

201320039A

厚生労働科学研究費補助金【肝炎等克服緊急対策研究事業】

C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変に対する
抗線維化治療薬の開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 公則

東京都立駒込病院 肝臓内科

平成26(2014)年 3月

厚生労働科学研究費補助金【肝炎等克服緊急対策研究事業】

C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変に対する
抗線維化治療薬の開発に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

東京都立駒込病院 肝臓内科

研究代表者 木村 公則

目次

I 総括研究報告	5
C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変に対する抗線維化治療薬の開発に関する研究	
■研究代表者:木村 公則	7
II 分担研究報告	13
血漿 TGF- β LAP 断片を用いた PRI-724 の抗線維化効果の評価	
■研究分担者:小嶋 聡一	15
NASH 肝線維化モデルを用いた PRI-724 の抗線維化効果の解明	
■研究分担者:池嶋 健一	19
C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者を対象とした PRI-724 の 非盲検・用量検討試験(第 I 相)の安全性評価	
■研究分担者:奥坂 拓志	21
ヒト肝組織を用いた線維化/脱線維化の解析	
■研究分担者:原田 憲一	27
肝線維化における腫瘍壊死因子(TNF- α)の役割	
■研究協力者:大澤 陽介	33
III 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV 研究成果の刊行物・別刷	41

I 総括研究報告

C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変に対する抗線維化治療薬の開発に関する研究

研究代表者 木村公則 東京都立駒込病院肝臓内科 医長
研究分担者 小嶋聡一 理化学研究所 特別ユニットリーダー
池嶋健一 順天堂大学附属病院消化器内科 准教授
奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院肝胆膵内科 科長
原田憲一 金沢大学医薬保健総合研究科形態機能病理学 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染に起因する肝硬変患者は、国内で30万人以上とされているが、現在肝硬変に対する治療薬（抗線維化薬）は実用化されていない。肝硬変の進行は、蛋白質合成などの肝臓の様々な機能低下をもたらし、腹水や門脈圧亢進症等の合併症を誘発し治療に難渋することが多い。また肝硬変患者は、高率に肝細胞がんを発症することから、新規の線維化を標的とした肝硬変治療薬を開発することが緊急の課題である。PRISM PharmaはWntシグナル伝達を阻害し、 β -カテニンとCREB-binding proteinの蛋白相互作用を選択的に阻害できる化合物、PRI-724を見いだした。研究代表者らはHCV蛋白発現肝線維化マウスを用いてPRI-724の抗線維化作用を検討した結果、PRI-724投与群でコントロール群と比較して肝線維化像において著しい改善が認められ治療薬としての可能性が示唆された。本研究ではPRI-724の抗線維化作用機序の解明をマウスモデルでおこなうと同時に、有効な治療薬がないHCV肝硬変に対するPRI-724の安全性と忍容性を確認する医師主導治験（Phase I試験）を行う。

A.研究目的

HCV感染者は現在世界で約1億7千万人、国内では約200万人いると推定される。また肝硬変患者は国内で約40万人に上るといわれ、約70%がHCVに起因している。この感染症の問題点は高率に持続感染化し、持続的肝障害が線維化を誘導し肝硬変から肝細胞がんを発症させる。また肝硬変の進行は、蛋白質合成などの肝臓の様々な機能の低下をもたらし、腹水や門脈圧亢進症等の合併症を誘発する。C型慢性肝炎の治療薬としての抗ウイルス剤の開発はかなり進んでいるが、未だ肝硬変に対する抗線維化薬は実用化されていない。従って、抗ウイルス療法が実施出来ないあるいは治療効果を認めなかったC型肝炎患者への対策が肝細胞がん発症予防への鍵となっている。

PRISM PharmaはWntシグナル伝達を阻害し、

β -カテニンとCREB-binding proteinの蛋白相互作用を選択的に阻害できる化合物、PRI-724を見いだした。この化合物は、米国でのがん臨床試験（Phase Ia、固型がん）において単剤での安全性の確認試験が終了し、現在健常人での経口投与による臨床薬理試験および通常治療薬との併用における臨床試験を実施中である。研究代表者らはPRI-724が抗線維化作用を有するかHCV蛋白発現肝線維化（HCV-Tg）マウスを用いて検討した。17ヶ月齢のHCV-TgマウスにPRI-724（1mg/kg/day）を42日間持続静脈投与し肝臓組織を観察したところ、PRI-724投与群ではコントロール群と比較して肝線維化像の著しい改善が認められた。

HCV-Tgマウスの長期にわたる持続的肝障害を経て形成された肝線維化はヒトHCV肝硬変の病態に類似していると考えられ、この治療効果は

特筆すべきである。また同様の効果は肺線維症マウスモデルでも確認されており (PNAS; 2010)、抗線維化薬としての PRI-724 の可能性が示唆された。本研究では、Wnt シグナル阻害剤が抗線維化作用を有するという新しい知見をもとに、有効な治療薬がない HCV 肝硬変に対する PRI-724 の安全性と忍容性を確認する医師主導治験 (Phase I 試験) を行うとともに線維化のメカニズムを実験マウスモデルで解明する。

B. 研究方法

(1) PRI-724 の HCV 肝硬変症例に対する安全性・忍容性の医師主導治験 ; Phase I 試験
試験実施施設 : 東京都立駒込病院

症例登録～治療計画～観察 (木村) : 本試験の適格基準に一致した HCV 肝硬変患者に対して症例登録をおこない、投与可能な患者に対して駒込病院にて PRI-724 の持続静脈投与を開始し、プロトコールに準じて 3 ヶ月間の治験をおこなう。

PRI-724 の安全性 (奥坂) : PRI-724 投与後の各症例の全身状態、血液検査や画像検査により有害事象の有無を確認する。

PRI-724 の治療効果 (原田) : PRI-724 投与前後において肝生検を実施し線維化の治療効果を病理学的に評価する。

基本デザイン ; 単施設, 持続静脈内投与, オープンラベル, 用量漸増試験

目標登録症例数 ; 18 例 (1 コホート 6 例)

用量ならびに投与方法 ;

用量 : 10, 40, 160 mg/m²/day

投与方法 : (コホート 1) 1 週間持続静脈内投与期間 (試験期間 I) と 1 週間の観察期間 (試験期間 II) を以って 1 サイクルとし、10 mg/m²/day の投与を 6 サイクル (合計 12 週間)

実施する。

※第 1 サイクル Day1 および Day2 の PRI-724 および 活性体である C-82 の血漿中薬物濃度を確認するまでは第 2 サイクルの投与は開始しない。

(コホート 2) コホート 1 の被験者すべてに少なくとも 1 サイクルの治療が完了し、薬物濃度と安全性が確認された時点で、次の用量に増量し (40 mg/m²/day : コホート 2)、同じ手順で投与を開始する。

※第 1 サイクル Day1 及び Day2 の PRI-724 および C-82 の血漿中薬物濃度を確認するまでは第 2 サイクルの投与は開始しない。

(コホート 3) 同様に、コホート 2 の被験者すべてに少なくとも 1 サイクルの治療が完了し、薬物濃度と安全性が確認された時点で、次の用量に増量し (160 mg/m²/day : コホート 3)、同じ手順で投与する。

※第 1 サイクル Day1 および Day2 の PRI-724 および C-82 の血漿中薬物濃度を確認するまでは第 2 サイクルの投与は開始しない。

次コホートへのステップ移行判断は、各コホートの第 1 サイクルの治療がすべて完了し、かつ、6 症例において (Child-Pugh Score A および B それぞれ 3 症例)、第 1 サイクル Day1 および Day2 ならびに Day8 および Day9 の PRI-724 および C-82 の血漿中薬物濃度を確認し、そのコホートでの安全性を確認した時点で行う。

評価方法 ;

【主要評価項目】

安全性 : 有害事象および副作用発現率

【副次評価項目】

Child-Pugh Score

肝生検 ; Histology Activity Index (HAI)

血清アルブミン値

血清線維化マーカー値

腹水量

下腿浮腫の改善率

薬物動態

(2) PRI-724 の HCV 発現肝線維化モデルにおける抗線維化作用機序の研究 (木村、小嶋)

上記マウスモデルを用いて PRI-724 の抗線維化作用のメカニズムを解析する。PRI-724 投与後の肝臓組織を用いて星細胞の関与を検討すると同時に TGF- β や PDGF- β などのサイトカイン、MMP、TIMP 等の線維化因子、新規 fibrogenesis マーカー TGF- β LAP 分解産物の発現解析をおこなう。肝臓、脾臓リンパ球を採取し炎症細胞の免疫学的解析をおこなう。また、星細胞株 (LX-2) を用いて PRI-724 投与後の遺伝子解析をおこなう。

(3) PRI-724 の NASH 由来肝線維化モデルに対する抗線維化作用の研究 (池嶋)

NASH マウスモデルとして報告してきた KK-A(y) マウスを用いて肝臓内の Wnt シグナルの発現を解析し、PRI-724 の抗線維化効果を検討する。

(倫理面への配慮)

本臨床試験に関与するすべての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2008年10月改訂版)及び「臨床研究に関する倫理指針」に従う。

研究責任医師及び研究分担医師は、被験者が本臨床試験に参加する前に、被験者に対して説明・同意文書を用いて十分に口頭で詳しく説明し、本臨床試験の参加について自由意思による同意を被験者から文書により得るものとする。

本試験で収集された症例報告書等を当該機関外に提供する際には、連結可能匿名化を行うために新たに被験者識別コードを付して、それを用いる。また、症例報告書の作成・取り扱い、医学雑誌への発表等においては、被験者の秘密を

保全する。

本臨床試験に起因して有害事象が発生し、被験者に何らかの健康被害が発生した場合には、実施医療機関は適切な治療その他必要な措置を講ずる。

施設モニタリングでは、研究実施計画書の遵守確認、安全性情報の収集、実施症例に対するサンプリングによるSDVの実施を行い、実施手順は「モニタリング計画書」を別途作成し、それに従う。また、監査部門を設置し、内部監査の実施と外部からの監査にも対応する。

C.研究結果

◇研究代表者(木村)

- (1) 17ヶ月齢のHCV蛋白発現肝線維化マウスに PRI-724 (1mg/kg/day) を 42 日間持続静脈投与し肝臓組織を観察したところ、PRI-724 投与群ではコントロール群と比較して肝線維化像の著しい改善が認められた。同時に肝脂肪化、肝細胞索の異常構造等の組織所見も改善していた。
- (2) PRI-724 投与後肝臓内に活性化したマクロファージ、単球、好中球の増加を確認した。
- (3) ヒトC型肝炎患者に対する PRI-724 の安全性及び有効性を確認するための医師主導治験を実施するにあたり治験実施施設である駒込病院の治験支援体制の整備(臨床研究支援室の設立、SOPの作成、CRO選定等)をおこなった。
- (4) 「C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者を対象とした PRI-724 の非盲検・用量検討試験」の治験実施計画書の作成を行った。
- (5) PRI-724 の医師主導治験にあたり PMDA と薬事戦略相談(事前面談)を2回実施し、対面助言を H26 年 1 月 30 日に実施。2 月 12 日に対面助言後面談を行い、治験内容およびプロトコールについて概ね合意となった。

◇研究分担者(小嶋)

- (1) これまでの研究で肝線維化を誘導する主要因子である TGF- β が活性化を受ける際に、副次的に生成する LAP 断片が“fibrogenesis”のマーカーとして有用であることを確認した。今年度は、同血中濃度が PEG-IFN+リバビリン投与による薬効を反映するマーカーであることを患者血漿で確かめた。
- (2) PRI-724 の抗線維化活性を肝臓ハイドロキシプロリン量と血中 LAP 断片量で評価した。

◇研究分担者(池嶋)

- (1) NASH マウスモデルとして報告してきた KK-A(y) マウスを用いて肝臓内の Wnt シグナルの発現を real-time PCR で行った。

◇研究分担者(奥坂)

- (1) 今回の医師主導治験“C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者を対象とした PRI-724 の非盲検・用量検討試験”の安全性評価委員を担当した。

◇研究分担者(原田)

- (1) PRI-724 治療前後の肝生検の病理学的治療効果判定方法として、線維化、肝炎性変化、脂肪変性、肝細胞多型性の観点から評価することとし、現有の肝生検材料を用いて予備的研究を施行した。
- (2) PRI-724 の抗線維化作用を解析するため、線維化および脱線維化に関連する浸潤炎症細胞、肝細胞壊死と再生、細胞形態を制御する分子、細胆管反応の観点などから評価することとし、現有の肝生検材料を用いて免疫染色等の予備的実験を終了した。

D.考察

- (1) PRI-724 の HCV 肝硬変症例に対する医師主

導治験

C 型肝炎硬変は、HCV の持続感染に起因する慢性肝炎から進展した病態である。HCV 感染による持続的肝障害の結果、慢性肝炎が認められるようになるが、この病期に HCV の排除が達成されない場合、肝炎による肝細胞壊死に続き肝線維化を生じ、線維化の進行とともに肝硬変に至る。肝硬変の進行に伴い、黄疸、腹水、食道静脈瘤、および肝性脳症といった肝不全による種々の重篤な合併症が生じ、やがては死に至る。このように C 型肝炎硬変は肝の線維化を伴い不可逆的かつ進行性の病態を辿ることから、患者の QOL を著しく低下させる難治性の疾患である。HCV 感染者は現在世界で約 1 億 7 千万人、国内では約 200 万人と推定され、このうち約 40% が 10~15 年のうちに肝硬変に進展するとされる。さらに、HCV に起因する C 型肝炎患者のうち年率約 7% が肝細胞がんを発症すると報告されており、肝臓がん発症の主な危険因子の一つと考えられている。

C 型肝炎硬変の治療には、代償性の場合 C 型肝炎と同様に、HCV の排除を目指すペグインターフェロンとリバビリンの併用による抗ウイルス療法が行われる。⁴ HCV の排除は望めないものの、肝臓の炎症抑制を目的としたウルソデオキシコール酸またはグリチルリチン製剤等による肝庇護療法もまた利用される。しかし、治療対象となる症例は限定的であり、治療効果は 30% 程度と不十分である。また、これらの抗ウイルス療法は副作用も多い。さらに、HCV を排除出来た場合であっても、病態の進行にともなう肝線維化は改善しない。肝線維化に伴い有効肝血流量が低下するため、薬剤の曝露が不十分である場合や、脾腫にともなう血小板数減少によって薬剤の投与量が制限される場合があることから、進行した C 型肝炎硬変患者に対して十分な治療を行えないのが現状である。したがって、現時点で治療薬が無いとされる肝線

維化状態からの回復は、当該疾病の治療に必須であり、線維化状態からの回復により抗ウイルス薬の治療効果の改善なども期待されることから、抗線維化薬の開発が必須であると考えられる。今回我々が肝硬変症例に対して投与を計画している PRI-724 は米国においてがん患者を対象に複数の臨床第Ⅱ相試験を実施中で、最近固形がんを対象にした安全性を確認する試験が終了しており、安全性が確認されている薬剤である。前述の方法に記載した様に、用量: 10, 40, 160 mg/m²/day の 3 dose で治験を行う予定であり、駒込病院単施設での実施となる。

(2) PRI-724 の抗線維化作用機序

今回我々が使用した HCV 蛋白発現マウスは Cre/loxP のスイッチングシステムを用いて、ある一定の時期より肝臓内に HCV 蛋白を持続発現できるマウスモデルである (PLoS One 2012)。HCV 蛋白発現後の経時的な肝臓組織を観察したところ、HCV 蛋白発現後、1 週間以内に中心静脈や門脈周囲や、肝臓実質内に炎症細胞浸潤が認められ、apoptosis を生じた肝細胞も散見された。発現後 180 日頃には肝細胞索の異常構造、肝細胞の脂肪変性、線維化、グリコーゲンの異常蓄積等のヒト慢性活動性肝炎の組織像と非常に類似した肝臓組織像を示していた。またこのマウスは、肝線維化を経て肝細胞がんを誘発することが認められ、特に雄マウスに有意に発症することが判明している。17 ヶ月齢の HCV 蛋白発現マウスは肝線維化が進行しており、このマウスに PRI-724 を 1mg/kg/day、42 日間持続投与したところ、コントロール群と比較し明らかに肝線維化の改善を認めた。また肝細胞索の異常構造なども正常構造に回復していた。重要な点は、肝細胞の膨化、脂肪化等も正常肝細胞に改善していた点である。これらの所見は、PRI-724 が従来他の疾患モデル（肺線維症、腎硬化症等）で抗線維化効果を認めていた事象を

肝線維化のモデルでも確認することができた。また PRI-724 投与中に血清 ALT の上昇などの有害事象はみられなかった。このように PRI-724 投与により抗線維化作用を認めたため、作用機序について検討した。まず肝臓内のリンパ球解析を行ったところ、CD11b+F4/80+陽性マクロファージや CD11b+Ly-6c+陽性単球、CD11b+Gr-1+好中球の増加を認めた。CD4、CD8 T 細胞の増加は明らかではなかった。これらの結果は PRI-724 の投与により主に骨髄由来の炎症細胞が肝臓に浸潤し抗線維化作用を誘導した可能性がある。最近、マクロファージの抗線維化作用に関する報告が多数認められており、M1/M2 マクロファージの ratio、調節性マクロファージの関与など検討する予定である。また肝線維化の形成に重要な星細胞の解析は出来ておらず、今後の課題である。さらに、Wnt 阻害剤は細胞の分化を誘導する機能が報告されており、障害を受けた肝細胞の分化誘導の視点からも治療効果を検討したい。

E. 結論

本研究班では現在有効な治療薬のない C 型肝炎に対する PRI-724 の安全性、忍容性を医師主導治験で検証するとともに抗線維化作用機序の解明をマウスモデルでおこなう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura K. Should we try antiviral therapy for hepatitis C virus infection with pyoderma-gangrenosum-like lesions? Hepatol Res 2013 in press
- 2) Aoki J, Kowazaki Y, Ohtsuki T, Okamoto R, Ohashi K, Hayashi S, Sakamaki H, Kohara

M, Kimura K. Kinetics of Peripheral
Hepatitis B Virus-specific CD8⁺ T Cells in
Patients with Onset of Viral Reactivation.
J gastroenterology 2013
Jun;48(6):728-37.

2. 学会発表

1) Kohara K, Kimura K, Kohara M. Inflammation
and Cancer in Hepatitis C virus infection.
International symposium of Tokyo
Metropolitan Institute of Medical Science,
Tokyo, Japan, 2013.2.15

2) Aoki J, Sakamaki H, Kimura K. KINETICS OF
PERIPHERAL HEPATITIS B VIRUS-SPECIFIC CD8⁺
T CELLS IN PATIENTS WITH ONSET OF VIRAL
REACTIVATION. Poster Presentation AASLD
single topic conference Virginia USA
2013.3.21

3) Kimura K, Ohtsuki T, Kohara M. Tissue
macrophages are responsible for
inflammatory liver disease in the hepatitis
C virus transgenic mice. Oral Presentation
AASLD annual meeting Washington DC. USA
2013.11.3

4) 木村公則、林星舟、坂巻壽：造血幹細胞移
植後のHBV再活性化症例における宿主免疫応答
の解析 日本肝臓学会総会 平成25年10月 東京

5) 木村公則、小原道法：Tissue macrophages
are responsible for inflammatory liver
disease in the hepatitis C virus transgenic
mice. 日本免疫学会 平成25年12月 幕張

H. 知的所有権の出願・登録状況

- ①特許取得；なし
- ②実用新案登録；なし
- ③その他

II 分担研究報告

血漿 TGF- β LAP 断片を用いた PRI-724 の抗線維化効果の評価

研究分担者 小嶋聡一 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット
研究協力者 古谷 裕 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット
研究協力者 原 詳子 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット

研究要旨 : PRI-724 投与後のヒトやマウスのサンプルを用いて血漿 TGF- β LAP 断片等の線維化マーカーの測定を行い、PRI-724 の抗線維化効果を示すとともに、作用機序の解明に資することを目的とする。初年度は、HCV-Tg マウス肝線維化モデルにおいて、PRI-724 投与 (1mg/kg; 7 週間; 0.15 μ l/hour Mini-osmotic pump) により、肝ヒドロキシプロリン量 (コラーゲン蓄積量) を減少させることを確認したうえで、現在血漿 TGF- β LAP 断片量 (肝 fibrogenesis 量) の測定を行っている。

A. 研究目的

肝硬変は、年間患者数 30 万人、予備軍 350 万人で我が国死亡原因第 9 位の難病である。その病態は、様々な原因による肝組織の障害と修復の過程において、細胞外マトリックスタンパク質が異常蓄積することによって肝組織が硬化し、機能を失っていく。未だに根治治療法が確立されておらず対処療法のみ施されている。さらに、肝硬変、その前段階である肝線維化を検出する非侵襲的なバイオマーカーならびにそれを応用した非侵襲的検出法が確立されておらず、新薬開発の遅れにつながっている。この状況を克服するためには、肝線維化・肝硬変の病態形成機構に立脚した新しい肝疾患診断法を早急に開発する必要がある。肝硬変の際に細胞外マトリックスタンパク質の異常産生を引き起し、正常肝細胞の再生を阻害しているのがサイトカイン Transforming Growth Factor (TGF)- β である。TGF- β は、高分子潜在型

分子として産生された後標的細胞上でプロテアーゼの作用で活性化され働く。

小嶋は TGF- β が活性化される際に生成する TGF- β のプロペプチド LAP ([Latency-associated Protein]: 潜在型 TGF- β 分子中で TGF- β をトラップ [Nature 2012 年 6/16 号に立体構造]、活性化反応により切断され TGF- β を放出) の切断断片を特異的に認識する抗体を作製 (国際・国内特許取得) し、キャラクタリゼーションしたところ、同抗体で検出される LAP 断片は、従来の肝障害マーカー、fibrosis マーカー、肝機能マーカーとは異なる、これまでなかった肝 fibrogenesis を反映する新規バイオマーカーとして TGF- β 活性化反応が始まる肝線維化初期段階 (新犬山分類 F1, F2) を反映するマーカーとなりえることが、動物モデル並びに患者検体を用いた解析より判ってきた。

木村班では、肝ヒドロキシプロリン量、肝

切片シリウスレッド染色/ α SMA 染色をはじめとした 既存の fibrosis 評価系に加えて、LAP 断片を指標にした fibrogenesis 評価系を用いて

- 1) PRI-724 の抗線維化作用機序解明
- 2) 臨床試験における有用性評価を行う。

初年度は、動物モデルにおける線維化の評価を行った。

B. 研究方法

HCV-Tg マウス肝線維化モデルにおいて、PRI-724 投与 (1mg/kg; 7 週間; 0.15 μ l/hour Mini-osmotic pump) 後、肝臓を摘出し、肝ヒドロキシプロリン量 (コラーゲン蓄積量) を測定した。経時的に血漿 LAP 断片濃度と肝組織の LAP 断片染色の変化を調べ、肝組織シリウスレッド染色や肝ヒドロキシプロリン量 (コラーゲン蓄積量) の推移、 α -平滑筋アクチンによる活性化星細胞の変化との比較・検討を行い、PRI-724 の抗体 fibrosis 効果、抗 fibrogenesis 効果の評価する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、理化学研究所の動物実験指針に準拠して行うほか、NIH ガイドライン、並びに「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)」に沿った動物の飼育・実験を行った。すでに、理化学研究所の実験動物委員会において研究計画の承諾は受けており、研究内容に倫理面の問題はない [理研の承認番号: H24-2-002 (最終変更承認 H24. 3. 23)]

C. 研究結果

PRI-724 投与群では、ヒドロキシプロリン量 (コラーゲン蓄積量) の減少が観察された (図 1)。

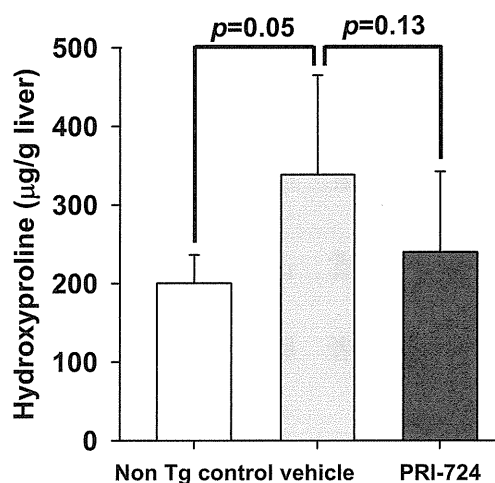


図1. PRI-724 投与によるコラーゲン蓄積量減少

D. 考察

今回の測定では、マウス肝臓の異なる葉を検体としたために、肝ヒドロキシプロリン量データがばらつき、有意差がつかなかったものと思われる。次回は、各群で同じ葉の同じ位置からサンプリングした検体で比較を行うことにより、有意差がある抑制作用がみられると考えられる。現在、血漿 TGF- β LAP 断片量 (肝 fibrogenesis 量) の測定を行っている。

E. 結論

PRI-724 の抗線維化効果を確認できた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata K, Hara M., Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, and Kojima S. (2013) HCV NS3 protease enhances

liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci. Rep.* 3:3243.

2) Sakata K, Eda S, Lee E-S, Hara M, Imoto M, and Kojima S. (2014) Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443(3): 950- 956.

3) Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T, Nagatsuma K, Dohmae N, Ogawa S, Imajoh-Ohmi S, Friedman S. L., Rifkin D. B, and Kojima S. (2014) LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis. *SpringerPlus* in press.

2. 学会発表

1) Sakata K, Eda S, Lee E, Hara M, Imoto M, Kojima S, Neovessels contribute to liver fibrosis via providing latent transforming growth factor-beta to be activated by hepatic stellate cells. American Association for the Study of Liver Diseases. 2013/6/7 Atlanta, USA

2) 坂田幸太郎、原詳子、津曲千恵美、寺田貴帆、渡邊則幸、矢口壮一、松本武久、白水美香子、横山茂之、宮澤恵二、相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、小嶋聡一
HCV NS3 protease plus TNF- α promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- β type I receptor

The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells

2013年9月27日 大阪

3) 坂田幸太郎、相崎英樹、小嶋聡一
C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β 疑似活性を介した肝線維化誘導機構-TNF- α との協調作用による肝細胞の感受性亢進-
第40回日本肝臓学会西部会 2013年12月6日 岐阜

H. 知的所有権の出願・登録状況

① 特許取得

小嶋聡一、近藤和嘉子、堂前直「TGF- β 活性化制御領域の切断面を認識する抗体」

特願 2003-313014 平成 15 年 9 月 4 日出願

JP2004/013189 平成 16 年 9 月 3 日 PCT 出願

US, EP, JP 移行手続き済 US 優先権出願 10/570606

登録番号 7, 803, 553 (平成 22 年 9 月 28 日)

US 優先権出願 12/856195

登録番号 8, 198, 412 (平成 24 年 6 月 12 日)

EU EPC 出願 04772928. 0

JP PCT 出願 特願 2005-513729 登録番号 4653660 (平成 22 年 12 月 24 日)

② 実用新案登録 特になし

③ その他

NASH 肝線維化モデルを用いた PRI-724 の抗線維化効果の解明

研究分担者 池嶋 健一 順天堂大学附属病院消化器内科

研究要旨: β -catenin と CREB binding protein (CBP) の結合に対する選択的阻害作用を有する低分子化合物である PRI-724 が C型肝炎ウイルス蛋白発現マウスの肝線維化に対して抗線維化作用を有する事が示された。今回我々は、KK-A^y マウスを用いて NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)由来の肝線維化モデルにおける PRI-724 の抗線維化作用を解析する。

A.研究目的

アルコール飲酒歴がなく、ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎、代謝性疾患など明らかな肝機能障害の原因を認めないにもかかわらず肝への脂肪沈着を認める肝疾患は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と考えられている。その病態群の中で重症型が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) であり、肝硬変から肝細胞癌へと進展しうる。最近高血圧、糖尿病などの生活習慣病の増加に伴い年々増加傾向にあり今後 NASH 由来の肝細胞癌が増加すると考えられている。C型肝炎硬変と同様に NASH に起因する肝硬変が肝細胞癌の発症に関与していると考えられ、抗線維化治療薬の開発は急務である。また HCV による慢性肝炎の病理学的所見に肝脂肪化

(steatohepatitis) があげられ、肝臓内への脂肪の沈着と線維化の関与も重要な研究課題である。これらの知見をもとに、今回新たな抗線維化治療薬の可能性が示唆される PRI-724 の治療効果を NASH マウスモデルで検討する。

B.研究方法

雄 KK-A^y マウスと C57BL/6 マウスに high-fat diet を 4, 8, 12 週間投与し肝臓を摘出し、肝組織像 (H. E. 染色、シリウスレッド染色) の解析をおこなった。また肝臓より RNA を抽出し Wnt シグナルの mRNA の発現を網羅的におこなった。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針 (平成 18 年 6 月 1 日制定) に従う。倫理面、実験手技に関して当該所属研究機関に申請し承認後実施する。

C.研究結果

KK-A^y マウスでは control マウスと比較し、明らかに high-fat diet 投与後の肝組織像で肝細胞の膨化、肝細胞索の異常構造が認められた。また血清 ALT の有意の増加を認めた。既報通り、KK-A^y マウスでは血清 leptin の低下、adiponectin の増加を認めた。KK-A^y マウスに対する High-fat diet 長期投与の肝組織像を現在確認中である。

D.考察

今回 KK-A^y マウスに high-fat diet を投与することで肝脂肪化モデルを樹立することができた。今後 high-fat diet を長期投与することにより、肝線維化が誘導されるか検討する。また肝脂肪化の形成過程で肝臓内の Wnt シグナルの mRNA の解析を進める予定である。

E. 結論

KK-A^yマウスに high-fat diet を投与することで肝脂肪化モデルを樹立することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagata H, Ikejima K, Takeda K, Aoyama T, Kon K, Okumura K, Watanabe S. Altered expression and function of hepatic natural killer T cells in obese and diabetic KK-A^y mice. *Hepatol Res* 2013;43(3):276-88.
- 2) Hosoya S, Ikejima K, Takeda K, Arai K, Ishikawa S, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Innate immune responses involving natural killer and natural killer T cells promote liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(3):G293-9.
- 3) Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2013 Dec 2. doi: 10.1111/hepr.12282.

2. 学会発表

- 1) Ikejima K, Arai K, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Ursolic acid minimizes cholestatic liver injury in common bile duct-ligated rats. The international liver congress 2013 (EASL2013)

2013. 4. 24-28, Amsterdam, Netherlands.

- 2) Ikejima K, Takashima S, Arai K, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Glycine prevents maturity-onset obesity and metabolic steatohepatitis in diabetic KK-Ay mice through modulation of hepatic innate immunity. *Digestive Disease Week2013 (DDW2013)* 2013. 5. 18-21 Orlando, Florida USA
- 3) 横川順子、池嶋健一、新井久美子、高嶋志在、今一義、山科俊平、渡辺純夫、メタボリックシンドローム KK-Ay マウスにおける脂肪性肝炎発症に伴う制御性 T 細胞の発現変化と機能異常. 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013. 6. 6-7 東京
- 4) 高嶋志在、池嶋健一、今一義、山科俊平、鈴木聡子、渡辺純夫、グリシンによる肝内自然免疫系制御を介した脂肪性肝炎進展制御. 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013. 6. 6-7 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

- ①特許取得：特になし
- ②実用新案登録：特になし
- ③その他

C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者を対象とした PRI-724 の 非盲検・用量検討試験(第 I 相)の安全性評価

研究分担者 奥坂拓志 国立がん研究センター中央病院肝胆膵内科 科長

研究要旨 : Wnt 阻害剤である PRI-724 が HCV 蛋白発現肝線維化マウスで抗線維化作用を有するという非臨床薬効試験の結果をふまえて今回研究代表者らが C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する PRI-724 の安全性および忍容性を検討する医師主導臨床治験を計画している。PRI-724 投与後の安全性評価を検討する。

A.研究目的

C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する PRI-724 の安全性および忍容性を検討する医師主導臨床治験を実施する際の PRI-724 の安全性を評価する。

B.研究方法

<安全性判定の基準>

- 1) 有害事象（臨床検査値の異常を含む）を認めない場合：次の被験者への投与を開始する。
- 2) 重篤な有害事象を認めるが、治験薬との因果関係が否定されている場合：治験責任医師は上記の事象の経緯および因果関係を否定した理由を効果安全性評価委員会に報告し、因果関係判定の妥当性に関する同委員会の判断を仰ぎ、記録を作成する。同委員会からの文書による判定結果を得た上で、次の被験者への投与開始を判断する。
- 3) 非重篤な副作用の発現が認められている場合：治験責任医師は副作用の内容、程度、経緯等から次の被験者への投与開始を判断する。
- 4) 重篤な副作用の発現が認められた場合、未知の重篤有害事象が認められた場合、または副作用について Grade 2 以上かつ Grade の 2 段階以上の増加を認めた場合：治験責任医師は発現したすべての有害事象の詳細を効果安全性評

価委員会に報告した上で、同委員会の判断を仰ぎ、記録を作成する。同委員会からの文書による判定結果を得た上で、次の被験者への投与開始を判断する。

<有害事象および副作用の定義>

有害事象（Adverse Event; AE）とは、被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上のできごとと定義される。必ずしも当該治験薬の投与との因果関係が明らかなもののみを示すものではない。つまり有害事象とは、治験薬が投与された際に起こる、あらゆる好ましくない、あるいは意図しない徴候（臨床検査値の異常を含む）、症状、または疾患のことであり、当該治験薬との因果関係の有無は問わない。また、既存の状態や疾患の増悪も有害事象と考える。本治験では、下記の事象を有害事象として取り扱う。

- 1) 投与開始前の入院日以降に発現したあらゆる好ましくない医療上の事象。
- 2) 投与開始日以前から発現していた事象で、入院日以降に有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳（CTCAE v4.0）の grade が 1 段階以上悪化したもの。
- 3) 上記 2 には該当しないが、その事象によって治験が中止され、内科的治療介入が必要な場合または治験責任医師または治験分担医師が

それらを有害事象と判断する場合に該当する臨床検査値の異常とバイタルサインの変化

なお、本治験において、治験薬が投与された被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上のできごとを、治療により発現した有害事象

(Treatment Emerged Adverse Event : TEAE)として取り扱う。上記 1～3のうち、投与開始以降に発現した AE をそれぞれ TEAE として取り扱う。

副作用とは、有害事象のうち、治験薬との因果関係が否定できないものをいう。すなわち、別項「プロトコル治療との因果関係」の判定により、「関連なし」以外の有害事象を副作用として取り扱う。

<有害事象の調査方法および判定基準>

治験責任医師または治験分担医師は、別項で定めたスケジュールに基づき観察日ごとに、被験者からの自発的報告および問診により有害事象を調査し、症例報告書で報告する。治験責任医師または治験分担医師は、因果関係の有無に係わらず、有害事象が認められた被験者に対して適切な観察、処置、対応を行い、当該有害事象が正常に復したこと、または治験薬投与前の程度に復したことを確認する等、十分に観察および調査を行う（臨床検査値については、施設基準内または投与前に復する等）。器質的な障害（脳梗塞・心筋梗塞など）で不可逆的な有害事象が認められた場合は、症状が安定または固定するまで観察および調査を行う。

有害事象と判定した場合、下記の調査項目を症例報告書の有害事象欄に記載する。

【調査項目】

- 有害事象名・発現日・転帰日・処置（治療の有無、治験継続の有無）・転帰・重篤度分類（重篤、非重篤・重症度分類・治験薬との因果関係

<有害事象の調査期間>

本治験における有害事象の観察および調査期間は、治験薬投与前の入院開始時点から、第 6 サイクル終了後 28 日までとする。ただし、いずれかの投与サイクル期間に中止した場合には、治験薬投与終了後 28 日までとし、治療後観察期間中に中止した場合には中止時までとする。

<有害事象の重症度の評価>

治験責任医師または治験分担医師は、前項で定義された調査期間中に観察された有害事象および副作用の評価を有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 (CTCAE v4.0) を用いて、有害事象の項目を挙げ、Grade 1～5 の段階で grade 判定する。

<有害事象の重篤度>

治験責任医師または治験分担医師は、有害事象を以下の基準に従って「重篤な有害事象」および「非重篤な有害事象」に分類する。重篤な有害事象の場合、該当する事象を以下の 1)-7) から選択する。

1. 重篤な有害事象
2. 非重篤な有害事象

重篤な有害事象

- 1) 死亡
- 2) 死亡につながるおそれのあるもの
- 3) 治療のために病院または診療所への入院または入院期間の延長が必要となるもの
- 4) 障害（永続的または顕著な障害・機能不全に陥るもの）
- 5) 障害につながるおそれのあるもの
- 6) その他、1)～5) に準じて重篤であるもの
- 7) 後世代における先天性の疾病または異常

(倫理面への配慮)

本臨床試験に関与するすべての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2008年10月改訂版)及び

「臨床研究に関する倫理指針」に従う。

C. 研究結果

今年度は医師主導臨床治験を開始していないため研究結果はない。

D. 考察

上記と同様。

E. 結論

次年度に予定されている PRI-724 の C 型肝炎硬変症例に対する医師主導臨床治験を開始後、安全性委員会を開催し治験薬の安全性を評価する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Emerging drugs for biliary cancer. Okusaka T, Ojima H, Morizane C, Ikeda M, Shibata T. Expert Opin Emerg Drugs. 2013 Dec 20.
- 2) Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Beare S, Mizuno N, Wasan H, Bridgewater J, Okusaka T. Ann Oncol. 2014 Feb;25(2):391-8.
- 3) Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Shibata T. Hepatology. 2013 Oct 9.
- 4) Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and

metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. Ueno H, Ioka T, Ikeda M, Ohkawa S, Yanagimoto H, Boku N, Fukutomi A, Sugimori K, Baba H, Yamao K, Shimamura T, Sho M, Kitano M, Cheng AL, Mizumoto K, Chen JS, Furuse J, Funakoshi A, Hatori T, Yamaguchi T, Egawa S, Sato A, Ohashi Y, Okusaka T, Tanaka M. J Clin Oncol. 2013 May 1;31(13):1640-8.

2. 学会発表

- 1) Okusaka T. Evaluation of the feasibility of TSU-68 plus S-1 combination therapy for advanced hepatocellular carcinoma and predictive factors of response. (ポスター) Jun 6-9, APASL 2013, シンガポール
- 2) 奥坂拓志. ワークショップ 1 : 分子標的薬の効果予後予測因子から治療法対象を考える. (コメンテーター) 第 8 回日本肝がん分子標的治療研究会. 2013 年 6 月 21 日 - 22 日. 於: 金沢
- 3) 奥坂拓志. 一般演題 (ポスター): 分子標的治療 4 (座長). 第 49 回日本肝癌研究会. 2013 年 7 月 11 日 - 12 日. 於: 東京都
- 4) 泉 並木、池田公史、高山忠利、沼田和司、國土典宏、古瀬純司、奥坂拓志、角谷眞澄、伊藤雄一郎、工藤正俊. GIDEON 最終解析～日本人における Sorafenib の Child Pugh B への投与の実際～. (シンポジウム SY1-2) 第 49 回日本肝癌研究会. 2013 年 7 月 11 日 - 12 日. 於: 東京都新宿区
- 5) 池田公史、奥坂拓志. 進行肝細胞癌に対する分子標的治療薬の開発の現状と今後の展望 (シンポジウム SY1-9) 第 49 回日本肝癌研究会. 2013 年 7 月 11 日 - 12 日. 於: 東京都新宿区
- 6) 浅岡良成、池田公史、椎名秀一朗、建石良

- 介、上野秀樹、森実千種、近藤俊輔、坂本康成、仲地耕平、光永修一、清水 怜、小島康志、有岡 仁、小池和彦、奥坂拓志。肝細胞がん患者を対象とした TSU-68+S-1 臨床第 I / II 相試験—有効性評価と血管新生関連因子の検討—。(シンポジウム SY1-10) 第 49 回日本肝癌研究会。2013 年 7 月 11 日-12 日。於：東京都新宿区
- 7) 奥坂拓志。Hepatocellular carcinoma: Development of drug therapy for hepatocellular carcinoma/肝細胞癌：肝細胞癌薬物療法における最新のエビデンス。教育講演 6 EL6 演者。第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2013 年 8 月 29 日-31 日。於：宮城県仙台市
- 8) 林 秀幸、近藤俊輔、柴 知史、坂本康成、森実千種、上野秀樹、奥坂拓志。A retrospective analysis of long-term survivors with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Oral Session 29 OS29: Hepatobiliary and Pancreatic Cancer, Pancreatic Cancer3/肝胆膵 膵がん③ 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2013 年 8 月 29 日-31 日。於：宮城県仙台市
- 9) 柴 知史、近藤俊輔、森実千種、上野秀樹、林 秀幸、坂本康成、奥坂拓志。Clinical features and outcome of hepatocellular carcinoma patients without etiologic risk factors. Oral Session 6 OS6: Hepatobiliary and Pancreatic Cancer, HCC/肝胆膵 肝がん 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2013 年 8 月 29 日-31 日。於：宮城県仙台市
- 10) 大川伸一、池田公史、奥坂拓志、山本俊介、鈴木郁恵、古瀬純司。GC33 の日本人進行性間細胞癌患者を対象とした第 I 相臨床試験 / A phase I study of GC33 in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Oral Session 32 OS32: Novel anti-cancer drugs 1/新規抗がん剤 ① 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2013 年 8 月 29 日-31 日。於：宮城県仙台市
- 11) 五十嵐久人、奥坂拓志、伊藤鉄英、西田俊朗、橋垣 学、木村信之、大木恵美子、澤木 明、山雄健次、今村正之。Phase II study of sunitinib (SU) in Japan patients with well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumor (NET). Poster Session 45/PS45: Novel anti-cancer drugs 2/新規抗がん剤② 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2013 年 8 月 29 日-31 日。於：宮城県仙台市
- 12) 坂本康成、尾島英知、近藤俊輔、森実千種、上野秀樹、奥坂拓志、金井弥栄。(一般口演 0-29)。進行胆道癌における薬効予測バイオマーカーとしての ERCC1 蛋白発現の意義。(胆道, 27(3), 2013) 第 49 回日本胆道学会学術集会。2013 年 9 月 19 日-20 日。於：千葉県舞浜市
- 13) 佐々木満仁、濱口哲弥、森実千種、後藤慶子、山田康秀、島田安博、近藤俊輔、上野秀樹、奥坂拓志、谷口浩和、平岡伸介、久嶋亮治。肝転移を有する切除不能消化器神経内分泌腫瘍に対する内科的治療の検討。(ポスターセッション 2) 膵・遠隔転移治療 P2-5) 第 1 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会。2013 年 9 月 28 日。於：京都市
- 14) 奥坂拓志、森実千種、池田公史。胆道癌・消化器神経内分泌腫瘍に対する分子標的薬—最近の動向。(シンポジウム 15: 消化器癌に対する分子標的治療薬—最近の動向 消 S15-6 指) (日本消化器病学会雑誌, 110, 臨時増刊号 (第 55 回大会), A625, 2013.) 第 55 回日本消化器病学会大会。2013 年 10