

アルブミンダイマーの体内動態 評価 日本薬学会第 135 年会
2015/3/25-28 (神戸)

37. 山崎 啓之、平山 茜、安楽 誠、田口 和明、小田切 優樹、瀬尾 量 粉末吸入用アルブミン粒子の吸入特性におよぼす脂肪酸添加の影響 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28 (神戸)

38. 安楽 誠、平賀 歩、庵原 大輔、伊福 伸介、James D. PIPKIN、小田切 優樹、平山 文俊スルホブチル- β -シクロデキストリンによるキトサン ナノファイバーゲルの調製 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28 (神戸)

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

臨床試験データマネジメント

分担研究者：田中康博 国立国際医療研究センター医療情報解析研究部

研究要旨： 本分担研究では、JCRAC データセンターの整備を実施している。本年度の活動は主に、(1) データマネジメント業務の標準化、(2) 品質管理体制の強化、であった。(1) について、SOP 検討会議を 24 回開催した。今年度、新規に作成した SOP やマニュアルは 9 種類であった。また既に作成されたものに関して、今年度 23 件の改訂を行った。SOP の周知のため、データマネージャーによる再確認やクイズの作成、実施を行った。(2) のために、データセンター内に品質保証部門を設置した。またデータセンター内で自主点検を平成 25 年 11 月 5 日、7 日に実施した。自主点検内容は、1) SOP、マニュアルの確認、2) 複数の研究でデータセットと原本の一致の確認、3) 契約書類の確認、4) 各研究の保管すべき資料の確認、などであった。点検後の指摘事項を受け、改善作業を実施している。今後国内においてより信頼性の高い臨床研究を実施していく必要がある。アカデミアでのデータセンター機能を強化し、試験データの品質保証、品質管理が着実に実施されるべきである。

A. 研究目的

最近、国内では臨床試験等に関わるデータのねつ造や改竄の問題が報告され、その中で利益相反の管理や臨床試験のデータの品質管理の在り方が問題とされている。さらに臨床研究に関する倫理指針及び疫学研究に関する倫理指針を見直し、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針が平成 27 年度より施行される。研究の質及び透明性の確保、資料の保存がより一層強く求められる。臨床試験における本研究班の分担研究課題の遂行のため、研究開発の出口戦略の一環として、臨床試験データマネジメントを担う JCRAC データセンターの整備を進め、本年度の活動は主に、(1) データマネジメント業務の標準化、(2) 品質管理の持続的改善、に取り組んだ。このようなアカデミアでの独立したデータセンターによるデータ管理の体制が確立されれば、アカデミアにおいてデータマネジメントの方法を蓄積し臨床医に還元できると考えた。

B. 研究方法

(1) データマネジメント業務の標準化のため、

Standard Operating Procedure (SOP) やマニュアルの改訂を進める一方で、ICH-GCP 水準のデータ品質管理を実現するための IT 基盤として、Electronic Data Capture (EDC) を導入した。EDC に基づいた SOP の見直しと、その業務標準化に取り組んだ。(2) 品質管理の持続的改善のために、昨年度実施した自主点検のフォローアップを中心に、Plan-Do-Check-Action の業務改善の仕組みを進めた。

C. 研究結果

(1) データマネジメント業務の標準化

データマネジメント業務のフローは概略図 1 のように整理できる。現状は臨床試験毎に SOP に則った業務フローに沿ってデータマネジメントが行われているが、担当するデータマネージャーの流儀、すなわち属人的なやり方で品質が作り込まれる自由度が内在し、避けられない。この自由度の揺れ幅を狭める(コントロールする)ことは、業務の標準化、データ品質管理の向上につながると考えられる。

そこで、図 1 に示すように、症例報告書(CRF、

Case Report Form) の作成 (上流段階) から解析データセットを作成 (下流段階) に至るまでのほぼ全てのプロセスを One Stop でカバーするシステム化 (EDC 利用) を考えた。

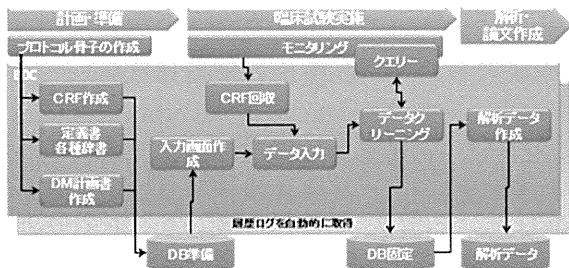


図 1 : EDC を基盤とするデータマネージメント業務の構想図

EDC は、88 개국、1,300 超の機関が利用している、米国 Vanderbilt 大学開発の REDCap (Research Electronic Data Capture) を導入し、サーバー、データは JCRAC データセンター内のサーバー室に設置して運用管理している。

運用に際して、以下の 2 つの SOP と 3 つのマニュアルも作成した。

- ① システム・ネットワーク運用業務に関する標準作業手順書
- ② REDCap システム運用規程
- ③ REDCap システム運用マニュアル
- ④ REDCap システムリカバリマニュアル
- ⑤ REDCap システム問い合わせ・課題対応マニュアル

既に研究が進行している臨床研究や症例登録が開始される研究の幾つかについて、データマネージャが進捗管理する業務においては、EDC に移行できる範囲で試用し、利用上障害となるような問題は今のところ見つかっていない。また、既に行っている症例登録と平行して REDCap による症例登録も行い、データの照合チェック、ベリフィケーションを行い、問題は見当たらなかった。

さらに、多施設共同臨床試験への利用も考えたい。そのためには、厚生労働省の定めるコンピュータ化システム適正管理ガイドラインに基づいたシステムバリデーションを行い、機関としての承認を得る必要である。本研究では、

図 2 のチェックリストを作成して自己点検チェックを試みた。

項目	内容	確認状況	確認者
1.1	プロトコル・骨子作成、CRF作成、定義書台帳作成、DM計画書作成	確認済	研究員A
1.2	モニタリング	確認済	研究員A
1.3	クエリー	確認済	研究員A
1.4	データ入力	確認済	研究員A
1.5	データ解析	確認済	研究員A
1.6	読込データ作成	確認済	研究員A
1.7	解析データ	確認済	研究員A
2.1	DB評価	確認済	研究員A
3.1	履歴ログを自動的に取得	確認済	研究員A
4.1	ユーザー管理に関する業務	確認済	研究員A
4.2	ユーザー登録、変更、抹消	確認済	研究員A
4.3	ユーザー権限設定	確認済	研究員A
4.4	ユーザーパスワード管理	確認済	研究員A
4.5	ユーザーバックアップ	確認済	研究員A
4.6	ユーザーログ管理	確認済	研究員A
4.7	ユーザーログバックアップ	確認済	研究員A
4.8	ユーザーログ削除	確認済	研究員A
4.9	ユーザーログ検索	確認済	研究員A
4.10	ユーザーログ印刷	確認済	研究員A
4.11	ユーザーログメール送信	確認済	研究員A
4.12	ユーザーログExcel出力	確認済	研究員A
4.13	ユーザーログCSV出力	確認済	研究員A
4.14	ユーザーログJSON出力	確認済	研究員A
4.15	ユーザーログXML出力	確認済	研究員A
4.16	ユーザーログ圧縮	確認済	研究員A
4.17	ユーザーログ展開	確認済	研究員A
4.18	ユーザーログ暗号化	確認済	研究員A
4.19	ユーザーログ復号化	確認済	研究員A
4.20	ユーザーログ署名	確認済	研究員A
4.21	ユーザーログ検証	確認済	研究員A
4.22	ユーザーログ圧縮率確認	確認済	研究員A
4.23	ユーザーログ展開率確認	確認済	研究員A
4.24	ユーザーログ暗号強度確認	確認済	研究員A
4.25	ユーザーログ復号強度確認	確認済	研究員A
4.26	ユーザーログ署名強度確認	確認済	研究員A
4.27	ユーザーログ検証強度確認	確認済	研究員A
4.28	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.29	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.30	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A
4.31	ユーザーログ復号強度最適化	確認済	研究員A
4.32	ユーザーログ署名強度最適化	確認済	研究員A
4.33	ユーザーログ検証強度最適化	確認済	研究員A
4.34	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.35	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.36	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A
4.37	ユーザーログ復号強度最適化	確認済	研究員A
4.38	ユーザーログ署名強度最適化	確認済	研究員A
4.39	ユーザーログ検証強度最適化	確認済	研究員A
4.40	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.41	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.42	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A
4.43	ユーザーログ復号強度最適化	確認済	研究員A
4.44	ユーザーログ署名強度最適化	確認済	研究員A
4.45	ユーザーログ検証強度最適化	確認済	研究員A
4.46	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.47	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.48	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A
4.49	ユーザーログ復号強度最適化	確認済	研究員A
4.50	ユーザーログ署名強度最適化	確認済	研究員A
4.51	ユーザーログ検証強度最適化	確認済	研究員A
4.52	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.53	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.54	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A
4.55	ユーザーログ復号強度最適化	確認済	研究員A
4.56	ユーザーログ署名強度最適化	確認済	研究員A
4.57	ユーザーログ検証強度最適化	確認済	研究員A
4.58	ユーザーログ圧縮率最適化	確認済	研究員A
4.59	ユーザーログ展開率最適化	確認済	研究員A
4.60	ユーザーログ暗号強度最適化	確認済	研究員A

図 2 : システムバリデーションチェックリスト

(2) 品質管理の持続的改善

昨年度、内部監査を模した機関内他部署による自己点検を実施し、

- ① 治験レベルを目指した ICH-GCP 準拠の検討、
 - ② 品質管理・品質保証の運用記録の作成、
 - ③ データマネージャーの研修履歴作成、内部でプログラム作成を行った場合の検証、
- について改善すべき指摘を受けた。

- ①、②については、REDCap を導入することにより解決

D. 考察

国内では臨床試験データの品質管理の在り方が問題とされている。現在、疫学研究に関する倫理指針と臨床研究に関する倫理指針を統合した新たな倫理指針の改訂作業が行われている。臨床研究においても、品質に関する要求水準が高くなる可能性がある。アカデミアでのデータセンター機能を強化し、臨床医が主体となった信頼性のある臨床試験を実施できる体制を構築する必要がある。

E. 結論

JCRACデータセンターにおいて (1) データマネージメント業務の標準化、(2) 品質管理体制の強化をはかった。これにより、本研究班の出口段階において信頼性のある臨床試験が実施できることを目指した。またアカデミアで

品質の高い臨床試験が実施できる基盤構築に
寄与することを目指した。

F. 研究発表 (本研究に関わるもの)

1. 論文発表 :

2. 学会発表 :

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

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:分担者は、HBV 治療の現状とその予後についての臨床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26年度は肝内HBV cccDNAのマーカーとされるHBs抗原あるいはHBコア関連抗原量と核酸アナログ投与経過、あるいは肝炎臨床病期(免疫寛容期、HBe抗原陽性期、HBe抗原陰性期、非活動キャリア、寛解期)の関連に着目して検討を行い、核酸アナログ投与、あるいは肝炎臨床病期の進展に伴って両抗原量が低下することを示した。一方、肝硬変・肝癌などの病態進展症例では、HBs抗原は低下するのに対してHBコア関連抗原量は低下しない特徴的なプロフィールを呈することを明らかとした。肝病態進展例におけるHBs抗原量とHBコア関連抗原量の乖離する機序を明らかにするため、HBs抗原産生に関与するHBVゲノムのpreS領域に着目、同領域における変異をdeep sequenceにて検討し、HBs抗原量低値かつHBコア関連抗原量高値症例において、preS領域変異・欠失が有意に多いことを示した。これらの結果から、肝病態進展に関わるHBs抗原、HBコア関連抗原とpreS変異の密接かつ重要な関連が明らかとなった。

A. 研究目的

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、従来の核酸アナ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。

H26 年度は肝細胞内 cccDNA からの mRNA 転写活性を反映するマーカーとされる HBs 抗

原量、あるいは HB コア関連抗原量と肝疾患病態進展の関連について、さらにこれらに関わる HBV ゲノム preS 領域変異の関与について、deep sequence を用いた詳細な検討を行った。

B. 研究方法

(1) 核酸アナログ投与経過(N=192)、あるいは肝炎臨床病期(免疫寛容期、HBe 抗原陽性期、HBe 抗原陰性期、非活動キャリア、寛解期)(N=337)と、肝内 HBV cccDNA のマーカーとされる HBs 抗原あるいは HB コア関連抗原量の変化について検討した。

(2) 病態進展症例(LC/HCC, N=62)と非進展症例(non-LC, N=275)における HBs 抗原あるいは HB コア関連抗原量の関連を検討した。

(3) 非活動キャリア群(Inactive carrier)32 例、慢性肝炎群(CH)28 例、肝硬変・肝癌群(LC/HCC)36 例における血清から preS 領域をパイロシークエンサーをもちいて deep sequence を行い、preS 領域変異、HB s 抗原量、HB コア関連抗原量と病態進展との関連性について詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 核酸アナログ投与経過(N=192)、あるいは肝炎臨床病期(免疫寛容期、HBe 抗原陽性期、HBe 抗原陰性期、非活動キャリア、寛解期)(N=337)において、治療経過とともにあるいは臨床病期の進展とともに、HB s 抗原量と HB コア関連抗原量は低下した。

(2) LC/HCC 症例では HBs 抗原は低値であるものの、HB コア関連抗原高値であった。

(3) パイロシークエンスによる preS 領域変異の検討で HBs 抗原低値かつ HB コア関連抗原高値となる乖離症例では preS 変異や欠失が有意に多く認められ、肝病態進展に関わる HBs 抗原、HB コア関連抗原と preS 変異の密接かつ重要な関連が明らかとなった。

D. 考察

肝病態の進展、HB s 抗原量、HB コア関連抗原量、preS 領域変異・欠失の関連を検討することにより、HBs 抗原が低下し、HBcr 抗原が低下しない病態は cccDNA からの mRNA の転写は持続しているにも関わらず HBs 抗原の分泌が障害され細胞障害が増強している状態と考えられた。またこれらを用いた肝病態の把握によって、HCC ハイリスク群の正確な評価が可能となることが考えられた。

E. 結論

肝病態、HB s 抗原量、HB コア関連抗原量、preS 領域変異の関連を調べることにより、肝病態進展についての正確な評価が可能になる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura

- H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 2015 Mar;134(3):279-89.
2. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus. *J Virol.* 2014 Nov 15;88(22):13352-66.
3. Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]
4. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]
5. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Dec;44(13):1339-1346.
- 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ヌクレオシドの設計と合成に関する研究

研究分担者 原口一広 (日本薬科大学)

研究要旨：今年度は、以下の3つの研究テーマを実施した。(1) 3'-置換 BCA誘導体の合成、(2) フルオロエンテカビルの合成、(3) 4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成。

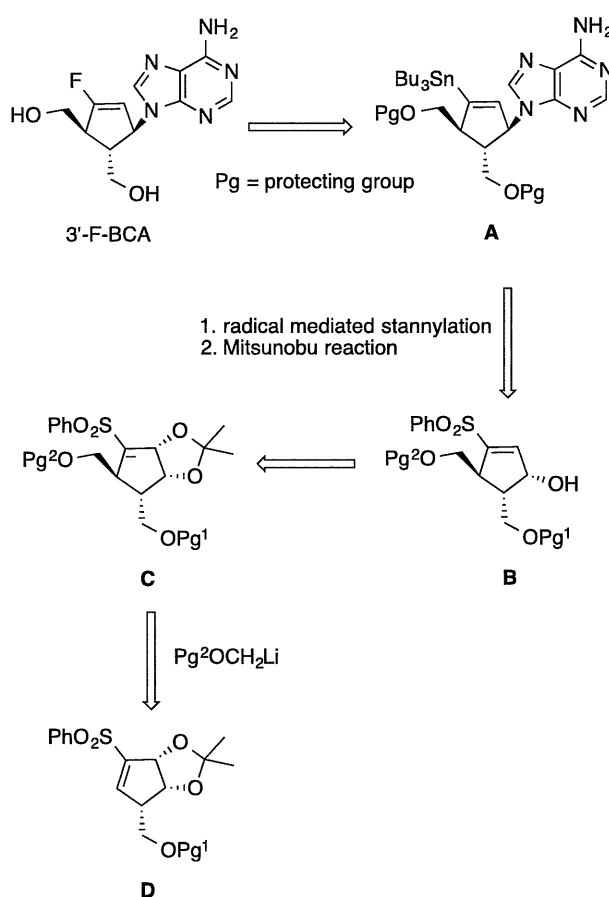
A. 研究目的

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) 3'-置換 BCA 誘導体の合成

3'-フルオロ BCA (3'-F-BCA) の逆合成解析を Scheme 1 に示した。3'-F-BCA はスタニル体 A のフッ素化により合成する。スタニル体 A はビニルスルホン B の脱硫的スタニル化と光延型の S_N2 反応によるアデニン塩基の導入により合成できると考えた。ビニルスルホン B はビニルスルホン C への Pg²OCH₂Li の 1,4-付加と生成したフェニルスルホニル α-カルボアニオンの E1cb 反応の 1 ポット-2 段階反応により合成することを計画した。

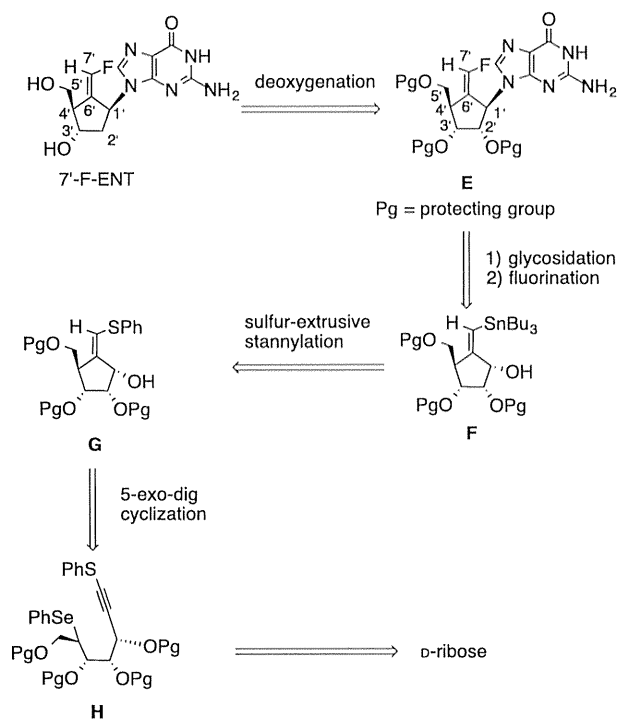


Scheme 1. retro-synthetic analysis for 3'-F-BCA

(2) フルオロエンテカビルの合成

7'-フルオロエンテカビル (7'-F-ENT) はトリオール保護体 E の 2'位のラジカル的デオキシ化により合成できると考えた (Scheme 2)。化合物 E はヒドロキシシクロペンタンビニルスタナン F のスズ-フルオロ交換反応と光延型の S_N2 反応によ

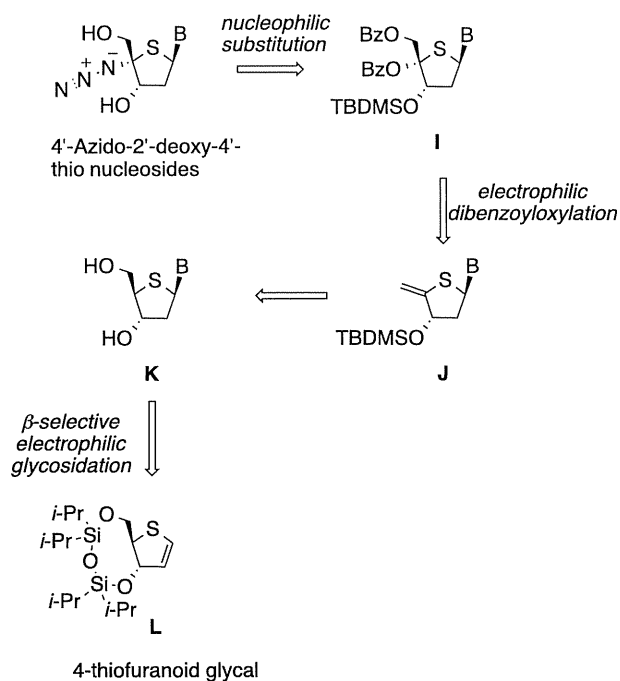
るグアニン塩基の導入により合成できると考えた。ビニルスタナン F はビニルスルフィド G の脱硫的スタニル化により合成し、G はフェニルスルファニルエチルビニルスルフィド H の分子内ラジカル的 5-exo-dig 環化反応により合成できると考えた。ラジカル前駆体 H は D-リボースから調製する。



Scheme 2. Retro-synthetic Analysis for the Target Molecule 7'-F-ENT.

6) 4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成

4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドは4'-ベンゾイルオキシ誘導体**I**とアジドイオンとの



Scheme 3. Retro-synthetic Analysis for 4'-Azido-2'-deoxy-4'-thio nucleosides

求核置換反応で合成する事を計画した(Scheme 3)。鍵中間体**I**は4',5'-不飽和ヌクレオシド**J**に体するジベンゾイルオキシレーションにより合成可能である。不飽和ヌクレオシド**J**は2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド**K**から合成し、**K**は4-チオフラノイドグリカル**L**から合成することを企図した。

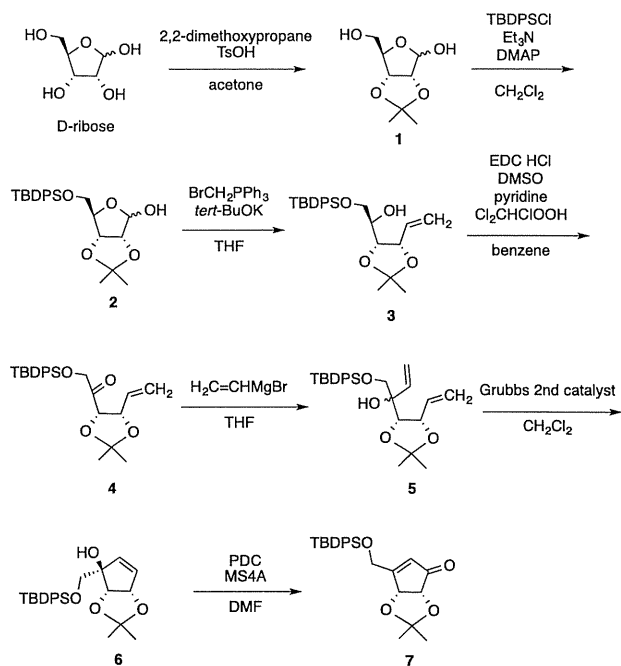
(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

(1) 3'-置換 BCA 誘導体の合成

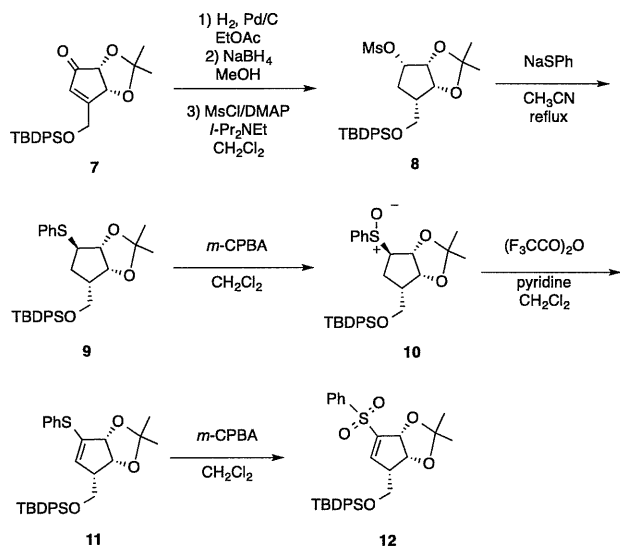
D-リボース(**1**)をイソプロピリデン化し**1**とした後、シリル化し **2** を得た (Scheme 4)。得られた**2**は Wittig 反応により**3**とした後、Moffatt 酸化および Grignard 反応により**4**を経て**5**を得た。アリルアルコール**5**は Grubbs 触媒 (2nd) を用いた閉環メタセシスによりシクロペンテノール**6**へ変換し、アリルアルコールの転位を伴う PDC 酸化により、シクロペンテノン**7**を得た。



Scheme 4. Preparation of enone **7**.

シクロペンテノン**7**は二重結合の接触還元、ケトンのヒドリド還元および二級水酸基のメシル化

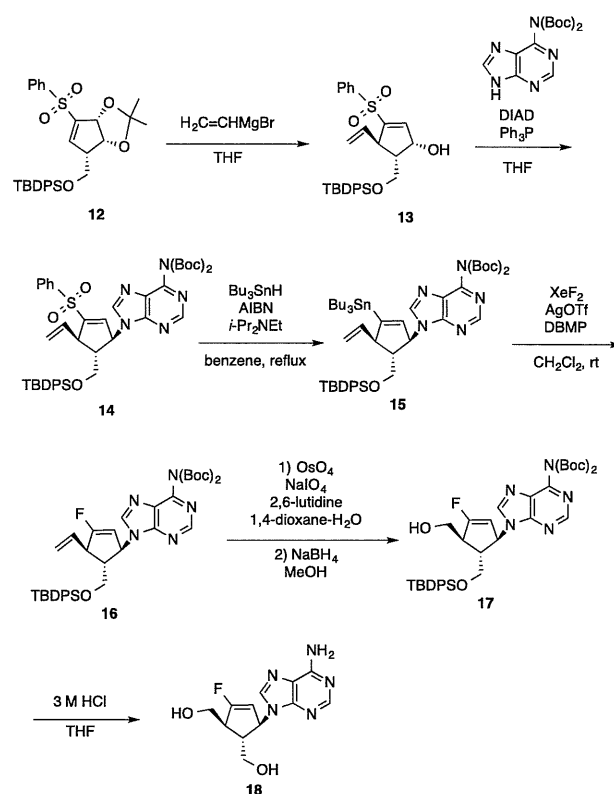
により**8**へ変換した (Scheme 5)。つぎに、**8**をアセトニトリル中、加熱還流下、NaSPh と反応させることにより、フェニルスルファニル体**9**とし、*m*-CPBA 酸化により得られたスルホキシド**10**の PUmmerer 型の酸化反応により、ビニルスルフィド**11**を得た。引き続き、**11**を *m*-CPBA で処理することにより、ビニルスルホン**12**を得ることができた。



Scheme 5. Preparation of vinylsulfone **12**.

ビニルスルホン**12**に対してビニルマグネシウムブロミドを反応させたところ、 β -面選択的な 1,4 付加が進行し、引き続き 1,3-ジオキソラン環の開裂を伴う E1cb 反応により、ビニルスルホン**13**を得ることができた (Scheme 6)。次に、**13**とビス-N-Boc-アデニンを DIAD および Ph_3P の存在下で反応させたところ、光延型のグリコシル化反応が進行し、**14**を得ることができた。次に、脱硫的スタニル化を行うために、*i*- Pr_2NEt の存在下、**13**を Bu_3SnH ならびに AIBN とベンゼン中、加熱還流下反応させたところ、目的とするスタニル体**15**を得ることができた。得られた**15**を塩化メチレン中、DMAP の存在下、 AgOTf と XeF_2 で処理したところ、スズ-フッ素原子交換反応が進行し、フルオロビニル体**16**を得ることができた。4'-位のビニル基をヒドロキシメチル基に変換する目的

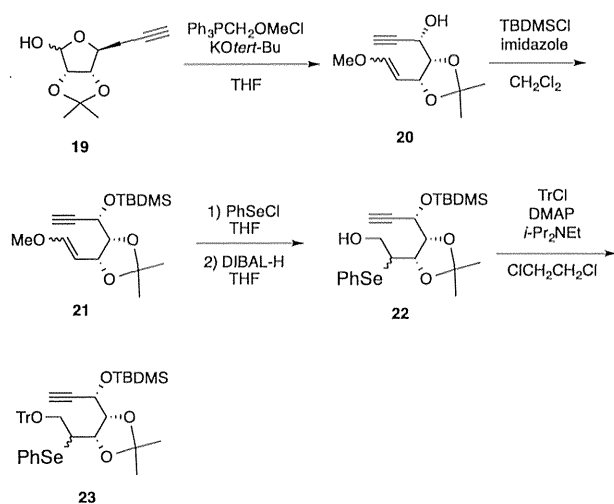
で、Lemieux-Johnson 酸化反応を行った後、生成したアルデヒドをヒドリド還元し、**17**を得た。最後に、**17**を THF 中、3 M 塩酸と加熱条件下反応させることにより、Boc 基と TBDPS 基を脱保護し、標的化合物**18**の合成を完了した。



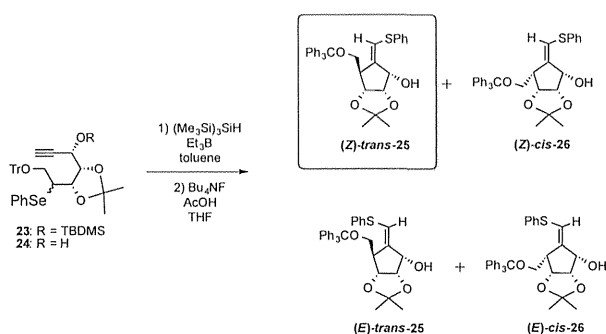
Scheme 6. Synthesis of 3'-fluoro-BCA **18**.

(5) フルオロエンテカビルの合成

文献に従い合成した**19**を Wittig 反応によりビニルエーテル**20**へ変換した (Scheme 7)。ビニルエーテル**20**のプロパルギルアルコールをシリル基で保護した後、得られた**21**のエノールエーテルへのフェニルセレネニレーションと引き続きアルデヒドの DAIBAL-H 還元により、**22**を得た。フェニルセレノ体**22**の一級水酸基をトリチル化しラジカル反応の前駆体**23**を合成した。合成したラジカル前駆体**23**をトルエン中、トリエチルボランをラジカル開始剤に用い、トリストリメチルシリルシランと反応させた結果、(*Z*)-*trans*-**25**、(*E*)-*trans*-**25**、(*Z*)-*cis*-**26** および (*E*)-*cis*-**25** の混合物が得られた (Scheme 8)。



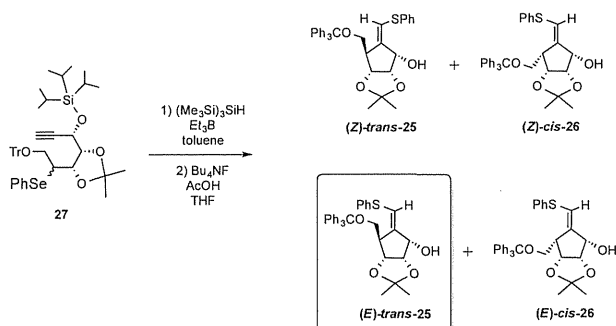
Scheme 7. Synthesis of Radical Precursor 23



Scheme 8. Radical-mediated 5-exo-dig Cyclization of Precursor 23 and 24.

Table1. Radical-mediated 5-exo-dig cyclization of precursor 23 and 24

entry	precursor	temp. [°C]	time [h]	25		26		ratio of <i>trans/cis</i>
				yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	
1	23	110	20	47 (3.8 / 1)	14 (3.8 / 1)	3.36 / 1		
2	23	rt	9	63 (11.1 / 1)	17 (11.1 / 1)	3.71 / 1		
3	23	-30	20	70 (25.0 / 1)	17 (25.0 / 1)	4.12 / 1		
4	23	-70	96	73 (50.0 / 1)	14 (50.0 / 1)	5.21 / 1		
5	24	-70	96	62 (1.0 / 1)	31 (1.4 / 1)	2.00 / 1		



Scheme 9. Radical-mediated 5-exo-dig Cyclization of Precursor 27.

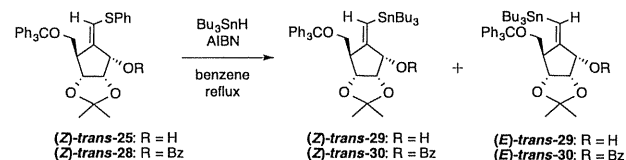
Table2. Radical-mediated 5-exo-dig cyclization of precursor 27

entry	temp. [°C]	time [h]	25		26		ratio of <i>trans/cis</i>
			yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	yield [%] (<i>Z/E</i>)	
1	-70	120	69 (1 / 7.1)	13 (0 / 1)	5.31 / 1		

反応温度と環化成績体の生成比を調べてところ、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ で反応を行った場合に、最も高い生成比で (*Z*)-*trans*-25 が得られることが明らかとなった

(Table 1)。無保護の24を用いた閉環反応では *E/Z* 比および *trans/cis* の比率ともに低下する結果となった (entry 5, Table 1)。次に、トリイソプロピルシリル基で保護された27のラジカル閉環反応を行った結果、(*E*)-*trans*-25 が主成績体として生成することが明らかとなった (Scheme 9, Table 2)。

得られた (*Z*)-*trans*-25 を用いて脱硫的スタニル化を行った (Scheme 10)。その結果、立体保持で反応は進行し (*Z*)-*trans*-25 を主生成物として得ることができた。この反応をベンゾエート (*Z*)-*trans*-28 を検討した結果、(*Z*)-*trans*-30 のみを得ることに成功した (Table 3)。同様に、(*E*)-ビニルスタナンの脱硫的スタニル化も立体保持で進行し、ベンゾエート (*E*)-*trans*-31 を用いた場合、極めて高い選択性で (*E*)-*trans*-32 を得る事ができた (Scheme 11, Table 4)。



Scheme 10. Sulfur-extrusive Stannylation of Precursor (*Z*)-*trans*-25 and 28.

Table3. Sulfur-extrusive Stannylation of Precursor (*Z*)-*trans*-25 and 28.

entry	precursor	products (isolated yield, %)		ratio of <i>Z/E</i>
		(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -29	(<i>E</i>)- <i>trans</i> -29	
1	25	(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -29 (75)	(<i>E</i>)- <i>trans</i> -29 (10)	7.5 / 1
2	28	(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -30 (78)	-	1 / 0

Scheme 11. Sulfur-extrusive Stannylation of Precursor (*E*)-*trans*-25 and 31.

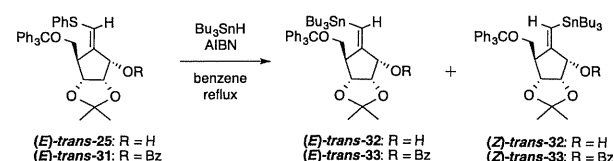
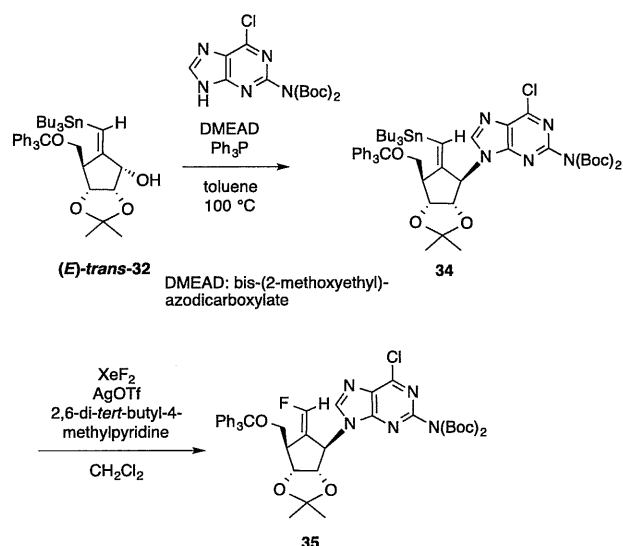


Table4. Sulfur-extrusive Stannylation of Precursor (*Z*)-*trans*-25 and 31.

entry	precursor	products (isolated yield, %)		ratio of <i>E/Z</i>
		(<i>E</i>)- <i>trans</i> -32	(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -32	
1	25	(<i>E</i>)- <i>trans</i> -32 (51)	(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -32 (23)	2.2 / 1
2	31	(<i>Z</i>)- <i>trans</i> -33 (71)	-	1.0 / 0

次に、光延型のグリコシル化反応を用い、得られたビニルスタナンへのプリン塩基の導入を検討した。(E)-*trans*-**32**をトルエン中、ビス-(2-メトキシエチル)アゾジカルボキシレート (DMEAD) およびトリフェニルフォスフィンの存在下、100 °Cで*N,N*-ビス-(Boc)-6-クロロプリンと反応させた結果、目的化合物**34**を得ることができた (Scheme 12)。得られた炭素環ヌクレオシド**34**を塩化メチレン中、トリフルオロメタンスルホン酸銀と2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルピリジンの存在下、フッ化キセノン (XeF₂) と反応させたところ、フルオロビニル体**35**を得ることができた。

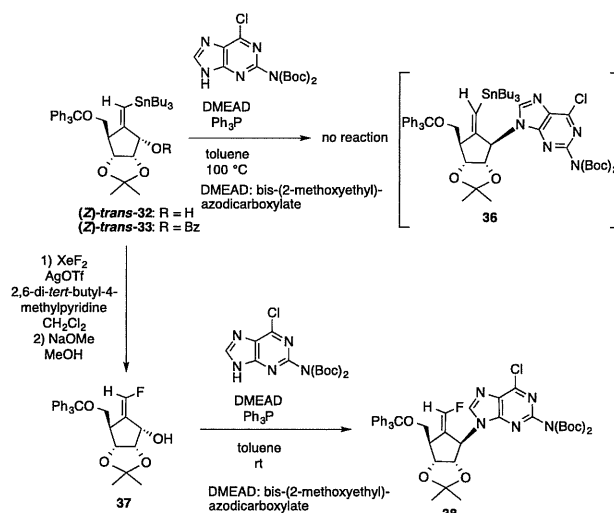


Scheme 12. Conversion of (*E*)-*trans*-**32** into **35**.

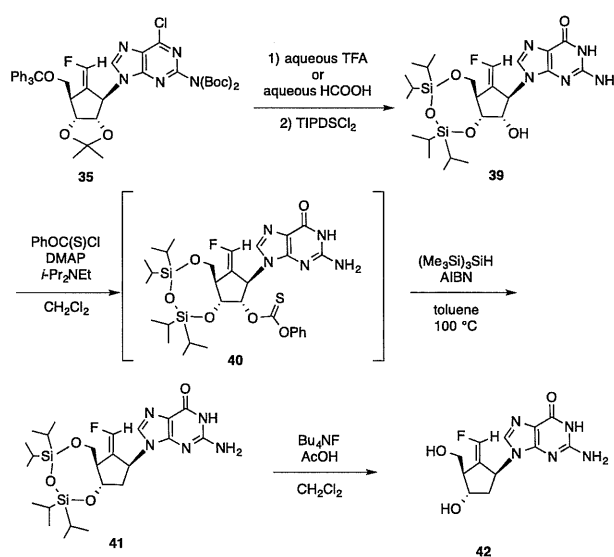
一方、(*Z*)-*trans*-**32**を先と同様の反応条件下、グリコシル化に付したところ、原料回収に終わった。そこで、ベンゾエート(*Z*)-*trans*-**33**のスズ-フッ素原子交換反応に付して得られた**37**をグリコシル化に付したところ、グリコシル化成績体**38**を得ることができた。

最後に、炭素環リボヌクレオリドをデオキシヌクレオシドへの変換を行った。(E)-フルオロビニル体**35**をトリフルオロ酢酸水溶液あるいはギ酸水溶液で処理し、脱保護を行った後、生成したフリーのヌクレオシドを TIPDS 化し、2'-ヒドロキシル体**39**を得た (Scheme 14)。TIPDS 体**39**をフェノ

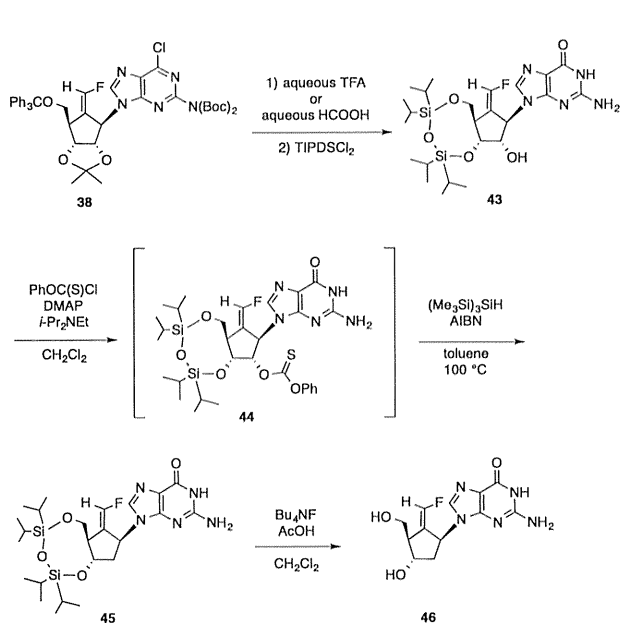
キシチオカルボニル体**40**とした後、トルエン中、AIBN の存在下、(Me₃Si)₃SiH と 100 °C で加熱還流下において反応させ、2'-デオキシ体**41**へ変換した。最後に、TIPDS 基をテトラブチルアンモニウムフルオリドで脱保護することにより、標的化合物 7'-(*E*)-フルオロエンテカビル**42**を得ることができた。7'-(*Z*)-フルオロエンテカビル**46**は、**38**を原料に用い、同様の条件下で変換反応を行うことにより (**38**→**43**→**44**→**45**→**46**)、合成することができた (Scheme 15)。



Scheme 13. Conversion (*Z*)-*trans*-**21** into **38**.

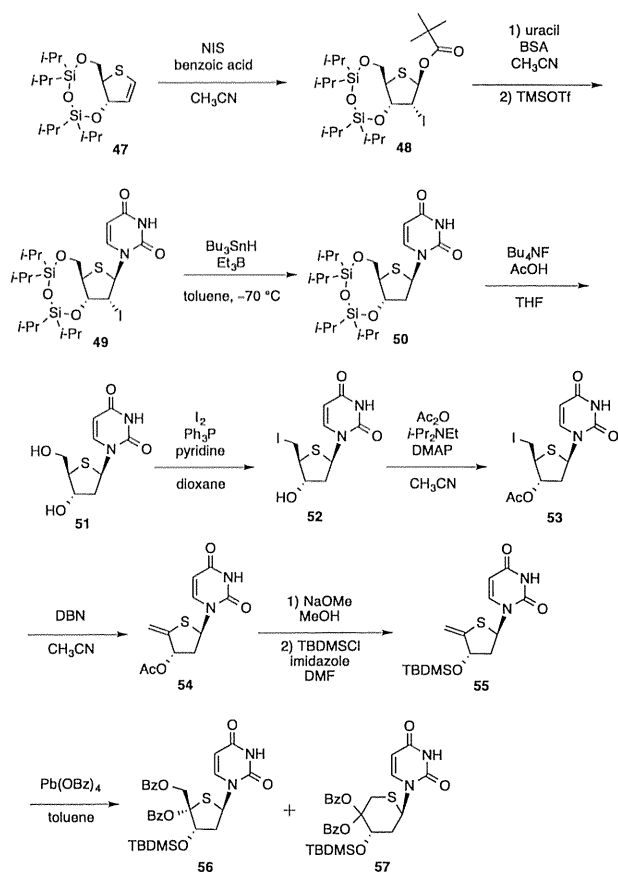


Scheme 14. Conversion of **35** into **42**.



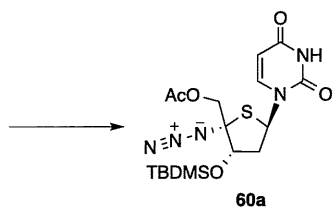
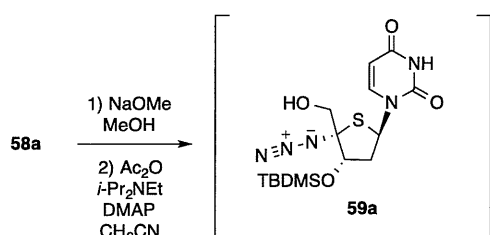
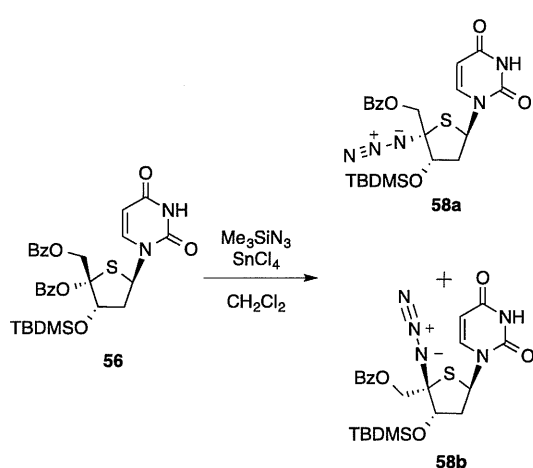
Scheme 15. Conversion of 38 into 46.

6) 4'-アジド-4'-チオデオキシヌクレオシドの合成
 4-チオフラノイドグリカル (47) をアセトニトリル中、ピバリン酸の存在下、*N*-ヨードコハク酸イミド (NIS) を反応させることにより、3,5-*O*-(テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-1-*O*-ピバロイル-2-デオキシ-2-ヨード-4-チオリボース 48 を選択的に得た (Scheme 16)。糖供与体 48 はアセトニトリル中、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (TMSOTf) の存在下、ビス-*O*-トリメチルシリルウラシルと反応させたところ、 β -選択的なグリコシル化が進行し、目的とする 2'-ヨード-2'-デオキシ-4'-チオウリジン誘導體 49 のみが得られた。チオウリジン誘導體 49 は 2'位のヨード基の還元および得られた 50 のテトラブチルアンモニウムフルオリドによる脱シリル化により 2'-デオキシ-4'-チオウリジン 51 を得た。チオウリジン 51 は $I_2/Ph_3P/pyridine$ による 5'-デオキシ-5'-ヨード体 52 へ変換し、引き続き、アセチル化により 53 とした。ヨード体 53 をアセトニトリル中、DBN による脱 HI に付し、3'-*O*-アセチル-4',5'-不飽和誘 4'-チオウリジン誘導體へ変換し、得られた 54 は 2 工程を経て、TBDMS 体

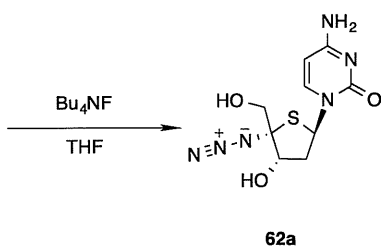
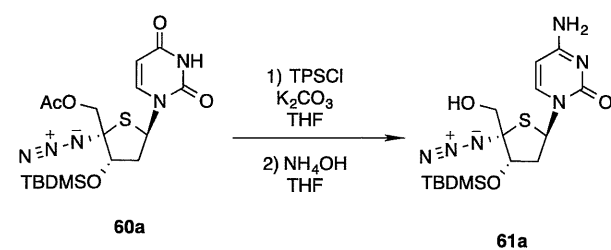


Scheme 16. Synthesis of 4',5'-unsaturated 2'-deoxy-4'-thiouridine (56).

55 とした。不飽和誘導體 55 はトルエン中、四酢酸鉛 ($Pb(OBz)_4$) によるジベンゾイルオキシレーションにより、目的とする 4'-ベンゾイルオキシ体 56 を得ることができた。この反応では、環拡大成績体 57 が副生することがわかった。
 4'-ベンゾイルオキシ体 56 を塩化メチレン中、四塩化スズの存在下、アジドトリメチルシランと反応させたところ、4'- α -アジド体 (58a) とそのエピマー 58b が生成した (Scheme 17)。立体化学は 58a を脱ベンゾイル化した後、得られた 59a をアセテート 60a に変換し、その NOE 実験により決定した。化合物 60a はトリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド (TPSCl) と反応させた後、生成した 4-*O*-TPS 体をアンモニア水で処理することにより、シトシンヌクレオシド 61a へ変換した (Scheme 18)。最後に、テトラブチルアンモニウムフルオリドにより脱シリル化し、4'-アジド-2'-デオキシシチジン 62a の合成を達成した。



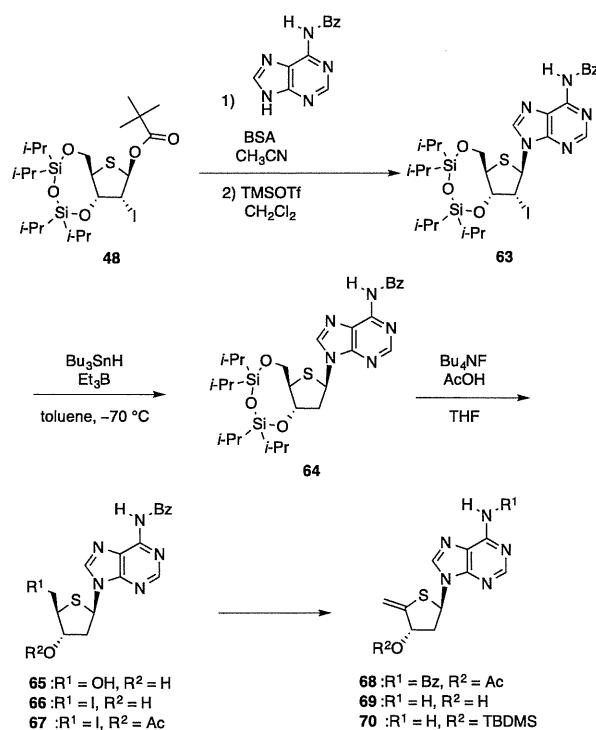
Scheme 17. SnCl_4 -mediated Nucleophilic substitution of **56** with Me_3SiN_3 .



Scheme 18. Synthesis of 4'-azido-2'-deoxy-4'-thiocytidine.

つぎに、4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオアデノシンの合成を行った。糖供与体**48**とトリメチルシリル

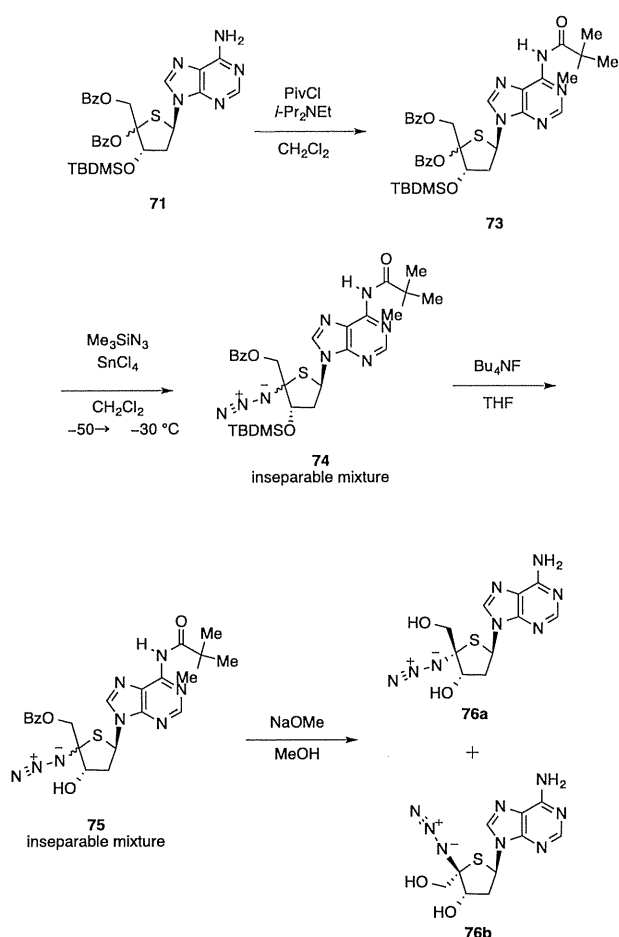
化した N^6 -ベンゾイルアデニンを塩化メチレン中、TMSOTfの存在下、反応させたところ、目的とする N^9 -置換体**63**のみを得ることができた (Scheme 19)。グリコシド**63**はラジカル還元により**64**へ変換した後、脱シリル化により**65**とした。 N^6 -ベンゾイル 2'-デオキシ-4'-チオアデノシン**65**の一級水酸基のヨード化とアセチル化により**66**を経て**67**へ変換した。次に、**67**を DBN で処理し脱 HI を行った後、得られた 4',5'-不飽和誘導体**68**をナトリウムメトキシドで処理することにより**69**とし、最後にシリル化して**70**とした。得られた**70**をトルエン中、四安息香酸鉛と反応させ、鍵中間体である 4'-ベンゾイルオキシ体**71**を合成した。この反応でも、環拡大した**72**が副生した。



Scheme 19. Synthesis of 4'-benzoyloxy-2'-deoxy-4'-thioadenosine **71**.

合成したベンゾイルオキシ体**71**を塩化メチレン

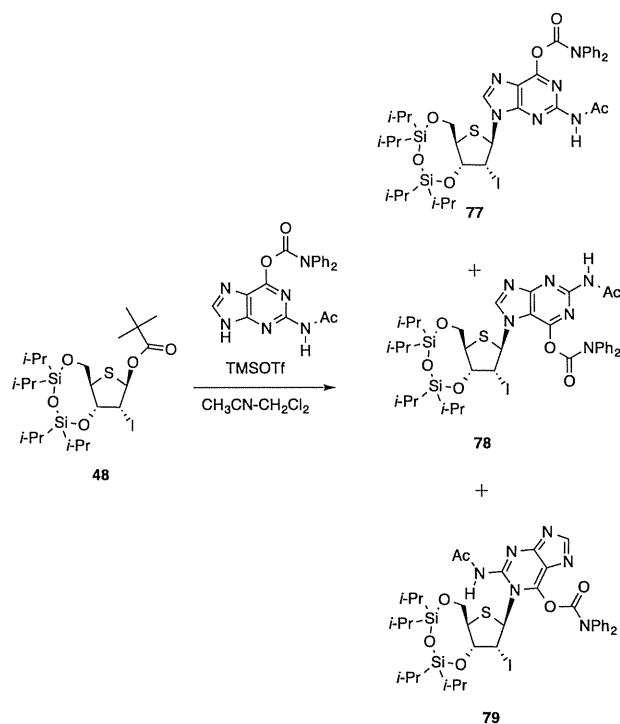
中、四塩化スズの存在下、アジドトリメチルシランと反応させたところ、原料回収に終わった。そこで、**71**をピバロイル化に付し、得られた**73**に対してアジド化を行ったところ、期待した反応が進行し、4'-アジド体**74**のジアステレオマーの混合物が得られた。アジド体**74**を脱シリル化することにより、**75**へ変換した。最後に、メタノール中、ナトリウムメトキシドで処理することにより、ジアステレオマーの分離が可能となり、4'- α -アジド体**76a**と4'- β -アジド体**76a**を得ることに成功した。しかしながら、その立体構造の決定には至っていない。



Scheme 20. Synthesis of 4'-azido-2'-deoxy-4'-thioadenosine **76a**.

最後に、4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオグアノシンの合成を行った。即ち、4-チオフラノイドグリカール**48**を *N*²-Ac-6-*O*-ジフェニルカルバモイルプリンと TMSOTf の存在下、反応させたところ *N*⁷

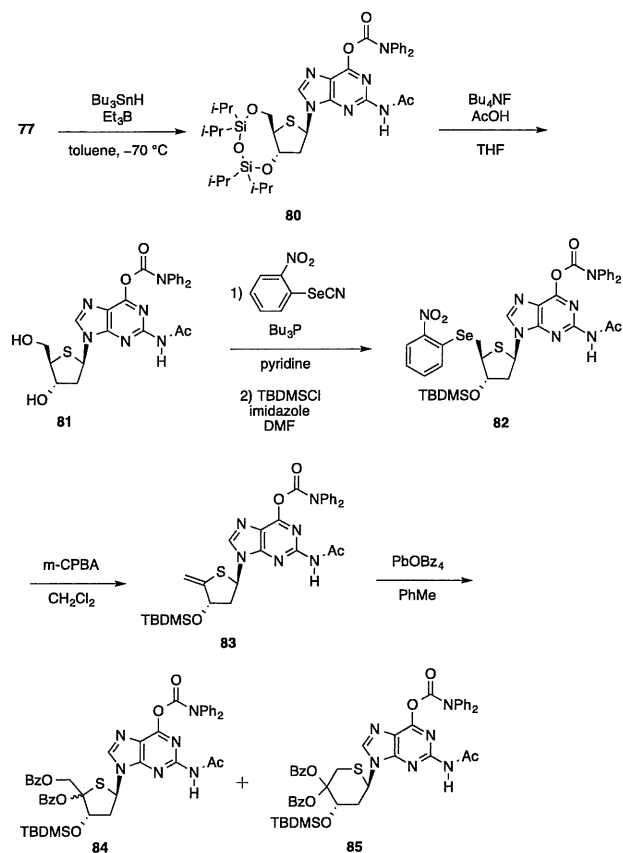
グリコシド**78**および *N*¹-グリコシド**79**が生成したものの、目的とする *N*⁹-グリコシド**77**を主成体として得ることができた (Scheme 21)。得られた *N*⁹-グリコシド**77**はラジカル還元と脱シリル化により、**80**を経て**81**へ変換した (Scheme 22)。得られた**81**はピリジン中、トリブチルホスフィン存在下、*ortho*-ニトロフェニルセレンシアネートと反応させた後、二級水酸基を TBDMS 化し、**82**を得た。セレン体**82**は *meta*-クロロ過安息香酸で酸化すると生成したセレンキシドは速やかに *syn*-脱離を受け、4',5'-不飽和ヌクレオシド**83**を与えた。得られた**83**を四安息香酸鉛と反応させることにより、目的とする 4'-ベンゾイルオキシ体**84**を得た。この場合にも、環拡大が起こった**85**が副生した。



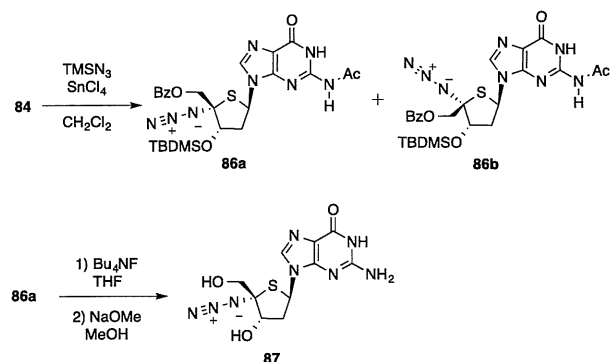
Scheme 21. Electrophilic glycosidation between **48** and *N*²-Ac-6-*O*-diphenylcarbamoyluracil.

4'-ベンゾイルオキシ体**84**を塩化メチレン中、四塩化スズの存在下、アジドトリメチルシランと反応させたところ、カルバモイル部分が脱保護を受けた 4'-アジド-*N*²-アセチルグアニン誘導体**86**を

ジアステレオマーの混合物として得ることができた (Scheme 23)。最後に、アジド体**86a**はテトラブチルアンモニウムフルオリドによる脱シリル化とナトリウムメトキシドによる脱アセチル化に付し、標的化合物である 4'-アジド-2'-デオキシ-4'-チオグアノシン**87**を合成することができた。



Scheme 22. Synthesis of 4'-benzoyloxynucleoside **84**.



Scheme 23. Synthesis of 4'-benzoyloxy-2'-deoxy-4'-thioguanosine **87**.

D. 考察

今年度、新規にデザインした新規核酸誘導体の合成を予定通り完了することができた。しかしながら、合成ルートは工程数が長く、かつ収率や立

体選択性も改良すべき部分があるため、更に精密化された合成ルートを立案する必要がある。

E. 結論

今年度の研究結果に示した通り、デザインした新規核酸誘導体をすべて合成することができた。合成した化合物の抗 HBV 活性を調べ、その効果と細胞毒性を評価し、構造活性相関研究により、更に精密な分子設計を行う。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

- 論文発表
 - Imoto, S.; Kohgo, S.; Tokuda, R.; Kumamoto, H.; Aoki, M.; Amano, M.; Kuwata-Higashi, N.; mitsuya, H.; Haraguchi, K. "Design, Synthesis and Evaluation of Anti-HBV Activity of Hybrid Molecules of Entecavir and Adefovir: Exomethylene Acycloguanine Nucleosides and its Monophosphate Derivatives", *Nucleosides, nucleotides & Nucleic Acids*, **2015**, *34*, in press.

- 学会発表

- 日本薬学会第135年会 (神戸)

“エンテカビルとアデホビルのハイブリッド型化合物：メチレンアシクロヌクレオシド誘導体の合成と抗 HBV 活性”

井本修平、向後 悟、徳田 亮、熊本浩樹、青木 学、天野将之、鎌田 (東) 伸好、満屋裕明、原口一広

- 54th International Conference on Antiviral Microbial Agents and Chemotherapy (2014) (Washington, DC)

4'-MODIFIED NUCLEOSIDE ANALOGS: Potent Inhibitors Active against Entecavir-resistant Hepatitis B Virus

(HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V})

Takamatsu, Y.; Tanaka, Y.; Kohgo, S.;
Murakami, S.; Singh, K.; Das, D.; Venzon, D.
J.; Amano, M.; Kuwata, N.; Aoki, M.; Delino,
N. S.; Hayashi, S.; Takahashi, S.; Haraguchi,
K.; Sarafianos, S. G.; Maeda, K.; Mitsuya H.

3. Conference on Retroviruses and Opportunistic
Infections (2015) (Seattle, Washington)

4'-Ethyneyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)
has an extremely high genetic barrier,
persistently exerting highly potent activity
against a variety of HIV-1 isolates including
EFdA-selected HIV-1 variants

Maeda, K.; Takamatsu, Y.; Kohgo, S.;
Haraguchi, K.; Delino, N. S.; Chang, S. B.; Das,
D.; Li, Z.; Kirby, K. A.; Sarafianos, S. G.;
Mitsuya H.

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

本年度、新規 HBV 剤の開発のためにスクリーニング系の広範な見直しと新たなヒット化合物を見出すために小分子天然物 (Mw 1,000 以下) のスクリーニングを行った。まず HBV レセプターのひとつとして同定された NTCP 遺伝子を発現ベクターに組み込み、浮遊細胞である MT-2 細胞に遺伝子導入した。この細胞での HBV の感染性等を検討中であり、耐性ウイルスの誘導やそのスクリーニングに応用したい。次に強い生物活性を発揮する天然物を産生する酵素類は平時に抑制されており、感染などのストレス下でより効率的に産生されることが明らかとなっている。東北大学薬学研究科と共同研究で休眠遺伝子を epigenomic modulator によって覚醒させ、生物活性を有する天然物取得を目指している。産生された天然物を分離・精製し、構造を決定させたところ、新規骨格を有する天然物を多数得ることが可能であった。これらの新規天然物を HepG2.2.15 細胞を用いてスクリーニングしている。

A. 研究目的

HBV は感染によって急性肝炎を起こすだけでなく、慢性に経過し、肝硬変・肝がんを引き起こす。主たる感染経路は血液・体液を介した感染である。その *in vivo* 感染性は血液感染症としては非常に強いものの、*in vitro* では初代ヒト肝細胞以外、感染がほとんど成立せず、また細胞変性効果も少ないため、既存の方法を用いた high through-put (HTS) アッセイの確立が困難である。一方で、同様の感染経路を主に使用し、HBV よりも *in vivo* 感染性が低い 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。

抗 HBV 剤の多くは HIV 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中から、抗 HBV 活性のあったものを流用しており、例えばラミブジン、テノフォビルがあげられる。しかし最近では、テルビブジンやエンテカ

ビルのように HBV RT に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 には効果が弱いが、ラミブジンやテノフォビルは HBV と HIV の RT 活性をほぼ同レベルで阻害する。さらに HBV では HIV の多剤耐性変異である Q151M を有しており、HIV-RT 阻害剤の ddI、ddC、d4T 等が 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) があることもあわせて、HBV-RT と HIV-RT には類似点と相違点が混在すると考えられる。つまり、HIV で採用したアッセイ系では HBV 特異的な薬剤を見出すことには不可能ではないが、限界がある。

RT を阻害する核酸誘導体は細胞内でリン酸化され、HBV-RT に認識されなければならない。昨年度は核酸誘導体の多くを宿主リン酸化酵素より効率よくリン酸化させ、ヒット化合物検出率の向上のために、herpes simplex virus type 1 thymidine

kinase (HSV-TK) を HepG2.2.15.7 細胞に導入した。この方法の利点としては以下のような点があげられる。テノフォビル等に特徴的な非環状リボースは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ため化学的に 1 リン酸化されていなければならない。これでは化学合成の効率を下げ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。

これらを踏まえて本年度は、2 つの研究から HBV 感染系を有するスクリーニング系の確立と効率的なヒット化合物の探索のために epigenomic modulator を応用した。

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。Bovine serum albumin fraction V (BSA) は Sigma-Aldrich 社より購入した。

3) 培養上清定量 PCR (薬剤スクリーニング)： 培養上清に MgCl₂ 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) ヒト肝細胞からの NTCP 遺伝子のクローニングと遺伝子導入： NTCP (Sodium/taurocholate co-transporting polypeptide) コーディング領域は、HepG2.2.15.7 細胞から、RT-PCR で増幅した。増幅できた NTCP 遺伝子は、G418 耐性遺伝子を導入した pCI-G418 ベクター

(Promega 社を改変) に組換え、塩基配列を決定した。pCI-NTCP/G418 を種々の細胞に遺伝子導入し、G418 でセクションした。

5) NTCP 発現細胞への HBV 感染：

NTCP を発現した MT-2 細胞等に HepG2.2.15.7 細胞の上清を加えて、24 時間後に細胞を洗浄し、培養を継続した。約 5 日ごとに細胞を洗浄し、1/10 に細胞数を減らして培養を継続し、培養上清中に含まれる HBV-DNA 量をリアルタイム PCR で計測した。また、HepG2.2.15.7 細胞との共培養を 3 日間行い、その後、MT-2 を分離して培養を継続させた。

6) 天然物由来の化合物のスクリーニング：

東北大学大学院薬学系研究科で分離・精製された天然物を分与頂き、HepG2.2.15.7 細胞と定量 PCR を応用した方法でスクリーニングを行った。天然物は糸状菌をニコチンアミドやメチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine などの epigenomic modulator 存在下で培養したものをを用いた。これらの天然物は分離時に分子量が 1000 以下かつ構造が未報告の化合物を用いた。

(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) NTCP クローニング： HepG2 細胞から DNA を抽出し、PCR をかけたがイントロンが含まれるためか、増幅されなかった。そのため RNA を抽出し、30 サイクルからなる single RT-PCR を行ったが増幅がかわらず、30 サイクルの 1st PCR に引き続き、25 サイクルの 2nd PCR を加える RT nested PCR を行い、ようやく良好なシグナルが得られた。この PCR 産物を真核細胞発現ベクターに組み込み、塩基配列を決定し

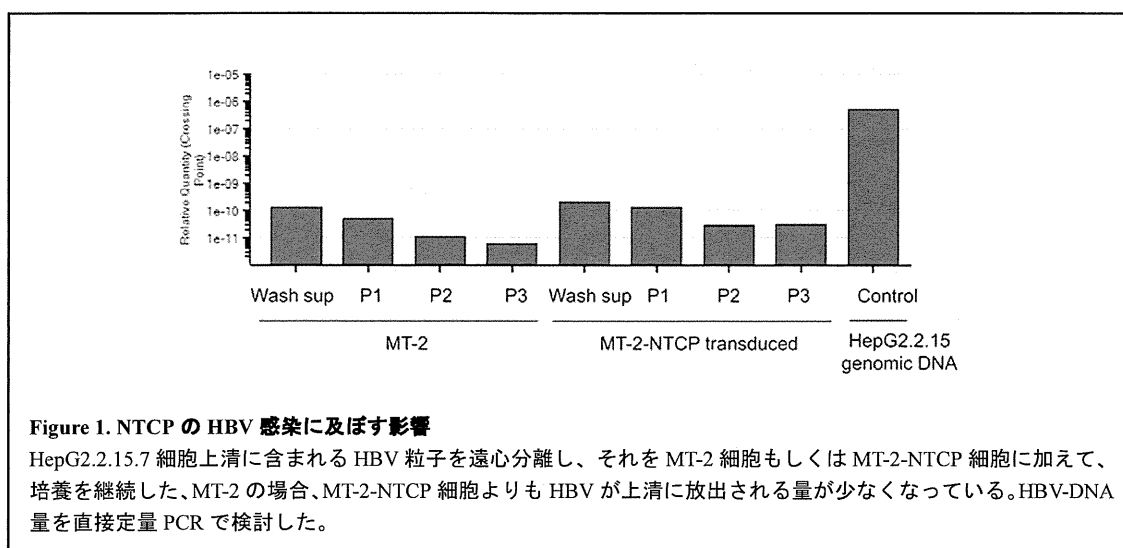


Figure 1. NTCP の HBV 感染に及ぼす影響

HepG2.2.15.7 細胞上清に含まれる HBV 粒子を遠心分離し、それを MT-2 細胞もしくは MT-2-NTCP 細胞に加えて、培養を継続した。MT-2 の場合、MT-2-NTCP 細胞よりも HBV が上清に放出される量が少なくなっている。HBV-DNA 量を直接定量 PCR で検討した。

た。クローニングできた 16 クローンの中から、Genbank に登録されている塩基配列と同一の配列をもつ 2 クローンを得た。一方で MT-2 をはじめとするリンパ球系細胞からは nested PCR でも増幅が認められなかった。

2) NTCP 遺伝子導入： NTCP 発現ベクターを MT-2 細胞に遺伝子導入し、400 µg/ml の G418 でセレクションした。また、他の T 細胞株として、MOLT-4 細胞、Hut-102 細胞、単球由来の THP1 細胞、B 細胞由来の RPMI-8226 細胞、B95a 細胞、さらには HepG2 細胞に遺伝子導入し、現在、そのセレクションを行っている。B95a 細胞、Hut-102 細胞、THP1 細胞では導入に成功し、G418 存在下でも増殖してきている。今後、これらの細胞を HBV 感染実験に用いる予定である。

3) 感染実験： NTCP 発現細胞として先行して樹立できた MT-2/NTCP 細胞を用いて HBV 感染実験を行った。はじめに HepG2.2.15.7 細胞の上清を回収し、これを MT-2 細胞に加え、24 時間感染を行い、その後に洗浄を繰り返した。一次的に感染価は低下したが、その後は、細胞を洗浄していること、細胞数を 1/10 に減らしていることから考えると、効率は高くないものの、感染が成立していると考えられた (Figure 1)。次により MT-2/NTCP 細胞に適した HBV を得るために、MT-2/NTCP 細胞と HepG2.2.15.7 細胞との共培養を現在行っている。また、順次、樹立できた細胞株を

使った同様の感染実験を行う予定である。

4) 新規天然物のスクリーニング： 東北大学大学院薬学研究科で分離・精製された天然物由来の化合物のスクリーニングを行った。これまでに約 100 化合物のスクリーニングを行ったが、抗 HBV 活性を見出すことはできていない。今後も新規化合物のスクリーニングを継続していく予定である。

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、分担研究者は平成 24 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を確立した。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、耐性ウイルスを用いたアッセイ系の確立を試みている。平成 25 年度からはこれらに加え、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た。今年度は、HBV 感染系を確立するために HBV レセプターとして有力な候補である NTCP に注目して、遺伝子導入を多種の細胞に行い、感