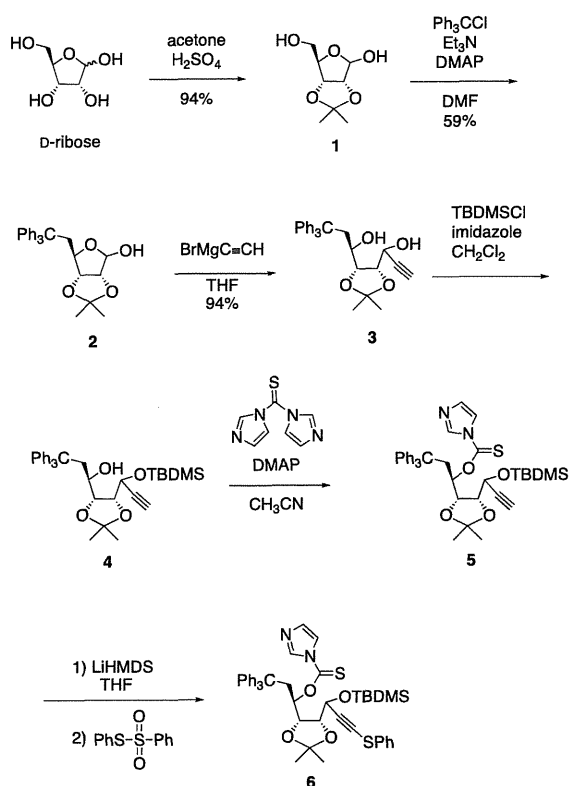


Scheme 2. Synthesis of radical precursor **7**

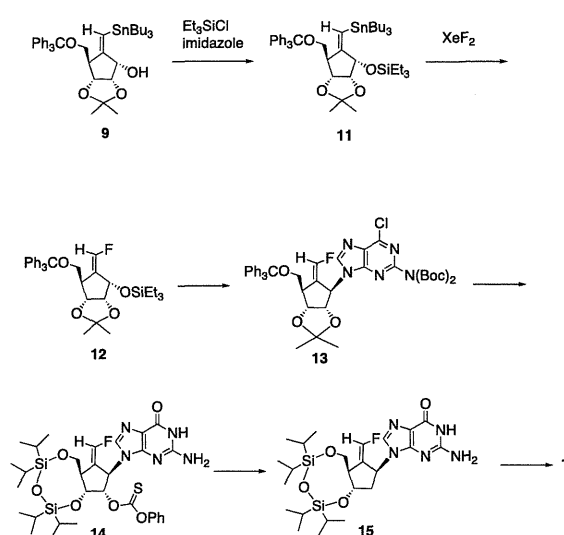


得られた **6** に対してトリストリメチルシリルシランをラジカル開始剤に用いる分子内ラジカル閉環を行うことにより、エキソメチレンシクロペンタン **7** を得る事ができた (Scheme 3)。シクロペンタン **7** は、スルホン **8** へ変換した後、脱硫的スタニル化により脱シリル化を経て (*Z*)-ビニルスタナン **9** および (*E*)-ビニルスタナン **10** へ変換した。

(*Z*)-ビニルスタナン **9** の 2 級水酸基をトリエチルシリル基で保護し **11** とし、キセノンジフルオリドと反応させることにより、ビニルフルオリド **12** を得た (Scheme 4)。ビニルフルオリド **2** は脱シリル化、光延条件下でのグリコシル化により ENT 誘導体 **13** を得た。炭素環ヌクレオシド **13** は酸加

水分解によりグアニン塩基とした後、フェノキシチオカルボニル誘導体 **14** へ変換した。得られた **14** をラジカル的デオキシ化に付すことにより、標的化合物の保護体 **15** へ変換する事ができた。最後に、脱シリル化により標的化合物 **1** を合成した。

Scheme 4. Synthesis of (*Z*)-fluorinated entecavir **1**



#### D. 考察

当研究室で開発した脱硫的スタニル化は立体保持進行し、(*Z*)-ビニルスタナン **9** から (*Z*)-フルオロビニル体が得られることが明らかとなった。この実験結果は、本反応の機構として考えられている付加-脱離反応以外の機構で進行していることを示唆するものである。

#### E. 結論

本年度の研究により、D-リボースを出発原料として用い、フェニルチオエチニル基をラジカルアクセプターとする 2 級炭素ラジカル の 5-*dig*-ラジカル閉環反応により鍵化合物の 1 つであるビニルスルフィドを有するシクロペンタン誘導体を良好な収率で得ることができた。(*Z*)-ビニルスルフィドの立体選択的な脱硫

的スタニル化によりフルオロビニル体の前駆体となる(Z)-ビニルスタナンを高収率で合成することができた。引き続きフッ素化、核酸塩基の導入、2'位のラジカル的デオキシ化および脱保護により表的化合物であるエンテカビルの(Z)-フルオロビニル体を合成することに成功した。

#### F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kumamoto, H.; Kawahigashi, S.; Wakabayashi, H.; Nakano, T.; Miyaike, T.; Kitagawa, Y.; Abe, H.; Ito, M.; Haraguchi, K.; Tanaka, H. “Tuning Efficiency of the 4-*Exo-trig* Cyclization by Electronic Effect: Ring-Closure of 3,3-Difluoro-4-pentenyl Carbon Radicals and Synthesis of *gem*-Difluorocyclobutane Nucleoside”, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10993-10995.
2. Haraguch, K.; Takeda, S; Kubota, Y; Kumamoto, H; Tanaka, H; Hamasaki, T; Baba, M; Paintsil, E; Cheng, Y.-C. “From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-HIV agent Festinavir”, *Current Pharmaceutical Design*, 2013, *19*, 1880-1897.

##### 2. 学会発表

1. 日本薬学会第132年会 (2012) (札幌)

“3,3-ジフロロ4-ペンテニルラジカルの4-*exo-trig* 閉環反応：新規ジフルオロシクロブタンヌクレオシドの合成 “

熊本浩樹、川東祥子、若林宏美、中野智彦、宮池朋子、阿部 洋、原口一広、田

中博道

2. 日本薬学会第133年会 (2013) (横浜)

“ビニルスルホンに対する共役付加および脱硫的スタニル化を利用する3'-置換BCAの合成研究 “

熊本浩樹、原口一広、田中博道

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

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

逆転写酵素阻害剤等のスクリーニング法開発・耐性ウイルスに対する効果判定  
に関する研究

研究分担者 児玉 栄一 東北大学大学院医学系研究科 宮城地域医療支援寄附講座  
東北大学 東北メディカルメガバンク機構  
東北大学病院 内科・総合感染症科

### 研究要旨

慢性活動性 B 型肝炎に対する効果的かつ安全な新規治療薬が望まれているが、high through-put screening 法 (HTS) の未確立によって研究は立ち遅れたままである。本分担研究では逆転写酵素を分子標的とした候補化合物 HTS 確立を目標とした。従来から使用されている HBV 産生細胞である HepG2.2.15 細胞と新たにクローン化した HepG2.2.15.7 細胞における HBV 産生を定量 PCR によって比較、後者が約 20 倍 HBV を多く産生することから、この細胞を用いた HTS を確立した。また、HBV ゲノムプロモーターのサイレンシング機構を解析中である。これらの知見を応用し、現在大臣確認申請を行っている感染性組換え HBV 作成をより効率化させたい。

### A. 研究目的

Hepatitis B virus (HBV)は、慢性感染ののちに肝硬変・肝がんを引き起こす難治性のウイルスである。血液・体液感染を主な感染ルートとする HBV の in vivo 感染力は非常に強いが、in vitro では初代ヒト肝細胞を除けば感染性は非常に低く、また細胞変性効果も少ないため、有効なアッセイ系がないままである。初代培養細胞等を得ることが困難であり、大量の薬剤をスクリーニングするには不向きである。細胞変性効果が少ないことは、MTT 色素法などの high through-put 法(HTS)が確立させにくいことにつながる。

対照的に human immunodeficiency virus (HIV)では in vitro で十分な感染を支持する培養細胞が存在し、これまでに多数の薬剤がスクリーニング、有用な薬剤が同定され、臨床で実用化されている。分担研究者のグループも日本たばこ産業との共同開発で HIV のインテグラーゼ阻害剤を臨床応用す

ることに成功している。HIV は、培養細胞による感染系があり、さらに細胞変性効果があることから、HTS に向いているウイルスであると言える。一方で、Hepatitis C virus (HCV)も HBV と同様に近年まで感染系がなかったために薬剤の開発が立ち遅れていた。HCV に関してはレプリコンアッセイ法が確立され、ウイルス複製の中期・後期に作用する薬剤のスクリーニングが可能となった。事実、RNA ゲノムを複製させる RNA polymerase やプロテアーゼなどを標的とする小分子化合物が見出され、現在のインターフェロン治療に置き換わろうとしている。事実経口可能な薬剤が開発されれば、これまでのインターフェロンのような注射剤ではないこと、主に宿主に作用する生物製剤でもないことから、安全性や副作用の面でも有用である。

このような歴史的背景から、現在使われている HBV に対する抗ウイルス剤は基本

的に HIV などの逆転写酵素阻害剤としてスクリーニングで見出されてきたものの中から、抗 HBV 活性のあったものを流用している状態である。ラミブジン、アデフォビルがその代表である。一方で最近ではエンテカビルのように HBV 活性が十分あるような薬剤も見出されてきている。エンテカビルは HIV に対する効果が弱く、HBV 特異的な逆転写酵素阻害剤である。我々が開発した EFdA などは HIV に対する効果が非常に強く、HBV には効果が弱い。ラミブジンやアデフォビルは同等であったことからすれば興味深い。HBV では HIV の多剤耐性変異である Q151M をすでに獲得しているなど HIV 逆転写酵素と機能的に異なることが報告されており、HIV で代用したアッセイ系では HBV 特異的な薬剤を見落とす可能性が十分にありうる。

本研究で研究分担者は、これまで HIV やヘルペスウイルスなどの高細胞変性効果を示すウイルスや HCV に対する薬剤をスクリーニング・開発した経験から、それらの知見を応用して、HBV に対するスクリーニング法を開発し、有用な薬剤探索に資するアッセイ系、特に逆転写酵素阻害剤を効率よく見出せるアッセイ系を構築することを目的とする。本年度は、従来の細胞を用いた簡便なアッセイ系の構築を試みた。

## B. 研究方法

1) 細胞：HBV を産生する細胞として、HepG2.2.15 細胞とそのクローン化された HepG2.2.15.7 細胞の 2 種類を用いた。これらの細胞は、G418 と FCS (final 10%) を添加した DMEM 培地を用いた。

2) 薬剤と試薬：ラミブジン、テノフォビルは NIH AIDS Research and Reference Reagent Program より分与を得た。HIV 逆転写酵素阻害剤 AZT、DNA methyl transferase 阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC)、histone 脱アセチル化阻害剤の tricostatine A (TSA)、Bovine serum albumin fraction V (BSA) は Sigma-Aldrich 社より購入した。

3) DNA 抽出と PCR：上清中の HBV-DNA は、Zymo-Research 社の Viral DNA kit を用いて抽出した。PCR は Takara 社のリアルタ

イム PCR 機器と SYBR Premix ExTaq II を使用して行い、半定量化した。DNA 抽出前に、MgCl<sub>2</sub> 存在下で DNase I を加え、37 度で 30 分間処理することで上清中に含まれるウイルス粒子由来でない DNA を消化した。

4) プロモーター解析：DNA メチル化の程度を確認するために、HBV ゲノム DNA を抽出したのち Qiagen 社の Epitect Bisulfite kit を用いて deoxycytidine の deoxyuridine への変換を行ったのち、スピンカラムで精製・塩基配列を決定した。

### (倫理面への配慮)

本研究では創薬応用を主たる目的とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

## C. 研究結果

1) 通常の培養条件での検討： HepG2.2.15 細胞から、より多くの HBV が多く産生されれば、PCR サイクル数を少なくでき、正確な DNA 定量化が期待できる。このことはより正確な薬剤効果判定につながるため、HepG2.2.15 細胞の培養条件を検討した。まず、96 ウエルプレートにおいて 200 μL の 10%FCS 含有 DMEM 培地で培養を行った。DNA の抽出は Zymo-Research 社の Viral DNA kit を用いた。この方法では上清中の HBV-DNA の検出に 30 サイクル以上を要した。培地を RPMI1640 に変更したが DNA 検出レベルは向上しなかった。次に非働化していない FCS を 10% で検討したが、DNA 検出レベルに差が認められなかった。実際、ラミブジンの薬剤効果を判定したが、独立アッセイごとにデータが異なり、スクリーニングには適していなかった。また、HepG2.2.15 細胞の増殖が良好で 5 日以上培養には培地交換を必要とし、簡便さにも問題があった。

2) BSA を用いた培養：上記のように FCS を用いた培養では細胞が十分に増えるものの、十分な HBV DNA の検出ができなかつ

た。この原因として上清に出てくる DNA を抽出している間にチューブ等に吸着もしくはカラム等から十分溶出されていないことを考えた。この仮定を証明するために培地に加える FCS を 0.1% BSA に変更し、培養上清を DNA 抽出なしに直接定量 PCR ができるかを検討した。PCR 反応液に加える上清を反応液の 10% 容量まで増加させたが、PCR 効率はほとんど変化しなかった。この方法は、DNA 抽出を簡便化するだけでなく、DNA 検出が 30 サイクル以下で見られ、DNA 検出レベルの向上につながった。一方で、BSA 添加の DMEM では HepG2.2.15 細胞はほとんど増殖せず、96 ウェルプレート 1 ウェル当たりに加える細胞数は少なくとも  $2 \times 10^4$  を必要とした。細胞毒性については MTT で検討したが、十分な吸光度が出るまでに反応時間を 24 時間程度必要とした。

3) クローン化 HepG2.2.15 細胞の使用：感染症研究所渡士博士がクローン化した HepG2.2.15.7 細胞を名古屋市立大学田中教授、熊本大学満屋教授より分与を受けた。この細胞で上記の BSA 添加 DMEM で培養、PCR で検討したところ、HepG2.2.15 細胞よりも約 10 倍ウイルス産生能が高いことが明らかとなった。そのため、今後は HepG2.2.15.7 細胞を用いて薬剤スクリーニング系の確立を試みた (図 1)。

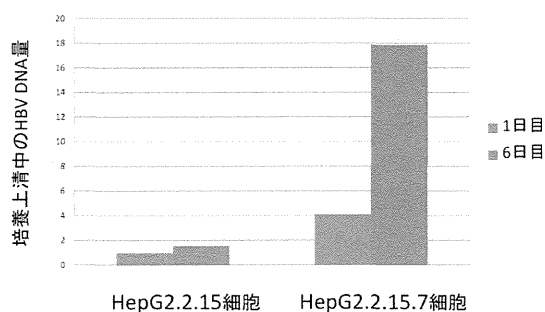


図 1. HBV 産生細胞の比較

HepG2.2.15 細胞と HepG2.2.15.7 細胞を同一条件で培養し、上清に放出される HBV-DNA 量を定量 PCR で検討した。HepG2.2.15 細胞から 24 時間後に産生される HBV-DNA 量を 1 とし、HepG2.2.15 細胞は 6 日間培養しても HBV-DNA 量が 4 倍程度にしか増加していないが、HepG2.2.15.7 細胞では HepG2.2.15 細胞の 24 時間後と比較して 18 倍程度 DNA の増加が認められた。

4) スクリーニング：上記培養系を用いて 1 週間での薬剤感受性試験を試みた。陽性コントロールとしてはラミブジン(3TC)とテノフォビル(TDF)、陰性コントロールとしてはアジドチミジン(AZT)を用いた。これらの薬剤を本方法で、7 日間培養によって再現性よく検討できることを明らかとした (図 2)。

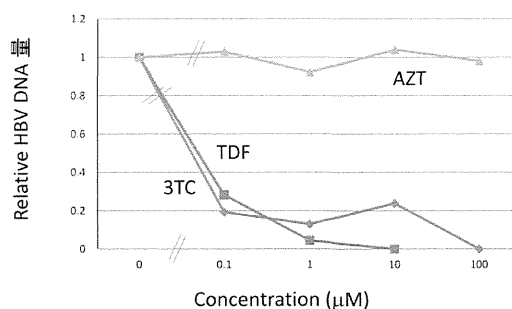


図 1. 抗 HBV 剤の効果

HepG2.2.15.7 細胞を 0.1% BSA を加えた DMEM 培地で 1 週間培養し、その培養上清を DNase 処理したのちに定量 PCR で、上清中に含まれる HBV-DNA 量を検討した。抗 HBV 剤であるラミブジン(3TC)とテノフォビル(TDF)のみが効果を示した。

5) Epigenetic change 解析：同一遺伝子導入細胞由来の HepG2.2.15 細胞と HepG2.2.15.7 細胞でなぜ HBV 発現量が異なるのかを検討した。導入した HBV 遺伝子が同一であることから、導入後の宿主 DNA 発現調整機能によって HepG2.2.15 細胞で HBV 産生抑制がかかっていると考え、DNA メチル化阻害剤である 5-azadC とヒストン脱アセチル化阻害剤である TSA を用いて検討した。まず、これらの薬剤の細胞毒性を検討した。5-azadC は 2 μM まで TSA は 100 nM までであれば細胞毒性 (10%以下) が見られず、この最大濃度を使用した。これらの薬剤存在下で培養を行い、3 日後の上清中に産生された HBV DNA 量を検討した。HepG2.2.15 細胞では 5-azadC、TSA の濃度依存的に上清中の HBV-DNA 量が増加した (図 3)。

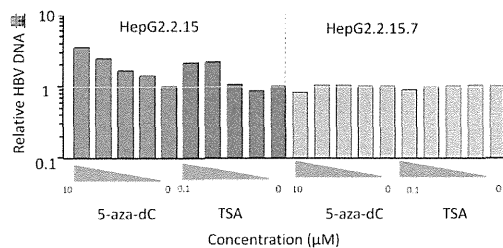


図3. HBV 産生抑制の解除

HepG2.2.15 細胞と HepG2.2.15.7 細胞を同一条件で培養し、上清に放出される HBV-DNA 量を定量 PCR で検討した。これらの細胞を 7 日間 DNA-methyl transferase の素材剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) とヒストン脱アセチル化阻害剤である toricostatine A (TSA) 存在下で培養し、上清に放出される HBV-DNA 量を定量 PCR で検討した。HepG2.2.15 細胞はこれらの薬剤に反応し、HBV-DNA の産生量が増加したが、HepG2.2.15.7 細胞では影響がなかった。5-aza-dC は 10 μM まで、TSA は 0.1 μM まで毒性を示さないことを MTT 法で確認している。

#### D. 考察

本分担研究の目的は、不完全であるスクリーニング系を改善、確立し、preclinical evaluation に持ち込めるような新規候補薬を数多く見出すことであり、タンパク構造学的解析や臨床評価を行うに値する化合物を複数同定することである。そのため、分担研究者は第一に効率のよいスクリーニング系を確立、次にそれを利用した薬剤のスクリーニングを開始、さらに薬剤耐性 HBV の分子クローンを作製、それを使用した耐性 HBV に効果を示す薬剤のスクリーニング法を確立する。これらの進捗に併せ、新規 HBV 薬のスクリーニングを並行して行うことを目標とする。初年度である本年度は、これまで使われてきたアッセイ系を改変し、比較的短期（7 日）で再現性のあるスクリーニング法が確立しつつある。一方で、文部科学省大臣確認遺伝子組換え実験の申請も済ませ、平成 25 年度からは耐性ウイルスを用いたアッセイ系の確立を試みる。

HepG2.2.15 細胞において HBV 産生能は、クローン化された HepG2.2.15.7 細胞と比べ 10 倍程度低下していた。HepG2.2.15 が樹立されてからすでに 20 年以上が経過し、長期にわたる継代中に徐々にその発現が低下し

てきたものと思われる。DNA メチル化やヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の低下が起こることが知られているが、それぞれの阻害剤である 5-aza-dC や ricostatin A によって HBV-DNA の放出量が増加することを明らかとしている。HepG2.2.15 細胞における HBV 産生能の低下はこれらの遺伝子サイレンシング機構によって引き起こされていると考えられた。

本年度はラミブジンとテノフォビルを用いて検討を進めてきたが、来年度以降は組換え耐性 HBV を遺伝子導入した細胞株を樹立し、それに対する効果判定を行えるようにしたい。また、東北大学や共同研究者から分与していただく新しい薬剤もまずは野生型の HBV を産生する HepG2.2.15 細胞を用いて検討を開始する予定である。

#### E. 結論

HepG2.2.15.7 細胞を用いた 7 日間という比較的短期間でかつ DNA 抽出を伴わない上清をそのまま PCR 反応液に加える簡便な定量 PCR を確立した。HepG2.2.15.7 細胞の親株である HepG2.2.15 は HBV の産生能が低下しており、その原因として宿主遺伝子サイレンシング機構が関与していた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanyaradzwa P. Ndongwe, Adeyemi O. Adedeji, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Emily M. Ryan, Devendra K. Rai, Karen A. Kirby, Angela S. Whatley, Donald H. Burke, Marc Johnson, Shilei Ding, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, Ei-Ichi Kodama, Krista A. Delviks-Frankenberry, Vinay K. Pathak, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. Biochemical, inhibition, and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research* 40:345-359, 2012

- 2) Ryo Masuda, Shinya Oishi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Akira Hirasawa, Gozoh

- Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Medicinal Chemistry* 4:837-844, 2012
- 3) Xiaoguang Li, Hua Qian, Fusako Miyamoto, Takeshi Naito, Kumi Kawaji, Kazumi Kajiwara, Toshio Hattori, Masao Matsuoka, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Eiichi N. Kodama. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424:257-261 2012
- 4) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Krzysztof Palczewski, Yee Tsuey Ong, Daniel T. Griffin, Matthew M. Schuckmann, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama and Stefan G. Sarafianos. HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K, suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations to both nucleoside and nonnucleoside RT inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 287:29988-29999, 2012
- 5) 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 (Noisy-le-grand)* 58:187-195, 2012
- 6) Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama. Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45:908-915, 2013.
- 7) Fusako Miyamoto and Eiichi N. Kodama. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, in press 2013
- 8) 児玉栄一、宮本総子 新しい抗ウイルス剤開発の考え方 臨床と微生物 40:51-55, 2013
2. 学会発表
- 1) Masahiro Watanabe, Koichi Hashimoto, Yusaku Abe, Eiichi Kodama, Ryota Nabika, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Mitsuaki Hosoya A novel peptide derived from measles virus fusion protein inhibits the replication of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus in vitro and in vivo. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012
- 2) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Eiichi N. Kodama, Michael A Parniak, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, Stefan G Sarafianos. The Combination of 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine with Rilpivirine Shows Synergistic Anti-HIV-1 Activity In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012
- 3) Eleftherios Michailidis, Jordan Wilkins, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. Effect of 4'- and 2'-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase and Toxicity. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012
- 4) Fusako Miyamoto, Kumi Kawaji, Toshio Hattori, Hiroaki Mitsuya, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama. Sustained Activity of 4'-Ethynyl Nucleosides to Variants with M184V Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012
- 5) Hiroaki Mitsuya, Eiichi Kodama, Hiroto Nakata, Shinichiro Hattori, Seiji Okada, Kenji Maeda, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA), a translocation defective reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against

diverse multi-drug-resistant HIV-1 variants. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012

6) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Karen A. Kirby, Maxwell D. Leslie, Shinichi Oka, Eiichi N. Kodama, Michael A. Parniak, Hiroaki Mitsuya, and Stefan G. Sarafianos. Combinations of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine with rilpivirine show synergistic anti-HIV activity *in vitro*. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012

7) 服部俊夫、鈴木定彦、山岡昇司、井戸栄治、一瀬休生、仲宗根正、久保亨、臼澤基紀、垣本和弘、福本学、児玉栄一。サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築の試み。第27回日本国際保健医療学会学術大会。岡山, Nov3-4, 2012.

8) 宮本総子、満屋裕明、児玉栄一。EFdAおよびEdDAPに対する耐性変異が耐性度と複製能力に及ぼす影響。第26回日本エイズ学会学術集会。横浜, Nov3-4, 2012.

#### G. 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

新規抗 HBV 薬の 1 次・2 次評価に関する研究

研究分担者 田中靖人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授  
研究協力者：村上 周子 名古屋市立大学 大学院医学研究科 特任助教

研究要旨：B 型肝炎ウイルス (HBV) には、A-J までの遺伝子型が特定されており、それぞれの臨床病態は異なる。また、HBV 治療において薬剤耐性変異ウイルスを克服することは避けることのできない重要課題である。本研究はウイルス変異株を含む HBV の病態を解析し、新規治療薬を開発することを目的としている。1) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株を用いて、薬剤耐性変異株 7 種類を作成し、ヒト肝細胞キメラマウスに接種した。その結果、現在までに 6 種類の感染を確認し、感染源となる血清が得られた。2) HBV (genotype D) 産生肝癌細胞株 (HepAD38 細胞) を用いて、新規の核酸アナログ候補化合物 24 種類についてスクリーニングを行った。その結果、2 種類の化合物は比較的強い抗 HBV 活性を認めた。今後、日本に多い genotype C 野生株及び薬剤耐性変異株に対する抗 HBV 活性を *in vitro* で検討するとともに、これらの HBV クローンを感染させたキメラマウスを用いて、候補化合物の抗 HBV 効果、副作用などを検討する予定である。

#### A. 研究目的

これまでに我々は、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV の感染実験を展開し、各遺伝子型クローンによる感染・複製効率の違いや薬剤感受性の違いを検討してきた。本研究では、HBV の薬剤耐性変異株について *in vitro* および *in vivo* での感染実験を行うため、各遺伝子型の薬剤耐性変異株クローンの作成からウイルス感染源の作成を試みた。また、HBV 新規治療薬の開発における薬剤評価系として、ハイスループット *in vitro* HBV アッセイ系を検討した。

#### B. 研究方法

1) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株について、薬剤耐性変異株 7 種類：エンテカビル耐性 4 種類 (genotype Ae: 1 種類、genotype Bj: 1 種類、genotype Ce: 2 種類)、ラミブジン耐性 1 種類 (genotype Ce)、アデホビル耐性 1 種類 (genotype Ce)、ラミブジン+アデホビル耐性 1 種類 (genotype Ce) を作成し、これを Huh7 細胞に transfection して得られたウイルス粒子を含む培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種した。  
2) 新規の核酸アナログ候補化合物 24 種類について、HBV を産生する HepAD38 細胞株 (genotype D) を用い、HBV-DNA 量を指標としてスクリーニングを行った。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

#### C. 研究結果

1) キメラマウスに接種した HBV 薬剤耐性変異株の培養上清 7 種類のうち、現在までに 6 種類の感染を確認した。その後、HBV 感染源としてマウス血清を採取した。引き続き未感染の 1 種類についても試験継続中である。  
2) 検討した核酸アナログ候補の化合物 24 種類中、2 種類の化合物は強い抗 HBV 活性が見られた。

#### D. 考察

HBV genotype D を産生する肝癌細胞株を用いることにより、ハイスループット *in vitro* HBV アッセイ系を確立し、抗 HBV 薬スクリーニングが可能となった。本研究で用いた Hep AD 38 細胞は、HBV 産生能の高い細胞株であるため、核酸アナログを含む化合物のスクリーニングには適しており、培養上清中の HBV-DNA 量を抑制する化合物は新規治療薬の候補として期待できる。現在、今回得られた候補化合物あるいは類似化合物の合成展開が実施されており、今後、日本に多い

genotype C 野生株及び薬剤耐性変異株に対する抗 HBV 活性を *in vitro* で検討するとともに、これらの HBV クローンを感染させたキメラマウスを用いて、候補化合物の抗 HBV 効果、副作用などを検討する予定である。

#### E. 結論

HBV 薬剤耐性変異クローンを作成し、各種変異体ウイルスを得た。また、ハイスループット *in vitro* HBV アッセイ系を確立した。これらの成果は新規薬剤の探索において非常に有用である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral Hepat*, 2013;20:e27-e36.
- 2) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013;23(2):503-6.
- 3) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol*, 2012 in press.
- 4) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol*, 2012;84(4):587-95.
- 5) 新海登, 田中靖人, 杉山真也, 溝上雅史. 【B型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性】核酸アナログ耐性変異パターン解析とその対策. *消化器内科*. 2012;54(5):582-585.

##### 2. 学会発表

- 1) Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England
- 2) Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Immune restoration Hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England.
- 3) 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 溝上雅史. B型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討～中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて～. 第48回日本肝臓学会総会. 平成24年6月, 石川.
- 4) 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 村上周子, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人: 核酸アナログを投与したB型慢性肝炎患者における interferoninducible protein-10 値の動態. 第20回日本消化器関連学会週間(第16回日本肝臓学会大会), 平成24年10月, 神戸.
- 5) 柏木有美, 可児里美, 都築祐二, 松浦健太郎, 五藤孝秋, 大橋実, 脇本幸夫, 田中靖人. リアルタイム PCR 法を用いた Abbott m2000 system による HBV-DNA 定量測定の基礎的検討. 第59回日本臨床検査医学会学術集会. 平成24年11月, 京都.

#### G. 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

## 前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験に関する研究

～ 新規抗 HBV 感染症治療薬の臨床開発に向けて ～

分担研究者：

伊藤 俊之（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部長）

研究協力者：

川崎 敏克（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部治験管理室治験主任）

近藤 美紀（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部副看護師長）

助永 義和（独立行政法人国立国際医療研究センター開発医療部知財開発室長）

小早川雅男（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部相談室長）

泉 和生（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部支援室長）

松下 由美（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部推進室長）

小林 信之（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部治験管理室長）

菊池 嘉（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部副部長）

### 研究要旨

本プロジェクトにおいて開発予定の新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化した化合物を用いて、前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発を円滑に実施する。

### A. 研究目的

本プロジェクトにおいて開発予定の新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化した化合物を用いた前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発を実施するにあたり、まず当施設を中心とした臨床試験実施体制並びに実施支援体制を確立・整備した後、各試験を円滑に実施することを目的とする。

### B. 研究方法

リード化合物の最適化による医薬品候補化合物獲得に至るまで数年を要すると予測される。それまでの期間、医薬品候補化合物獲得へ向けた基礎的研究の側方支援を行いながら、同じく数年を要すると見込まれる臨床試験実施並びに実施支援体制の確立・整備等を行い、リード化合物獲得後の前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発の円滑な実施に備える。

#### 1) 新規抗 HBV 感染症治療薬候補となるリード化合物の選定支援

(1) シード化合物の新規性調査によるリード化合物の絞り込み

① SciFinder®を用いた化合物新規性調査

#### 2) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

(1) 臨床試験プロトコール作成支援体制

① 「治験及び先進医療プロトコール作成ユニット（以後、プロトコール作成ユニット）」の設置並びに試験的運用

(2) 多施設共同試験実施体制

① 「国立国際医療研究センター臨床研究センター中央事務局（以下、NCGM 中央事務局）」の設置並びに試験的運用

② コーディネーター部門の整備

(3) 第 I 相臨床試験（以下、Phase I）病棟

① 院内各部門間調整

## ②病棟整備、病棟スタッフ教育等

### (倫理面への配慮)

まず動物実験などで新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化された化合物の安全性を十分に確認するが、動物実験においては、必要最小限数の動物使用となるよう配慮する。

さらに volunteers については、国立国際医療研究センター臨床研究センター、研究組織内の各大学医学部内における該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請し認可された後、ヘルシンキ宣言や該当の倫理指針に則り、研究対象者に対する人権擁護に配慮して、臨床試験の具体的な内容及び考えられる副作用の危険性等について文書による説明を行い、同意取得（インフォームド・コンセント）が得られた後に臨床試験を開始する。

## C. 研究結果

### 1) 新規抗 HBV 感染症治療薬候補となるリード化合物の選定支援

(1) シード化合物の新規性調査によるリード化合物の絞込み

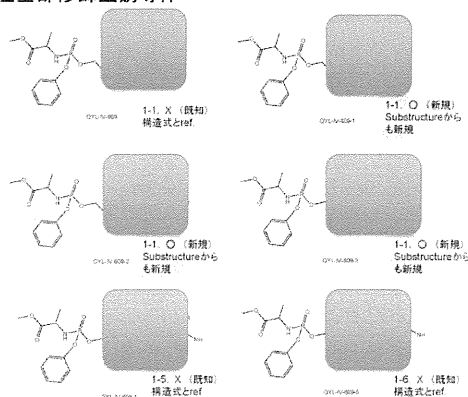
#### ①SciFinder®を用いた化合物新規性調査

SciFinder®は、論文検索はもとより、化学構造式による検索が可能な唯一の電子情報サービスであるだけでなく、特許検索も可能である。

今回、QYL シリーズの 15 シード化合物について SciFinder®検索を行った。3 化合物が特許・非特許既知化合物であった。残り 12 の新規化合物をリード化合物候補とした (図 1)

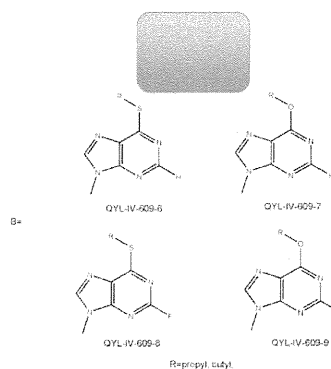
図 1. シード化合物の新規性調査結果

#### 1. 塩基部修飾型誘導体

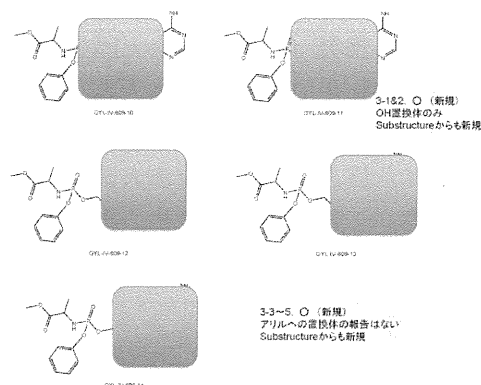


#### 2. 塩基部修飾型誘導体

2-1~4, O (新規)  
アミノ基付塩基誘導体の既知物質  
Substructureからも新規



#### 3. 糖部修飾型誘導体



(注) Confidential information のため blind 処理済

### 2) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

#### (1) 臨床試験プロトコール作成支援体制

##### ①プロトコール作成ユニットの設置並びに試験的運用

国立国際医療研究センター臨床研究センター内に、臨床医、生物統計家、データセンター長やメディカルライター等をメンバーとして組織横断的に構成されるプロトコール作成ユニットを設置した (添付資料 1: 治験及び先進医療プロトコール作成ユニット要綱)。

プロトコール作成ユニットは、支援の対象を ICH-GCP レベルでの実施を求められる医師主導治験と先進医療に限定し、週 1 回の打ち合わせやメールでのやり取りを通じて、研究者と協議しつつ、プロトコール作成を全面的に支援している。

今年度、臨床試験プロトコールの作成支援に着手したのは計 6 件となった (表 1)。

表1. 作成支援プロトコール（平成24年度）

<p>医師主導治験</p>	<p>①高度催吐性化学療法に伴う悪心・嘔吐を生じた患者に対してオランザピンを追加予防投与に用いたプラセボ対照比較試験 ②静脈瘤に対するモノエタノールアミンオレイン酸を使用したバルーン閉塞下逆行性静脈閉塞術(B-RTO)に関する医師主導治験</p>
<p>先進医療</p>	<p>①FDG-PET/CTの不明熱診断への応用ーガリウムSPECTとの比較研究（先進医療B） ②腹膜偽粘液腫に対する減量切除術と周術期腹腔内化学療法に関する前向き研究（先進医療B） ③全自動遺伝子解析装置を用いた、グラム陰性桿菌血症例における迅速菌名同定・耐性遺伝子同定（先進医療A） ④膵切除および自家膵島移植に関する臨床研究（先進医療B）</p>

（注）作成中のプロトコールを含む

（2）多施設共同試験実施体制

- ①NCGM 中央事務局の設置並びに試験的運用  
国立国際医療研究センター臨床研究センター臨床研究支援部内に、NCGM 中央事務局を設置し、事務局員として専任の薬剤師を配置した。  
当施設は多施設共同試験に対応する中央事務局としての経験が未だ十分ではないため、本格稼働時の安定的運用を目的として、外部に一部業務委託した（添付資料2：医師主導治験を実施するための『(独)国立国際医療研究センター中央事務局(仮称)』の体制整備及び維持に係る業務（一部抜粋））。
- ②コーディネーター部門の整備  
従前は企業治験を担当するコーディネーターと、臨床研究を支援するコーディネーターが別部署に所属し、独立して業務を行っていたが、業務の効率化やノウハウの共有等を目的として、両者を治験管理室に一元的に所属するコーディネーター（CRC）として体制整備することとし

た（平成25年度4月から本格運用開始）。

（3）Phase I 病棟

前臨床試験は当施設内で実施するのではなく、外部委託を予定していることから、当施設内で実施する最初の試験はPhase Iとなる。そこで、当施設内でPhase Iを実施できる体制整備から着手することとした。

① 院内各部門間調整

病院長、看護部、薬剤部や検査部門等との調整が進行中で、Phase I病棟の設置場所と職員配置が議論の中心となっている。設置場所については、ごくわずかながらも新病棟16階が実施実績を有することから有力候補となっているが、約2年後に新設が予定されている新外来棟内の化学療法室が新たな提案として挙げられており、現在も関係者間で検討が進められている。

② 病棟整備、病棟スタッフ教育等

Phase Iを実施するにあたり、病棟で必要となる物品類の整備を要するが、時間的に若干の余裕があることから、まだ本格的には取り掛かってはいない。

D. 考察

1) 新規抗HBV感染症治療薬候補となるリード化合物の選定支援

（1）シード化合物の新規性調査によるリード化合物の絞込み

①SciFinder®を用いた化合物新規性調査

新たに探索されたシード化合物に対し、今後も迅速な新規性調査を継続的にリード化合物の絞込みを行うこととする。なお、将来的に対応案件数の増加や特許対応が見込まれる場合、知財担当者の人員増が必要となる可能性がある。

2) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

（1）臨床試験プロトコール作成支援体制

①プロトコール作成ユニットの設置並びに試験的運用

今後、ユニット内の相互連携の強化や外部からの意見聴取などにより、更に質の高い臨床試験プロトコール作成を目指す。なお、臨床試験プロトコール作成支援件数が増加した場合、メディカルライターの人員増が必要となる可能性

がある。

## (2) 多施設共同試験実施体制

### ① NCGM 中央事務局の設置並びに試験的運用

本格稼働時の安定的運用が可能となるまで、まだ当面は外部への業務委託が必要となろう。なお、対応する多施設共同試験の件数が増加した場合、事務局員の人員増が必要となる可能性がある。

また、現在部分的である中央倫理委員会としての機能を、将来的には NCGM 中央事務局が運営することによって、完全に機能させることを検討している。更に、多施設を対象とすることから、倫理審査の IT 化（ペーパーレス化）による効率的な運営の実現を目指したい。

### ② コーディネーター部門の整備

CRC 間での業務の効率化やノウハウの共有のもとに、質の高い臨床研究の実施を目指す。

なお、対応する多施設共同試験の件数が増加した場合、CRC の人員増が必要となる可能性がある。

また、CRC による本格稼働時のモニタリング及び監査への対応は困難であるため、外部委託を行う予定である。

## (3) Phase I 病棟

### ① 院内各部門間調整

当施設では Phase I の経験が少ないことから、当該病棟のスタッフを含めて他施設の Phase I 病棟の視察を行い、当施設における Phase I 病棟整備の参考としたい。

### ② 病棟整備、病棟スタッフ教育等

対象症例や病棟スタッフの安定的確保が困難であるため、現時点では Phase I のみに対応する病棟ではなく、Phase I 実施時に随時対応する病棟として体制整備を行う予定である。なお、既存の病棟を活用することから、物品類の整備や改築費等は最小限に抑えたいと考えている。

Phase I 病棟が決定した後に、当該病棟を中心とした関連スタッフに対する教育並びに病院職員全体への啓発を目的とした説明会等の実施を計画している。

化合物の最適化および医薬品候補化合物の早期の獲得が望まれるが、未だその時期は定かではない。

それまでの期間、医薬品候補化合物獲得へ向けた基礎的研究の側方支援を行いながら、同じく数年を要すると見込まれる臨床試験実施並びに実施支援体制の確立・整備等に努め、医薬品候補化合物獲得後の前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発の円滑な実施に備えることとする。

## F.健康危険情報

・なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

・なし

### 2. 学会発表

・なし

## 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

## E.結論

新規抗 HBV 感染症治療薬候補となるリード化

## 治験及び先進医療プロトコール作成ユニット要綱

## (目的)

第1条 この要綱は、治験及び先進医療プロトコール作成ユニット（以下「プロトコール作成ユニット」という。）の組織及び運営について必要な事項を定めるとともに、独立行政法人国立国際医療研究センター（以下「センター」という。）が行う医師主導治験並びに先進医療の推進を図ることを目的とする。

## (ユニットの構成員)

第2条 プロトコール作成ユニットは、次に掲げる者をもって構成する。

- 一 臨床研究相談室長、医学統計研究室長、JCRAC データセンター長、探索的臨床試験支援室長、メディカルライター
  - 二 その他、プロトコール作成ユニット代表が必要と認めた者
  - 三 顧問として臨床研究センター長、相談役として医療情報解析研究部長、臨床研究支援部長、開発医療部長
- 2 プロトコール作成ユニットの代表は臨床研究相談室長とし、副代表は医学統計研究室長とする。

## (ユニットの任務)

第3条 プロトコール作成ユニットは、次の各号に定める臨床試験について研究代表者と協力して必要なプロトコール、標準業務手順書（SOP）、及び症例報告書（CRF）などの作成を行うとともに、センター倫理委員会（遺伝子解析研究に係る倫理委員会及びヒトES細胞研究倫理審査会を含む。）の承認並びに厚生労働省の承認を得ることを支援する。

- 一 センターの研究者が研究代表者として、これから実施しようとしている医師主導治験
- 二 センターの研究者が研究代表者として、これから実施しようとしている先進医療
- 三 その他、一及び二に準ずる医師主導治験及び先進医療

- 2 前項の目的を達成するため、プロトコール作成ユニットは、必要に応じて研究代表者から資料又はデータ等の提出を求めることができる。

## (定例会議)

第4条 プロトコール作成ユニットは、1ヶ月に一回定例会議を開催する。  
ただし、プロトコール作成ユニット代表が必要と認めた場合は、臨時に開催することができる。

- 2 プロトコール作成ユニット代表が必要と認めた場合は、構成員以外の者を出席させ意見を聞くことができる。

## (その他)

第5条 この要綱に定めるものの他、プロトコール作成ユニットの運営に関し必要な事項は、プロトコール作成ユニット定例会議で決定する。

附 則 この要綱は、平成24年 10月 1日から施行する。



平成24年 10月 1日現在

## 治験及び先進医療プロトコール作成ユニット名簿

代 表	小早川雅男	臨床研究相談室長
副代表	田中 紀子	医学統計研究室長
構成員	田中 康博	JCRAC データセンター長
〃	和泉 静枝	メディカルライター
〃	欠 員	探索的臨床試験支援室長
オブザーバー	泉 和生	臨床研究支援室長
相談役	新保 卓郎	医療情報解析研究部長
〃	伊藤 俊之	臨床研究支援部長
顧 問	満屋 裕明	臨床研究センター長

## 業務完了報告書

件名 医師主導治験を実施するための『(独) 国立国際医療研究センター中央事務局 (仮称)』の体制整備及び維持に係る業務

2012年9月26日付け契約に基づく上記業務について、2013年3月28日に業務が完了しましたのでご確認ください。

2013年3月28日

独立行政法人国立国際医療研究センター 殿

東京都中央区築地三丁目3番2号  
株式会社CTD

代表取締役社長 小林史明 印

## 添付資料一覧

### 1.独立行政法人国立国際医療研究センター（以下、NCGM という。）における医師主導治験業務の相談と対応

- ・ FDG-PET/CT 中央画像評価委員会の運営に関する手順書（資料 1-1）
- ・ FDG-PET/CT 最終効果判定委員会の運営に関する手順書（資料 1-2）

### 2.NCGM 医師主導治験中央事務局（仮称）（以下、中央事務局という。）の体制構築

#### ①治験実施に向けた計画作成および体制構築

#### (2)治験品質管理を考慮した手順作成

- ・ 治験実施計画書チェックリスト（資料 2-1）
- ・ 治験薬概要書チェックリスト（資料 2-2）
- ・ 同意説明文書チェックリスト（資料 2-3）
- ・ IRB 審議資料チェックリスト（資料 2-4）
- ・ 治験計画届チェックリスト（資料 2-5）
- ・ 治験変更届チェックリスト（資料 2-6）
- ・ 治験終了届チェックリスト（資料 2-7）

#### (3)他の実施医療機関の選定並びにモニタリングその他治験の運営及び実施に必要な業務を委託する開発業務受託機関（CRO）の選定

- ・ 実施医療機関選定時の確認事項（資料 2-8）
- ・ 開発業務受託機関選定時の確認事項（資料 2-9）

#### ②-1 各実施医療機関との調整

#### (1)IRB 準備段階で入手すべき情報の特定

- ・ IRB 審議資料一覧（資料 2-10）

#### (2)治験計画届作成段階で入手すべき情報の特定

- ・ 治験計画届（届書及び届出事項）（資料 2-11）

#### (3)治験実施段階で入手すべき情報の特定

##### ③治験実施計画に係わる問題点、確認点の収集

- ・ 各施設への周知に関するメール文例（資料 2-12）

#### (4)その他に入手すべき情報の特定

- ・ 届出事項変更有無の確認メール文例（資料 2-13）

#### ②-2 プロジェクト管理サイトの構築

- ・ website 画面（資料 2-14）

#### ④自ら治験を実施する者等の手順書の作成

- ・ 単施設治験用 15 種類（資料 2-15）
- ・ 多施設共同治験用 16 種類（オランザピン医師主導治験用）（資料 2-16）

#### ⑤資料の保管管理

- ・ 治験に係る保管資料一覧（資料 2-17）

### 3.NCGM スタッフに対する教育研修

- ・ 各回の配布資料（資料 3）

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  
研究報告書

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  
研究分担者 天野 将之  
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。本分担研究では、抗 HBV 活性と抗 HIV-1 活性を有すると期待される、新規に合成された候補化合物群における抗ウイルス活性の評価を MTT アッセイ法や real-time PCR 法を用いる事で継続して行い、このうち複数の化合物において HBV DNA 合成の阻害活性を有する事を見出した。

**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。既に研究代表者満屋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。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。

**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<sub>LAI</sub>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