

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of
New Drugs for Hepatitis B
- 研究開発課題名 : (日本語) B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発
(英語) Research and development of novel agents for therapy of HBV infection
- 研究開発担当者 (日本語) 熊本大学 医学部附属病院 特別招聘教授 満屋裕明
所属 役職 氏名 : (英語) Hiroaki Mitsuya, Distinguished Guest Professor,
Kumamoto University Hospital
- 実施期間 : 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 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
開発課題名 : 動態解析
(英語) Evaluation of new candidate anti-HBV compounds in humans and the analysis of
the wild/mutant HBV genome dynamics
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人山梨大学 大学院総合研究部 第一内科・教授 榎本 信幸
所属 役職 氏名 : (英語) Nobuyuki Enomoto, M.D., PhD., Professor, First Department of Internal Medicine,
Graduate School of Medical and Engineering Science, University of Yamanashi
- 分担研究 (日本語) B型肝炎ウイルス逆転写酵素活性を強力に阻害する新規核酸誘導体の
開発課題名 : 合成研究
(英語) Synthesis of novel nucleoside derivatives and evaluation of its anti-HBV activity
- 研究開発分担者 (日本語) 日本薬科大学 薬学部 教授 原口一広
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Pharmaceutical Sciences, Nihon Pharmaceutical University,
Professor, Kazuhiro Haraguchi

分 担 研 究 (日本語) HBV 逆転写酵素の立体構造情報取得を目指す研究

開 発 課 題 名 : (英 語) Research for obtaining structural information on HBV reverse transcriptase

研究開発分担者 (日本語) 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門／主任研究員／安武義晃

所属 役職 氏名 : (英 語) Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)／Senior Researcher／Yoshiaki Yasutake

II. 成果の概要（総括研究報告）

(1) 抗 HBV 活性を有する多数の新規核酸アナログ、特に強力な抗 HBV 活性を有する CAdA/CdG の同定：
抗 HBV 活性を高感度で検出するアッセイ系を確立、entecavir (ETV) など既存の抗 HBV 薬とは基本骨格の異なるユニークな構造を有する薬剤の開発と活性評価を続けた。研究開発代表者（満屋）のグループは過去に抗 HIV 薬の候補として合成された 100 種類以上の化合物を有しており、まずこれらの抗 HBV 活性評価を行い、その中の約 40 種類の化合物が抗 HBV 活性を有していることを確認した。結晶構造解析を含むこれまでの構造学的検討により、HIV の RT の活性部位の構造は HBV の RT の構造とかなり異なることが推察されているが、今回、抗 HIV 薬候補化合物の中に抗 HBV 活性を持つものが多数存在したことから、抗 HIV 薬候補化合物の構造を改変することで、抗 HBV 活性を増強させることが可能という着想を得た。そこで満屋らが日本国内の企業との共同研究で初期開発に成功、現在抗 HIV 薬として米国メルク社に導出、臨床試験段階にある 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591) に着目、EFdA はその強力な抗 HIV 活性 (IC_{50} : 0.3 nM) に比して抗 HBV 活性は軽微 (IC_{50} : 200 nM) であったが、糖の 4' 位の構造の optimization (4 位にシアノ基を付加) により新規の化合物：CAdA (4'-cyano-2-amino-2'-deoxyadenosine)、および CdG (4'-cyano-2'-deoxyguanosine) を同定した。これらは親化合物である EFdA と同等の抗 HIV 活性 (IC_{50} : 0.4 nM) を維持しながら、その抗 HBV 活性は極めて強力で、 IC_{50} 値で ETV と同等 (IC_{50} : 0.4 nM) の抗 HBV 活性を有することが明らかとなった。さらに分担研究者である田中靖人教授のグループ（名古屋市立大学 大学院医学研究科 病態医科学 ウイルス学分野）との共同研究により、CAdA と CdG は ETV 耐性 HBV (HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V})、および TDF (テノフォビル) と交差耐性を示す ADF 耐性 HBV (HBV_{ADF-R}^{A181T/N236T}) に対しても強力な抗 HBV 活性を発揮することをサザンブロット法で明らかにした。また感染ヒト肝細胞移植キメラマウスへの 2 週間の経口投与では、ETV は ETV 耐性 HBV に対して血清ウイルスの抑制を示さなかったが CAdA と CdG はウイルス血症を有意に減少させた。さらに 2 週間の CAdA/CdG 投与は明らかな体重減少や血清ヒトアルブミン値の減少を起さなかった。

(2) 野生株および耐性株への抗 HBV 活性を保持しつつ細胞毒性を軽減させた新規化合物の開発：
CAdA/CdG は強力な抗 HBV 活性を有していたが ETV に比して細胞毒性が強いことが分かった。そこで ETV より毒性が低く CAdA/CdG と同様に強力、かつ ETV 耐性 HBV にも活性を維持した化合物の探索を目的に CAdA/CdG を中心としたリード化合物の最適化 (optimization) を進め各合成グループとの連携により複数の候補化合物を合成、それらの HBV 活性評価および毒性などの各種プロフィールの解析を行い CAdA/CdG と共通の基本骨格 (4'-cyano) を有し、purine (adenosine) の構造のみを改変した SK14-276 と YMS15002 は HBV, HIV に対する活性を維持したまま、肝細胞由来の細胞株に対する毒性を大きく改善させることに成功した。しかしながらこれらの化合物はいずれもマウスへの中等量投与 (1mg/kg) でマウスが死亡、in vivo レベルでの毒性が高いことが判明した。これらのデータを元に構造と活性・毒性の関連についての更なる検討を行い、化合物の構造改変を進め、良好な活性と各種細胞株・動物モデルに対する毒性の軽減の両立に専心し SK15-146 および YMS15042 の開発に成功した。特に YMS15042 は adenosine の 7 位の窒素原子を炭素原子に置換、さらに同炭素原子に F (フッ素) を付加することにより活性と毒性プロフィール両方の改善に成功しているが、これは同じく adenosine に F を付加することにより毒性を軽減させることに成功した EFdA の知見と併せて今後の化合物設計に非常に有用な手段になり得るものと考えられた。

(3) HBV 野生株および耐性株に対して強力な抗 HBV 活性・低い細胞毒性を示し、かつ少ない投与回数（週 1 回投与など）で活性を維持できる新規抗 HBV 薬の開発に向けた研究の進展： 本研究班での開発の中心テーマである核酸アナログ（逆転写酵素阻害剤）は上述の通り、HIV 感染症/AIDS の治療でも重要な薬剤として開発が進められてきたが、最近では強力・低毒性（耐性化しにくい・副作用が

少ない)であるのみならず、より投与回数が少なくて済む薬剤の開発が服用者の QOL 向上のために望まれている。本研究班で開発された複数の有望な抗 HBV 薬のリード化合物となった EFdA/MK8591 は前述の通り、現在米国にて抗 HIV 薬として臨床試験が行われているが、その臨床試験で示された優れた薬物動態と強力な抗ウイルス効果により、QW (週 1 回) 経口投与、もしくは徐放性の剤形を用いることで数ヶ月おき、又は半年から 1 年に 1 度の投与による治療が可能とする臨床試験の結果が報告されている (CROI: Boston, MA, 2016)。我々は極く最近、ETV より毒性が低く HBV 野生株において ETV と同等もしくはより強い抗 HBV 効果を発揮し、かつ ETV 耐性 HBV にも活性を維持する新規化合物 CFCP の合成に成功した。CFCP は EFdA と同様フッ素を含む構造となっており、さらに動物モデルでも一定期間の投与の後、投与を中断しても長期間に亘り抗 HBV 活性を持続するというデータを得ていることから、本新規化合物の開発により EFdA のように長期間効果を発揮し、少ない服用回数 (週 1 回投与など) での治療が可能となる可能性が期待されている。今後は CFCP 等薬剤候補化合物の吸収・分布・代謝・排泄を始めとした薬物動態特性を明らかにするために動物モデルと薬理学的解析手法を駆使した解析を進める。

(4) 候補化合物の作用メカニズムの基礎的・臨床的解析: 本研究班で開発された候補薬のターゲットである HBV-RT は現段階では結晶構造が得られておらずその構造学的解析研究は進んでいない。これらの情報を得ることはより構造学的エビデンスに基づいた薬物の設計・開発のために必要不可欠となるために、本研究班でも HBV-RT の立体構造情報、特に活性部位 (薬剤結合部位) の詳細な立体構造情報を得ることを目的として研究を進めてきた。研究期間の前半では多種多様な発現宿主、酵素の断片化、様々な因子との共発現などによる可溶性向上クローンの取得、リフォールディング等の取組みを行ってきたが、HBV-RT タンパクの安定発現取得を実現できなかった。一方で HBV-RT と類似の活性部位構造を持つ HIV-1-RT の HBV-RT 型変異体 (キメラ酵素) の結晶構造解析を進め、一部の変異体については結晶化に成功した。しかし、最終的に HBV-RT タンパクの安定した発現・取得が困難であったため、完全な HBV-RT の結晶構造の解明には至らなかった。

他方、新規抗 HBV 薬治療に関する臨床的解析として、HBV 治療の現状についての情報収集・解析を行い、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかにする検討を行った。血液保存検体あるいは肝組織を用いて HBV ゲノム、あるいは対応する宿主遺伝子情報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施行、病態との密接な関連が示唆される HBV の preS 領域の deep sequencing などにより個々の患者内での preS 変異の quasispecies の状態の検討、さらにはウイルスマーカー・宿主ゲノム情報を含む各種パラメータの新規薬剤の治療効果評価系としての意義について検討した。

(5) 前臨床試験並びに第 I/II 相臨床試験に向けた準備、検討: 治療薬候補として合成・開発された新規化合物を用いた前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験を実施するにあたり、臨床試験支援体制を確立・整備した。

(6) 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・解析及びマーケティングリサーチ: 新たに合成された活性を示す化合物について、逐次 SciFinder ソフトによる構造式検索を実施し、新規化合物の中から、特許 3 件を出願すると共に探索的非臨床試験及び前臨床試験体制を確立・整備した。

1. Identification of novel nucleic acid analogs with potent anti-HBV activity.

The nearest relatives of HBV-reverse transcriptase (RT) include HIV-1-RT and murine leukemia virus (MuLV) RT but with only 25% sequence identity. However, the functionally important amino acid residues as in RT's active sites are highly conserved among the RTs of HBV, HIV-1, and MuLV. In fact, there has been a good (but limited) success in treating HBV infection with nucleoside analog drugs that also show good antiviral activity against HIV-1. In fact, the recent availability of nucleos(t)ide analogues transformed the treatment of chronic hepatitis B virus (HBV) infection,

significantly reducing the replication of HBV in the liver, normalizing blood hepatic enzymes, and improving histology of the liver. Indeed, the treatment of HBV infection with nucleos(t)ides has halted/slowed the progression of liver diseases to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. However, as in the case of HIV-1 treatment, the propensity of HBV to acquire resistance to nucleos(t)ides has been challenging. HBV's development of resistance to nucleos(t)ides leads to loss of efficacy of treatment. Indeed, the acquisition of HBV resistance to lamivudine (3TC), the first nucleoside analog used for treating HBV infection, has occurred in as high as 80 % of 3TC-receiving individuals over 5 years (Tenney, Hapatology 2009). Although the advent of ETV- and tenofovir (TFV)-resistant HBV variants is remarkably low or absent over 5 years of therapy, prior 3TC resistance confer ETV resistance on as high as 43% ETV-receiving individuals over 5 years. TDF is highly efficacious in patients harboring 3TC-resistant HBV; however, its long-term clinical use is associated with a low, albeit significant, risk of kidney injury. Thus, in the present study, we attempted to design, synthesize, and identify novel agents potent against HBV variants resistant to various existing anti-HBV agents including ETV-resistant HBV with no or less adverse effects.

We have recently identified a novel nucleoside analog, 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591), as a potential antiviral agent against human immunodeficiency virus (HIV-1) through collaborative research within Japan. EFdA is presently under clinical trials in the US. The 4'-modified unique structure of EFdA appears to be responsible for its salient features that HIV-1 extremely hardly develops resistance to EFdA and EFdA is apparently devoid of serious adverse effects despite its extremely potent anti-HIV-1 activity. Our findings that the 4'-modification apparently confers unique features on certain nucleoside analogs prompted us to design, synthesize, and identify novel 4'-modified nucleos(t)ide analogues as potential therapeutic candidate agents for HBV infection that are effective against both wild-type YBV (HBV^{WT}) and drug-resistant HBV strains and do not permit or delay the emergence of HBV variants resistant to the very agents.

Over the last 5-years, we examined approximately 150 strong newly generated novel nucleoside analogs plus over 100 novel compounds that had been synthesized as potential anti-HIV agents in the past 30 years in the assay systems for identifying anti-HBV activity with high sensitivity/reproducibility, focusing on agents with unique structures different from currently available anti-HBV drug such as entecavir (ETV). Among such ~250 agents, ~40 compounds were identified to have anti-HBV activity.

EFdA had a very moderate anti-HBV activity (IC₅₀: ~200 nM) compared to its strong anti-HIV activity (IC₅₀: ~0.3 nM), but optimization of the structure at the 4'-position of the sugar (cyano group at the 4-position) resulted in the identification of two lead compounds, 4'-cyano-2-amino-2'-deoxyadenosine (CAaA) and 4'-cyano-2'-deoxyguanosine (CdG). These two agents retain their anti-HIV activity (IC₅₀: 0.4 nM) equivalent to that of the parent agent EFdA, while their anti-HBV activity was also seen to be extremely potent, and their IC₅₀ values were virtually equivalent to that of ETV (IC₅₀: 0.4 nM). Further research by Dr. Tanaka's group (Nagoya City University Graduate School of Medicine) revealed that CAaA and CdG also exhibited potent anti-HBV activity against ETV-resistant HBV (HBV_{ETV-R}^{L180 M/S202G/M204V}) and adefovir (ADF)-resistant HBV (HBV_{ADV-R}^{A181T/N236T}) as well, which showed cross-resistance to TDF using the Southern blotting method. In 2 weeks of oral administration to HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V}-exposed hu-liver-chimeric-uPA+/+SCID+/+ mice, no reduction of serum HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V} viremia was observed; however, both CAaA and CdG significantly decreased HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V} viremia. Over the 2 weeks administration of CAaA or CdG, no significant weight loss or decrease in serum human albumin value was seen.

2. Development of a novel compound with reduced cytotoxicity and anti-HBV activity to wild-type and anti-HBV-drug-resistant HBV strains.

As described above, although CAaA / CdG had potent anti-HBV activity against both wild-type and ETV-resistant HBV strains, they turned out to be substantially cytotoxic in culture compared to ETV, CAaA and CdG were dropped from the line of preclinical studies and we continued our search efforts for potent and less toxic/safer agents were continued. We have more recently designed and synthesized novel compounds, SK15-276 and YMS15002, of which anti-HBV activity against wild-type and ETV-resistant HBV were observed, but both of these compounds were also highly toxic and all the mice receiving 1 mg/kg/day died out. We have subsequently identified novel SK15-146 and YMS-15042. In SK15-146, a cyano group has been added at the 4'-carbon, designated as CMCP. In YMS-15042, the 7-nitrogen atom has been replaced with a carbon and a 7-hydrogen atom has been replaced with a fluorine atom in adenine moiety, carrying a cyano moiety in the 4'-carbon of the ribose. Both CMCP and YMS-15042 are potent against wild-type and ETV-resistant HBV. Efforts to newly design, synthesize, and identify more promising agents are being continued.

3. An attempt to identify novel agents with potent activity against wild-type and various drug-resistant HBV strains and capability of less frequent administration.

Nucleic acid analogs, the main targets for development of anti-HBV agents in this project, have served as a crucial class of therapeutics for HIV-1 infection and AIDS. As described above, EFdA/MK8591, a novel nucleoside HIV-1 RT inhibitor developed by this research group led by Mitsuya, is currently undergoing Phase II clinical trials in the United States, has proved to significantly reduce HIV-1 viremia with at least once-weekly (QW) oral administration in Phase I clinical trial (CROI: Boston, MA, 2016). We have very recently synthesized and identified a novel nucleoside analog, CFCP, which is more potent against wild-type and various drug-resistant HBV strains than ETV. In preliminary data we have thus far generated, CFCP, following being triphosphorylated, appears to persist within hepatocytes much longer. When intragastrically administered over two weeks to HBV-exposed hu-liver-chimeric-uPA+/+SCID+/+ mice, CFCP more potently suppressed HBV^{WT} viremia. More importantly, CFCP also potently suppressed viremia of ETV-resistant HBV_{ETV-R}^{L180 M/S202G/M204V}, while ETV totally failed suppressing HBV_{ETV-R}^{L180 M/S202G/M204V}. More impressively, the viremia suppression by CFCP persisted over weeks following the cessation of CFCP administration. It is possible that

CFCP, as in the case of EFdA, may allow less frequent administration regimens. More detailed PK/PD studies are currently underway.

4. Basic and clinical analysis of the mechanism of action of candidate anti-HBV agents.

No crystallographic information is presently available for HBV-RT. Thus, we have modeled the structure of the active site of HBV-RT, utilizing the actual crystallographic data of HIV-1 complexed with EFdA-TP, collaborating with Prof. Stefan Sarafianos. We are currently studying the structural features of the active site of HBV-RT in relation to CFCP-TP. The reason why no crystallographic data are hardly obtained is that HBV-RT is hardly soluble in solution, taking various measures such as the use of various expression hosts and the fragments of RT, and the co-expression of HBV-RT with various factors, etc.

Another way we have taken is chimeric protein production: certain amino acid(s) derived from HBV-RT is introduced into HIV-1-RT. Certain such chimeric proteins have been successfully crystalized and such structures have been solved. The analysis of mutated HBV strains and the dynamics of such HBV mutants is also underway by analyzing HBV genomes in association with host gene information using preserved liver specimens and blood samples. The deep sequencing of the preS region of HBV, which is suggested to be closely related to the examination of the state of the quasi-species of the preS mutation in individual patients has also been conducted. Furthermore, we investigated the significance of various parameters including virus marker and host genome information as a therapeutic effect evaluation system of new drugs.

5. Preparation and examination for preclinical studies and Phase I/II clinical trials.

For preclinical studies using novel compounds developed as therapeutic candidates and subsequent Phase I/IIa clinical trials, a clinical trial support system has been established, updated, and improved.

6. Analysis of novelty of compounds, marketing research, and establishment/protection of intellectual property/rights.

Efforts have been paid for the protection of all and any possible intellectual rights. Regarding compounds newly synthesized, we continuously conducted a structural formula examination using SciFinder software and such, filed 3 patents, and established/maintained exploratory nonclinical study and preclinical testing system from among new compounds.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 9件)

1. Kumamoto H, Fukano M, Nakano T, Iwagami K, Takeyama C, Kohgo S, Imoto S, Amano M, Kuwata-Higashi N, Aoki M, Abe H, Mitsuya H, Fukuhara K, and Haraguchi K, Diastereoselective Synthesis of 6''-(Z)- and 6''-(E)-Fluoro Analogues of Anti-hepatitis B Virus Agent Entecavir and Its Evaluation of the Activity and Toxicity Profile of the Diastereomers. *J Org Chem*. 2016, 81, 2827-36.
2. Salie ZL, Kirby KA, Michailidis E, Marchand B, Singh K, Rohan LC, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Structuralbasis of HIV inhibition by translocation-defective RT inhibitor 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2016, 113:9274-9.
3. Kumamoto H. Fukano M. Imoto S. Kohgo S. Amano M. Kuwata-Higashi N. Mitsuya H. Haraguchi K. Fukuhara, K. A Novel Entecavir Analogue constructing with spiro[2.4]heptane Core structure In the Aglycon Moiety: its Synthesis and Evaluation for Anti-HBV Activity. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2017, 36, accepted for publication.
4. Ichikawa S, Motosugi U, Enomoto N, Matsuda M, Onishi H. Noninvasive hepatic fibrosis staging using mr elastography: The usefulness of the bayesian prediction method. *J Magn Reson Imaging*. 2016, DOI: 10.1002/jmri.25551.
5. Itakura J, Kurosaki M, Hasebe C, Osaki Y, Joko K, Yagisawa H, Sakita S, Enomoto N, et al. Complex Pattern of Resistance-Associated Substitutions of Hepatitis C Virus after Daclatasvir/Asunaprevir Treatment Failure. *PLoS One*. 2016, 11:e0165339.
6. Komiyama Y, Kurosaki M, Nakanishi H, Takahashi Y, Itakura J, Yasui Y, Tamaki N, Enomoto N, et al.

Prediction of diuretic response to tolvaptan by a simple, readily available spot urine Na/K ratio. PLoS One. 2017, 12:e0174649.

7. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Enomoto N, et al. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. Gastroenterology. 2017, 152:1383-94.
8. Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama M, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Enomoto N, et al. Induction of IFN-lambda3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection. Gut 2016, DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312653.
9. Nakamura, T., Tamura, N., Yasutake, Y. Crystal structure of the HIV-1 reverse transcriptase Q151M mutant. Photon Factory Activity Report. 2016, 33B, pp241.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規核酸アナログ SK15-146 は薬剤耐性 HBV 変異株に対して有効である, 口頭, 林佐奈衣, 前田賢次, 高松悠樹, 向後悟, 鋤田伸好, 村上周子, 尾曲克己, 五十嵐正語, 満屋裕明, 田中靖人, 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 国内.
2. エキソメチレン部位にフッ素原子を有するエンテカビル誘導体の立体選択的合成と抗 HBV 作用の評価、口頭、熊本浩樹、深野実里、中野智彦、岩上啓人、竹山千晶、向後悟、井本修平、天野将之⁴、鋤田（東）伸好、青木学、満屋裕明、福原潔、原口一広、第 26 回抗ウイルス療法研究会、2016/5/13, 国内.
3. 新規 6''-フルオロエンテカビルの立体選択的合成と抗ウイルス作用の評価、口頭、熊本浩樹、深野実里、中野智彦、岩上啓人、竹山千晶、向後悟、井本修平、天野将之、鋤田（東）伸好、青木学、阿部洋、満屋裕明、福原潔、原口一広、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016/11/30, 国内.
4. 5'-ビニル-およびエチニルネプラノシン A 類の合成と抗ウイルス作用の評価、ポスター、熊本浩樹、秋川佳美、井本修平、鋤田伸好、青木学、天野将之、向後悟、満屋裕明、福原潔、原口一広、日本薬学会第 137 年会 2017/3/25, 国内.
5. 4'位にアジド基を有するヌクレオシド誘導体の合成と抗 HBV 活性評価、井本修平、鬼塚健吾、徳田亮、鋤田伸好、青木学、熊本浩樹、天野将之、向後悟、前田賢次、満屋裕明、原口一広、日本薬学会第 137 年会、2017/3/25, 国内.
6. Mapping the region responsible for disease progression in the HBV preS1/S2 genome by deep sequencing
Poster presentation
Yuichiro Suzuki, Shinya Maekawa, Mitsuaki Sato, Masaru Muraoka, Shuya Matsuda, Natsuko Nakakuki, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto,
Nobuyuki Enomoto.
23rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HEPATITIS C VIRUS AND RELATED VIRUSES, Kyoto, Japan 2016 Oct 11-14
7. 「Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase mutants complexed with DNA aptamer」
(ポスター)、安武義晃、田村範子、服部真一郎、林宏典、松田幸樹、前田賢次、満屋裕明、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、2017/03/14、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 時代の証言者, 満屋裕明, 読売新聞, 2016/10/29-2016/12/6(全 27 回)
2. 世界初のエイズ治療薬はこうしてできた～成功と失敗を乗り越えて～, 満屋裕明, AMED 臨床研究フォーラム, 2017/1/28, 国内
3. 話の肖像画, 満屋裕明, 産経新聞, 2017/3/20-2017/3/24(全 5 回)

(4) 特許出願

なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of
New Drugs for Hepatitis B
- 研究開発課題名： (日本語) B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発
(英語) Research and development of novel agents for therapy of HBV infection
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 研究所
難治性ウイルス感染症研究部 レトロウイルス感染症研究室
室長 前田 賢次
(英語) Kenji Maeda, M.D., Ph.D. Chief, Experimental Retrovirology Section,
Dept. of Refractory Viral Infection, National Center for Global
Health and Medicine
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 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
(英語) Study, analysis about the novelty of the innovative drug development
compounds, and examination, analysis of preclinical trial shift
conditions, and study on market research.
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 臨床研究センター
室長 助永 義和
(英語) Yoshikazu Sukenaga, Chief, Center for Clinical Sciences,
National Center for Global Health and Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：満屋 裕明（熊本大学・医学部附属病院・特別招聘教授）総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 4'-Modified NRTIs' Potent Anti-HIV Activity Stems from Strong RT Active Site Binding., ポスター, Takamatsu Y, Das D, Kohgo S, Hattori S, Hayashi H, Matsuda K, Stefan G. Sarafianos SG, Hiroaki Mitsuya H, Maeda K. 2017 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Feb 12-16, 2017, Seattle WA. (国外)
2. 逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発, ポスター, 前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、鎌田伸好、林宏典、Debananda Das、満屋裕明, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/24-26, 鹿児島 (国内)
3. Progress in the therapy for HIV/AIDS: development of molecular-targeting approach for antiretroviral drugs., 口頭, Maeda K, and Mitsuya H., 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar. Oct 31-Nov 2, 2016, Kumamoto (国内)
4. 新規の逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発, 口頭, 前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、鎌田伸好、林宏典、松田幸樹、Debananda Das、Stefan G. Sarafianos、満屋裕明, 白馬シンポジウム in 山梨. 2016/10/7-8, 山梨. (国内)
5. Development of novel nucleoside reverse transcriptase inhibitors active against 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591)-resistant HIV-1s., ポスター, Maeda K, Takamatsu Y, Kohgo S, Das D, Hattori S, Hayashi H, Stefan G. Sarafianos SG, and Mitsuya H., The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 6-9, 2016. Hyogo. (国内)
6. 新規の逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発, 口頭, 前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、鎌田伸好、林宏典、Debananda Das、満屋裕明, 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋 (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
公開を希望しない

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 肝炎等克服実用化研究事業
B型肝炎創薬実用化等研究事業

(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発

(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発担当者 (日本語) 崇城大学 薬学部 教授 小田切 優樹

所属 役職 氏名：(英語) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Professor, Masaki Otagiri

実施期間：平成 24 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) PK/PDの解析と毒性評価に関する研究

開発課題名：(英語) Study on PK / PD analysis and toxicity assessment

研究開発分担者 (日本語) 崇城大学 薬学部 准教授 井本 修平

所属 役職 氏名：(英語) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Shuhei Imoto

分担研究 (日本語) B型肝炎治療薬を目指した新規核酸誘導体の合成

開発課題名：(英語) Design and synthesis of novel nucleoside analogues as potential new anti-HBV agents

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：熊本大学・大学院生命科学研究部・満屋裕明 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. Murata H, Higuchi T, Otagiri M. Oral pharmacokinetics and in-vitro metabolism of metyrapone in male rats. J. Pharm. Pharmacol. 2016, 68(8):970-9.
2. Enokida T, Yamasaki K, Okamoto Y, Taguchi K, Ishiguro T, Maruyama T, Seo H, Otagiri M. Tyrosine411 and Arginine410 of Human Serum Albumin Play an Important Role in the Binding of Sodium 4-Phenylbutyrate to Site II. J. Pharm. Sci. 2016, 105(6):1987-94.
3. Kumamoto H, Fukano M, Nakano T, Iwagami K, Takeyama C, Kohgo S, Imoto S, Amano M, Kuwata-Higashi N, Aoki M, Abe H, Mitsuya H, Fukuhara K, Haraguchi K. Diastereoselective Synthesis of 6''-(Z)- and 6''-(E)-Fluoro Analogues of Anti-hepatitis B Virus

Agent Entecavir and Its Evaluation of the Activity and Toxicity Profile of the Diastereomers. *J. Org. Chem.* 2016, 81(7):2827-2836.

4. Sugimoto R, Watanabe H, Ikegami K, Enoki Y, Imafuku T, Sakaguchi Y, Murata M, Nishida K, Miyamura S, Ishima Y, Tanaka M, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Down-regulation of ABCG2, a urate exporter, by parathyroid hormone enhances urate accumulation in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2017, 91(3):658-670.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規 6" - フルオロエンテカビルの立体選択的合成と抗ウイルス作用の評価, 熊本 浩樹, 深野実里, 中野 智彦, 岩上 啓人, 竹山 千晶, 向後 悟, 井本 修平, 天野 将之, 鎌田 (東) 伸好, 青木 学, 満屋 裕明, 福原 潔, 原口 一広, ポスター, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2016/11, 国内.
2. 5'-ビニルおよびエチニルネプラノシン A 類の合成と抗ウイルス作用の評価, 熊本 浩樹, 秋川佳美, 井本 修平, 鎌田 伸好, 青木 学, 天野 将之, 向後 悟, 満屋 裕明, 福原 潔, 原口 一広, ポスター, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3, 国内.
3. 4'位にアジド基を有するヌクレオシド誘導体の合成と抗 HBV 活性評価, 井本 修平, 鬼塚 健吾, 徳田 亮, 鎌田(東)伸好, 青木 学, 熊本 浩樹, 天野 将之, 向後 悟, 前田 賢次, 満屋 裕明, 原口一広, ポスター, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3, 国内.
4. B 型肝炎ウイルス新規候補治療薬の単独投与及びエンテカビルと併用投与時の体内動態解析, 口頭, 橋本麻衣, 田口和明, 石黒貴子, 山崎啓之, 向後悟, 満屋裕明, 小田切優樹, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/24-27, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業 B型肝炎創薬実用化等研究事業

(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発

(英語) Research and development of novel agents for therapy of HBV infection

研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授 田中 靖人

所属 役職 氏名：(英語) Professor, Yasuhito Tanaka, Public University Corporation Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences Sciences

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 新規抗HBV薬の1次・2次評価

開発課題名：(英語) The first/second evaluation of new anti-HBV drugs

分担研究 (日本語) 可溶性HBVポリメラーゼの立体構造解析

開発課題名：(英語) Three-dimensional structure analysis of the soluble HBV polymerase

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教 尾曲 克己

所属 役職 氏名：(英語) Assistant Professor, Katsumi Omagari, Public University Corporation Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

II. 成果の概要(総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：熊本大学・医学部附属病院・満屋 裕明 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌2件、国際誌0件）

1. 林佐奈衣, 村上周子, 尾曲克己, 松居剛志, 飯尾悦子, 五十川正記, 渡邊綱正, 狩野吉康, 田中靖人. B型肝炎治療不応例における新規 Entecavir 耐性変異 (rtA186T) の同定. NAGOYA MEDICAL JOURNAL. 2016, 55(1), 35-42.
2. 林佐奈衣, 高松悠樹, 前田賢次, 村上周子, 尾曲克己, 松居剛志, 五十川正記, 渡邊綱正, 狩野吉康, 向後悟, 満屋裕明, 田中靖人. 新規核酸アナログ 4'-C-cyano-2-amino-2'-deoxyadenosine, 4'-C-cyano-2'-deoxyguanosine は薬剤耐性 B 型肝炎ウイルス変異株に対して有効である. 肝臓. 2016, 57(6), 299-301.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規核酸アナログ SK15-146 は薬剤耐性 HBV 変異株に対して有効である, 口頭, 林佐奈衣, 前田賢次, 高松悠樹, 向後悟, 鎌田伸好, 村上周子, 尾曲克己, 五十川正記, 満屋裕明, 田中靖人, 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 名古屋市立大学桜山キャンパス, 愛知県名古屋市, 2016/5/14, 国内.
2. Novel 4'-modified nucleoside analogs, CAdA and CdG, strongly suppress the replication of wild-type hepatitis B virus and drug-resistant mutants, Poster, Hayashi S, Takamatsu Y, Maeda K, Murakami S, Omagari K, Matsui T, Isogawa M, Watanabe T, Karino Y, Kohgo S, Mitsuya H, Tanaka Y, 2016 International HBV Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Yonsei University, Korea Seoul, 2016/9/21, 国外.
3. Crystallization of Hepatitis B virus core protein of genotype C and F (B 型肝炎ウイルス・ジェノタイプ C, F のコア蛋白質の結晶化), Poster, Omagari K, Tanaka Y, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市, 2016/10/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New
Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発
(英語) Research and development of novel agents for therapy of HBV infection

研究開発担当者 (日本語) 満屋 裕明 熊本大学・医学部附属病院 特別招聘教授
所属 役職 氏名： (英語) Hiroaki Mitsuya, Distinguished Guest Professor, Kumamoto University
Hospital

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 逆転写酵素阻害剤等のスクリーニング法開発・耐性ウイルスに対効果判定
開発課題名： (英語) Development of screening and reverse transcriptase inhibitors for
hepatitis B virus.

研究開発分担者 (日本語) 児玉 栄一 東北大学 災害科学国際研究所 教授
所属 役職 氏名： (英語) Eiichi Kodama, Professor, Tohoku University International Research
Institute of Disaster Science.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：熊本大学 医学部附属病院 満屋裕明
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Salie ZL, Kirby KA, Michailidis E, Marchand B, Singh K, Rohan LC, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Structural basis of HIV inhibition by translocation-defective RT inhibitor 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine(EFdA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 16;113(33):9274-9.
2. Watanabe M, Hashimoto K, Abe Y, Kodama EN, Nabika R, Oishi S, Ohara S, Sato M, Kawasaki Y, Fujii N, Hosoya M. A Novel Peptide Derived from the Fusion Protein

Heptad Repeat Inhibits Replication of Subacute Sclerosing Panencephalitis Virus In Vitro and In Vivo. PLoS One. 2016 Sep 9;11(9):e0162823.

3. Connell BJ, Chang SY, Prakash E, Yousfi R, Mohan V, Posch W, Wilflingseder D, Moog C, Kodama EN, Clayette P, Lortat-Jacob H. A Cinnamon-Derived Procyanidin Compound Displays Anti-HIV-1 Activity by Blocking Heparan Sulfate- and Co-Receptor- Binding Sites on gp120 and Reverses T Cell Exhaustion via Impeding Tim-3 and PD-1 Upregulation. PLoS One. 2016 Oct 27;11(10):e0165386.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Structural Basis of Inhibition and Resistance Mechanism to EFdA, a highly potent NRTI. 口頭, Zhe Li, Karen A. Kirby, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Eiichi N. Kodama, Lisa C. Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings Retroviruses 2016/5/ 23 - 28, 国外 (Cold Spring Harbor, NY) .
2. ジョロウグモ内生糸状菌のポストゲノム型天然物探索, 口頭, 浅井禎吾, 塚田健人, 森下陽平, 伊藤史織, 網谷雄志, 岡崎裕亮, 児玉栄一, 大島吉輝, 第 58 回天然物有機化合物討論会, 2016/9/15, 国内 (仙台) .

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし