

表1 症例の内訳と成績

症例	性別	年齢	腫瘍径 (mm)	部位	凝固時間 (分)	TACE a) の量	凝固径 直径×短径×高さ (mm)
1	女性	70	49	S4	24	EPI <sup>b)</sup> 30 mg, MMC <sup>c)</sup> 6 mg, lipiodol 6.5 ml	70×53×50
2	男性	67	27	S5	12	EPI <sup>b)</sup> 20 mg, MMC <sup>c)</sup> 4 mg, lipiodol 3 ml	50×47×55
3	女性	69	25	S8	12	EPI <sup>b)</sup> 20 mg, MMC <sup>c)</sup> 4 mg, lipiodol 2 ml	—
4	女性	70	24	S5	12	EPI <sup>b)</sup> 20 mg, MMC <sup>c)</sup> 4 mg, lipiodol 2.5 ml	55×44×55

a) TACE : transcatheter arterial chemoembolization, b) EPI : epirubicin hydrochloride, c) MMC : mitomycin C

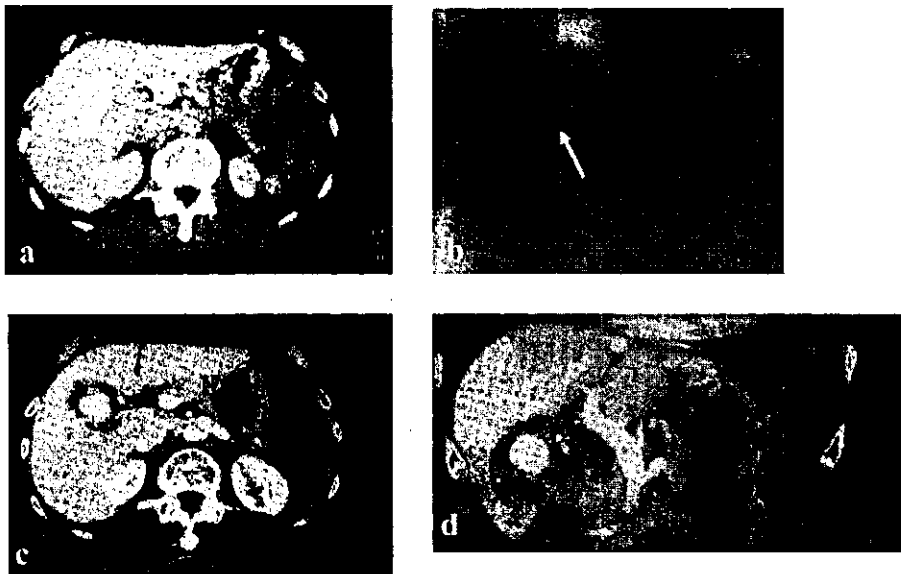



図1 症例2 : a : 治療前CTA, b : 右肝動脈にバルーンマイクロカテーテルを挿入した所 (矢印), c(axial像), d(sagittal像) : 治療後のdynamic CT 50×47×55 mmの凝固範囲を認める

ジオ波凝固療法は、バルーンマイクロカテーテルでの手技でも有効性が示唆された。なお、同治療法は、血管造影検査を行う侵襲性および高価なバルーンマイクロカテーテルを用いる経済面ではデメリットではあるが、最近報告されている5 cm展開針RITA Model 90の単独治療の1回凝固と比較し、凝固範囲が同等以上である点<sup>11)</sup>および短期間での精査と治療が可能となる点では十分なメリットがあり、今後はとくに大型肝癌に適応拡大可能と考える。

文献 : 1) Rossi S, Garbagnati F, Lencioni R, et al : Radiology 217 : 119-126, 2000 2) 三輪一彦, 堀部俊哉, 鈴木史郎, 他 : 肝臓 43 : 172, 2002 3) Kurokohchi K, Watanabe S, Masaki T, et al : Int J Oncol 21, 841-846,

2002 4) 山崎隆弘, 黒川典枝, 白橋 斉, 他 : 肝臓 41 : 425, 2000 5) Yamasaki T, Kurokawa F, Shirahashi H, et al : Cancer 95 : 2353-2360, 2002 6) 山崎隆弘, 黒川典枝, 高見太郎, 他 : 肝臓 42 : 688-689, 2001 7) Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, et al : in submitted 8) Nakamura H, Hashimoto T, Oi H, et al : Radiology 167 : 415-417, 1988 9) 堀田彰一, 中村英明, 藤田朋紀, 他 : 肝臓 41 : 580-581, 2000 10) Kitamoto M, Imagawa M, Yamada H, et al : AJR 181, 997-1003, 2003 11) 三輪一彦, 堀部俊哉, 小熊一豪, 他 : 肝臓 45 : 125-126, 2004

 **ライフサイエンス出版**

TEL(03)3664-7900(代表)

【禁 無断転載・複製】

## 自己骨髄細胞を用いた肝硬変症に対する肝臓再生療法

寺井崇二 大森 薫 石川 剛  
 青山浩司 高見太郎 横山雄一郎  
 田島邦彦 坂井田功 沖田 極

肝不全患者に対し生体肝移植が行われているが、ドナーの問題、外科侵襲の多さという問題点があり、次世代の肝臓再生療法の開発が求められている。われわれは骨髄細胞（肝幹細胞）の移植療法の有効性を評価するため、GFP/CCl<sub>4</sub>モデルを開発し解析してきた。さらに基盤研究を基に臨床研究（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）へと展開した。われわれは、肝移植が受けられない肝不全患者に対する新たな治療方法の開発を慎重に進めている。

## はじめに

骨髄中の幹細胞の存在が報告されて以来、再生医療の新たな細胞源として骨髄細胞が注目されている。われわれは『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発を進めるため、5年前より基礎研究を行い、実際に肝硬変症に対する骨髄移植の有効性の検討を骨髄細胞からの肝細胞への分化増殖の *in vivo* 評価モデルを開発し検討してきた<sup>1,2)</sup>。このモデルにおいては、持続的な四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 投与による肝障害時に骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖が確認され、骨髄細胞投与後、肝臓内に投与された骨髄細胞は肝細胞索構造を構築した。発生段階の肝芽細胞の増殖に SEK1, MKK7→SAPK/JNK→c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることと<sup>3)</sup>、持続炎症時に骨髄細胞のアルブミン陽性肝細胞への分化が確認できたことは相似点があると考えられた。さらにわれわれのモデルでは、骨髄細胞投与により、血清アルブミン値の回復や生存率も骨髄細胞の非投与群に比べ有意に改善していた。また肝線維化も有意に改善していた<sup>4)</sup>。これらの結果から、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は臨床応用可能な次世代の移植医療に

なりうると思われた。一方で過去にすでに、循環器領域の虚血性疾患に対しても自己骨髄細胞の注入療法が行われており<sup>5,6)</sup>、また骨髄移植そのものについてはすでに20年以上の実績がある。われわれは基礎研究の結果を基盤とし平成13(2001)年12月に、『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床研究について、山口大学医学部生命倫理委員会に申請し、安全性・有用性の臨床研究の認可を受けた。さらに約2年の期間をかけ、実際に臨床研究を行うための細胞療法部関連の設備、器具を整え、臨床研究の準備を行い、平成15年11月14日に69歳男性に対して国内最初の「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の phase I 研究を開始した。本稿ではこの第1症例の経過について提示する。

## 臨床研究の対象症例

今回の臨床研究における対象患者（非代償性肝硬変症）は以下のとおりとした。

T.B. は 3 mg/dL 以下、血小板は 5 万以上、肝細胞癌についてはコントロールできている症例。食道、胃静脈瘤のコントロールが良好であり、また骨髄採取に伴い全身麻酔をかけるので心肺機能は良好の患者とした。

てらい しゅうじ、おおもり かおる、いしかわ たけし、あおやま こうじ、たかみ たろう、よこやま ゆういちろう、たじま くにひこ、さかいだ いさお、おきた きわむ；山口大学医学部先端分子応用医科学講座（消化器病態内科学）

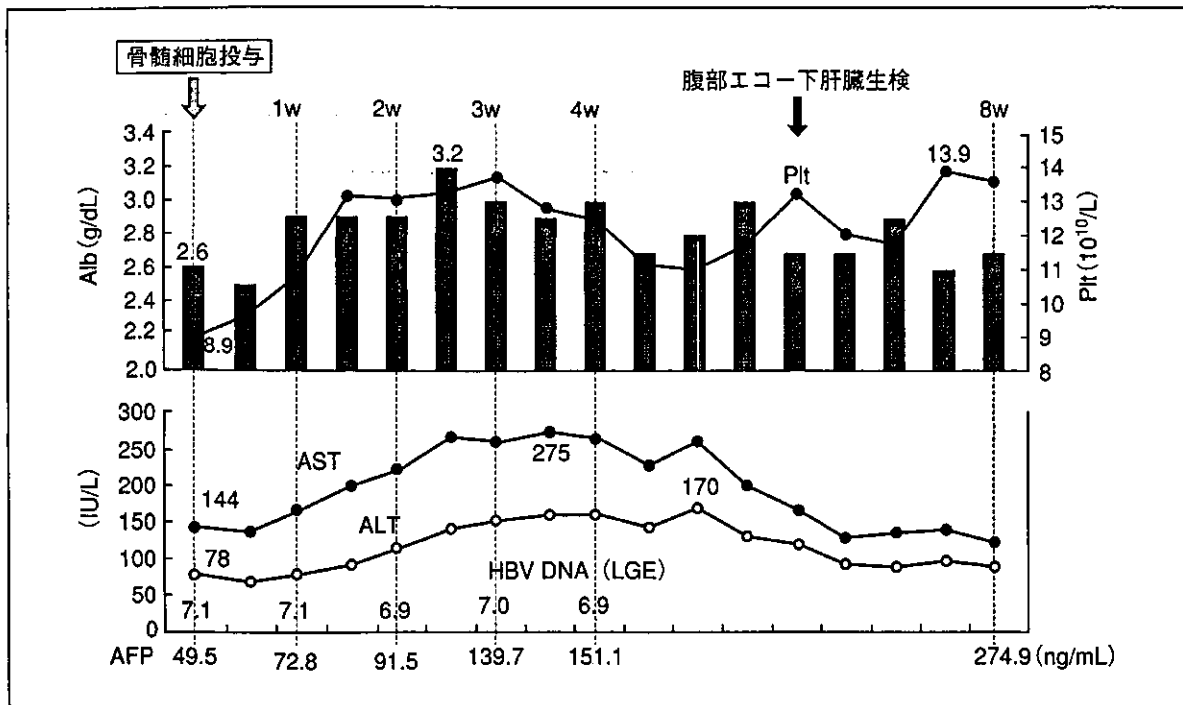


図 1 症例の臨床経過

### 症例：臨床経過

HBV 陽性非代償性肝硬変症の 69 歳男性に対し、全身麻酔下にて自己骨髄細胞を 400 mL 採取、洗浄後有核細胞の  $4 \times 10^9$  個を採取した。採取した自己骨髄細胞を約 1 時間かけ末梢静脈から投与し、肝臓の再生の誘導の有無について評価した。術中特に大きな合併症もなく、術後血液検査にて骨髄細胞の肝再生に与える影響について評価した。その結果、基礎研究の結果より予測されたように、骨髄細胞投与後より血清アルブミン値は、術前 2.5 g/dL であったものが最大 3.2 g/dL まで改善、また腹部エコーにて腹水の減少を確認し利尿薬の投与量の減量に成功した。また図 1 に経過を示すように AFP ( $\alpha$ -フェトプロテイン) も骨髄細胞投与により増加した(図 1)。その他、血小板の値も改善した。また骨髄細胞投与後に施行した肝生検において、hepatocyte nuclear factor-4 (HNF4), AFP などの誘導も確認され、肝再生が誘導された可能性が考えられた。

### 考 察

症例については術後の経過もよく、骨髄細胞の投与により肝臓再生が誘導された可能性が示唆され

た。現時点においては、われわれの臨床研究は安全性評価の phase I 研究であり、現在までの 6 例の検討では重篤な副作用の発生はない。今後は慎重に症例を重ね phase I 臨床研究を進めていき、肝臓領域における新たな再生療法としての「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発の可能性を評価していきたい。

謝辞 本研究は、厚生労働省厚生科学研究費（基礎研究成果の臨床応用推進事業）の補助を得て推進されている。

### 文献

- 1) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. J Biochem 2003 ; 134 : 551-8.
- 2) McTaggart RA, Feng S. Hepatology 2004 ; 39 : 1143-6.
- 3) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai G, Seo J, et al. Dev Biol 2002 ; 250 : 332-47.
- 4) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al. Hepatology 2004 ; in press.
- 5) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. Cell Transplant 2000 ; 9 : 439-43.
- 6) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Lancet 2003 ; 361 : 45-6.

# G.I. Research

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社  
〒103-0004 東京都中央区東日本橋 1-9-7 G1 東日本橋ビル

## 骨髄細胞から肝細胞への分化転換の 制御機構の解析とその臨床応用 —自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の 基礎的検討—

寺井崇二\* 石川 剛\* 大森 薫\* 青山浩司\*  
坂井田功\* 沖田 極\*

われわれは「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発のため、骨髄細胞の肝細胞への分化評価モデル“GFP/CCl<sub>4</sub>モデル”を開発した。このモデルにおいては持続肝障害が続く肝硬変症において骨髄細胞は肝臓へ定着し肝細胞への分化転換していく。一方、肝発生過程において炎症性シグナルは肝芽細胞の発生、増殖は必須であり、肝発生と再生には共通のメカニズムが存在する。さらに、骨髄中の肝幹細胞群の同定のため新規モノクローナル抗体 Liv 8 抗体を用いて基礎的検討をおこなった。これらの結果は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は次世代の治療法になり得る可能性を示したのでここに紹介する。

### はじめに

B型、C型肝炎ウイルスによる肝疾患はまだまだ増加傾向を示し、肝細胞癌による死亡は年間の癌死の第3位を占めるようになってきた。われわれは臨床の現場において、肝癌治療をおこなっているが、その背景には肝硬変症が合併している患者も多く、肝癌治療そのものの治療法の開発とともに

に、いかに肝不全を制御するかが重要な問題になる。わが国において生体肝移植が導入されたが、ドナーの不足、外科手術による侵襲の危険性、経済的な問題などからなかなか普及しにくい状況である。これらをふまえて考えた場合、次世代の治療法として肝臓再生療法の開発は重要と考えられる。われわれは、新たに肝不全に対する治療として「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発をめざし研究を進めてきたのでここに紹介したい。

### 【キーワード】

骨髄細胞  
肝幹細胞  
肝再生  
細胞療法  
Oval 細胞  
Niche  
分化転換  
肝芽細胞

### 1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性の発見

肝臓は代謝、蛋白合成、解毒などを司る多機能な臓器である。肝臓の発生過程に関してその分化系譜はまだ詳細には明らかにされていないが、われわれは図1のように胎児期にまず肝芽細胞が発

\* Shuji TERAI, Tsuyoshi ISHIKAWA, Kaoru OMORI, Koji AOYAMA, Isao SAKAIDA, Kiwamu OKITA/山口大学医学部先端分子応用医科学講座 (消化器病態内科学)

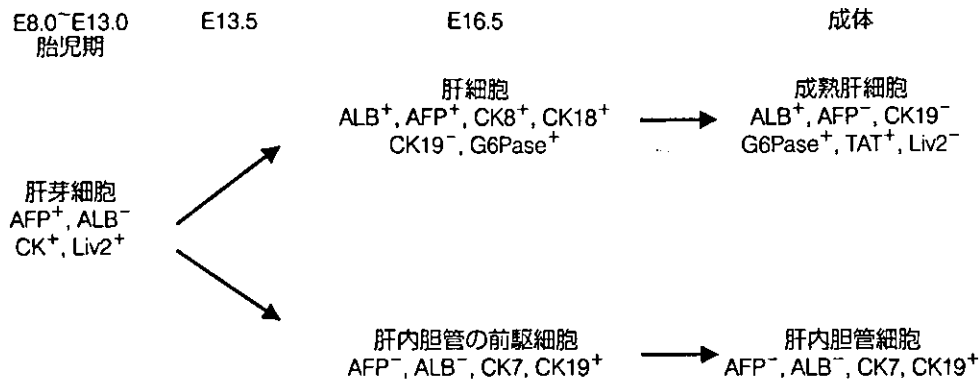


図 1. マウス肝発生過程における分化系譜

E12.5 における肝臓は肝芽細胞が全体の 2 割、血球系の細胞が 8 割を占める。

生し、その後肝細胞、肝内胆管の前駆細胞に分かれて、成熟肝細胞、肝内胆管細胞が発生すると考えている。また、臓器としての特徴としては胎児期の肝臓は造血臓器としてはたらいっていることが特徴である。一方、肝臓に存在する幹細胞そのものについては以前より研究がおこなわれてきている。そのなかでも、重篤な肝障害に伴い発生する卵円形をした oval 細胞は肝幹細胞の一つと考えられてきた<sup>1)</sup>。この oval 細胞については肝細胞以外に、膵臓、胆管、小腸細胞に分化する可能性が知られている。また、その他方法で、肝幹細胞の同定が試みられ、ラットより小型肝細胞 (small hepatocyte)<sup>2)</sup>、Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットより肝幹細胞様細胞<sup>3)</sup>、胎児肝からは H-CFU-C などが発見されている<sup>4)</sup>。これらの細胞の臨床応用については今後、病態に伴うこれらの個々の細胞についての発生制御機構、また局在の変化などについて検討していく必要がある。

一方、骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性については、女性レシピエントに男性ドナーからの骨髄移植後の剖検例において、骨髄細胞が肝細胞に分化することが報告された<sup>5)</sup>。これは Y 染色体陽性細胞の存在の有無を肝、胆管細胞にて検討したものであり、骨髄細胞はヒトにおいて肝細胞に分化する可塑性を証明した報告である。このヒトにおける発見は非常に重要で、何らかの機序により

骨髄細胞は肝細胞へと分化する可能性があることを示すとともに、肝幹細胞が骨髄中に存在することが明らかになった。また、骨髄細胞の腸管への分化転換についても報告され、骨髄中にはほかの臓器に分化転換する細胞群が存在することが明らかになった<sup>6)</sup>。

## 2. さまざまな肝再生—部分肝切除による肝再生と oval 細胞の発生を経た肝再生の違い—

ここで一步はなれて肝再生という現象について考えてみたい。肝臓という臓器は非常に複雑な臓器であり、その構成は、肝細胞、胆管細胞、星細胞、内皮細胞、Pit 細胞、クッパー細胞から成り立ち、肝臓という複雑な代謝系を司っている。肝臓は古来から再生する臓器として知られており、実際に肝切除後には肝再生が起こる。図 2 に示すようにラットの部分肝切除により肝小葉内に存在する肝細胞が肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) などの増殖因子の誘導により増殖し肝再生が起こると考えられている<sup>7)</sup>(図 2)。一方で oval 細胞の肝細胞化のモデルとしてはアセトアミノフルレン、部分肝切除 (AAF/PH モデル) があるが、このモデルはアセトアミノフルレンの投与により肝細胞の増殖が起こらないようにした状態で肝切除をおこなうモデルであり、この場合

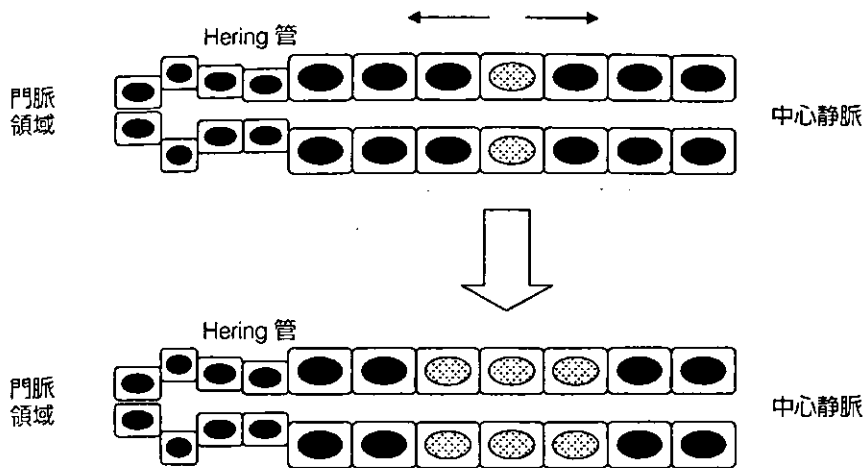


図 2. 部分肝切除に伴う肝再生

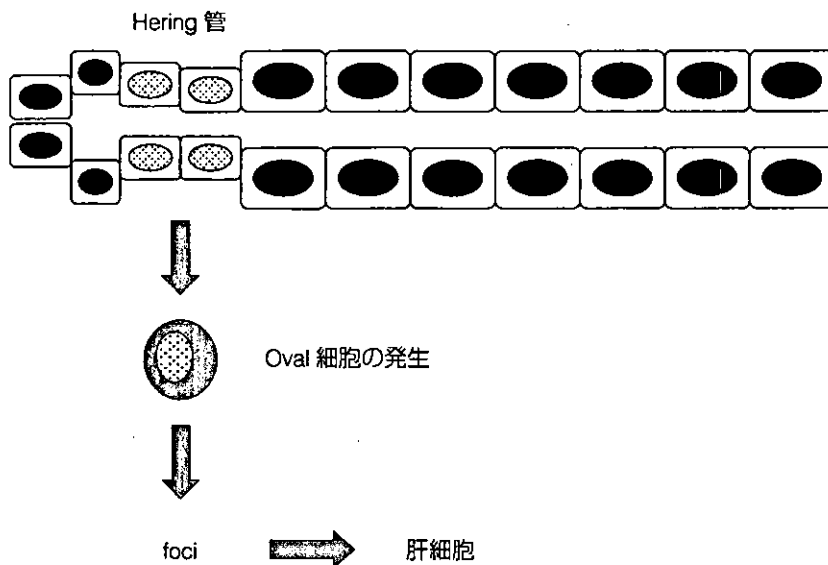


図 3. Oval細胞発生を通じた肝再生 (AAF/PHモデル)

は肝細胞の再生は起こらないため、胆管のすぐそばの Hering 管より oval 細胞が発生し basophilic hepatocyte の foci を経て肝細胞に分化するモデルである<sup>1)</sup>(図 3)。これらの実験結果は、部分肝切除に伴う肝再生と、oval 細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序が異なることを示す。すなわち、肝臓の再生において、病態の違いによりその再生におもに関与する細胞は異なることになる。一方で Petersen ら<sup>2)</sup>は、骨髓移植後、アセトアミノフルレン・四塩化炭素障害 (CCl<sub>4</sub>) したモデルにおいて骨髓細胞由来の oval 細胞があらわれることを報告している。アセトアミノフルレン・

CCl<sub>4</sub> モデルはもともと oval 細胞の発生モデルであり、この条件において骨髓細胞は oval 細胞の表現型を経て肝細胞への分化が誘導される可能性を示した。

### 3. GFP/CCl<sub>4</sub> モデルの開発

われわれは骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髓細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決するためには新たな *in vivo* モデルの開発が必要だと考えた。この分化転換に関与する微小環境のことを“Niche”とよぶが、ここにはさまざまなシ



グナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられている(図4)。過去の報告では血球幹細胞が肝細胞に分化し、その結果肝臓の機能を代償したことについては、チロシン血漿突然変異マウス(FAH欠損マウス)に対し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した $\beta$ gal陽性細胞が肝臓にクラスターをつくって定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが報告されていた<sup>9)</sup>。しかしながら、このモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。また、FAHモデルでみられる移植細胞のクラスターをわれわれは実際の臨床の現場においてはほとんどみることはない。最近になり、このモデルにおける骨髄細胞の肝細胞への分化は細胞融合により起こるという報告がなされ、骨髄細胞の分化転換に対して否定的な見解が述べられているが<sup>10)11)</sup>、米国国立公衆衛生研究所(NIH)などでおこなわれた人における、男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植後の類粘膜の採取を通じた細胞融合の検討では、細胞融合については認められていないと報告されている<sup>12)</sup>。

一方で、われわれは「自己骨髄細胞を用いた肝

臓再生療法」をおこなう可能性のある対象患者は「持続的な肝障害のある肝硬変患者」と考えた。このため、より臨床に近い病態のレシピエントを作成すべくCCl<sub>4</sub>の持続投与し(肝硬変マウス)作成した、GFPTgマウス<sup>13)</sup>のGFP陽性骨髄細胞を投与することで、その投与したGFP陽性骨髄細胞の肝細胞への分化転換の有無、過程を評価した。われわれの開発したモデルを“GFP/CCl<sub>4</sub>モデル”と名づけた。図5にGFP/CCl<sub>4</sub>モデルの概略を示すが、まず4週間ほどCCl<sub>4</sub>投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP標識した陽性骨髄細胞を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化転換について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながら、われわれが臨床でみる患者は「持続的な肝障害のある患者」であり、この持続的なCCl<sub>4</sub>の投与により肝障害を続けることが骨髄細胞の肝細胞への分化においては必須と考えられた。実際の結果であるが、図6<sup>14)</sup>のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、CCl<sub>4</sub>での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後1日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊なNicheにおいて

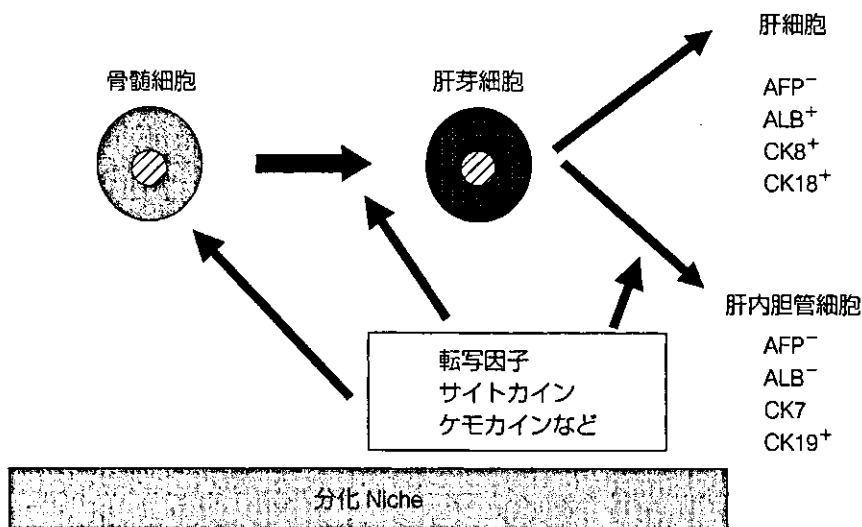


図4. 骨髄細胞の肝細胞への分化転換

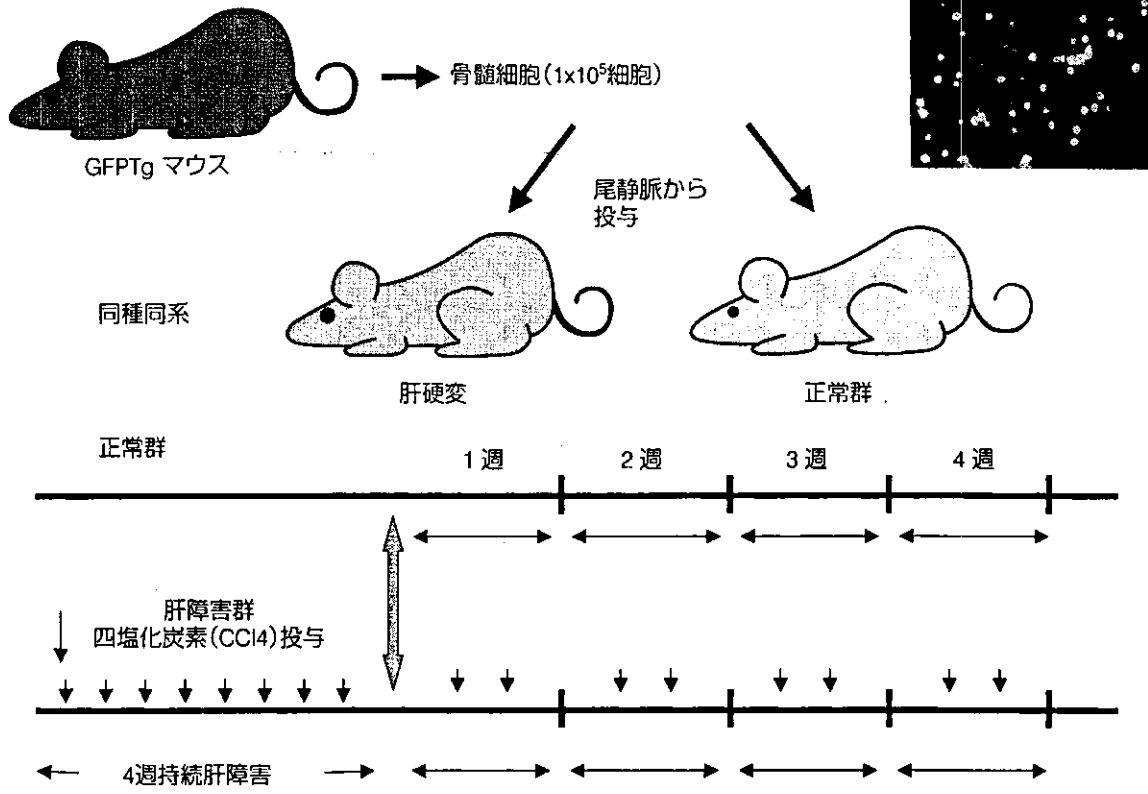


図 5. GFP/CCI4 モデルの概略

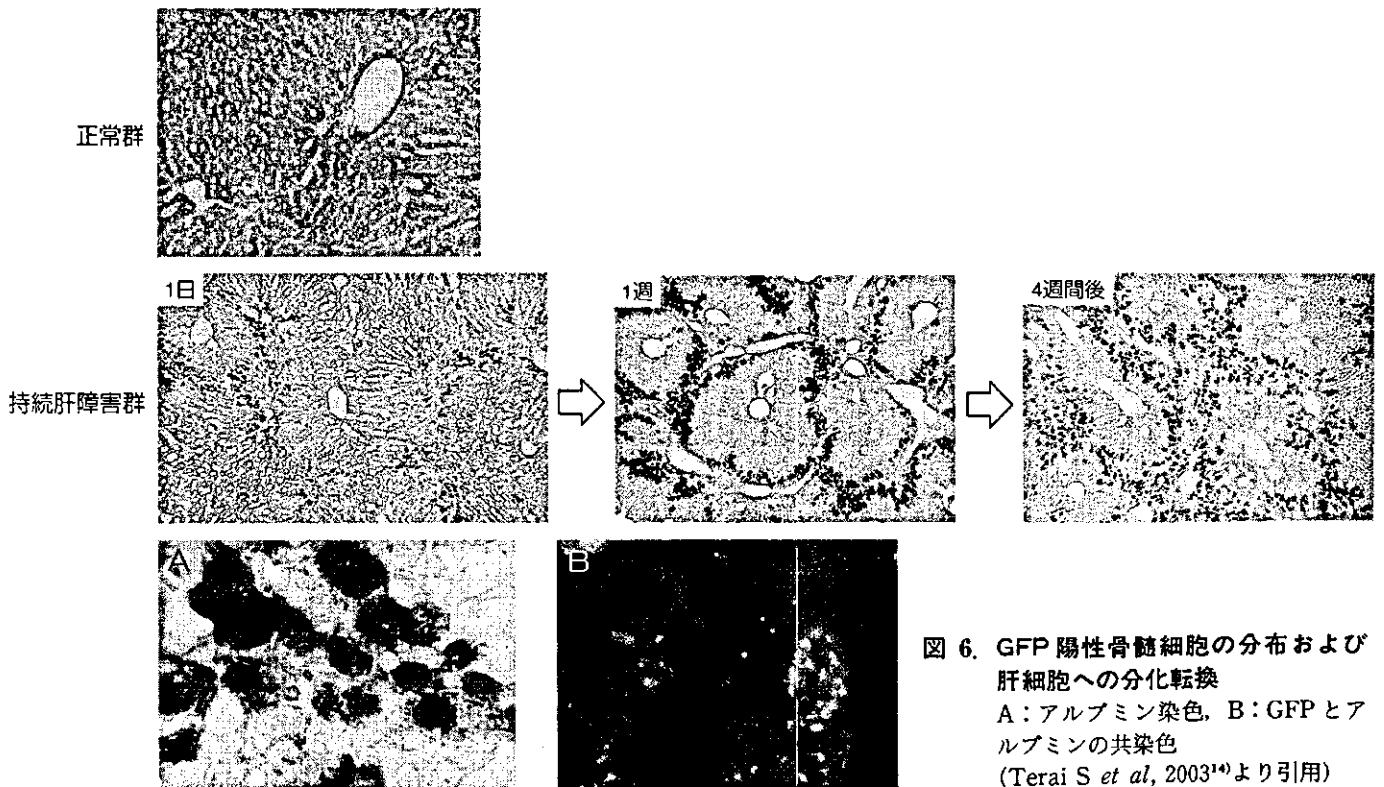
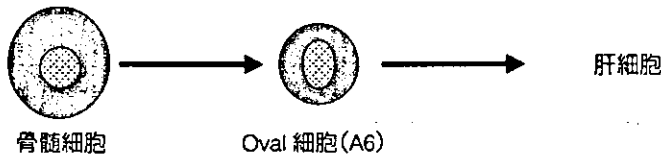


図 6. GFP 陽性骨髄細胞の分布および肝細胞への分化転換  
A: アルブミン染色, B: GFP とアルブミンの共染色  
(Terai S *et al*, 2003<sup>14)</sup>より引用)

モデル1



モデル2

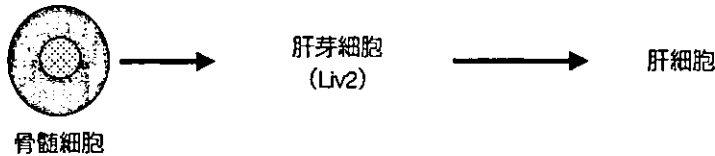


図7. 骨髓細胞の肝細胞への分化転換の経路

骨髓細胞から肝芽細胞に分化転換し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化転換することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた<sup>14)</sup>。次に、分化転換機序についての評価であるが、骨髓細胞は図7に示すように oval 細胞の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは、肝発生を分子レベルで解析することを目的として、胎児肝特異的な分子マーカーを単離すべく、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する<sup>15)</sup>。この Liv 2 抗体で染色してみると、骨髓細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に分化していることが明らかになった。一方、マウスの oval 細胞の特異抗体である A 6 抗体<sup>16)</sup>の染色をおこなうも骨髓細胞は A 6 陽性 oval 細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCl4 モデルにおいては投与した骨髓細胞が oval 細胞の表現型をへることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型をへながら肝細胞に分化することが明らかになった<sup>14)</sup>。Liv 2 抗体を用い、肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する

AML 1 ノックアウトマウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており<sup>15)</sup>、GFP/CCl4 モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと共通機構がはたらいっている可能性を示す。現在、分化制御機構については DNA チップや増殖因子の解析を通じておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川投稿中)。また、このモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善したことについては、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また 3 ヶ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は、持続肝障害のある肝硬変状態においては骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示すとともに、肝臓再生をうまく誘導するにはレシピエントの状態が重要なことを示した。

#### 4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる細胞としては、骨髓中の細胞は大きく 3 つあり、①血

球幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC)<sup>17)</sup>,  
 ② 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell :  
 MSC)<sup>18)</sup>, また最近幹細胞として注目されている  
 ③ side population cell (SP 細胞)<sup>19)</sup>があげられる  
 が、実際に骨髄中にどの分画に肝幹細胞が存在し  
 ているかについては明らかになっていない。この  
 理由としては、従来血球系の解析のツールとして  
 解析された抗体を用いており、肝臓の臓器として  
 の特性を考慮して解析したものではないことがあ  
 げられると考える。この状況を打破するにはやは  
 り肝発生について注目したアプローチが必要と考  
 えられる。前述で肝臓の発生の特徴として胎児肝  
 は造血の場であるということあげたが、そこで、  
 われわれは胎児肝の造血時期である E 11.5 日の  
 マウス胎児肝を抗原とし、新規マウスモノクロー  
 ナル抗体の Liv 8 抗体を作成し骨髄中の肝幹細胞  
 の同定を目的に以下の研究をおこなった<sup>20)</sup>。Liv 8  
 陽性細胞は全骨髄細胞中約 30% 存在し CD 45 陽  
 性細胞分画を含んでいた。E 11.5 日の胎児肝では  
 Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも、造血能がな  
 い AML 1 ノックアウトマウスの胎児肝では  
 Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった。Liv 8  
 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体である

ことを示すため、そこで、GFP/CCl4 モデルを用  
 い、GFPTg マウスから分離した骨髄細胞を  
 AutoMACS を使用し、Liv 8 抗体で全骨髄細胞を  
 Liv 8 陰性骨髄細胞集団と Liv 8 陽性骨髄細胞集  
 団に分離しそれぞれを CCl4 投与にて肝硬変状態  
 にしたレシピエントマウスの尾静脈よりこれらの  
 細胞群を投与する (図 8)。免疫組織化学染色、蛍  
 光二重染色にて Liv 8 陽性、陰性細胞群の肝細胞  
 への分化転換の有無、また血清アルブミン値の改  
 善について評価した結果、また肝細胞への分化転  
 換についての評価の結果より、Liv 8 陰性分画に  
 肝臓再生に有用な細胞群が存在する可能性が明ら  
 かになった (図 9)。骨髄間葉細胞を HGF、線維芽  
 細胞成長因子 (fibroblast growth factor : FGF)  
 を加え培養することにより、非常に可塑性に富む  
 骨髄間葉系幹細胞由来の multipotent adult pro-  
 genitor cells (MAPC) の樹立に成功したとする  
 報告もあることより、骨髄細胞中の肝幹細胞は間  
 葉系幹細胞群に含まれる可能性が高いのではない  
 かと推測された<sup>21)</sup>。

## 5. 今後の課題

今回われわれは GFP/CCl4 モデルを開発する

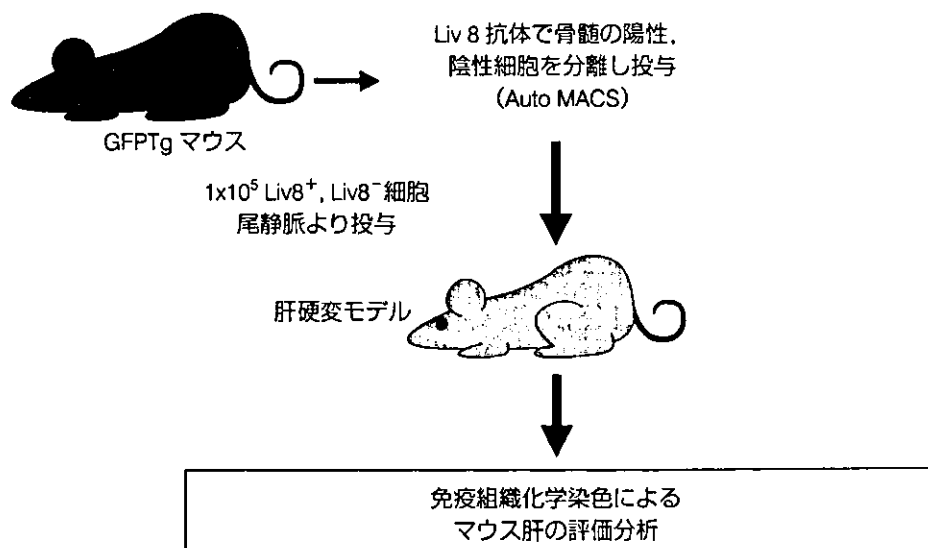


図 8. 実験プロトコル

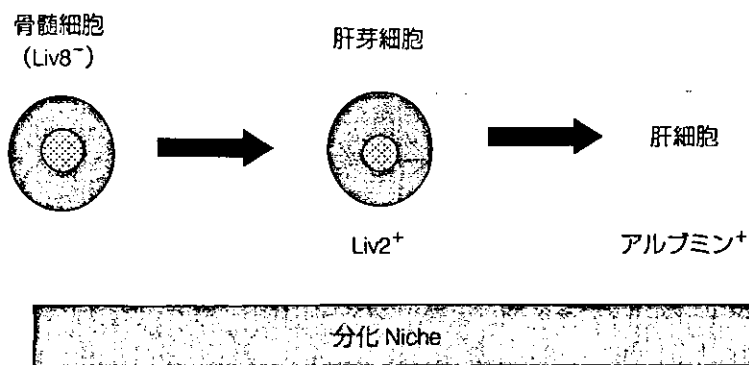


図 9. GFP/CCI4 モデルにおける  
骨髄細胞の肝細胞への分化  
転換

ことにより、持続肝障害下において、投与した骨髄細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、幼弱化しながら肝芽細胞のなり肝細胞になることが明らかになったが、①なぜ投与した細胞は効率よく障害を起こした肝臓に遊走されたか？、②移植した細胞の運命は？、また③移植した細胞が分化することで周囲の肝臓への影響はどうか？など今後解明していかなければならない課題がある。これらを解明できれば将来さらに効率的な肝臓再生療法の開発につながると考えられる。

## おわりに

すでに自己骨髄細胞を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており、良好な成績をあげている<sup>22)23)</sup>。また、骨髄移植は血液疾患の治療に多くの施設で応用されており、骨髄採取のそのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髄細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また生存率も改善していた。これらの結果は肝不全（非代償性肝硬変症）などに対する「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれはすでに報道されたように、2003年11月14日より、（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）Phase I 臨床研究を開始した。まずは、安全性を評価する臨床研究になるが、この「基礎から臨床」・臨床から基礎研究というトランスレーショナルリサーチを推進することで、次世代にス

タングードになる肝臓再生療法を開発したいと考えている。

## 文 献

- 1) Grisham JW, Thorgeirsson SS : In : *Liver stem cells*, academic press, Manchester, 1997, pp. 233-282
- 2) Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T *et al* : Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29 : 111-125, 1999
- 3) Yasui O, Miura N, Terada K *et al* : Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver. *Hepatology* 25 : 329-334, 1997
- 4) Suzuki A, Zheng Y, Kondo R *et al* : Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32 : 1230-1239, 2000
- 5) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R *et al* : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 : 11-16, 2000
- 6) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M *et al* : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8 : 1011-1017, 2002
- 7) Sell S : Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33 : 738-750, 2001
- 8) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD *et al* : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999

- 9) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M *et al* : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* **6** : 1229-1234, 2000
- 10) Wang X, Willenbring H, Akkari Y *et al* : Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422** : 897-901, 2003
- 11) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422** : 901-904, 2003
- 12) Tran SD, Pillemer SR, Dutra A *et al* : Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo* : a molecular analytical study. *Lancet* **361** : 1084-1088, 2003
- 13) Okabe M, Ikawa M, Kominami K *et al* : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407** : 313-319, 1997
- 14) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N *et al* : An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* **134** : 551-558, 2003
- 15) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S *et al* : SEK1/MKK4-Mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- $\kappa$ B-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* **250** : 332-347, 2002
- 16) Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS : Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* **145** : 409-422, 1994
- 17) Krause DS, Theise ND, Collector MI *et al* : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105** : 369-377, 2001
- 18) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 19) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC *et al* : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34<sup>+</sup> side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* **108** : 1071-1077, 2001
- 20) Yamamoto N, Terai S, Ohata S *et al* : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* **313** : 1110-1118, 2004
- 21) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L *et al* : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109** : 1291-1302, 2002
- 22) Hamano K, Li TS, Kobayashi T *et al* : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* **73** : 1210-1215, 2002
- 23) Stamm C, Westphal B, Kleine HD *et al* : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361** : 45-46, 2003

# 炎症と免疫

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 浜町花長ビル 2 階

## 肝硬変治療の新たなストラテジー

## —自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法—

寺井崇二\* 坂井田功\* 沖田 極\*

骨髄細胞移植による非代償性肝硬変症に対する治療の有用性を検討するため、われわれはGFP/CCI<sub>4</sub>モデルを開発しその有効性について検討してきた。その結果、持続炎症の存在する肝硬変状態において、末梢静脈より投与した骨髄細胞は効率よく肝臓へ遊走され、肝芽細胞への表現型を経てアルブミン陽性の肝細胞へ分化するとともに、この分化過程において肝線維化抑制効果があることが明らかになった。また骨髄細胞移植により肝機能、生存率が改善しており、これらの結果は、肝硬変症の治療の1つとして自己骨髄細胞移植の有効性を示す結果であった。本稿では、過去にわれわれがおこなった基礎的検討について概説する。

## はじめに

B型、C型肝炎ウイルスの蔓延により肝疾患は増えつづけ、現在肝疾患をベースとした肝細胞癌による癌死は年間の癌死の第3位を占めるようになってきた。肝細胞癌の背景にある病変は肝硬変症であるため、肝癌の効率的な治療、生存率の向上のためにはいかに肝不全を制御するかが重要な問題になる。わが国においては末期肝不全患者に対してはすでに生体肝移植がおこなわれているがドナーの不足、外科的侵襲など克服すべき課題は多い。われわれは新たな肝不全(肝硬変)に対する

治療として『自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法』の開発をめざし研究を進めてきたのでここに紹介する。

## 1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性の発見

肝臓は肝細胞、星細胞、Kupffer細胞、Pit細胞、内皮細胞より構成されており代謝、蛋白合成、解毒など多機能をつかさどっている臓器である。2000年に骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性についての女性レシピエントに男性ドナーからの骨髄移植後の剖検例において、骨髄細胞が肝細胞に分化することが報告された<sup>1)</sup>。これはY染色体陽性細胞の存在の有無を肝、胆管細胞にて検討したものであり、ヒトにおける骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性を証明した報告である。この発見は何らかの機序により骨髄細胞は肝細胞へと分化する可能性があることを示すものであり、肝臓に分化する細胞群が骨髄中に存在することが予測された。また骨髄細胞の腸管への分化についても報告され、骨髄中には、さまざま臓器に分化する細

## 【キーワード】

骨髄細胞  
肝幹細胞  
肝再生  
細胞療法  
Oval cell  
Niche  
肝硬変症

\* TERAI Shuji, SAKAIDA Isao, OKITA Kiwamu/山口大学 医学部先端分子応用医科学講座消化器病態内科学



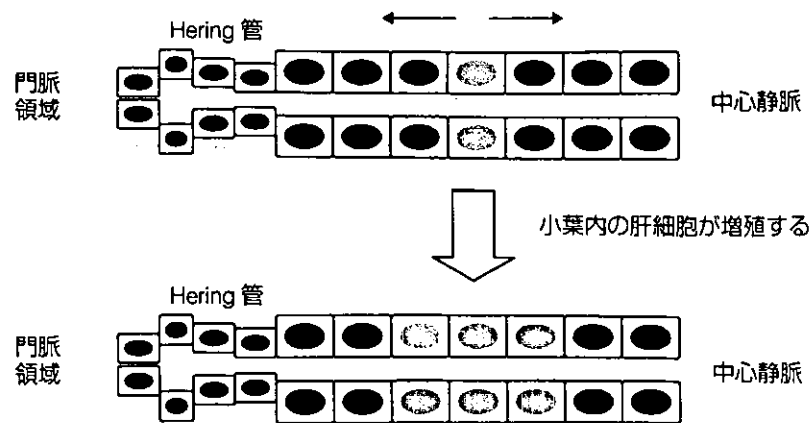


図 1. 部分肝切除に伴う肝再生

胞群が存在することが明らかになった<sup>2)</sup>。

## 2. 肝再生(部分肝切除による肝再生とOval細胞の発生と経た肝再生の違い)

ここで一步はなれて肝再生という現象について考えてみる。肝臓は再生する臓器として知られており、実際に肝切除後には肝再生が起こる。図1に示したようにラットの部分肝切除により肝小葉内に存在する肝細胞が肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などの増殖因子の誘導により増殖し肝再生が起こると考えられている<sup>3)</sup>。一方で肝幹細胞の1つであるOval細胞の有名なモデルとしてはアセトアミノフルレン(acetylaminofluorene: AAF)投与に部分肝切除(partial hepatectomy: PH)を加えたAAF/PHモデルがあるが、このモデルはAAFの投与により肝細胞の増殖が起こらない状態で肝切除をおこなうことで、肝細胞の再生は起こらないためHering管由来で卵円形の形のOval細胞が発生し好塩基性肝細胞のFociを経て肝細胞に分化が観察できる<sup>4)</sup>(図2)。このようなラット動物実験モデルを用いた治験は、部分肝切除による肝再生と、Oval細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序、関与細胞が異なることを示す。すなわち肝臓の再生において、病態の違いによりその再生にも関与

する細胞は肝細胞かあるいはOval細胞と肝臓の病態により異なることを示す。

## 3. GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの開発

われわれは骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髄細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決したいと考えた。このためには新たな*in vivo*モデルの開発が必要だと考えた。この分化に関与する微小環境“Niche”は、さまざまな炎症、免疫的なシグナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられる。血球幹細胞が肝細胞に分化しその結果、肝臓の機能を代償したことについては、チロシン血漿突然変異マウス(FAH欠損マウス)に対し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -galactosidase:  $\beta$ -gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した $\beta$ -gal陽性細胞が肝臓に細胞塊をつくり定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが、報告されていた<sup>5)</sup>。しかしながらこのモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。またFAHモデルで見られる移植細胞の細胞塊をわれわれは実際のヒトの肝臓の病理像においてはほとんどみることはない。一方でわれわれが実際に再生療法をおこない救命したいと考える対象患者は持続的な肝障害がつづい

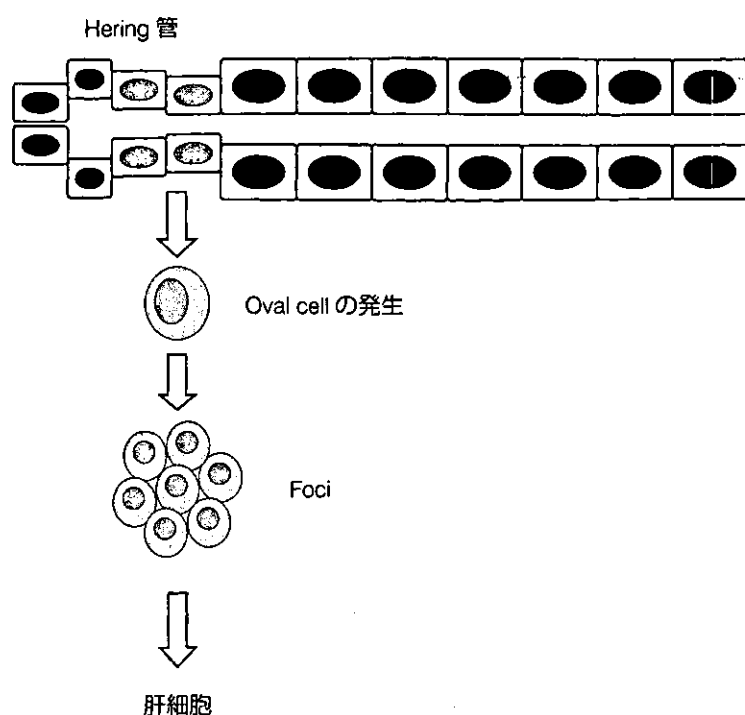


図 2. Oval cell 発生をつうじた肝再生 (AAF/PH モデル)

ている肝硬変患者(非代償性肝硬変症)が対象になる。われわれは持続的な肝障害がつづく肝硬変症患者を対して、果たして骨髄細胞を用いた肝臓再生療法をおこなうことが有用であるか評価したいと考えた。このために、まずレシピエントモデルを四塩化炭素( $\text{CCl}_4$ )の持続投与によりつくった肝硬変マウスとし、GFPTg マウス<sup>9)</sup>から GFP 陽性骨髄細胞を投与することで投与した GFP 陽性骨髄細胞の肝細胞への分化の有無またその過程を評価した。最終的にわれわれの開発したモデルは“GFP/ $\text{CCl}_4$ モデル”と名づけた。図 3 に GFP/ $\text{CCl}_4$ モデルの概略を示すが、まず 4 週間ほど  $\text{CCl}_4$  投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP 標識した陽性骨髄細胞(非培養、ヘテロな細胞集団)を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながらわれわれが臨床でみる患者は持続的に肝障害がつづく患者であるため  $\text{CCl}_4$  投与は骨髄細胞移植後もつづけ GFP 陽性骨髄細胞

の定着について評価した。結果は、図 4 のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、 $\text{CCl}_4$ での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後 1 日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊な Niche において骨髄細胞から肝芽細胞に分化し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた<sup>7-9)</sup>。つぎに分化機序についての評価であるが、骨髄細胞は図 5 に示すように Oval cell の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは肝発生を分子レベルで解析することを目的として、過去に知られているアルファフェトプロテイン以外の胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する<sup>10)</sup>。この Liv 2 抗体で染色してみると骨髄細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に

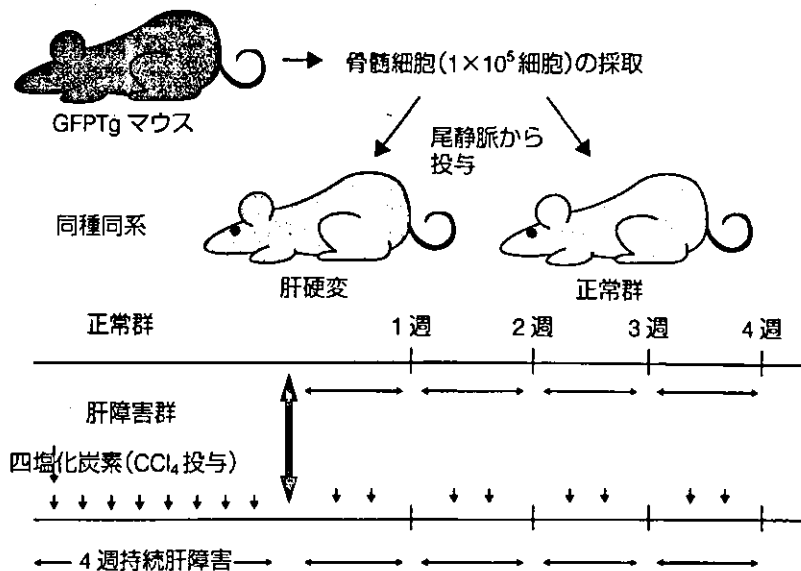


図 3. GFP/CCl<sub>4</sub>モデル

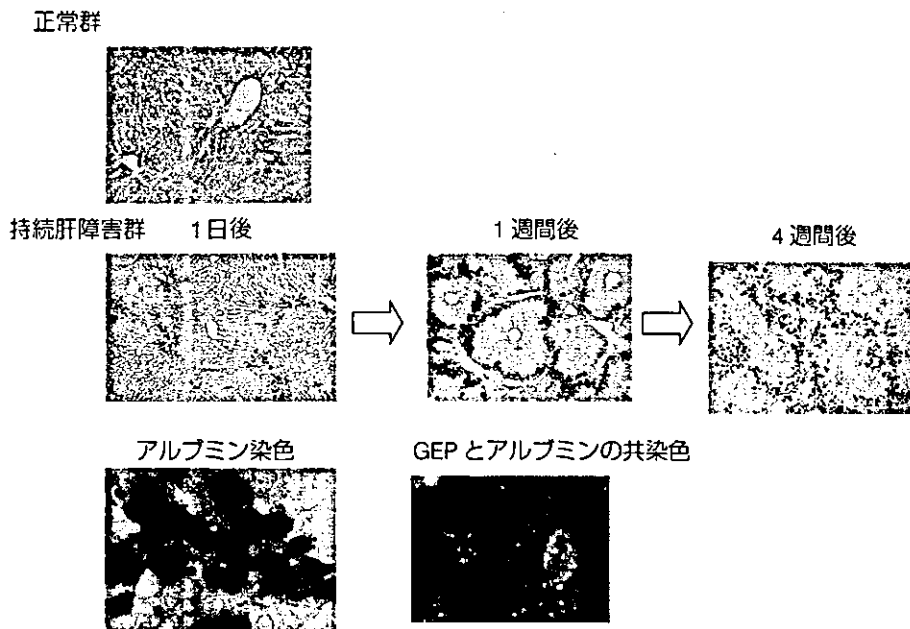


図 4. GFP 陽性骨髄細胞の分布および肝細胞への分化

分化していることが明らかになった。一方マウスの Oval 細胞の特異抗体である A6 抗体<sup>14)</sup>の染色をおこなうも骨髄細胞は A6 陽性 Oval 細胞の表現型をとらないことが明らかになり、GFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおいては投与した骨髄細胞が Oval 細胞

の表現型を経ることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型を経ながら肝細胞に分化することが明らかになった<sup>7)</sup>。Liv 2 抗体を用い肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する AML 1 ノックアウト

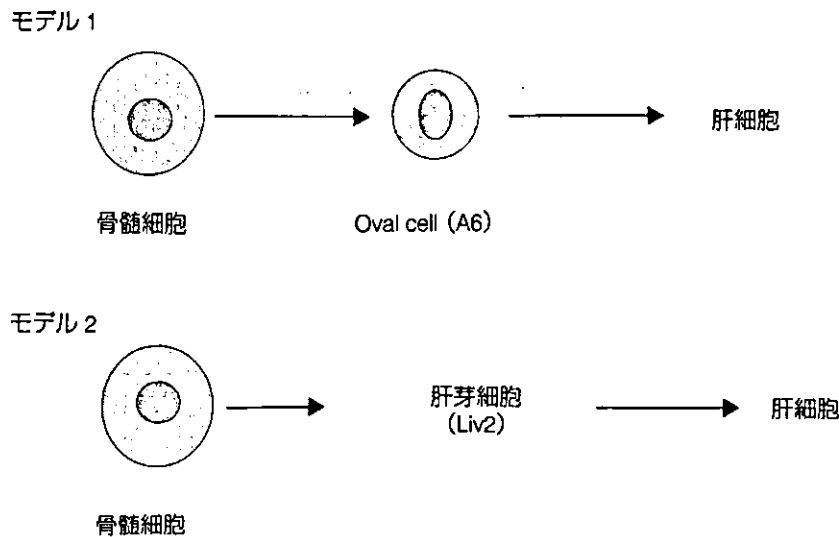


図 5. 骨髓細胞の肝細胞への分化の経路

マウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており<sup>10)</sup>, GFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと、共通機構がはたらいている可能性が考えられた。現在、分化制御機構については DNA-Chip や増殖因子の解析をつうじておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川未発表データ)。またこのモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善されたのであるが、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また3ヵ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は持続肝障害がつづく肝硬変状態において骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示した。

#### 4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる候補細胞としては、骨髓中の細胞は大きく3つ、血球幹細胞(hematopoietic stem cell : HSC)<sup>12)</sup>, 間葉

系幹細胞(mesenchymal stem cell : MSC)<sup>13)</sup>また最近幹細胞として注目されている SP 細胞(side population cell)<sup>14)</sup>があげられるが、実際に骨髓中にどの分画に幹細胞がするかは非常に混乱している。血球系マーカーをどこまで使い分画を評価するかの問題もあるが非常に混乱している。われわれは従来手法とは違う方法、すなわち肝発生について注目したアプローチをおこなうこととした。肝臓の発生の特徴として胎児肝は造血の場であるということがあげられる。そこでわれわれは胎児期の造血時期である E 11.5 日のマウス胎児肝を抗原とし新規マウスモノクローナル抗体 Liv 8 抗体を作成し骨髓中の肝幹細胞の同定を目的に以下の研究をおこなった<sup>15)</sup>。Liv 8 陽性細胞は全骨髓細胞中約 30%存在し CD 45 陽性細胞分画を含んでいた。E 11.5 日の胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも、造血能がない AML 1 KO マウスの胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった。これらの結果は、Liv 8 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体であることを示す。そこで GFP/CCl<sub>4</sub>モデルを用い、GFPTg マウスから分離した骨髓細胞を AutoMACS を使用し、Liv 8 抗体で全骨髓細胞を Liv 8(-)骨髓細胞集団と Liv 8(+)骨髓細胞集団に分離しそれぞれを