

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 井上和明 昭和大学藤が丘病院 准教授

研究要旨： 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しており治験薬の安全性を安全性評価委員として評価する。

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直前に復する等）。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) Watanabe T, Hatakeyama H, Matsuda-Yasui C, Sato Y, Sudoh M, Takagi A, Hirata Y, Ohtsuki T, Arai M, Inoue K, Harashima H, Kohara M. In vivo therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. *Sci Rep.* 2014 Apr 23;4:4750
- 2) Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 23;448(1):56-62.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- ①特許取得;なし
- ②実用新案登録;なし
- ③その

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 金沢大学形態機能病理学

研究要旨

C型慢性肝炎/肝硬変患者で抗ウイルス治療にて線維化の軽減が見られた症例では、 α SMA陽性筋線維芽細胞の減少、肝細胞における β カテニンおよびCBP活性化の減弱、エステラーゼ陽性好中球の増加を認めた。CBP/ β -カテニンの複合体形成を選択的に阻害するPRI-724は、ウイルス治療後脱線維化過程と類似の作用を示すことが示唆された。

A. 研究目的

PRI-724はCREB-binding protein(CBP)/ β -カテニンの複合体形成を選択的に阻害する低分子化合物であり、Wntシグナルが異常亢進している癌細胞に対して細胞増殖抑制作用を示す。一方、Wntシグナル伝達経路は肺線維症などの線維化にも関与しており、PRI-724がHCV慢性肝炎モデルマウスにおいて抗線維化作用を示すことも報告されている。我々の研究目的は、HCV関連の肝硬変患者に関してPRI-724が肝線維化を軽減することを確認し、更にPRI-724による抗線維化機序の基礎的解析を行うことである。本年度、我々はPRI724投与による組織学的効果判定基準の策定のため、3名の委員（琉球大学医学部附属病院病理部 齊尾征直先生、東京都立駒込病院病理科 比島恒和先生、金沢大学医学系形態機能病理学 原田憲一）で構成される治療効果評価委員会にて手順書を作成した。また、PRI724の脱線維化に関する機序解明に向けての予備的研究を以下の如く施行した。

B. 研究方法

対象:HCV感染患者のうち抗ウイルス治療前後で肝生検施行され、組織学的に線維化軽減がみられた症例12例を対象とした。なお、これらの症例は治療後にSVRが得られたものの肝細胞癌の合併またはその他の肝疾患の精査にて治療後に

肝生検が施行された症例である。肝生検前後の期間は1~12年。

方法:HE染色の他、シリウスレッド染色にて線維化を評価した。また、肝線維化および脱線維化に関与する細胞や分子として、①Wnt経路のシグナル伝達分子である β カテニン、CBP、P300、②活性化星細胞マーカーである α SMA、③portal fibroblastマーカーであるfibulin 2、④好中球マーカーである好中球エラスターゼ、⑤M2マクロファージのマーカーであるCD163、⑥活性化マクロファージマーカーであるIba-1(AIF1)、⑦細胞外マトリックス分解酵素であるMMP8の免疫組織化学的解析を施行した。

C. 結果

抗ウイルス治療にて線維化軽減を認めた対象症例について、肝線維化を新犬山分類にてstage1~stage4に評価した結果、12例中4症例は2ポイント、8例は1ポイントの線維化軽減を認めた。活動度(A0-3)については3例で不変であったが、その他は1ポイントの軽減を認めた症例であった。これらの症例を用いてウイルス治療前後で比較検討した結果、Wnt経路の関連分子である β カテニン、CBP、P300のうち、活性型を示唆する β カテニン、CBPの核発現は、C型慢性肝炎/肝硬変症例のinterface肝炎部周囲の肝細胞に発現を認め、12例中8例では治療後に β カテニンの核発現の軽減

を認め、CBP 発現の低下も 8 例に認めた(図 1)。しかし、p300 については増減を示す症例や不変の症例があり、一定の傾向は認めなかった。 α SMA 陽性の筋線維芽細胞は門脈域周囲の interface 肝炎付近に散見され、治療後では全例で筋線維芽細胞の減少が認められたが、門脈域内に存在する filubin 2 陽性の portal fibroblast については増減に関する明らかな傾向は認めなかった(図 1)。Iba1 (AIF-1)および CD163 は Kupffer 細胞に発現を認めたが、特に治療前後での傾向は認めなかった。MMP8 陽性細胞は形態学的に好中球であり、MMP8 陽性好中球数に明らかな傾向は認めなかったが、Neutrophil elastase 陽性好中球はほぼ全例(11 例)で細胞数の増加を認めた(図 1)。免疫染色のサマリを表 1 に示す。C 型慢性肝炎では、肝細胞をはじめ、あらゆる細胞が β カテニンが活性化しており、ウイルス消失により β カテニンおよび CBP 活性化が減弱、筋線維芽細胞の減少、エラスターゼ陽性好中球が増加した。

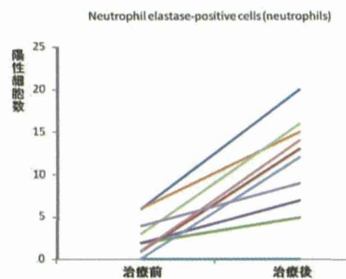
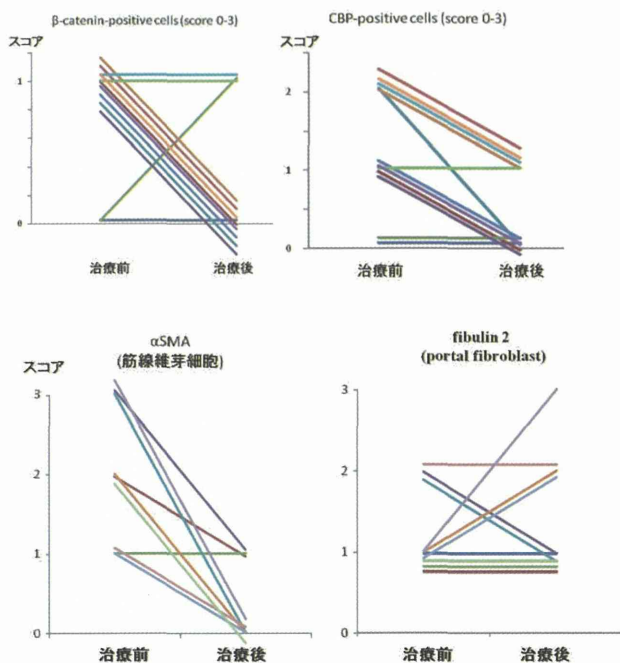


図 1 C型慢性肝炎の抗ウイルス治療前後の肝生検における β カテニン, CBP, α SMA, fibulin 2, 好中球エラスターゼ陽性細胞の変化。

	CH,C	
	CH~LC	Fibrosis resolving
線維化	Stage 1-4	↓
炎症	Activity 1-3	↓
β -catenin	肝細胞他	↓
P300	肝細胞他	→
CBP	肝細胞他	↓
活性化HSC	interface肝炎部	↓
portal fibroblast	門脈域内	→
Iba1	多数浸潤	→
M2 macrophage	多数浸潤	→
MMP8	少数散見	→
好中球エラスターゼ	少数散見	↑

表 1 C型慢性肝炎/肝硬変の線維軽減過程における各因子、細胞数の推移のまとめ

D. 考察

肝線維化の発生および進展に、活性化肝星細胞から筋線維芽細胞への分化と細胞外マトリックスの異常増加が重要である。今回の検討により α SMA 陽性の活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)はC型肝炎/肝硬変の interface 肝炎部を中心に多数出現し、活性化肝星細胞は線維促進の一因であることが確認出来た。また、抗ウイルス治療にて SVR となり線維化が軽減した症例では、肝炎性活動度の軽減と共に筋線維芽細胞も減少しており、活性化肝星細胞の減少は抗線維化の重要な因子であることが示唆された。fibulin 2 陽性 portal fibroblast に関しては、C型慢性肝炎の線維化の程度および治療前後にかかわらず門脈域内に局限して分布していたが、線維化の進展および軽減における明

らかな関与については見いだせなかった。βカテニン-CBP-p300 シグナル系の発現については肝細胞をはじめあらゆる細胞に核発現を認め、肝星細胞における発現に関する詳細については今後更に検討する必要がある。肝細胞における発現を見た限りでは、治療後線維化の軽減とともにβカテニンおよびCBPの活性化が減弱していた。このようなシグナル伝達系の変化はCBP活性化阻害を示すPRI724の作用効果と類似の変化と推定された。また、HCVトランスジェニックマウスを用いた検討では、PRI-724投与による抗線維化の作用機序として単球/マクロファージ、好中球などの炎症性細胞の増加および肝内MMP8の上昇が指摘されている。今回の抗ウイルス治療前後の肝生検で検討した結果では、Iba1 (AIF-1)やCD163(M2)陽性のKupffer細胞に治療前後での明らかな差はなかった。またMMP8陽性好中球に関しても明らかな差異は認めなかったが、好中球エラストラーゼ陽性好中球は線維化軽減とともに細胞数の増加を認めた。このようにMMP8, 好中球エラストラーゼによる好中球の同定では相違が生じたが、好中球の数のみならず機能の変化も反映していると推測され、今後更に検討する必要がある。

E. 結論

C型慢性肝炎/肝硬変からの線維化軽減過程においてαSMA陽性筋線維芽細胞の減少、エラストラーゼ陽性好中球およびβカテニン-CBP-p300シグナル系伝達系の変化が関与している事が示唆された。CBP/β-カテニンの複合体形成を選択的に阻害するPRI-724は治療後線維化軽減過程と類似の作用を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原田憲一. 特集 肝良性腫瘍および類似病変の

病理・画像診断 update. 肝良性腫瘍の病理診断. 画像診断 2015;35(2):148-157

2) Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Furubo S, Song JY, Nakanuma Y. Activation of the PI3K/mTOR Pathway Is Involved in Cystic Proliferation of Cholangiocytes of the PCK Rat. PLoS One. 2014 Jan 30;9(1):e87660.

3) 原田 憲一. 特集：臨床・画像・病理トライアングル 肝細胞癌と鑑別を要する疾患.

病理学的に肝細胞癌と鑑別を要する疾患. 映像情報メディカル 2014;46(5):418-420

4) 原田 憲一. 今月の話題. 胆管癌と鑑別を要する良性胆管狭窄. 病理と臨床 2014;32(4):446-447

5) 原田 憲一. メディカルインフォメーション医療 up-to-date. 良性胆管狭窄を来す胆道系炎症性疾患. 石川医報 2014;10(2):第1573号:27-29

2. 学会発表

1) 原田 憲一、池田 博子、佐藤 保則、中沼安二. 胆道系腫瘍および前癌病変におけるglucose transporter1の発現. 第103回日本病理学会総会 (平成26年4月24日～26日、広島)

2) 原田 憲一. 肝胆膵 肝細胞癌と鑑別を要する疾患：病理. 第33回日本画像医学会 (2014年2月22日、東京)

3) 原田 憲一. PBCの病態および診断に関する最近の知見. 第10回新潟PBC研究会 (2014年6月26日、新潟市 新潟グランドホテル)

4) Harada K. Cholangiocarcinoma with respect IgG4 Reaction. IAP (2014.Oct 5-10, Bangkok, Thailand)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

①特許取得 特になし

②実用新案登録 特になし

③その他

マウス肝線維化における Wnt/ β -catenin シグナルの関与

研究分担者 大澤 陽介 東京都立駒込病院 肝臓内科

研究要旨

肝線維化における Wnt/ β -catenin シグナルの役割を Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤 PRI-724 を用いて検討した。四塩化炭素および胆管結紮誘導肝線維化モデルにおいて、PRI-724 は肝線維化を抑制することが示唆され、その機序のひとつとして肝星細胞の活性化の抑制が関与することが示唆された。

A. 研究目的

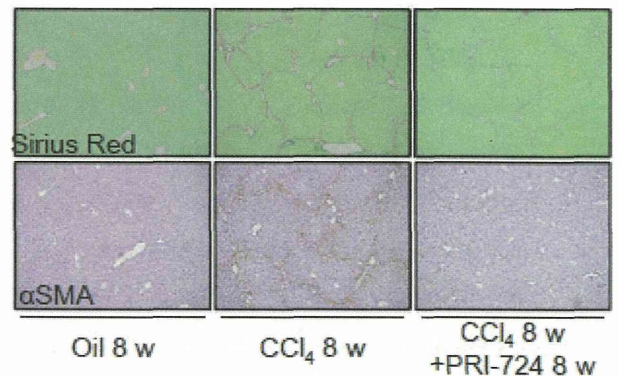
種々の疾患において、線維化や組織修復異常に Wnt/ β -catenin シグナルの関与が報告されている。そこで、肝硬変における Wnt/ β -catenin シグナルの関与を解析するために、動物実験モデルを用いて肝臓線維化における Wnt/ β -catenin シグナル活性化とその阻害剤の影響を検討した。

B. 研究方法

マウスに四塩化炭素投与あるいは胆管結紮を施すことにより肝線維化を誘導した。Wnt/ β -catenin シグナルの活性化を S100A4 の発現を比較することにより検討した。また、Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤を用いて線維化に対する影響を検討した。Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤として、PRI-724 を使用した。PRI-724 は生体内で活性分子種の C-82 に変換され、cAMP 応答エレメント結合蛋白 (CREB) 結合蛋白 (CBP) と β -カテニンとの相互作用を阻害することにより Wnt/ β -catenin シグナルを阻害する低分子化合物である。次に、PRI-724 の抗線維化作用の機序を検討するため、マウス肝臓より星細胞を分離し、その活性化における PRI-724 活性化体 C-82 の影響を検討した。

C. 研究結果

S100A4 の発現は線維化を誘導した肝臓において発現が上昇し、PRI-724 の投与により発現上昇が抑制された。PRI-724 の投与により、シリウスレッド染色およびヒドロキシプロリン量、 α -SMA 発現の上昇は抑制された(下図)。



• Balb/c male mice were treated with CCl₄ plus PRI-724 or PBS for eight weeks. Collagen deposition was assessed by Sirius Red staining (upper panel) The expression of α SMA was examined by immunohistochemistry with an anti- α SMA antibody (lower panel) (original magnification $\times 42$).

初代培養星細胞をプラスチックディッシュ上で培養すると活性化による形態の変化が認められるが、C-82 の培養上清への添加

により抑制された。さらに、collagen $\alpha 1(I)$, α -SMA, TIMP-1 mRNA 発現の上昇も抑制された。

D. 考察

肝線維化に伴って Wnt/ β -catenin シグナルが活性化することが示唆された。また、阻害剤により肝線維化が抑制されたことより、このシグナルの活性化が肝線維化に関与しており、その機序のひとつとして肝星細胞の活性化の抑制が関与することが示唆された。

E. 結論

Wnt/ β -catenin シグナルは肝線維化に関与する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Saito K, Seishima M. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Reduces Mortality from Peritonitis and Sepsis in Mice by Regulating Functions of CD11b+ Peritoneal Cells. *Infect Immun.* 82, 4487-4495, 2014.

2. 学会発表

1) 大澤陽介 森脇久隆:胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおける Kupffer 細胞と TNF- α の役割. 第 50 回日本肝臓学会総会 東京 2014

2) 大澤陽介 森脇久隆:シンポジウム 2「消化管癌の分子病態学に関する進歩」大腸癌細胞由来転移性肝腫瘍の増殖における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割. 第 100 回日本消化器病学会総会, 東京, 2014.

3) 大澤陽介 木村公則: 大腸癌細胞由来転移性肝腫瘍の増殖における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割. 第 25 回「The Meeting of Liver and Immunology」京都 2014

4) 大澤陽介 木村公則: 大腸癌細胞由来転移性肝腫瘍の増殖における酸性スフィンゴミエリナーゼの役割. 広島シンポジウム 広島 2014

5) 大澤陽介 今村潤 木村公則:胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおける Kupffer 細胞と TNF- α の役割 第 28 回肝類洞壁細胞研究会学術集会 岡山 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

- ①特許取得 なし
- ②実用新案登録 なし
- ③その他 なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hara.M. Matsuura.T <u>Kojima.S</u>	TGF-β LAP degradation products, a novel biomarker and promising therapeutic target for liver fibrogenesis.	Nakao, K., Minato, N., and Umeto, S. eds	Innovative Medicine : Basic Research and Development	Springer	Tokyo	2015	In press
<u>原田憲一</u> 中沼安二	自己免疫性肝疾患の病理診断	大平弘正 坂井田功	HEPATOLOGY PRACTICE 第4巻	文光堂	東京	2014	50-57
<u>Kenichi Harada</u>	Histological Findings of Autoimmune Hepatitis	Hiromasa Ohira	Autoimmune Liver Diseases	Springer Japan	Tokyo	2014	45-65

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aoki J, <u>Kimura K.</u> , Kakihana K, Ohashi K, Sakamaki H.	Efficacy and tolerability of Entecavir for hepatitis B virus infection after hematopoietic stem cell transplantation.	Springer Plus	Aug 20		2014
<u>Kimura K.</u>	Should we try anti-viral therapy for hepatitis C virus infection with pyoderma gangrenosum-like lesions?	Hepatol Res	Feb;44(2)	173-5	2014

Hara.M. Matsuura.T <u>Kojima.S</u>	LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis	<i>SpringerPlus</i>	3	221	2014
Hosoya S, <u>Ikejima K</u> , 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.	304	G293-9	2013
<u>Okusaka T</u> , Ueno H, Ikeda M, Mitsunaga S, Ozaka M, Ishii H, Yokosuka O, Ooka Y, Yoshimoto R, Yanagihara Y, Okita K.	A phase 1, open-label, non-randomized trial of OPB-31121, a STAT3 inhibitor, in patients with advanced hepatocellular carcinoma	Hepatology Research			
Shiba S, <u>Okusaka T</u> et al.	Characteristics of 18 patients with hepatocellular carcinoma who obtained a complete response after treatment with sorafenib.	Hepatology Research	44(13)	1268-127 6	2014
Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, <u>Okusaka T</u> , Kosuge A, Shibata T.	FGFR2 tyrosine kinase fusion define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma.	Hepatology,	59(4)	1427-143 4	2014
Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, <u>Okusaka T</u> , et al	Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes.	Nat Genet	46(12)	1267-127 3	2014
Watanabe T, Hatakeyama H,	In vivo therapeutic potential of Dicer-hunting	Sci Rep.	23	4:4750	2014

Matsuda-Yasui C, Sato Y, Sudoh M, Takagi A, Hirata Y, Ohtsuki T, Arai M, <u>Inoue K</u> , Harashima H, Kohara M.	siRNAs targeting infectious hepatitis C virus.				
Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, <u>Inoue K</u> , Kohara M.	Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins.	Biochem Biophys Res Commun.	448(1)	56-62	2014
<u>原田 憲一</u>	肝良性腫瘍の病理診断	画像診断	35(2)	148-157	2015
Ren XS, Sato Y, <u>Harada K</u> , Sasaki M, Furubo S, Song JY, Nakanuma Y.	Activation of the PI3K/mTOR Pathway Is Involved in Cystic Proliferation of Cholangiocytes of the PCK Rat.	PLoS One.	30;9(1)	e87660. (1-14)	2014
<u>原田 憲一</u>	病理学的に肝細胞癌と鑑 別を要する疾患	映像情報メデ ィカル	46(5)	418-420	2014
<u>原田 憲一</u>	胆管癌と鑑別を要する良 性胆管狭窄	病理と臨床	32(4)	446-447	2014
<u>原田 憲一</u>	良性胆管狭窄を来す胆道 系炎症性疾患	石川医報	10(2)	27-29	2014
Hoshi M, <u>Osawa Y</u> , Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Saito K, Seishima M.	Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Reduces Mortality from Peritonitis and Sepsis in Mice by Regulating Functions of CD11b+ Peritoneal Cells.	Infect Immun.	82	4487-4495	2014.

IV 研究成果の刊行物・別刷

TGF- β LAP degradation products, a novel biomarker and promising therapeutic target for liver fibrogenesis

Mitsuko Hara¹, m-hara@riken.jp

Tomokazu Matsuura², matsuurat@jikei.ac.jp

and Soichi Kojima^{1,*}, skojima@riken.jp

¹ Micro-Signaling Regulation Technology Unit, RIKEN Center for Life Science Technologies, Wako, Saitama 351-0918, Japan;

²Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105-0003, Japan;

Corresponding Author:

Soichi Kojima, PhD. skojima@riken.jp

Address: 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0918, Japan.

Phone: +81-48-467-7938; fax: +81-48-462-4675

List of Abbreviations:

ECM, extracellular matrix; HSCs, hepatic stellate cells; α SMA, α smooth muscle actin; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; LAP, latency associated protein; SLC, small latent complex; LTBP, latent TGF- β binding protein; LLC, large latent complex; PLN, plasmin; PLK, plasma kallikrein; LAP-DP, LAP degradation products; LAP β 1, TGF- β 1 LAP; BDL, bile duct ligation; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

Abstract

While there are many blood and/or tissue biomarkers as well as algorithms clinically used to assess hepatic fibrosis, a good biomarker and therapeutic target of hepatic fibrogenesis, which reflects profibrotic changes, has not been established. The most fibrogenic cytokine, transforming growth factor (TGF)- β , is produced as a latent complex, in which TGF- β is trapped by its propeptide. On the surface of activated hepatic stellate cells, plasma kallikrein activates TGF- β by cleaving LAP between R⁵⁸ and L⁵⁹ residues, releasing active TGF- β from the complex. We made specific antibodies that recognize neo C-terminal (R⁵⁸) and N-terminal (L⁵⁹) ends of LAP degradation products (LAP-DP) and found that LAP-DP may serve as a novel surrogate marker of TGF- β activation, namely generation of active TGF- β , thereby a therapeutic marker for TGF- β -mediated liver fibrogenesis in patients and is also used to monitor effects of anti-fibrogenic factors or compounds for discovery of a novel anti-fibrosis drug.

Keywords

Biomarkers; hepatic fibrogenesis; TGF- β ; LAP; latent TGF- β activation; hepatic stellate cells; plasma kallikrein; LAP-DP; drug discovery; anti-fibrosis drug.

Introduction of liver fibrogenesis

Hepatic fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrices (ECM; mainly collagen) in the perisinusoidal space (or space of Disse) in the liver, and an important pathological step developing from chronic hepatitis to liver cirrhosis irrespective of etiologies [1], whereas hepatic fibrogenesis means fibrosis progression or an ongoing reaction producing excessive ECM, sometimes nonsymptomatic, in the liver [2]. While there are many blood and/or tissue biomarkers as well as algorithms clinically used to assess hepatic fibrosis [3-7], a golden standard is still scoring stained collagen fibers in the biopsy sample [3]. However, biopsy is invasive and risky. Imaging techniques including ultrasound elastography have been developed [3]. In contrast, a good biomarker and therapeutic target of hepatic fibrogenesis, which reflects prefibrotic changes, has not been established [2, 3]. Therefore, development of a noninvasive biomarker for hepatic fibrogenesis, which will lead to not only establishment of a novel diagnosis useful to prevent liver fibrosis/cirrhosis, but also acceleration of drug discovery and development against liver fibrosis, is in high demand [3].

Activation of hepatic stellate cells (HSCs)

Hepatic stellate cells (HSCs) play a central role in the pathogenesis of hepatic fibrosis by virtue of their ability to undergo a process termed activation [1, 2]. During this process, HSCs transform into myofibroblast-like cells accompanying several key phenotypic changes, which collectively increase extracellular matrix accumulation [1-3]. These include (1) cellular proliferation caused by upregulation of mitogenic cytokines

and their receptors; (2) morphologic changes with loss of stored vitamin A droplets; (3) contractility caused by increased α smooth muscle actin (α SMA), which may constrict sinusoidal blood flow; and (4) fibrogenesis mainly caused by increased synthesis and release of collagen.

TGF- β and its activation reaction

Among many cytokines and growth factors related to fibrogenesis, the most potent therefore “the most fibrogenic” cytokine is the 25 kD homodimeric cytokine, transforming growth factor (TGF)- β [8]. The TGF- β family is composed of 3 subtypes (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3), with biological properties that are nearly identical [8]. TGF- β is produced as an inactive latent complex, in which active TGF- β is trapped by its propeptide, latency associated protein (LAP), and for exerting its biological activities, must be released from the complex [9]. This reaction is called activation of TGF- β (Fig. 1). TGF- β 1 is produced as a 390 amino acid precursor protein consisting of a signal peptide of 29 amino acids, an N-terminal LAP, and a C-terminal region that becomes the active TGF- β 1 molecule, and each region dimerized through S-S bonds. After processing by cleavage at R²⁷⁸-A²⁷⁹ by a furin-like protease, the LAP still non-covalently captures the active TGF- β 1, forming small latent complex (SLC) and preventing active TGF- β 1 from binding its cognate receptors [9]. The active TGF- β 1 and the LAP homodimers are 25 kD and 75 kD, respectively. SLC is S-S bonded to another gene product, the latent TGF- β binding protein (LTBP), via C³³ residues, forming the large latent complex (LLC). This complex can be sequestered in the ECM

(Fig. 1) [10] because LTBP is a member of an ECM protein family, fibrillin [11].

Activation of latent TGF- β is performed through different mechanisms depending on the tissue and cell types and experimental conditions and several molecules are known to activate TGF- β 1 in animal models [12-21]. These include integrins [12-15], thrombospondin [16], and proteases, such as matrix metalloproteinases and serine proteases [17-21]. The integrin α v β 6 binds to and activates latent TGF- β and plays a role in regulating pulmonary inflammation and fibrosis as well as biliary fibrosis [12-15]. Thrombospondin 1 is another major activator of latent TGF- β , especially in the lung and pancreas, by binding to a defined site within LAP and inducing a conformational change in the latent complex [16]. In the normal liver, TGF- β is produced and secreted from sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells (KCs, resident macrophages in the liver) at low levels. Elevated production of TGF- β was seen first in all cell types and then mainly in hepatocytes and HSCs after partial hepatectomy, whereas elevated production of TGF- β was seen solely in HSCs after inflammation and fibrosis [22]. TGF- β secreted from HPCs is entirely in the latent form, whereas TGF- β secreted from HSCs is 50%–90% in the active form [22]. Thus, HSCs are recognized as the major source of active TGF- β , namely the site of TGF- β activation, particularly in the damaged liver [22, 23].

We have addressed a potential proteolytic mechanism for latent TGF- β activation in HSCs by surface plasmin (PLN) and plasma kallikrein (PLK) during the formation of hepatic fibrosis [20, 21]. PLN releases latent TGF- β from the extracellular matrix and activates it by cleaving LAP from latent TGF- β molecules on the HSC surface [9, 20].

Lyons R.M. *et al.* first reported that PLN digests LAP and activates TGF- β 1 *in vitro* [24]. Using a protease inhibitor, Camostat Mesilate, we demonstrated that PLN and PLK are involved in the TGF- β 1 activation associated with liver fibrosis and impaired liver regeneration in animal models [20, 21]. However, it remained to be elucidated whether PLN- and/or PLK-dependent TGF- β 1 activation also occurs during the pathogenesis of liver fibrosis in patients as there was no good biomarker reflecting protease-dependent TGF- β 1 activation reaction. To answer this question, we determined cleavage site within LAP and made specific antibodies that recognize LAP degradation products (LAP-DP) bearing neo amino or carboxyl terminus [25].

TGF- β LAP-DP serves as a surrogate marker for its activation reaction

To identify the cleavage sites in LAP during latent TGF- β 1 activation by PLN and PLK, recombinant human LAP β 1 was digested with these proteases, the resultant fragments were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and the N-terminal sequence of each LAP-DPs were determined using a pulsed liquid protein sequencer Precise 494cLC, which revealed that PLN and PLK primarily cleave LAP β 1 between K⁵⁶ and L⁵⁷ residues, and R⁵⁸ and L⁵⁹ residues, respectively, during proteolytic activation of latent TGF- β 1 (Fig. 2) [25].

To detect PLK-produced LAP-DPs, we made two monoclonal antibodies. One is the R58 antibody detecting N-terminal side LAP-DPs terminating on R⁵⁸ residue (R⁵⁸ LAP-DPs), and another is L59 antibody detecting C-terminal side LAP-DPs starting from L⁵⁹ residue (L⁵⁹ LAP-DPs). We established techniques to detect each LAP-DP

using these antibodies [25]. The R⁵⁸ LAP-DPs remaining in tissues or cell surfaces through S-S bonded LTBP can be detected mostly in α SMA- positive activated stellate cells in liver tissues from both fibrotic animals and patients by immunostaining with the R58 antibody, whereas the L⁵⁹ LAP-DPs was not detectable by immunostaining with the L59 antibody [25]. Figure 3 is the results obtained from bile duct ligation (BDL) mice. Those mice often exhibited granulomatous lesions (*panel a*), in which fibroblastic cells infiltrated and started ECM production (*panel b*). Importantly, the R⁵⁸ LAP-DPs were detected in granulomatous lesions prior to Sirius red positivity, namely before collagen accumulation (arrowheads in *panel c*). In contrast, L59 antibody failed to stain the L⁵⁹ LAP-DPs with although various antigen unmasking procedures were treated (*panel d*). We found that the L⁵⁹ LAP-DPs were released into blood and could be measured by the ELISA using the L59 antibody (Hara et al., unpublished data). In panels *e-h*, nonparenchymal regions were recognized by antibody R58 (arrowheads in *panel e*), and mostly overlapped with α SMA-positive HSCs (arrowheads in *panel f*), but not with CD31-positive liver sinusoidal endothelial cells (*panel g*) nor with CD68-positive Kupffer cells (hepatic macrophages) (*panel h*). We further found that the R58 antibody detected TGF- β 1/3 LAP-DPs but not TGF- β 2 LAP-DPs due to the similarity and difference of the R58 side sequence, respectively (Fig. 2). Finally, we succeeded to detect R⁵⁸ LAP-DPs in patients with chronic hepatitis B and C virus (HBV and HCV, respectively) infection categorized as A1F2 and A2F2 as well as in patients with non-viral hepatitis, such as autoimmune hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [25]. A specific cell shape called crown-like structure or CLS is referred to a