

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

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
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
研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・・・	35
研究成果の刊行物・別刷	・・・・・・・・・・	41

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

血漿 TGF- 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/ 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 効果を評価する。

(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)。

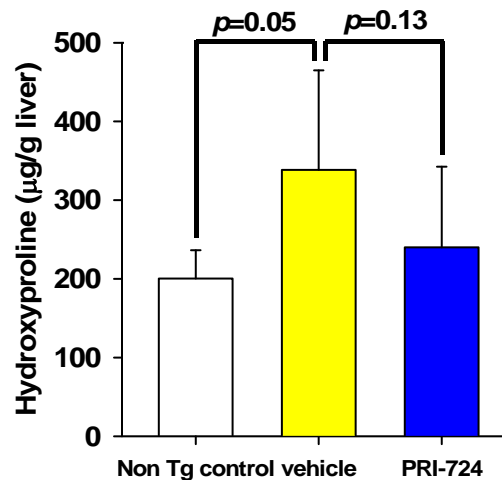


図 1. PRI-724 投与によるコラーゲン蓄積量減少

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- 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- . *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-de-pendent TGF- 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- promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- 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- 疑似活性を介した肝線維化誘導機構 - TNF- 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

特許取得

小嶋聡一、近藤和嘉子、堂前直「TGF - 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)

実用新案登録 特になし

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

特許取得：特になし

実用新案登録：特になし

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 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, Shiota 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 / 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 回日本肝臓学会 .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 survival with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Oral Session 29 OS29: Hepatobiliary and Pancreatic Cancer, Pancreatic Cancer3 / 肝胆膵 膵がん 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
- 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 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 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 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

月9日-12日．於：東京都

- 15) 池田公史、奥坂拓志．肝細胞癌に対する分子標的治療薬 - 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S15-4 指Y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月9日-12日．於：東京都

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

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: HCV 関連の前硬変肝/肝硬変患者の肝実質では、組織学的正常肝に較べて活性化星細胞、TGF- β 、MMP、Wnt 経路の関連分子の発現パターンが異なっており、また好中球や CD11b 陽性細胞の減少も見られ、肝線維化進展との関連性が示唆された。また、HCV 肝硬変の門脈域には細胆管反応を伴う interface 肝炎を認めるが、胆管細胞は自然免疫応答や炎症性サイトカイン刺激にて肝星細胞走化性分子 MCP1 を産生し、胆管細胞が直接肝星細胞を誘導し肝線維化に加担することが示唆された。PRI-724 投与による抗線維化機序を解明するため、Wnt シグナル伝達系の変化に加えて、肝星細胞、細胞外マトリックス分解酵素、炎症細胞および胆管細胞の観点からも解析する必要がある。

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 HCV 関連肝硬変における肝線維化機序の病理学的解析ならびに Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)を介した肝線維化における胆管細胞の関与について解析を行い、PRI-724 にて期待される抗線維化の機序解明に向けての予備的研究を施行した。

B. 研究方法

B-1: 肝組織における肝線維化関連因子の検出

対象：HCV 感染患者より診断目的に施行され

た肝生検材料で病理学的に F3~F4 相当の進行性肝疾患(前硬変肝~肝硬変)と診断された 10 例の肝針生検を対象とした。また、対照群として原因不明の肝障害患者より診断目的に肝生検が施行され、組織学的に特異的な所見が見られなかった症例(組織学的正常肝) 5 例を用いた。

方法：肝線維化および脱線維化に關与する細胞や分子として、活性化星細胞マーカーである SMA、好中球マーカーである好中球エラストラーゼ、単球/マクロファージマーカーで NK 細胞、顆粒球にも発現する CD11b、M2 マクロファージのマーカーである CD163、主要な profibrogenic factor である TGF- β 、細胞外マトリックス分解酵素である MMP1、MMP8、Wnt 経路のシグナル伝達分子である β -カテニン、CBP、P300 の免疫組織化学的解析を施行した。

B-2: 肝線維化進展における胆管細胞の関与

対象：培養ヒト胆管細胞 2 株、ヒト肝星細胞株(LI90, HSRRB より分与)および HCV 関連慢性肝炎の他、各種肝疾患患者より得られた肝針生検。

方法：ヒト培養胆管細胞における profibrogenic factor (MCP-1, PDGF-B, CTGF, endothelin 1, TGF- β) の mRNA を PCR 法にて検出し、さらに poly(I:C) (TLR3 リガンド), Pam3CSK4 (TLR1/2 リガンド), LPS (TLR4 リガンド) または炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN γ , TNF α) 刺激による profibrogenic factor の動態を解析するため、Real-time PCR および一部 ELISA 法にて検出した。また、ヒト肝星細胞株における MCP-1 受容体 (CCR2) の発現および TLR リガンドや炎症性サイトカイン刺激による動態を検討した。最後に、肝組織切片を対象に、MCP-1, SMA, CCR2 の免疫組織化学的染色を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認済みである。課題名：「胆道系炎症性疾患および胆道系腫瘍の病理学的解析 - 病理検体の研究目的での使用について - 」(審査番号 305)。

C. 結果

C-1: 肝組織における肝線維化関連因子の検出

組織学的正常肝では、好中球エラスターゼ陽性好中球および CD11b 陽性細胞を実質内に散見したが、HCV 前硬変/肝硬変症例ではこれらの陽性細胞はごく少数のみであり、正常肝に比べて減少していた。CD163 陽性の M2 マクロファージは正常肝、HCV 症例ともに実質内に多数の細胞を認め、両群間で明らかな差は認めなかった。SMA 陽性の活性化肝星細胞は主に HCV 症例の interface 肝炎を伴う門脈域周囲に多数認めた。TGF- β 陽性細胞は、HCV 症例の類洞内細胞に散見し、また実質内の壊死部の肝細胞にも陽性所見を認めた。MMP1, MMP8 は好中球等の多核白血球の他、肝細胞に弱い発現を認め、MMP1 は胆管にも弱い発現を認めた。Wnt 経路の関連

分子である カテニン, CBP, P300 のうち、活性型を示唆する カテニン, CBP の核発現は、HCV 症例の interface 肝炎部周囲の肝細胞に発現を認めた。しかし、P300 の発現は正常肝の実質肝細胞にびまん性に発現を認めるものの、HCV 症例では全体的に P300 の発現が低下していた。

C-2: 肝線維化進展における胆管細胞の関与

培養ヒト胆管細胞を用いた検討にて、胆管細胞から MCP-1, PDGF-B, CTGF, endothelin 1, TGF- β のすべての profibrogenic factor の mRNA を検出できた。また、TLR リガンド (Pam3CSK4, poly(I:C), LPS) および炎症性サイトカインの IL-1 β , TNF α の刺激にて MCP1 発現の亢進が見られ(図 1)、ELISA 法でも MCP1 蛋白の分泌および産生亢進が確認出来た(培養上清中で 8-10ng/ml)(図 2)。また、ヒト肝星細胞は MCP1 リガンドである CCR2 を発現していなかったが、poly(I:C) および TNF α 刺激にて CCR2 発現の誘導が見られた。また、肝組織切片を用いた免疫組織化学的検討にて、MCP1 の発現は門脈域周囲の増生細胆管に発現を認め、同部では SMA および CCR2 陽性の活性化肝星細胞も見られた(図 3)。

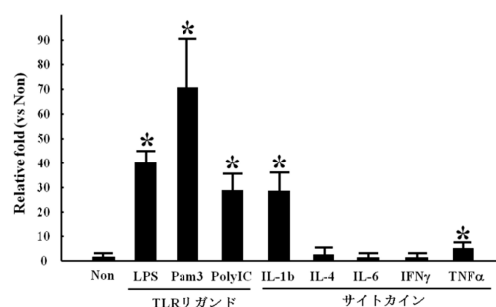


図 1 培養胆管細胞における TLR リガンド、炎症性サイトカイン刺激による MCP-1 mRNA 発現の変化。Real time PCR 法。* < 0.01.

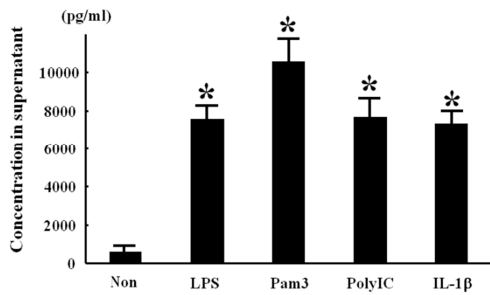


図2 培養胆管細胞におけるTLRリガンド,炎症性サイトカイン刺激による培養上清中MCP-1蛋白濃度。ELISA法。* < 0.01.

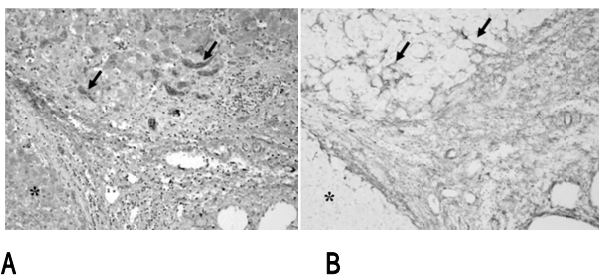


図3 HCV関連肝硬変。MCP1(A), SMA(B)の免疫染色。MCP1陽性の細胆管増生部位にはSMA陽性活性化肝星細胞を散見するが(矢印)、細胆管増生を認めない部位ではSMA陽性活性化肝星細胞は認めない(*)。

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SMA陽性の活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)はHCV前硬変肝/肝硬変のinterface肝炎部を中心に多数出現し、静止期の線維芽細胞に対して活性化した線維芽細胞の遺伝子発現を引き起こすTGFの発現も見られた。また、HCV症例では組織学的正常肝に較べて好中球、CD11b陽性細胞が減少していた。好中球はMMP1, MMP8を産生する細胞であり、HCV前硬変肝/肝硬変ではMMP関連の線溶系機能不全が起って

いることが示唆された。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MMP-8の上昇が指摘されており、ヒトHCV患者でもPRI-724投与による同様な抗線維化機構が期待される。また、活性型カテニン、CBPの発現をinterface肝炎部周囲の肝細胞に認め、PRI-724の有効性が期待される所見と考えられた。なお、CD163陽性細胞はいわゆるM2マクロファージと解されているが、今回の検討では正常肝、HCV肝ともに多数の陽性細胞を類洞内に認め、CD163陽性クッパー細胞の明らかな増減は認めなかった。

MCP-1は単球/マクロファージの走化性因子および活性化因子として作用するケモカインで、また肝星細胞の走化性因子として肝線維化にも関与する(Marra et al., *Hepatology*, 1999)。今回の検討により、MCP1産生細胞としてinterface肝炎部に出現する増生細胆管を見出し、特にTLRを介した自然免疫応答およびIL-1等による炎症性サイトカインによるMCP1発現の誘導が見られた。細胆管増生は種々の病的肝で出現する非特異的反応であるが、慢性進行性肝疾患では特に目立つ組織反応であり、病期進展に大きく関連することが推測されている。しかし、病期進展の直接的な関与の機序については不明であったが、今回の検討により、増生細胆管の胆管細胞は自然免疫応答や炎症性反応によりMCP1を産生し、肝星細胞の動員に関与することが示唆された。一方、肝星細胞は、通常の培養状態ではMCP1の受容体であるCCR2の発現を認めなかったが、自然免疫応答および炎症性サイトカインにてCCR2の発現誘導が見られた。これらの所見より、通常の生理的環境では胆管細胞からのMCP1産生や肝星細胞のCCR2発現はないものの、感染や炎症に伴って胆管細胞からのMCP1産生および肝星細

胞の CCR2 発現が惹起され、肝星細胞の誘導、TGF- β 作用により線維化を来すことが示唆され、増生細胆管の組織反応が直接肝線維化に関わることが明らかとなった。

E. 結論

HCV 肝硬変患者に対する PRI-724 投与の有効性を確認し、さらにその機序を解明するためには、Wnt シグナル伝達系の変化に加えて、肝星細胞、細胞外マトリックス分解酵素、炎症細胞および胆管細胞の観点からも解析する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada K, Kakuda Y, Sato Y, Ikeda H, Shimoda S, Yamamoto Y, Inoue H, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y. Alteration of energy metabolism in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol*. 2013 Nov 29.
- 2) Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of serum fractalkine in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2013 Jun 14.
- 3) Harada K, Sato Y, Ikeda H, Hsu M, Igarashi S, Nakanuma Y. Notch1-Hes1 signalling axis in the tumorigenesis of biliary neuroendocrine tumours. *J Clin Pathol* 2013;66:386-391
- 4) Harada K, Chiba M, Okamura A, Hsu M, Sato Y, Igarashi S, Ren XS, Ikeda H, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma

Y. Monocyte chemoattractant protein-1 derived from biliary innate immunity contributes to hepatic fibrogenesis. *J Clin Pathol* 2011 Aug;64(8):660-5

2. 学会発表

- 1) Harada K, et al. IgG4 reaction in biliary intraepithelial neoplasia and cholangiocarcinoma arising from sclerosing cholangitis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 2) Harada K, et al. Energy metabolic change induced by ERR- α -PGC-1 axis in chronic non-suppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 3) Harada K, et al. Pathological Differences between IgG4-Related Sclerosing Cholangitis with and without Autoimmune Pancreatitis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 4) Harada K, et al. Clinicopathological significance of serum fractalkine and its regulation by ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. AASLD, The Liver Meeting 2013 (2013.Nov 1-5, Washington, DC)
- 5) Harada K, et al. Alteration of energy metabolism and subsequent oxidative stress in the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. AASLD, The Liver Meeting 2013 (2013.Nov 1-5, Washington, DC)
- 6) 原田憲一, 中沼安二. 自己免疫性膵炎合併の有無からみた IgG4 硬化性胆管炎の病

- 態の違い. 第 99 回日本消化器病学会総会 (2013 年 3 月 21~23 日、鹿児島)
- 7) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化. 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6~7 日、東京)
- 8) 原田憲一, 佐藤保則, 中沼安二. IgG4 関連硬化性胆管炎に出現する Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) 病変. 第 49 回日本肝臓学会 (2013 年 7 月 11~12 日、東京)
- 9) 原田憲一, 池田博子, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管細胞腺腫における glucose transporter 1 発現 - 悪性ポテンシャルの解析. 第 49 回日本肝臓学会 (2013 年 7 月 11~12 日、東京)
- 10) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序: エネルギー代謝の変化と細胞死の関与. 第 50 回日本消化器免疫学会総会 (2013 年 8 月 1~2 日、東京)
- 11) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管傷害とエネルギー代謝との関連性. 第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 (2013 年 9 月 13~14 日、福岡)
- 12) 原田憲一, 佐藤保則, 中沼安二. IgG4 関連硬化性胆管炎に見られる BilIN 病変の解析. 第 49 回日本胆道学会学術集会 (2013 年 9 月 19~20 日、千葉)
- 13) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管における endocytosis 機能の低下. 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9~10 日、東京)
- 14) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝と細胞死との関連. 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9 日~10 日、東京)
- 15) 原田憲一, 中沼安二. 胆道系自然免疫

応答による胆道閉鎖症の病態形成機序.

- 第 40 回日本胆道閉鎖症研究会 (平成 25 年 11 月 16 日、茨城)
- 16) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化 脂肪酸代謝系への偏位による胆管細胞アポトーシス感受性の亢進. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)
- 17) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管における endocytosis 関連分子の解析. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)
- 18) 原田憲一, 池田博子, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管癌および biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) における glucose transporter1 の発現. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)

H.知的所有権の出願・登録状況

特許取得 特になし

実用新案登録 特になし

その他

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 岐阜大学大学院医学系研究科

研究要旨:肝線維化における腫瘍壊死因子 (TNF- α) の役割を胆管結紮肝障害モデルと TNF- α 欠損マウスを用いて検討した。TNF- α は肝細胞障害、炎症細胞浸潤、肝再生には関与せずに肝線維化を促進することが示唆され、その機序として肝星細胞の TIMP-1 発現が関与することが示唆された。

A.研究目的

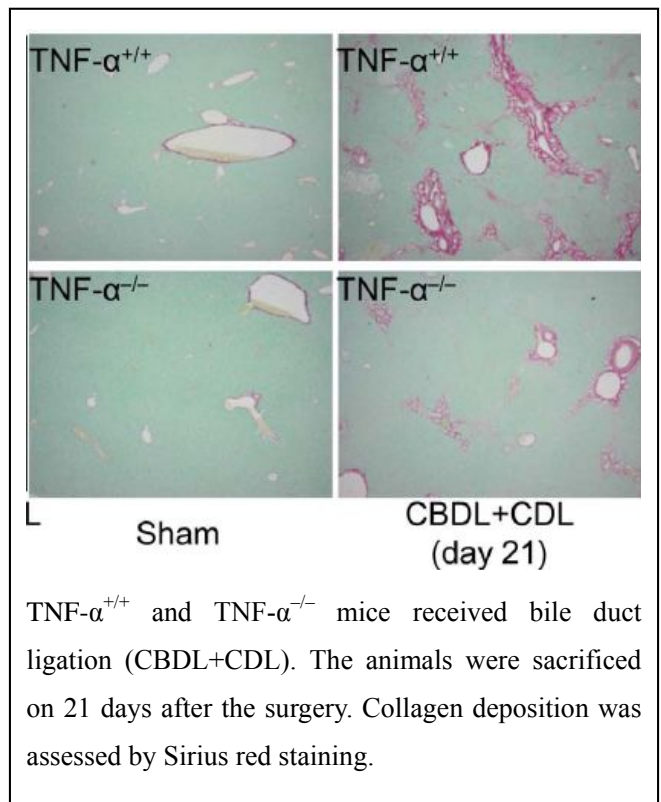
腫瘍壊死因子(TNF- α)は炎症性サイトカインの一つであり、C型肝炎をはじめとした種々の肝障害に深く関与している。動物実験モデルでは、TNF- α 欠損マウスやその受容体の欠損マウスで、肝障害や肝線維化が抑制されることが報告されており、TNF- α は肝障害・肝線維化に促進的に働くと考えられている。しかし TNF- α が肝線維化を促進する機序については不明な点が多い。そこで、これらにおける TNF- α の役割について、胆管結紮肝障害モデルと TNF- α 欠損マウスを用いて検討した。

B.研究方法

TNF- α ^{+/+}および TNF- α ^{-/-}マウスの総胆管と胆のう管を結紮することにより、肝細胞障害および肝線維化を誘導し、肝障害・線維化、マクロファージ・リンパ球浸潤、肝再生を比較した。肝星細胞(HSCs)のコラーゲン産生における TNF- α の影響を検討するためラットより HSCs を分離し、TNF- α 添加後のコラーゲン mRNA を測定した。さらに、肝線維化における TIMP-1 の役割を検討するため TIMP-1 mRNA 発現を比較し、肝組織における TIMP-1 の局在を検討した。また、TIMP-1 欠損の肝線維化におよぼす影響を検討した。

C.研究結果

胆管結紮により血清中 TNF- α は増加した。TNF- α ^{-/-}マウスでは胆管結紮後の肝線維染色(下図)およびヒドロキシプロリンの増加が抑制された。



一方、血清 ALT, T-BIL, 肝組織中 F4/80 陽性細胞、CD3 陽性細胞、Ki67 陽性細胞、および Cyclin E 発現は、TNF- α ^{+/+}と TNF- α ^{-/-}マウスで差が無かった。このことから、TNF-

は肝細胞障害、炎症細胞浸潤、肝再生には関与せずに肝線維化を促進することが示唆された。初代培養 HSCs に TNF- α を添加するとコラーゲン mRNA の発現が低下し、TNF- α が直接コラーゲン発現を促進させる効果は無かった。MMP 阻害作用をもつ TIMP-1 は胆管結紮後の肝組織で発現が増加し、免疫染色では desmin 発現細胞で強く発現が認められた。また、初代培養 HSCs に TNF- α を添加すると TIMP-1 mRNA の発現が増強した。さらに TIMP-1^{-/-}マウスでは胆管結紮後の肝線維化が抑制された。

D. 考察

TNF- α は肝細胞障害、炎症細胞浸潤、肝再生には関与せずに肝線維化を促進することが示唆された。これまで、TNF- α は肝細胞障害を介して肝線維化を誘導すると考えられていたが、この結果から、TIMP-1 を介して肝線維化に直接的な促進効果があることが明らかとなった。今後、肝星細胞や TIMP-1 欠損マウスを用いて Wnt シグナルとの関連に関する解析を進め、肝線維化に対する新規治療の開発を目指す。

E. 結論

TNF- α は HSCs の TIMP-1 発現を介して肝細胞障害後の肝線維化を促進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in

hepatic stellate cells. PLoS One. 8, e65251, 2013.

- 2) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. J Clin Invest. 123, 834-843, 2013.

2. 学会発表

- 1) 大澤陽介 森脇久隆：ワークショップ「胆汁酸研究の最近の進歩」胆汁酸による肝細胞障害および肝線維化における TNF- α の役割 第49回日本肝臓学会総会，東京，2013.
- 2) 大澤陽介 森脇久隆：パネルディスカッション3「機能性食品や補助食品の消化器疾患における役割」アミノ酸の肝脂肪化に対する影響．第55回日本消化器病学会大会，東京，2013
- 3) 大澤陽介 森脇久隆：肝線維化における腫瘍壊死因子（TNF- α ）の役割．第40回日本肝臓学会西部会 岐阜 2013

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 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kimura K.</u>	Should we try antiviral therapy for hepatitis C virus infection with pyoderma-gangrenosum-like lesions?	Hepatol Res	44	173-175	2014 (in press)
Aoki J, Kowazaki Y, Ohtsuki T, <u>Kimura K.</u> et al.	Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8 ⁺ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation.	J gastroenterology	48	728-37	2013
Sekiguchi S, <u>Kimura K.</u> , et al.	Immunization with a Recombinant Vaccinia Virus That Encodes Nonstructural Proteins of the Hepatitis C Virus Suppresses Viral Protein Levels in Mouse Liver	PLOS ONE	Vol.7 No.12	e51656(1-12)	2012
Sakata, K. <u>Kojima S.</u> , et al.	HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor	Sci. Rep.	3	3243	2013
Qin Xian-Yang, <u>Kojima S.</u> , et al.	The Effect of Acyclic Retinoid on the Metabolomic Profiles of Hepatocytes and Hepatocellular Carcinoma Cells	PLOS ONE	Vol.8 No.12	e82860(1-11)	2013
Sakata, K., <u>Kojima S.</u> et al.	Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor- β	Biochem. Biophys. Res. Commun.:	443(3)	950-956.	2014
Yamagata H, <u>Ikejima K.</u> , et al.	Altered expression and function of hepatic natural killer T cells in obese and diabetic KK-A ^y mice.	Hepatol Res	43(3)	276-288	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hosoya S, <u>Ikejima K</u> , et al.	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(3)	G293-G299	2013
Fukuo Y, <u>Ikejima K</u> , et al.	Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease.	Hepatol Res.	doi: 10.1111/hepr.12282.	1-11	2013
<u>Okusaka T</u> , Ojima H, Morizane C, Ikeda M, Shibata T	Emerging drugs for biliary cancer.	Expert Opin Emerg Drugs.	(Vol.19 No.1 (2014))		2013
Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Bridgewater J, <u>Okusaka T</u> et al.	Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials.	Ann Oncology	25(2)	391-398	2014
Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, <u>Okusaka T</u> , et al.	Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma.	Hepatology			2013
Ueno H, Ioka T, <u>Okusaka T</u> , et al.	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.	J Clin Oncol.	31(13)	1640-1648	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Harada</u> et al.	Alteration of energy metabolism in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis.	J Clin Pathol			2014 (in press)
<u>Harada</u> et al.	Clinicopathological significance of serum fractalkine in primary biliary cirrhosis.	Dig Dis Sci	58	3037-3043	2013
<u>Harada</u> et al.	Notch1-Hes1 signalling axis in the tumourigenesis of biliary neuroendocrine tumours.	J Clin Pathol	66	386-391	2013
<u>Harada</u> et al.	Monocyte chemoattractant protein-1 derived from biliary innate immunity contributes to hepatic fibrogenesis.	J Clin Pathol	64	660-665	2011
<u>Osawa Y</u> , Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O.	Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells.	PLOS One.	Vol.8 No.6	e65251(1-10)	2013
<u>Osawa Y</u> , Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, et al.	Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer.	J Clin Invest	123	834-843	2013