

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長）

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）

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臨床研究相談室長）

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臨床研究推進室長）

安藤 幸恵（独立行政法人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）

北川 明（独立行政法人国立国際医療研究センター開発医療部探索的臨床試験支援室長）

菊池 嘉（独立行政法人国立国際医療研究センター副臨床研究支援部部長）

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あと 1~2 年を要すると予測される。それまでの期間、①前臨床試験の実施に向けた各種調整、②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。なお、医薬品候補化合物獲得の進捗状況に鑑み、本年度は②を中心に研究を行った。

1) 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で、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) 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（H24年度）。

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。プロトコール作成ユニット設置以来、臨床試験プロトコールの作成支援に着手したのは7件となっている（表1）。

表1. 作成支援プロトコール（平成25年度）

医師主導治験	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
--------	---

先進医療	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） ⑤迅速薬剤耐性因子検出法を用いた重症細菌感染症の高度抗菌剤療法による先進医療（先進医療 A）
------	--

(注) 作成段階にある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（H24年度）。

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（事務局業務支援等）している。

今年度は、医師主導治験（多施設共同）2件、先進医療 B（多施設共同）1件、先進医療 B（単施設）1件の、合計4件の試験事務局業務の支援の実施を開始した（表2）。

表2. 試験事務局業務を支援した臨床試験（平成25年度）

医師主導治験	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（多施設共同） 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
--------	--

	脈閉塞術(B-RTO)に関する医師 主導治験 (多施設共同)
先進医療 B	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 (多施設共同) 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 (単施 設)

(注) 試験準備段階のプロトコールを含む

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、各々が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、平成 25 年度 4 月に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) として体制整備した。

これまで臨床研究を支援してきた CRC は ICH-GCP に対する理解が比較的浅かったが、企業治験の OJT によってより深い理解が得られ、業務の質向上に繋がっている。

(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。なお、H26 年 3 月に関係者で東京大学医学部附属病院の Phase I 病棟の見学を行い、検討の参考としている。

① 院内各部門間調整

病院長、救急部門、看護部、薬剤部、検査部門、施設課等との間で調整が進行中で、Phase I 病棟の設置場所並びに職員配置が議論の中心となっている。ごくわずかながらも Phase I 実施実績を有する新病棟 16 階と、新外来棟内の化学療法室が新たな設置場所の候補として挙げられており、現在も関係者間で調整が進められている。

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や病棟スタッフの教育を要す

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かれてはいない。

D. 考察

1) 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の作成を目指す。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。

これまで、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ていたが、内部の研究者から自己の医師主導臨床研究のプロトコール作成支援の要請が数多くなされていることから、ユニットの運用に関する見直しを検討中である。

(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

現在 NCGM 中央事務局が支援している臨床試験はいずれもまだ実施前の段階であり、試験終了までの一連の業務を経験できていないことから、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、現時点では、本格稼働時の CRC によるモニタリング及び監査等への対応は経験不足ゆえに困難であると考えられるため、当初は外部委託を行う予定であるが、当施設の CRC の育成を目的として、委託内容に CRC への教育を盛り込む予定としている（特にモニタリング）。

(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国内複数施設の Phase I 病棟の見学を行い、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、まずは、Phase I 実施時に随時対応する病棟（病床）として体制整備を行う方向性で検討を進めている。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。

なお、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。

E. 結論

新規抗 HBV 感染症治療薬候補となるリード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、前臨床試験の実施に向けた各種調整や、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

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

創薬化合物の新規性についての研究・解析及び前臨床試験移行諸条件の検討・解析及び
マーケットリサーチに関する研究

研究分担者 助永義和 独立行政法人国立国際医療研究センター・臨床研究センター・知財開発室長

研究要旨 最適化誘導体合成の新規性調査：合成された化合物の特許を含めた新規性調査を行った結果、複数の新規リード化合物が発見された。その中で目標の活性kineticsに近い候補が得られており、更に創製されるリード化合物の分担研究を継続する。

A. 研究目的

最適化誘導体合成の過程で、多くの医薬品候補が創製されつつある。これら構造式に基づく情報検索を行うことにより、創製化合物の新規性・特許性の検索に迫られているのが現状である。特許出願は必至であり、可及的速やかにリード化合物段階から新規性調査特許検索を行い、特許出願による権利確保を他者から勝利することは急務である。創製化合物の新規性についての研究・解析を行いリード化合物を調査する。得られた医薬品候補化合物は前臨床試験移行諸条件を検討・解析し、マーケットリサーチを実施する。

B. 研究方法

アメリカ化学会の CAS が提供する電子情報サービス SciFinder は論文検索もとより、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。新規性調査についてはこの SciFinder 解析ソフトを使用して、構造より検索を行う。前臨床試験移行諸条件検討・解析は製薬企業の創薬経験に基づく未公開ノウハウ及び ADMET 因子より、更に核酸アナログに特化した抽出を行う。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

■調査 1 : Exact search □Substructure search

□Similarity search

■調査 2 : QYLsubstitution 1 - 9

1.-S-(CH₂)₇-Me & -OH

2.-S-(CH₂)₅-Me

3.-S-(2Methylpropyl)

4.-S-butyl

5.-S-propyl

6.-S-Me

7.-S-Propyl

以上、1. の derivatives

8.-S-(CH₂)₄-Me (OH なし)

9.-S-Pr-n

A)新規リード化合物創製 1

1)塩基部修飾型 1 : 3 種類

2)塩基部修飾型 2 : 4 種類

3)糖部修飾型 : 2 種類

B)新規リード化合物創製 2 : 4 種類

C)新規リード化合物創製 3 : 4 種類

D-1)新規リード化合物創製 4-1 : 3 種類

D-2)新規リード化合物創製 4-2 : 4 種類

D-3)新規リード化合物創製 4-3 : 4 種類

D. 考察

核酸アナログとしてリード化合物 4 群より新規化合物が 26 個創製された。別のリードも創製中であり、リード化合物群は特許を睨んだ最終的新規構造を目標として予定通り創製が進捗している。

E. 結論

合成を展開する過程で有望な新規リード化合物の複数合成に成功した。その中には目標の活性 kinetics に近い候補が得られており、更に新規リード化合物を集積し、その群分けリード化合物の最適化誘導体から医薬品候補が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

特許取得前のためなし。

2. 学会発表

特許取得前のためなし。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 特許取得

未取得。

2) 実用新案登録

なし。

3) その他

医薬品候補化合物が取得された段階で特許出願を行う。

肝炎ウイルスのポリメラーゼ・逆転写酵素の結晶構造解析

研究分担者 尾曲 克己 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・助教

HBV ポリメラーゼの逆転写領域 (RT) の立体構造を原子レベルで明らかにするために、RT の結晶構造解析を行っている。本分担研究では、昆虫細胞発現系とコムギ無細胞発現系を利用して、RT の発現系の開発を行っている。本年度は、昆虫細胞発現系で HBV ポリメラーゼの TP 領域の発現が確認でき、コムギ無細胞発現系では RT 領域の発現が確認できた。これら TP と RT は可溶性蛋白質であることが示唆できたので、結晶構造解析に利用できるか検討を行っている。本年度は可溶性 RT の発現系作製についての途中経過を報告する。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)の治療薬に対する耐性株の出現により、現在の治療薬の効果が減少することが危惧されている。この耐性ウイルスに対する新規阻害剤の開発が急務の課題である。本分担研究では阻害剤の標的である HBV ポリメラーゼの逆転写(RT)領域の結晶構造解析を目的としている。HBV ポリメラーゼは不溶性の蛋白質とされており、20年以上、その構造解析が遅れていた。そこで、蛋白質発現系の開発から手がけることにした。蛋白質発現系には、目的である結晶構造解析の行いやすさから、大腸菌、昆虫細胞、無細胞発現系を選んだ。これらの発現系の中で、どれが蛋白質結晶構造解析に適しているか分かっていない。この分担研究では、昆虫細胞と無細胞発現系による蛋白質の発現を利用した。大腸菌発現系は、安武博士のグループが担当した。

平成25年度までに、安武博士が行った大腸菌発現系の作製から、HBV ポリメラーゼ内の発現領域がおおよそ決定できた。そこで、結晶構造解析の目的である RT 領域を昆虫細胞発現系にて発現させるために、トランスファーベクターとリコンビナントウイルスを作成した。

平成26年度は、前年度までに作製したリコンビナントウイルスを利用して、蛋白質発現の確認を

目的とした。また、バキュロウイルス発現系とは別に、高発現・可溶性の蛋白質を得るため、コムギ無細胞発現系にて蛋白質発現系の開発も行った。

B. 研究方法

昆虫細胞発現系

HBV ポリメラーゼを図1に示したようなドメインにわけ、TPとRT領域をリコンビナントバキュロウイルスに組み込んだ。まず、リコンビナントウイルスを作製するために、トランスファーベクターにTPとRT領域を挿入した。これらのトランスファーベクターを利用して、相同組み換えによりバキュロウイルスを作製した。

作製したバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、27 ° Cで48~72時間培養した。蛋白質の発現を確認するために、培養後の感染細胞を回収し、超音波破砕機で破砕した。破砕後のサンプルを遠心し、上清をSDS-PAGEとWestern Blotに供した。

TP	spacer	RT	RNaseH
----	--------	----	--------

図1 : HBVポリメラーゼのドメイン構成。
TP: Terminal Protein, RT: 逆転写領域, RNaseH: RNase活性領域

コムギ無細胞発現系

コムギ無細胞発現系には、セルフリーサイエンス社 WEPROシリーズを利用した。まず、蛋白質発現用のベクターを作成した。発現領域は、RT領域全長とN末端とC末端を切断したRT(Δ NC)とした。これらの蛋白質には、精製用のタグとして、GSTとHisの両方をN末端に付加してある。

蛋白質発現の手順は、WEPROのマニュアルに従って行った。大まかな手順は次に示したとおりである。まず、発現プラスミドから発現領域の蛋白質をコードするmRNAを合成し、その後、mRNAを翻訳反応液に加え、20時間反応後、翻訳産物を確認した。蛋白質合成確認のために、翻訳産物を遠心し、上清をSDS-PAGEとWestern Blotに供した。

C. 研究結果

昆虫細胞発現系

昆虫細胞発現系で発現させる蛋白質領域を図1のように4つにわけ、TP、RT領域を組み込んだリコンビナントバキュロウイルスを作製した。このウイルスを昆虫細胞に感染させ、48~72時間後に感染細胞を回収した。これらの細胞中に目的の蛋白質が発現しているかを確認するために、回収した細胞を超音波処理により破碎し、抽出液をSDS-PAGEとwestern blotに供した。図2が示すように、TP領域については、蛋白質の発現が確認できた。しかし、RTについては、蛋白質発現が非常に少なかった。

TPとRTの可溶性を調べるために、細胞抽出液を高速遠心して調べた。TPは、細胞抽出液の遠心前後での蛋白質量の減少がほとんどなく、可溶性と推定できた。しかし、RTは遠心前後の蛋白質量の減少が大きく、RTは昆虫細胞発現系でも不溶性の可能性があると分かった。



図2: 昆虫細胞発現系によるTP,RTの発現 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。

Lane 1: 非感染細胞, Lane 2: TP, Lane 3: RT, Lane 4: TPとRTとの共感染

コムギ無細胞発現系

昆虫細胞発現系を利用した場合、RT領域の発現は困難と考え、コムギ無細胞発現系にて蛋白質発現を調べた。発現させた領域は、RT領域に限定し、昆虫細胞発現系と同様にRT領域全長(RT)と、N末端とC末端を切断した領域(RT(Δ NC))とした。図3と図4にRT領域全長RTを発現させた結果を示した。Hisタグを付加した蛋白質をHis-RT, GSTタグを付加した蛋白質をGST-RTとして示してある。His-RT、GST-RTともに蛋白質の発現を確認できた。

発現した蛋白質が可溶性であるか不溶性であるかを調べるために、蛋白質合成反応液を遠心し、遠心後の上清をSDS-PAGEとWestern Blotに供した。Hisタグを付加した蛋白質は遠心後の上清に確認できなかったが(図3, Lane 2)、GST-tag付きの蛋白質を発現させた結果は遠心前と遠心後でSDS-PAGEのバンドの濃淡がわずかに減少しただけで、蛋白質量にわずかな変化しかないと考えられる(図4, Lane 2)。



図3: コムギ無細胞発現系を用いたHis-RT発現 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。

Lane 1: 蛋白質合成産物、Lane 2: 合成産物遠心後の上清。



図4: コムギ無細胞発現系を用いたGST-RT発現 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。

Lane 1: 蛋白質合成産物、Lane 2: 合成産物遠心後の上清。

次に、RT領域のN末端とC末端を切断した蛋白質の発現を行った。それらにHisタグを付加したものをHis-RT(Δ NC), GSTタグを付加したものをGST-RT(Δ NC)として示してある。RT全領域のものとは比べ、His-tag付きの蛋白質も少し可溶化した(図5, Lane 1)。一方、GST-tag付き蛋白質は遠心前後の上清中の蛋白質量に違いはなかった(図6, Lane 1)。そのため、今回は可溶性であるGST-tag付きタンパク質の発現を利用することにした。

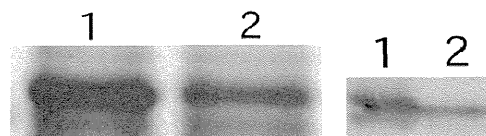


図5: コムギ無細胞発現系を用いたHis-RT(Δ NC)発現 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。Lane 1: 蛋白質合成産物、Lane 2: 合成産物遠心後の上清。



図6: コムギ無細胞発現系を用いたGST-RT(Δ NC)発現 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。Lane 1: 蛋白質合成産物、Lane 2: 合成産物遠心後の上清。

蛋白質合成反応後の産物には、目的のGST融合蛋白質以外の、蛋白質合成に必要な蛋白質が粗雑物として含まれる。これらの粗雑蛋白質をアフィニティーカラムにて除き、目的の蛋白質のみを精製した。まず、蛋白質合成後の反応溶液を遠心し、上清をアフィニティーカラムに供した。これらの精製サンプルをSDSとwestern blotに供した。図6にGST-RTを精製した結果を、図7にGST-RT(Δ NC)を精製した結果を示した。

精製前には目的の蛋白質以外の粗雑蛋白質がたくさん見えていたが、精製後の産物をSDS-PAGEに供すると目的蛋白質のバンドのみが確認できた。これらの精製蛋白質は、目的の蛋白質の分子量(それぞれ75kDa, 87kDa)と一致する。また、Western blotにて目的の分子量の位置にサンプルバンドを確認できた。このGST-RT、GST-RT(Δ NC)のアミノ酸配列を確認するために、アミノ酸配列解析を安武博士に依頼し、発現蛋白質がHBV RT領域を発現していることを確認した。

精製後のGST-RTおよびGST-RT(Δ NC)の発現量をBradford法により測定すると、50-100 μ g/mL程度の蛋白質が発現している事が分かった。

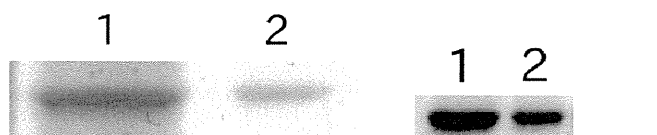


図7: GST-RTの蛋白質精製 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。

Lane 1: 蛋白質合成産物, Lane 2: 精製産物

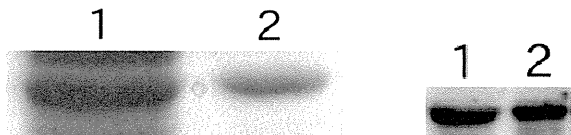


図8: GST-RT(Δ NC)の蛋白質精製 (左: SDS-PAGE, 右: Western Blot)。

Lane 1: 蛋白質合成産物, Lane 2: 精製産物

D. 考察

昆虫細胞発現系にてTPとRT領域の蛋白質発現を確認するために、これらの遺伝子領域を含んだリコンビナントバキュロウイルスを作製した。ウイルス感染後の蛋白質の発現を確認すると、TPは非常に大量に発現していたが、RTの発現量は少なかった。また、可溶性について調べると、TPは可溶性蛋白質であるが、RTは不溶性であることが示唆できた。

コムギ無細胞発現系にて、RT領域の発現を確認した。発現領域はRT全領域とN末端とC末端を切断した領域である。また、これらのN末端にはHisタグとGSTタグを融合させてある。これらの発現蛋白質の中で、GST融合のRT、つまり、GST-RTとGST-RT(Δ NC)は目的蛋白質を視覚的に確認できる程度発現しており、また、可溶性である推測できた。

HBVポリメラーゼのリコンビナント蛋白質について、ドメインに分割して、その発現量について詳細に知らべた研究は、ほとんどない。今回、安武博士の大腸菌発現系、昆虫細胞発現系とコムギ無細胞発現系でドメインごとに、蛋白質がどの程度発現し、その発現蛋白質が可溶性であるかどうかについて検討できた。蛋白質発現系に依存して、発現蛋白質の可溶性の変化がみられることが示唆できた。発現系により、蛋白質の発現・可溶性が変化することは、経験的に知られている。コムギ無細胞発現系にて、RT領域の発現が可溶性蛋白質として確認できたが、その発現領域が大きくなれば、発現量と可溶性の減少も確認できた。現在、発現蛋白質の活性測定を行っていないので、今後、蛋白質活性を含めた発現領域の確定を行い、可溶性蛋白質の取得を行う必要がある。

蛋白質発現量を調べるとコムギ無細胞発現系では、精製後のGST-RTおよびGST-RT(Δ NC)の発現量は、Bradford法で50-100 μ g/mL程度の蛋白質が発現している事が分かった。この発現量は、結晶構造解析に一般的に利用される発現系、大腸菌や昆虫細胞発現系に比べ、発現量が10倍以上低い。これらを解決するために、コムギ無細胞系発現用の合成機を利用して、蛋白質の収量の向上を検討している。現在、十分な検証ができていないが、この合成機を利用することで、手作業で蛋白質を発現・精製するよりも、高効率で蛋白質を発現・精製できることが分かった。今後、この蛋白質合成機を利用して、結晶化に向けた可溶性蛋白質が取得できるか検討する。

E. 結論

昆虫細胞発現系では、TPが可溶性蛋白質として得られた。TPについて蛋白質の精製を行っており、その後、結晶化に供する予定である。コムギ無細胞発現系では、RTが可溶性蛋白質で得られる可能性が示唆できた。この発現系を利用して、蛋白質の結晶化および構造解析を行う

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 2014 Mar 8. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

HBV 逆転写酵素の構造学的研究

研究分担者 安武 義晃（産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員）

研究協力者 尾曲克己（名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・助教）

研究協力者 田中靖人（名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・教授）

研究要旨

本研究は、B型肝炎治療薬開発において極めて重要な創薬ターゲット分子であるB型肝炎ウイルス（HBV）逆転写酵素（Pol）の立体構造を原子分解能で解析することを目指すものである。Polの安定性・可溶性の問題は未だ解決されておらず、結晶化サンプルの取得はこれまで達成されていない。私たちはH24年度に引き続き、Polの様々なフラグメントの発現テストを行い、可溶性でかつ安定に取得できる領域の探索を行った。結果、Pol- Δ -8がシャペロンと強く結合した状態で共精製できることを見出し、本サンプルの結晶化実験と構造解析を行った。次に、GSTやGFP等蛋白質との融合発現テストを行い、いくつかの系で可溶性に取得できることを見出した。最後に、Polが逆転写のプライミング反応時に結合する ϵ RNAを組換え大腸菌により取得した。 ϵ RNAはPolが安定に存在するために必要な会合パートナーの可能性があり、 ϵ RNAの取得により、Polの結晶化に向けた多様なサンプル調製実験が期待できる。

A. 研究目的

本研究は、HBV逆転写酵素（Pol）を大量に準備し、結晶化を成功させることによって、Polの原子分解能での立体構造を明らかにすることを目的とする。構造解析に成功することで、様々な薬剤候補物質との複合体構造解析が現実的となり、また阻害メカニズムやPolの薬剤耐性獲得メカニズムを理解することが可能となる。同時に、計算機化学によるドッキングシミュレーションを強力に押し進め、新たな候補化合物の探索へと展開できる。

本研究目的を達成するためには、構造を正しく形成したPol蛋白質を大量に、かつ高い精製度で準備することが要求される。しかしながら、これまで世界中で行われている数多のHBV研究において、それを達成

した例はない。そこで本研究では、Polを安定に大量に取得するためにどのような操作および技術が必要であるか探索することから始めている。これまでの研究で、Polは4つのドメイン領域に分割できると推定されている。N末端側から順に、プライミングに関与するN末端側ドメイン（TP）、機能を持たないスペーサー領域（SP）、ポリメラーゼ（逆転写）ドメイン（RT）、RNaseドメイン（RH）である。H24年度から引き続き、様々な位置でPolをフラグメント化し、これらドメイン領域の構造形成単位がどこにあるか探索を行った。加えて、様々な高溶解度蛋白質との融合コンストラクトの作成、会合パートナーであるだろうRNA発現コンストラクトの作成等を行った。

B. 研究方法

1. 発現系

Pol 遺伝子 (Genbank: AB246345) は、名古屋市立大学大学院医学研究科の田中靖人博士より供与いただいた。ドメイン境界に関する情報は GlobPlot2 等の構造予測ソフトウェアを用い、また名古屋市立大学の尾曲克己博士との情報交換を基に推定した。また尾曲博士には、真核細胞での発現を行っていただいている。

Pol 遺伝子は、オリジナルに加え、コドン使用頻度をバクテリアに最適化したものを複数種類作成した。様々な長さのフラグメント、またそれらを別の蛋白質と融合させた蛋白質、また活性残基に変異を入れた蛋白質等を発現させるにあたり、すべての場合で His-tag を付加するよう配列を設計した。εRNA の発現は、tRNA の一部を εRNA に置き換えたキメラ RNA を作成することで、RNA の安定性を向上させて実験を行った。

大腸菌を用いる場合は、BL21 を発現ホストの基本とし、pET、pACYC 等のベクターを、ロドコッカスを用いる場合は、L88 株 (リゾチーム感受性株) を発現ホストとし、pTip ベクターを用い、それぞれ適切な条件で IPTG、チオストレプトンを用いて発現誘導を行った。

2. 精製・検出

菌体は遠心分離により集菌し、ビーズショック (安井器械) や sonication により菌体を破碎、遠心分離により不溶物を除去した後、Ni アフィニティレジン (ロシュ) を用いた精製を行った。非変性の native condition、および 8 M urea 存在下での変性条件 (denatured condition) の双方で精製を行った。目的蛋白質発現の検出は、遠心分離後の上清および沈殿の双方を SDS PAGE および抗ヒスタグモノクローナル抗体 (Covance) を用いたウェスタンブロットに

より行い、溶解度の程度を精査した。RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて製品プロトコルに従って行った。

3. GroEL と Pol-Δ-8 共精製

上記の Ni アフィニティカラムによる精製後、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex, GE ヘルスケア) により行った。溶出蛋白質は SDS PAGE で解析し、さらに抗ヒスタグ抗体および抗 GroEL 抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

4. 結晶化と構造解析

GroEL/Pol-Δ-8 は濃縮後、スパースマトリックス結晶化スクリーニングキット (Hampton Research) に供し、初期結晶を得た後、条件の最適化を行った。結晶回折実験は高エネルギー加速器研究機構 (つくば市) で行い、構造解析は CCP4 等の結晶学ソフトウェアを用いることで行った。

C. 研究結果

1. Pol 断片化および融合蛋白質の発現

発現を試みた HBV-Pol の領域は以下のとおりである。

- ① Pol 全長
- ② RT-RH ドメイン領域のうち、RT の N 末端側を様々な位置に変化させたもの
- ③ RT-RH ドメインの RH 側終結位置を変化させたもの
- ④ ②、③の中でさらに RT の途中にある保存性が低く、かつ avian HBV Pol には存在しない介在配列 (ins) を削除したもの
- ⑤ TP および TP の N 末端側を削除したもの

これらはほとんどの場合、コドン最適化したものおよびオリジナルの塩基配列の両方を試行し、場合によって RT 活性残基に変異

を入れ不活性型にしたものや、ヒスタグの位置をN側C側と変化させてテストを行った。またいくつかのサンプルは、大腸菌に加え放線菌である *Rhodococcus erythropolis* を用いた発現実験を行った。

結果を概観すると、まずコドン最適化は発現量に大きな向上をもたらすものではなく、オリジナル配列と同等であった。また、断片化、変異導入やヒスタグの位置を変えることにより、劇的に可溶性が向上することはなかった。これらのうち、②に属する Pol- Δ -8 を大腸菌シャペロンと共精製することができた (図1)。このサンプルは後述のとおり結晶化および構造解析を行った。また、③に属する RT- Δ -1、および④に属する RT- Δ -1- Δ ins は少量ながら可溶性に蛋白質を得ることができたため、これらを GST, MBP, GFP 等の高溶解性蛋白質と融合させる実験を行い、融合蛋白質も可溶性に得ることができた (図2)。今後、結晶化を行う量を確保できるかどうか検討を行う。この他に、可溶性ではないものの、効率良く大量に封入体として取得できる TP 等いくつかのサンプルは、リフォールディングによって構造を取り戻すことができないか検討を行うことが可能である。

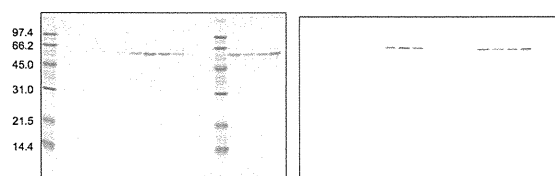


図1. 精製 Pol- Δ -8/GroEL

ゲル濾過溶出フラクションの SDS PAGE (左) と、抗ヒスタグ抗体を用いたウェスタンブロット解析 (右)。GroEL と Pol- Δ -8 はともに分子量が等しく、ゲル上で分離できていないが、抗 GroEL 抗体を用いた場合も同一のバンドが検出されるため、共精製されていると考えられる。Pol と GroEL の相互作用は多くの文献で示されており矛盾しない。GroEL 単体には抗ヒスタグ抗体は反応しない (data not shown)。

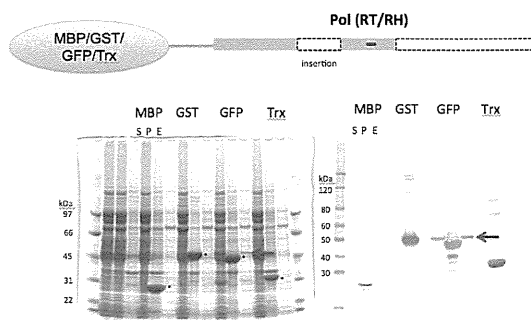


図2. RT- Δ -1- Δ ins と様々な可溶性蛋白質との融合テスト

SDS PAGE (左) と抗ヒスタグ抗体を用いたウェスタンブロット解析 (右)。融合させた蛋白質はそれぞれ、MBP: maltose-binding protein; GST: glutathione S-transferase; GFP: green fluorescent protein; Trx: thioredoxin。また、S: 上清、P: 沈殿、E: Elution by Ni affinity resin をそれぞれ示す。ウェスタンブロットの結果、特に GFP 融合で可溶性に蛋白質が取得できていることが分かる (赤矢印)。

2. 共精製サンプルの結晶化と構造決定

上述の Pol- Δ -8 と GroEL の共精製サンプルを結晶化スクリーニング実験に供し、結晶を得た。さらに結晶化条件の最適化を行い、最終的には 0.1 M imidazole pH 8.0, 0.2 M MgCl₂, 10-13% PEG3350 の条件で良好な単結晶を取得した (図3)。高エネルギー加速器研究機構における回折実験の結果、この結晶は空間群 P2₁ に属し、 $a = 285$, $b = 136$, $c = 284$ Å, $\beta = 117$ deg の格子定数を持つことが分かった。結晶学的に同形の GroEL データは Protein Data Bank には登録されていなかった。そこで、別結晶系に属する GroEL のモデルを用いた分子置換法により解析を行い、正しい解を得ることに成功した。解析したデータには、七量体リング構造が二つ会合した GroEL の典型的な高次構造が詳細に観測され、完全な原子モデルを構築することができた。一方、リング内およびリング外に、さらなる電子密度が観察される部分があるものの、明瞭にポリペプチド鎖であると認識できるマップは計算されなかったため、Pol に相当する構造は残念ながら解析することができなかつた (図4)。

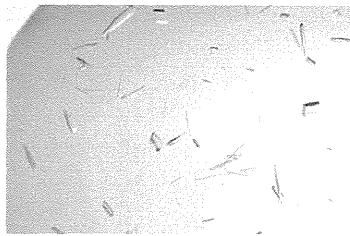


図3. GroEL/Pol-Δ-8 共精製サンプルの結晶

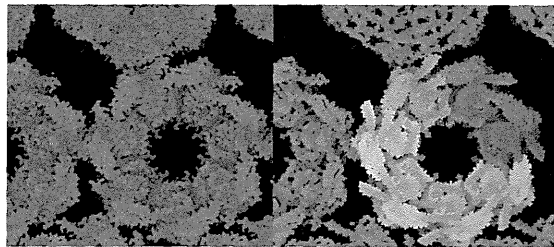


図4. GroEL/Pol-Δ-8 共精製サンプルの結晶構造電子密度 (左)、および構築した GroEL の原子モデル (右)。電子密度には、GroEL 以外に明瞭なマップが観察されず、Pol のモデルを解析することができていない。

3. εRNA の発現

εRNA は、HBV 粒子内にパッケージされる全長 RNA (pgRNA) の 5' 末端側に存在する領域で、Pol はまずこの領域を認識し、逆転写のためのプライミング反応を行うことが知られている。したがって、Pol との共発現や、精製 Pol との間の結合アッセイ等に使用するため εRNA の取得を行った。RNA は細胞内で速やかに分解されてしまう。そこで、RNase による分解耐性が高い tRNA^{Lys} の一部を εRNA に入れ替えたキメラ (tεRNA^{Lys}) を作成することで、安定に発現させることができるか検討した。この方法は Ponchon et al., Nature Protocols, 4, 947-959 (2009) に基づいたものである。抽出 RNA を Urea PAGE によって解析した結果、tεRNA^{Lys} の発現を確認することができた (図5)。

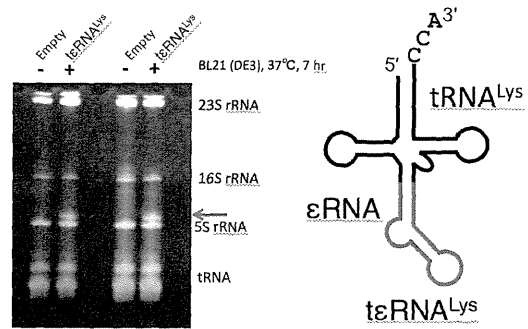


図5. tεRNA の発現

10% Urea-PAGE により、tεRNA の発現を確認した (左)。tεRNA の構成は、Ponchon et al., Nature Protocols, 4, 947-959 (2009)を参考にした。

D. 考察

HBV-Pol の異宿主発現、大量取得の試みは世界中で行われてきたが、決定的に成功した例はまだ存在しない。これまでの研究の蓄積から、Pol 発現の難しさに関して、その要因を考察することができる。それは主に、①ドメイン境界の不確実性、②会合パートナーの存在、③Pol 遺伝子上に S 遺伝子が完全にオーバーラップしている特殊なゲノム構造、の3点に集約されると考える。①に関して、HBV-Pol の RT/RNase 領域は HIV やマウス白血病ウイルスのそれと相同性が認められるものの、配列保存性は非常に低く、多くの insertion や deletion が観察されたため、正確な構造単位がどこからどこまでなのか推定することが非常に難しい。これまで様々な領域で HBV-Pol を断片化し、発現テストを行ったが、さらに細かな位置での切断、あるいはこれまで手を入れていない領域を fine tuning する必要があるかもしれない。②に関して、RNA や分子シャペロンであるヒートショックプロテイン (Hsp) が会合パートナーとして報告されている。また、逆転写反応はウイルスコア粒子内で進行するとされるため、コア (C) 蛋白質との相互作用も考慮すべきである。他にも未同定の会合パートナーが存在するか

もしれない。つまり、極めて特殊な環境にて、複数の蛋白質や核酸が複雑に会合し機能している可能性がある。これら会合パートナーと正しく相互作用してはじめて、Pol は安定した構造を形成できるかもしれないが、これまでの研究でそのような安定状態を人為的に作り出すことに成功していないと思われる。③に関しては、S 蛋白質の ORF が Pol 遺伝子上に読み枠がずれて存在することから、Pol の配列に進化的なバイアスが かかっていることは想像に難しくなく、その結果、構造安定性が犠牲にされている可能性が考えられる。これは②の問題とも関連しており、例えば Hsp がレスキューすることで Pol の構造が安定化されているかもしれない。以上を考慮し、今後あらゆる手段・技術を用いて Pol 蛋白質の取得を試みる予定である。

E. 結論

HBV-Pol の様々な断片、もしくは高溶解度蛋白質との融合蛋白質として、大腸菌もしくは *R. erythropolis* を用いて発現させ、抗ヒスタグモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって検出を行い、正しく構造を形成し可溶性画分に発現できる条件の探索を行った。これまでに合計 50 以上の発現コンストラクトを作製し発現チェックを行っているが、溶解度が劇的に向上するような条件を発見できていない。一方、TP、SP を削除した Pol- Δ -8 において、大腸菌のシャペロンと共精製し、結晶化、構造解析を行った。しかし、Pol に相当する電子密度を残念ながら観察できていない。今後、無細胞発現系、会合パートナーである RNA や Hsp 分子との共発現、リフォールディング、可溶性発現のための配列の最適化等、これまでとは異なったアプローチも取り入れながら、Pol の取得と結晶化を試行する。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。

核酸アナログの合成

研究分担者 井本 修平 (崇城大学薬学部)

研究要旨：

抗HBV活性を示す新規核酸アナログの合成を目的とし、①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成を行った。本年度中に合成を達成した化合物の一部は高い抗HBV活性を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

わが国におけるB型肝炎ウイルスキャリアは約150万人程度と考えられている。現在、B型肝炎の治療薬としてentecavir等が広く用いられているが、既存の薬剤に対して耐性化したHBVに対する治療薬の開発が急務となっている。そこで、本研究では、これまでのHBV治療薬よりも強力かつ耐性発現を許さない（または著しく遅延させる）新規B型肝炎治療薬の設計と合成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

満屋グループが所有するヌクレオシド誘導体ライブラリ中で強い抗HBV活性を有する化合物、または既存のB型肝炎治療薬を基本として新規B型肝炎治療薬候補化合物の設計と合成を行なう。さらに、得られる抗HBV活性の評価結果をフィードバックして構造最適化を行っていく。

本年度は、主に以下の構造を有する化合物の合成について計画・検討を行った。(Fig. 1)

①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体の合成

二重結合を有するジオールを出発原料とし、一方の水酸基を保護した後、光延反応で様々な塩基骨格を導入することを計画した。

②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成

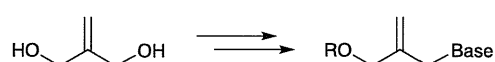
各種デオキシヌクレオシドを出発原料として、4'位に置換基を導入するために、5'水酸基をヨウ素化した後、塩基処理にてオレフィン体とし、この二重結合への付加反応で4'位アジド体の合成を行なうことを計画した。

(倫理面への配慮)

研究分担者の本推進研究における担当は、治療薬

候補化合物の有機合成であるため、倫理面の配慮には該当しない。

①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体



②4'位にアジド基を有するヌクレオシド

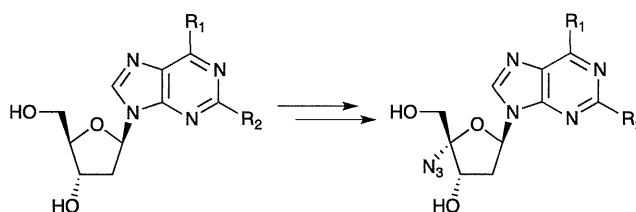


Fig. 1 本年度合成した主な化合物構造

C. 研究結果

①二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体の合成

現在抗HBV薬として使用されているentecavirはエキソメチレンを有するシクロペンタン骨格が構造上の特徴として挙げられ、この二重結合は逆転写酵素との相互作用に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、構造に二重結合を有する様々なアシクロ型ヌクレオシド誘導体を合成し、抗HBV活性を評価することとした。以下に示すアシクロ型核酸誘導体は、昨年度の実験報告書にて報告した手法と同様の方法にて合成を達成した。(Fig. 2)

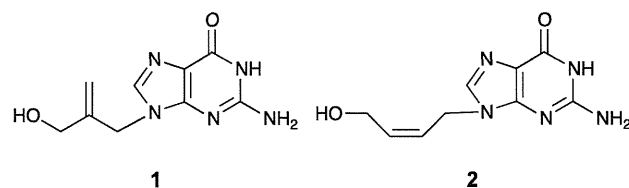
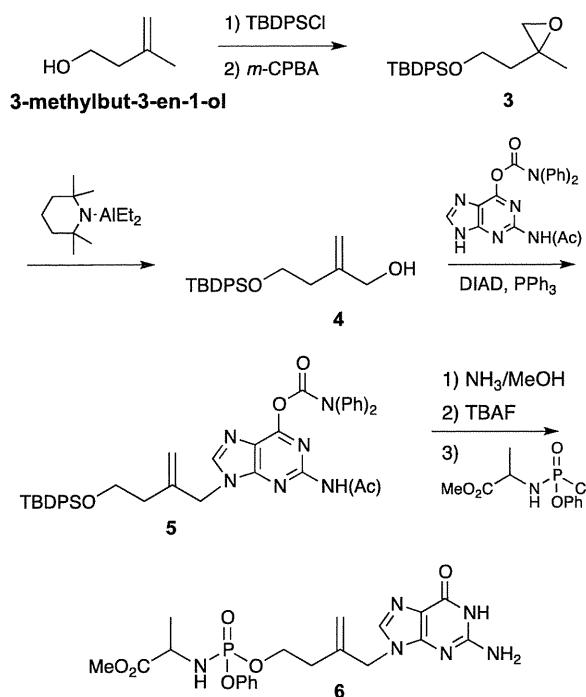


Fig. 2 二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体

さらに、entecavirが開環した構造のリン酸化誘導体として**6**を設計し、合成を行った(Scheme. 1)。

3-methylbut-3-en-1-olを出発原料とし、水酸基を保護した後、オレフィンのエポキシ化と引き続き塩基処理で、**4**を得た。保護したグアニンを光延反応にて導入し、塩基部、水酸基の脱保護を行った後、リン酸化試薬にて処理することで目的とする**6**の合成を達成した。現在、塩基部を2,6-ジアミノプリンとした構造についても合成を検討中である。



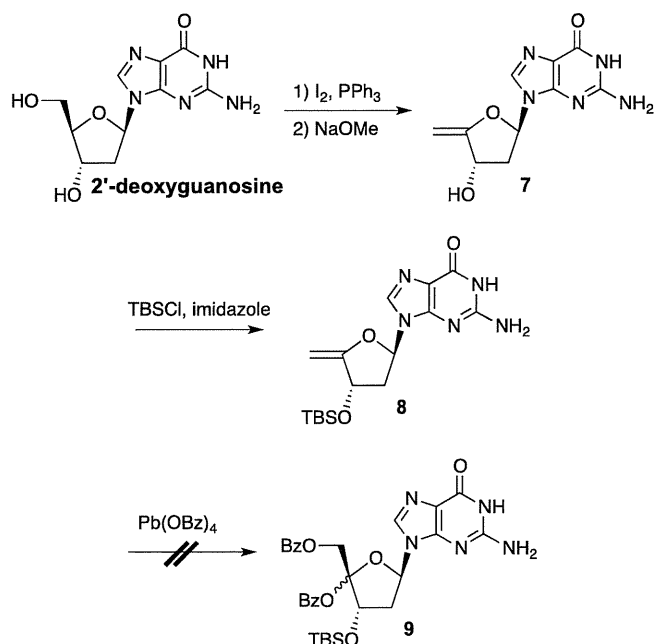
Scheme. 1 entecavir開環型誘導体の合成

②4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成

研究代表者である満屋教授らのグループにより開発が進められている抗HIV薬である4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine(EFdA)をはじめとして、4'位に置換基を持つヌクレオシド構造は抗ウイルス薬として注目されている。そこで、4'位にアジド基を有するヌクレオシド誘導体を合成することとし、まずは、4'-アジド-2'-デオキシグアノシンの合成に着手した。

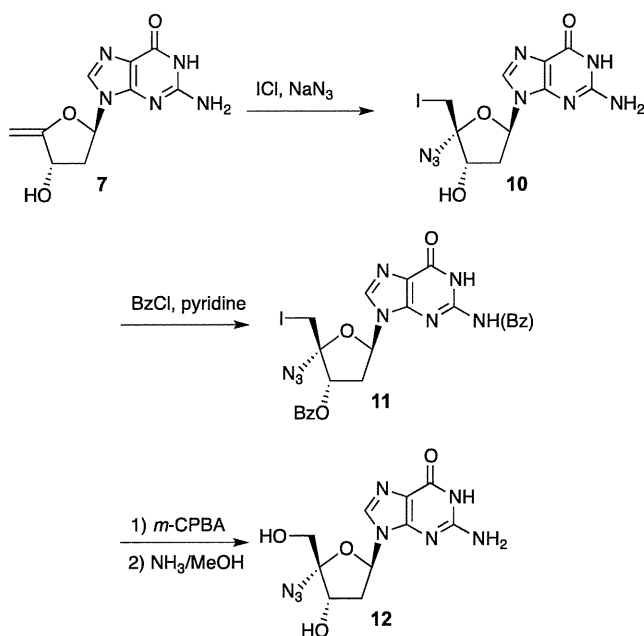
2'-デオキシグアノシンを出発原料とし、5'位のヨウ素化、ナトリウムメトキシドによる脱離反応、TBS化を経て、オレフィン体(**8**)とした。このオレフィン体に対し、Pb(OBz)₄による付加反応を試みたが、付加構造である**9**を得ることは出来なかった。ジアミノプリンのオレフィン体、または**8**のエ

キソアミン保護体等を用いてPb(OBz)₄による付加反応を試みたが、反応が進行しない、または複雑な多数の生成物を与え、目的とする付加体を単離することはできなかった(Scheme. 2)。



Scheme. 2 4'-azide-dGの合成(1)

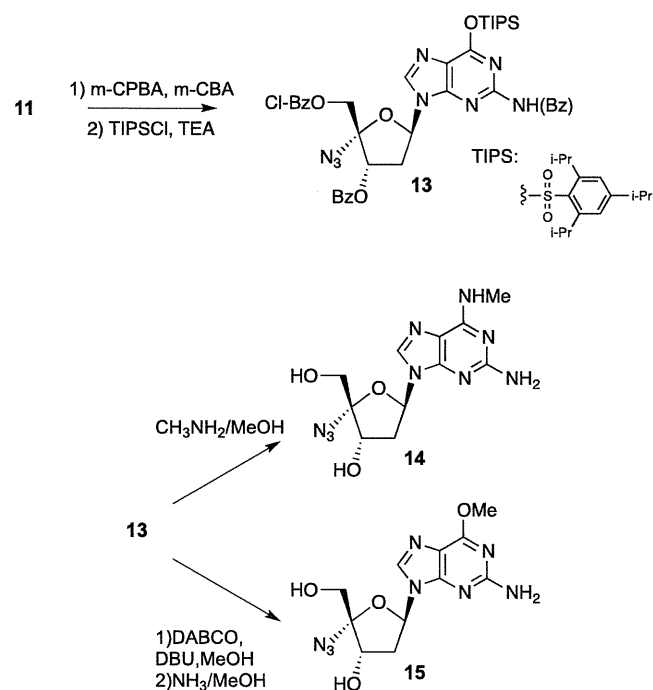
そこで、オレフィン体に対して系中で発生させたIN₃による付加反応を行なうことで、4'位にアジド基を導入した**10**を得た。水酸基とエキソアミンをベンゾイル基で保護して**11**へと変換した後、*m*-CPBAと塩基処理で目的とする4'-アジド-2'-デオキシグアノシン(**12**)の合成を達成した (Scheme.3)。



Scheme. 3 4'-azide-dGの合成(2)

同様の方法で、アデニン、チミン、イノシン、2,6-ジアミノプリンのC4'アジド-2'デオキシ体の合成を完了した。

さらに、プリン6位置換体の合成を計画し、Scheme.4に従って合成を行った。11の5'位のヨウ素を酸素置換基へと変換した後、トリイソプロピルベンゼンスルホネート体(13)とした。13をメチルアミンで処理することで、プリン6位のメチルアミノ化と保護基の脱保護を同時に行い4'-アジド-2'-デオキシ-2-アミノ-6-メチルアミノプリン(14)とした。類似の手法を用いて2-アミノ-6-メトキシプリン体(15)の合成も達成した。13を鍵中間体として用いることで、今後も様々なプリン6位置換体の合成が可能となっている。



Scheme. 4 4'-アジド-6位置換プリン誘導体の合成

E. 結論

本年度は、B型肝炎治療薬候補化合物として上記化合物群の合成を達成した。特に4'-アジド-2-アミノ-6位置換プリンヌクレオシド誘導体を合成する上で、有効な合成経路を確立することが出来た。抗HBV活性については熊本保健科学大学の青木博士に評価頂き、一部の化合物については高い抗HBV活性を示すことが示唆されている。今後、構造最適化を行っていき、より活性が高く、毒性を低減した化合物の合成を進めていく予定である。

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

(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

新規化合物の抗ウイルス活性の評価に関する研究

研究分担者 青木 学 熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科講師

研究要旨：本研究では既存の抗HBV逆転写酵素剤阻害剤であるエンテカビルと同等かそれ以上の活性を有する新規のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の開発・同定を目的とし、新規化合物の*in vitro*における抗HBV活性、抗HIV-1活性および細胞毒性の検討を行った。評価した23化合物のうち、C4位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体が両ウイルスに対する高い活性を有しており、薬剤耐性ウイルスに対する活性の評価など更なる検討が必要であるが、有望なリード化合物として今後の化合物のデザイン・合成に有益な情報をもたらすものと考えられる。

A. 研究目的

本邦における B 型肝炎ウイルス (HBV) のキャリアは人口の約 1%を占めているとされ、持続感染により慢性 B 型肝炎、肝硬変へと病態が進行し、肝がんを発症する可能性がある。HBV に対する治療薬としては 3 種類の核酸誘導体が臨床応用されているが、HBV がこれらの薬剤に対して耐性を獲得する等の問題があり、特に先行して臨床応用されたラミブジン (3TC) に対する耐性ウイルスが比較的早期にエンテカビル (ETV) に耐性を獲得することが知られていることから、既存の薬剤に耐性となったウイルスにも高い活性を発揮し、且つ耐性プロフィールが全く異なるなどの新規化合物の開発が必須である。本研究では、本研究プロジェクトの新規化合物のデザイン・合成を担当する研究分担者より供給される新規化合物について、*in vitro* における抗 HBV 活性と細胞毒性を測定し、既存の薬剤と比較評価を行う。また本研究で開発を目

指すヌクレオシド誘導体は、HBV がウイルス RNA から cDNA を合成するために必須の酵素である逆転写酵素の活性を阻害するものであるが、HIV も逆転写酵素を有することから、抗 HIV 活性についても同様に評価を行う。その中から細胞毒性が良好で且つ ETV 等の既存の薬剤と同等かより強力な活性を有する有望な化合物については、更に薬剤耐性 HBV に対する活性を測定、また既存の薬剤と比較して耐性ウイルスが発現し易いかどうか (genetic barrier) 等の検討も行う。また抗ウイルス活性等の一連のデータについては、化合物の合成を行なう研究分担者に速やかにフィードバックし更に化合物の再デザイン・最適化を加速させる。

B. 研究方法

1) 新規化合物の抗 HBV 活性の評価：96-well plate にて新規化合物を 10%FCS+DMEM で 1 μ M から段階希釈し、次に持続

的に HBV を産生する HepG2.2.15 細胞を $1 \times 10^5/\text{ml}$ で播種、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 6 日間培養した。培養上清中の HBV DNA を QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) で抽出・精製し、DNA 濃度を測定、50 ng 中の HBV DNA 量を real-time PCR (LightCycler, Roche) で検出、算出した。Primer は HBV の逆転写酵素遺伝子内に設計、試薬は SYBR Green を用いた。化合物非存在下での培養上清中の HBV DNA 量と比較し IC_{50} 値を算出した。

2) 化合物の細胞毒性の検討：細胞はヒト $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞である MT-2 細胞を用い、MTT assay にて評価を行なった。96-well plate で化合物を $10\% \text{FCS} + \text{RPMI}$ で $100 \mu\text{M}$ から段階希釈し、次いで $2 \times 10^4/\text{ml}$ の MT-2 細胞を添加、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 7 日間培養した。MTT 試薬 (nacalai tesque) を添加後に 2 時間インキュベート、可溶化溶液を添加し細胞溶解液の 570 nm の吸光度を測定した。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し CC_{50} 値を算出した。

1) 新規化合物の抗 HIV-1 活性の評価：MT-2 細胞と実験室野生 HIV-1 株である HIV-1_{LAI} を用い、MTT assay にて評価を行なった。96-well plate にて新規化合物を $10\% \text{FCS} + \text{RPMI}$ で $1 \mu\text{M}$ から段階希釈し、次いで $2 \times 10^4/\text{ml}$ の MT-2 細胞と 100 TCID_{50} の HIV-1_{LAI} を添加、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 7 日間培養した。MTT 試薬 (nacalai tesque) を添加後に 2 時間インキュベート、可溶化溶液を添加し細胞溶解液の 570 nm の吸光度を測定した。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し IC_{50} 値を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、株化された細胞株と実験室株の HIV-1 を用いているため倫理面への特別な配慮は必要が無いと判断した。

C. 研究結果

研究分担者である井本博士のグループにより合成された①アシクロ型 ETV 誘導体 6 種類、②アルケンを有するアシクロ型ヌクレオシド誘導体 10 種類、③C4 位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体 7 種類、について抗ウイルス活性と細胞毒性を評価した。

①は抗 HBV, HIV 活性共に IC_{50} 値が $1 \mu\text{M}$ 以上で細胞毒性も $100 \mu\text{M}$ 以上であった。

②は、リン酸付加体の 1 種類で抗 HIV 活性が $0.26 \mu\text{M}$ であったが、抗 HBV 活性は $1 \mu\text{M}$ 以上であった。③の化合物は抗 HBV, HIV 活性が共に見られた。抗 HBV 活性については IC_{50} 値が $0.0027 \sim 0.09 \mu\text{M}$ (ETV は $0.00036 \mu\text{M}$)、抗 HIV 活性は $0.00028 \sim 0.54 \mu\text{M}$ (AZT は $0.032 \mu\text{M}$) であった。また CC_{50} 値は $3.8 \sim 100 \mu\text{M}$ であった。

D. 考察

今回評価を行った 23 種類の化合物について、C4 位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体の 7 種類で両ウイルスに対する活性が認められた。抗 HBV 活性については ETV ほどの高い活性は見られなかったものの、既存の薬剤であるテルビブジン (IC_{50} : $0.83 \mu\text{M}$) よりも強力であった。また抗 HIV-1 活性については、AZT と同等かより高い活性が認められた。これらの化合物については、薬剤耐性 HBV, HIV 変異体に対する活性やミトコンドリア障害の程度を更に評価する必要があり、良好であればリード化合物として抗ウイルス活性を更に高めるように再デザイン・最適化を行う必要があると思わ

れる。

E. 結論

23 種類の新規化合物について抗 HBV 活性、抗 HIV-1 活性および細胞毒性について検討、評価を行った。C4 位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体で抗ウイルス活性が見られた。これらの化合物については、薬剤耐性ウイルスに対する活性やミトコンドリア障害の程度を検討し、更に塩基や糖の修飾など最適化が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Yedidi RS, Garimella H, Aoki M, Aoki H, Desai DV, Chang SB, Davis DA, Fyvie WS, Kaufman JD, Smith DW, Das D, Wingfield PT, Maeda K, Ghosh AK and Mitsuya H

Conserved hydrogen-bonding network of P2 bis-tetrahydrofuran containing HIV-1 protease inhibitors (PI) with protease active site amino acid-backbone aid in their activity against PI-resistant HIV

Antimicrob Agents Chemother 2014. In press.

2. Maeda K, Desai DV, Aoki M, Nakata H, Kodama EN, Mitsuya H.

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.

Antivir Ther. 2013. In press.

3. Yedidi RS, Maeda K, Fyvie WS, Steffey M, Davis DA, Palmer I, Aoki M, Kaufman JD, Stahl SJ, Garimella H, Das D, Wingfield PT, Ghosh AK, Mitsuya H.

P2' Benzene Carboxylic Acid Moiety Is Associated with Decrease in Cellular Uptake: Evaluation of Novel Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors Containing P2 bis-Tetrahydrofuran Moiety.

Antimicrob Agents Chemother 2013 Oct;57(10):4920-7.

2) 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他