

## 14. 再生医療

あさはらとしまさ ひのひろし いたもととしゆき  
浅原利正, 白野裕史, 板本敏行

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 先進医療開発科学講座外科学

### 最近の動向

再生医学は現在最も活発に研究されており、かつ臨床応用が強く期待されている領域であるため、新しい知見や可能性が次々と提示されている。その一方、昨年からこれまでの研究成果に対して再評価が行われていることがこの一年の大きな特徴である。臨床応用に向けた再生医学研究のより具体的な対応について精力的な研究が進んでいるといえる。これまで期待されてきた成体（組織）幹細胞の全能性は、特異な条件下での産物との認識が拡がりつつあり、また胚性幹細胞（ES細胞）は、臨床応用に体細胞核移植が必須であり、この技術によって創られたクローンが、少なくとも現段階では遺伝子プログラムを完全に再現できない現実が明らかにされた。こうした厳しい事実にぶつかりながら、それを上回る活発なアプローチで再生医療実現の可能性が模索されている。

### はじめに

体細胞核移植によるクローン羊ドリーの誕生で衝撃をもたらしたクローン技術研究の進歩は、科学や学問にとどまらず政治や宗教に至るまで社会に大きな影響を及ぼした。特に、生殖クローニングに対する倫理的問題が現実の懸念として表れたことから、米国におけるヒトクローン禁止法案をはじめ、各国でクローン技術に関する研究を一部規制する動きが表れた。

核移植は治療対象者と免疫学的に全く同じ臓器・組織を入手するための再生医療である。それは、成人体細胞の核を卵子の中に移し電気刺激で体細胞核の遺伝子を再活性化させ、胚発生を再開させる技術である。再構築された胚を個体の発生に用いれば生殖クローンに、胚から胚性幹細胞（ES細胞）を作り、目的の細胞、組織を得れば治療用クローンとなる。

このように核移植は個人に合わせた胚性幹細胞を作り出すために欠かせない方法であるが、これをヒトの生殖に用いるとクローン人間を生み出すことが可能となり、このことが体細胞核移植技術を利用した治療クローニングの研究までも規制するものとなった。これを解決するために、再生医療を進める研究者が成体（組織）幹細胞の利用に向かったのは必然ともいえる流れであった。成

体幹細胞が胚性幹細胞と同程度に万能ならば、胚性幹細胞の使用に伴う議論も必要でなくなる。

こうして、成体幹細胞に関する知見が次々と報告され大きな期待が持たれるようになり、一部誇大ともいえる成体幹細胞の全能性を示す報告が次々となされた。

しかしここに来て、それらの報告の多くに誤りを含む可能性が指摘されている。つまり、人為的影響やあるいは細胞融合の結果生じた可能性を全能性と認識したもの、または正常な生物学的環境下では例外的な事象に起因していると考えられるものが含まれており、厳密な検証のもと再評価する報告が相継いでなされた。

胚性幹細胞がすべての組織を作り出せるということには議論の余地は無いと思われるが、成体幹細胞に同様の能力があるのかは未だ明らかにされてはいない。

### 幹細胞を特徴づける因子

Hoechst 33342蛍光色素は UV レーザーで蛍光を発する色素だが、造血幹細胞はこれを強く排泄して蛍光を発しない特異な細胞集団として検出されることが知られている。この細胞は SP (Side Population) 細胞と名付けられ、調べられた哺乳動物すべてで確認された。種を越えて保存された性質であるだけでなく、骨髓細胞中以外の、筋肉、神経、腎臓、肝臓などにも存在することが明らかになっており、成体(組織)幹細胞に共通の性質である可能性が示唆されている。最近、この SP 細胞の性質が ATP binding cassette transporter の一種である Bcrp-1/ABCG2 という分子によって担われていることが、Zhouらによって明らかにされた<sup>1)</sup>。

また胚性幹細胞(ES細胞)と成体幹細胞に共通する、幹細胞を特徴づける遺伝子の探索同定が、Ramalho-Santosら<sup>2)</sup>や、Ivanovaら<sup>3)</sup>によって遺伝子発現プロファイリングの手法を用いて行われた。彼らは、見つけた遺伝子が幹細胞の特徴に關与するとして“stem cell signature”と呼んだ。ところが、ドイツとアメリカの研究グループが同様の遺伝子解析を試したところ、前の二つのグループと同じシステムを使っているにもかかわらず、発表された幹細胞共通遺伝子群は6遺伝子しか共通しておらず、さらに網膜幹細胞遺伝子群との重複を調べた結果、わずか1個(integrin alpha-6)しか一致しなかったことがScience誌に掲載された<sup>4,5)</sup>。これは遺伝子解析技術の再現性と、共通発現している事実だけで「幹細胞の特性をもたらす遺伝子」と評価することに疑問を投げ掛けたのである。候補の遺伝子が本当に幹細胞に特徴的な遺伝子か最終的に判断するためには、ノックアウトマウスを作製して、各々の機能を決定する必要があると筆者は考える。

- 1) Zhou S, Morris JJ, Barnes Y et al : Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 99 (19) : 12339-12344, 2002
- 2) Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y et al : "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 298 (5593) : 597-600, 2002
- 3) Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C et al : A stem cell molecular signature. Science 298(5593) : 601-604, 2002
- 4) Fortunel NO, Otu HH, Ng HH et al : Comment on "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells and "a stem cell molecular signature". Science 302 (5644) : 393, 2003
- 5) Evsikov AV, Solter D : Comment on "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells and "a stem cell molecular signature". Science 302 (5644) : 393, 2003

これらにひき続き発表された, Chambers ら<sup>6)</sup> や Mitsui ら<sup>7)</sup> の報告は, 胚性幹細胞 (ES 細胞) に限られるが, self-renewal や細胞産生能を与えている遺伝子を同定した報告で, 幹細胞の特徴を解明するうえで基礎となる研究である。ES細胞が分化多能性を維持できるメカニズムは, これまでほとんどわかっていなかった。ES 細胞で特異的に働いているホメオボックス遺伝子を同定し, 彼らはそのうちの一つを Nanog と命名した。ES 細胞から Nanog 遺伝子を除去すると, 分化多能性を維持できず原始内胚葉へと分化した。また Nanog 遺伝子ノックアウトマウスは, 発生初期において分化多能性細胞が消失し致死的となった。一方, ES 細胞において Nanog 遺伝子を過剰に発現させると, それだけで分化多能性を維持することができた。これらの結果から, Nanog は ES 細胞の分化多能性を維持する必須因子であることが明らかとなった。

また別のホメオボックス遺伝子の一つは, 癌遺伝子である Ras に構造が類似していることから ERas と命名された。Takahashi ら<sup>8)</sup> の報告によると, ERas を導入した NIH3T3 細胞はトランスフォームし, 培地中で異常増殖し, ノードマウスに移植しても腫瘍形成が認められたことから, ERas も Ras と同様に細胞を癌化する能力のあることがわかった。ES 細胞で ERas の働きを止めると, 腫瘍形成が正常 ES 細胞の 1 割以下に減少した。しかし, 驚くべきことに ERas が欠損した ES 細胞の分化能や, ノックアウトマウスは全く正常で万能性は維持された。これらの事実から, ERas は ES 細胞の腫瘍形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この成果はヒト ES 細胞の臨床応用において, ERas 遺伝子を除去することが腫瘍化の危険性を回避する有効な手段として期待できることを示している。

### 胚性幹細胞 (ES細胞) からの分化誘導

通常得ることが困難な研究材料を調達するため, あるいは疾病の治療などに用いることを目指し, ES 細胞を各種分化細胞に誘導する試みは多数報告されている。

ES 細胞は三つの胚性胚葉 (内胚葉, 中胚葉, 外胚葉) のすべてに分化するが, 現在なお, 分化誘導できるのは一部の細胞種だけである, 特にその生成に減数分裂を必要とする生殖細胞への分化誘導は, 従来不可能に近いとも考えられていた。しかし Hubner らにより, マウス ES 細胞から成熟卵細胞を形成し, その後胚盤胞類似の構造を発生する卵母細胞の集団が単離されたことが報告された<sup>9)</sup>。このように, 目的の細胞・組織を発生させる技術は目覚ましく進んでいる。

#### 1. ES 細胞から肝細胞への分化誘導

マウス ES 細胞から肝細胞を得るために Fair らは, 心臓中胚葉の細胞と共培養することにより, 肝細胞への分化を誘導した<sup>10)</sup>。その細胞は形態的に肝細

6) Chambers I, Colby D, Robertson M et al : Functional expression cloning of Nanog, pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113 (5) : 643-655, 2003

7) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H et al : The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5) : 631-642, 2003

8) Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S : Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 423 (6939) : 541-545, 2003

9) Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK et al : Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300 (5623) : 1251-1256, 2003

10) Fair JH, Cairns BA, Lapaglia M et al : Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* 134 (2) : 189-196, 2003

胞の形を呈し、肝臓分化に非常に重要な転写因子 *sox17a*, *HNF3β* などが活性化され、アルブミンや *αFP* の mRNA の発現も増強していた。

また Yamamoto らは、アルブミンプロモーターの下流に緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子を組込んだ ES 細胞を一定条件下で培養した後、*CCl4* で肝障害を惹起させたマウスの肝臓に24時間後移植した。するとES細胞は生着し、そこで GFP 陽性の細胞集団が確認された。これらの細胞つまりアルブミン遺伝子発現陽性の細胞を検討したところ、いくつかの肝特異的マーカーも陽性であった。さらにこの細胞を *in vitro* で培養すると、複数の肝特異的マーカーを発現するコロニーが出現した。この細胞は糖新生などの肝臓特異的な機能を有し、電子顕微鏡観察の結果からも成熟肝細胞に近いとしている<sup>11)</sup>。

## 2. ES 細胞から膵細胞への分化誘導

2001年に Lumelsky らが、マウス ES 細胞をブドウ糖応答性をもつインスリン分泌細胞に分化させることに成功し、さらにこの細胞を糖尿病モデルマウスに移植すると、血糖値などが改善することが報じられた<sup>12)</sup>。

しかし、Rajagopal らは、ES 細胞由来の細胞は培地中のインスリンを取り込む活性が極めて高く、それ自身はインスリン (mRNA) を合成していないことを示した。そして「インスリン分泌細胞に分化誘導されたとされる細胞は、使用された培養液中からインスリンを吸収することにより膵細胞のように見えるだけではないか」と実験結果を根本から揺るがす反論を発表した<sup>13)</sup>。

こうしたなか、Hori らは糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に ES 細胞から分化誘導したインスリン産生細胞を移植することにより、生存率改善効果と血糖値上昇抑制効果があったことを報告した。そして、その細胞がインスリンを生産していることを確かめるために、プロインスリンから活性型インスリンが切断される際に生じる c-ペプチドを含むことを明らかにして、細胞由来のインスリンであることを証明した<sup>14)</sup>。

Kim らは、マウスの ES 細胞から新しい一連の手順で分化誘導したインスリン分泌細胞が膵内分泌細胞に特異的な遺伝子を強発現しており、この細胞を3匹の糖尿病モデルマウスに10万個を移植、3匹の血糖値は4、5日後には正常値まで下がり、移植した細胞の腫瘍化は認めなかったと報告している<sup>15)</sup>。

これらの報告から、誤認の指摘を受けた最初の論文も内容の事実すべてが否定されるわけではないと筆者は考える。しかし mRNA の発現などの基本的な確認もされておらず、たとえ一流誌に掲載された論文でも現象面の新奇性にとられ検証面で不十分なものと警鐘を鳴らした出来事であったと思われる。

## 骨髄細胞、造血幹細胞からの分化転換

Wagers らはマウスの造血幹細胞を1個単離し、それをマウスの体内に戻

- 11) Yamamoto H, Quinn G, Asari A et al : Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes : biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 37 (5) : 983-993, 2003
- 12) Lumelsky N, Blondel O, Laeng P et al : Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 293 (5529) : 428, 2001
- 13) Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S et al : Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. Martinez OI, Melton DA. *Science* 299 (5605) : 324, 2003
- 14) Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC et al : Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (25) : 16105-16110, 2002
- 15) Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiya M et al : *In vivo* functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas* 27 (2) : E34-E41, 2003

し、GFP を使ってその細胞の子孫について追跡を行った。その結果、末梢白血球を別にすると、その幹細胞から作られた脳、腎、腸、肝、筋肉など他の組織の細胞は、3匹のマウスでたった8個だけということが確認され、他組織への分化は非常に稀な現象だと結論している<sup>16)</sup>。また「骨髄造血幹細胞は神経細胞には分化転換しない」という報告が Castro らによって報告された。骨髄キメラマウスの脳に損傷を与えても、骨髄由来細胞は動員されないという内容である<sup>17)</sup>。

しかし、これらの報告に対しスタンフォード大の Blau らは、Castro らや、Wagers らの実験にはポジティブコントロールが無いため、実験結果が必ずしも正しいとはいえないと批判した<sup>18)</sup>。それぞれの主張のどちらが正しいかは、今後の研究で明らかにされていくであろう。

### 骨髄細胞と組織細胞の細胞融合

チロシン血症1型のモデルマウスである fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) 欠損マウスへ正常な肝臓をもつマウスの骨髄を移植すると、骨髄細胞が移植したマウスの細胞に置き換わるだけでなく、肝細胞も正常なマウスの肝細胞に置き換わることが知られている。これは、移植した骨髄細胞の一部が肝細胞に変化したためであると考えられてきた。

Wang らが行った実験でも、骨髄移植により正常肝に変化した。ところが、詳細な解析を行うと修復された肝臓の細胞にはドナーの遺伝子とレシビエントの遺伝子の両方が含まれていることが判明し、染色体も2倍体あるいは3倍体の肝細胞が認められた<sup>19)</sup>。ワシントン大学の Vassilopoulos らも、FAH 欠損マウスに骨髄幹細胞を移植する実験で、上記の報告と似た融合の証拠を見いだした<sup>20)</sup>。このことから、骨髄細胞は他の細胞に変化する能力は実は無く、細胞融合する能力があるだけではないかと彼らは考えている。骨髄細胞は損傷を受けた肝臓細胞と融合し、障害を受けた細胞機能を正常化している可能性も考えられる。

また骨髄移植後、2ヵ月ほどして肝細胞が置換し始めることから、細胞融合するのは移植した骨髄細胞そのものではなく、骨髄細胞から作られた T 細胞、B 細胞、マクロファージなどが肝細胞と融合している可能性があるとも推測している。

その一方で、Ianus らは骨髄細胞から膵内分泌細胞への分化を二つの手段、性染色体の確認と、インスリン遺伝子が働くと GFP が発現する CRE-LoxP システムを用いて、骨髄細胞から膵内分泌細胞への分化は細胞融合の可能性は無いと報告している<sup>21)</sup>。

16) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JJ et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297 (5590) : 2256-2259, 2002

17) Castro RF, Jackson KA, Goodell MA : Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 297 (5585) : 1299, 2002

18) Blau H, Brazelton T, Keshet G : Something in the eye of the beholder. *Science* 298 (5592) : 361-362, 2002

19) Wang X, Willenbring H, Akkari Y et al : Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422 (6934) : 897-901, 2003

20) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422 (6934) : 901-904, 2003

21) Ianus A, Holz GG, Theise ND et al : *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111 (6) : 799-801, 2003

### 臍帯血細胞から肝細胞への分化転換

Newsome らは、ヒト臍帯血の単核球を放射線照射した免疫不全マウス (NOD-SCID) に移植し、肝臓を蛍光 *in situ* hybridization で識別し、肝細胞に分化したことを確認した<sup>22)</sup>。また肝細胞に分化した細胞は、細胞融合した証拠は全く認められなかったと報告している。ほぼ同様の方法で、Ishikawa らのグループはヒト臍帯血の CD34 または CD45 陽性細胞を移植して<sup>23)</sup>、Kakinuma らはヒト臍帯血を培養しアルブミン陽性を示す細胞を免疫不全マウスに移植して肝細胞様に分化したことを報告している<sup>24)</sup>。

### その他の細胞から肝細胞への分化転換

Okumura らは、唾液腺の前駆細胞が肝細胞や膵細胞へ分化することを報告した。唾液管を結紮し得られた唾液腺の前駆細胞を培養することにより上皮様細胞 SGP-1 を得た。この細胞は造血幹細胞のマーカー CD34 や肝前駆細胞の一つ oval cell のマーカー、アルブミン、 $\alpha$ FP や CK19 などはずべて陰性だったが、門脈経由で肝臓に移植すると肝索状構造を作りアルブミンを発現した。またコラーゲンコートしたディッシュで培養すると、 $\alpha$ FP やアルブミン陽性の肝細胞様の細胞集団やグルカゴン・インスリン陽性の膵細胞様の細胞集団を形成した<sup>25)</sup>。

Tosh らは膵細胞由来の cell line を、デキサメタゾンを使用して培養し、肝細胞の代謝と解毒機能を持ち、肝細胞特有のマーカーを発現する細胞を作り出した。肝細胞の初代培養に代わる実験系としての価値を報告している<sup>26)</sup>。

### 肝細胞から膵細胞への分化転換

アデノウイルスベクターを用いマウスの肝臓に PDX-1 遺伝子を導入し生体内でインスリンを直接産生させた Ber らの報告<sup>27)</sup> や、VP16 アクチベーターを付けた PDX-1 遺伝子を、培養ヒト成体肝細胞に導入し膵分泌細胞への分化転換を確認した Horb らの報告があった<sup>28)</sup>。

また Kojima らによると、ストレプトゾトシンを用いた糖尿病モデルマウスにアデノウイルスベクターで PDX-1 遺伝子を導入したところ、劇症肝炎が誘発された。そこで PDX-1 の下流にある NeuroD-beta cellulin 遺伝子を用いることで、劇症肝炎を誘発することなくすべてのマウスを回復させることが可能となり、肝臓由来のインスリンやその他の膵島特異的な転写因子やプロインスリン加工酵素なども確認されたと報告している<sup>29)</sup>。

### クローン技術の抱える問題点

体細胞から発生させたクローンは未だ多くの問題を抱えている。多くのクロー

22) Newsome PN, Johannessen I, Boyle S : Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 124 (7) : 1891-1900, 2003

23) Ishikawa F, Drake CJ, Yang S et al : Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 996 : 174-185, 2003

24) Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R et al : Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 21 (2) : 217-227, 2003

25) Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y et al : Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 38 (1) : 104-113, 2003

26) Tosh D, Shen CN, Slack JM : Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* 36 (3) : 534-543, 2002

27) Ber I, Shternhall K, Perl S et al : Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278 (34) : 31950-31957, 2003

28) Horb ME, Shen CN, Tosh D et al : Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol* 13 (2) : 105-115, 2003

29) Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K et al : NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9 (5) : 596-603, 2003

ーン胚は移植後すぐに死んでしまう。生きて産まれたものも、ドナー細胞の種類に関わりなく共通した異常が現れる。巨大児や巨大胎盤はよく知られているが、それ以外にも新生児に肺・腎・肝・脳・心の欠陥が多く、たとえうまく成長しても早死や、肥満、腫瘍形成が高率に出現する。

また動物種によって核移植の成績は異なり、ウシ体細胞は比較的高率に仔ウシへ発現するが、その半数は形態形成異常を含む多くの原因で成牛になる前に死亡する。マウス ES 細胞の核移植も産仔の多くが分娩直後に死亡する。それに対し、ブタは出産後順調に発育するが、逆に産仔にまで発生する率が1%以下と極めて低いなど、種固有の問題も存在している。

このような問題が生じるのは成体の体細胞遺伝子が、胚の成長を正常にもたすように再プログラムされていない可能性が高いからと考えられている。

さらにヒトに関する判断をするうえで重要な報告が Simerly らによってなされた。その内容は、核移植によって716個のアカゲザルの胚を作成し、これらのうち初期の細胞分裂が起こった33個を代理母に移植した。表面上は通常どおり発生が進んでいるにもかかわらず、すべての胚が妊娠に失敗した。そしてその原因が細胞分裂を助ける紡錘体があり、二つの極めて重要な蛋白質を欠如しているために正常に機能せず、細胞が正常より多いあるいは少ない染色体をもつことがつきとめられた。彼らはこの発見から、ヒトを含む霊長類のクローンは現在の技術では達成できないと結論している<sup>30)</sup>。

この報告からも、現在のクローン動物の健康状態は正常からほど遠いという厳しい現実が再認識された。筆者は、共通の技術である核移植を用いて得られる組織・臓器の安全性に関して一抹の不安を感じている。移植医療に使用するためには核移植技術のさらなる成熟が必要であると考ええる。

## 組織工学による再生

Tissue engineering に関する報告は、食道、胃、小腸、大腸など管腔臓器に関しては、本年も動物レベルでの報告がいくつかみられた。

生体適合材料、殊に生体吸収性の高分子素材を支持体として細胞を移植し組織の再構築を行う技術は、形態形成に関してはほぼ完成の域に近付き、また機能面でも多くの面で再現可能になりつつある。ただし依然、ドナー細胞を新生児動物から得ている報告が多く、再構築に必要な細胞ソースの調達に関しては課題として残されていると筆者は考えている。

また実質臓器、肝、脾に関しては、Tissue engineering の報告は少なく、新たな進展はみられなかった。

30) Simerly C, Dominko T, Navara C et al : Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. Science 300 (5617) : 297, 2003

## 8. 再生医療

あさはらとしまさ いたもととしゆき ひのひろし  
浅原利正, 板本敏行, 日野裕史  
広島大学大学院先進医療開発科学講座 外科学

### 最近の動向

再生医学は 21 世紀の新しい革新的医療である再生医療への期待が最も大きい生命科学と考えられている。消化器に属する肝, 膵, 腸管などの臓器の再生研究は ES 細胞や組織幹細胞それに末梢血幹細胞, さらには臍帯血の幹細胞を用いて目的とする分化した細胞の増殖を試みているが, 散発的な研究であり, 効果的, 効率的な再生技術に進展していない。同時に再生に関与する因子の解析も継続して多くの研究が行われているが, 再生医療につながる画期的な成果が得られていない。足踏み状態であろうか。ただこれらの研究はかなり成熟してきた観があり, なかには再生医学の研究をリードする可能性を秘めたものもあり, 今後注目に値する研究に発展する予感がある。今後はこれらの再生研究をいかに有効に臨床に結びつけていくかという面からも研究がなされることにより, 再生医療の発展充実につながると考えられる。

### はじめに

再生医学の基礎研究は多くの研究者により精力的に進められており, 優れた基盤研究として成果は蓄積されつつあるといえる。しかし, その臨床応用である再生医療の展開は当初の期待に反して進んでいない。なかでも血管内皮や軟骨系では臨床応用が進展しているように思われるが, 内胚葉系の消化器臓器である肝, 膵, 小腸などを対象にした再生医療に関しては, 多くの研究者の熱心な取り組みにもかかわらず臨床応用に向けたブレークスルーとなるような報告が無く, 壁にぶつかっているようである。視点を変えた発想の転換が必要と思われる。本項では過去 2 年間, stem cell を中心に再生医療へつながる研究について概説した。今回は肝, 膵, 小腸の臨床応用につながる研究に焦点を当て概説したい。

### 肝 臓

1999 年 Paterson らが 2-AAF と CCl<sub>4</sub> を投与し, 肝部分切除モデルに骨髓移植した細胞が肝臓の oval cell に分化した報告以来, 骨髓細胞や造血幹細胞



などの幹細胞やその候補となる細胞から肝細胞への分化の報告が続いたが、分化する細胞はごくわずかであった。また、それは分化でなく細胞融合であるという新しい報告もなされた。この点については今後もさらなる解析が必要と思われる。一昨年、Krause らが Cell に発表した 1 個の造血幹細胞が様々な血球細胞や肺、肝、消化管、皮膚の細胞に分化したというようなセンセーショナルな報告は今回はみられない。

肝再生における甲状腺ホルモン、hepatic stellate cell の役割に関する報告を以下に述べる。

甲状腺機能低下状態では肝再生が低下していることはよく知られている。Italy の Moro らは、70 %部分肝切除モデルで甲状腺機能低下ラットに T3 を投与することで肝切除後の肝再生が復元したと述べている。その機序として T3 がミトコンドリア・カルシウム含量を調節し、肝再生を制御していると報告している<sup>1)</sup>。Pasteur Institute の Strick-Marchand らは、彼らが開発した Bipotential Mouse Embryonic Liver (BMEL) cell line を vector とともに uPA/SCID マウスに移植し、移植された BMEL が hepatocyte と bile duct に分化、増殖していることを明らかにした。この分化した細胞は分化、増殖、代謝酵素の zonal expression, cytokaine の発現調節、転写因子の発現など、host 細胞と同様の反応を示した。また、MHC class I molecule も donor でなく recipient のそれを発現していたと報告している<sup>2)</sup>。

肝再生における Hepatic Stellate Cell (HSC) の役割の重要性も認識されている。Bordeaux University の Balabaud らは、肝再生における HSC の役割について以下のように述べている。HSC は肝切除後 4 時間で分裂のピークを迎え、その後急速に消失する。その結果、HSC/SEC ratio は肝切除後 72 時間で最大となる。その時 HSC 間の距離は 36  $\mu$  に落ち、HSC/hepatocyte ratio は 50 %にまで上昇する。これらの結果から、HSC と hepatocyte の細胞接着が肝再生の早期に出現する重要性について述べている<sup>3)</sup>。同様に、New Zealand Otago University の Mabuchi らは、肝再生の早期に HSC が増殖し、hepatocyte との距離が減じ、肝再生の早期段階において HSC が hepatocyte に adhere することにより活性化されると述べている<sup>4)</sup>。いずれも肝再生の早期における HSC の役割の重要性について述べたものである。

次に肝再生をコントロールする因子について VEGF-R1, Notch/Jagged シグナル, NMP, OSM, NOS, c-met,  $\beta$  カテニンなどについての報告がみられたが、いずれもただちに臨床につながる報告というより、今後臨床応用につなげるための基盤的な研究報告である。

angiogenesis に影響する因子として VEGF, VEGF-R1, ANG などがあるが、三重大学の Saitou らは 5 名のヒト部分肝移植ドナーにおいて、肝切除後のこれら血管増殖因子の動態を検討した。その結果、VEGF-R1 が肝切除後の

1) Moro L, Marra E, Capuano F et al : Thyroid hormone treatment of hypothyroid rats restores the regenerative capacity and the mitochondrial membrane permeability properties of the liver after partial hepatectomy. *Endocrinology* 2004

2) Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P et al : Bipotential embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 8360-8365, 2004

3) Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A : The role of hepatic stellate cells in liver regeneration. *J Hepatology* 40 : 1023-1026, 2004

4) Mabuchi A, Mullaney I, Sheard P W et al : Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepatology* 40 : 910-916, 2004

hepatocyte 増殖に up-regulate に作用する遺伝子の一つといえと結論している<sup>5)</sup>。また、Togo らは肝部分切除後の再生初期段階、特に G0 からS期における遺伝子発現を DNA microarray を用いて解析した。その結果、Inhibitor of DNA binding 2 (ID2) と Inhibitor of DNA binding 3 (ID3) が細胞周期 S 期への進展を促進する新しい肝再生因子として同定された。また、その工程を阻害する因子として GADD45  $\gamma$  (growth arrest and DNA-damage-inducible protein) の存在を報告している<sup>6)</sup>。

Notch/Jagged signaling system は多くの組織において細胞の増殖や分化に影響していることで知られている。肝再生に関してこれまでにこの Notch/Jagged signaling system に関する報告は無い。Halle University (Germany) と Pittsburgh のグループは肝再生における Notch/Jagged シグナルの関与についてラットモデルで検討している。その結果、Notch/Jagged シグナル伝達経路は肝再生時に活性化され、細胞の分化や成長に関わることが判明したと述べている<sup>7)</sup>。

Yat-Sen University と Hong Kong のグループは、ラット正常肝と硬変肝における部分肝切除後の nuclear matrix protein (NMP) の発現を解析し、その役割について検討している。NMP のうち s33, s34, s35 は部分肝切除後の肝再生の際にみられたが、s36, s37, s38 は硬変肝にみられた。この結果から NMP のいくつかは肝再生に特異的なものであると述べている<sup>8)</sup>。また Nakamura らは Interleukin 6 family に属するサイトカインであるオンコスタチン M (OSM) と OSM 特異的受容体の遺伝子発現が再生過程の肝臓に誘導され、この OSM が肝障害における病態生理や肝再生と関連していることを報告している。さらに、ここでは OSM 受容体欠損マウスを作成し、肝障害と肝再生過程における OSM の関与について解析している。その結果、OSM 特異的受容体を介したシグナルは肝再生過程において障害の回復、肝細胞の増殖、細胞外マトリックスの再構築といったそれぞれの過程で必須のコンポーネントであることが強く示唆されたと述べている<sup>9)</sup>。

Fernandez-Martinez らの Spain のグループは、Nitric Oxide Synthase 2 (NOS-2) や Cyclooxygenase-2 (COX-2) のように炎症に関連した遺伝子発現に関して NOS-2 KO マウスや COX-2 を選択的に阻害するよう処理されたマウスで再生の過程を解析した。その結果、thioacetamide で処理したマウスの肝細胞では NOS-2 や COX-2 蛋白の発現がみられ、肝再生を誘導していると思われた。そして NOS-2 のノックアウトマウスや COX-2 を選択的に阻害した動物の thioacetamide による肝障害モデルでは NO が無ければ肝再生は遅れ、COX-2 の阻害は肝障害を減じると報告している<sup>10)</sup>。同じような報告が Zeini らによってなされている。彼らは、遺伝子操作による NOS knockout と薬剤による COX-2 阻害モデルでは肝切除 24~72 時間後の動物の死をもたら

5) Saitou Y, Shirai K, Yamaguchi Y et al : Serum vascular endothelial growth factor-receptor 1 during liver regeneration. *J Hepatology* 41 : 170-171, 2004

6) Togo S, Makino H, Kobayashi T et al : Mechanism of liver regeneration after partial hepatectomy using mouse cDNA microarray. *J Hepatology* 40 : 464-471, 2004

7) Kohler C, Bell AW, Bowen WC et al : Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 39 : 1056-1065, 2004

8) Yun JP, Liew CT, Chew EC et al : Nuclear matrix protein expression in hepatocytes of normal and regenerating conditions. *J Cell Biochem* 91 : 1269-1279, 2004

9) Nakamura K, Nonaka H, Saito H et al : Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39 : 635-644, 2004

10) Fernandez-Martinez A, Callejas NA, Casado M et al : Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *J Hepatology* 40 : 963-970, 2004

し、NO と PG が肝組織のアポトーシスを保護することで肝切除後の肝再生に重要な役割を担っていると報告している<sup>11)</sup>。

c-met 遺伝子はすでに肝再生に重要な役割をもつことで知られている。NIH の Chang-Goo らは肝細胞に c-met 遺伝子が不足するマウスに低用量の抗 Fas 抗体を投与すると、これらのマウスの大多数は強力なアポトーシスと出血性ネクロシスで死亡したが、wild type のマウスはすべて軽い障害だけで生存したと報告している。CCl<sub>4</sub> による壊死性障害を誘発したマウスモデルにおいて、c-met knockout マウスでは肝細胞増殖欠乏よりはむしろ小葉中心性障害の修復能力が損なわれていたと述べている。なかでも後発性修復では、持続的な炎症反応、オステオポンチンの過剰生産、早期の異栄養性石灰化に関連しており、障害部位では肝細胞の scattering/migration が損なわれていたと述べている。本研究から効率的な肝再生に c-met が決定的な役割がある直接的な遺伝的因子であり、c-met が肝細胞生存と組織の再構築に影響を及ぼすことを示唆するものである<sup>12)</sup>。また、Hannover の Borowiak らはマウスのモデルで肝再生時の Met 遺伝子の役割について検討している。その結果、Mx-cre を誘導して Met mutation を起こさせたマウスの肝部分切除後の肝再生は傷害されていたと報告している。これらの結果、HGF/SF/Met シグナル系は肝臓の胎生期の発達段階だけでなく、成人における肝再生においても本質的な役割をもつものと理解されると結論している<sup>13)</sup>。

$\beta$  カテニンは Wnt signaling pathway の重要な因子で、肝再生においても重要な働きをしているとの報告がみられた。Pittsburgh の Micsenyi らはマウスの胎生期の肝臓を用いて  $\beta$  カテニンの発現について検討した。その結果、核や細胞質の  $\beta$  カテニンは肝臓の発達過程における細胞増殖に一致していることが明らかになったと述べている<sup>14)</sup>。Tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) は NF $\kappa$ B の活性化を介して細胞をアポトーシスに導くことが知られている。三重大学の Yamaguchi らは生体部分肝移植ドナーの TRAIL の血中レベルを経時的に測定したところ、術後すぐに低下し、12 時間でナディアとなり、3 日目から上昇し始めた。このことから、TRAIL は肝再生に対して抑制的に作用していることが推測されたと述べている<sup>15)</sup>。

## 膵臓

膵再生の研究は、糖尿病に対する膵  $\beta$  細胞の再生を中心に展開されている。その対象疾患は、I 型糖尿病だけでなく、糖尿病全体であり、再生医療にかかる期待は大きい。その原材料となる ES 細胞や組織幹細胞を膵  $\beta$  細胞に分化、増殖させ治療に応用しようと試みられている。

まず組織幹細胞からの  $\beta$  細胞の再生に関する報告について述べる。障害膵で膵  $\beta$  細胞が再生する場合、成熟  $\beta$  細胞の複製と幹細胞の  $\beta$  細胞への分化による

11) Zeini M, Hortelano S, Traves PG et al : simultaneous abrogation of NOS-2 and COX-2 activities is lethal in partially hepatectomized mice. *J Hepatology* 40 : 926-933, 2004

12) Chang-Goo H, Factor VM, Sanchez A et al : Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *PNAS* 101 : 4477-4482, 2004

13) Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T et al : Met provides essential signals for liver regeneration. *PNAS* 101 : 10608-10613, 2004

14) Micsenyi A, Tan X, Sneddon T et al :  $\beta$ -catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 126 : 1134-1146, 2004

15) Yamaguchi Y, Shiraki K, Saitou Y et al : Tumor necrosis factor-related apoptosis ligand (TRAIL) during liver regeneration. *J Hepatology* 40 : 718-719, 2004

細胞新生によると推測される。膵幹細胞の存在はこれまでの研究で示唆されていたが、その実体は未だ証明されていなかった。Suzuki らは、成体マウス膵内の  $c\text{-Met}^+CD45^-TER119^-c\text{-kit}^-Flk-1^-$  細胞をフローサイトメトリーでソーティングし、この単細胞から膵内外分泌細胞だけでなく、肝、腸管の細胞に分化することから、この細胞が膵幹細胞であると Suzuki Aらにより報告された。さらに Suzuki A らは HGF/c-Met シグナルが膵細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていることも示唆している<sup>16)</sup>。一方で Dor らは、マウスが成体になって新たに生じる膵  $\beta$  細胞の主な起源は、幹細胞ではなく、既存の膵  $\beta$  細胞であり、その複製によって再生することを報告した<sup>17)</sup>。

膵組織幹細胞の増殖や分化誘導を刺激する機構についての研究は盛んに行われている。そのなかで、EGF ファミリーの Betacellulin (BTC) は、糖尿病モデル動物の膵  $\beta$  細胞の再生を促進することにより糖代謝を改善するといわれている。一方、TGF  $\beta$  のスーパーファミリーである Activin は、様々な細胞の分化に関与していることが知られている。Activin とそのレセプターによるシグナル伝達は、生体内に存在するそのインヒビターとともに膵  $\beta$  細胞の再生を調整している可能性も示唆されていた。生後間もないラットに対するストレプトゾトシン処置では、膵  $\beta$  細胞の再生は不十分で、成体になると II 型糖尿病を発症するが、これら分化誘導、増殖因子の単独投与では十分な糖代謝の改善はみられない。しかし、Activin A と BTC の併用投与により、成体時に血糖降下作用、インスリンの増加、 $\beta$  細胞の再生がみられた。この効果は  $\beta$  細胞の複製の亢進のみならず前駆細胞からの  $\beta$  細胞新生もある程度は関与している。しかし、糖負荷に対するインスリンの反応性はみられず、今後の課題であると Li らは報告している<sup>18)</sup>。

次に、遺伝子導入による膵  $\beta$  細胞の再生について述べる。 $\beta$  細胞の分化に必要な転写因子遺伝子を組織幹細胞へ導入し発現させることで、 $\beta$  細胞の再生をめざした遺伝子治療の研究も行われている。しかし、これを臨床応用するにあたり大きな障害となっているのは、ウイルスベクターの毒性とダイナミックな血糖値の変動に対応できるインスリン量の生理的調節能にある。Kojima らは、ストレプトゾトシン処置糖尿病マウスの肝臓にアデノウイルスベクターを用いて Pdx-1 を導入したところ、膵外分泌細胞も新生し、産生された消化酵素により劇症肝炎が誘発されたが、Pdx-1 の下流にある膵臓関連転写因子 NeuroD と増殖分化因子である Betacellulin を用いると劇症肝炎は誘発することなく肝臓由来のインスリン産生細胞が新生し、糖尿病が是正されたと報告している<sup>19)</sup>。また、このとき使用したアデノウイルスベクターは、ウイルス由来の遺伝子をほとんど含まないため、安全性にも考慮されている。

さらに ES 細胞からのインスリン産生細胞の再生に関する報告も継続的にされている。Lumersky らは、マウス ES 細胞をインスリン産生細胞に分化させ

16) Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H : Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53 : 2143-2152, 2004

17) Dor Y, Brown J, Martinez OI et al : Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429 : 41-46, 2004

18) Li L, Yi Z, Seno M et al : Activin A and Betacellin. Effect on regeneration of pancreatic  $\beta$  -cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 53 : 608-615, 2004

19) Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K et al : Neuro D-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9 : 596-603, 2003

ることに成功した<sup>20)</sup>が、これに対して Rajagopal らは、インスリン抗体で染色されるインスリンは、細胞内で新たに産生されたものではなく、培養液に添加されたものを細胞が取り込んだものであると反論している<sup>21)</sup>。ES 細胞が  $\beta$  細胞となる能力を有していることは間違いなさそうであるが、その分化誘導過程における細胞系譜の詳細も不明である。厳格かつ信頼のおけるプロトコールの作成が必要である<sup>22)</sup>。ヒト ES 細胞に関しては、異なる培養条件でインスリン産生細胞への分化に成功し<sup>23)</sup>、ES 細胞の培養増殖に異種フィーダー細胞を必要としなかったことより、臨床応用に際して動物由来の未知感染症を回避できる<sup>24)</sup>。しかし、ES 細胞からのインスリン産生細胞への分化に際して、奇形腫の発生は大きな問題となっている<sup>25)</sup>。また、現時点で確立されている ES 細胞株では臨床応用は難しく、新たに有効な細胞株の樹立が望まれている<sup>26)</sup>。

## 小腸

小腸の再生研究は極めて基盤的である。Small Intestinal Submucosa (SIS) の応用研究が盛んで腸管そのものを再生する研究には発展していない。

Verginia University の Vidrich らは、マウスの正常腸管発生過程での腸管上皮再生に関わる因子について解析している。Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR-3) はマウス胎生期に発現し、十二指腸、近位空腸に特に強く発現しており、FGFR-3 のシグナルは陰窩形成や上皮幹細胞を制御する重要な役割を担うものと述べている<sup>27)</sup>。

University of Tennessee の Wright Jerningan らは成体豚モデルで small intestinal submucosa (SIS) の血管再構成効果について検討した。腸管汚染状態における動脈修復のための血管パッチとして PTPF と SIS を用いて比較検討した結果、仮性動脈瘤発生率、感染率においても SIS は優れた結果を示し、SIS は感染領域における血管再構築の手段として有望であると報告している<sup>28)</sup>。同様に、SIS を用いた尿管再建について Assmy らは以下の検討をしている。成犬を用いて右尿管を 4 cm 切除後、管腔化した SIS にて置換・再建したが、12 週間後すべての尿管は閉塞しており、重度の水腎症、腎機能低下を認めた。尿管上皮と筋細胞の再生は認められたが、機能的には再生できず、長い距離の欠損には SIS を用いた今回の方法では無理であると結論している<sup>29)</sup>。SIS に関してはさらに香川大学の Wang らがラットのモデルで腸管再生の検討を報告している。彼らは、ラットから 2 cm 管状 SIS を取り出し、これを回腸ループの中央に挿入して、この SIS への小腸粘膜再生状態などを解析した。その結果、8 週までには約 70 % のグラフト内腔表面が粘膜上皮により覆われ、24 週でグラフト壁は粘膜、平滑筋、漿膜の 3 層を認め、SIS は粘膜、平滑筋の再生を促し、小腸再生に有用であると報告している<sup>30)</sup>。

Regensburg University の Leeb らは生検あるいは手術から得られたヒト大

- 20) Lumelsky N, Blondel O, Laeng P et al : Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islet. *Science* 292 : 1389-1394, 2001
- 21) Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S et al : Insulin staining of Es cell progeny from insulin uptake. *Science* 299 : 363, 2003
- 22) Hussain MA, Theise ND : Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet* 364 : 203-205, 2004
- 23) Segev H, Fishman B, Ziskind A et al : Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 22 : 265-274, 2004
- 24) Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y et al : Analysis of insulin-producing cells during *in vitro* differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 52 : 1163-1168, 2003
- 25) Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG et al : Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cell. *Diabetologia* 47 : 499-507, 2004
- 26) Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J et al : Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350 : 1353-1356, 2004
- 27) Vidrich A, Buzan JM, Iio C et al : Fibroblast growth factor receptor-3 is expressed in undifferentiated intestinal epithelial cells during murine crypt morphogenesis. *Develop Dynam* 230 : 114-123, 2004
- 28) Wright Jernigan T, Croce MA, Cafiannos C et al : Small intestinal submucosa for vascular reconstruction in the presence of gastrointestinal contamination. *Ann Surg* 239 : 733-740, 2004
- 29) Assmy EL, Ahmed H, Ashraf T et al : Use of single layer small intestinal submucosa for long segment ureteral replacement : A pilot study. *L Urol* 171 : 1939-1942, 2004
- 30) Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A et al : Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in a rat model. *J Pediatr Surg* 38 : 1596-1601, 2003



# ABO血液型不適合肝移植の 新戦略

— 過去・現在・未来 —



島津元秀\*

肝移植

2000年に発足したABO血液型移植研究会も2004年9月で第10回という節目の研究会を迎えました。その際に、代表幹事の高橋公太、田中紘一両先生から肝移植の分野についてまとめるよう要請されました。本稿は、その講演内容に加筆・修正を加えたものであります。

腎移植では、血液型不適合移植のグラフト生着率は適合移植のそれと有意差はなく、血液型不適合の壁はすでに乗り越えられつつありますが、肝移植においては成績向上の兆しはあるにせよ、いまだに合併症率、生存率はわるく、解決しなければならぬ問題が多くあります。

そこで、肝移植の分野におけるいままでの研究、臨床の流れを振り返るとともに、現状ならびに今後の治療戦略について概説したいと存じます。

## 過去：脳死肝移植の成績とその教訓

まず、脳死肝移植で蓄積された過去の成績をレビューします。

Starzlらが肝移植をはじめた当初は、血液型適合性にかかわらず、肝移植そのものの成績がきわめてわるく、血液型不適合移植の成績を云々する状況ではありませんでした。彼らは少数例の経験から、肝臓では病理学的に液性拒絶のような所見はみられず、腎臓にくらべてhyperacute rejectionが

起こりにくい臓器であろうと結論しました<sup>2)</sup>。したがって、初期のころはABO血液型不適合移植を禁忌とせずに実施していた時代があったと思われませんが、しだいに症例が蓄積されると、その結果が惨憺たるものだということがわかってきました。

ピッツバーグの病理学者であるDemetrisら<sup>3)</sup>が、それまでStarzlらの行った血液型不適合肝移植をまとめてみると、非常にわるい成績だということが明らかとなりました。最初の約1カ月で46%がgraft failureになり、病理学的にみると、グラフトは広範囲な出血壊死を呈し、血管内凝固、血管内血栓を伴っていて、抗体や補体が特に動脈に沈着していました。彼らはこのような病態を“single organ DIC syndrome”と名付けて、肝移植でもABO血液型不適合の場合は明らかに液性拒絶が起こって、それがgraft failureの主因であることを明らかにしました。

その後、パリのBismuthら<sup>4,5)</sup>のグループが、3剤あるいは4剤併用の強力な免疫抑制をかけ、さらに抗体価を下げるために術後に血漿交換を行っても、hyperacute/acute rejection、血管合併症、胆管合併症などの頻度が減ることはなく、逆に重症感染症が増加するばかりで、やはり5年グラフト生着率は20%ときわめてわるい状態でした。

したがって、ABO不適合肝移植は、劇症肝不全に対する救命のためのブリッジ的な緊急移植にのみ限定して行われるべきであり、高価な費用や再移植などの代償が必要であるので、その適応には

\*慶應義塾大学医学部外科学教室

賛否両論あると結論づけました。

### 現在：わが国における進歩と現況

現在でも、海外の脳死移植ではグラフトの有効利用を前提とする allocation system にのっとり、血液型不適合移植はほとんど行われていないのが現状です。

日本では脳死移植が非常に少ない状況のなかで、なおかつ血縁者には ABO 不適合者しかいないという状況は充分起こりうるため、施設によっては ABO 不適合移植にチャレンジしたわけです。京都大学は13例をまとめて、大部分が小児例ということもあり、1年生存率が77%とよい成績を報告しております<sup>6)</sup>。また、東北大学が症例数は少なくすべて小児例ですが、3例とも良好な経過をたどったと報告しております<sup>7)</sup>。同じころ、名古屋市立大学の橋本ら<sup>8)</sup>が、成人2例を含む7例に ABO 不適合移植を行いました<sup>8)</sup>が、1年生存率43%とわるい成績であり、特に成人例はいずれも短期間に死亡しています。

日本肝移植研究会が1998年までにまとめた血液型不適合移植の成績では、5年生存率が約50%で、血液型適合移植にくらべると有意に不良でありました<sup>9)</sup>。これは対象の大半が小児例の解析でしたが、北海道大学の藤堂らは成人例だけをアンケート調査しております。この当時、不適合移植はまだ症例数も少なかったのですが、5年生存率は20%で Bismuth らと同様の成績でした(図1)。したがって、死因が液性拒絶によるものかどうかは別にしても、ABO不適合移植は血縁者間の生体移植でも同様に成績がわるいということが再認識されました。

1980年代後半から、腎移植の領域では ABO 不適合を乗り越える努力がされていて、それは通常の免疫抑制によって細胞性拒絶を抑えるのみならず、移植前に血漿交換を行って抗A、抗B抗体を除去し、さらに代謝拮抗剤や脾摘によって液性拒絶を抑えるプロトコルでした<sup>9)</sup>。さらに、腎移植

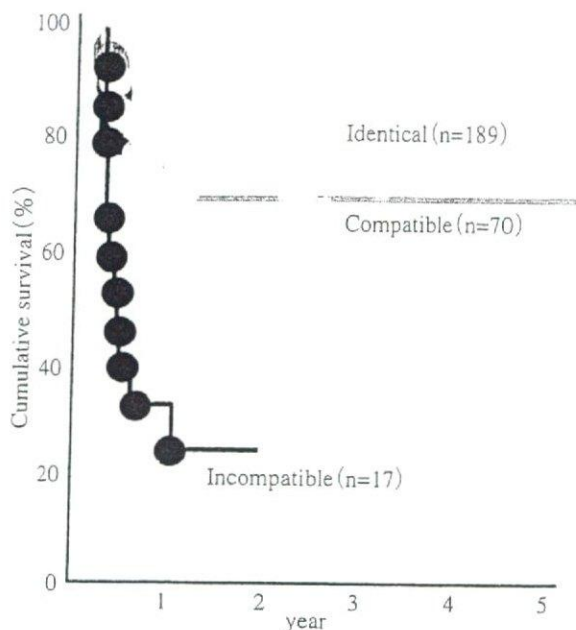


図1 ABO血液型適合性による成人生体肝移植の成績 (藤堂らの全国アンケート調査, 1998)

においても、前述の single organ DICあるいは local DIC という病理所見が認められており、DIC に対する治療を行うべきだということで、抗凝固療法も導入されました<sup>10)</sup>。その結果、腎移植では患者生存率およびグラフト生着率のいずれにおいても、ABO血液型適合性の違いによって有意差がないところまで進歩しました<sup>12)</sup>。

しかしながら、このような腎移植で、ある程度確立された治療法を肝移植に応用しても、あまり成績が向上しないということは、Bismuth らの報告のみならず、生体肝移植のパイオニアである京都大学の経験でも同様でありました。

われわれの施設では、1998年11月に末期的な原発性胆汁性肝硬変に対して最初の不適合移植を行いました。腎移植で行われているプロトコルはすべて採用して、なおかつ局所的なDICのコントロールをする方法として、門脈内に薬剤を注入する療法(門注療法)<sup>11)</sup>を開発しました。使用した薬剤は、methylprednisolone, prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)、および gabexate mesilate (FOY) の3剤です。全身的な免疫抑制としては、腎移植と同様に術前の血漿交換によって抗ドナー血液型抗体価を

表1 Therapeutic regimen for adult ABO-incompatible LDLT(1)

Systemic anti-rejection therapy			
• Perioperative plasma exchange	Anti-donor blood group IgG, IgM titer $\leq$ $\times 8 \sim 16$		
• Splenectomy			
• Triple immunoprophylaxis therapy			
Steroids			
Tacrolimus			
Target trough level	15 ~ 20 ng/mL	Day 0 ~ 7	
	10 ~ 15 ng/mL	Day 8 ~ 21	
	10 ng/mL	Day 22 ~	
Antiproliferative agents			
Cyclophosphamide (CPMA)	50 ~ 100 mg/day, iv	Day -7 ~ 21	
Azathioprine (AZA)	50 mg/day, po	Day 22 ~	

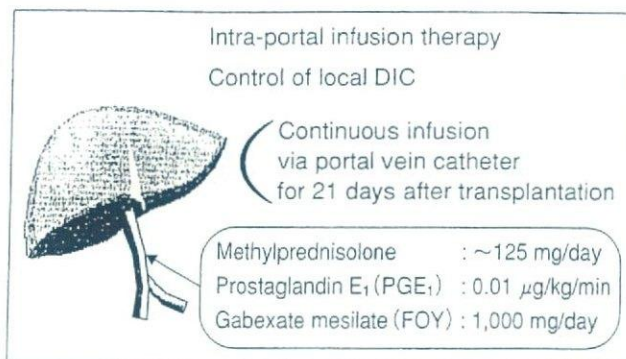


図2 Therapeutic regimen for adult ABO-incompatible LDLT(2)

16倍以下に下げ、脾摘を術中同時に行います。免疫抑制剤はステロイド、FK506、代謝拮抗剤のtriple therapyで、代謝拮抗剤は術前からcyclophosphamideで導入して、維持療法としてazathioprineに変えます(表1)。それに加えて、いわゆるlocal therapyとして、門脈内にカテーテルを挿入・留置し、前述の薬剤を原則として術後3週間持続投与します(図2)。

これらの薬剤を選択した理由は、ステロイドはいうまでもなく強い免疫抑制・抗炎症作用があり、過去に局所投与の動物実験があったこと<sup>12)</sup>、PGE<sub>1</sub>に関しては、われわれの動物実験で血管内皮傷害を抑制して微小循環を改善し<sup>13)</sup>、肝血流増加・細胞保護作用により移植肝のviabilityを向上させること、さらに、FOYはDICに対する抗凝固療法に

用いられること、などであり、いずれもcommercially availableな薬です。

門脈カテーテルの挿入ルートとしては、下腸間膜静脈または中結腸静脈で、挿入部はゴムバンドで締めて3週間で抜いたあとも出血がないようにしました。実際に、われわれはABO不適合以外の成人移植でも全例に門脈カテーテルを入れており、約40例の症例でこのカテーテルによるトラブルは1例もありませんでした。

前述したように、PGE<sub>1</sub>の門脈内投与がグラフトに対していかなる影響を与えるかという点について、ブタを用いた肝移植実験で検討しておりました<sup>14)</sup>。門脈内にPGE<sub>1</sub>を投与すると、移植肝の肝動脈血流が有意に増加し、肝組織血流量も増加します(図3)。メカニズムが不明な点がありますが、生体肝移植で起こりやすい肝動脈血栓に対しても有効であろうということで、成人の第1例目からPGE<sub>1</sub>を門脈内に投与していましたので、血液型不適合に応用することにはあまり抵抗がありませんでした。

現在までに8例の不適合移植を行い、うち4例は小児で、3例は2歳以下の乳幼児であり、残りの4例が成人です(表2)。乳幼児に対しては術前の血漿交換は行いますが、脾摘もせず、門脈カテーテルも挿入しません。最近の年長児症例には脾摘をして、門注カテーテルを入れて、なおかつリツキサン(リツキシマブ)を使いました。小児例は血管・胆管合併症を発症しましたが、全例元気に生存しています。最初の成人2例は順調に経過し、それぞれ4年以上および6年近く経過した現在も元気です。

しかしながら、あとの2例は不幸な転帰をたどり、1例はthrombotic microangiopathy(TMA)による著明な血小板減少で脳出血を起こし、16日目に死亡し、他の1例は胆汁漏、胆管炎のために免疫抑制を下げた状態がつづき、最終的には肝不全になり4カ月で死亡しました。後者は剖検で肝動脈、門脈の内皮が著明に肥厚し胆管障害が高度で、慢性拒絶を示唆する病理所見でした。



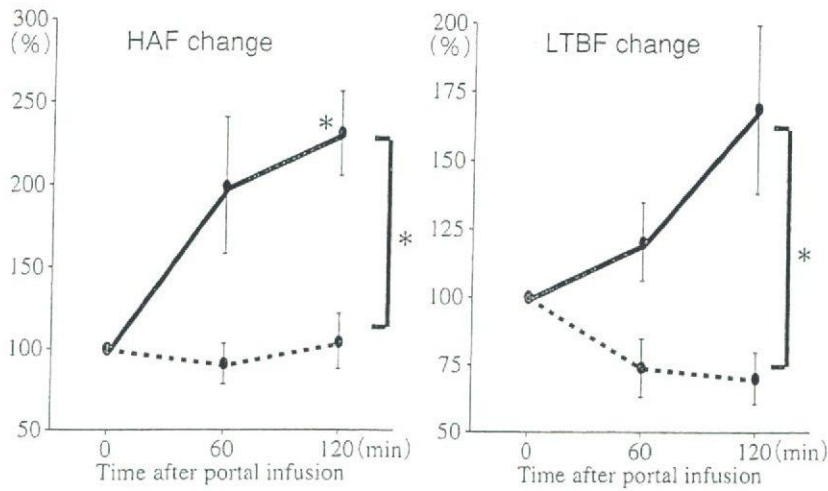


図3 Effects of the intraportal infusion of PGE<sub>1</sub> on the hepatic arterial flow (HAF) and liver tissue blood flow (LTBF) in the allograft after OLT  
\*p<0.05. — : PGE<sub>1</sub>, - - - : Control

表2 ABO-incompatible LDLT in Keio University Hospital (2004.9)

	Case	Age	Sex	Disease	Blood type	Donor	Graft	Complications	Out come
小児	1	9m	Female	BA	A→B	Father, 28 y/o	Lateral seg.	HA thrombosis	Alive (102M)
	2	1y 1m	Female	BA	B→O	Mother, 26 y/o	Lateral seg.	Bile leakage	Alive (66M)
	3	6m	Male	BA	B→A	Father, 38 y/o	Lateral seg.	(-)	Alive (43M)
	4	12y	Female	BA	A→B	Father, 41 y/o	Left lobe	Bile leakage	Alive (3M)
成人	5	52y	Female	PBC	A→O	Son, 23 y/o	Left lobe	Intra-abdominal bleeding	Alive (69M)
	6	42y	Male	FHF	AB→A	Brother, 39 y/o	Right lobe	Bile leakage	Alive (50M)
	7	46y	Male	Hep.B	B→O	Wife, 45 y/o	Right lobe	TMA*, Cerebral bleeding	Dead (16D)
	8	22y	Female	FHF	B→O	Mother, 50 y/o	Right lobe	Bile leakage & stasis, TMA*	Dead (4M)

\*Thrombotic microangiopathy

成人の第1例目の術後経過を示しますと、腹腔内出血に対して再開腹・血腫除去を行い、胆管内凝血塊による閉塞性黄疸が起こりPTCDで軽快し、その他CMV antigenemiaが陽性になるなど多少のトラブルはありましたが、約2カ月で軽快退院しました。晩期胆管合併症をおそれてPTCDを留置していましたが、6カ月後の胆管造影では、狭窄など胆管障害の所見はありませんでした。そのときの肝生検でも拒絶などの異常所見はありません。この症例はAからOの移植で、抗A抗体の変動をみると、術前の血漿交換でいったん下がりましたが、その後リバウンドでIgGは1,024倍まで上昇しました。血漿交換を繰り返し、最終的には64倍で移植を行い、術後は最高32倍まで上が

りましたが、その後は低値を持続しました。抗B抗体も測定したところ高値を示しており、donor specificに抗血液型抗体が減少していました(図4)。

致死的な合併症として、TMAという病態を経験したので、これについて述べます。術前状態不良なB型肝硬変の移植後に、同様のプロトコールで治療していたところ、突然貧血が進み、血小板が何千というレベルまで著減しました。赤血球のfragmentationやLDHが増加しましたので、血液内科に相談したところ、TMAではないかと診断されました。骨髄移植でときどき起こりますが致命的でない症例が多く、血小板輸血もあまりやりすぎると、この病態自体を助長するかもしれないとい

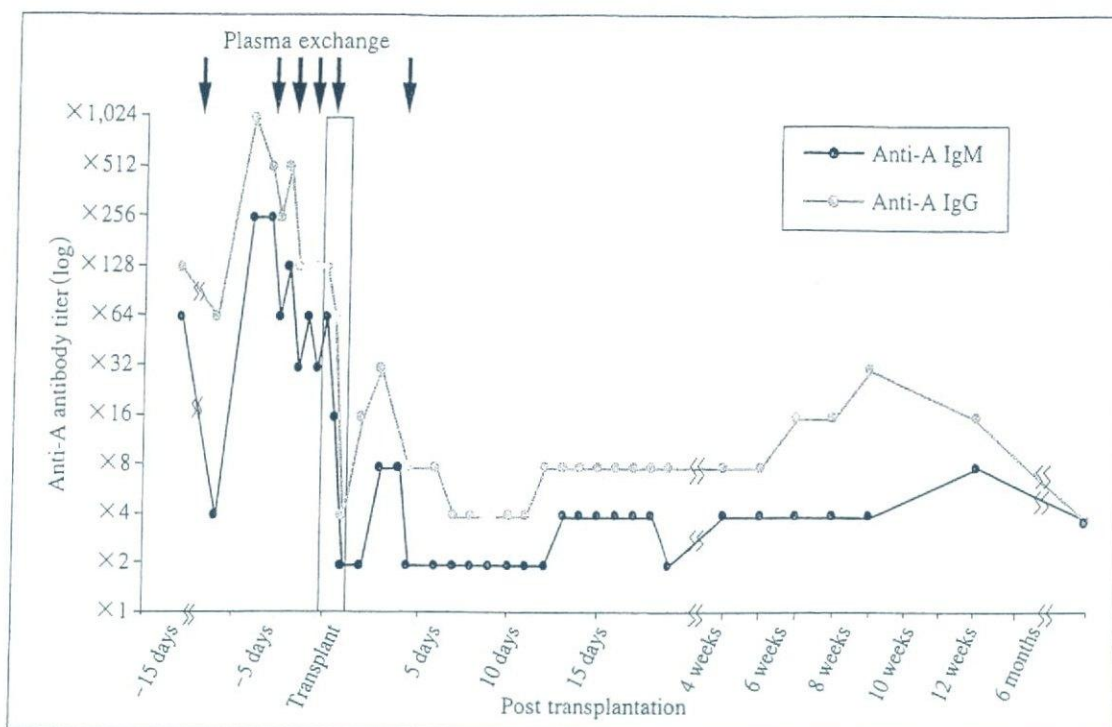


図4 Kinetics of anti-donor blood group antibody (Case 5)

うことで控えめにしましたが、脳出血を起こして死亡しました。いわゆる thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) という名称でもよばれている疾患で、細動脈レベルでの血管内皮傷害が起こって、vWF, PAI-1 などの内皮傷害マーカーも増加します。

原因としては、FK506, CyAやエンドキサン、マイトマイシンなどの抗がん剤でも誘発されます。治療法として確立されたものはありませんが、ステロイド、PGE<sub>1</sub>, 血漿交換などが有効とされます。TMAではvWF cleaving protease に対する抗体が産生され、vWFが増加すると考えられており、血漿交換はその抗体の除去により効果を発揮します。TMAには病勢の幅があって、セルフリミットする症例もありますが、生体肝移植後の場合には、重篤な合併症の一つのように思われます(表3)。

われわれの小児例を含めた80例の成績では、不適合移植の5年生存率は71.4%で、適合移植の83.2%とくらべて有意差はありません(図5)。

京都大学の局所療法を導入する前の2000年2月までの68例のデータでは<sup>15)</sup>、1歳以下、1~8歳、8~16歳、16歳以上と年齢層別に比較しますと、

表3 Thrombotic microangiopathy (TMA)

<b>Synonym</b>	Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) Hemolytic uremic syndrome (HUS)
<b>Clinical manifestations</b>	Severe thrombocytopenia Hemolytic anemia with many fragmented red cells Neurological symptoms, Renal dysfunction, Fever
<b>Laboratory findings</b>	Reticulocytes ↑, LDH(L1, L2) ↑, Indirect bilirubin ↑ von Willebrand factor ↑, Thrombomodulin ↑, PAI-1 ↑
<b>Causes</b>	Idiopathic occasionally associated with autoimmune Bone marrow transplantation, Organ transplantation Drug-induced (CyA, FK506, Cyclophosphamide, etc.)
<b>Treatment</b>	Plasma exchange Cessation of causative drugs Glucocorticoids Platelets only for life-threatening hemorrhage

1歳以下はほとんど compatible の成績と差がありませんが、16歳以上はきわめて不良で、1~16歳はその中間です。年齢のインパクトは非常に強いということを多数の症例で証明しました。

ABO不適合肝移植の主たる合併症は、液性拒絶

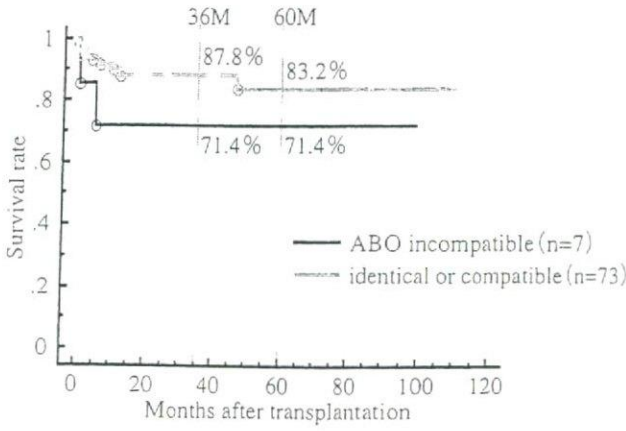


図5 Effect of ABO compatibility on patient survival after living donor liver transplantation in Keio University (2004.5)

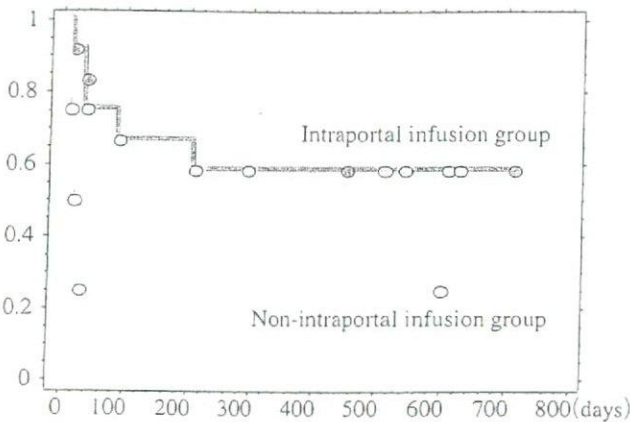


図6 Impact of intraportal infusion on patient survival

(Data from Kyoto University by permission, May 2004)

による肝壊死と胆管障害ですが、肝壊死は年少児では起こらず、年長児あるいは成人でのみ発症し、非常に重篤で短期間に死に至るのですが、これはグラフトの抗原性の大小と関係があると考えられます。京都大学がわれわれの門脈注入を導入したあとの成人例の成績は2年生存率50%で、それ以前の20%にくらべて向上しています(図6)。

最近、京都大学は肝動脈経路で局所投与を行っています。最初は、肝動脈と門脈の両方から薬剤をわけて投与しました(肝動脈からステロイドとPGE<sub>1</sub>、門脈からFOY)が、脾摘を行うためか門脈血栓症が多いこともあって門脈カテーテルをやめて、肝動脈単独の注入療法に変えています。すなわち、PGE<sub>1</sub>とステロイドだけを肝動脈注入して、

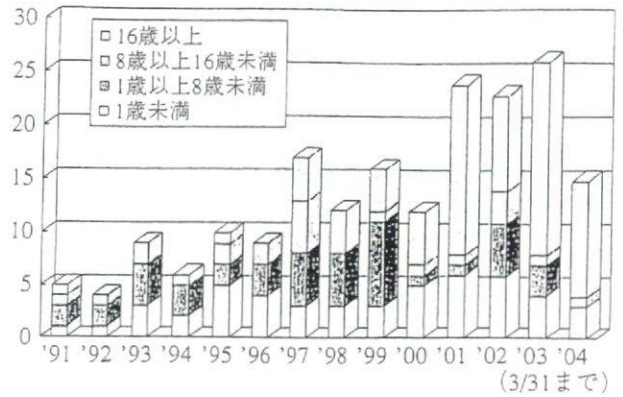


図7 年別不適合肝移植数 (全国アンケート, 2004)

さらに脾摘をしないというプロトコールを行っているのです。まだ観察期間は短いのですが、門注例、肝動注併用例、肝動注単独例と、しだいに成績が向上しつつあると報告しています。

肝局所投与の経路として、門脈がよいか肝動脈がよいかは議論の余地がありますが、われわれは門脈投与の基礎実験データがあったことと、安全性の点から門脈を選択しました。動脈カテーテルは肝動脈血栓および抜去時の出血のリスクが高いと考えたわけです。

わが国のABO不適合肝移植の現況について、京都大学の田中・江川らの行ったアンケート調査をもとに述べてみます。2004年3月までの不適合症例194例が全国31施設から累積されました。年次別の症例数の推移をみると2000年ごろから徐々に増えて、特に局所投与の導入に伴い成人例が増加しました(図7)。年齢別では、1歳未満の乳児が約1/4、1~8歳以下の幼児が約1/4、8歳以上の年長児と成人を合わせると半数というポピュレーションです。

使われた免疫抑制剤としては、calcineurine inhibitorはすべてFK506、代謝拮抗剤はエンドキサンが最も多く、その他アザチオプリン、ブレディニン、最近ではMMFが徐々に増えています。過去にはOKT3を定期的に使うプロトコールがありましたが、現在では行われていません。Hantoら<sup>16)</sup>は、OKT3を併用したquadruple immunosuppressionを行い、拒絶によるグラフトロスがな

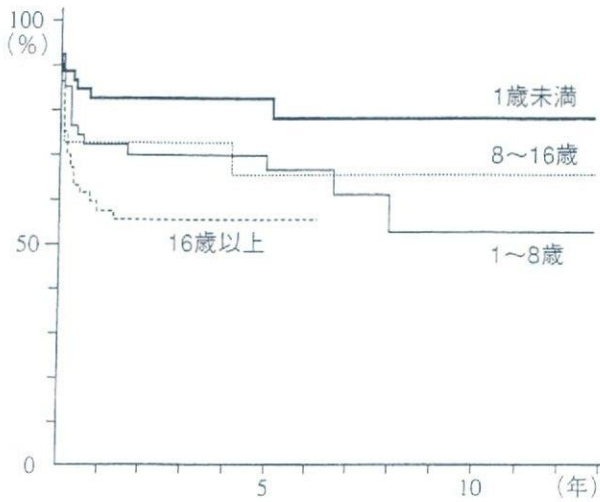


図8 不適合症例の年齢別累積生存率 (全国アンケート, 2004)

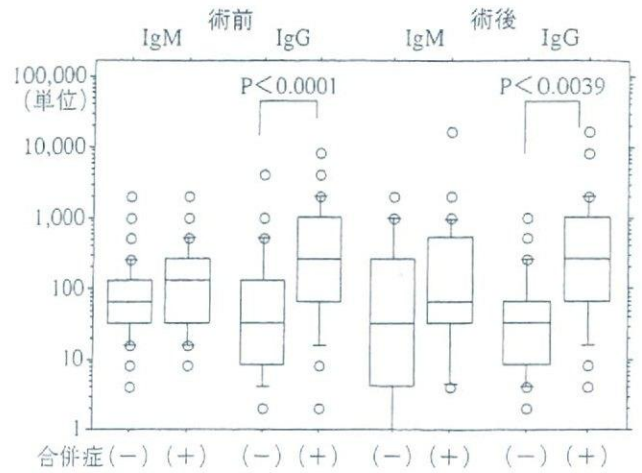


図9 不適合関連合併症の有無と抗体価ピーク値  
不適合関連合併症なく重篤な感染症合併症例を除く  
1歳以上98例(全国アンケート, 2004)

かったことを2003年に報告していますが、京都大学では成績の向上は得られませんでした。最近では、腎移植にならってB-cell lymphomaの治療薬である抗CD20抗体、リツキシマブ<sup>17)</sup>を使う症例が増えていますが、この集計の段階では9例ありました。

局所投与のルートとしては、門脈、門脈・動脈併用、動脈単独などが報告されていますが、おそらく現在では、門脈・動脈を併用している施設はないと思われます。京都大学の影響で、動脈投与の場合には脾摘をしない症例が多くあります。

年齢別の成績を全国集計で見ますと、京都大学のデータとはほぼ同様で、1歳未満は適合移植と変わらない成績ですが、年齢が高くなるとわるくなり、成人では5年生存率が50数%です。これは局所投与をした症例を含む成績で、以前より明らかに改善しています(図8)。現段階で局所投与のルート別に成績を比較しますと、肝動注が最も良好で、動・門注併用は局所投与なしと同様に不良です。この成績から動脈カテーテルを追試する施設は今後も増えると思われますが、その合併症、長期成績などについては、さらなる検討が必要だといえます。

死因として最も多いのは感染症で、局所投与導入以前の over-immunosuppression を反映していま

す。液性拒絶が関係した合併症として、肝内胆管合併症は17例に発症し、うち7例が死亡し、肝壊死は23例に発症し、うち17例と多くの症例が死亡しています。肝壊死を起こしても生存した6例はすべて2001年以降の局所投与導入後の症例です。

血液型抗体価のピークを不適合関連合併症の有無別にみますと、術前・術後のIgGのみが合併症ありの症例で有意に高値でした(図9)。また、局所投与例の術後の抗体価を脾摘の有無別に比較しますと、IgM、IgGともに脾臓温存例で有意に高値でした。Hagaら<sup>18)</sup>は、初期の病理変化としてperiportal edemaを指摘し、そのような所見を示す症例は全例抗体価が高いと報告しています。肝移植の場合には、抗体価の上昇が原因か結果かは別にして、予後因子の一つであることは事実のようであります。

持続注入療法の場合合併症発生率と死亡率は、門注症例では胆管合併症、肝壊死がそれぞれ10%、20%の頻度で起こっており、そのうち1/3、あるいは2/3の症例が死亡しています。動注症例では胆管合併症はなく、肝壊死は起こっていますが重症例はありません。肝動脈は胆管血流に関係しており、PGE<sub>1</sub>を動注すると肝動脈血流が増加し、そのために肝内胆管合併症が減少したと推察されます。