

201423030A

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

次世代生命基盤技術を用いた  
B型肝炎制圧のための創薬研究  
(H24-B創-肝炎-一般-003)

平成26年度総括・分担研究報告書

研究代表者 小嶋 聡一

平成27(2015)年3月

## 序文

現在 B 型肝炎(HBV)治療の中心は核酸アナログですが、HBV の完全排除は望めず、投与中止に伴う再増殖や長期投与に伴う耐性ウイルスの問題を抱えつつ薬を一生飲み続ける必要があります。インターフェロンも副作用の問題を抱えています。このような状況から脱却し、7年以内に有望な薬剤候補を世に送り出すために、本研究班は、非核酸アナログ剤の創薬実用化を目指し、理研小嶋、慈恵医大松浦、感染研相崎を中心として、同事業の他の研究班と連携して、HBV 生活環のいろいろなステップに対する新規非核酸アナログ薬剤候補化合物の大規模化合物スクリーニング研究を実施して参りました。大規模高速化合物スクリーニングを行い、ヒット化合物を得、構造活性相関研究を展開、理化学研究所が有する京コンピュータを用いたドッキングシミュレーション、インシリコスクリーニング、SPRING-8(放射光施設)や SACLA(X線自由電子レーザー施設)を用いた構造解析、次世代シーケンサー、PET イメージング等の次世代生命基盤技術を駆使して、次世代(非核酸アナログ)HBV 薬候補化合物 3 つ以上を同定し、創薬支援ネットワークを活用しながら、臨床試験・実用化を目指しております。平成 26 年度までに、ウイルスのカプシド形成を阻害し、抗ウイルス活性を發揮するヒット化合物の取得に成功しました。他班と積極的に連携することで、ウイルスの侵入を阻害し、抗ウイルス活性を發揮するヒット化合物、ならびに cccDNA の形成阻害/分解誘発の可能性を有するインターフェロン疑似低分子誘導体を得るとともに、ウイルスの転写活性化を選択的に阻害し、抗ウイルス活性を發揮するヒット化合物を得つつあります。

残り 2 年間で、これらのヒット化合物の中から、体内動態、毒性などいわゆる ADMET 研究を行い、開発候補化合物を絞り、リード化合物を得るとともに、RNase H 阻害候補薬等のスクリーニングを続行し、ヒット化合物を得ます。さらにヒット化合物の有用性検証にも用いることが可能な遺伝子型の異なるウイルスや耐性ウイルスを簡易に検出する技術を開発します。一方、今年度途中で終了した HBV 線維化阻害候補薬、来年度途中で終了する予定の劇症肝炎阻害候補薬を世の中に提示できる見込みです。

このように研究班 3 年間の課題を順調に遂行でき、当初設定しました目標をほぼ達成できましたのは、研究分担者、研究協力者をはじめとした諸先生方、他班の緒先生方の絶大なご支援・ご指導の賜物と深く感謝申し上げます。また、本研究班の活動に始終ご助言とご理解を頂きました評価委員会の先生方、厚生労働省健康局疾病対策課肝炎対策推進室の技官、事務官の方々に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究班の事務局として、本事業の遂行に献身的に努力していただきました田島貴美枝、高山康代の両氏に心から感謝いたします。

平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者 小嶋 聡一

# 目 次

I 研究班 班員名簿	1
II 総括研究報告	5
研究代表者 小嶋聡一(理化学研究所 特別ユニットリーダー)	
III 分担(協力)研究報告	
小嶋聡一 (理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット) .....	21
齋藤臣雄 (理化学研究所 創薬ケミカルバンク基盤ユニット)	
古谷裕 (理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット)	
九十田千子(理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット) .....	28
臼井健悟 (理化学研究所 核酸診断技術開発ユニット) .....	31
小川健司 (理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室) .....	33
白水美香子(理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター).....	36
種村健太郎(東北大学大学院農学研究科).....	38
松浦知和 (東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部) .....	40
金井好克 (大阪大学大学院 医学系研究科生体システム薬理学) .....	45
相崎英樹 (国立感染症研究所 ウイルス第2部 第4室) .....	48
掛谷秀昭 (京都大学大学院薬学研究科).....	54
吾郷日出男(理化学研究所 ビームライン基盤研究部生命系放射光利用システム開発ユニット).....	57
堂前 直 (理化学研究所 連携支援ユニット) .....	61
平野秀典 (理化学研究所 計算分子設計研究グループ).....	64
名越澄子 (埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科) .....	66
鈴木治和 (理化学研究所 LSA要素技術開発グループ) .....	69
渡辺恭良 (理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター).....	74
IV 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	79
V 研究成果の刊行物・別刷 .....	85
VI 参考資料 .....	283
班会議資料、合同勉強会資料	

研究班 班員名簿

## 次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究 平成26年度

区分	氏名	所属機関	職名
研究代表者	小嶋 聡一	理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	特別ユニットリーダー
研究分担者	掛谷 秀昭	京都大学大学院 薬学研究科	教授
	白水 美香子	理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター	副センター長
	小川 健司	理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室	専任研究員
	平野 秀典	理化学研究所 計算分子設計研究グループ	研究員
	吾郷 日出夫	理化学研究所 ビームライン基盤研究部生命系放射光利用システム開発ユニット	専任研究員
	松浦 知和	東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	教授
	鈴木 治和	理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 機能性ゲノム解析部門	グループディレクター
	金井 好克	大阪大学大学院 医学系研究科生体システム薬理学	教授
	堂前 直	理化学研究所 連携支援ユニット	専任技師
	名越 澄子	埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科	教授
	相崎 英樹	国立感染症研究所 ウイルス第2部 第4室	室長
	種村 健太郎	東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野	教授
	渡辺 恭良	理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター	センター長
	研究協力者	須藤 正幸	中外製薬(株) 富士御殿場研究所 創薬企画推進部
斎藤 臣雄		理化学研究所 創薬ケミカルバンク基盤ユニット	ユニットリーダー
臼井 健悟		理化学研究所 核酸診断技術開発ユニット	ユニットリーダー
山口 時男		理化学研究所 創薬・医療技術基盤プログラム	マネージャー
古谷 裕		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	研究員
寺岡 龍太郎		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	研究員
原 祥子		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	リサーチアソシエイト
井上 育代		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	テクニカルスタッフ
佐藤 裕美		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	テクニカルスタッフ
森田 直子		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	テクニカルスタッフ
結城 瑞恵		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	テクニカルスタッフ
山崎 勇太		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット	テクニカルスタッフ
九十田 千子		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット(ウイルス肝炎研究財団)	訪問研究員
秦 咸陽		理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット(JSPS)	訪問研究員
坂田 幸太郎		湧永製薬株式会社	研究員
新野(終元)睦子		理化学研究所 タンパク質機能・構造研究チーム	上級研究員
津曲(三嶋)千恵美		理化学研究所 タンパク質機能・構造研究チーム	技師
市川 保恵		理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室	テクニカルスタッフ
坪田 昭人		東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 臨床医学研究所	教授
前橋 はるか		東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	実験助手
西山 直子		東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	臨時研究職員
阿片 理恵		東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	臨時研究職員
田島 彩沙		東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	臨時研究職員

## 次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究 平成26年度

区分	氏名	所属機関	職名
	白井 美佐子	東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	臨時研究職員
	鈴木 哲朗	浜松医科大学医学部医学科感染症学講座	教授
	池田 均	東大病院検査部 消化器内科	副部長
	清水 弘樹	産業技術総合研究所 北海道センター	研究員
	グオン テジュン	理化学研究所 LSA要素技術研究グループトランスクリプトーム研究チーム(JSPS)	訪問研究員
	永森 収志	大阪大学大学院 医学系研究科生体システム薬理学	准教授
	坂西 由希子	理化学研究所 連携支援ユニット	研究支援パートタイマー
	滝川 康裕	岩手医科大学 消化器・肝臓内科	教授
	宮坂 昭生	岩手医科大学 消化器・肝臓内科	助教
	清水 雅仁	岐阜大学大学院 医学系研究科腫瘍制御学講座 消化器病態学分野	教授
	寺井 崇二	新潟大学大学院 歯学総合研究科 消化器内科学分野	教授
	藤澤 浩一	山口大学大学院 医学系研究科 消化器病態内科学	助教
	日高 勲	山口大学医学部附属病院・肝疾患センター	助教
	浦田 洋平	山口大学医学部付属病院第一内科	助教
	丸本 芳雄	山口大学臨床試験支援センター	助教
	水上 拓郎	国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第4室	室長
	明里 宏文	京都大学霊長類研究所・人類進化モデル研究センター 比較免疫微生物領域	教授
	土屋 好司	東京理科大学 理学部第一部応用化学科	ポスドクトラル研究員
	浮田 陽子	理化学研究所 ビームライン基盤研究部生命系放射光利用システム開発ユニット	リサーチアソシエイト
	金山 洋介	理化学研究所 健康・病態科学研究チーム	研究員
	細谷 孝充	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	チームリーダー
	ヒューム ウィリアム ユエワン	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	副チームリーダー
	張 周恩	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	研究員
	丹羽 節	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	研究員
	隅田 有人	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	研究員
	落合 秀紀	理化学研究所 分子標的化学研究チーム	特別研究員
	崔 翼龍	理化学研究所 分子動態イメージング研究ユニット	ユニットリーダー
	佐古 健生	理化学研究所 分子動態イメージング研究ユニット	特別研究員
	丹澤 和比古	理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター	コーディネーター
事務局	田島貴美枝 高山康代	〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1研究本館 独立行政法人理化学研究所 微量シグナル制御技術開発特別ユニット TEL 048-467-7938(直) FAX 048-462-4675	アシスタント

# 総括研究報告

次世代生命基盤技術を用いた B 型肝炎制圧のための創薬研究班  
平成 26 年度総括研究報告書

研究報告者 小嶋 聡一 独立行政法人理化学研究所 特別チームリーダー

【研究要旨】

現在 HBV 治療の中心は核酸アナログであるが、HBV の完全排除は望めず、再活性化の恐れを抱えつつ飲み続ける必要がある。IFN についても毒性の問題が存在する。さらに、HBV を抑えた患者から肝癌になる患者は絶えず、予後を決する因子が肝硬変と言われている。本研究は、2 年後に有望な非核酸アナログ抗ウイルス薬候補、並びに付随病態改善薬候補計 3 つ以上について前臨床試験を開始し、製薬会社に提供することを最終目的として、他班と連携して大規模化合物スクリーニングを実施。HBV の生活環の他ステップに効く非核酸アナログ薬を見出し、相加相乗的な抗 HBV 効果獲得、それによる HBV 完全排除、もしくは中和抗体である HBs 抗体の獲得が期待される。HBV に付随する肝線維化や劇症肝炎の改善薬は、ウイルス感染患者に有益であり、他の原因による同病態にも適用が期待される。

プロジェクト 3 年目となる平成 26 年度は、以下の具体的な成果を得た。

- ① 分泌型 Gaussia スプリットルシフェラーゼ利用カプシド（コアタンパク質 HBc 2 量体）形成阻害（CFI）ハイスループットスクリーニングで NPDepo 理研天然化合物バンク、東大化合物バンク、市販化合物ライブラリー 計 20 万化合物から抗ウイルス活性示す 3 化合物獲得。HBV 逆転写を可視化・数値化する新システム構築と化合物の評価。エンテカビル耐性変異型疑似ゲノム複製阻害評価。最有望な IsoPhthalic diAmide 誘導体（CFI-IPA）創製。急性毒性無確認。CFI 化合物探索準備として、動的光散乱・ゲル濾過の結果から 2 量体化とカプシド形成能有すコアタンパク質を無細胞合成系で調製。網羅的リン酸化プロテオミクスにより CFI-IPA の標的・作用機序同定中。
- ② SCID マウスより更に免疫不全状態でヒト由来細胞の生着率が良い NOD-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> に uPA をマウス肝臓特異的に発現させた TK-NOG マウス導入。ヒト肝細胞移植キメラマウス作製。HBV 感染患者血清を尾静脈より注入し、HBV 感染を成立させ、CFI-IPA 化合物投与薬効評価。
- ③ 脇田班と連携し HBV 受容体 NTCP 発現抑制、抗ウイルス剤 RO41-5253 発見、NCTP 標的侵入阻害の有効性提示。NTCP（SLC10A）の質量分析計を用いた絶対定量法開発。田中班/上田班から導入した疑似ウイルスバイオナノカプセル（BNC）の細胞への取り込みが NTCP に依存しないことを確認。BNC を用いたウイルス侵入阻害剤スクリーニング系で NPDepo 1 万化合物より得たヒット化合物 58 種のうち 5 種類に PXB 細胞系にて毒性なく濃度依存的抗ウイルス活性を確認、NTCP-independent Entry Inhibitor（NIEI）と命名。構造活性相関研究開始。非 NCTP 侵入細胞因子同定のため HBV mRNA 標的蛍光プローブ導入ヒト肝細胞開発。
- ④ IFN $\alpha$ 2 型受容体（IFNAR2）アゴニスト imidazonaphthyridine に cccDNA 形成阻害/消去能発見。類縁体 cccDNA Eliminator（CDE）合成。イミダゾ[1,2-a][1,8]ナフチリジン骨格含有 CDE3008 につき PXB 細胞で抗 HBV 活性発揮を見出。同骨格を創薬テンプレートとして、化学構造多様性を指向した合成経路確立。溶解性等を向上新規 CDE 化合物群創製。IFNAR2 細胞外ドメインと IFN $\alpha$  の発現コンストラクトを構築、結晶化成功。CDE 化合物結合部位探索のため、部分的糖鎖 6 か所を含む IFN $\alpha$ 2 構造確認。網羅的リン酸化プロテオミクスにより CDE の標的・作用機序同定中。構造活性相関研究ならびに IFNAR2 ECD との結合について生化学的解析・分子ドッキングシミュレーションを行い、有益情報を得て in silico スクリーニング開始。IFNAR 発現誘導能を有する非環式レチノイドによる IFN 抗 HBV 作用増強効果確認。
- ⑤ 森屋班との連携研究により、HBV コアプロモーター転写活性阻害剤スクリーニングで約 7 千化合物から 9 化合物を見出し、Core Promoter Inhibitor（COPIN）と命名。脇田班との連携研究により RNaseH 阻害剤のスクリーニング開始。



- ⑥ 慢性 HBV 肝線維化予防・治療候補薬開発では、高活性低毒性 CMR46 ( $IC_{50}:0.1 \mu M$ )を得て、標的 TGF- $\beta$  LAP タンパクとのドッキングシュミレーション、NMR により LAP-CMR46 相互作用確認。複合体結晶化成功。ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化田中モデルで薬効確認。理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに引き継ぐ。
- ⑦ 劇症肝炎の治療薬開発では、HBV 劇症肝炎茶山モデルへの核トランスグルタミナーゼ(TG2)による転写因子 Sp1 架橋・不活性化機構の関与を見出し、肝細胞株を用いた高速大規模核 TG2 阻害剤探索系で NPDepo 約 3 万化合物から 1 化合物がヒット。構造活性相関研究続行中。
- ⑧ 患者血清よりラミブジン/エンテカビル耐性ウイルス産生細胞 EB-HBJ6 株樹立。
- ⑨ 埼玉医科大、慈恵医科大、山口大、岩手医科大、岐阜大、東大の 6 大学 7 施設から HBV 感染 122 例血液取集・データベース構築。エンテカビル治療不良例/良好例の背景因子解明を目指し HBV 感染・増殖に関わる宿主遺伝子同定のためのトランスクリプトーム解析実施。
- ⑩ 小原班から導入した HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウス、HBV トランスジェニックマウスで  $^{11}C$  標識 telbivudine PET イメージング試験実施。隔離環境で安全かつ繰り返し PET 試験可能実験システム構築。HBV 非侵襲的検出法開発のため  $^{18}F$  標識 Fluoropropoxyentecavir の標識前駆体合成成功。

## 本研究班の目標

HBV の創薬・実用化を最終目標とし、理化学研究所の小嶋、東京慈恵会医科大学の松浦、国立感染症研究所の相崎を中心として、同事業の他班との連携研究により大規模高速化合物スクリーニングを行い、ヒット化合物を得、構造活性相関研究を展開、理化学研究所が有する京コンピュータを用いたインシリコスクリーニング、SPring-8(放射光施設)や SACL(A線自由電子レーザー施設)を用いた構造解析、次世代シーケンサー、PET イメージング等の次世代生命基盤技術を駆使して、次世代 HBV 薬候補化合物を 3 つ以上同定し、創薬支援ネットワークを活用しながら、臨床試験・実用化を目指す(図 1)。



図 1 小嶋班の目標

## A. 研究目的

小嶋を中心としたスクリーニンググループは、HBV 生活環の様々なステップと付随する病態について独自のスクリーニング系を構築、もしくは相崎を中心とした有効性・安全性評価グループや松浦を中心とした臨床グループ、同事業他班から細胞スクリーニング系を導入。ハイスループットスクリーニングを行い、ヒット化合物を得る。キメラマウスを用いた動物モデルで薬効を検証し、相崎グループと連携して安全性を確認し、リード化合物を得ることを目的とする。

相崎グループは、松浦グループと連携してヒト肝移植キメラマウスモデル(Hepatology 2008)や、新たに免疫系を保持した細胞培養系・小動物感染系を用い、小嶋グループで得たリード候補化合物の抗ウイルス効果、安全性・薬物動態を評価することを目的とする。その一環として、PET を用いた肝残存ウイルスの検出技術の開発を目指す。

松浦グループは、相崎グループと連携して TK-NOG マウス系を作製して *in vivo* 活性を測定する。再活性化症例、急性肝不全症例、兄弟姉妹で病態の異なる慢性肝炎症例などの HBV 感染症例からオミックス解析を駆使し、2 次・3 次スクリーニングに用いる標的候補を同定、細胞株を確立するとともに、臨床試験の実施に向けた準備を行うことを目的とする(図 2)。

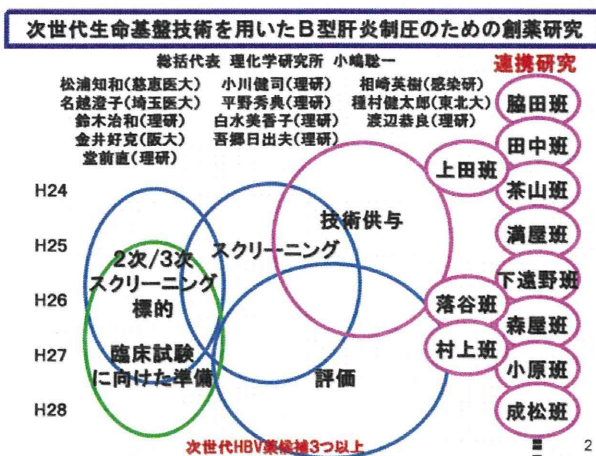


図2 小嶋班の研究体制

理研創薬医療技術基盤プロジェクト山口マネージャーと企業研究者(湧永製薬、中外製薬)2名の研究協力者のアドバイスの下、実用化に耐える薬剤開発を目指す。

メインスクリーニング各項目の具体的な目的は以下のとおりである。\*数値は図中の番号

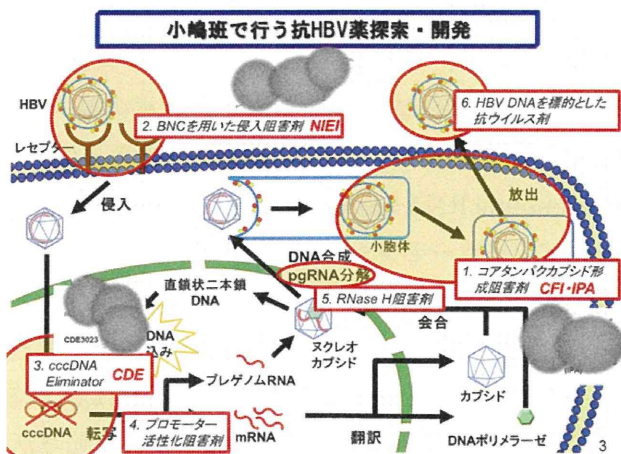


図3 小嶋班の創薬標的

### カプシド形成阻害剤の抗HBV活性測定（1）

分泌型 Gaussia スプリットルシフェラーゼを利用したカプシド形成（コアタンパク HBc 二量体形成）阻害剤探索系で東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物ライブラリー14万化合物から得たヒット化合物（小川報告参照）の抗HBV活性を生ウイルスを用いて評価することと、構造類縁体の合成、収集を目的とした。

### BNCを用いた侵入阻害剤スクリーニング（2）

バイオナノカプセル(BNC)は脂質二重膜にHBVの表面抗原が浮かんだ中空状粒子で、肝臓由来の細胞に効率よく取り込まれる。この性質を利用して、HBVの代わりにBNCを用いてウイルス侵入阻害剤のスクリーニングを行い、抗HBV活性を持つ低分子化合物を同定することを目的とした（田中班/上田班との共同研究）。

### CDE誘導体の抗ウイルス活性測定（3）

CDE-3008(RO4948191)は、インターフェロン(IFN) $\alpha$ 受容体2のアゴニスト活性を有し、IFN $\alpha$ 誘導性遺伝子群(ISGs)の発現を促進するIFN様活性を持つHCV増殖阻害活性を有する化合物として開発されたがHBVに対する活性は分かっていた。今回、CDE-3008およびその誘導体がHBVの増殖を阻害し、さらに、cccDNAの形成阻害/分解促進活性を有することを見出し、一連の誘導体をcccDNA Eliminator(CDE)と命名、構造活性相関研究により最適化し、可溶性や安定性を向上させた非核酸アナログ抗ウイルス低分子化合物を作製することを目的としている。

### HBVコアプロモータ阻害剤スクリーニング（4）

HBVは侵入した肝細胞の核内でcccDNAを形成した後に、これに含まれるプロモータの転写活性によりプレゲノミックRNA及び4種類のmRNAを合成し、HBV複製のためのパーツを作製する。これらのプロモータ活性を抑える低分子化合物をスクリーニングし、抗HBV活性を持つ転写阻害剤を同定することを目的とした（森屋班との共同研究）。

### その他、RNase H阻害剤スクリーニング（5）

の開始、スマートアンプ簡易HBV DNA測定系（6）の確立を行う（臼井報告参照）と共に、HBVに伴う線維化抑制剤を理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに導出し、劇症肝炎抑制剤の構造活性相関を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

分泌型 Gaussia スプリットルシフェラーゼを利用したカプシド形成 (コアタンパク質 HBc の二量体形成) 阻害剤探索系(小川報告参照)など小嶋グループ内で構築したスクリーニング系に加え、相崎グループや松浦グループ、HepaRG 細胞や脇田班、田中班、森屋班を始めとする同事業の他班で構築した HepG2.2.15.7 細胞(脇田班)、HuS- E/2 細胞(田中班)、HepG2-hNTCP-C4 細胞(田中班)、Huh7#94 GL4.18 AeUS BCP 細胞(森屋班)、R6FLR- N 細胞(小原班)などの細胞株を用いる細胞スクリーニング系、BNC を用いた HBV 侵入阻害剤スクリーニング系を導入・ハイスループット化し、これを用いて理研天然物化合物バンク(NPDepo)、市販、並びに東大ライブラリーの計 20 万化合物を、図 3 に示した標的について大規模化合物スクリーニングを実行した。

ヒット化合物を得たら、構造活性相関研究を実施し(斎藤、掛谷、小嶋)、標的分子とヒット化合物の構造情報を基にコンピュータによるドッキングシミュレーション、並びにインシリコスクリーニングを行い(平野)、誘導体を有機合成し(斎藤、掛谷)、NMR 解析や共結晶の X 線立体構造解析を行い(白水)、リード候補化合物を得、TK-NOG ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた抗ウイルス活性の評価を行うとともに、相崎グループとともに動物モデル、細胞モデルを用いて安全性を確認する(種村、水上)。

### カプシド形成阻害剤の抗 HBV 活性測定 (1)

ウイルス感染細胞で発現した Core タンパク質 (HBc) は、アッセンブリドメインにより二量体を形成する。この二量体を単位として多量体が形成され、HBV のヌクレオカプシドが作られる。HBc が大腸菌で強制発現させた組換えタンパク質でも、*in vitro* でカプシド様構造を形成する特徴を利用し、HBc の二量体形成を *in vitro* で可視化する HTS を用いて、二量体化による Gaussia スプリットルシフェラーゼの再構成は阻害するが、全

長 Gaussia ルシフェラーゼの活性は阻害せず、かつ細胞障害活性を示さない化合物をスクリーニングした (小川)。化合物のより詳細な評価 (2 次スクリーニング) を行うために、HBV の複製を数値化するシステムを新規に構築した。HBV の感染および複製を解析するアッセイ系は複数存在するが、いずれも感染性のあるウイルスを使用する点から安全面に留意が必要であり、大量のサンプルを扱いつらい。HBV が確実に感染する細胞は、現段階ではヒト初代肝細胞または HepaRG 細胞しか知られておらず、さらに比較的簡便な株化細胞 (HepG2.2.15、HepAD38 など) を使った系であっても、複製の検出までには長時間の培養を要することからスループット性に大きな問題がある。この状況が、HBV の新規創薬を困難にしていると想像される。そこで、我々は、感染性のあるウイルスを用いずに、HBV の複製を短時間で可視化・数値化するシステムの構築を試みた。HBV のゲノムは約 3.2Kb の不完全環状 DNA (rcDNA) である。感染後、宿主の核内で完全二本鎖となった DNA (cccDNA) のマイナス鎖を鋳型として mRNA が産生される。この内最大の 3.5kb の mRNA が、ゲノム DNA の鋳型となる pregenomic RNA (pgRNA) である。逆転写酵素であるポリメラーゼタンパク質 (HBV-Pol) は pgRNA の 5' および 3' 両端に存在する RNA encapsidation signal epsilon ( $\epsilon$ ) と相互作用することによりヌクレオカプシドに取り込まれる。続いて、pgRNA を鋳型として HBV-Pol の逆転写活性によりマイナス鎖 DNA が合成される。我々は、この HBV のマイナス鎖 DNA 合成 (逆転写) を、短時間で測定して数値化する方法を開発した。HeLa 細胞を用いて解析した結果、ゲノムの複製には、HBc および HBV-Pol の存在が不可欠であり、X タンパク質 (HBx) はその作用を更に増強することが示された (小川)。HBc の二量体化阻害剤のスクリーニングおよびその後の 2 次スクリーニングにより得られたヒット化合物とその類縁体の 27 化合物について、Hep38.7-Tet 細胞お

よびヒト初代肝細胞である PXB 細胞を用いて抗ウイルス活性を評価した。テトラサイクリンにより HBV 発現を誘導することができる Hep38.7-Tet 細胞をテトラサイクリン存在下で 3 日間培養した後、テトラサイクリンを含まない培地で培養することによって HBV の発現を誘導すると同時にさまざまな濃度のヒット化合物を処理し、6 日後の培養上清中の HBV DNA 及び細胞毒性を測定した。また、ヒト初代肝細胞である PXB 細胞を用いた抗ウイルス活性測定には Hep38.7-Tet 細胞由来の HBV を用い、HBV 感染時及び感染後の 12 日間化合物を処理し、培養上清中の HBV DNA 量を測定した (九十田)。

スクリーニングヒット化合物の構造を基に、市販の化合物ライブラリーから構造類縁化合物を約 150 種抽出し、目視で 70 化合物に絞り込みを行ない、生物活性再評価結果に基づき、高活性化合物とそれらの構造類縁体を、1~6 段階程度の反応工程により合成した (斎藤)。

HBV DNA の検出は、従来の PCR を用いるとともに、臼井らが開発した約 30 分で血中 HBV DNA の検出が可能な等温核酸増幅技術 Smart Amp 法による迅速検出系を構築している。

カプシド形成阻害化合物を探索する準備として、コアタンパク質を無細胞合成系で調製し、動的散乱、ゲル濾過、電子顕微鏡観察により性状の評価を行った (白水)

CFI-IPA 1106 の単回投与急性毒性を検討した。生後 8 週齢の C57BL/6 雄マウスを、体重測定後、用量 0、15、150、1500 MG/KG にてゾンデを用いて単回強制胃内投与を行った (各投与群で N=4、溶媒は 0.5%メチルセルロース溶液で、投与物質は懸濁状態であった)。投与 2 時間後に一般状態観察を行うとともに、サーモグラフィによる熱画像診断を行った。その後、ケージ内行動量測定装置にて 5 昼夜の一般行動様式を観察し、投与 6-7 日後に情動認知行動解析を行い、行動解析終了後に採血、解剖し、血液・生化学検査 (血中 GOT、血中 GPT、血中クレアチンフォスフォキ

ナーゼ活性、血中乳酸脱水素酵素活性、血中コリンエステラーゼ活性、血中ブドウ糖、血中尿素窒素、血中総コレステロール、血中中性脂肪)、および主要臓器の一般状態を観察した。また肝臓については、常法に従い組織切片を作成し、HE 染色標本作製し、鏡検を行った (種村・水上)。

自殺遺伝子である TK を肝細胞特異的に発現させた TK-NOG マウスに基質であるガンシクロビルを投与して肝傷害を惹起させ、相応に肝細胞が破壊された段階でヒト肝細胞を移植することによりヒト肝細胞キメラマウスを作製する。次に、その動物モデルを用いて抗 CFI-IPA 1106 の *in vivo* 効果を検討した (坪田・松浦)。

## BNC を用いた侵入阻害剤スクリーニング (2)

BNC を黒田 (名古屋大学: 上田班) から供与して頂き、HepaRG 細胞に蛍光標識した BNC を取り込ませ、取込みの基本的性質を検討した後、HepG2-hNTCP-C4 細胞を渡士 (感染研: 田中班) より供与して頂き、BNC 取込みが HBV の受容体として同定された胆汁酸のトランスポーター (Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide: NTCP) に依存しているかを検証した。数種類の肝臓由来の培養細胞を用いて BNC の取り込み量を比較し、スクリーニングに使用する細胞を選定した。同細胞に蛍光標識した BNC と終濃度 10 μg/ml NPDepo 化合物とを加え、1 日後に 1 細胞あたりの BNC 取込み量をイメージング細胞アナライザーにて測定し、BNC の取込みを阻害する化合物を同定した。次に、PXB 細胞に HBV とヒット化合物を加え、1 日培養し、さらに 1 日化合物処理し、12 日間培養した後に抗 HBV 活性を調べた。

さらに、NTCP 発現を標的とした HBV 侵入阻害剤スクリーニングを脇田班と連携して論文にまとめた。

NTCP 絶対定量系の構築に必要な標的ペプチドの情報を取得するため、NTCP 安定発現細胞 (HepG2-NTCP-C4) を用いて条件検討を行った。膜タンパク質の網羅的プロテオミクス法 (金井、永森他 特願 2012-37919) に従い、細胞膜に富んだ

膜画分を調製し、ペプチド化した。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチトップ型四重極 Orbitrap) にナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer をプラットフォームとし、解析アルゴリズム Matrix Science Mascot によって UniProt データベースを用いて行った。解析によって得られた SLC10A1(NTCP) の同定ペプチド配列情報に基づき、絶対定量系に必要な安定同位体標識ペプチド (AQUA ペプチド) を設計した。さらに予備実験を行い、使用する AQUA ペプチドの量と質量分析計の測定パラメータ等を最適化した。既知量の AQUA ペプチドをペプチド化後の膜画分試料に添加し、絶対定量用のサンプルとした。絶対定量解析には精度の高いプレカーサーイオン測定法である Selected Ion Monitoring (SIM) 法、もしくは Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法を用いた。絶対定量値の算出には解析ソフトウェア Thermo Pinpoint を使用した。

網羅的比較定量発現プロテオミクスには iTRAQ 法もしくは non-label 法を用いた。網羅的比較リン酸化プロテオミクスには、IMAC 法でリン酸化ペプチドを選択的に回収し iTRAQ 法を使用した。(金井・永森)。

### CDE 誘導体の抗ウイルス活性測定 (3)

CDE-3008 類の設計・創製：2,4 位にトリフルオロメチル基を有する CDE-3008 類は、2,6-ジアミノピリジンを出発物質として、リン酸存在下、1,1,1,5,5,5-ヘキサフルオロペンタン-2,4-ジオンと反応させて得られる化合物 1 を経由し、その後、イミダゾ[1,2-a][1,8]ナフチリジン骨格を構築し、最後に 1,3,4-オキサゾール環を導入可能な合成経路を確立した。さらに、置換基としてのオキサゾール環の改変には本合成経路を応用した (図 4)。一方、構造活性相関研究の知見を踏まえて、検出

タグおよび光親和性官能基を導入した二官能性分子プローブの設計・合成を行った。各反応経過、ならびに反応生成物の追跡は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った。さらに、反応生成物の同定・構造解析は、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 解析、質量分析スペクトル (MS) 解析等を行った (掛谷)。

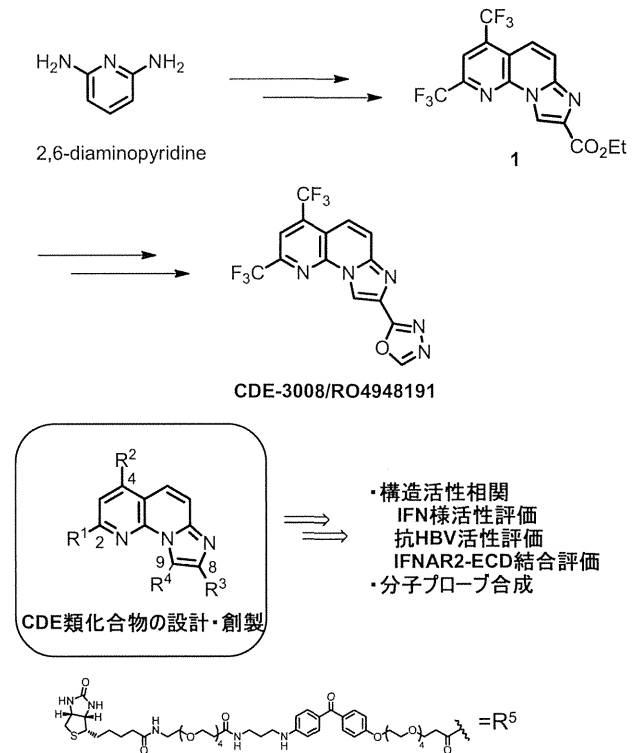


図 4. CDE 類の設計・合成およびプローブ合成

小原班より導入した HCV レプリコン細胞を用い、ISGs の 1 つ OAS-1 の mRNA 発現量を測定していた昨年までの実験系と比較して約 10 倍感度が良い IFN 様活性を測定できるようになった。また、HBV 感染 PXB 細胞を用いて CDE 誘導体の IFN 様活性を HBV DNA 量と cccDNA 量から測定した (古谷・小嶋)。

IFNAR2-ECD (IFNAR2 細胞外ドメイン) と CDE-3008 類の *in vitro* 結合評価：リンコンビナント IFNAR2-ECD と各種合成した CDE-3008 類の *in vitro* における親和性を Octet96 を用いて評価した (吾郷)。

*In silico* 探索の初期モデル構築に必要なタンパ

ク質の構造や結合部位の解析は、タンパク質は複数の酵素による消化断片を行い生じたペプチドをえ、MALDI-TOF MS (Bruker ultraflextreme) は、Reflector mode での MS 分析と LIFT mode による MS/MS 分析を行い、またナノ液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化法質量分析法 (nLC-MS, Thermo Q-Exactive) では、データ依存的 Top10Method を用いて、MS および MS/MS を取得して分析することで、糖鎖結合部位 6 箇所を含むアミノ酸配列のを確認した (堂前)。

分子ドッキングには、Protein Data Bank に登録されている IFNAR2 の X 線結晶解析構造 (PDB entry: 3S9D, 3SE3) を用いた。これらの構造は、タンパク質単独のもので、リガンドの結合情報は含まれていない。そこで、Konishi らにより報告された IFN 様作用物質の結合部位を推定し、分子ドッキングによる化合物のスクリーニングを行った。分子ドッキングには GOLD および glide を用いた。さらに、本研究グループで合成展開された IFN 様物質群 (CDE 化合物群) の活性測定データに基づいて構造活性相関を評価した。これらの結果を加味して、分子シミュレーションによる化合物スクリーニングの最適化を試みている (平野)。

#### HBV コアプロモータ阻害剤スクリーニング (4)

森屋班の森石 (山梨大学) から導入しコアプロモータールシフェラーゼを高発現する Huh7 #94 GL4.18 AeUS BCP 細胞に終濃度 10  $\mu$ g/ml NPDepo 化合物を加え、Sp1 の阻害剤である Mithramycin をポジティブコントロールとして用い、これと同等の阻害活性を持つ化合物をスクリーニングした。一般的に、ウイルスのプロモータを阻害する化合物は様々な動物由来のプロモータを阻害し細胞毒性を示す。今回のスクリーニングでは HBV コアプロモータを特異的に阻害し、動物細胞のプロモータは阻害しない、つまり細胞毒性の低い化合物をヒット化合物とした。これら

のヒット化合物の抗 HBV 活性を、PXB 細胞を 14 日間化合物処理し、HBV DNA 量から測定した。

HBV 線維化抑制剤については、昨年得られたヒット化合物 CMR46 (IC<sub>50</sub>: 0.1  $\mu$ M) の uPA-SCID ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化モデル (田中モデル) での有効性を解析した。

茶山 HBV 感染劇症肝炎モデルでの関与が判明した核トランスグルタミナーゼによる転写因子 Sp1 の架橋活性化による細胞死を抑制する核トランスグルタミナーゼ活性阻害剤 HTS 系でヒットした phenosafranin の構造類縁体 32 種を合成・収集し、阻害活性の比較をした。

名越班で 7 施設 (埼玉医科大学総合医療センター (名越)、東京慈恵会医科大学 (本院: 松浦、柏病院: 坪田)、岩手医科大学 (滝川)、山口大学 (寺井)、岐阜大学 (清水)、東京大学 (池田)) から収集した患者血清から選択した 5 検体の、HBV ゲノム配列を決定した。genotype C、HBsAg 陽性の男性症例におけるエンテカビル治療効果を HBV-DNA 量の推移により 3 群に分類し、各群におけるウイルス因子と宿主因子の相違をトランスクリプトーム解析等により解析中である (名越・鈴木(治))。NTCP を強制発現させた HepG2 細胞で HBV の感染性が高いサブクローンおよび低いサブクローン、分化することによって感染性が出現する HepaRG 細胞の未分化および分化サンプルからトータル RNA を精製した。マイクロアレイにより宿主遺伝子の発現プロファイルを作成し、インフォマティクスにより発現差の有意な遺伝子を抽出した。次に上位遺伝子について、siRNA によりノックダウンし、HBV 感染性への影響を調べた。増殖に関わる宿主因子探索は、HBV を強制導入した Hep38 細胞で HBV の複製能に差があるサブクローン間のトータル RNA を用いて、上記と同じ方法で調べた。(九十田・鈴木(治))

慢性 B 型肝炎で NA 耐性になったと思われる患

者血液から検出したウイルス(J6)の全遺伝子配列を検討し、NA 耐性ウイルスの 1.3 x genome (一本鎖) を作製し、その発現を Huh-7 細胞で確認した後、episomal 型ベクター (pEBMulti) を用いて、1.3 x HBV (J6) genome が、細胞分裂と同調して複製・分配されるシステムを構築した。この episomal な遺伝子複製システムでは、細胞に導入した plasmid は染色体に結合して存在し、HBV mRNA が産生される (鈴木(哲)・松浦)

Entecavir はプロドラッグであり細胞内でリン酸化することで薬効を示す。これを妨げずに標識化するには entecavir の 2 位の炭素への  $^{18}\text{F}$  導入の他にないが、(2*R*)-fluoroentecavir、(2*S*)-fluoroentecavir の二つの構造異性体が存在し得る。活性評価、分析標品に使用するため非標識(2*R*)-fluoroentecavir をまず合成した (渡辺)。手法として、cyclopentene 部へ安定同位体  $^{19}\text{F}$  を導入後にグアニン部を結合することで合成を行った。作成した (2*R*)-fluoroentecavir は PXB 細胞 (ヒト肝細胞キメラマウスから採取されたヒト肝細胞) を用いた抗 HBV 活性評価を行った (古谷)。しかし放射性  $^{18}\text{F}$  標識化には迅速・高収率の合成が必要となるため、標識部位への脱離基導入および非標識部位の OH 基、NH<sub>2</sub> 基などへの保護基導入による標識前駆体の合成が必要となる。様々な保護基導入

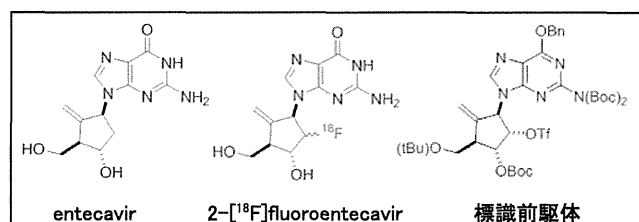
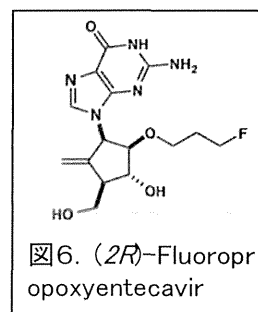


図5. Entecavir、 $^{18}\text{F}$  標識 fluoroentecavir、2*R*体の標識

法の検討により標識前駆体 (図5右) を得た。これに  $^{18}\text{F}$  と同様の反応系を用いて安定  $^{19}\text{F}$  導入を行い、反応収率、保護基安定性についての NMR 測定による検討を行った。

さらに、(2*R*)-fluoroentecavir の代替案として、

entecavir の 2 位の炭素へ側鎖 (fluoropropoxy 基) を導入した(2*R*)-fluoropropoxyentecavir (図6) の合成を行った。 $^{19}\text{F}$  を導入した安定同位体を合成し、抗 HBV 活性評価を行った。



小原班より HBV-Tg マウス (HBV-Tg CAT3) 及び対照群としての negative control (HBV-/-) マウスを導入した。このマウスは C57BL6 マウスに HBV 全長遺伝子が導入されたもので、感染性を有する HBV を産生する。昨年度同様に PET 撮像用アイソレーションボックスを用いて $^{11}\text{C}$ LdT を投与後 90 分間の撮像を行った。また更に、LdT 以外に HBV 病態に対する有用なプローブを探索するため、理研に既に合成法の確立された PET プローブの中で逆転写酵素阻害薬の一つである $^{11}\text{C}$ azidothymidine、また炎症部位の検出のため末梢性ベンゾジアゼピン受容体に結合する $^{11}\text{C}$ PK11195、Cyclooxygenase-2 (COX-2) 阻害剤の $^{11}\text{C}$ ketoprofen methyl ester、 $^{11}\text{C}$ indomethacin methyl ester (IND-Me) の4種について n=1 の予備的 PET 動態評価を行った。その結果、 $^{11}\text{C}$ IND-Me において HBV-Tg マウスと Negative Control マウスの肝集積差が最も大きかった。COX-2 は慢性肝炎での高発現が肝がん発症リスクファクタと考えられている酵素であり (He *et al.*, *Can J Gastroenterol* 2010;24(7):435-440, Cheng *et al.*, *Modern Pathology* 2004;17:1169-1179)、これの発現量の検出が肝炎病態の診断に有用な可能性がある。そこで、 $^{11}\text{C}$ IND-Me を用いてさらに PET 試験を行うこととした。また COX-2 発現量を確認するため、COX-2 特異的な蛍光プローブ (XenoLight Rediject COX-2) を用いマウスに腹腔内投与 12 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、肝臓を摘出、切片を作成して蛍光像の観察を行った。得られた PET 画

像に各臓器への関心領域を設定し時間放射能曲線を作成した (渡辺)。

(倫理面への配慮)

血液検体の採取にあたっては、登録患者に対して不利益、危険性およびその対処について十分に説明し、インフォームドコンセントを書面で得て行う。血液検体は各施設で連結可能匿名化し、対応表は各施設の個人情報管理者が管理する (名越)。

実験動物を使用する実験計画は、動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、動物の殺処分方法に関する指針 (平成 19 年環境省告示第 105 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号) 等に基づいて実施した。またすべての動物実験は理化学研究所、東京慈恵会医科大学、大阪大学、国立感染症研究所、東北大学の各研究施設の動物実験委員会による承認を経て、「動物実験規程」にしたがって行った。

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は理化学研究所、国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

### C. 研究結果

小嶋スクリーニンググループでは、カプシド形成阻害剤 CFI-IPA スクリーニング、並びに NTCP 非依存侵入阻害剤 NIEI スクリーニング、コアプロモータ阻害 COPIN スクリーニングでは、ヒット化合物を得るとともに、CDE 誘導体の cccDNA 形成阻害/分解誘導を伴う抗ウイルス活性を確認し、構造生物学的解析からインシリコスクリーニングを行った。

具体的には以下のとおりである。

① 分泌型 *Gaussia* スプリットルシフェラーゼ利用カプシド (コアタンパク質 HBc 2 量体) 形

成阻害 (CFI) ハイスループットスクリーニングで NPDepo 理研天然化合物バンク、東大化合物バンク、市販化合物ライブラリー 計 20 万化合物から抗ウイルス活性示す 3 化合物獲得。HBV 逆転写を可視化・数値化する新システム構築と化合物の評価。エンテカビル耐性変異型疑似ゲノム複製阻害評価。最有望な *IsoPhthalic diAmide* 誘導体 (CFI-IPA) 創製。急性毒性無確認。CFI 化合物探索準備として、動的光散乱・ゲル濾過の結果から 2 量体化とカプシド形成能有すコアタンパク質を無細胞合成系で調製。網羅的リン酸化プロテオミクスにより CFI-IPA の標的・作用機序同定中 (金井・松浦)。

② SCID マウスより更に免疫不全状態でヒト由来細胞の生着率が良い NOD-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> に uPA をマウス肝臓特異的に発現させた TK-NOG マウス導入。ヒト肝細胞移植キメラマウス作製。HBV 感染患者血清を尾静脈より注入し、HBV 感染を成立させ、CFI-IPA 化合物投与薬効評価 (坪田・松浦)。

③ 脇田班と連携し HBV 受容体 NTCP 発現抑制、抗ウイルス剤 RO41-5253 発見、NCTP 標的侵入阻害の有効性提示。NTCP (SLC10A) の質量分析計を用いた絶対定量法開発 (金井・松浦)。田中班/上田班から導入した疑似ウイルスバイオナノカプセル (BNC) の細胞への取り込みが NTCP に依存しないことを確認。BNC を用いたウイルス侵入阻害剤スクリーニング系で理研天然物化合物ライブラリー (NPDepo) 1 万化合物より得たヒット化合物 58 種のうち 5 種類に PXB 細胞系にて毒性なく濃度依存的抗ウイルス活性を確認、NTCP-independent Entry Inhibitor (NIEI) と命名。構造活性相関研究開始。非 NCTP 侵入細胞因子同定のため HBV mRNA 標的蛍光プローブ導入ヒト肝細胞開発 (相崎)。

④ IFN $\alpha$ 2 型受容体 (IFNAR2) アゴニスト imidazonaphthyridine に cccDNA 形成阻害/消去能発見 (古谷・小嶋)。類縁体 cccDNA Eliminator (CDE) 合成 (掛谷)。イミダゾ [1,2-a][1,8] ナフチリジン骨格含有 CDE3008 につき PXB 細胞で抗 HBV 活性発揮を見出。同骨格を創薬テンプレートとして、化学構造多様性を指向した合成経路確立。溶解性等を向上新規 CDE 化合物群創製。IFNAR2 細胞外ドメイン (ESD) と IFN $\alpha$  の発現コンストラクトを構築、結晶化成功 (吾郷)。CDE 化合物結合部位探索のため、部分的糖鎖 6 か所を含む IFN $\alpha$ 2 構造確認 (堂前)。網羅的リン酸



化プロテオミクスにより CDE の標的・作用機序同定中（金井）。構造活性相関研究ならびに IFNR2 ECD との結合について生化学的解析・分子ドッキングシミュレーションを行い、有益情報を得て in silico スクリーニング開始（平野）。IFNAR 発現誘導能を有する非環式レチノイドによる IFN 抗 HBV 作用増強効果確認（清水・松浦）。

- ⑤ 森屋班との連携研究により、HBV コアプロモーター転写活性阻害剤スクリーニングで約 7 千化合物から 9 化合物を見出し、Core Promoter Inhibitor (COPIN)と命名（古谷・小嶋）。脇田班との連携研究により RNaseH 阻害剤のスクリーニング開始（古谷・小嶋）。
- ⑥ 慢性 HBV 肝線維化予防・治療候補薬開発では、高活性低毒性 CMR46 ( $IC_{50}:0.1 \mu M$ )を得て、標的 TGF- $\beta$  LAP タンパクとのドッキングシミュレーション（平野）、NMR により LAP-CMR46 相互作用確認（白水）。複合体結晶化成功。ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化田中モデルで薬効確認（小嶋）。理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに引き継ぐ。
- ⑦ 劇症肝炎の治療薬開発では、HBV 劇症肝炎茶山モデルへの核トランスグルタミナーゼ (TG2)による転写因子 Sp1 架橋・不活性化機構の関与を見出し、肝細胞株を用いた高速大規模核 TG2 阻害剤探索系で NPDepo 約 3 万化合物から 1 化合物がヒット。構造活性相関研究続行中（小嶋）。

松浦臨床標的グループでは、HBV 感染症例からオミックス解析を駆使し、2次・3次スクリーニングに用いる標的候補を同定するとともに、臨床試験の実施に向けた準備を行った。また、相崎グループと連携して TK-NOG マウス系を作製中である。具体的には、上記の記載に加えて

- ⑧ 患者血清よりラミブジン/エンテカビル耐性ウイルス産生細胞 EB-HBJ6 株樹立（松浦・鈴木(哲)・清水・池田）。
- ⑨ 埼玉医科大、慈恵医科大、山口大、岩手医科大、岐阜大、東大の6大学7施設から HBV 感染 122 例血液収集・データベース構築。エンテカビル治療不良例/良好例の背景因子解明を目指し HBV 感染・増殖に関わる宿主遺伝子同定のためのトランスクリプトーム解析実施。埼玉医科大、慈恵医科大、山口大、岩手医科大、岐阜大、東大の6大学7施設から再活性化症例、急性肝不全症例、兄弟姉妹で病態の異なる慢性肝炎症例などの HBV 感染症例 87

検体を収集。約半数は未治療症例（松浦・名越・鈴木(治)ほか）。

相崎有効性・安全性評価グループでは、HBV 線維化抑制リード候補薬の毒性評価（種村・水上；上記参照）に加えて、

- ⑩ ウイルス侵入阻害化合物探索用 HepG2-hNTCP-C4 細胞+3%DMSO 感染効率 60%系を構築した（相崎）。
- ⑪ HBV 粒子からコレステロールを除き蛍光コレステロールを戻した蛍光ウイルスを構築した（相崎）。
- ⑫ 小原班から導入した HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウス、HBV トランスジェニックマウスで  $^{11}C$  標識 telbivudine PET イメージング試験実施。隔離環境で安全かつ繰り返し PET 試験可能実験システム構築。HBV 非侵襲的検出法開発のため  $^{18}F$  標識 Fluoropropoxy entecavir の標識前駆体合成成功。（渡辺）。

#### D.考察

HBc の二量体形成（カプシド形成）を阻害する CFI-IPA については、核酸アナログの entecavir、lamivudine、tenofovir と比較した結果、CFI-IPA 1086、1100、1106 が tenofovir と同程度の抗 HBV 効果を有すること ( $IC_{50} < 0.5 \mu M$ ) が示された。さらに急性毒性がないことを確認した（種村報告参照）が、TK-NOG キメラマウス系の一部で HBV の低下傾向が観察されるものの、有意差はみられなかった（松浦報告参照）。溶解性に問題あるものと思われた。

NTCP 非依存の侵入阻害剤 NIEI については、双方向の阻害実験から BNC は HBV と同様な機構により肝臓由来の細胞に取り込まれることが解り、また、NTCP 非依存的に肝臓由来の細胞に取り込まれるため、NTCP 以外のレセプターの関与が示唆された。BNC 取込み阻害スクリーニングから得られたヒット化合物が抗 HBV 活性を示したことから、NTCP 非依存的 HBV 侵入阻害剤抗ウイルス剤の同定に BNC が大変有効であることが解った。しかしながら、HBV の侵入阻害剤は、初期感染に対しては、有効であると考えられるが、一旦感染して HBV が cccDNA としてイン

テグレートされた肝細胞や動物モデルに対しても有効であるかどうかを検証する必要がある。

cccDNA を消去する低分子化合物は未だに開発されておらず、CDE 誘導体は有力な候補である。しかしながら、CDE 誘導体が複製の過程を抑制するために 2 次的 cccDNA の形成を阻害しているように見えている可能性は否定できず、ECO プローブの技術を応用して cccDNA 特異的に標識し、cccDNA 消去活性を確かめるとともに、トランスクリプトーム解析や網羅的リン酸化タンパク質のプロテオーム解析により cccDNA を消去するに至る分子機構を明らかにでき、これを指標にリード化合物を得られると考えている。

コアプロモータ転写阻害剤ヒット化合物には、COPIN-001 と基本骨格に相同性がある COPIN-004, -005 が含まれており、その他にも、COPIN-014 と COPIN-016、COPIN-019 と COPIN-020 など同一の基本骨格を持つものが含まれていた。COPIN-001 は抗 HBV 活性を示したことから、コアプロモータ阻害剤スクリーニング系の有効性が示された。

## E. 結論

ウイルス生活環の異なるステップを標的とした大規模スクリーニングから、いくつかの有望な非核酸アナログ抗ウイルス薬候補のもととなるヒット化合物を得ることができた。

カプシド形成阻害 CFI-IPA については、in vivo での溶解性、吸収・血中安定性等の問題を解決するために、来年度は、ADMET 研究を進め、理研創薬・医療技術基盤プログラムに導出して medicinal chemistry を実行してリード化合物を得る。

HBV 侵入阻害 NIEI については、スクリーニングを継続、ヒット化合物を増やすと共に、構造活性相関研究によりヒット化合物の最適化を行い、ADMET 研究を経て新規非核酸アナログ製剤の開発を目指す。

cccDNA 形成阻害 CDE については、cccDNA 形成阻害/分解誘導の機構解明、構造活性相関研究を進め、可溶性と安定性を向上させ、抗 HBV 活性をもつ CDE 誘導体リードを開発する。

さらには HBV コアプロモータを特異的に阻害する低分子ヒット化合物 COPIN を同定、構造活性相関研究により最適化して新規抗 HBV 剤の開発を目指す。

残り 2 年間で、これらの構造活性相関研究・ADMET 研究を進め、リード化合物を取得、RNase H 阻害候補薬のスクリーニングを完了すると共に、先行して進んでいる HBV 線維化阻害候補薬、劇症肝炎阻害候補薬を世の中に提示できる見込みである。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- ①特許取得 該当なし
- ②実用新案登録 該当なし
- ③その他 該当なし

# 分担研究報告

## HBV 侵入・複製・カプシド形成阻害新規抗ウイルス剤のスクリーニング研究

研究報告者 小嶋聡一 独立行政法人理化学研究所 特別ユニットリーダー

研究協力者

須藤正幸 中外製薬株式会社 課長

坂田幸太郎 湧永製薬株式会社 研究員

独立行政法人理化学研究所

斎藤臣雄 ユニットリーダー、白井健悟 ユニットリーダー、山口時男 マネージャー、

古谷裕 研究員、寺岡龍太郎 特別研究員、原詳子 リサーチアソシエート、井上育代

テクニカルスタッフ、佐藤裕美 テクニカルスタッフ、森田直子 テクニカルスタッフ

結城瑞恵 テクニカルスタッフ、山崎勇太 テクニカルスタッフ、

秦咸陽 訪問研究員(日本学術振興会)、九十田千子 訪問研究員 (ウイルス肝炎研究財団)

### 研究要旨

- ① 分泌型 *Gaussia* スプリットルシフェラーゼを利用したカプシド形成 (コアタンパク HBc 二量体形成) 阻害剤探索系で東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物ライブラリー14 万化合物から得たヒット化合物 (小川報告参照) 27 種のうち3 種類に Hep38.7-Tet 細胞/ヒト初代肝細胞 PXB 細胞系にてテノホビルと同程度の抗ウイルス活性を確認、Core Formation Inhibitor-IsoPhthalic diAmide 誘導体(CFI-IPA)と命名。
- ② 田中班/上田班から導入した疑似ウイルスバイオナノカプセル(BNC)の細胞への取り込みが NTCP に依存しないことを確認。BNC を用いたウイルス侵入阻害剤スクリーニング系で理研天然物化合物ライブラリー(NPDepo)1 万化合物より得たヒット化合物 58 種のうち5 種類に PXB 細胞系にて毒性なく濃度依存的抗ウイルス活性を確認、NTCP-independent Entry Inhibitor (NIEI)と命名。
- ③ 脇田班と連携して RO41-5253 を含む RAR 阻害剤が NTCP の発現レベルを低下させることで HBV 感染感受性を低下させることを明らかにした(九十田報告参照)。
- ④ IFN 様作用を示す経口 IFN $\alpha$ 2 型受容体アゴニスト Imidazonaphthyridine (RO8191)の誘導体 27 種類(掛谷報告参照) のうち4 種類について PXB 細胞系にて毒性なく濃度依存的に cccDNA の形成阻害もしくは分解誘導を伴う抗ウイルス活性を確認、cccDNA Eliminator (CDE)と命名。
- ⑤ 森屋班から導入したプロモータ・ルシフェラーゼ安定発現株 Huh7#94 GL4.18 AeUS BCP 細胞を用いてコアプロモータ転写阻害剤のスクリーニングを行い、これまでに NPDepo 7 千化合物から 310 ヒット化合物を同定、この内の PXB 細胞系にて細胞毒性をほとんど示さない 41 化合物から抗 HBV 活性を持つ 9 化合物を見出し、Core Promoter Inhibitor (COPIN)と命名。
- ⑥ 脇田班との連携研究により RNaseH 阻害剤のスクリーニングを開始した。
- ⑦ 慢性 HBV 肝線維化予防・治療候補薬開発では、高活性低毒性 CMR46 (IC<sub>50</sub>:0.1  $\mu$ M)を得て、標的 TGF- $\beta$  LAP タンパクとのドッキングシュミレーション、共結晶化成功。ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化田中モデルで薬効確認。理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに引き継ぐ。
- ⑧ HBV 劇症肝炎茶山モデルへの核トランスグルタミナーゼ(TG2)による転写因子 Sp1 架橋・不活性化を阻害する phenosafranin を NPDepo 約 3 万化合物から得て構造活性相関研究中。