であった。

またこの中で、品質管理の体制の一層の整備が必要と考えられた。

SOPに関しては、内容について討議されたSOPが24件、新規に作成が検討されたものが11件に及んだ。

D. 考察

上記の結果も踏まえ、データマネジメントの質を一定以上に保つために、品質管理の体制を平成25年1月に整えた。品質管理業務はSOP検討責任者の責務とされていたが、品質管理を強化するために、SOP検討責任者が品質管理に専念できる体制を整えた。業務内容は、SOPの制定、改定と、SOPを遵守したデータマネジメントを行っているか、必要な記録文書を残しているか、予定通りに業務が進められているか等の確認を行うことである。今年度は、各研究における必要な手順書の完備の確認を順次行っている。また、業務の進捗確認のために、研究毎に各業務の完了予定日と実際の完了日をスケジュール表への記載を始めた。

E. 結論

研究対象や研究規模が多様になっていることより、データマネジメント業務の標準化が容易でない点も多々ある。しかしながら業務を標準化し、品質管理を強化する必要がある。今後、自己点検や安全性情報について報告する体制の一層の整備を検討している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimbo T, Miyaki K, Song Y, Masaki N, Study Group Developing Nationwide Database of Hepatitis Japan. The effectiveness and tolerability of combined treatment with peginterferon alpha-2a or alpha-2b and ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C: Results based on the nationwide hepatitis registry in Japan. Value in Health 2012; 15(7): A326

2. 学会発表

鈴木知子、田中紀子、他。JCRACデータセンターにおけるデータマネジメントの活動実績と今後の取り組み。日本臨床試験研究会第4回学術集会総会、札幌、2013年2月7-8日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

分担研究報告書

候補化合物の生体内での抗 HBV 効果の評価と HBV ゲノム変異の動態解析

分担研究者： 山梨大学大学院医学工学総合研究部・教授

榎本 信幸

研究要旨：

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療は近年長足の進歩を遂げているが、限られた治療薬剤しか使用できず、薬剤耐性 HBV あるいは副作用で十分な投与ができない場合などへの対応が困難なこと、さらに現在の核酸アナログ製剤では治療導入後の臨床経過において、肝炎の鎮静化は得られても肝発癌を十分に抑制できない可能性も示唆されているなど現行治療に残された問題は多い。本研究班はこれらの問題を克服する新しい核酸アナログの開発に向けての研究を進めていくことが目的であるが、分担者は本研究班において HBV 治療の現状とその予後についての情報収集と解析を行うことにより、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかとし、一方で大量に存在する臨床情報とリンクした血液検体を用いた HBV ゲノムを次世代シーケンサーにて解析することにより HBV 変異体の臨床的意義や新規薬剤に対する HBV 変異体の動態解析を行ってゆく。

平成 24 年度は臨床的な検討においてエンテカビル導入後 6 年経過しても未だ肝癌が十分に減っていないこと、また慢性 B 型肝炎 23 症例のポリメラーゼ領域における deep sequence による検討にて、核酸アナログ未投与においても一定の頻度で核酸アナログ耐性変異部位にすでに多くの症例で変異体が存在していることを明らかとした。

共同研究者氏名

坂本穰

山梨大学医学工学総合研究部 准教授

前川伸哉

山梨大学医学工学総合研究部 講師

認められ、慢性肝炎から肝硬変への進展抑制は効率よく抑えることが可能となった。

一方、現行の HBV 治療も、現在は使用できる核酸アナログが限られており、未だ十分なものとは言えない。すなわち、核酸アナログは単剤投与が治療の中心であるが、HIV 治療におけるカクテル療法などと比べて耐性出現の確率が高いことが考えられる。また現行のアデホビルは腎機能障害症例に使いにくい。一方、従来の核酸アナ

A. 研究背景・目的

B 型慢性肝炎感染は肝硬変・肝発癌のハイリスクである。近年、核酸アナログ製剤の開発により肝炎の治療は大きな進歩が

ログの肝発癌に対する進展抑制が実際に生じているのか、未だ明らかとはなっていない。

分担者は本研究班において HBV 治療の現状とその予後についての情報収集と解析を行うことにより、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかとし、一方で大量に存在する臨床情報とリンクした血液検体を用いた HBV ゲノムを次世代シーケンサーにて解析することにより HBV 変異体の臨床的意義や新規薬剤に対する HBV 変異体の動態解析を行ってゆく。

B. 研究方法 (2012 年度)

(1) 核酸アナログを投与した症例において、臨床的ウイルス反応性、ならびに核酸アナログ投与後の発癌リスクについて検討した。

(2) 核酸アナログ未投与 HBV 感染症例における HBV ゲノムの核酸アナログ自然耐性変異の有無について 23 症例 (inactive carrier 12 症例 vs. HCC 11 症例) におけるポリメラーゼ領域に注目して次世代シーケンサーを用いた deep sequence によって検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) 山梨大学通院中の 396 例の HBV 患者に対して、HCC 発症は 80 症例に認めた。核酸アナログ投与によるウイルス消失率は 1 年目から 4 年目まで階段状に上昇するが 4 年で 94% に達して以降プラトーとなった。HCC 発症率は、核酸アナログ投与開

始後、毎年 10-30% に新たに認め、5 年以上経過しても 20-30% に認め、肝発癌抑制効果を核酸アナログが有するのか明らかではなかった。一方、核酸アナログ投与後 HBc 関連抗原の低下する症例では発癌率が低下する可能性を明らかとした。

(2) ラミブジン (L180M、M204V/I)、エンテカビル (L180MorM204V/I+T184A or S202G or M250V)、アデフォビル (A181T、N236T) における自然耐性変異の有無を deep sequence にて検討した。それぞれの変異部位における各アンプリコンにおいて 1049 から 2488 のリードが得られたが、特に活性中心である M204V/I に加え M250I は HCC 群で 55%、inactive 群で 42% の症例に 1% 弱の比率ではあるものの有意な変異型の混在を認めた。これらの部位に比べると頻度は少ないが他の領域 A181T (45%、16%)、T184A (9%、25%)、S202G (45%、25%)、N236T (0%、8%) (各々 HCC 群、inactive 群) にも 1% 弱の混在比率で耐性変異を認めた。自然耐性変異の混在は inactive carrier より HCC 症例で多い傾向であった。これらが臨床的耐性とどのように関連するのは今後の検討が必要である。

D. 考察と結論

さらなる検討が必要なものの、現行の核酸アナログ製剤が肝発癌に対して十分な抑制効果を持っていない可能性が示唆された。HBc 関連抗原は肝発癌に対するマーカーとなる可能性が考えられた。一方、次世代シーケンサーによる耐性変異の検討において、一定の頻度で耐性関連変異がすでに混在しており、新たな核酸アナログ化の開発にあたり、十分留意すべきことが考

えられた。

F. 研究発表論文発表 1. 論文発表

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. The serum RANTES level influences the response to pegylated-interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.

Hepatol Res. 2012, in press.

2) Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection.

J Med Virol. 2012 Sep;84(9):1360-8.

3) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of Both Protease and

Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge Amphimedon sp. PLoS One. 2012;7(11):e48685.

4) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.

J Viral Hepatitis. 2012, in press.

5) Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N.

Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection. Hepatology. 2012 May 10.

6) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S,

Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi
K.

Inhibition of hepatitis C virus
replication and viral helicase by ethyl
acetate extract of the marine feather
star *Alloeocomatella polycladia*.
Mar Drugs. 2012 Apr;10(4):744-61.

G. 知的所得権の出願・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。

脱硫的スタニル化を基盤とするエキソメチレン部位にフッ素原子が置換した新規entecavir
誘導体の合成研究

研究分担者 原口 一広、向後 悟 (昭和大学 薬学部)

研究要旨：現在繁用されているentecavir (ENT) は2'-デオキシグアノシンの糖部分がシクロペンタンに置き換わった誘導体で、同環の二重結合を欠落する化合物は抗HBV性を有しない事から同環上の二重結合とHBV RTとの相互作用が重要であると考えられる。しかし二重結合の水素原子が置換された誘導体は報告がない。本研究では脱硫的スタニル化を鍵反応として未報告の修飾型ENTを合成する。

A. 研究目的

現在繁用されている entecavir (ENT) は 2'-デオキシグアノシンの糖部分がシクロペンタンに置き換わった誘導体で、同環の二重結合が欠落した化合物は抗 HBV 活性が減弱する事から同環上の二重結合と HBV 逆転写酵素との相互作用が重要であると考えられる。しかし、二重結合の水素原子が置換された誘導体の報告例はない。本研究では脱硫的スタニル化を鍵反応として利用することにより未報告のフルオロビニル型 ENT (**1**)を合成することを目的とする。

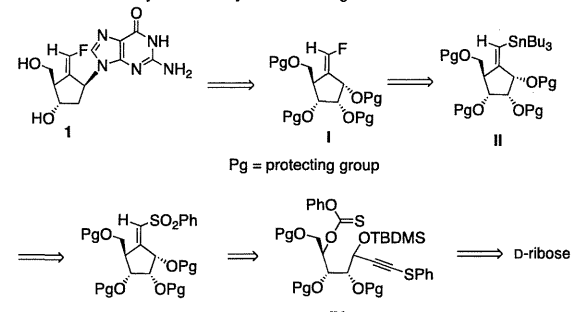
B. 研究方法

標的化合物 **1** の逆合成解析をスキーム 1 に示した。標的化合物 **1** はフルオロメチレンシクロペンタン **I** の1位へ核酸塩基を導入する事で合成できる。化合物 **I** のビニルフルオリド部分はビニルスタナン **II** のフッ素化により合成可能である。ビニルスタナン **II** の合成はビニルスルホン **III** の脱硫的スタニル化により行い、**III** はフェニルチオアセチレン **IV** の 5-*dig*-ラジカル閉環反応により合成し、**IV** はリボースから合成することを企図した。

(倫理面への配慮)

化学合成研究であることから、倫理面への配慮には該当しない。

Scheme 1. Retro-synthetic Analysis for the Target Molecule 1



C. 研究結果

D-リボースを出発原料に用い、イソプロピリデン化およびトリチル化により **1** を経て **2** を合成した (Scheme 2)。化合物 **2** に対してエチルマグネシウムブロミドを反応させた後、生成したプロパルギルアルコール **3** の二級水酸基のシリル化により **4** へ変換し、引き続きチオカルボニルジイミダゾールとの反応によりイミダゾリド **5** を合成した。最後に、末端アセチレン部をフェニルスルファニル化しラジカル前駆体 **6** を得た。