声帯癭痕に対する肝細胞増殖因子を用いた再生医療: 第 I / II 相医師主導治験

平 野 滋

Phase I / II Clinical Trial for Regeneration of the Vocal Fold with Hepatocyte Growth Factor in Patients with Vocal Fold Scar and Sulcus

Shigeru Hirano

The vocal fold mucosa has vibratory properties that are supported by specific histological structures, including the layer structure and wide distribution of hyaluronic acid. When the mucosa is scarred, the vibratory property is deteriorated, which leads to severe permanent dysphonia. No optimal treatment has yet been established. Hepatocyte growth factor (HGF) has a strong anti-fibrotic function and has been proven to resolve fibrosis and regenerate the original tissues in lung and kidney in animal experiments. We have additionally shown that HGF can resolve fibrotic tissues in vocal fold scars and improve the vocal function in animal models. Based on these pre-clinical data, a phase I/II exploratory clinical trial was planned for the assessment of the regeneration of the vocal fold in patients with vocal fold scar and sulcus. A GMP-compatible recombinant human HGF protein drug (KP-100LI; Kringle Pharma, Inc., Osaka) was injected into the scarred vocal folds under topical anesthesia. Three different dosages (1, 3, and 10 μ g) for 1 side of the vocal fold were used for each group of patients. The injection was repeated weekly, up to four times. The patients were followed for six months after the treatment. The results indicated significant improvement of the vocal fold vibratory amplitude, voice handicap index (VHI)-10, and GRBAS scale. No severe adverse events were noted. These findings suggest that HGF is effective for promoting regeneration of the vocal fold in patients with vocal fold scar and sulcus.

Keywords : vocal fold scar, vocal fold sulcus, regenerative medicine, hepatocyte growth factor

緒 言

声帯癭痕は炎症や外傷後の粘膜硬化性病変であり、不可逆的で高度な音声障害をきたし、確立した治療法のない難治性希少疾患である。種々の音声外科的アプローチが試みられてきたが有効な治療法は確立されていない¹⁾。

声帯粘膜は他の粘膜とは異なる特異的な組織構造をしており、粘膜固有層が3層構造であることやヒアルロン酸の豊富な分布が声帯振動に必要不可欠とされている^{2, 3)}。粘膜固有層のうち、中間層と深層は声帯靱帯を形成しており、これはヒト以外の動物には確認されておらず、またヒトにおいても小児には認められない特異的な構造である。声帯靱帯は声帯のテンションを維持・調整するのに有効と考えられ、その表層を最も柔軟な粘膜固有層浅層が上皮とともに振動することでヒトの幅広い音域の音声生成が可能になると考えられている。声帯癭痕ではこの層構造が破綻し密な不良コラーゲン線維によって粘膜固有層が占拠されるとともに、ヒアルロン酸が減少あるいは消失することで、振動に必要な粘弾性を失う事がわかっている⁴⁾。声帯溝症は特異な形態の硬化性病変であり、粘膜固有層浅層が溝により消失し、溝の底部では上皮と声帯靱帯が線維化組織により強固に癒着するため、同部位において振動が途絶

し音声障害をきたす。これら硬化性病変を改善するためには、破綻した組織構造を改善する必要がある、そのために特に蓄積したコラーゲン線維を消化しヒアルロン酸を回復させる必要があるが、従来、そのような薬理作用を有する薬剤はなかった。

肝細胞増殖因子 (HGF : hepatocyte growth factor) は強力な抗線維化作用と組織再生作用を有する蛋白として1990年代大阪大学で世界に先駆けて分離精製された⁵⁾。当初肝臓で発見されたのでこのような名称が付いたが、その後の研究で、線維芽細胞を含む全身の様々な細胞で産生されることがわかった。HGFの薬理作用として強力な抗線維化作用や血管新生作用が知られ、動物モデルにおいては肝硬変、腎硬化症、肺線維症などの慢性線維化病変にHGFを投与することで、線維化が解消され組織が再生することが示された。我々は、声帯粘膜にHGFの受容体であるc-Metが存在する事⁶⁾、in vitroでラットやヒトの声帯線維芽細胞にHGFを投与することでヒアルロン酸産生が有意に増大し、同時にコラーゲン産生が抑制される事^{7, 8)}、ラット声帯にHGFを局所投与すると声帯粘膜内のMMP2, MMP3, HAS (ヒアルロン酸合成酵素) の遺伝子発現が増大するとともにI型プロコラーゲンの遺伝子発現が抑制される事⁹⁾を確認した。続いてイヌ声帯癭痕にHGFを声帯

内投与することで、声帯のコラーゲン蓄積が解消され、ヒアルロン酸が回復することを確認した^{10, 11)}。これらの基礎実験データを基に、臨床へのトランスレーションを試みた。

医師主導治験の準備(図1)

2001年より基礎実験を開始し基礎データは揃っていたものの、当時ヒトに使用可能なGMP (good manufacturer practice) 準拠の治験薬がなかったため臨床応用には足踏みしていたが、クリングルファーマ社よりヒトに投与可能なGMP準拠治験薬である5残基欠損型組換えヒトHGFタンパク質(dHGF)が開発され、これを用いた医師主導治験を目指して先端医療振興財団臨床研究情報センター(TRI)に相談した。dHGFがそれまで動物実験で用いていた全長型HGFと同様の声帯再生効果を有することをイヌを用いた動物実験で確認し¹²⁾、2012年に当時医師主導治験の中核的役割を担っていた先端医療振興財団先端医療センター病院で開発プロジェクトチームが組まれた。その後PMDA(医薬品医療機器総合機構)との薬事戦略相談、対面助言を経て2年後の2014年に治験開始に至った。

医師主導治験の概略

目的：声帯癬痕・溝症患者に対する治験薬HGF製剤(KP-100LI)の声帯内投与の安全性と声帯再生効果を検討する。
デザイン：オープン試験、反復投与、用量漸増(3用量)
相：第Ⅰ/Ⅱ相試験
対象：声帯癬痕・溝症患者18名
主要エンドポイント：安全性
副次エンドポイント：音声改善効果としてvoice handicap index-10(VHI-10)、声帯振動振幅、最長発声持続時間(MPT)、GRBAS聴覚印象スコアの総和、ゆらぎ指数Jitter。
声帯振動振幅は喉頭ストロボスコーピー検査の画像上で、各声帯粘膜の振動中の最大閉鎖期と最大開大期における移動距離を計測することで検出。
VHI-10以外の検査は、ブラインドされた検査員により施行。

治験体制：京都大学医学部附属病院、先端医療センター病院、臨床研究情報センター(TRI)、クリングルファーマ社
スキーム：京都大学医学部附属病院でスクリーニング検査・適格性判定を行い、TRIデータセンターに症例登録ののち、先端医療センター病院で治験薬投与、その後6か月間京都大学医学部附属病院で追跡調査。

プロトコル：

咽喉頭の表面麻酔ののち、経鼻喉頭内視鏡によるモニター下に経口的に声帯粘膜内にKP-100LIを注射する。毎週1回、4回の反復投与。用量を一側声帯あたり1 µg, 3 µg, 10 µgの3段階(各stepⅠ～Ⅲ)とする。StepⅠの6例の投与が終わり、最終症例の投与後1か月目の安全性が確認されればstepⅡに移行、同様に6例の安全性を確認したうえでstepⅢに移行する(図2)。

医師主導治験の進捗(図3)

2014年9月に開始となり、症例登録、プロトコルは順調に進捗し、途中安全性の問題を認めず約2年後の2016年11月に無事終了した。その後データ解析が行われ2017年3月に総括研究報告書の作成が完了した。

図2 ステップの構成と移行手順

HGF開発の経緯

2001年	in vitro実験、動物実験
2009年	臨床研究情報センター(TRI)に相談 KP-100LI薬効薬理試験
2012年	先端医療センター病院で医師主導治験の 開発プロジェクトチーム結成
同年	PMDA薬事戦略相談1回目、2回目
2013年	PMDA薬事戦略相談3回目(追加データ)
2014年	PMDA 対面助言(治験実施許可)
同年	先端医療センター病院、京大病院IRB 治験届提出、治験開始

図1 HGF開発の経緯

HGF治験の進捗

2014年9月25日	治験開始
2014年11月17日	FPI: Step I, 1例目初回投与
2015年3月23日	Step I: 6例目最終投与
2015年6月15日	Step II: 1例目初回投与
2015年8月17日	Step II: 6例目最終投与
2015年11月9日	Step III: 1例目初回投与
2016年1月12日	Step III: 6例目最終投与
2016年6月16日	LPO
2016年11月4日	治験終了届
2017年3月31日	総括研究報告書作成完了

図3 医師主導治験の進捗

FPI: first patient in, LPO: last patient out

結 果

患者背景

Stepごとの患者背景は、step I, step II, step IIIの順で男女比5:1, 1:5, 1:5, 平均年齢38歳, 45歳, 44歳, 瘢痕/溝症例数が2/4, 3/3, 4/2の分布で、男女比以外は有意差を認めず(χ^2 乗検定, ANOVA), step Iにおいてのみ女性が有意に多かった。治療前の音声検査では、step I, step II, step IIIの順で、VHI-10の平均が24.7, 23.7, 20, MPTの平均が18.3秒, 16.5秒, 19.5秒, 声帯振動振幅の平均が0.0781, 0.0497, 0.0482, GRBAS総和の平均が5.83, 5.25, 4.58, Jitter平均が1.79, 2.70, 1.72で、いずれの検査項目においても群間の有意な差を認めなかった(χ^2 乗検定, ANOVA)¹³⁾。

主要評価項目(安全性)

全例において因果関係を否定できない重篤な有害事象は認めなかった。一過性の声帯の充血を全症例中16.7%に認めたが、すべて2か月以内に改善した。ステップ間における有意差は認めなかった¹³⁾。

副次評価項目(音声改善効果)

全例での統計解析(MMRMモデル検定)において、VHI-10は2か月目より有意な改善(図4)、声帯振動振幅とGRBASは1か月目より有意な改善(図5, 6)を認めた。MPTとJitterにおいては有意差は認めなかった。またすべての評価項目において、各step間に有意差を認めなかった。VHI-10の5点以上改善は全18例中7例で確認された¹³⁾。

MMRMモデルによる調整平均(LSMean)の経時推移(全例)

図4 VHI-10の推移 * $p < 0.05$ (文献13より許可をえて転載)

MMRMモデルによる調整平均(LSMean)の経時推移(全例)

図5 声帯振動振幅の推移 * $p < 0.05$ (文献13より許可をえて転載)

MMRM モデルによる調整平均 (LSMean) の経時推移 (全例)

図6 GRBAS尺度の推移 * $p<0.05$ (文献13より許可をえて転載)

考 察

今回の医師主導治験は再生医療における新薬治験である。その道のりは決して短くなかったが、このような医師主導治験では往々にして苦労話になりがちのところ、本治験においては治験相談から5年で治験開始、治験が始まってからは約2年で完遂することができた。この間、TRIやPMDAからは建設的な意見を得ることができ、その結果質の高い治験ができたものと考えている。特に、反復投与と用量漸増のデザインで、途中何か突発の事項が起きれば治験全体がすぐにストップしう中、極めて順調に進捗したのは一重に支援センターを始めとする全協力機関の最大限の尽力によるものと感謝している。

さて、本治験はHGFの声帯瘢痕・溝症に対する再生効果を検討するための探索的試験であったが、安全性には全く問題を認めず、VHI-10、声帯振動振幅、GRBAS尺度において6か月間の追跡において有意な改善効果を認めたことは、HGFの高い効果と薬事承認へ向けての可能性を示すものとする。評価項目も探索事項であったが、MPTやJitterは硬化性病変の評価には適さないものと思われた。MPTには計測誤差の問題、呼吸機能や共鳴状態が関与し声帯の粘弾性を直接的に反映しない問題が考えられる。Jitterはもともと誤差が多いこと、左右声帯振動の規則性が求められることなどから、硬化性病変では誤差が大きくなることが問題と考えられる。一方、HGFが声帯粘膜の振動性を改善する作用をみるにはストロボスコーピー上の声帯振動振幅は一義的に有意義であり、その結果として導出されるVHI-10、GRBASは適切な指標と考えられた。

今回の検討では用量による有意差は認められなかった。最低用量の1 μ gは、動物実験で使用した用量から算出したものであり、これで十分な効果があることがわかった。細

胞増殖因子は用量依存性でないことが多く、用量が大きすぎると逆効果のことや有害事象の問題が出てくることがある。今回用いた3用量では安全性、効果に差はなく問題ないと考ええる。

この研究は最終的に薬事承認を目指しており、次相試験においては、プラセボ対照二重盲検試験が必要と考えている。原稿執筆中の現時点において、多施設共同による第Ⅲ相試験の準備段階にある。

結 論

本医師主導治験は、HGFを用いた研究シーズからのトランスレーションであり、translational researchの典型例である。このような基礎研究から治験への実現には臨床研究支援センターや新規薬剤開発会社の協力が必要不可欠である。結果、HGFの声帯内局所投与は声帯瘢痕の粘弾性を回復させ、音声障害の改善につながる事が実臨床の症例において確認された。

謝 辞

本治験に多大なるご支援を頂いた先端医療振興財団臨床研究情報センター(現、医療イノベーション推進センター)、各協力病院の試験担当医師、看護師、薬剤師およびCRC、治験薬提供を頂いたクリングルファーマ社に深謝いたします。

本論文に関して、利益相反に該当する事項はない。

文 献

- 1) Hirano S : Current treatment of vocal fold scarring. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 13 : 143-147, 2005.

- 2) 平野 実 : 音声外科の基礎と臨床. 耳鼻 21 : 239-440, 1975.
- 3) Gray SD, Titze IR, Chan R et al : Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. Laryngoscope 109 : 845-854, 1999.
- 4) Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M et al : Histologic characterization of human scarred vocal folds. J Voice 23 : 399-407, 2009.
- 5) Matsumoto K, Nakamura T : Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem Biophys Res Commun 239 : 639-644, 1997.
- 6) Hirano S, Thibeault S, Bless DM et al : Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in rat and rabbit vocal folds. Ann Otol Rhinol Laryngol 111 : 661-666, 2002.
- 7) Hirano S, Bless DM, Massey RJ et al : Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. Ann Otol Rhinol Laryngol 112 : 1026-1033, 2003.
- 8) Hirano S, Bless D, Heisey D et al : Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta 1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts. Laryngoscope 113 : 144-148, 2003.
- 9) Ohno T, French LC, Hirano S et al : Effect of Hepatocyte Growth Factor on Gene Expression of Extracellular Matrix During Wound Healing of the Injured Rat Vocal Fold. Ann Otol Rhinol Laryngol 117 : 696-702, 2008.
- 10) Hirano S, Bless DM, Nagai H et al : Growth Factor Therapy for Vocal Fold Scarring in Canine Model. Ann Otol Rhinol Laryngol 113 : 777-785, 2004.
- 11) Ohno T, Hirano S, Kanemaru S et al : Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol 116 : 762-769, 2007.
- 12) Mizuta M, Hirano S, Ohno S et al : Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. Laryngoscope 124 : E81-86, 2014.
- 13) Hirano S, Kawamoto A, Tateya I et al : A Phase I/II exploratory clinical trial for intracordal injection of recombinant hepatocyte growth factor for vocal fold scar and sulcus. J Tissue Eng Regen Med 12 : 1031-1038, 2018.

別刷請求先 〒602-8566 京都市上京区梶井町 465
京都府立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科
平野 滋