

氏 名 ちよう の こうじ  
**長 野 浩 治**

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 富医薬博乙第42号

学位授与年月日 平成25年6月26日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第4項該当

学位論文題目 **Pharmacological study of ASP2151 (amenamevir),  
helicase-primase inhibitor possessing antiviral activity  
against varicella-zoster virus and herpes simplex virus type  
1 and 2**

**(水痘・帯状疱疹ウイルス, 単純疱疹ウイルス1型及び2型に対す  
る抗ウイルス活性を示すヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤  
ASP2151 (amenamevir) の薬理学的研究)**

論文審査委員

(主査) 教授 山本善裕

(副査) 教授 服部裕一

(副査) 教授 布施秀樹

(副査) 教授 清水忠道

(紹介教員) 教授 白木公康

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

ASP2151 (amenamevir) は単純疱疹ウイルス 1 型 (HSV-1) , 2 型 (HSV-2) 及び水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に抗ウイルス活性を示すヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤である。ASP2151 の抗ウイルス活性, 作用機序, ASP2151 低感受性株の特徴及び既存抗ヘルペス剤との併用効果を明らかにするため, 各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験系で評価を行った。

### 〔方法並びに成績〕

ASP2151 のウイルスヘリカーゼ・プライマーゼ酵素阻害及びウイルス DNA 複製阻害を評価するため, それぞれ HSV-1 組換えヘリカーゼ・プライマーゼタンパク質及びヘルペスウイルス (HSV-1, HSV-2, VZV 又はサイトメガロウイルス) 感染細胞を用いて検討した。また, *in vitro* 及び *in vivo* 抗ウイルス活性の評価はそれぞれプラーク減少法及びマウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いた。ASP2151 は 1 本鎖 DNA 依存的 ATPase 活性, ヘリカーゼ及びプライマーゼ活性を阻害し, *in vitro* では HSV-1, HSV-2 及び VZV 感染細胞に対して, 各ウイルスにほぼ同程度の濃度でウイルス DNA 複製阻害による抗ウイルス活性を示した。検討した全ての VZV 株において ASP2151 はアシクロビル (ACV) より低濃度で薬効を示した。さらに, マウス HSV-1 皮膚感染モデルで, ASP2151 の経口投与により皮膚病変の症状進行を阻害した。

ASP2151 低感受性 HSV-1, HSV-2 及び VZV 株の特徴を明らかにするため, これら低感受性株の変異遺伝子解析, 感受性試験, *in vitro* 増殖能及び *in vivo* 病原性解析を行った。変異遺伝子解析により, ASP2151 低感受性株のヘリカーゼ及びプライマーゼ遺伝子に幾つかのアミノ酸置換を同定した。HSV-1, HSV-2 及び VZV のヘリカーゼ遺伝子内

に存在する機能的活性部位である 6 つのモチーフ配列の 1 つであるモチーフIV配列の内部又は近傍にアミノ酸置換部位が集中していた。また、ASP2151 感受性に関連する変異として、プライマーゼ遺伝子内の R367H 変異を ASP2151 低感受性 HSV-1 株内に同定した。さらに、ASP2151 低感受性株は既存抗ヘルペス剤に対してその野生株と同等の感受性を示し、その増殖能及び病原性は野生株と同等以下であった。

HSV-1, HSV-2 及び VZV に対する ASP2151 と既存抗ヘルペス剤との併用効果を評価するため、*in vitro* 及び *in vivo* において併用試験を行った。ASP2151 と ACV の併用効果について、プラーク減少法を用いた isobologram 及び応答曲面モデルによる解析を行った。また、マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いて *in vivo* 併用効果を検討した。*In vitro* では、ASP2151 と ACV や他の既存抗ヘルペス剤との併用による HSV-1, HSV-2 及び VZV に対する抗ウイルス活性は相乗又は相加作用を示した。さらにマウス HSV-1 皮膚感染モデルでは、ASP2151 とバラシクロビルの併用投与は各単剤投与よりも有意に皮膚病変の症状進行を阻害した ( $P < 0.05$ )。

#### 〔総括〕

ASP2151 は新規ヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤であり、HSV-1 及び HSV-2 のみならず VZV に対しても強い抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。ウイルスヘリカーゼ・プライマーゼのアミノ酸変異により、増殖能の低下している ASP2151 低感受性株では、実際に顕在化した場合でもその病原性は低いことが示唆された。また、ASP2151 と ACV や他の既存抗ヘルペス剤との併用は相乗又は相加作用を示すことから、ASP2151 と他の既存抗ヘルペス剤との併用投与は、既存薬剤単独では効果不十分な難治性又は重症ヘルペス感染症に対する有効性が期待された。本研究結果から、ASP2151 は新たな HSV-1, HSV-2 及び VZV 感染症治療剤として更なる研究開発が望まれる。

## 学位論文審査の要旨

### 〔目的〕

これまで報告のあるヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤は単純疱疹ウイルス 1 型 (HSV-1) 及び 2 型 (HSV-2) に抗ウイルス活性を示す一方、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) への活性は低く、その抗ウイルス活性スペクトルは限定的なものであった。今回、HSV-1 及び HSV-2 のみならず VZV にも活性を示す新規のヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤である ASP2151 (amenamevir) を見出し、ASP2151 の抗ウイルス活性、作用機序、ASP2151 低感受性株の特徴及び既存抗ヘルペス剤との併用効果を明らかにするため、各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験系で評価を行った。

### 〔方法並びに成績〕

ASP2151 のウイルスヘリカーゼ・プライマーゼ酵素阻害及びウイルス DNA 複製阻害を評価するため、それぞれ HSV-1 組換えヘリカーゼ・プライマーゼタンパク質及びヘルペスウイルス (HSV-1, HSV-2, VZV 又はサイトメガロウイルス) 感染細胞を用いて検討した。また、*in vitro* 及び *in vivo* 抗ウイルス活性の評価はそれぞれプラーク減少法及びマウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いた。ASP2151 は 1 本鎖 DNA 依存的 ATPase 活性、ヘリカーゼ及びプライマーゼ活性を阻害し、*in vitro* では HSV-1, HSV-2 及び VZV 感染細胞に対して、各ウイルスにほぼ同程度の濃度でウイルス DNA 複製阻害による抗ウイルス活性を示した。検討した全ての VZV 株において ASP2151 はアシクロビル (ACV) より低濃度で薬効を示した。さらに、マウス HSV-1 皮膚感染モデルで、ASP2151 の経口投与により皮膚病変の症状進行を阻害した。

ASP2151 低感受性 HSV-1, HSV-2 及び VZV 株の特徴を明らかにするため、これら低感受性株の変異遺伝子解析、感受性試験、*in vitro* 増殖能及び *in vivo* 病原性解析を行った。変異遺伝子解析により、ASP2151 低感受性株のヘリカーゼ及びプライマーゼ遺伝

子に幾つかのアミノ酸置換を同定した。HSV-1, HSV-2 及び VZV のヘリカーゼ遺伝子内に存在する機能的活性部位である 6 つのモチーフ配列の 1 つであるモチーフIV配列の内部又は近傍にアミノ酸置換部位が集中していた。また, ASP2151 感受性に関連する変異として, プライマーゼ遺伝子内の R367H 変異を ASP2151 低感受性 HSV-1 株内に同定した。さらに, ASP2151 低感受性株は既存抗ヘルペス剤に対してその野生株と同等の感受性を示し, その増殖能及び病原性は野生株と同等以下であった。

HSV-1, HSV-2 及び VZV に対する ASP2151 と既存抗ヘルペス剤との併用効果を評価するため, *in vitro* 及び *in vivo* において併用試験を行った。ASP2151 と ACV の併用効果について, プラーク減少法を用いた isobologram 及び応答曲面モデルによる解析を行った。また, マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いて *in vivo* 併用効果を検討した。*In vitro* では, ASP2151 と ACV や他の既存抗ヘルペス剤との併用による HSV-1, HSV-2 及び VZV に対する抗ウイルス活性は相乗又は相加作用を示した。さらにマウス HSV-1 皮膚感染モデルでは, ASP2151 とバラシクロビルの併用投与は各単剤投与よりも有意に皮膚病変の症状進行を阻害した ( $P < 0.05$ )。

#### 〔総括〕

ASP2151 は新規ヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤であり, VZV へ活性を示さなかった既存のヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤とは異なり, HSV-1 及び HSV-2 のみならず VZV に対しても強い抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。ウイルスヘリカーゼ・プライマーゼのアミノ酸変異により, 増殖能の低下している ASP2151 低感受性株では, 実際に顕在化した場合でもその病原性は低いことが示唆され医学における学術的重要性は高い。また, ASP2151 と ACV や他の既存抗ヘルペス剤との併用は相乗又は相加作用を示すことから, ASP2151 と他の既存抗ヘルペス剤との併用投与は, 既存薬剤単独では効果不十分な難治性又は重症ヘルペス感染症に対する有効性が期待され臨床的発展性が

期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。