

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 部長
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
井上和明 昭和大学藤が丘病院 准教授
原田憲一 金沢大学医薬保健総合研究科形態機能病理学 教授
大澤陽介 東京都立駒込病院肝臓内科 医長

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、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にした肝硬変治療薬を開発することは重要な課題である。Wntシグナルは成体の分化、細胞増殖に関与しており、発癌のメカニズムに重要な因子の一つである。最近、WntシグナルがTGF- β を介して線維化にも関与していることが報告された。PRI-724は、Prism Pharmaが開発した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である。現在、米国で大腸癌等の固形腫瘍に対してがん臨床試験が開始されている。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肝線維化像において著しい改善が認められた。また四塩化炭素および胆管結紮を用いた線維化モデルを用いても、PRI-724投与により抗線維化作用を認めた。今年度はPRI-724の作用機序として、肝星細胞の活性化を抑制することを見出し、Ly-6C^{low}マクロファージの関与を示した。また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）に対する治験届をH26年5月にPMDAに申請し9月より登録開始となった。H27年3月時点で、登録症例は5名（男4女1）、Child A2例、Child B3例投与開始した。現在治験薬に関係する重篤な有害事象は認めていない。

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

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、井上) : 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 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。

(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、6 症例において、Child-Pugh Score A および B それ

ぞれ 3 症例の第 1 サイクルの治療がすべて完了し、かつ第 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。また Child-Pugh Score A および B ごとに 3 症例の確認で、次コホートへステップ移行可能である。

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。

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。
- (6) H26年5月PMDAに治験届を提出し9月より登録開始となった。H27年3月時点で、登録症例は5名（男4女1）、Child A2例、Child B3例投与開始した。現在治験薬に係る重篤な有害事象は認めていない。

• 研究分担者(小嶋)

- (1) 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。この時、non-Tgマウス群と比較してHCV-Tgマウス群で血漿中L59 LAP断片量が増加し、PRI-724投与により増加が抑制された。このことから、PRI-724による抗線維化作用にPLK依存性TGF- β 活性化が何らかの関与をしていることが示唆された。ヒドロキシプロリン量と血漿中L59 LAP断片量は、個体ごとでは相関が見られなかったが、群毎では緩やかな相関が見られた。
- (2) PRI-724の抗線維化活性を肝臓ヒ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、井上)

- (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」の効果安全性評価委員を担当した。Child B、10mg/m²/day投与群が3例登録後、第1サイクル終了時のPK値の結果をもとに効果安全性評価委員会を開催し、次の用量への移行を承認した。

• 研究分担者(原田)

- (1) 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stage 1～stage 4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。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filbin 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。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。

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、エラストラーゼ陽性好中球が増加した。

• 研究分担者(大澤)

- (1) 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。
- (2) 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 1(I), α-SMA, TIMP-1 mRNA発現の上昇も抑制された。

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型肝硬変患者のうち年率約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型肝硬変の治療には、代償性の場合C型慢性肝炎と同様に、HCVの排除を目指すインターフェロンとリバビリン等の併用による抗ウイルス療法が行われる。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。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ことが多い。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Ⅲ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で治験を行い、駒込病院単施設での実施である。PMDAとの対面助言により1)1コホート6例中、Child A, Bそれぞれ3例ずつ実施すること2)全例に投与後薬物血中濃度(PK)を測定し、投与量を増加する際に安全性をチェックすることなどプロトコルを修正した。PMDAに治験届を5月に提出し、9月より症例登録開始となった。

現在 Child A 症例 1 例、Child B 症例 3 例が投与終了となっており、治験薬との因果関係のある重篤な有害事象は認められていない。今後引き続き症例登録を増やし、治験を遂行していく。

(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。今年度は更に、HCV Tg マウス以外の肝線維化マウスモデル (四塩化炭素、胆管結紮) でも PRI-724 の抗線維化効果を検討した。両線維化モデルを用いても同様に PRI-724 は線維増生を低下させており、抗線維化作用を有することを確認した。作用機序として、肝星細胞の活性化抑制及び CD11b+Ly6C+マクロファージの関与を示しており今後更に解析を進めたい。最後に、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。次年度では初代ヒト肝細胞、マウス肝細胞株などを用いて PRI-724 の作用を検討したい。

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) Aoki J, Kimura K, Kakihana K, Ohashi K, Sakamaki H. Efficacy and tolerability of Entecavir for hepatitis B virus infection after hematopoietic stem cell transplantation. Springer Plus 2014 Aug 20;3:450

2) Kimura K. Should we try anti-viral therapy for hepatitis C virus infection with pyoderma gangrenosum-like lesions? Hepatol Res. 2014 Feb;44(2):173-5.

2. 学会発表

1) Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP-signaling ameliorates hepatitis C virus-induced fibrosis Tokunaga, Y., Kimura, K., Ohtsuki, T., Hayashi, Y., Hara, M., Munekata, K., Hishima, T., Kouji, H., Kojima, S., and Kohara, M. 21st International symposium on hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7 The Fairmont Banff Springs (Banff, Canada)

2) 選択的 Wnt/ β -catenin/CBP シグナル阻害剤による肝線維症改善作用 徳永 優子、木村 公則、大槻 貴博、林 幸子、原 詳子、宗片 圭祐、比島 恒和、小嶋 聡一、小原 道法 日本ウイルス学会 2014.11.11 パシフィコ横浜、日本

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

