

図 1. 肝発生過程における細胞系譜

AFP: alpha-fetoprotein

ALB: Albumin

CK7: Cytokeratin 7

CK8: Cytokeratin 8

CK18: Cytokeratin 18

CK19: Cytokeratin 19

G6Pase: Glucose-6-phosphatase

TAT: Tyrosine aminotransferase

様細胞⁶⁾、胎児肝からはH-CFU-C等が発見されている⁷⁾。これら肝幹細胞を用いた細胞療法の開発も模索されているがすでに肝線維化が進行し肝不全状態である患者から肝幹細胞を分離することは困難を伴う。2000年に、骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性については、女性recipientの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^{8,9)}。これはY染色体陽性細胞の存在の有無をrecipientの肝臓中の肝、胆管細胞にて検討したものであり、骨髄細胞は人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った。また骨髄細胞の腸管への分化についても報告され、骨髄中には他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¹⁰⁾。骨髄細胞を肝臓の再生療法の細胞源として使うことは、肝機能不全の患者において肝臓に存在する肝幹細胞に比べ容易であり、骨髄細胞(特に自己骨髄細胞)を細胞源とする新たな肝臓再生療法の臨床開発が可能と考えられた。そこで我々は骨髄中に幹細胞が存在するならば、その骨髄細胞を使った

治療を実際の臨床の医療として展開するには、“どのような状況、病態において骨髄細胞は肝臓疾患の治療に有効であるか”を明らかにする必要があると考え基礎研究を行った。

2. GFP/CCl₄モデルの開発と骨髄細胞の肝細胞への分化制御機構の解析

我々が研究を開始するにあたって、慢性の肝疾患に対して、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、 β -galactosidase (β gal) 陽性の血球幹細胞の投与により、移植した β gal陽性細胞が肝臓にclusterを作り定着し、肝臓の機能がうまく代償されることを報告されていた¹¹⁾。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、我々が日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。そのため肝硬変症に対する新たな治療法の臨床応用を実現するには、なるべく人の肝不全状態と近い病態を作り骨髄細胞を用いた治療が有効であるかの評価が大事と考えた。そこで我々は骨髄細胞から肝細胞への

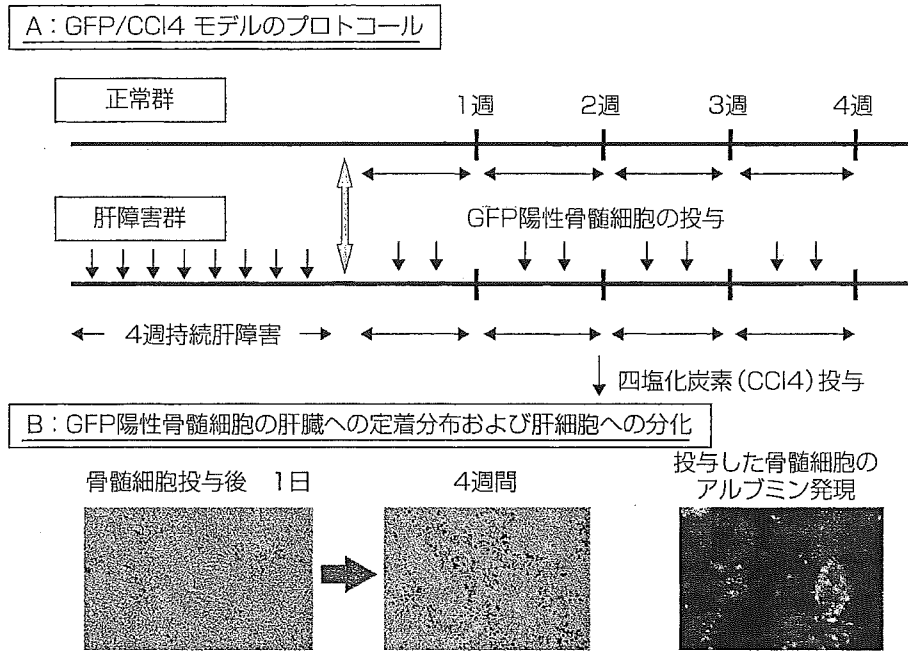


図2. GFP/CCI4 モデルのプロトコールとGFP陽性骨髄細胞の肝臓への分布および肝細胞への分化 (文献12 改変)
2-A: 四塩化炭素投与により肝硬変状態にした肝硬変マウスに尾静脈からGFP陽性の骨髄細胞を投与し肝細胞への分化を評価する. 2-B: GFP陽性細胞を検出するため, GFP抗体を用いて骨髄由来の肝細胞への分化を評価した. その結果, GFP陽性骨髄細胞は肝硬変状態にしたrecipientマウスの中に門脈周囲に定着し, 時間経過とともに増加した. また骨髄由来細胞のアルブミン陽性肝細胞への分化はアルブミンとGFPの共染色により評価した. (黒の部分肝臓に定着したGFP陽性細胞である)

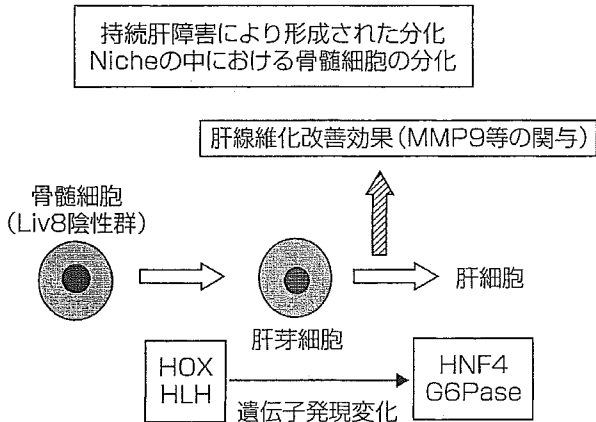


図3. 基礎的検討のまとめ
骨髄細胞の中でも特にLiv8 陰性細胞群が肝細胞へ分化しやすい細胞と考えられた. またその分化は肝芽細胞の表現型を経て最終的にアルブミン陽性細胞になる. 遺伝子発現の解析では, 骨髄細胞投与後初期にHOX, HLH型の転写制御因子群が活性化し, 後期は肝細胞の分化に関与する遺伝子群が活性化していた. またその分化の過程においてMMP9 等が発現され肝線維化も改善した.

分化評価モデル(GFP/CCl₄ model)を開発し¹²⁾, その評価を受けている¹³⁾. 図2に我々のモデルの概略を示すが, 我々は4週間ほど四塩化炭素投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたrecipientマウスに, GFP標識した陽性骨髄細胞を投与して実際の分化転換について評価した. 我々の結果では, 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, 骨髄細胞投与後も続く持続肝障害下の特殊な微小環境“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へ分化することで実際に肝機能も代償していた. また定着した骨髄細胞は時間経過とともに, 肝臓の門脈周囲から小葉内に向かい増加分布していた. 肝発生時の肝芽細胞の発生分化にSEK 1 (SAPK/ERK1 kinase)-JNK (c-Jun NH(2)-terminal kinase) 系の炎症性のシグナルの関与が重要であることと明らかになっているが³³⁾, 骨髄細胞の肝細胞への分化においても炎症

性シグナルが重要であることが明らかになった¹²⁾。さらに骨髓細胞投与により活性化する遺伝子群についてはDNA-Chipを用いた遺伝子解析にSelf-Organization-Mapという統計解析の手法を使った方法で経時的に骨髓細胞を投与することで起こる遺伝子発現変化の解析を行った。この結果GFP/CCL₄ modelにおいて、初期にはHLH, HOX型の転写因子などの形態形成期に関与する遺伝子群が誘導され、時間経過とともにHepatocyte nuclear factor (HNF)4やGlucose-6-Phosphatase isomerase (GPI)などの肝臓の代謝に関与する遺伝子群が誘導されていることが明らかになった¹⁴⁾ (図3)。この事実は骨髓細胞から肝細胞への分化とは、肝発生と共通の機構が遺伝子的にも発現され動いていると考えられた。現在骨髓細胞の肝細胞への分化に関与するメカニズムについては、分化転換¹⁵⁾、あるいは細胞融合によるNuclear reprogrammingの2つで議論されているが^{16,17)}、我々はこの両者とも骨髓細胞が肝細胞への分化する時に重要なメカニズムと考える。しかしながら肝臓から分離した初代肝細胞はFACS解析により2n, 4n, 8n, 16nと核型が多核の細胞からなる細胞集団である。このことを考えると肝臓という臓器を使った解析で、骨髓細胞の肝細胞への分化について、分化転換、細胞融合どちらに決めるかということはかなり困難と考えられ、今後新たな方法での解析が必要と考える。

3. 骨髓細胞の投与による肝機能の上昇、肝線維化改善、生存率の上昇

我々臨床医が一つの治療法を開発するときに、重要なことはそのような医療行為をすることが実際に治療対象の臓器の機能を上昇させるかということである。今回のGFP/CCL₄モデルの解析より、骨髓細胞を投与する事により血清アルブミン値が上昇することが明らかになった¹²⁾。また骨髓細胞投与により、新たに持続的なCCL₄投与

に関わらず肝線維化は進行せずむしろ、肝線維化が改善することが明らかになった¹⁸⁾。この事実は肝臓特異的な肝線維化改善剤の開発が難しい中、骨髓細胞を用いた治療法は肝臓線維化抑制療法としての意味を持つ可能性が明らかになった。現在のところこの機構はMatrix Metalloproteinase9 (MMP9)などの、コラゲナーゼの関与が考えられ、さらに基礎的検討を行っている。また最終的には骨髓細胞投与により実際に生存率が改善していた。この事実は骨髓細胞投与による治療法の有効性を論理的に示したものと考える。

4. 骨髓中の肝臓再生に有用な細胞群

骨髓中の幹細胞は大きく3つ、血球幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)、Side population cell (SP細胞)があげられる一方で、骨髓間葉細胞をHGF, FGFを加え培養することにより、非常に可塑性に富む骨髓間葉系細胞由来のMAPC(Multipotent adult progenitor cells)の樹立に成功したとする報告もある¹⁹⁾。また培養条件の工夫により骨髓細胞を肝細胞に分化させた報告もある²⁰⁾。しかしながらいぜんとして骨髓中にどの分画に幹細胞がするかは混乱している。そこで我々は胎児期の造血時期であるE11.5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Liv8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行った(東京大学大学院薬学系研究科 仁科 博史博士との共同研究)。Liv8陽性細胞は全骨髓細胞中約30%存在しCD45陽性細胞分画を含んでおり、E11.5日の胎児肝ではLiv8陽性細胞の存在を確認するも、造血能がないAML1 KOマウスの胎児肝ではLiv8陽性細胞の存在は確認できなかった。これらの結果は、Liv8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/CCL₄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, Liv8 抗体で全骨髄細胞を Liv8 陰性骨髄細胞集団と Liv8 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し免疫染色, 蛍光 2 重染色にて Liv8 陽性, 陰性細胞群のアルブミン陽性肝細胞への分化の有無, また血清アルブミン値の改善について評価した. その結果肝細胞への分化転換についての評価の結果より, Liv8 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²¹⁾. 現在 Liv8 抗体の認識する抗原については同定を目指している. 今後の解析によりさらに骨髄中の肝疾患の治療に有用な細胞群を評価していきたいと考える.

5. 臨床研究: 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法

以上述べてきたように, 骨髄細胞 (特に自己骨髄細胞) を用いた肝臓再生療法は, 肝臓機能の再生, 線維化改善, また生存率の改善が期待できた (図 3). しかしながら肝硬変患者に対して自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法が施行されたことがないことより, 我々はまず第一に安全性評価の臨床研究として基礎研究の結果を基盤とし平成 13 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, 安全性・有用性を申請し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, プロトコルを整え, 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²²⁾. この最初の症例においては自己骨髄細胞移植後, 血清アルブミン値の上昇 (約 20% 上昇), また肝線維化マーカーの改善が確認できた. また骨髄細胞投与後に施行した肝生検組織において, 今回の臨床研究における対象患者は以下のと

りとした. 全ビリルビン値は 3mg/dl 以下, 血小板は 5 万以上, CT, MRI 検査等の画像検査にて viable な肝細胞癌がない症例. また静脈瘤のコントロールが良好であり, 麻酔をかけるので心肺機能は良好の患者とした. また採取する骨髄細胞は 400ml とした. 現在のところ 7 例の患者に対して施行し副作用の発生もなく, 最初の例と同様に血清アルブミン値の上昇, 肝線維化マーカーの改善が確認されつつある. 今後は骨髄細胞を用いた肝臓再生療法について慎重に効果等を見極めていくところである.

さいごに

肝臓疾患に対する骨髄幹細胞を用いた治療法の開発は始まったばかりである. 今後 Phase I が終了し, 次は骨髄細胞の投与の方法など工夫を重ねていくことになる. 基礎研究, 臨床応用 (研究) を繰り返し, 肝不全患者に対し “役にたつ” 次世代の治療法を開発したいと考えている.

文 献

- 1) Kinoshita T, Miyajima A: Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592: 303-312, 2002.
- 2) Shiojiri N, et al: Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 51: 2611-2620, 1991.
- 3) Watanabe T, et al: SEK1/MKK4-Mediated SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF-kappaB-Induced Anti-Apoptosis. *Dev Biol* 250: 332-347, 2002.
- 4) Grisham JW, Thorgeirsson SS: Liver stem cells. *ACADEMIC PRESS INC, Manchester*, 1997, 233-282.
- 5) Mitaka T, et al: Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29: 111-125, 1999.
- 6) Yasui O, 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.
- 7) Suzuki A, et al: Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32: 1230-1239, 2000.
- 8) Theise ND, et al: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-16, 2000.
- 9) Alison MR, et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406: 257, 2000.

- 10) Okamoto R, et al: Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8 : 1011-1017, 2002.
- 11) Lagasse E, et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6 : 1229-1234, 2000.
- 12) Terai S, et al: An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 134 : 551-558, 2003.
- 13) McTaggart RA, Feng S: An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology. *Hepatology* 39 : 1143-1146, 2004.
- 14) Omori K, et al: Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett* 578 : 10-20, 2004.
- 15) Krause DS, et al: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 : 369-377, 2001.
- 16) Terada N, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 : 542-545, 2002.
- 17) Wang X, et al: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422 : 897-901, 2003.
- 18) Sakaida I, et al: Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 : 1304-1311, 2004.
- 19) Schwartz RE, et al: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109 : 1291-1302, 2002.
- 20) Miyazaki M, et al: Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 298 : 24-30, 2002.
- 21) Yamamoto N, 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.
- 22) 寺井崇二, 他: 自己骨髄細胞を用いた肝硬変症に対する肝臓再生療法. *治療学* 38 : 1158-1159, 2004.

サイトプロテクション

— 生体防御機構の解明と最先端医療への道 —

峯 徹哉 監修



サイトプロテクション研究会編

6. 自己骨髄細胞を用いた肝硬変に対する細胞療法

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
寺井 崇二 坂井田 功

■ はじめに

現在国内において肝炎ウイルス(B, C型)を原因とした肝疾患は増加しており, さらに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。肝癌患者の背景にある病変が肝硬変症であるため, 肝疾患患者の生存率の改善にはいかにして肝硬変症(肝不全)を制御するかが重要な問題になっている。肝不全患者に対して生体肝移植が行われているがドナーの不足, 外科侵襲, 経済的な問題が大きい。この問題の解決のために肝移植に代わる次世代の肝臓再生療法の開発は重要と考えられる。われわれは細胞療法に使用する細胞源として自己骨髄中の幹細胞に注目し, 実際の「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発をめざし基礎研究を進めてきた。本稿では現在までに行ってきた基礎研究の結果から, さらに臨床研究の展望について概説する。

■ I. 骨髄細胞の肝細胞への分化する幹細胞の発見

肝臓は代謝, 蛋白合成, 解毒などをつかさどる多機能な臓器である。また胎児期の肝臓は造血臓器として働く特徴がある。一方, 肝臓に存在する体性幹細胞そのものについては以前より研究が行われてきているが, 重篤な肝障害に伴い発生する卵円形のOval細胞は肝幹細胞の一つと考えられてきた¹⁾。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。2000年に骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性については, 女性recipientの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²⁾。これはY染色体陽性細胞の存在の有無をrecipientの肝臓中の肝, 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。この発見は, 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った。骨髄細胞を肝臓の再生療法の細胞源として使うことは, 肝機能不全の患者において肝臓に存在する肝幹細胞に比べ容易と考えられ, 骨髄細胞(特に自己骨髄細胞)を細胞源とする新たな肝臓再生療法の臨床応用の可能性は高いと考えられた。そこでわれわれは骨髄中に幹細胞が存在するならば, その骨髄細胞を使った治療を実際の臨床の医療として展開するには, “どのような状況, 病態の肝臓疾患の治療に骨髄細胞を使用した治療が有効であるか”を明らかにする必要があると考え基礎研究を行った。

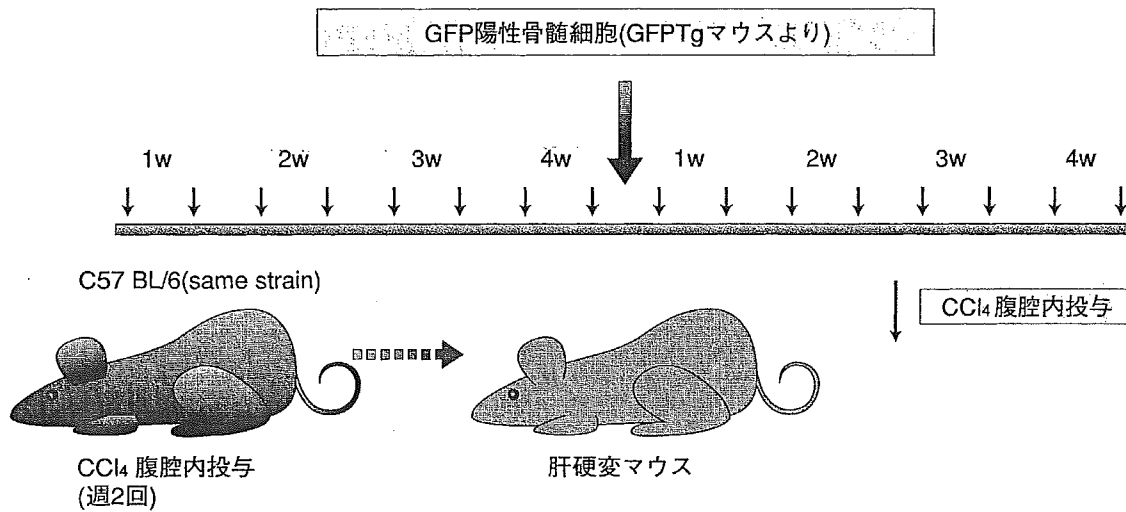


図1 GFP/CCl₄ modelの概説

四塩化炭素を週2回投与し、肝硬変症にしたマウスの尾静脈よりGFPTgマウスから採取したGFP陽性細胞を投与し、骨髄細胞の定着、分化について評価するモデルである。

■ II. 骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル(GFP/CCl₄ model)の開発と解析

われわれは骨髄細胞を用いた細胞治療の実現のために、実際に骨髄細胞の移植により肝機能が改善するかの評価のため、骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CCl₄ model)を開発した³⁾。図1にわれわれのモデルの概略を示すが、われわれは4週間ほど四塩化炭素投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたrecipientマウスに、GFP標識した骨髄細胞を投与して実際の分化転換について評価した。われわれの結果では、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、骨髄細胞投与後も続く持続肝障害下の特殊な微小環境“ニッチ”において、骨髄細胞が肝芽細胞に分化し、最後はアルブミンを発現する肝細胞へ分化し、実際に肝機能も骨髄細胞移植により改善していた。また定着した骨髄細胞は時間経過とともに、肝臓の門脈周囲から小葉内に向かい増加分布していた。肝発生時の肝芽細胞の発生分化増殖にSEK-JNK系の炎症性シグナルの関与が重要であることが明らかになっているが⁴⁾、骨髄細胞の肝細胞への分化においても炎症性シグナルが重要であることが明らかになった。さらに骨髄細胞投与により活性化する遺伝子群については、DNA-Chipを用いた遺伝子解析にSelf-Organizing-Mapという統計解析の手法を使った方法で経時的に骨髄細胞を投与することで起こる遺伝子発現変化の解析を行った。この結果GFP/CCl₄ modelにおいて、初期にはHelix-Loop-Helix(HLH)、HOX型の転写因子などの形態形成期に関与する遺伝子群が誘導され、時間経過とともにhepatic nuclear factor(HNF)4やglucose-6-phosphatase isomerase(G6Pase isomerase)など、肝臓の代謝に関与する遺伝子群が誘導されていることが明らかになった⁵⁾。この事実は骨髄細胞から肝細胞への分化とは、肝発生と共通の機構が遺伝子的にも発現され動いていると考えられた。現在骨髄細胞の肝細胞への分化に関するメカニズムについては、分化転換⁶⁾あるいは細胞融合によるnuclear reprogrammingの二つで議論されているが^{7,8)}、われわれはこの両者とも骨髄細胞が肝細胞への分化する時に重要なメ

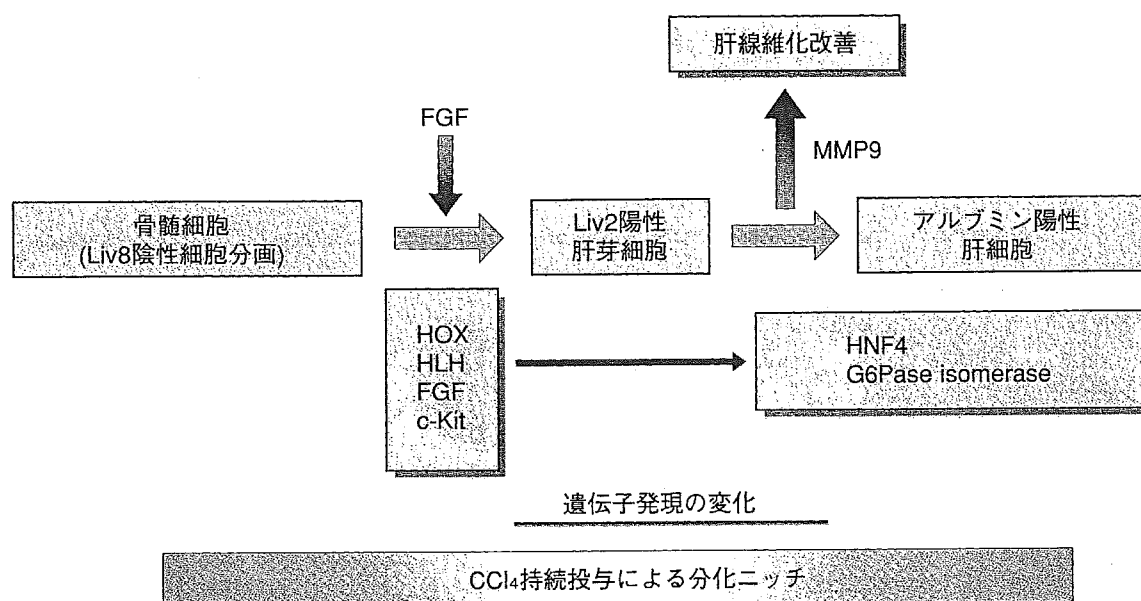


図2 GFP/CCl₄ modelの解析結果

現在までのGFP/CCl₄ modelにおける骨髓細胞の分化，また分化に伴い肝線維化抑制などの周囲環境に与える影響についてまとめた。また，その分化過程に関与する遺伝子群などについて記載した。

カニズムと考える。しかしながら肝臓から分離した初代肝細胞はFACS解析により，2n，4n，8n，16nと核型が多核の細胞からなる細胞集団である。このことを考えると肝臓という臓器を使った解析で，骨髓細胞の肝細胞への分化について，分化転換，細胞融合どちらに決めるかということはかなり困難と考えられ，今後新たな方法での解析が必要と考える。

■ Ⅲ. 骨髓中の肝臓再生に有用な細胞群

骨髓中の幹細胞は大きく三つ，血球幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)，間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)，side population cell(SP細胞)があげられる一方で，骨髓間葉(系)細胞をHGF，FGFを加え培養することにより，非常に可塑性に富む骨髓間葉系細胞由来の multipotent adult progenitor cells(MAPC)の樹立に成功したとする報告もある⁹⁾。骨髓中にどの分画に幹細胞がするかは混乱している。そこでわれわれは胎児期の造血時期であるE11.5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Liv8抗体を作製し，骨髓中の肝幹細胞の同定を目的に以下の研究を行った(東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野 仁科博史教授との共同研究)。Liv8陽性細胞は全骨髓細胞中約30%存在しCD45陽性細胞分画を含み，E11.5日の胎児肝ではLiv8陽性細胞の存在を確認するも，造血能がないAML1 KOマウスの胎児肝ではLiv8陽性細胞の存在は確認できなかった。この結果より，Liv8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/CCl₄ modelを用い，GFPTgマウスから分離した骨髓細胞をAutoMACSを使用して，Liv8抗体で全骨髓細胞をLiv8陰性骨髓細胞集団とLiv8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recipientマウスの尾静脈より、これらの細胞群を投与し、免疫染色、蛍光二重染色にてLiv8陽性、陰性細胞群のアルブミン陽性肝細胞への分化の有無、また血清アルブミン値の改善について評価した。その結果、アルブミン陽性肝細胞への分化転換の評価結果より、Liv8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¹⁰⁾。現在、Liv8抗体の認識する抗原については同定をめざしている。今後の解析により、さらに骨髄中の肝疾患の治療に有用な細胞群を評価していきたいと考える。

■ IV. 骨髄細胞から肝細胞への分化過程に関与する増殖因子群の検討

増殖因子は様々な領域において細胞分化・増殖に影響を与えていると考えられており、また多くの器官の修復過程に密接に関与している。また末梢血管障害・虚血性心疾患・皮膚傷害に対し、血管新生機序を介した新たな治療法の開発をめざして種々の増殖因子を用いた臨床研究も行われており、その有効性が証明されつつある。われわれは障害肝の再生過程、すなわち移植された骨髄細胞から肝細胞への分化過程を促進する増殖因子を同定するため、スクリーニング的にGFP/CCl₄ modelにおける増殖因子の関与について検討した。c-Met(hepatocyte growth factor receptor: HGFR), EGFR(epidermal growth factor receptor), Flg/Bek(fibroblast growth factor receptor: FGFR), Flt-1/Flk-1(vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR), PDGFR α /PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor: PDGFR), TGF β R I/TGF β R II (transforming growth factor β receptor: TGF β R), その結果、GFP/CCl₄ modelにおいて骨髄細胞の分化過程でFGF-FGFRシグナリング系が重要な役割を果たしていることが明らかになった。またそのプロセスにおいて分化過程の骨髄細胞にFGFのautocrineに働くregulationが存在する可能性が示唆された。さらにはrecombinant FGF(rFGF)併用骨髄移植により、骨髄移植およびrFGF2同時投与によってTNF- α シグナリングが誘導され、骨髄細胞から肝細胞への分化過程が単純骨髄移植に比べ促進されることが示唆された。またそれに伴って、肝合成能および生命予後が有意に改善することが確認され、将来的にはrFGF2併用骨髄移植療法が難治性肝疾患に対する新たな治療法になり得ると考えられた¹¹⁾。

■ V. 骨髄細胞の投与による肝機能の上昇、肝線維化改善、生存率の上昇

実際に基礎研究を基盤とし臨床研究として推進するためには、臨床に還元する効果がどの程度あるかが重要となる。GFP/CCl₄ modelの解析により、骨髄細胞を投与することにより血清アルブミン値が上昇することが明らかになった。また骨髄細胞投与により、肝線維化が改善することが明らかになった¹²⁾。この事実は肝臓特異的な肝線維化改善剤の開発が難しいなか、骨髄細胞を用いた治療法は肝臓線維化抑制療法としての意味をもつ可能性が明らかになった。現在のところ、この機構はmatrix metalloproteinase 9(MMP9)などのコラゲナーゼの関与が考えられ、さらに基礎的検討を行っている。また最終的には骨髄細胞投与により実際に生存率が改善していた。この事実は骨髄細胞投与による肝硬変症に対する有効性を論理的に示したものと考えられる。

■ VI. 臨床研究：自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法

以上述べてきたように、骨髄細胞(特に自己骨髄細胞)を用いた肝臓再生療法は、肝臓機能の再生、線維化改善、また生存率の改善が期待できる。これらの成果を基盤に、現在われわれは臨床研究(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)を行っている(現在までに10症例に施行している)。今後はさらに臨床研究を進めるとともに、基礎研究を推進し次世代の肝臓再生療法の開発を推進していきたいと考える。

文 献

- 1) Grisham JW and Thorgeirsson SS: Liver stem cells. Manchester, Academic Press Inc, 1997, pp.233-282.
- 2) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-16, 2000.
- 3) 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. (Tokyo)* 134: 551-558, 2003.
- 4) Nishina H, Vaz C, Billia P, et al: Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 126: 505-516, 1999.
- 5) Omori K, Terai S, Ishikawa T, et al: Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 578: 10-20, 2004.
- 6) 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.
- 7) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002.
- 8) Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897-901, 2003.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al: Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 14: 1-11, 2005.
- 12) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al: Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40: 1304-1311, 2004.

表 題

著 者 名

醫學のあゆみ 別刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

骨髄細胞移植による肝再生

Liver regeneration induced by bone marrow cell transplantation

現在、肝不全患者に対して生体肝移植が行われているが、ドナーの不足、外科侵襲、経済的な問題が大きい。この問題の解決のために肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は重要と考えられる。著者らは細胞療法に使用する細胞源として自己骨髄中の幹細胞に注目し、“自己骨髄細胞を用いた肝再生療法”の開発をめざしトランスレーショナルリサーチを行ってきた。

骨髄中の肝細胞へ分化する幹細胞の発見

肝は、代謝、蛋白合成、解毒などをつかさどる多機能な臓器である。2000年に骨髄中の幹細胞の肝細胞への分化の可塑性について、女性のレシピエントに対して男性の骨髄移植後の剖検例の観察によりY染色体陽性細胞の肝、胆管細胞の存在が明らかになり、骨髄中に存在する肝細胞に分化しうる幹細胞の存在が明らかになった¹⁾。著者らはこの結果より、骨髄細胞(とくに自己骨髄細胞)を細胞源とするあらたな肝再生療法の臨床応用の可能性があるのではないかと考えた。まずは基礎研究として、その骨髄細胞を使った治療を実際の臨床の医療として展開するには、“どのような状況、病態の肝疾患の治療に、骨髄細胞を使用した治療が有効であるか”を明らかにする必要があると考え基礎研究を行った²⁾。

骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル(GFP/CC14モデル)の開発と解析

最初に、骨髄細胞を用いた細胞治療の実現のためには、骨髄細胞の移植により実際に肝機能が改善

するかの評価のため、骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CC14モデル)を開発した³⁾。四塩化炭素投与により4週間ほど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、蛍光のgreen fluorescent protein(GFP)標識した陽性骨髄細胞を投与して、その肝への定着、実際の分化転換について評価した。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、骨髄細胞投与後も続く持続肝障害下の特殊な微小環境“ニッチ”において骨髄細胞が肝芽細胞に分化し、最後はアルブミンを発現する肝細胞へ分化し、肝機能も骨髄細胞移植により改善していた。また、定着した骨髄細胞は時間経過とともに、肝の門脈周囲から小葉内に向かい増加分布していた。この骨髄細胞投与により活性化する遺伝子群については、DNA-Chipを用いた遺伝子解析にSelf-Organizing-Mapという統計解析の手法を使った方法で経時的に遺伝子発現変化の解析を行った。この結果、GFP/CC14モデルにおいて初期にはHelix-Loop-Helix(HLH)、HOX型の転写因子などの形態形成期に関与する遺伝子群が誘導され、時間経過とともにhepatic nuclear factor(HNF)4やGlucose-6-phosphatase isomerase(G6P isomerase)などの肝の代謝に関与する遺伝子群が誘導されていることが明らかになった⁴⁾。

骨髄中の肝再生に有用な細胞群

骨髄中の幹細胞は大きく3つ、血球幹細胞(hematopoietic stem cell:HSC)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)、SP細胞(side population cell)があげら

れる。間葉系細胞をHGF、FGFを加え培養することにより可塑性に富む骨髄間葉系細胞由来のMAPC(multipotent adult progenitor cells)の樹立に成功した報告もある⁵⁾。現在のところ骨髄中のどの分画に幹細胞があるかは混乱している。著者らは胎仔期の造血時期であるE11.5日のマウス胎仔肝を抗原とし新規マウスモノクローナル抗体Liv8抗体を作成し骨髄中の肝幹細胞の同定を目的に、以下の研究を行った(東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野、仁科博史教授との共同研究)。Liv8抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体である。GFP/CC14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、Liv8抗体で全骨髄細胞をLiv8陰性骨髄細胞集団とLiv8陽性骨髄細胞集団に分離しそれぞれを、CC14投与で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し免疫染色、蛍光二重染色にてLiv8陽性、陰性細胞群のアルブミン陽性肝細胞への分化の有無、また血清アルブミン値の改善について評価した。アルブミン陽性肝細胞への分化転換の評価の結果よりLiv8陰性分画に肝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⁶⁾。

骨髄細胞の投与による肝機能の上昇、肝線維化改善、生存率の上昇

実際に基礎研究を基盤とし臨床研究として推進するためには、臨床に還元する効果がどの程度あるかが重要となる。GFP/CC14モデルの解析より骨髄細胞を投与することにより血清アルブミン値が上昇することが明らかになった。また、骨髄細胞投与により、あらたに肝線維化が改善することが明らかになった⁷⁾。この事実は、肝特異的な肝線維化改善剤の開発が難

しいなか、骨髄細胞を用いた治療法は肝線維化改善療法としての意味をもつ可能性が明らかになった。現在のところこの機構は Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9)などのコラゲナーゼが関与していることが明らかになり、さらに基礎的検討を行っている。また、最終的には骨髄細胞投与により実際に生存率が改善している。この事実は骨髄細胞投与による肝硬変症に対する有効性を示している。

臨床研究：自己骨髄細胞を用いた肝再生療法

骨髄細胞(とくに自己骨髄細胞)移植により肝硬変マウスにおいて肝機能の再生、線維化改善、また生存率の改善が明らかになった⁸⁾。これらの成果を基盤に平成15年(2003)11月より著者らは国内初の臨床研究(自己骨髄細胞を用いた肝再生療法)を開始した(現在までに11症例に施行している)。さらに、臨床研究を推進し本治療法の有効性について明らかにしていきたいと考えている。

- 1) Theise, N.D. et al. : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, **32** : 11-16, 2000.
- 2) Terai, S. et al. : A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J. Gastroenterol.*, **37**(Suppl. XIV) : 162-163,

2002.

- 3) Terai, S. et al. : An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem (Tokyo)*, **134** : 551-558, 2003.
- 4) Omori, K. et al. : Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.*, **578** : 10-20, 2004.
- 5) Schwartz, R.E. et al. : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, **109** : 1291-1302, 2002.
- 6) Yamamoto, N. 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.
- 7) Sakaida, I. et al. : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, **40** : 1304-1311, 2004.
- 8) Terai, S. et al. : Lesson from the GFP/CCl₄ model-Translational Research Project : the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.*, **12** : 203-207, 2005.

寺井崇二, 坂井田 功/Shuji TERAI and Isao SAKAIDA

山口大学先端分子応用医科学講座消化器病態内科学

胞に到達するとは限らず、桑実期胚で止まってしまうことがある。そこで、これらの短所を改善する目的で桑実期胚移植を行い、その臨床上的有用性を検討してみた。

桑実期胚移植の実際

平成16年(2004)10月～3月末日までの期間内で38歳未満、GnRH-aを用いたlong法でM-II期卵子が5個以上採取、採卵周期4回以内のICSI症例を対象とした。採卵後に3～4時間前培養後に顕微授精して得られた胚をQuinn's Cleavage medium内で培養、採卵3日目の8細胞期胚をQuinn's Blastocyst mediumに移し桑実期胚に達した時点で、子宮内に移植した。気相条件はN₂:O₂:CO₂=90%:5%:5%で行った。凍結、融解の方法は緩慢凍結では1.8 M エチレングリコール+0.2 M シュークロースの凍結用培養液に胚を入れ洗浄、その後、0.25 ml のストローに吸引し密封。このストローを-7°Cに設定したプログラムフリーザーに入れ、-7°Cで植氷し、毎分-0.3°Cの速度で-30°Cまで冷却し、その後液体窒素内で保管した。融解は30°Cの微温湯にストローを入れ、耐凍剤の除去は6段階で施行した。Vitrification法は北里サプライのキットを用いて指定されたプロトコール通りに行った。

Experimental Medicine

実験医学 増刊

別刷

株式会社 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1神田三和ビル

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail: eigyo@yodosha.co.jp

6. 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発 —基礎研究から臨床研究へ—

石川 剛, 寺井崇二, 坂井田 功

難治性肝疾患に対する新たな治療法の開発を目指して、われわれは骨髄幹細胞の可塑性に着目し基礎研究を進めてきた。慢性炎症という特殊環境下（分化Niche）において骨髄細胞が肝細胞へと分化し、さらにその過程で肝合成能・肝線維化・生命予後が有意に改善するという動物実験の結果を基盤として、われわれは2003年11月より国内初の臨床研究「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」を開始するに至った。今後より効率の良い治療法の開発に向けてさらなる基礎・臨床研究を重ね、詳細な解析・検討を進めていこうと考えている。

はじめに

非代償性肝硬変をはじめとした重症肝疾患の唯一無二の根治療法は肝移植（生体肝移植・脳死肝移植）であるが、これにはドナー不足や手術侵襲・免疫拒絶といった問題が積みまとうため現状では対症療法を余儀なくされるケースがほとんどである。したがってこれに代わる新たな治療法として、幹細胞を用いた肝臓再

生療法の開発が急務であると考え、その細胞療法のソースとして骨髄幹細胞・胚性幹細胞・臍帯血幹細胞・肝幹細胞などがあげられるが、われわれはその細胞源として骨髄幹細胞を選択し、基礎・臨床研究を進めてきた。骨髄細胞には胚性幹細胞にみられるような奇形腫形成の危険性がなく、肝臓に存在する肝幹細胞に比べて分離が容易である。また他の幹細胞の使用に当たって問題視されている倫理面の障壁も容易にクリ

[キーワード&略語]

肝臓再生療法, 骨髄幹細胞, 分化, 線維芽細胞増殖因子, 腫瘍壊死因子

AFP : alpha fetoprotein

CCl₄ : carbon tetrachloride

EGFR : epidermal growth factor receptor

FGFR : fibroblast growth factor receptor

GFP : green fluorescent protein

HGFR : hepatocyte growth factor receptor

HNF4 : hepatic nuclear factor 4

MMP : matrix metalloproteinase

NF- κ B : nuclear factor κ B

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

rFGF : recombinant fibroblast growth factor

TGF- β R : transforming growth factor- β receptor

TNFIP3 : tumor necrosis factor- α induced protein 3

TNF- α : tumor necrosis factor- α

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

Development of liver regenerative therapy using autologous bone marrow cells — basic and clinical research
Tsuyoshi Ishikawa/Shuji Terai/Isao Sakaida : Department of Molecular Science & Applied Medicine (Gastroenterology & Hepatology), Yamaguchi University School of Medicine (山形大学医学部消化器病態内科学)

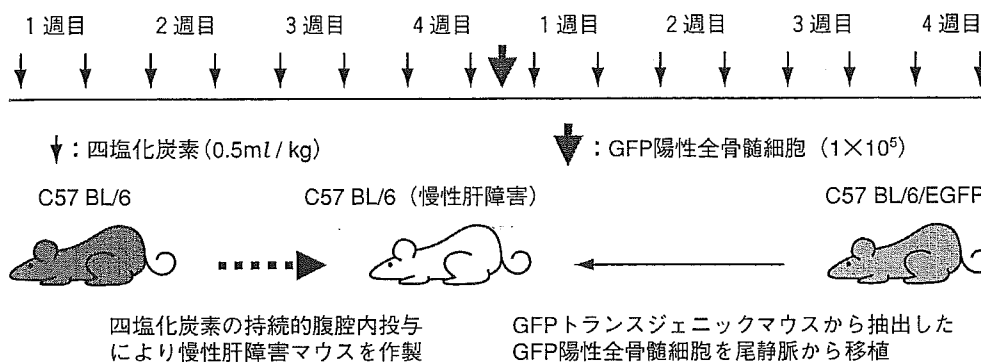


図1 GFP/CCl₄モデル

6週齢のC57 BL/6マウスに四塩化炭素 (0.5 ml/kg) を週2回・4週間 (計8回) 腹腔内投与して慢性肝障害モデルを作製する。同種同系GFPトランスジェニックマウス (C57 BL/6/EGFP) の大腿骨から抽出したGFP陽性全骨髄細胞を尾静脈から移植し、その後も四塩化炭素を継続投与する

アできる。さらに自己骨髄細胞を用いることで免疫拒絶の問題も解消され、これを利用した肝臓再生療法が臨床応用へ最も現実的で実現可能な治療法であるとわれわれは考えたのである。

一方、血液疾患患者に対する骨髄移植および末梢血幹細胞移植症例〔女性患者 (XX) に男性 (XY) の幹細胞を移植した症例〕の剖検においてFISHによる解析の結果、慢性炎症環境下にあった肝臓および消化管内にY染色体が検出され、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された。これらの症例検討より、骨髄細胞から肝細胞および消化管上皮細胞への可塑性が証明されたといえる^{1) 2)}。

そこで自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の早期実現を目指して、われわれは骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル [green fluorescent protein (GFP) /carbon tetrachloride (CCl₄) モデル] を確立し、それを用いてさまざまな解析・検討結果をこれまでに報告してきた^{3) ~8)}。本稿では難治性肝疾患に対する新たな細胞療法の開発に向けてわれわれが進めてきた基礎研究の結果、さらにはそれを基盤として2003年11月より開始した国内初の臨床研究の経緯および経過を含めて述べる。

骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル (GFP/CCl₄モデル)⁸⁾

私たちはさまざまな肝障害モデルの中から、四塩化炭素 (CCl₄) による肝細胞直接障害モデルを選択し基礎研究を進めてきた。われわれが独自に開発し報告し

てきたGFP/CCl₄モデルの特徴は、①持続的なCCl₄投与により慢性肝障害をもたらすこと、②骨髄移植後もCCl₄投与を継続し慢性炎症状態を維持すること、③自家骨髄移植を想定してレシピエントと同種同系のGFPトランスジェニックマウスをドナーとして用いることである。同モデルのプロトコールは図1に示す通りである。6週齢のC57 BL/6マウス (雌) にCCl₄ (0.5 ml/kg) を週2回・4週間 (計8回) 腹腔内投与して慢性肝障害モデルを作製した (レシピエント)。同種同系GFPトランスジェニックマウス (雄; ドナー) の大腿骨から抽出した全骨髄細胞をレシピエントの尾静脈から移植し、その後も同量・同頻度のCCl₄投与を継続した上で経時的変化を観察した。

1) 肝内のGFP陽性細胞すなわち骨髄由来細胞は移植後時間経過と共に有意に増加し (p<0.01)、投与後早期に肝小葉辺縁部 (Zone1) に限局して存在していたそれらの細胞が、次第に中心部 (Zone2) へ向かって広がっていくという特徴的な局在性が認められた。その過程において幹細胞マーカーであるc-kit、幹細胞から肝細胞への分化を制御する転写制御因子であるhepatic nuclear factor 4 (HNF4)、肝芽細胞マーカーであるLiv2、肝細胞マーカーであるalpha fetoprotein (AFP) ・アルブミンの発現はいずれも骨髄移植後有意に上昇し、また蛍光二重染色においてGFPとの共発現が確認された³⁾。

2) 骨髄移植により血清アルブミン値 (図2) および累積生存率の有意な上昇 (p<0.05)、さらにはシリウスレッド染色における線維の明らかな減少が認めら

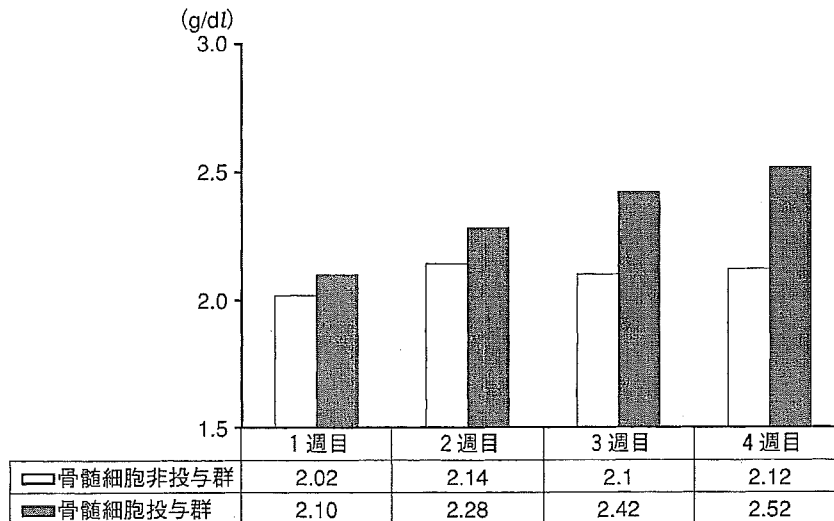


図2 血清アルブミン値の推移

骨髄細胞投与群の血清アルブミン値は非投与群に比して有意に高く、また移植後時間経過とともに有意に上昇する ($p < 0.05$)

れた。またその過程において骨髄由来 GFP 陽性細胞が matrix metalloproteinase (MMP) 2・9 などのゲラチナーゼを分泌していることが確認された⁵⁾。

以上 GFP/CCl₄ モデルを用いた基礎研究より、慢性肝障害環境下において移植された骨髄細胞が肝細胞へと分化し、肝合成能・肝線維化さらには生命予後の有意な改善をもたらすことが示唆された。

骨髄細胞から肝細胞への分化過程に 関与する増殖因子の検討

増殖因子はさまざまな領域において細胞分化・増殖に影響を与えていると考えられており、また多くの器官の修復過程に密接に関与していると報告されている^{9)~12)}。さらに末梢血管障害・虚血性心疾患・皮膚傷害に対し、血管新生機序を介した新たな治療法の開発を目指して種々の増殖因子を用いた臨床研究がこれまでにも行われており、その有効性が証明されつつある^{13)~15)}。続いてわれわれは障害肝の再生過程、すなわち移植された骨髄細胞から肝細胞への分化過程を促進する増殖因子を同定するため各種検討を行った⁷⁾。

1) スクリーニングのため、肝組織を用いて以下に示す10種類の増殖因子受容体抗体による免疫染色を行った。

c-Met (HGFR : hepatocyte growth factor receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor), Flg/Bek

(FGFR : fibroblast growth factor receptor), Flt-1/Flk-1 (VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor), PDGFR α /PDGFR β (PDGFR : platelet-derived growth factor receptor), TGF β R I/TGF β R II (TGF β R : transforming growth factor β receptor)

画像解析ソフトを用いて抗体陽性部の面積占有率を測定し、それぞれのタンパク発現を定量化して統計学的解析を行った結果、FGFの受容体であるFlgとBekにのみ骨髄細胞投与後の有意な発現上昇が確認された ($p < 0.05$)。その他の増殖因子受容体の発現も認められたが、統計学的な有意差は認められなかった。

2) FGFR (Flg/Bek) およびそれらのリガンドである FGF (FGF1/FGF2) を対象として骨髄細胞投与群と非投与群の比較実験を行った。いずれの発現も骨髄細胞非投与群に比して投与群の方が有意に高く、さらに骨髄移植後時間経過とともに有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$; 表1)。またそれぞれの抗体陽性部は、骨髄細胞投与後肝小葉辺縁部から中心部へと徐々に増加しながら移動するという特徴的な分布傾向を示した。GFP との蛍光二重染色を行った結果、骨髄由来 GFP 陽性細胞の膜表面に FGFR、細胞質に FGF の共発現が確認された。

以上の結果より、GFP/CCl₄ モデルにおける骨髄細胞から肝細胞への分化過程には FGF-FGFR シグナリ

表1 FGFR・FGFの免疫染色

		1週	4週
FGFR1	BMT(+)	5.3%±1.1	6.7%±1.2
	BMT(-)	3.7%±0.6	4.2%±1.2
FGFR2	BMT(+)	5.4%±0.9	7.1%±0.9
	BMT(-)	3.8%±0.9	4.4%±1.2
FGF1	BMT(+)	5.8%±1.3	7.1%±1.2
	BMT(-)	3.8%±0.7	4.8%±0.6
FGF2	BMT(+)	6.1%±1.3	7.5%±1.3
	BMT(-)	3.9%±1.0	4.6%±1.0

FGFRおよびFGFの発現は骨髄細胞非投与群に比して投与群の方が有意に高く、また骨髄移植後時間経過とともに有意な発現上昇が認められる ($p<0.05$)。BMT (+) ; 骨髄細胞投与群, BMT (-) ; 骨髄細胞非投与群。(文献7より引用改変)

ングが密接に関与しており、さらにはそのプロセスにおいてFGFのautocrine regulationが存在する可能性が示唆された。

3 recombinant FGF (rFGF) 併用骨髄移植による慢性肝障害改善効果とその分子制御機構

骨髄細胞と共にrFGF (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を同時投与^{13) 14)}することにより、骨髄細胞から肝細胞への分化効率が上昇するか否か、またその慢性肝障害にもたらす影響について詳細な検討を行った。CCl₄の持続投与によって作製された慢性肝障害マウスを以下に示す6群に分けて経時的变化を比較・解析した⁷⁾。

- ①CCl₄群 (骨髄細胞・rFGF非投与) ②rFGF1群 (rFGF1のみ投与) ③rFGF2群 (rFGF2のみ投与) ④BMC群 (骨髄細胞のみ投与) ⑤BMC+rFGF1群 (骨髄細胞・rFGF1同時投与) ⑥BMC+rFGF2群 (骨髄細胞・rFGF2同時投与)

1) 抗GFP抗体を用いた免疫染色の結果、骨髄由来細胞の肝臓へのrepopulation rateは、rFGF、特にrFGF2同時投与により有意に上昇した ($p<0.05$; 図3)

2) 抗Liv2抗体・抗アルブミン抗体を用いた免疫染色の結果、rFGF、特にrFGF2同時投与によりそれらの発現は有意に上昇した ($p<0.05$)。一方、rFGFのみを投与してもCCl₄群に比して明らかな発現増加傾向は認められなかった。

3) 血清アルブミン値・累積生存率の解析を行った

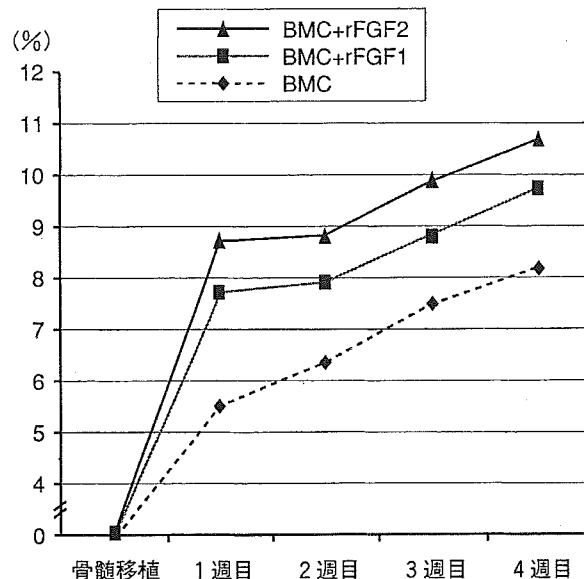


図3 肝内GFP陽性細胞の割合

rFGF、特にrFGF2併用により骨髄由来細胞の肝臓へのrepopulation rateは有意に上昇する ($p<0.05$)。BMC: 骨髄細胞のみ投与, BMC+rFGF1: 骨髄細胞・rFGF1同時投与, BMC+rFGF2: 骨髄細胞・rFGF2同時投与 (文献7より引用改変)

結果、骨髄移植さらにはrFGF2を同時投与することによりそれらは有意に上昇した ($p<0.05$)。一方、rFGFのみを投与ではいずれの検討においても明らかな改善効果は認められなかった。

4) DNAチップを用いた遺伝子発現の網羅的解析および対数を含む特殊方程式を用いた統計学的解析を行った結果、rFGF2を同時投与することで最も有意にup regulateされた遺伝子 (BMC+rFGF2群 vs BMC群) はtumor necrosis factor α induced protein 3 (TNFIP3)であった。

5) TNFIP3 (別名A20)の上流因子であるtumor necrosis factor α (TNF α)・下流因子であるnuclear factor κ B (NF κ B)に対して免疫染色を行った結果、遺伝子発現同様タンパクレベルにおいてもTNF α シグナリングの有意な発現上昇が確認された。

以上の結果より、骨髄移植およびrFGF2同時投与によってTNF α シグナリングが誘導され、骨髄細胞から肝細胞への分化過程が有意に促進されることが示唆された。またそれに伴って肝合成能および生命予後が有意に改善することが確認されており、将来的にはrFGF2併用骨髄移植療法が難治性肝疾患に対するよ

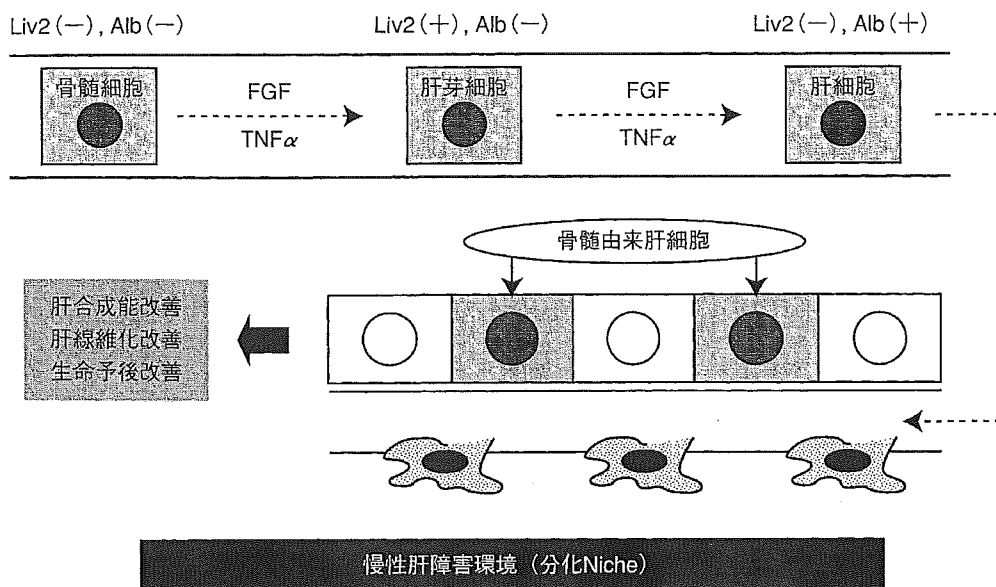


図4 骨髄細胞から肝細胞への分化過程のまとめ

慢性肝障害環境（分化Niche）において、移植された骨髄細胞が肝芽細胞の表現型を経て機能的成熟肝細胞へと分化する。またその過程で肝合成能・肝線維化および生命予後が有意に改善する。さらにそのプロセスにおいてFGFシグナリング、TNF α シグナリングが重要な役割を果たしていることが推測される

り効率の良い治療法になりうると考えている。この治療法の臨床応用については現在進めている臨床研究の結果を評価しながら検討していきたい。

4 臨床研究「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」

これまでの基礎研究結果を基盤として、2003年11月より国内初の臨床研究「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」を開始し、2005年9月までに10症例（HCV：5例，HBV：3例，アルコール+HCV：1例，原因不明：1例）を経験した。われわれが設定した適応条件は以下に示す通りである。

〈適応条件〉総ビリルビン値：3.0 mg/dl以下。

血小板数：5.0 × 10¹⁰/l以上。

食道・胃静脈瘤および肝細胞癌のコントロールが良好である。

心・肺機能が良好でその他に重篤な併存疾患が認められない。

骨髄移植後6カ月間厳重な経過観察を続け、血液生化学検査・肝組織学検査・腹部CT検査などさまざまな角度から安全性および有効性の評価を行った。

1) 現時点で治療後に大きなトラブル（合併症・副作

用）が生じた症例はなく、安全性に関しては特に問題のない治療法といえる。

2) 肝予備能の指標とされるChild-Pughスコアは明らかな改善傾向を示した。

3) 肝線維化マーカーであるプロコラーゲン3ペプチド（P-3-P）値は明らかに低下し、線維化の改善傾向が示唆された。

4) 現時点では統計学的な有意差はないものの血清アルブミン値の明らかな上昇傾向が確認され、難治性腹水のコントロールが良好になった症例も認められた。

5) 骨髄移植1カ月後の肝組織を用いた免疫染色の結果、HNF4・AFPの発現増加が認められ、肝細胞への分化・肝再生の誘導が示唆された。

現時点で10症例に対して臨床研究「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」を施行しており、これまでの経過はGFP/CCl₄モデルを用いた動物実験から予測された結果にほぼ一致している。今後も安全性に関する厳重なチェックを行うと同時に、多施設研究などの推進によってさらにさまざまなデータを集積しその有効性についての明確なエビデンスを示していきたいと考えている。