

課題番号 : 29指2008
研究課題名 : 新規サイトメガロウイルス (CMV) 治療薬の開発
主任研究者名 : 前田 賢次 国立国際医療研究センター 研究所 室長
分担研究者名 : 井本 修平 崇城大学 薬学部 准教授
キーワード : CMV・サイトメガロウイルス感染症・逆転写酵素阻害剤・免疫不全・抗ウイルス薬

研究成果 :

(背景・目的) CMV (サイトメガロウイルス) は先天性 CMV 感染症として問題となる場合を除き、ほとんどが不顕性感染の形で生涯その宿主に潜伏感染する。しかし、近年では、エイズなどの免疫不全をきたす疾患、さらには造血器腫瘍など各種の癌に対する強力な免疫抑制を伴う移植治療の拡大により、成人における CMV 感染症のリスクは高くなっている。その一方で、現在使用可能な CMV 感染症に対する治療薬は数が少なく、しかもそれぞれが毒性、耐性出現などの問題を抱えている。本研究では、独自の核酸系化合物のライブラリーから CMV 阻害リード化合物の同定をはかり、構造の最適化 (新規化合物合成) を行うことにより、有望な医薬品候補化合物を発見し、サイトメガロウイルス感染症に対する新しい治療薬開発を目指す。

(方法) CMV とウイルスに感染する細胞 (MRC-5) を用いた薬剤評価系の構築を行なった。CMV 感染細胞でのウイルス増殖および薬剤による増殖阻害能を MTT 法および QPCR 法にて評価するシステムを樹立、ライブラリーの 100 種類以上の候補化合物の抗 CMV 活性の評価を行なった。さらに抗 CMV 活性を有するリード化合物については最適化 (構造の optimization) による新規化合物の合成を進めた。

(結果・考察) 現在までに既に 2 系統のリード化合物の同定に成功、それらの詳細な抗 CMV 活性評価と薬剤の特性解析を進めた。そのうちの一つは強力な抗 HIV/HBV 活性を有する 4'-modified NRTIs (核酸系逆転写酵素阻害剤) である CAdA・CdG (Takamatsu et al. *Hepatology* 62:1024-36, 2015 etc.) と類似した骨格を有する一連の化合物で、HIV 感染症治療薬として現在臨床試験段階にある EFdA/MK8591 もこのグループに含まれる。EFdA や CAdA・CdG に関しては明らかな抗 CMV 活性を認めなかったが、HIV・HBV に対してほとんど活性を有しなかった類似体の一部のグループに抗 CMV 活性が確認された。その中の YMS14045 という化合物は IC50 が 10nM と非常に強力な抗 CMV 活性を示したが毒性も比較的強かった (CC50 : 4 μ M) ため、4' 位や炭素環の側鎖を種々に変更した新規化合物の合成を行い、より毒性の低い化合物の開発を進めた。一方で、これらに比べてやや活性 (IC50) は劣るものの、in vitro で細胞に対して毒性をほとんど示さない、全く異なる基本骨格を有する別のリード化合物 (HKT2-1) の同定にも成功している。こちらのリード化合物は前述の 4'-modified NRTIs のような 5 炭糖とは異なる構造を有しており、薬剤活性・耐性プロファイルが全く異なると考えられている。現在、本化合物に対する詳細な活性評価を進めている。今までの解析で、これらの化合物は既存の抗 CMV 薬である GCV (ガンシクロビル) と同様に、CMV の有するリン酸化酵素 (UL97) によってリン酸化 (活性化体) されるため非感染細胞に対する毒性が少ないことが考えられている。今後はこの両系統の開発を継続するとともに、これらの利点を併せ持つような新しい構造と特性を有する新規の化合物の開発を図り、より安全かつ強力な新しい CMV 治療薬の創製を目指す。

Subject No. : 29a2008
Title : Study for the development of novel anti-cytomegalovirus (CMV) drugs
Researchers : Kenji Maeda (Research Institute, NCGM)
Shuhei Imoto (Dept. of Pharmacy, Sojo University)
Key word : CMV, cytomegalovirus, reverse transcriptase inhibitors, immunodeficiency, antiviral drugs

Abstract

(Background)

Severe cytomegalovirus (CMV) infection occurs in immunocompromised patients such as HIV-1-infected individuals and hematopoietic tumor patients. In addition, risk of severe CMV infection in adults is currently increasing due to the growing number of transplantation for malignant diseases. However, only few therapeutic agents for CMV infections are currently available, and each of them has problems such as toxicity. In this study, we aim to develop new therapeutics against CMV infection.

(Method)

We established a drug evaluation system with CMV-infected cells (MRC-5). The inhibitory effect of drugs was measured by MTT method and QPCR method. Using the assay system, over 100 compounds in a chemical library of nucleic acid analogs were screened and candidates as lead compounds for anti-CMV drugs were selected. Structural optimization and synthesis for new compounds that have greater activity with less toxicity was simultaneously conducted.

(Results and Discussion)

In the first year of the study, we have successfully identified lead compounds that belong to two different groups. One is 4'-modified NRTIs (nucleic acid reverse transcriptase inhibitors) related to CAdA and CdG with potent anti-HIV and HBV activity (Takamatsu et al. Hepatology 62: 1024-36, 2015). EFdA/MK 8591, which is currently under clinical trials as a new anti-HIV drug, also belongs to the group. Although no anti-CMV activity was observed for EFdA, CAdA, and CdG, we found that some of other 4'-modified NRTIs possessed potent anti-CMV activity (IC₅₀: ~10 nM). However, they also had somewhat strong toxicity, and thus structural optimization toward higher activity with less toxicity is currently ongoing.

On the other hand, we also identified another lead compound (HKT2-1) with a unique core structure and activity profile. Our preliminary data suggests that the compound is likely to be phosphorylated (activated) by the UL97 of CMV as well as existing anti-CMV drug GCV (ganciclovir), and thus it is less toxic to uninfected cells.

In the future we will continue to develop these two different anti-CMV drug candidates. In addition, we will consider to develop novel lead compounds that have combined advantages of these two different groups.

(研究課題名) 新規サイトメガロウイルス (CMV)治療薬の開発

前田 賢次 (研究代表者) NCGM研究所

近年、エイズなどの免疫不全をきたす疾患、さらには悪性腫瘍に対する強力な免疫抑制を伴う移植治療の拡大により、成人における重症CMV感染症のリスクは高くなっている

研究グループの有する膨大な核酸アナログライブラリー

強力な抗HIV薬の開発 (EFdA:臨床試験中)

強力な抗HBV薬の開発

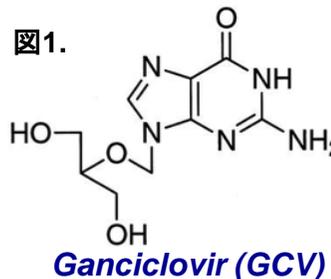


一連の核酸アナログライブラリーから抗CMV活性を有する新規リード化合物の同定に成功した



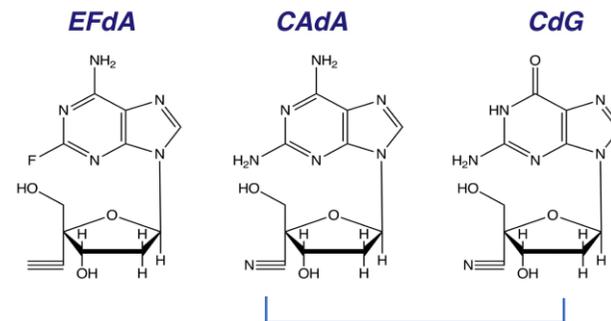
(今後の研究計画)

1. 強力な抗CMV活性を有する新規核酸系CMV治療薬の開発
(活性評価 [前田]、新規化合物合成 [分担：井本])
2. 活性を有する化合物の活性・毒性発現機序の解析
(よりCMV特異的に作用する新しい阻害薬の設計・開発)



GCVは臨床で用いられているCMV感染症に有効な薬剤であるが、治療不応例の出現や骨髄抑制などの副作用が問題となっている

図2.



HIVに強力な活性を有する
(臨床試験中)

HIV・HBVの両方に強力な
活性を有する

(Takamatsu & Maeda. Hepatology 2015)

今回、これらの類似体(4'-修飾 核酸系逆転写酵素阻害剤)に抗CMV活性を有する化合物が含まれることを見出した

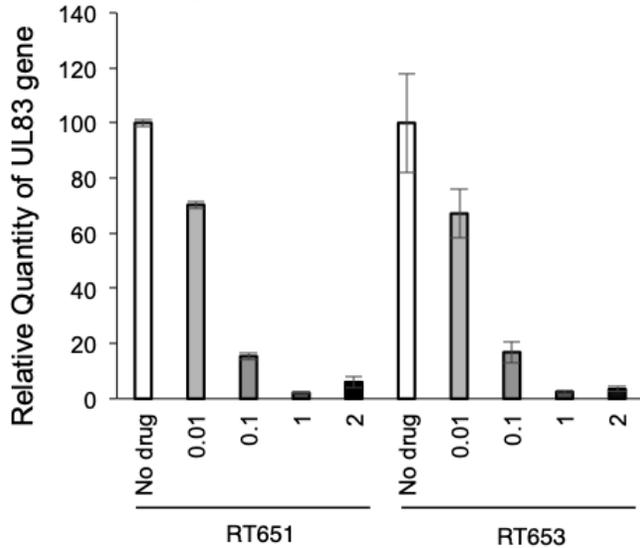
図3.

抗CMV活性と細胞毒性

Drug	IC ₅₀ (μM) (q-PCR)	CC ₅₀ (μM)
GCV	0.5	>100
ERS-RT651	0.02	1.1
ERS-RT653	0.02	4.3
YMS15045	0.01	4.0
HKT2-1	0.2	>100

図4.

感染細胞からのCMV産生



開発された化合物は細胞からのCMV産生を強力に抑制する

図5.

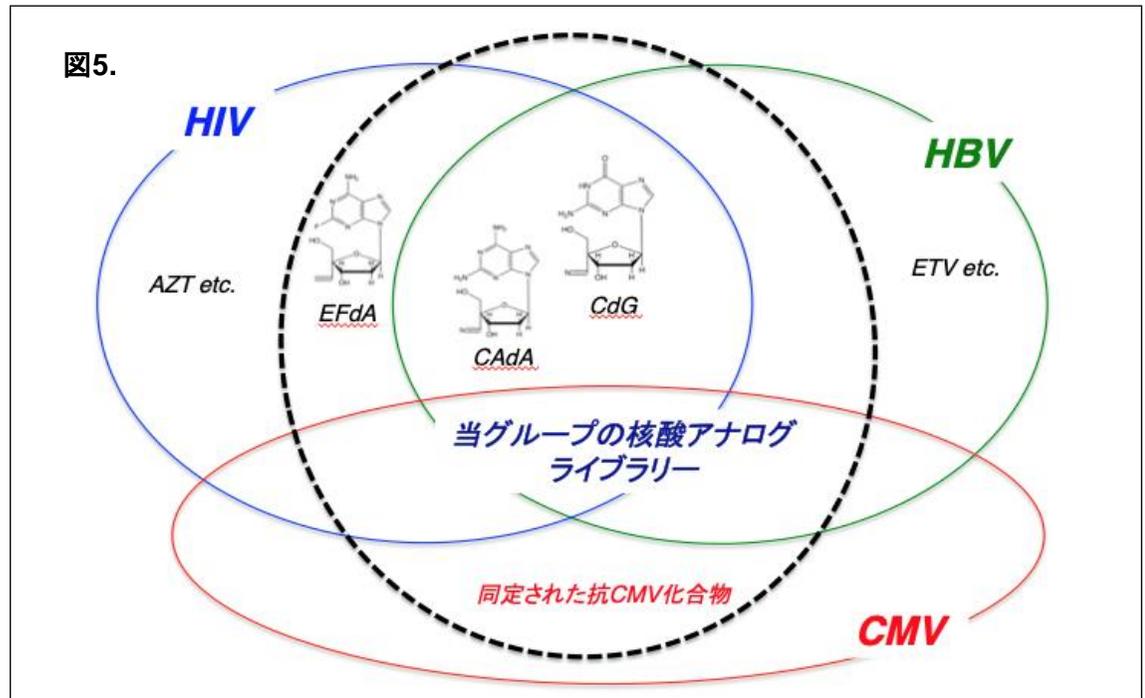
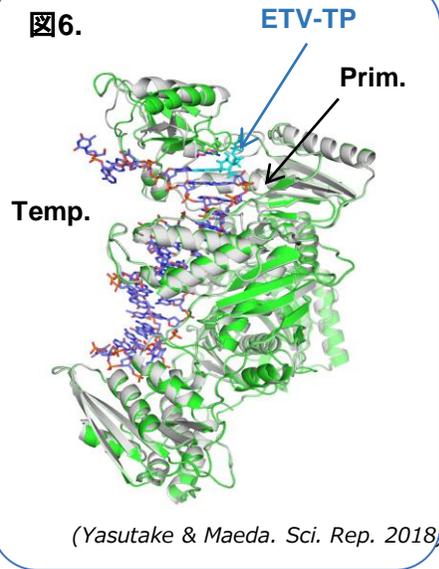


図6.



本研究で開発された化合物は2系統の化合物から成り、いずれも既存の抗CMV薬(GCV)と同等か、はるかに強力な活性を有する。(図3・4)

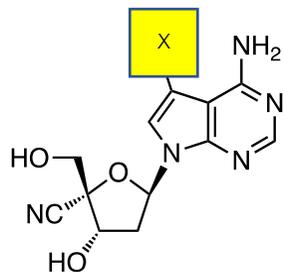
4'修飾基を有する化合物(YMS15045など)はHIVやHBVに活性を有する化合物と極めて類似した構造を有している(図5). 一方で、HKT2-1は全く異なる基本骨格を有しており、活性化メカニズムなども異なることが考えられている.

今後、HIV (図6)・HBV (いずれも逆転写酵素)とCMV (DNAポリメラーゼ)に対しての各種の化合物の活性(親和性)スペクトラムの違いを構造学的に解析する研究も進め、より構造学的エビデンスに基づいた新しいCMV治療薬の創製を図る.

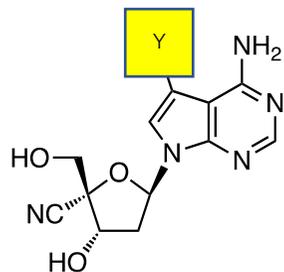
(分担研究課題) 抗CMV活性を有する新規核酸アナログの合成

井本 修平 (分担研究者) 崇城大学薬学部

1. 4'置換デアザプリンヌクレオシドの合成



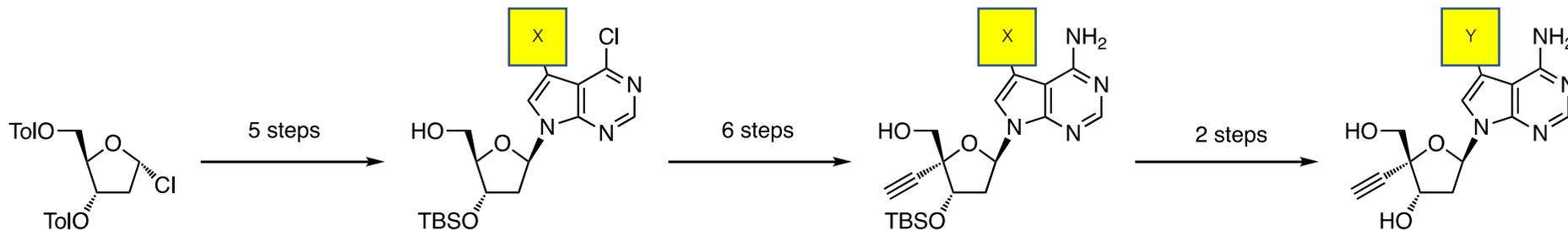
YMS15020



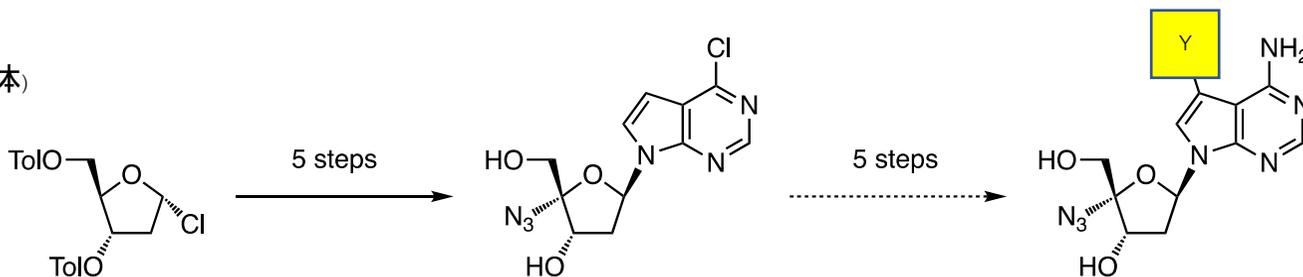
YMS15045

抗HBV薬開発過程で合成され、抗CMV活性が確認された4'シアノ-7-置換デアザプリン誘導体 (YMS15020/15045) をもとに、新規ヌクレオシドを設計・合成し、構造最適化を図った。

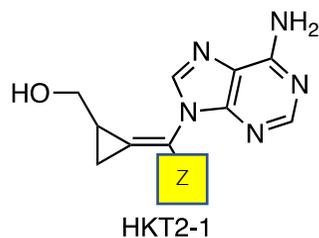
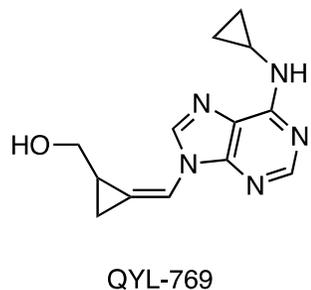
(例1: 4'エチニル誘導体)



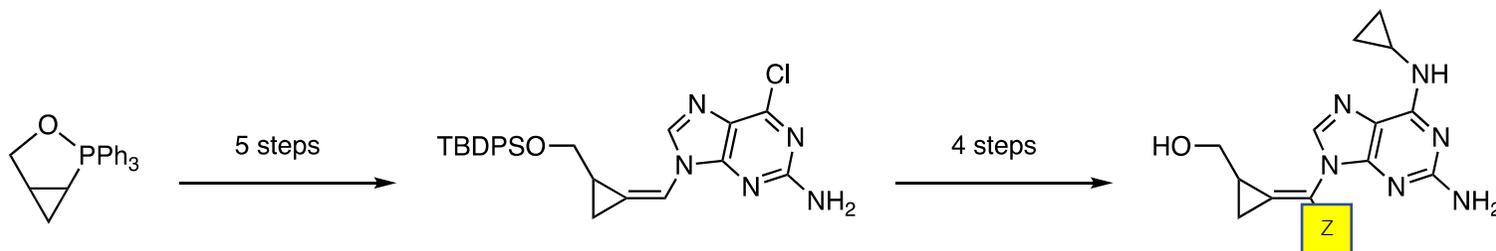
(例2: 4'アジド誘導体)



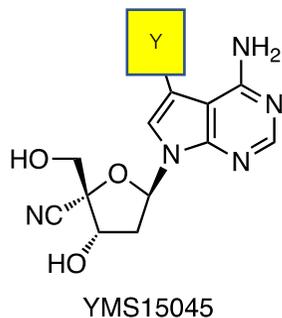
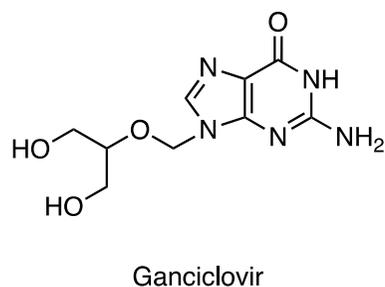
2. 炭素環ヌクレオシドの合成



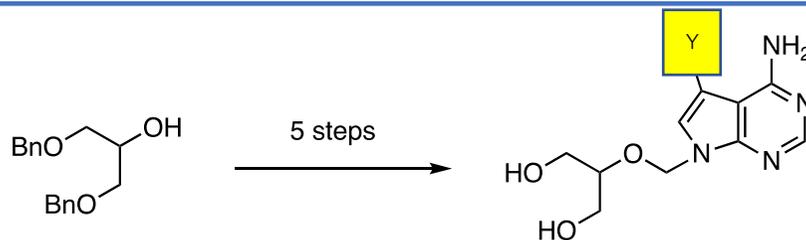
抗CMV活性が報告されているQYL-769および、満屋グループの化合物ライブラリから抗CMV活性が見出されたHKT2-1の骨格をもとに、新規炭素環ヌクレオシドの設計と合成を行なった。



3. アシクロ型ヌクレオシドの合成



CMV治療薬であるガンシクロビルおよび、先に挙げたYMS15045の特徴的な骨格をもとに、新規アシクロ型ヌクレオシドを設計し、合成を行なった。



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指2008

研究課題名： 新規サイトメガロウイルス (CMV) 治療薬の開発

主任研究者名： 前田 賢次

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Activity and structural analysis of GRL-117C: a novel small molecule CCR5 inhibitor active against R5-tropic HIV-1s.	Nakata H, <u>Maeda K</u> , Das D, Chang SB, Matsuda K, Kalapala Rao KV, Harada S, Yoshimura K, Ghosh AK, and Mitsuya H.	Sci Rep	under revision	-
Benzolactam-related compounds promote apoptosis of HIV-infected human cells via protein kinase C-induced HIV latency reversal	Matsuda K, Kobayakawa T, Tsuchiya K, Hattori SI, Nomura W, Gatanaga H, Yoshimura K, Oka S, Endo Y, Tamamura H, Mitsuya H, and <u>Maeda K</u>	J. Biol. Chem.	in press	2018
Combination of a latency-reversing agent with a Smac mimetic minimizes secondary HIV-1 infection in vitro	Hattori S, Matsuda K, Tsuchiya K, Gatanaga H, Oka S, Yoshimura K, Mitsuya H, and <u>Maeda K</u>	Frontiers in Microbiology	9 : 2222	2018
The high genetic barrier of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591) stems from strong interactions with the active site of drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase	Takamatsu Y, Das D, Kohgo S, Hayashi H, Delino NS, Sarafianos SG, Mitsuya H, and <u>Maeda K</u>	Cell Chem. Biol.	S2451-9456 (18) 30266-6	2018
Synthesis, Anti-HBV and Anti-HIV Activities of 3'-Halogenated bis(hydroxymethyl)-cyclopentenyladenines (BCAs)	H. Kumamoto, S. Imoto, M. Amano, N. Kuwata-Higashi, M. Baba, H. Mitsuya, Y. Odanaka, S. Shimbara Matsubayashi, H. Tanaka, and K. Haraguchi	ACS Medicinal Chemistry Letters	9(12), pp. 1211-1216	2018

研究発表及び特許取得報告について

Synthesis of 4' -Substituted Purine 2' -Deoxynucleosides and Their Activity against Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus.	Kohgo S, <u>Imoto S</u> , Tokuda R, Takamatsu Y, Higashi-Kuwata N, Aoki M, Amano M, Kansui H, Onitsuka K, <u>Maeda K</u> , and Mitsuya H.	ChemistrySelect	3:3313-3317	2018
HIV-1 with HBV-associated Q151M substitution in RT becomes highly susceptible to an anti-HBV inhibitor, entecavir: structural insights into HBV-RT inhibition by entecavir.	Yasutake Y, Hattori S, Hayashi H, Matsuda K, Tamura N, <u>Maeda K</u> , and Mitsuya H.	Sci Rep.	8, 1624	2018
Restoration of immune surface molecules in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infected cells by lenalidomide and pomalidomide	Davis DA, Mishra S, Anagho HA, Aisabor, AI, Shrestha P, Wang V, Takamatsu Y, Maeda K, Mitsuya H, Zeldis JB, Yarchoan R	Oncotarget	8:50342-50358	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
新規HIV逆転写酵素阻害剤の開発と次世代ARTに向けた新しい治療法への応用. シンポジウム12[ARTの現状：基礎研究者への発信]	前田 賢次	第32回日本エイズ学会学術集会・総会	大阪	2018/12/2-4
HIV潜伏感染細胞を標的とした新規治療薬開発に有効なHIV持続感染in vitroモデルの開発	松田 幸樹、 Mohammad Saiful Islam、 服部 真一朗、 土屋 亮人、 瀧 永博之、 吉村 和久、 岡慎一、 玉村 啓和、 佐藤賢文、 満屋裕明、 前田 賢次	第32回日本エイズ学会学術集会・総会	大阪	2018/12/2-4
Benzolactam-related compounds promote apoptosis via protein kinase C-induced HIV latency reversal	Matsuda K, Kobayakawa T, Tsuchiya K, Hattori SI, Nomura W, Gatanaga H, Yoshimura K, Oka S, Endo Y, Tamamura H, Mitsuya H, and <u>Maeda K</u>	第19回熊本エイズセミナー	熊本	2018/11/6-7

研究発表及び特許取得報告について

IVリザーバー再活性化後のウイルス産生を最小限に抑制しつつ潜伏感染細胞を強力に除去する新しい“Shock & Kill”療法の開発	前田 賢次、服部 真一朗、松田 幸樹、土屋 亮人、瀧永 博之、岡 慎一、吉村 和久、満屋 裕明	第28回抗ウイルス療法学会学術集会・総会	札幌	2018/6/7-9
2'-フルオロBCA誘導体の合成と抗ウイルス作用の評価	熊本 浩樹, 榎本 彩花, 鈴木 桃子, 中城 健夫, 鄭 侑利, 井本 修平, 鍬田(東) 伸好, 天野 将之, 青木 学, 阿部 洋, 福原 潔, 満屋 裕明, 原口 一広	日本薬学会第138年会	金沢	2018年3月
HIV潜伏感染細胞を標的とした新規治療薬開発に有効なin vitro評価系の開発	松田 幸樹、服部 真一朗、土屋 亮人、小早川 拓也、大橋 南美、野村 涉、原田 恵嘉、佐藤 賢文、吉村 和久、玉村 啓和、満屋 裕明、前田 賢次	第31回日本エイズ学会学術集会・総会	東京	2017/11/24-26
Analysis of molecular mechanism of HIV-1 latent infection & reactivation and development of novel therapeutics active against latent HIV-1 infection.	Kouki Matsuda, Shin-ichiro Hattori, Kiyoto Tsuchiya, Takuya Kobayakawa, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Shigeyoshi Harada, Yorifumi Satou, Kazuhisa Yoshimura, Hirokazu Tamamura, Hiroaki Mitsuya, and Kenji Maeda	第65回日本ウイルス学会学術集会	大阪	2017/10/24-26

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

研究発表及び特許取得報告について

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
※主任研究者が班全員分の内容を記載のこ