

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30万人以上と言われているが、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型肝硬変患者に対する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保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 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 型肝炎変に対する 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

特許取得；なし

実用新案登録；なし

その他