

9. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N.
Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatology Res.* 2013 Apr 5.
10. Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K.
Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon-alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology Res.* 2013 Apr 19.
11. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N.
 α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2013 Oct;58(4):1253-62.
12. 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 Hepat.* 2013 Apr;20(4):281-9.
13. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.
Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):449-58.
14. 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.
Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology Res.* 2013 Aug;43(8):865-75.
- 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。

HBVの逆転写酵素の阻害作用を有する核酸誘導体の設計と合成

研究分担者 原口 一広、向後 悟（日本薬科大学、国際医療研究センター）

研究要旨：今年度は、以下の5つの研究テーマを実施した。1) 4'-置換-β-L-2'-デオキシリボヌクレオシドの合成、2) 3'-ハロゲン置換型BCAの合成、3) 4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成、4) 4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成、5) シクロプロピルビニルヌクレオシドの合成

A. 研究目的

本研究は、現在世界で広く用いられているHBVの核酸系逆転写酵素阻害剤(RTIs)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)新規薬剤をデザイン・合成を目的とする。

B. 研究方法

1) 4'-置換-β-L-2'-デオキシリボヌクレオシドの合成

L-2'-デオキシリボースからβ-L-2'-デオキシリボヌクレオシド(I)を合成する(Figure 1)。ヌクレオシドIは4',5'-不飽和誘導体(II)へ変換する。4'-アジド-および4'-メトキシ体(III)は不飽和ヌクレオシドIIの二重結合の化学変換により合成する。一方、4'-シアノ体および4'-エチニル体(V)は4'-ヒドロキシメチル体(IV)の化学変換により合成する。

2) 3'-ハロゲン置換型BCAの合成

標的化合物(VI, R³ = F, Cl, Br, I)は、ビニルスタナン(VII, R⁴ = SnBu₃)の炭素-スズ結合を炭素-ハロゲン結合に変換することにより合成する(Figure 2)。ビニルスタナ

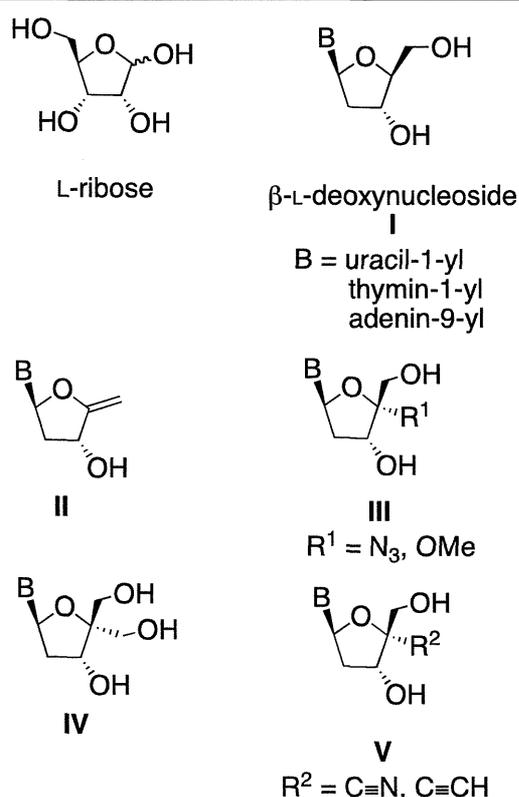
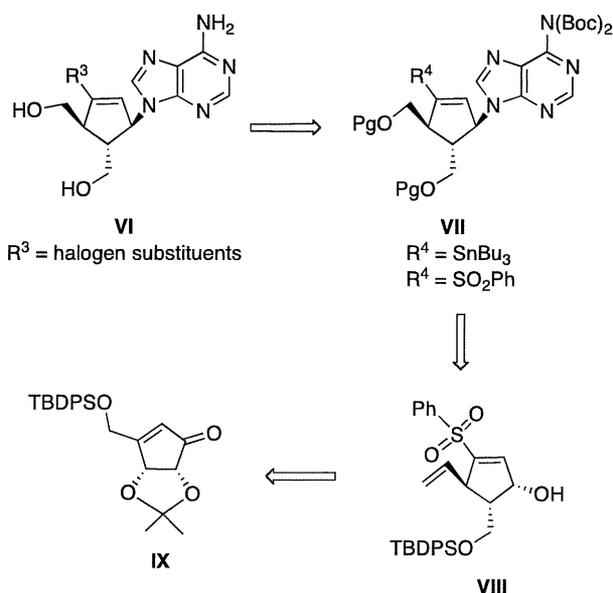


Figure 1. Synthetic strategy of 4'-substituted β-L-2'-deoxynucleosides

ン(VII, R⁴ = SnBu₃)はビニルスルホン(VII, R⁴ = SO₂Ph)の脱硫的スタニル化により合成する。ビニルスルホン(VII, R⁴ = SO₂Ph)はシクロペンテニルスルホン(VIII)への核酸塩基の導入とビニル基の酸化的開裂/ヒドリド還元により合成し、VIIIはシクロペンテノン(IX)から誘導する。

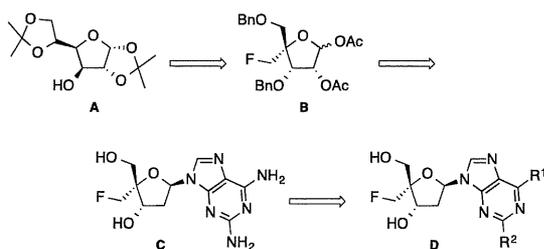


Scheme 1. Synthetic strategy of 3'-halogenated BCA (VI)

3) 4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成

抗 HBV 活性の期待できる候補化合物のひとつとして、4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドを設定し、その合成検討を行う。

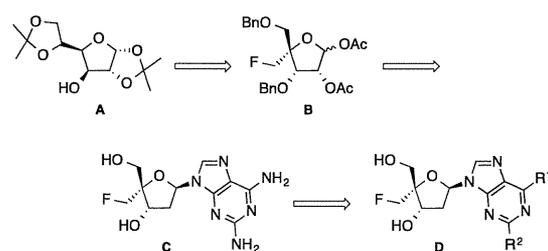
1,2:5,6-Di-O-isopropylidene-glucofuranose **A** を出発原料とし、鍵中間体となる 4'-fluoromethyl-ribofuranose 誘導体 **B** を合成する。これを 2,6-diaminopurine と縮合した後、2'位水酸基を還元、保護基の除去を経て、目的とする化合物のひとつである化合物 **C** とする。化合物 **C** のさらなる化学変換により、種々の候補化合物 **D** を得る。



4) 4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成

強い抗 HBV 活性を示すことが明らかとなった 4'-シアノヌクレオシド (**Figure 4**, 化合物 **C & D**) について、in vivo 試験用試料を合成する。

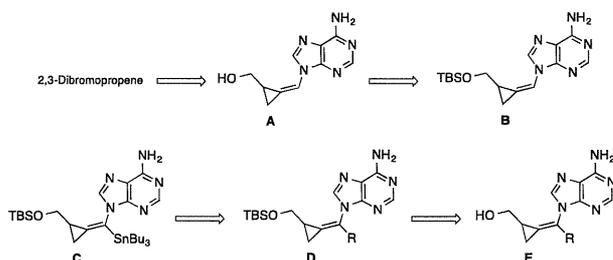
2-Amino-2'-deoxyadenosine **A** を出発原料とし、鍵中間体 **B** を合成する。その 4'位ヒドロキシメチルをシアノ基へと変換後、脱保護を行うことにより目的物 2-amino-4'-cyano-2'-deoxyadenosine **C** を合成する。さらに得られた化合物 **C** を酵素的に脱アミノ化することにより、4'-cyano-2'-deoxyguanosine **D** を得る。



5) シクロプロピルピルビニルヌクレオシドの合成

抗 HBV 活性の期待できる候補化合物のひとつとして、シクロプロピルヌクレオシドを設定し、その合成検討を行う。

市販の 2,3-Dibromopropene より得られる化合物 **A** の水酸基を保護して化合物 **B** とし、引き続き、リチウム化反応を経て化合物 **C** とする。化合物 **C** のスタニル基は種々の反応により様々な置換基へと変換可能であり、この反応を利用して、ビニル部の修飾体 **D** を合成する。最終的に化合物 **D** の保護基の除去を行い、候補化合物 **E** を合成する。



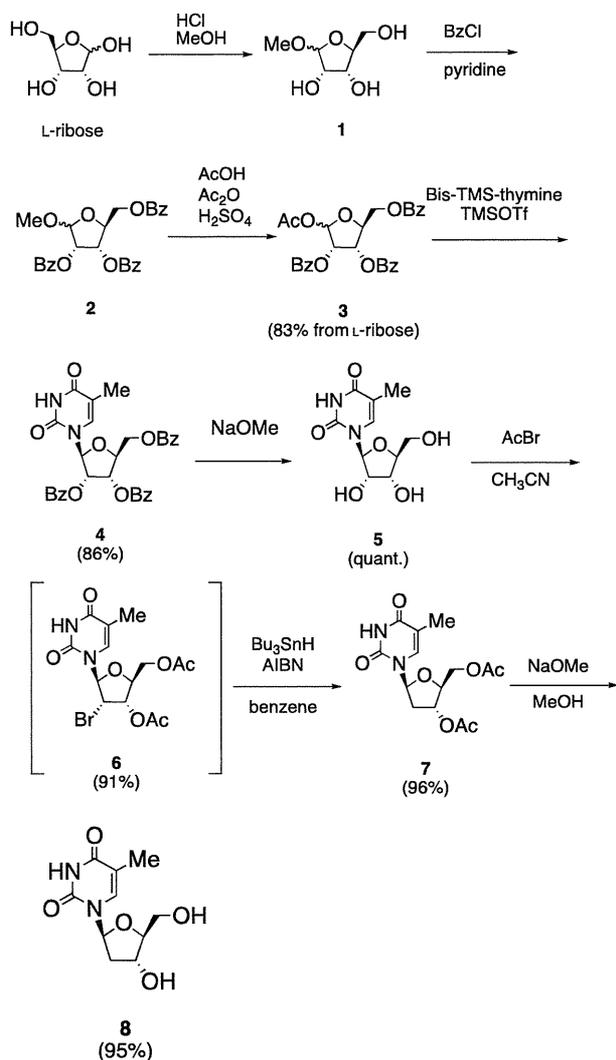
(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

1) 4'-置換-β-L-2'-デオキシリボヌクレオシドの合成

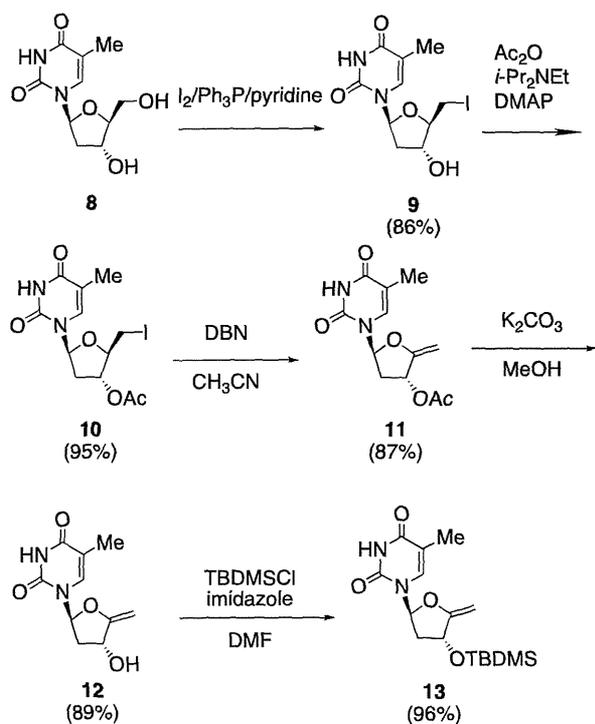
L-2-デオキシリボースを出発原料に用い1-O-メチル化により **1** とした後、ベンゾイル化およびアセトリススにより **2** を経て **3** を合成した (Scheme 2)。化合物 **3** をシリル化したチミンとのグリコシル化により **4** へ変換した後、脱ベンゾイル化により β-L-リボフラノシルチミン **5** を得た。化合物 **5** はアセトニトリル中、塩化アセチルと加熱還流下、反応させることにより **6** へ変換した後、スズラジカルによる還元および脱アセチル化により、**7** を経て β-L-チミジン **8** を良好な収率で得ることが出来た。



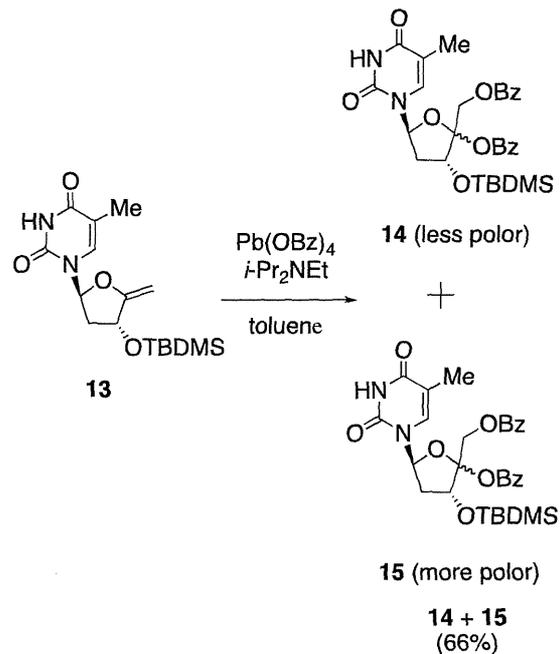
Scheme 2. synthesis of β-L-thymidine

L-チミジン **8** は、一級水酸基のヨウ素化と生成した **9** の二級水酸基のアセチル化および **10** の DBN による HI の脱離により、不飽和ヌクレオシド **11** とし、最後にアセチル基を TBDMS 基に変換し、**13** を得た。

(Scheme 3)



Scheme 3. Preparation of 4',5'-unsaturated β -L-thymidine **13**



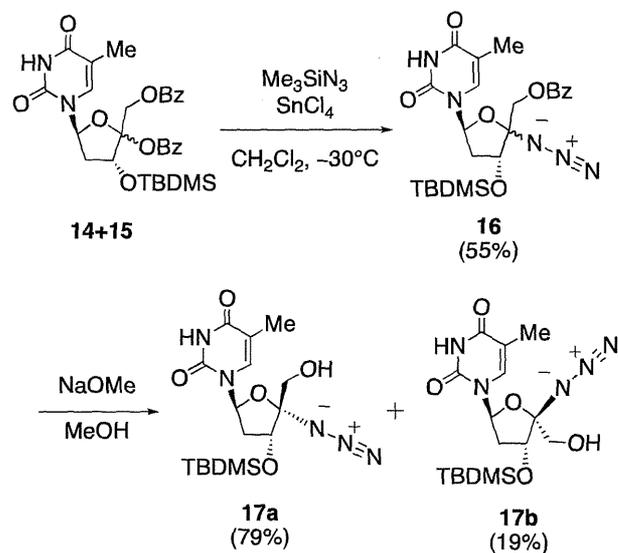
Scheme 4. $\text{Pb}(\text{OBz})_4$ -mediated di-benzoyloxylation of **13**

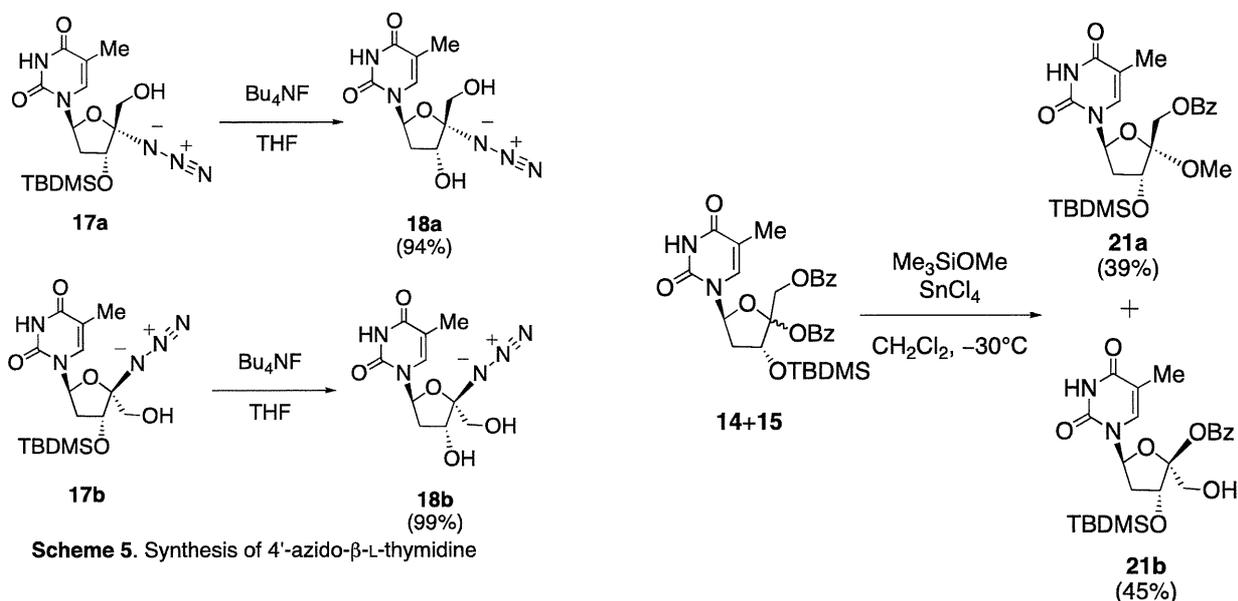
化合物 **13** は、 $\text{Pb}(\text{OBz})_4$ によるジベンゾイルオキシレーションを行い、鍵中間体となる **14** および **15** を立体異性体の混合物として得た (Scheme 4)。

4'-ベンゾイルオキシ体 (**14+15**) を塩化メチレン中、塩化スズの存在下においてアジドトリメチルシランと反応させることにより、目的とする 4'-a-アジド体 (**16**) を異性体の混合物として得た (Scheme 5)。

アジド体 **16** は脱ベンゾイル化により **17** へ変換することにより、両異性体を分離することが出来た。最後に、アジド体 **17a** と **17b**

の脱シリル化により、標的化合物 **18a** および **18b** を合成した。





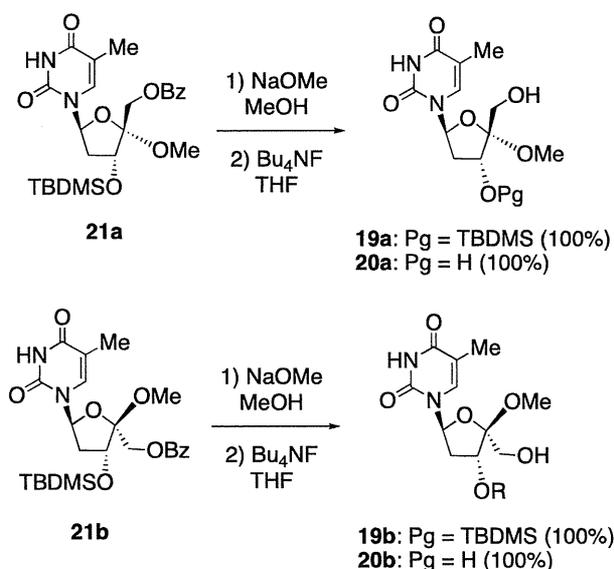
また、**14+15** を塩化メチレン中、四塩化スズ¹⁾の存在下、メトキシトリメチルシランと反応させたところ、目的とする 4'- α -メトキシ体 (**21a**) およびその立体異性体である

21b がそれぞれ 39% および 45% で得られた

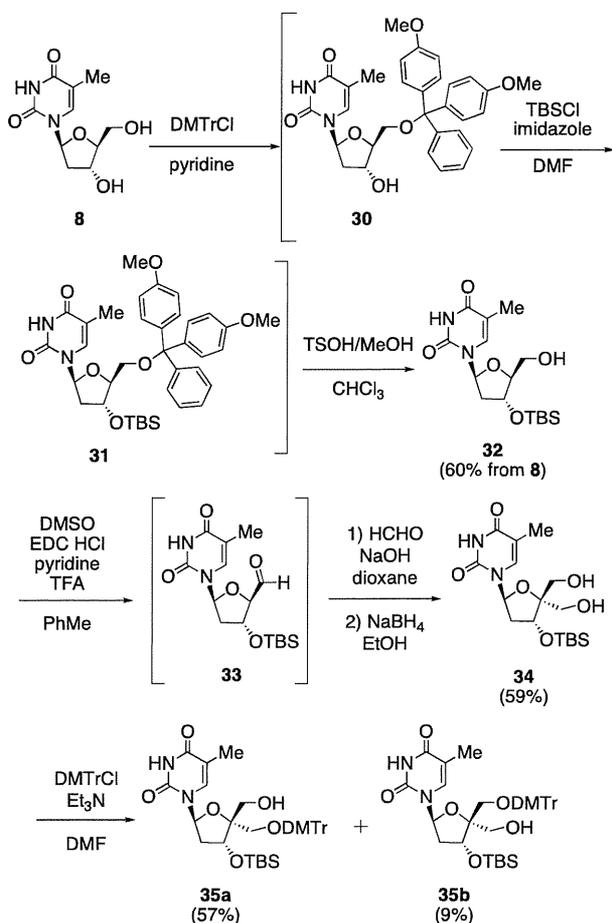
(Scheme 6)。得られたメトキシ体はメタノール中、ナトリウムメトキシドで処理することにより脱ベンゾイル化を行い、引き続きテトラブチルアンモニウムフルオリド

で脱シリル化し、**19a** を経て標的化合物 **20a**

と **20b** を合成することが出来た。



一方、シアノ体とエチニル体は 4'-ヒドロキシメチル体 **35a** を共通の中間体とし合成した (Scheme 7)。化合物 **35a** は β -L-チミン **8** を出発原料に使い、ジメトキシトリ



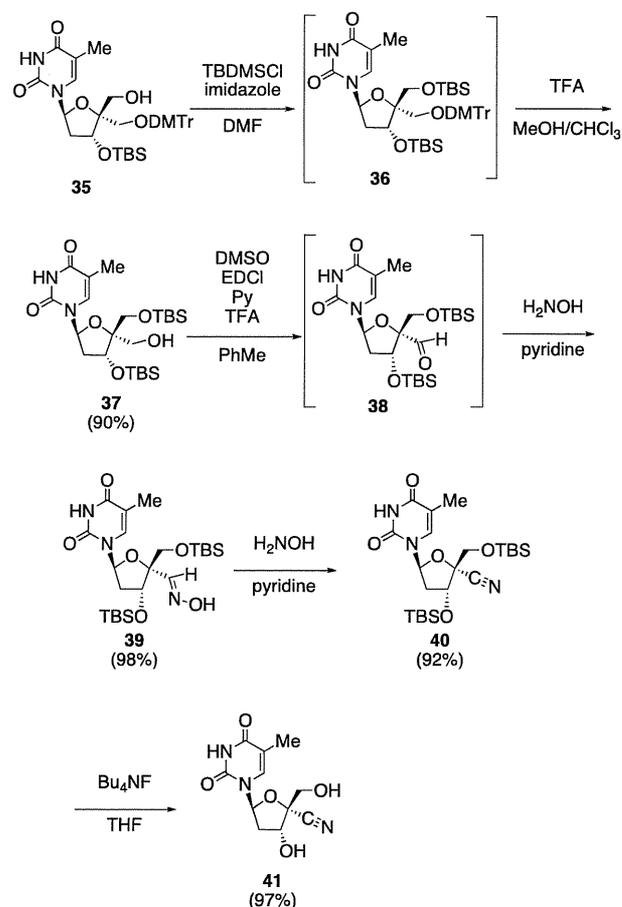
Scheme 7. preparation of 4'-hydroxymethyl- β -L-thymidine 35

チル化、TBS 化および脱ジメトキシトリチル化により **30**、**31** を経て 3'-O-TBS 体を合成した。次に、化合物 **32** をアルデヒド **33** へ変換し、引き続き aldol-cannizzaro 反応によりビスヒドロキシメチル体 **34** とし位置選択的なジメトキシトリチル化により目的とする **35a** を主生成物として合成した。

次に、**35a** の一級水酸基のシリル化と 36 の脱ジメトキシトリチル化により、4'- α -ヒドロキシメチル体 (**37**) を合成した

(Scheme 8)。

化合物 **37** は、Moffatt 酸化によりアルデヒド **38** へ変換し、引き続きオキシム化とオキシム **39** のメシル化により、シアノ体の保護体 (**40**) を得た。最後に、脱シリル化により、標的化合物である 4'- α -シアノ- β -L-チミジン (**41**) を得ることが出来た。



Scheme 8. Synthesis of 4'-cyano- β -L-thymidine 41

4'- α -エチニル- β -L-チミジン (**44**) は、アルデヒド **38** から誘導したプロモビニル体

(42) をカリウム *tert*-ブトキシドで処理しエチニル体 43 とし、脱シリル化により合成することが出来た (Scheme 9)。

4'-置換-β-L-チミジンの合成法にならい、デオキシアデノシン誘導体 (45-48) (Figure

2) およびデオキシシチジン誘導体 (49-52)

(Figure 4) を合成することが出来た。

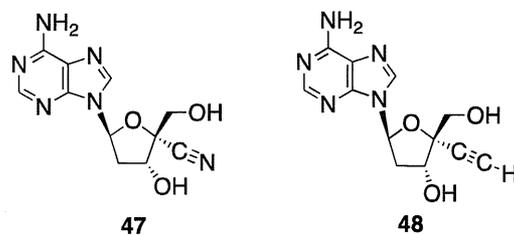
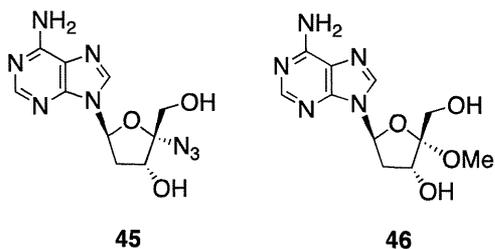
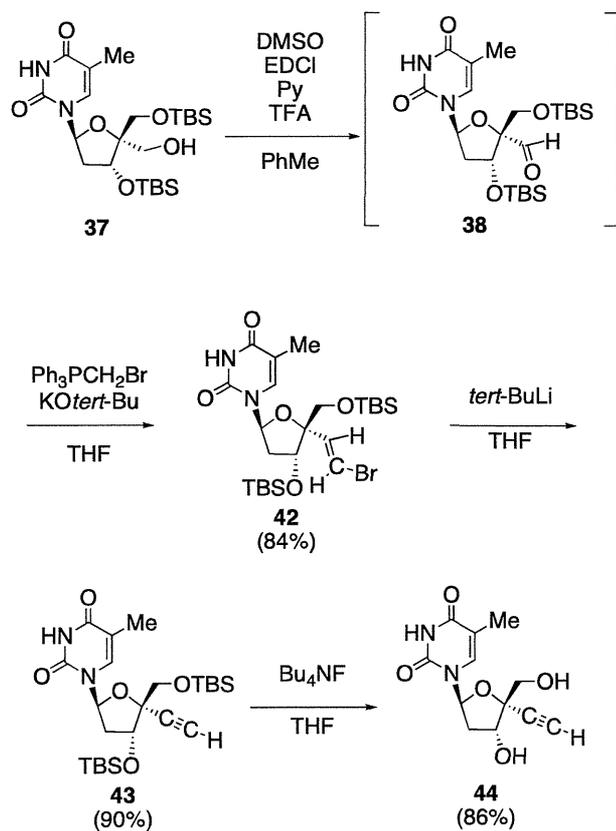


Figure 2. Structures of 4'-substituted β-L-2'-deoxyadenosine 45-48

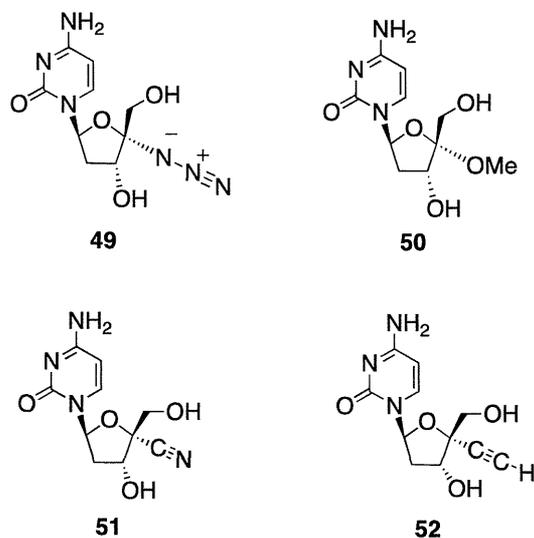


Figure 3. Structures of 4'-substituted β-L-2'-deoxycytidine 49-52

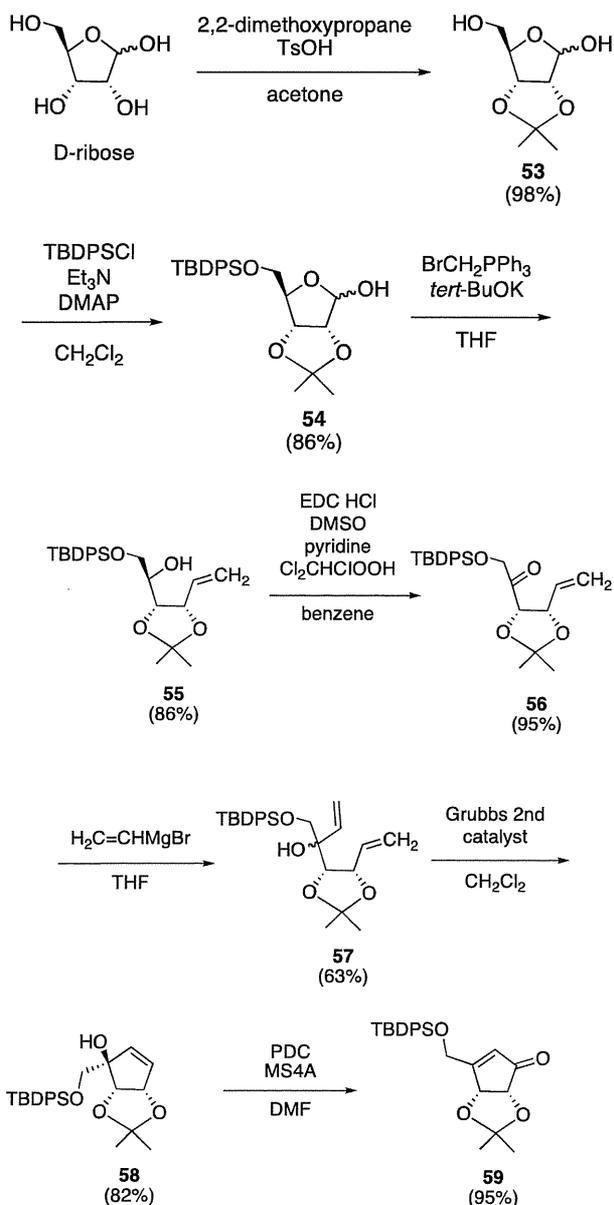
2) 3'-ハロゲン置換型 BCA の合成

D-リボースを原料に用い、インプロピリデン化および TBDPS 化により、53 を経て 54

を合成した (Scheme 10)。得られた 54 は

Wittig 反応によりビニルアルコール 55 とし、

引き続き Moffatt 酸化によりケトン 56 へ変換した。

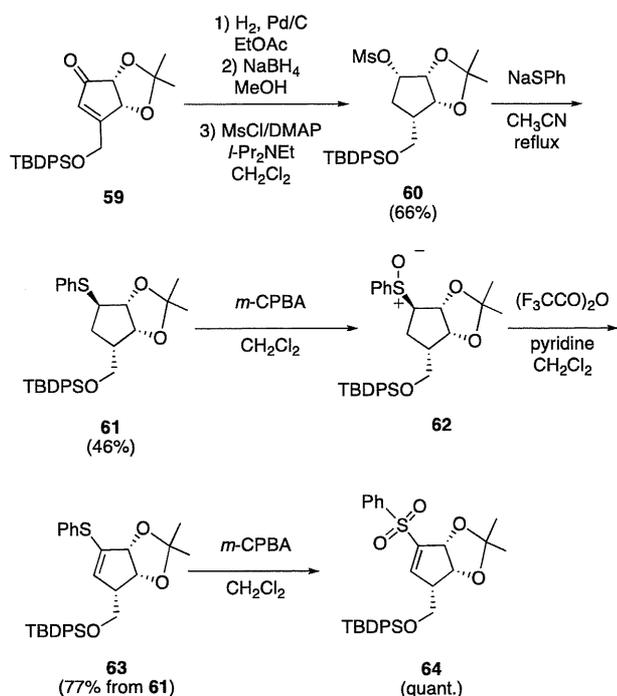


Scheme 10. Preparation of cyclopentenone **59**

ケトン **56** をビニル Grignard 試薬と反応させアリルアルコール **57** へ変換し、引き続き RCM 反応を行うことによりシクロペンテノール **58** を得た。化合物 **58** は PDC 酸化に付すことによりシクロペンテノン **59** へ変換した。

次に、シクロペンテノン **59** を 1)二重結合の接触還元、2)ケトンのヒドリド還元、3)二級アルコールのメシル化、によりメシレート **60** へ変換した (Scheme11)。メシレート **60** はフェニルチオラートイオンとの S_N2 反応によりフェニルスルファニル体 **61** へ変換した後、生成したスルフィド **61** のスルホキシド **62** への酸化およびトリフルオロ酢酸無水物との Pummerer 型の脱水素反応によりビニルスルフィド **63** へ変換した。得られたビニルスルフィド **63** は mCPBA 酸化によりビニルスルホン **64** へ変換した。

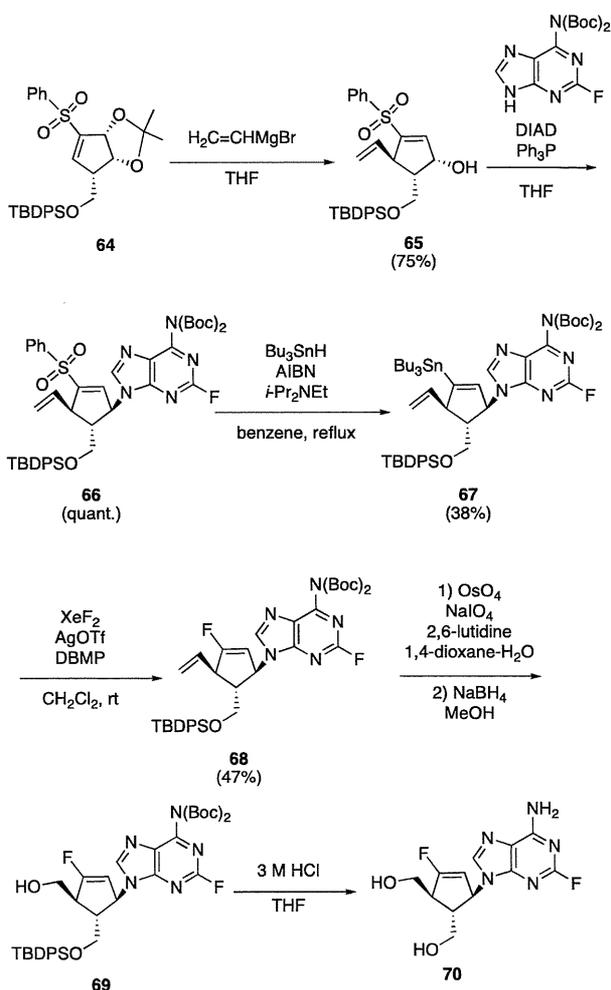
得られた **64** に対してビニルマグネシウムブロミドを反応させると、アリル転位反



Scheme 11. Preparation of cyclopentenylsulfone **64**

応が進行しアリルアルコール **65** が立体選択的に得られた (Scheme 12)。アリルアルコール **65** に対して DIEAD および Ph_3P の存在下、*N,N*-bis-Boc-2-フルオロアデニンを反応させたところ、 $\text{S}_{\text{N}}2$ 型のグリコシル化は効率よく進行し、目的とする β -ヌクレオシド **68** を立体選択的に良好な収率で得ることが出来た。得られたビニルスルホン **68** に対して *i*- Pr_2NEt の存在下、トリブチルチンラジカルを反応させたところ、脱硫的スタニル化が進行し、標的化合物の鍵化合物となるビニルスタナン **67** を得ることが出来た。引き続き、**67** に対して 4-*tert*-butyl-ジ-2,6-ジメチルピリジン (DBMP) およびト

リフルオロメタンスルホン酸銀 (AgOTf) の存在下、 XeF_2 を反応させることによりビニルフルオリド (**68**) へ変換することが出来た。現在、ビニル基の酸化的開裂と生成したアルデヒドのヒドリド還元によるヒドロキシメチル基への変換と脱保護により、最終目的化合物 **70** へ変換する予定である。



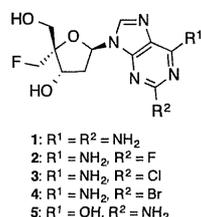
Scheme 12. Synthesis of 3'-fluoroBCA **70**

3) 4'-フルオロメチル-2'-デオキシピリヌクレオシドの合成

Figure 3 に示した合成経路に従い、化合物 **1** を得た (14 工程、通算収率 5.7%)。得られた化合物 **1** は、ジアゾ化反応を利用して、種々の 2-ハロゲノアデニン誘導体 **2-4** を合成した。また、化合物 **1** をアデノシン

デアミナーゼによる酵素的な脱アミノ化反応により、対応するグアニン誘導体 **5** へと変換した。

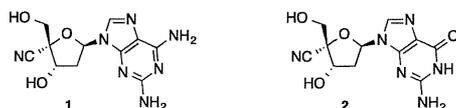
以上の5種類の4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成に成功し、*in vitro* での抗ウイルス活性試験に供した。



4) 4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成

Figure 4 に示した経路により、化合物 **1** を合成した (16 工程、通算収率 1.7%)。更に化合物 **2** をアデノシンデアミナーゼによる脱アミノ化反応により、化合物 **2** (出発原料より、17 工程、通算収率 1.4%) へと変換した。

以上、計画通り、2種類の4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成を終了し、*in vivo* 実験に供した。



5) シクロプロピルビニルヌクレオシドの合成

Figure 5 における化合物 **C** を強塩基である Lithium diisopropylamide (LDA) を用いてリチウム化を行った後、Tributyltin chloride と反応させることで、ビニル部分にトリブチルスタニル基の導入された化合物 **C** を高収率合成できることを明らかにした。今後、この化合物 **C** を用いて、ビニル部分を修飾した誘導体 **D** の合成検討を行う予定である。

D. 考察

平成25年度の研究テーマで設計した標的化

合物は、HIV の逆転写酵素を阻害することが知られている核酸誘導体をモチーフにした。これらの標的化合物は構造的に複雑性を有していたが、我々が開発した合成手法を用いることにより、極めて効率良く合成することに成功した。今年度に合成した化合物の中には、ETV に匹敵する活性を示すものが認められたが毒性を改善する課題が残された。平成26年度は、細胞毒性を低減することが期待される新規核酸誘導体を設計し、その合成を進めて行く予定である。

E. 結論

平成25年度の研究計画として5つのテーマを設定し、各テーマの標的化合物の合成を達成した。合成した新規核酸誘導体の抗 HBV 活性およびその細胞毒性の相関関係について、一定の方向性を見出すことができ、更にリファインされた化合物を設計することが可能となった。

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. Kubota, Y.; Kaneda, Y.; Haraguch, K. Abe, H.; Shuto, S. J.; Hamasaki, T.; Baba, M.; Tanaka, H. "Synthesis of Novel 4'-C-Methyl-1',3'-dioxolane pyrimidine nucleosides and evaluation of its anti-HIV-1 activity", *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 10884-10892.
2. Duraffou, S.; Drillien, R.; Haraguch, K. Balzarini, J.; van den Oord, J. J.; Andrei, G.; Snoeck, R. "KAY-2-41, a novel nucleoside analogue inhibitor of orthopoxviruses in vitro and in vivo", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 27-37.

2. 学会発表

1. 日本薬学会 第134年会 (2014) (熊本)

“4'-C-メチルジオキソランピリミジンヌクレオシド：合成および配座解析に基づく抗HIV活性の考察“

窪田 豊、金田有理、原口一広、水野美麗、阿部 洋、周東 智、濱崎隆之、馬場昌範、田中博道

2. 第23回抗ウイルス療法研究会 (2013) (東京)

gem-ジフルオロシクロブタンヌクレオシドの合成とその抗ウイルス活性”

原口一広、Jan Balzalini、馬場昌範、田中博道

3. International Conference on Antiviral Research 2013 (2013) (Sanfrancisco)

“The highly selective inhibition of Epstein-Barr virus replication by KAY-02-41 is dependent on the virus thymidine kinase”

N. Coen, S. Duraffou, K. Haraguchi, Kaori Yamada, J.J. Van den Oord, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei

4. International Conference on Antiviral Research 2013 (2013) (Sanfrancisco)

“KA-2-41: A novel nucleoside analog as inhibitor of orthopoxviruses in vitro and in vivo”

S. Duraffour, K. Haraguchi, R. Drillien, K. Yamada, H. Tanaka, R. Snoeck, G Andrei

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

平成24年度、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開発のために high through-put screening 法 (HTS) の確立を試みた。培養に牛胎児アルブミンを使用して HepG2.2.15.7 細胞培養上清から DNA 精製なしに直接定量 PCR を可能とした。平成25年度は、リン酸化されない核酸誘導体の効果を検討するためにヘルペスウイルスの thymidine kinase を細胞導入した。これにより1リン酸化されないと効果を示さないテノフォビルのような薬剤であっても1リン酸化反応を介さずに検討することが可能である。抗ヘルペス剤に抗 HBV 作用を持つものは見出されなかったが、今後も他の核酸誘導体を検討する。感染性組換え HBV 作製も文部科学大臣確認が取れたことから耐性ウイルスに対するアッセイ系の構築を開始した。

A. 研究目的

血液・体液感染を主な感染ルートとする hepatitis B virus (HBV) の in vivo 感染性は血液感染症としては非常に強いが、in vitro では初代ヒト肝細胞を除けば感染はほとんど成立せず、また細胞変性効果も少ないため、high through-put (HTS) アッセイ系の確立が困難である。対照的に human immunodeficiency virus (HIV) では、その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され、実際に有用な薬剤が臨床で多数実用化されている。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が、レプリコン法や pseudotype HCV 法が確立され、薬剤スクリーニングが可能となった。事実、RNA ゲノム複製に利用される HCV-RNA polymerase や HCV-protease など標的とする小分子化合物が見出され、これまで主流であったインターフェロン治療に置き換わろうとしている。

現在使われている抗 HBV 剤は HIV などの逆転写酵素(reverse transcriptase: RT)に対する阻害剤として見出されてきたものから、抗 HBV 活性のあったものを流用している状態である。例えばラミブジン、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 RT に比較的特異的な活性をもつ薬剤も見出されてきている。我々が開発した EFdA などは HIV に対する効果が非常に強いが、HBV には効果が弱い。ラミブジンやアデフォビルは HBV と HIV の RT をほぼ同レベルで阻害することから、HBV の RT は HIV のそれと類似点と相違点が混在する。興味深いことに 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ため、HIV-RT 阻害剤の ddI、ddC、d4T 等の dideoxy-nucleoside が HBV で効果を示さない理由のひとつと考えられている。また、RT 活性に直接関与しない terminal protein (TP) があるなど、機能的、構造的に異なることが報告されい

る。これらのことから HIV で代用したアッセイ系では HBV 特異的な薬剤を見出すことは困難である。

一方、RT 阻害活性を有する核酸誘導体は細胞内でリン酸化され、HBV-RT に認識される必要性がある。このうち HBV-RT における認識を変えることは困難であるが、リン酸化効率を改善することは可能である。例えばテノフォビルやアデフォビルにおけるリボース相当部位は非環状であり、その構造上の理由から宿主リン酸化酵素によって認識されない。そのため化学的に 1 リン酸化されたものを使用する。リン酸化効率を考えるとすべての核酸誘導体を 1 リン酸化したのちにスクリーニングに使用すれば確実に HBV-RT に効果を示す薬剤を見出す可能性が増加する。しかし、これでは化学合成の効率を下げってしまうだけでなく、1 リン酸化によってその細胞膜透過性も低下してくるため、効率的なアッセイへの障害となる。事実テノフォビル等の 1 リン酸化核酸は細胞膜透過性を改善させるために、リン酸基に化学修飾を施し、透過性を 100 倍以上に上昇させている。

本研究で研究分担者は、これまでヘルペスウイルスへの研究経験からヒット核酸誘導体を増加させるために HepG2.2.15.7 細胞にヘルペスウイルスリン酸化酵素 (herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: HSV-TK) を導入した。このことによって核酸誘導体の多くが、宿主リン酸化酵素より効率よくリン酸化される。このことによってスクリーニングにおけるヒット薬剤の検出向上を目指した。

B. 研究方法

1) 細胞: HBV を産生する細胞として、HepG2.2.15 細胞からクローン化された HepG2.2.15.7 細胞を用いた。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、抗 HSV 剤 acyclovir (ACV)、ganciclovir (GCV)、brivudine (BVdU)、そして bovine serum albumin fraction V (BSA) は Sigma-Aldrich 社より購入した。

3) 培養上清定量 PCR: 培養上清に $MgCl_2$ 存在下で DNase I を加え、37 度で 30 分間処理し、上清中に含まれるウイルス粒子由来ではない DNA を消化した。この処理液を DNA 抽出なしで直接 PCR 反応液に 2.5 μL 加えた。PCR は Takara 社のリアルタイム PCR 機器と SYBR Premix ExTaq II を使用、半定量化した。

4) HSV-TK の導入: HSV-TK は HIV-1_{KOS} 株から PCR 法によって TK 領域を増幅し、hygromycin 耐性遺伝子を導入した pCI-hyg ベクター (Promega

社) に組換えた。pCIneo-HSV-TK を HepG2.2.15.7 細胞に遺伝子導入し、hygromycin でセレクションを行った。セレクション後の HSV-TK 発現確認は GCV によって引き起こされる細胞毒性で評価した。

(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。ヘルペス TK のクローニング及び細胞への遺伝子導入は東北大学での遺伝子組換え実験申請済みである。

C. 研究結果

1) 昨年度樹立した定量 PCR での抗 HBV 活性: HepG2.2.15.7 細胞を BSA 存在下で 7 日間培養し、培養上清 DNA を抽出せずに HBV-DNA を定量化する方法によって既存薬をスクリーニングした。本年度は ETV の効果を合わせて検討し、おのおの数回行い、その平均値と SD を示す。定量 PCR 法によるため、SD はやや大きめであるが、平均値の絶対値以下に抑えることが可能であることが判明した。

2) HSV-TK 遺伝子導入: HSV-TK 遺伝子は HSV-1_{KOS} 株から PCR で増幅した。遺伝子配列が Genbank に登録されているものと同一であることを確認し、哺乳類細胞発現ベクターに導入した(図 1A)。これを hygromycin 存在下で培養し、TK 導入 HepG2.2.15.7 細胞を得た (HepG2.2.15.7-TK)。HSV-TK を導入すると GCV をリン酸化することができるようになり、GCV-3 リン酸化体 (GCV-TP) となり、細胞毒性を示す。一方で通常の細胞では GCV のリン酸化効率は非常に低く、ほとんど毒性を示さない。そのため導入した TK の発現レベル

表 1. 既存の抗ウイルス剤の効果

EC ₅₀ (nM)		
3TC	TDF	ETV
85 ± 51	172 ± 162	0.086 ± 0.05

HepG2.2.15.7 細胞を 0.1% BSA で 7 日間培養し、上清に放出される HBV-DNA 量を直接定量 PCR で検討した。SD も比較的小さく検討可能であった。抗ウイルス効果は最低 3 回のアッセイの EC₅₀ 値の平均値 ± SD で示す。3TC: ラミブジン、TDF: テノフォビル、ETV: エトラピリン。

を GCV phenotype アッセイにて検討した。GCV の毒性は 1 μM から見られ、100 μM では細胞生存率

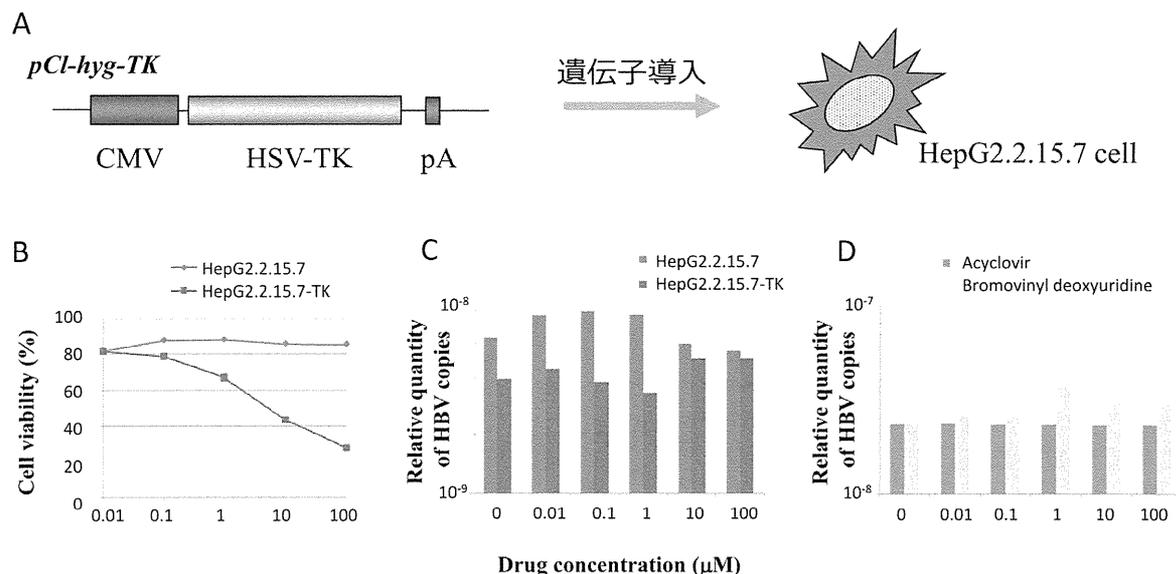


図 1. HSV-TK を利用した抗 HV 剤スクリーニング法

(A) HSV-TK は CMV をプロモーターとした発現ベクターを利用した。HepG2.2.15.7 細胞に導入されている HBV ゲノムを有するベクターが G418 によって選択されているために、市販のベクターの G418 耐性遺伝子を hygromycin (hyg) 耐性遺伝子によって置き換えた。このベクターを HepG2.2.15.7 細胞に導入し、hyg によって導入細胞を選択した。(B) TK 導入細胞での GCV による細胞毒性発現を示す。TK 非導入細胞では 100 μ M まで毒性は認められないが、TK 導入細胞では 1 μ M から細胞毒性が出現してきている。表現型として TK の発現を確認できた。(C) GCV の抗 HBV 効果を検討したが、上清中に放出されるウイルス量に明らかな低下は認められなかった。TK 非導入細胞と比べると低下傾向にも見えるが、1 μ M から細胞毒性 (B) が出現しているため、その影響の可能性はある。(D) TK 導入細胞での ACV と BVdU (5-bromovinyl-2'-deoxyuridine) 存在下での HBV 量は 100 μ M までほとんど変化していない。これらの薬剤では細胞毒性は観察されていない。

が 30%を下回るようになった。一方で TK 非導入細胞では 100 μ M でも細胞生存率に大きな変化がなかった。よって HepG2.2.15.7-TK 細胞では HSV-TK が機能的に発現していることが明らかとなった。

このときの培養上清中の HBV-DNA レベルを検討したところ、1 μ M まではやや減少気味で、その後増加している。BSA 存在下では細胞がほとんど増殖しないことから、1 μ M はやや GCV が効果を示し、その後は細胞毒性のために DNA が遊出しているとも考えられるが、どちらにしてもその効果は限定的で、単なる細胞毒性によって HBV 産生が減少している可能性も否定できない。

3) HepG2.2.15.7-TK を用いたスクリーニング：HSV-TK で効率よくリン酸化され、かつヘルペス DNA polymerase の良好な基質となる ACV と BVdU を検討した。ACV は 100 μ M まで HBV-DNA 産生量はほとんど変化なく、BVdU でやや上昇傾向がみられた。このデータは示さないが、どちらとも細胞毒性は見られなかった。

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によって、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、分担研究者は昨年度、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た。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ている。本年はこれらに加え、宿主細胞のリン酸化酵素によって認識されないために効果を示さない薬剤のリン酸化を補助するために HSV-TK を HBV 産生細胞に導入してスクリーニングを開始している。

ACV がリン酸化され、HIV の逆転写酵素を阻害する可能性について述べた論文 (J Virol 85:4618, 2011, J Biol Chem 283:31289, 2008, Cell Host Microb 4:260, 2008) から、ACV がリン酸化されれば、HIV の逆転写酵素を阻害する結果が得られている。また、これまでもリボース非環状核酸であるテノフォビルやアデフォビルが HBV や HIV の RT 活性を阻害することからも、ACV を含めた抗ヘルペス剤の中に抗 HBV 作用を示す核酸が含まれる可能性が高い。しかしリボース非環状核酸である ACV や GCV は残念ながら、抗 HBV 効果を示さ

なかった。GCV は細胞毒性を原因としているのか、実際に効いているのか判断に困る範囲であったが、仮に効果があるとしても宿主 DNA polymerase に認識されないなどの細胞毒性の低減策が必要となる。おそらく、4 位の酸素の硫黄化や塩基部の修飾が必要となるであろう。塩基部の修飾では BVdU については効果が認められていない。おそらく bromo-vinyl 基という比較的大きな修飾が塩基に行われているため、RT が取り込まなかったことが考えられる。

本年度は十分な数の核酸を試すことができなかったが、来年度はスクリーニング数を増やすことによってリードにつながるヒット核酸誘導体を見出して行く予定である。

E. 結論

昨年度 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 を確立したが、今年度は HSV-TK を導入することで候補薬剤の拾い上げ効率を上昇させることにつながる知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and Eiichi Kodama. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:4035-4038, 2013
- 3) Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand,

Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology* **10**:65

doi:10.1186/1742-4690-10-65, 2013

- 4) Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, Eiichi Kodama, Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 4554-4558, 2013.
 - 5) Kirby KA, Michailidis E, Fetterly TL, Steinbach MA, Singh K, Marchand B, Leslie MD, Hagedorn AN, Kodama EN, Marquez VE, Hughes SH, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effects of substitutions at the 4' and 2' positions on the bioactivity of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:6254-64, 2013.
 - 6) Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* in press 2013
 - 7) Fusako Miyamoto and Eiichi N Kodama. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, **19**:1827-34, 2013
- ### 2. 学会発表
- 1) Fusako Miyamoto, Fumiko Tomiyama, Kumi Kawaji, Mitsuo Kaku, Eiichi Kodama. Profile of a novel HIV reverse transcriptase inhibitor. NIH Tohoku University JSPS Symposium, Sendai, Japan, May 9-11, 2013
 - 2) 児玉栄一. MAGI 細胞による薬剤 screening

において酵素法がヒット化合物検出に優れる。第 27 回日本エイズ学会学術集会。熊本，Nov. 20-22, 2013.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 児玉栄一（京都大学・ヤマサ醤油株式会社と共同）エプスタイン・バーウイルス関連疾

患に対する薬剤およびにそのスクリーニング法 特願 2009-532175 特許 5326173 号 2008 年 9 月 8 日出願 登録平成 25 年 8 月 2 日

- 2) 中国（PCT 出願）同上 特許番号 2013092600196320 登録平成 25 年 9 月 26 日

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

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の変異株を含めた病態を解析し、新規治療薬の開発をめざしている。1) 1.24倍長 HBV 複製モデルの野生株を基にして作成した薬剤耐性変異株 7 種類をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、6 種類の感染を確認した。2) HBV粒子を産生する肝癌細胞株を用いて、新規の核酸アナログ候補化合物のスクリーニングを行った。その結果、2 種類の化合物に培養上清中の HBV-DNA 量を抑える効果が認められた。また、3) 上記 2 種類の化合物について、1.24倍長HBV複製モデルの野生株とエンテカビル（ETV）耐性株 1 種類をトランスフェクトしたHuH-7 細胞に化合物を添加し、細胞内のウイルス複製に与える影響を Southern blotting で確認した結果、2 種類の化合物はともにウイルス複製を抑制する傾向が認められた。そこで、4) HBV 野生株と ETV 耐性変異株を感染させたキメラマウスに化合物 2 種類を投与して、抗 HBV 効果を検討した。ETV と同様の用量である 0.02 mg/kg を投与した結果、いずれの化合物も野生株と ETV 耐性株の双方において HBV-DNA 量を抑制する効果が認められた。

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

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 B 型肝炎ウイルス（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。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。

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（ETV）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 細胞にトランスフェクト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) 薬剤評価系として、新規の核酸アナログ候補化合物 24 種類について、HBV 粒子を産生する HepAD38 細胞株または Hep2. 2. 15 細胞株を用い、HBV-DNA 量を指標としたスクリーニングを行った。

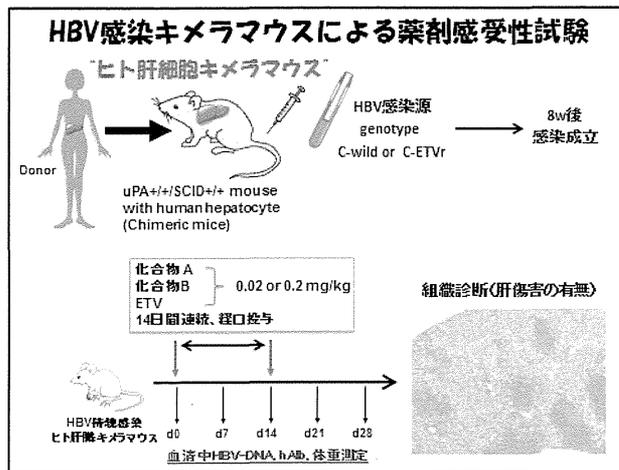
3) スクリーニングの結果、HBV-DNA 量の抑制効果を示した化合物について、1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株と ETV 耐性株 1 種類（genotype Ce）をトランスフェクトした HuH-7 細胞に化合物を添加し、細胞内のウイルス複製に与える影響を Southern blotting で確認した。

4) HBV 野生株と ETV 耐性変異株を感染させたキメラマウスに HBV-DNA 量の抑制効果を示した化合物を投与して、抗 HBV 効果や肝傷害の有無を検討した。（図 1）

（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。

(図 1)



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 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。
- 2) 検討した核酸アナログ候補の化合物のうち、2 種類に HBV-DNA 量を抑制する傾向が認められた。
- 3) Southern blotting の結果、HBV-DNA 量の抑制効果を示した上記 2 種類の化合物はともにウイルス複製を抑制し、IC50 は ETV と同等であった。また、ETV 耐性株に対する抗ウイルス効果も良好であった。
- 4) HBV を感染させたキメラマウスに 2 種類の化合物を ETV と同様の用量である 0.02 mg/kg で投与した結果、いずれの化合物も野生株と ETV 耐性株の双方において HBV-DNA 量を抑制する効果が認められた。

D. 考察

各種耐性株を含む HBV クローンをトランスフェクトした肝癌細胞株を用いることにより *in vitro* HBV アッセイ系を確立し、耐性株に対する抗ウイルス活性を検討することが可能となった。また、HBV 感染キメラマウスに化合物を投与することにより抗 HBV 効果を検討することができた。特に、キメラマウスに薬剤耐性変異 HBV を感染させた肝炎モデルは、新規の薬剤開発には、非常に有用な動物モデルである。今後、これらの系を用いて、*in vitro* での薬剤スクリーニングから、HBV 感染キメラマウスを用いた薬剤の抗 HBV 効果と、毒性などの有害事象の検討も行いたい。

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。HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに候補化合物を投与し、抗 HBV 効果を検証した。これら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) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. PLoS One. 2014;9(2):e86449.
 - 2) Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, Tanaka Y, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response. J Infect Dis. in press.
- #### 2. 学会発表
- 1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Matsuura K, Tanaka Y, Poovorawan Y. The variation of human leukocyte antigens (HLA) associated with chronicity and viral clearance in HBV infected Thai patients. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013. Singapore.
 - 2) Wong D, Watanabe T, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK,

Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in the Chinese. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013. Singapore.

- 3) Muroyama R, kumar V, Goto K, Kowatari N, Li W, Nakagawa R, Tateishi R, Tanaka Y, Mizokami M, Omata M, Koike K, Matsuda K, Kato N. Mica might have opposite effects on hepatocarcinogenesis between BHCC and C-HCC. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai.
- 4) Iio E, Tanaka Y, Watanabe T, Ikehara Y, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Gotoh M, Joh T, Mizokami M, Narimatsu H. A new liver fibrosis marker WFA+H1-12 is useful for an evaluation of the prognosis in liver cirrhosis patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
- 5) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
- 6) 岩瀬友也, 大根久美子, 可児里美, 小池史泰, 三浦敏史, 加藤恵子, 脇本幸夫, 田中靖人. HBc 抗体低力価試料を用いた、HBc 抗体測定試薬の比較検討. 第 62 回日本医学検査学会. 平成 25 年 5 月 18 日~19 日. 高松.
- 7) 田中靖人. 肝炎ウイルスと生体応答~ C 型肝炎の克服と B 型肝炎の再興. 第 37 回阿蘇シンポジウム. 平成 25 年 8 月 2 日~3 日. 阿蘇.
- 8) 楠本茂, 田中靖人, 溝上雅史. リツキ

シマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中の de novo B 型肝炎対策 : HBV DNA モニタリングによる preemptive antiviral therapy の有用性の検討. 第 17 回日本肝臓学会大会. 平成 25 年 10 月 9 日~10 日. 東京.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし