

学 位 論 文 要 旨

氏名 勝目 朝夫

題 目 : Preclinical evaluation of an anti-interleukin 6 receptor antibody for Castleman's disease and a serine palmitoyltransferase inhibitor as an antiviral agent for hepatitis C virus (キャッスルマン病に対する抗IL-6レセプター抗体と抗C型肝炎ウイルス剤としてのセリンパルミトイル転移酵素阻害剤に関する前臨床研究)

論文要旨 :

Clarifying the preclinical profiles of drug candidates is essential for estimating their clinical performance. However, the applicability of preclinical research to clinical profiles varies a great deal depending on the availability of suitable experimental models. In this study, I attempt to assess two drug candidates for which the clinical potential was difficult to estimate from the preclinical research because of species specificity and the lack of appropriate models.

Firstly, the effects of interleukin 6 (IL-6) signal blocking agents are evaluated in genetically modified Castleman's disease mice by administering anti-IL-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody (mAb). Castleman's disease is a syndrome associated with lymph node hyperplasia, plasmacytosis, fever, anemia, and hypergammaglobulinemia with an abnormal augmentation of IL-6, and blocking the IL-6 function by using a mAb to human IL-6R to neutralize the IL-6 function results in beneficial effects in the patients. The H-2Ld human IL-6 transgenic mice (IL-6 tgm) develop various disorders associated with dysregulated IL-6 overproduction, and most of these disorders are identical with those in Castleman's disease, so IL-6 tgm could be useful as a Castleman's disease model. I prepared a rat mAb to mouse IL-6R that would block the IL-6 signal in IL-6 tgm, which, when administered, almost completely prevented these symptoms and prolonged the life of the mice without severe adverse events. Thus, the clinically proven efficacy of the IL-6R mAb against Castleman's disease could be reproduced in this preclinical experiment.

Next, the therapeutic potential of a recently identified drug candidate to treat Hepatitis C virus (HCV) is assessed in preclinical examinations. HCV affects approximately 170 million people worldwide and can result in a persistent infection that leads to chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Unfortunately, the interferon (IFN)-based current standard therapy has limited efficacy and significant side effects. Although combinations of direct-acting antiviral agents (DAAs) without IFN have been tested for clinical use as novel anti-HCV therapies, emerging data suggest that DAAs might select for resistance, which can become a primary cause of treatment failure in clinical studies. Additionally, differences in HCV genotypes can result in certain DAAs

having reduced antiviral activity. Therefore, the development of additional antiviral agents with diverse resistance profiles and efficacy against a wide spectrum of HCV genotypes is necessary. To this end, I have identified a novel class of serine palmitoyltransferase (SPT) inhibitors that inhibited HCV replication by disrupting the host cell lipid rafts, which act as a scaffold for HCV replication. This unique mechanism of host enzyme-targeted viral inhibition is hypothesized to have potential for its high barrier to resistance and for its antiviral activity across different HCV genotypes.

Preclinical research of HCV replication has been limited by the lack of appropriate infection models. One model that has been reported as being possibly infected with HCV was produced by transplanting human primary hepatocytes into severe combined immunodeficient mice carrying the urokinase plasminogen activator transgene controlled by an albumin promoter. Here, I use these mice to assess the therapeutic potential of a SPT inhibitor, NA808, in clinical practice by investigating the efficacy across HCV genotypes, its synergistic effects with other antiviral agents, and the potential development of resistance.

The humanized liver chimeric mice infected with HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, and 4a could support long-term HCV infections at clinically relevant titers. Administration of NA808 results in approximately 1- to 3-log reductions in each genotype-infected group, which indicates that NA808 has a robust antiviral effect across HCV genotypes. In addition, NA808 has synergistic effects when combined with pegylated IFN (PEG-IFN), NS3/4A protease inhibitor, or NS5B polymerase inhibitors, regardless of the targeted enzyme. When a full-genome sequence analysis of HCV in NA808-treated chimeric mice was performed to evaluate the potential for resistance to develop, the viral sequences from NA808-treated mice were identical to those from untreated mice. This high barrier to resistance is also confirmed by an in vitro study using HCV sub-genomic replicon cells.

Thus, NA808 mediates potent anti-HCV activity in a variety of genotypes with an apparently high barrier to resistance and has synergistic effects with other anti-HCV agents. These findings suggest that NA808 has potential as a novel host-targeted drug in the treatment of HCV infection.

In conclusion, the results in the Castleman's disease model treated with anti-IL-6R mAb suggest that preclinical assessment might be capable of predicting the clinical performance, when using appropriate models with clinical relevance. In HCV-infected humanized liver chimeric mice, viral replication occurred in human hepatocytes, and long-term infection could be supported at a clinically relevant titer; hence, these mice are considered a suitable model with clinical relevance for evaluating anti-HCV drug candidates. Therefore, beneficial profiles of NA808 as an anti-HCV drug in HCV-infected humanized liver chimeric mice could reflect the drug's clinical potential and support the development of NA808 as a treatment for HCV infection or for use in combination with PEG-IFN alfa-2a or HCV polymerase or with protease inhibitors.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	勝目 朝夫
審 査 委 員	主 査：鹿児島大学 小原 恭子 教 授
	副 査：鹿児島大学 三好 宣彰 教 授
	副 査：山口大学 佐藤 晃一 教 授
	副 査：鹿児島大学 中馬 猛久 教 授
	副 査：鹿児島大学 小澤 真 准教授
題 目	<p>Preclinical evaluation of an anti-interleukin 6 receptor antibody for Castleman's disease and a serine palmitoyltransferase inhibitor as an antiviral agent for hepatitis C virus</p> <p>キャッスルマン病に対する抗IL-6レセプター抗体と抗C型肝炎ウイルス剤としてのセリンパルミトイル転移酵素阻害剤に関する前臨床研究</p>
<p>審査結果の要旨：</p> <p>医薬品開発において、臨床効果を予測するために候補物質の効果を前臨床試験で明らかにすることは必要不可欠であるが、適切な評価系の有無に依存し、非常に大きなばらつきがある。本論文では、適切な評価系が存在しないことにより、前臨床試験結果から臨床成績を予測することが困難と考えられた2つの医薬品候補物質の前臨床評価研究を行った。</p> <p>まず、第1章では抗インターロイキン6 (IL-6) 受容体 (IL-6R) モノクローナル抗体 (mAb) を遺伝子工学的に作成したキャッスルマン病モデルマウスに投与することによって、IL-6 シグナル伝達阻害物質の前臨床評価を行った。キャッスルマン病は、リンパ節の過形成、形質細胞増多症、発熱、貧血、高ガンマグロブリン血症などを伴う疾患であり、IL-6 の機能を中和する抗ヒトIL-6R mAbの投与によって症状が改善するという症例報告がなされている。IL-6の過剰産生に伴って、キャッスルマン病と類似した多くの症状を呈するH-2LdヒトIL-6 トランスジェニックマウス (IL-6 tgm) は、キャッスルマン病モデルとして有用と考えられる。IL-6 tgmでIL-6の機能を阻害するため、マウスのIL-6シグナル伝達を阻害するラット抗マウスIL-6R mAbを作成し、投与したところ、症状は、ほぼ完全に抑制され、重篤な副作用を示すことなく生存期間の延長が認められた。このようにIL-6R mAbのキャッスルマン病に対する臨床効果を再現するモデル系が樹立できた。</p> <p>第2章、第3章では、最近同定されたC型肝炎 (HCV) に対する医薬品候補物質の治療効果を評価した。HCVは、全世界で1.7億人が感染しており、持続感染から慢性肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こす。現在のインターフェロン (IFN) を用いた標準治療は、効果が限定的で、</p>	

重篤な副作用も知られている。新規治療法として、IFN を含まない複数の抗ウイルス薬併用療法が開発が進められているが、耐性ウイルスの出現が臨床試験における治療不成功の主要な要因となっている。さらに、HCV 遺伝子型の違いによって効果が減弱することも知られており、耐性プロファイルが異なり、幅広い HCV 遺伝子型に効果を示す抗ウイルス剤の開発が必要と考えられる。このために、HCV 複製の足場となる宿主細胞の脂質ラフトを障害することで HCV 複製を抑制する新規セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) 阻害剤を見出した。宿主酵素を標的として抗 HCV 活性を示すというユニークな作用機序は、耐性ウイルスが生じ難く、幅広い HCV 遺伝子型に有効である可能性が期待される。

HCV 複製の評価は、適切な感染複製系が無く困難であったが、アルブミンプロモーター制御下にウロキナーゼタイププラスミノーゲン活性化因子を発現する重症免疫不全マウスに移植したヒト初代肝細胞で HCV 感染が成立するとの報告がなされた。本研究では、新規 SPT 阻害剤 (NA808) の臨床での効果を予測するため、このマウスを用いて、耐性ウイルス出現プロファイル、異なる HCV 遺伝子型での効果、他の抗ウイルス剤との併用効果を評価した。ヒト肝キメラマウスでは、HCV 遺伝子型 1a、1b、2a、3a、4a いずれも感染が成立し、ヒトと同程度のウイルス量を長期間維持することができた。これらに NA808 を投与したところ、血清 HCV 量が約 1/10 から 1/1000 の範囲で減少し、いずれの遺伝子型においても確実な抗 HCV 効果を示した。さらにペグ化 IFN (PEG-IFN)、HCV プロテアーゼ阻害剤、HCV ポリメラーゼ阻害剤との併用では、その標的分子の違いに関わらず、いずれの薬剤とも相乗効果を示した。耐性ウイルスの出現を検証するため NA808 投与マウス由来 HCV 全ゲノム配列を確認したところ、未投与マウス由来 HCV ゲノムの配列と一致し、レプリコン細胞を用いた *in vitro* での検討でも耐性ウイルスの出現は認められなかった。

このように NA808 は種々の HCV 遺伝子型に対して有効で、耐性ウイルスを誘導することなく、他の抗 HCV 薬と相乗効果を示すことが明らかとなり、HCV 感染に対する新規宿主酵素阻害剤として有望である可能性が示唆された。

キャッスルマン病モデルに抗 IL-6R mAb を投与した試験の結果は、臨床との関連性をもった適切な試験系で評価することによって、臨床効果を予測可能な前臨床試験を実施することができることを示唆している。HCV 感染ヒト肝キメラマウスにおいて、HCV はヒト肝細胞で複製され、ヒトと同等のウイルス量が長期間維持されることから、抗 HCV 薬候補物質の評価に適切なモデルであると考えられる。したがって、HCV 感染ヒト肝キメラマウスで認められた、NA808 の抗 HCV 薬としての薬効は、臨床での効果が予測でき、抗 HCV 薬としてあるいは他の抗 HCV 剤との併用薬としての効果も期待される。

以上のように本論文は、キャッスルマン病や HCV に対する治療効果を示す薬剤の有効性を動物実験モデルを用いて明らかにし、極めて重要な新規の知見を提供した。よって、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。