

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21609

研究課題名(和文) 薬剤耐性HBV変異株に強力で長時間作用型のハロゲン化HBVキャプシド阻害剤開発

研究課題名(英文) Development of a long-acting halogenated HBV capsid inhibitor that is potent against drug-resistant HBV mutants

研究代表者

満屋 裕明(Mitsuya, Hiroaki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究所長

研究者番号：20136724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規HBVキャプシド構成阻害化合物のデザイン・合成・活性評価を行い、新規化合物20種類の合成とCC50値(50%の細胞に傷害を呈する濃度)及びIC50値(ウイルス複製を50%阻害する濃度)を決定した。評価の結果、In vitroレベルで既報の化合物、GLS4(CC50 =55 μ M, IC50 =0.015 μ M)と同等のSelectivity Indexを有する化合物 GRL-07-19 (CC50 =27 μ M, IC50 =0.007 μ M)と、同等の活性を有する化合物 GRL-12-19 (CC50 >100 μ M, IC50 =0.004 μ M)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハロゲン化HBVキャプシド阻害剤候補化合物のデザイン・合成・活性評価で既報化合物GLS4(CC50 =55 μ M, IC50 =0.015 μ M)に近い良好な活性を発揮する新規化合物GRL-12-19 (CC50 >100 μ M, IC50 =0.004 μ M)を見出した。本化合物は有望なリード化合物になる可能性があり、更なる薬剤開発に重要な情報を提供する点で学術的および社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We designed, synthesized, and identified novel HBV capsid composition-inhibiting compounds, and determined 50% inhibitory concentration (IC50) values and 50% cytotoxicity concentration (CC50) values. A compound GRL-07-19 (CC50 = 27 μ M, IC50 = 0.007 μ M), which has a selectivity index comparable to a previously reported compound/GLS4 (IC50 = 0.015 μ M; CC50 = 55 μ M), and GRL-12-19 (CC50> 100 μ M, IC50 = 0.004 μ M) were identified.

研究分野：感染症内科学、血液内科学

キーワード：HBV 慢性B型肝炎 薬剤耐性HBV変異株 HBVキャプシド阻害剤 新規抗HBV剤の開発

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染に起因する慢性 B 型肝炎 (CHB) の予後は、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTIs) が化学療法として標準的に用いられるようになり著しく改善した。しかし、生涯の服薬が必要となる CHB 治療においては、薬剤耐性 HBV 変異株の出現や腎障害などの副作用が問題となっており、更に強力な活性を發揮し、かつ副作用が軽微、あるいは皆無である NRTIs 及びそれらとは異なるクラスの新規薬剤の開発が将来にわたっての多剤併用療法の可能性の見地からも極めて重要である。HBV のキャプシド構成阻害剤 (Capsid assembly inhibitors: CAIs) は、感染性 HBV 粒子と HBV-RNA の細胞外への遊出抑制、肝細胞内での cccDNA の「補充」を阻止し、cccDNA の転写活性化を阻害することから、NRTIs との併用療法により現在よりも更に強力な抗 HBV 効果を發揮し著しい HBV コピー数の減少をもたらすと考えられているが、耐性 HBV 変異株の早期出現や強度・安定性などの課題が山積しており CAIs の臨床応用は困難を極めている。

2. 研究の目的

CAI 耐性 HBV 変異株にも強力な、HBV の耐性発現に抵抗し、かつ長時間作用型のハロゲン化 CAIs の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、研究代表者(満屋)が、Arun K. Ghosh 教授 (米国 Purdue 大学) と、Debananda Das 博士 (米国 NIH) らの研究協力のもと実施する。

1 年度目 (2020 年度): 既存の CAIs より強力な活性を發揮し、長時間作用型の新規化合物のデザイン・合成を協力者 (Ghosh) と連携して進める。新規に合成した化合物は、肝癌由来細胞株 (HepG2 や Huh7 など) や HBV 持続感染細胞株 (HepG2. 2. 15 など) を用いた抗ウイルス活性試験および細胞毒性試験を、リアルタイム PCR や MTT 法により実施し IC₅₀ (ウイルス複製を 50% 阻害する濃度) と CC₅₀ (50% の細胞に傷害を呈する濃度) を決定しつつ、再デザイン・合成を継続して有望化合物を同定する。有望化合物を同定した場合は、ヒト肝キメラマウス (PXB マウス) 由来の新鮮ヒト肝細胞 (PXB 細胞) を用いた HBV 感染実験による活性評価、加えて一過性に感染性 HBV を遺伝子導入した細胞株等を用いてウェスタン・サザンブロットティングなどによる作用機序解析を実施、さらにコンピュータモデリングなどによる構造解析を協力者 (Das) と連携して進める。得られた情報を元に、より強力な新規化合物のデザイン・合成・活性評価・最適化や構造解析を各協力者らと連携して強力に推進する。

2 年度目 (2021 年度): より強力な活性を示す新規化合物のデザイン・合成・活性評価・最適化を継続しつつ、有望な化合物については薬剤耐性 HBV 株を使用し、サザンブロットティングなどによる活性評価、加えて各種毒性評価へと進める。さらに、極めて有望な化合物については HBV 感染 PXB マウスを用いた in vivo 活性評価や、小動物を用いた薬物動態 (PK) 試験へと進める。

4. 研究成果

令和 2 年度 (2020 年度) は新規 HBV キャプシド構成阻害化合物のデザイン・合成・活性評価を開始した。具体的な成果として、新規化合物 20 種類の合成と CC₅₀ 値 (50% の細胞に傷害を呈する濃度) 及び IC₅₀ 値 (ウイルス複製を 50% 阻害する濃度) を決定した。結果を以下に示す。

GRL-01-19 (CC₅₀=31 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-02-19 (CC₅₀=27 μM, IC₅₀=0.018 μM); GRL-03-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-04-19 (CC₅₀=47 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-05-19 (CC₅₀=41 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-06-19 (CC₅₀=29 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-07-19 (CC₅₀=27 μM, IC₅₀=0.007 μM); GRL-08-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-09-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-11-19 (CC₅₀=56 μM, IC₅₀=0.1 μM); GRL-12-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀=0.004 μM); GRL-13-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-14-19 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-15-19 (CC₅₀=58 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-16-19 (CC₅₀=57 μM, IC₅₀>1 μM); 01-20 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-02-20 (CC₅₀=65 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-03-20 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-06-20 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM); GRL-07-20 (CC₅₀>100 μM, IC₅₀>1 μM)。これらの結果から更に再デザイン・合成を継続して有望化合物の同定を進めた。

令和 3 年度 (2021 年度) は令和 2 年度 (2020 年度) に引き続き、より強力な活性を示す新規化合物のデザイン・合成を継続し、新規 HBV キャプシド構成阻害化合物の活性評価を実施した。一方で令和 2 年度までに評価を行なった新規化合物の中で最も抗ウイルス効果が優れていた GRL-

12-19 ($CC_{50} > 100 \mu M$, $IC_{50} = 0.004 \mu M$) について、我々が既に同定している核酸アナログ *E*-CFCP (Higashi-Kuwata N. and Mitsuya H. et al. J Hepatol 74:1075-1086, 2021) との併用で抗ウイルス活性評価を実施し、NRTIs との併用療法の可能性を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------