

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究

研究分担者 大河内仁志 国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部

研究要旨：【目的】

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝硬変改善効果の検討とヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝臓細胞への分化法の開発

【方法】

マウスに四塩化炭素を週2回8週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始4週間後に皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞を150万個/匹、尾静脈より注入した。その4週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査と組織学的検査を行った。培養した間葉系幹細胞も同様に移植した。SCIDマウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した。

【成績】

培養しない新鮮な細胞を移植した群では総ビリルビン値は対照群に比べて有意に低下がみられた。培養した細胞を移植した場合には有意な差は認められなかった。SCIDマウスにヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した群では有意にALPの低下がみられた。従来の肝臓脂肪を分化誘導する方法にアクチビンを加えることによって、約2週間で脂肪由来の細胞を肝臓の細胞に分化できることを見いだした。

【考案】

細胞移植実験では血液生化学的に一部改善が認められたが、組織学的にはまだ明らかな抗線維化作用を証明することができなかったため、移植細胞数、移植回数、移植経路等をさらに検討して行く必要があると思われる。

A.研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成して、脂肪由来の間葉系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。また脂

肪由来の細胞に対して複数の細胞成長因子などを加えて培養すると、肝臓細胞を誘導することができるので、培養法の改良を行い、短期間に分化誘導する方法の開発を目指した。

B.研究方法

脂肪組織由来の間葉系幹細胞の分離

マウス（C57BL/6Njcl, ♀ 10週齢）の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2~3 mm まで細かく刻み、CO₂

incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type 1 collagenase (Wako) を加え、37 °C で振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引した。

ヒトの脂肪組織からも同様に細胞を分離したが、術前に書面による同意の得られた患者からの検体を用いた。

細胞培養

細胞を control medium で resuspend し、40 μm filter を通した後、 1×10^6 / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに四塩化炭素を週 2 回 8 週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始 4 週間後に同系マウスより皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞を採取し、150 万個/匹、尾静脈より注入した (n=10)。その 4 週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査 (AST, ALT, Alb, T-Bil, LDH, ALP) と組織学的検査を行い、細胞移植をしなかった群と比較検討した。

SCID マウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植して、効果を検討した。

ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞からの肝細胞の分化誘導

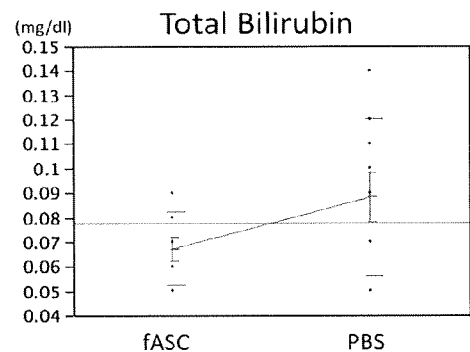
まず P5 から P10 のヒト培養間葉系幹細胞を 20 ng/mL の ActivinA と 20 ng/mL の FGF4 を加えた DMEM で 3 日間培養し、5 mg/mL transferrin, 10^{-6} mol/L hydrocortisone-21-he misuccinate, 0.5 mg/mL bovine serum albumin, 2 mmol/L ascorbic acid, 20

ng/mL epidermal growth factor, 5 mg/mL insulin, 50 mg/mL gentamicin を含む基礎培地に 150 ng/mL の hepatocyte growth factor (HGF), 100 ng/mL の FGF1, 25 ng/mL の FGF4, 30 ng/mL の oncostatinM (OsM), 2×10^{-5} mol/L の dexamethasone (Dex), 1×10^{-5} mol/L の insulin-transferrin-selenium (ITS), 0.05 mmol/L の nicotinamide, 0.1 % DMSO を添加して 10 日間培養した。

研究結果

培養しない細胞を肝硬変モデルマウスに移植

細胞移植群 (fASC) では総ビリルビン値は対照群 (PBS) に比べて有意に低下がみられたが (図 1)、AST, ALT, Alb, LDH, ALP には有意差がみられなかった。肝臓組織の組織染色標本を作製したが、肝硬変に特徴的な線維化像がみられ、シリウスレッドによる線維組織の染色面積を比較したが、これまでのところ細胞移植群において有意な線維化の改善を示す所見は得られていない。



数 平均 標準偏差 平均の標準誤差

fASC 10 0.067 0.014944 0.00473

PBS 10 0.088 0.031903 0.01009

*p=0.0412

図 1 血中ビリルビン値

培養した細胞を肝硬変モデルマウスに移植

脂肪由来の間葉系幹細胞を培養して上記の肝硬変モデルに尾静脈から投与する実験を行った。培養細胞は細胞のサイズが大きくなるため、50 万個の細胞移植でも移植直後にマウスが死亡した。ヘパリンを

同時投与することで100-150万個の培養した細胞を移植することができた。移植後4週間の採血並びに組織の検討を行ったが、対照群と比較して有意な差は得られていない。

培養したヒト細胞を肝硬変モデルマウスに移植

SCID マウスにヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (P5-10) を150万個、尾静脈より移植した群では有意にALPの低下がみられた(図2)。AST, ALT, Alb, T-Bil, LDHには有意差がみられなかった。シリウスレッドによる線維組織の染色面積を比較したが、これまでのところ細胞移植群において有意な線維化の改善を示す所見は得られていない。

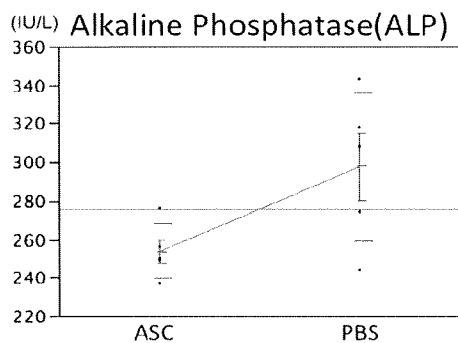


図2 血中ALP値

	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差
ASC	5	253.6	14.2934	6.392
PBS	5	297.4	38.7789	17.342

p=0.0316

肝細胞の短期間分化誘導法の開発

脂肪由来の細胞から肝細胞を分化誘導する従来の方法にアクチビンを新たに加えることによって、内胚葉系への分化が促進されることが転写因子の解析から示唆された。培養3日後より培養細胞の形態変化が認められ(図3)、実際にアルブミンの遺伝子発現を確認した。

約2週間で脂肪由来の細胞からアルブミンを産生する肝臓の細胞に分化できることを見いだした。

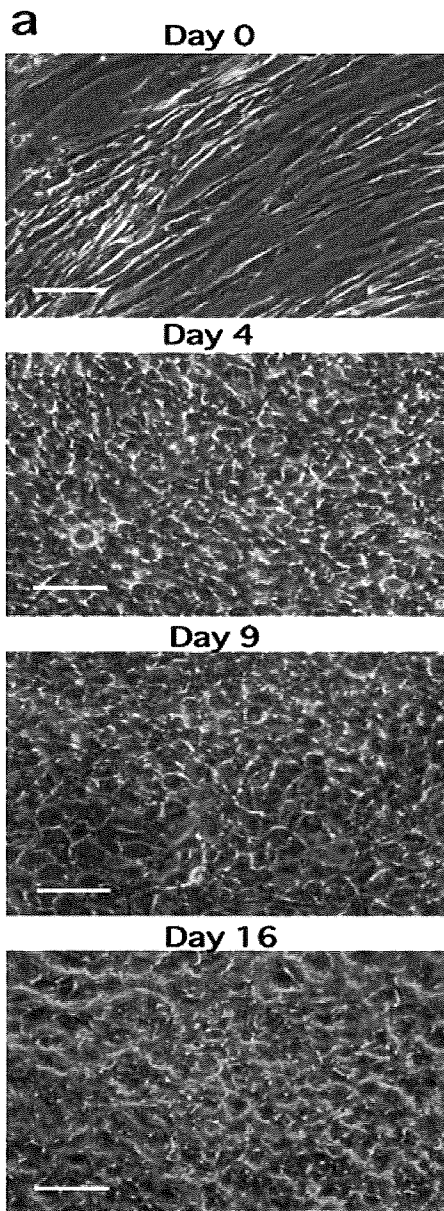


図3 経時的な形態変化

考察

今回の細胞移植実験では、マウス肝硬変モデルを用いて尾静脈から細胞を投与した。血液生化学検査にて移植群に改善がみられたことから、移植細胞による何らかの効果がみられたことが示唆される。しかし線維化組織の改善は画像解析では認められず、移植細胞の生着も検討したが、4週間後では肝臓でほとんど検出できなかった。骨髓細胞の移植実験においては移植細胞数が今回よりも10倍から100倍も多いことを考慮すると、効果を上げるには投与細胞数を増やす必要があると思われた。また移植回

数や移植経路の検討も必要と思われる。したがって今後の課題としては、

- 1) 1回の移植細胞数を増やす
- 2) 移植回数を増やす
- 3) 静注ではなく脾臓からの細胞投与を検討
- 4) 移植前に HGF などのサイトカイン処理をしてから移植することで、効果がみられるかを検討したいと考えている。

これまで脂肪由来の細胞から肝細胞の分化には5週間以上かかっていたが、今回の検討で約2週間程度に短縮することができた。アクチビンによる内胚葉への誘導が鍵を握っていることが示唆された。今後肝細胞に分化誘導した細胞の移植実験も計画して行きたい。

E. 結 論

細胞移植実験では細胞移植群において血液生化学的に一部改善が認められたが、組織学的にはまだ明らかな抗線維化作用を証明することができなかった。今後移植細胞数、移植回数、移植経路等をさらに検討して行く必要がある。

研究発表

1.論文発表

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. J Gastroenterol Hepatol. 24:70-7. 2009

2.学会発表

Tokuhara M, Fukuda S, Konno M, Hamazaki TS, Okochi H. Omentum as a potential source of cell therapy for acute liver damage. Seventh annual meeting of IFATS, Oct15, Daegu, Korea 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

ヒト脂肪組織由来間質細胞の肝硬変改善効果の検証に関する研究

研究分担者 酒井 佳夫 金沢大学恒常性制御学 准教授

研究要旨：

【目的】脂肪組織由来間質細胞は、骨髄細胞とともに、間葉系幹細胞を豊富に含む細胞群であり、再生療法への応用が期待されている。自己脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法の安全性の検討を行った。

【方法】文書による同意を得た Child-Pugh 分類 A の肝硬変患者を対象に、全身麻酔下に腹壁あるいは臀部皮下組織より脂肪組織を採取、完全自動密閉式の脂肪組織由来間質細胞分離装置 (Celution™ System) にて安全に間質細胞を分離することの評価を行った。

【考案】今回の結果、自己脂肪組織由来間質細胞の安全な採取が確認され、本知見は今後細胞療法を確立の上で重要な結果であった。

A. 研究目的

肝硬変患者における末期像である肝不全に対する治療法として、肝移植が現在のところ唯一の根治的治療法である。我が国ではドナー不足が深刻であり、生体肝移植が主に行われているものの、十分とはいえない。肝移植に代わる治療法として、肝再生療法が期待されている。骨髄組織、脂肪組織は、肝細胞への分化能を有する間葉系幹細胞を豊富に含む臓器であり、自己細胞を用いた肝再生療法への応用が期待されている。本研究では、脂肪組織由来間質細胞による肝再生療法開発のため、肝硬変患者に対する投与の安全性の臨床検討を行った。

B. 研究方法

対象は、文書による同意を得た重症度が Child-Pugh 分類 A の肝硬変患者。全身麻酔下に、腹壁および臀部皮下脂肪組織を採取し、完全自動密閉式の脂肪組織由来間質細胞分離装置 (Celution™ System®、Cytori Therapeutics Inc.) を用いて間質細胞を採取した。

C. 研究結果

完全自動密閉式の脂肪組織由来間質細胞分離装置にて安全に間質細胞の分離に成功した。

D. 考 察

肝硬変患者より安全に脂肪由来組織細胞の採取が可能であった。骨髄細胞とともに、脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生療法開発が期待される結果であった。

E. 結 論

肝硬変患者に対する自己脂肪組織由来間質細胞の安全な採取が可能であった。

研究発表

1. 論文発表

本研究課題に関する発表なし

2. 学会発表

本研究課題に関する発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
梅村武司、 田中榮司	B型急性肝炎 いわゆる de novo肝炎	林 紀夫, 他3名	Annual Review 2009 消化器	中外医学社	東京	2009	129-135

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terai S, Sakaida I	Currents Status and Prospects of Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients.	Bulletin Yamaguchi			2009 in press
Terai S	Fish model leads to new findings in liver disease.	Hepatology Research.			2009 in press
Segawa M, Sakaida I	Diagnosis and treatment of portal hypertension.	Hepatology Research.	39	1039-1043	2009
Tanaka Y, Sakaida I, Mizokami M. 他24名	Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Nature Genet.	41(10)	1105-1109	2009
Kiyotoki S, Nishikawa J, Sakaida I, 他4名	Use of the light-emitting diode-illuminated endoscope for upper gastrointestinal endoscopy.	Endoscopy	41	E173-174	2009
Ryozawa S, Iwamoto S, Sakaida I, 他3名	ERCP using double-balloon endoscopes in patients with Roux-en-Y anastomosis.	J Hepatobiliary Pancreat Surg	16(5)	613-617	2009

Kusakabe A, Sakaida I, Mizokami M, 他20名	Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B.	Hepatology Research.	39(7)	648-656	2009
Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, Sakaida I.	Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images.	J Gastroenterol.	44(7)	733-741	2009
Chen Y-R, Sekine K, Nakamura K, Yanai H, Tanaka M, and Miyajima A.	YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 by suppressing C/EBP β function, leading to hyperammonemia.	Gastroenterology	137	330-340	2009
Itoh T, Kamiya Y, Okabe M, Tanaka M, and Miyajima A.	Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response.	FEBS Letters	583	777-781	2009
Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K and Miyajima A.	Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers.	Development	136	1951-1960	2009
Tanimizu N, Miyajima A, and Mostov K.	Liver Progenitor Cells Fold Up a Cell Monolayer into a Double-layered Structure during Tubular Morphogenesis.	Mol. Biol. Cell.	20	2486-2494	2009

Tanaka M, Okabe M, Suzuki K., Kamiya Y, Tsukahara Y, Saito S, and Miyajima A.	Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development.	Mech. Dev.	126	665-676	2009
Hirose Y, Itoh T, and Miyajima A.	Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells.	Exp. Cell Res.	315	2648-2657	2009
Miyaoka Y, Tanaka M, Imamura T, Takada S and Miyajima A	A novel regulatory mechanism for FGF18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and Delta-like protein (Dlk).	Development	137	159-167	2010
Onitsuka I, Tanaka M, and Miyajima A	Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development.	Gastroenterology	in press		
田中稔 宮島篤	肝前駆細胞から肝細胞胆管上皮細胞への分化	肝胆膵	59	525-535	2009
宮島篤	肝臓の発生分化機構	最新医学	64	1426-1455	2009
Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H	Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	379	817-823	2009
Nakamura T, Nishina H	Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish.	Hepatol. Res.	39	633-644	2009

Matsumoto Y, Oota H, Asaoka Y, Nishina H, Watanabe K, Janusz M Bujnicki S, Oda S, Kawamura S, Mitani H	Medaka: a promising model animal for comparative population genomics.	BMC Research Notes	2	88	2009
Miyamura N, Hirayama J, Sawanobori K, Tamaru T, Asaoka Y, Honda R, Uno H, Yamamoto T, Takamatsu K, Nishina H	CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochrome1a gene.	Biol. Pharm. Bull.	32	1183-1187	2009
Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Todo T, Sawanobori K, Yamamoto T, Sassone-Corsi P, Nishina H	Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment.	Cell Cycle	8	2794-2780 1	2009
Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, Yamasaki T, Nakagawa K, Kajiho H, Penninger MJ, Katada T, Nishina H	Blockage by SP600125 of Fcε Receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.	J. Biochem.	145	345-354	2009
Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Jinzhan Wu, Kajiho H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H	CrxOS Maintains Self-Renewal Capacity of Murine Embryonic Stem Cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	390	1129-1135	2009
Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Jinzhan Wu, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H	Pax6-5a Promotes Neuronal Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells.	Biol. Pharm. Bull.	32	999-1003	2009

Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito T, Kawata S	Down-regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese <i>fafa</i> Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis	J Gastroenterol	44(6)	583-591	2009
Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S	Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population	Metabolism	58(8)	1067-1075	2009
Takeda H, Nishise S, Fukui T, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Kawata S	Plasma Level of Granulocyte-Colony Stimulating Factor during Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis	Hepato-gastroenterol	56(90)	348-351	2009
Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Takeda H, Kawata S	Biological effect of anaphylatoxin C5a on the generation of anti-inflammatory substances in leukocyte adsorption	Ther Apher Dial	13(6)	509-514	2009
Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M	The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients	Clin Immunol	133(2)	208-217	2009
Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Tanaka E, Kiyosawa K.	Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan.	Journal of Gastroenterology	suppl 19	102-107	2009
坪内博仁、熊田博光、清澤研道、持田智、坂井田功、田中榮司、梅村武司、他26人	免疫抑制・科学療法により発症するB型肝炎対策—厚生労働省「難治性の肝・胆道型疾患に関する調査研究」班 劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告—	肝臓	50	38-42	2009

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T.	Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure	J Gastroenterol Hepatol	24	70-77	2009
--	--	-------------------------	----	-------	------

Annual Review 消化器 2009

2009年1月30日発行

中外医学社

5. B型急性肝炎といわゆる de novo 肝炎

信州大学医学部消化器内科 梅村武司
同 教授 田中榮司

key words acute hepatitis B, hepatitis B virus, reactivation, lamivudine, chemotherapy, resolved infection

動 向

B型急性肝炎は、本邦では母子感染予防や血液製剤におけるスクリーニングの進歩により全体の発症数は減少している。しかし、散発性B型急性肝炎は徐々に増加傾向にあることがわかっている。その特徴について感染経路、B型肝炎の遺伝子型から検討がされている。

一方、最近ではB型肝炎の既感染者（HBs抗原陰性、HBc抗体もしくはHBs抗体陽性）において化学療法中・後にB型肝炎ウイルス（HBV）の再活性化が起こり、肝炎を発症するde novo肝炎の報告が増加している。これは、悪性腫瘍の治療法が進歩し、より強力な化学療法が行われるようになったことが一因となっている。De novo肝炎の中には劇症化して死亡する予後不良な症例が含まれている。最近の研究ではde novo肝炎の発症リスクの高い群が明らかになってきた。しかし、de novo肝炎の予防・治療に関するガイドラインはこれまでに世界中で作成されていない。本邦では2008年度に厚生労働省研究班から免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎に対するガイドライン案が作成されており、今後この検証が行われる予定である。

A. B型急性肝炎

B型急性肝炎はB型肝炎ウイルス（HBV）の初感染によって起こる。母子感染や輸血後肝炎は着実に減少しているが、成人の水平感染による散発性B型急性肝炎の発症率は徐々に増加傾向にある。Sugauchiらによる多施設共同研究では1982年から2005年に発症した本邦485例のB型急性肝炎の感染経路の検討では肝炎発症の45%は性行為が原因とされている¹⁾。同じ患者群でOzasaらが遺伝子型分布の検討を行っている²⁾。本邦のB型急性肝炎では遺伝子型Cを68%と最も多く認め、次いで遺伝子型A: 19%、B: 12%の順である。これは慢性肝炎の遺伝子型の分布とは異なり、Aの割合が高率である。本邦のB型急性肝炎における遺伝子型Aは1996年以降に増加し、若年における割合と慢性化する割合が高いという特徴がある。さらに、遺伝子型Bjに感染していると劇症化率が高いことが判明した。最近では海外でしか報告のなかった遺伝子型HによるB型急性肝炎の報告が本邦でも相次いだ³⁻⁵⁾。それぞれの遺伝子型によって予後や治療効果の違いが異なるため臨床像を把握した対応が必要とされる。

B型急性肝炎における基礎研究でもいくつかの

興味深い報告が発表されている。programmed death 1 (PD-1) は CD28 costimulatory receptor family の 1 つであり、この発現は HBV も含めた慢性ウイルス感染におけるウイルス特異的 CD8⁺T 細胞の反応を低下させることが報告されている。B 型急性肝炎では血液中の HBV 特異的 CD8⁺T 細胞における PD-1 の発現は高値でありウイルス消失とともに減少するが劇症肝不全に進行した症例では発現が持続しており、PD-1 の発現パターンが臨床結果と関連があることが報告された⁶⁾。さらに、ビリルビン代謝に重要な役割を果たす heme oxygenase-1 は肝臓保護作用に加えて HBV 感染において明らかな抗ウイルス作用を示すことが動物モデルで明らかにされた⁷⁾。

インドから B 型急性肝炎患者における lamivudine のコントロール研究が報告された⁸⁾。B 型急性肝炎患者で 3 カ月間 lamivudine を内服した群とプラセボ群を比較すると最初の 4 週での HBV DNA の減少は lamivudine 群で有意に認められたが、肝機能の改善、HBs 抗原の消失率は治療群とプラセボ群の間で有意差は認めなかった。症例数が少ないことと遺伝子型の検討などがされておらず本邦では今後の検討が必要である。

B. De novo 肝炎について

最近では、医療の進歩により、より強力な抗腫瘍薬、免疫抑制薬が次々と開発されており、悪性腫瘍、膠原病、移植患者においてこれらの薬剤を使用中・後に B 型肝炎ウイルス (HBV) が再活性化する症例が増加している。一般的に HBV の再活性化は大きく 2 つに分けることができ、HBs 抗原陽性である HBV キャリアの患者群から、もう 1 つは HBs 抗原陰性で Hbc 抗体もしくは HBs 抗体が陽性の HBV 既感染者群からの再活性化である。後者の場合を de novo 肝炎と称している。HBV キャリアでは化学療法前の lamivudine 投与

の有効性が報告されているが⁹⁾、de novo 肝炎については病態についても不明なことが多かった。

HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性者は以前までは臨床的に治癒と判断されていた人々で本邦では約 20% 存在するとされている。通常 HBV に感染した後は非特異的な自然免疫に引き続き、ウイルス特異的な免疫反応が起こる。この時は細胞障害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫が重要な役割を果たしている。細胞性免疫は急性肝炎罹患後、年単位で継続するため肝臓内では感染性のあるウイルスの産生が持続するが、CTL の働きのため血液中へのウイルスの放出は極めて少量に抑えられている。これは HBs 抗原陰性で既感染とされる状態である。よって HBV 特異的 CTL が HBV の増殖をコントロールできないような状態になると HBV DNA が急速に増えて、肝炎が再燃する。免疫抑制薬の投与などにより生じる状態が de novo B 型肝炎である。最近悪性リンパ腫の治療に抗 CD20 抗体である rituximab が用いられるようになって de novo 肝炎の発症が高頻度になり一躍注目を浴びることとなった。Rituximab は悪性リンパ腫の治療効果を劇的に改善したが B 細胞の減少が起こるため、様々なウイルスなどの再活性化の報告がなされるようになった。Rituximab の使用によって de novo B 型肝炎が発症した症例が 2001 年に初めて発表された¹⁰⁾。その後は表 1 のように rituximab 使用後に de novo B 型肝炎を発症した症例の報告例は 7 例であり¹¹⁻¹⁵⁾、死亡率も 7 例中 4 例 (57%) と高率であった。

2006 年には香港の Hui らが悪性リンパ腫の治療を行う HBs 抗原陰性者 244 名について前向きコホートで de novo B 型肝炎、劇症肝不全の発症率、危険因子などについて詳細な検討を行った¹⁶⁾。244 例中 8 例 (3.3%) で de novo B 型肝炎を発症しており、そのうち、3 例で劇症肝不全を発症し 1 例が死亡した。De novo B 型肝炎の発症の危険因子は rituximab とステロイドの併用療法であっ

表1 HBs抗原陰性者においてRituximabを含む化学療法後に de novo B型肝炎を発症した症例

No.	年齢/性	疾患	HBc/HBsAb	Peak ALT	治療	予後
1	73/M	FL	-/+	1230	Supportive	HBsAg +
2	80/M	DLC	ND/+	101	Supportive	治癒
3	55/M	DLC	ND/+	84	Supportive	治癒
4	73/M	DLC	-/+	—	Lamivudine	死亡
5	53/M	CLL	+/+	2120	Lamivudine	死亡
6	67/M	NHL	-/+	2240	Lamivudine	死亡
7	59/M	NHL	+/+	359	Lamivudine	死亡

DLC; diffuse large cell lymphoma, FL; follicular lymphoma, CLL; chronic lymphocytic leukemia, NHL; non-Hodgkin's lymphoma.
 ND: not detected

た。さらに、de novo B型肝炎を発症した患者は有意に劇症肝不全を引き起こし、唯一の危険因子であった。Huiらはde novo肝炎の患者を詳細に検討した結果臨床経過を図1に示すようにまとめた。化学療法終了後まずHBV DNAの増殖が起これ、それから中央値で10週後にHBs抗原が陽転化する。それから中央値8週後になると初めてALT値が上昇をしてきていわゆる肝炎の再燃状態になる。よって、HBV DNA量の増加を注意深く経過観察し、化学療法開始前の100倍に増加したら核酸アナログの内服を開始したらどうかという提案をしている。一方、LiuらはTaqMan PCR

で毎月HBV DNAを測定するより、核酸アナログを予防的に内服させた方が費用の面で効果的ではないかと反論しているが検証はされていない¹⁷⁾。

実際の臨床の間ではHBs抗原陰性者に対してHBV DNA量を化学療法前・中・後に測定することは保険制度上認められておらず、予防的に核酸アナログ薬を使用することも同様である。本邦ではde novo B型肝炎発症の臨床データがなかったため平成17・18年度の厚生労働省研究班熊田博光班長の指導のもと全国調査を行った¹⁸⁾。平成12～16年の5年間に新たにHBs抗原陽性になった患者についてアンケート調査を行い、最終

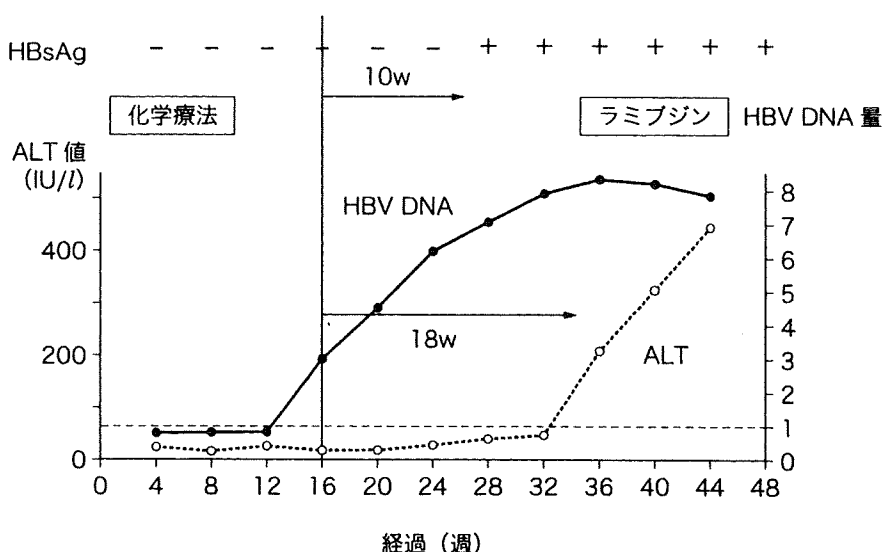


図1 De novo B型肝炎の発症パターン

的には552例について検討を行ったのでそのデータを紹介します¹⁹⁾。552例中96%はB型急性肝炎で、残りの4% (23例) はde novo B型肝炎であった。De novo 肝炎と急性肝炎の臨床像の比較ではde novo 肝炎は有意に高齢、ALT値とアルブミン値は低値、HBV DNA量が高値であることが判明した (表2)。遺伝子型はde novo 肝炎では遺伝子型Aは1例も認めず、遺伝子型Bの割合が急性肝炎群より高率であった。劇症肝不全となった割合はde novo 肝炎では23例中5例

(22%) であり、急性肝炎の529例中45例 (9%) より高率であった (図2)。さらに、劇症肝不全となったde novo 肝炎では全例死亡しており (図2)、de novo 型肝炎から劇症化すると救命は非常に困難であることが明らかとなった。劇症化した症例は全例de novo 肝炎発症後に lamivudine の内服を開始していたが劇症化を抑制することはできなかった。5例と症例数は少ないが、劇症化症例は全例非ホジキンリンパ腫でrituximab投与されており香港の報告と同じである。基礎疾患に悪

表2 De novo B型肝炎と急性B型肝炎の比較

	de novo (n = 23)	急性肝炎 (n = 529)	p value
年齢	63	33	< 0.001
男性	59%	71%	> 0.2
肝機能検査			
ALT (IU/l)	929	2300	< 0.001
T Bil (mg/dl)	10.3	6.4	0.12
Alb (g/dl)	3.2	3.6	< 0.001
PT (%)	65.0	75.0	> 0.2
HBV DNA (log copies/ml)	7.5	5.5	< 0.001
HBV genotype	(n = 19)	(n = 232)	
A	0%	25%	0.003
B	42%	12%	< 0.001
C	58%	63%	> 0.2

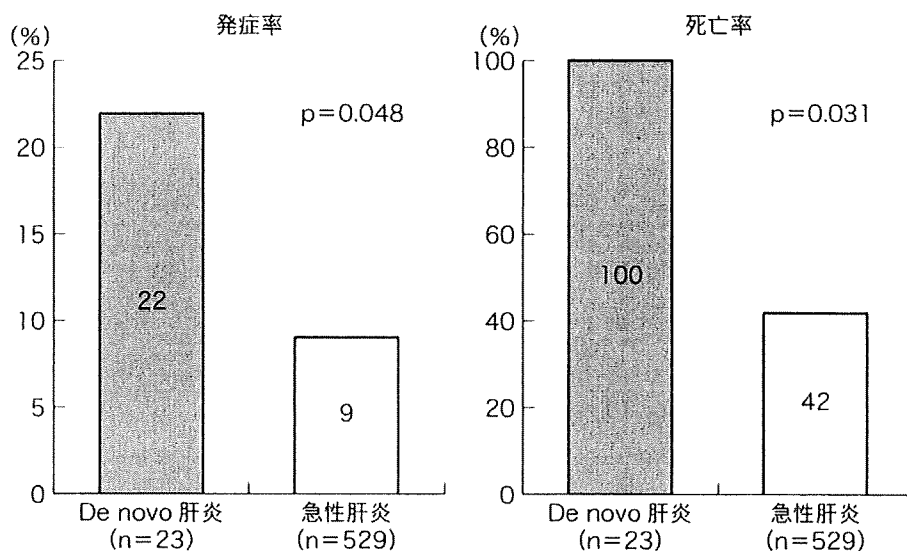


図2 劇症肝不全の患者の発症率と死亡率

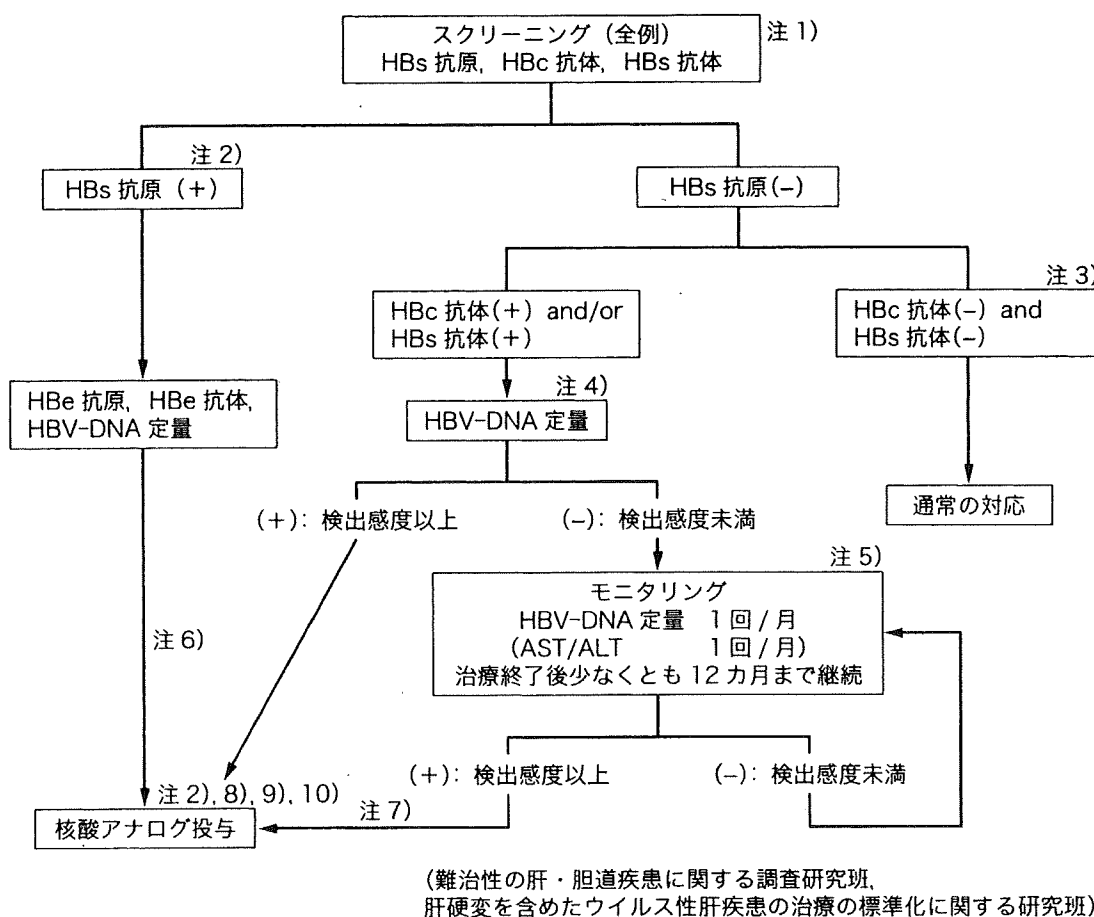


図3 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策のガイドライン*

補足

* 血液悪性疾患に対する強力な免疫・抑制化学療法中あるいは終了後にHBs抗原陽性あるいはHBs抗原陰性例の一部にHBV再活性化によりB型肝炎が発症し、その中には劇症化する症例があり、注意が必要である。その他の疾患においても治療によるHBV再活性化のリスクを考慮して対応する必要がある。また、ここで推奨する核酸アナログの予防投与のエビデンスはなく、劇症化予防効果を完全に保証するものではない。

- 注1) CLIA法で測定することが望ましい。
- 注2) HBs抗原陽性例は肝臓専門医にコンサルトすること。すべての症例で核酸アナログ投与にあたっては肝臓専門医にコンサルトするのが望ましい。
- 注3) 初回治療時にHBc抗体、HBs抗体未測定の場合は抗体価が低下している場合があり、HBV-DNA定量検査などによる精査が望ましい。
- 注4) PCR法およびリアルタイムPCR法により実施する。より検出感度の高いリアルタイムPCR法が望ましい。
- 注5) リツキシマブ・ステロイド使用例、造血細胞移植例はHBV再活性化の高リスクであり、注意が必要である。フルダラビンは強力な免疫抑制作用を有するが、HBV再活性化のリスクは不明であり、今後注意が必要である。
- 注6) 免疫抑制・化学療法を開始する前、できるだけ早期に投与を開始するのが望ましい。
- 注7) 免疫抑制・化学療法中はHBV-DNA定量検査が検出感度以上になった時点で直ちに投与を開始する。
- 注8) 核酸アナログはエンテカビルの使用を推奨する。
- 注9) 下記の条件を満たす場合には核酸アナログ投与の終了を検討して良い。
スクリーニング時にHBs抗原(+)例ではB型慢性肝炎における核酸アナログ投与終了基準を満たす場合、スクリーニング時にHBc抗体(+) and/or HBs抗体(+)例では、(1)免疫抑制・化学療法終了後、少なくとも12カ月間は投与を継続すること、(2)この継続期間中にALT(GPT)が正常化していること、(3)この継続期間中にHBV-DNAが持続陰性化していること。
- 注10) 核酸アナログ投与終了後12カ月間は厳重に経過観察する。経過観察方法は各核酸アナログの使用上の注意に基づく。経過観察中にHBV-DNA定量検査が検出感度以上になった時点で直ちに投与を再開する。

性腫瘍があるため肝移植の適応にはならないので de novo 肝炎は重篤なその病態の重症度について啓発活動が必要である。予防、そして de novo 肝炎の発症前に核酸アナログの治療開始を行うことが非常に重要である。そこで平成19年度厚生労働省肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究班（熊田博光班長）と難治性肝・胆道疾患に関する研究班の劇症肝炎分科会（坪内博仁分科会長）が共同で免疫抑制剤投与におけるB型肝炎のウイルスマーカーの測定、経過観察についてガイドラインを発表した（図3）。保険制度上HBV DNAの測定は認められていないが、今後はこのガイドラインをもとに臨床データを蓄積していく予定である。

一方、香港と本邦のデータから rituximab を含んだ化学療法を行うと de novo 肝炎の発症、劇症化が起こりやすいことから血液内科医が中心となって rituximab を含んだ化学療法を施行する悪性リンパ腫患者における de novo 肝炎の発症を多施設共同で前向きに検討するプロジェクトも始まっている。

むすび

De novo B型肝炎の発症機序の基礎的なデータ蓄積、さらに de novo B型肝炎発症の予防および、治療法を確立していく必要があると考えられる。

文献

- 1) Sugauchi F, Orito E, Ohno T, et al. Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatol Res.* 2006; 36: 107-14.
- 2) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2006; 44: 326-34.
- 3) Chihara N, Arase Y, Suzuki F, et al. Prolonged hepatitis after acute infection with genotype H hepatitis B virus. *Intern Med.* 2007; 46: 1847-51.
- 4) Kumagai I, Abe K, Oikawa T, et al. A male patient with severe acute hepatitis who was domestically infected with a genotype H hepatitis B virus in Iwate, Japan. *J Gastroenterol.* 2007; 42: 168-75.
- 5) 玉田陽子, 矢野公士, 小松達司, 他. 国内初となる HBV genotype HによるB型急性肝炎の1例. *肝臓.* 2007; 48: 109-11.
- 6) Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, et al. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology.* 2008; 134: 1938-49, 49 e1-3.
- 7) Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, et al. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2007; 133: 1156-65.
- 8) Kumar M, Satapathy S, Monga R, et al. A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology.* 2007; 45: 97-101.
- 9) Loomba R, Rowley A, Wesley R, et al. Systematic review: the effect of preventive lamivudine on hepatitis B reactivation during chemotherapy. *Ann Intern Med.* 2008; 148: 519-28.
- 10) Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med.* 2001; 344: 68-9.
- 11) Tsutsumi Y, Tanaka J, Kawamura T, et al. Possible efficacy of lamivudine treatment to prevent hepatitis B virus reactivation due to rituximab therapy in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol.* 2004; 83: 58-60.
- 12) Westhoff TH, Jochimsen F, Schmittl A, et al. Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood.* 2003; 102: 1930.
- 13) Sarrecchia C, Cappelli A, Aiello P. HBV reactivation with fatal fulminating hepatitis during rituximab treatment in a subject negative for HBsAg and positive for HBsAb and HBcAb. *J Infect Chemother.* 2005; 11: 189-91.
- 14) Law JK, Ilo JK, Hoskins PJ, et al. Fatal reactivation of hepatitis B post-chemotherapy for lymphoma in a hepatitis B surface antigen-negative, hepatitis B core antibody-positive

- patient: potential implications for future prophylaxis recommendations. *Leuk Lymphoma*. 2005; 46: 1085-9.
- 15) Sera T, Hiasa Y, Michitaka K, et al. Anti-HBs-positive liver failure due to hepatitis B virus reactivation induced by rituximab. *Intern Med*. 2006; 45: 721-4.
- 16) Hui CK, Cheung WW, Zhang HY, et al. Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology*. 2006; 131: 59-68.
- 17) Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Kinetics of hepatitis B virus reactivation after chemotherapy: more questions than answers. *Gastroenterology*. 2006; 131: 1656. author reply-7.
- 18) Umemura T, Kiyosawa K. Fatal HBV reactivation in a subject with anti-HBs and anti-HBc. *Intern Med*. 2006; 45: 747-8.
- 19) Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Mortality secondary to fulminant hepatic failure in patients with prior resolution of hepatitis B virus infection in Japan. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: e52-6.

Currents Status and Prospects of Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients

Shuji Terai

Department of Gastroenterology & Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan
(Received September 22, 2008)

Abstract We developed a novel cell therapy (ABMi therapy) using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis patients. Our study depends on the findings from basic studies using GFP/CCl4 models. Beginning in November 2003, we started clinical trials of ABMi therapy and found it to be safe and effective for liver cirrhosis patients. Multicenter trials in Japan and Korea have also shown the effectiveness of ABMi therapy. In this review, we discuss translational research for the development of ABMi therapy for liver cirrhosis patients.

Key words: ABMi therapy, bone marrow cell, regeneration, cell therapy, liver cirrhosis

Introduction

We began clinical trials of autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy for liver cirrhosis (LC) patients in November 2003. We then conducted a multi-center trial in Japan, in collaboration with a Korean group.^{1,2)} We have now performed ABMi therapy in 23 LC patients, and have confirmed the safety and effectiveness of ABMi therapy. In this review, we discuss the current status and future prospects of ABMi therapy.

Basic study for development of ABMi therapy

Stem cells have been identified in human bone marrow (BM).³⁾⁴⁾ Thus, BM is considered to be a novel source of cells for liver regenerative studies.⁵⁾ We subsequently developed a GFP/CCl4 model that monitors the differentiation of bone marrow cells (BMC) into hepatocytes in CCl4-induced liver damage.⁶⁾ In this GFP/CCl4 model, we found that BMC infusion is effective for improving liver damage (1. Liver function; 2. Liver fibrosis; 3. Survival rate) (Fig. 1). Infused BMC expressed matrix metalloproteinase (MMP9) and migrated into damaged areas.⁷⁾

Findings from GFP/CCl4 model

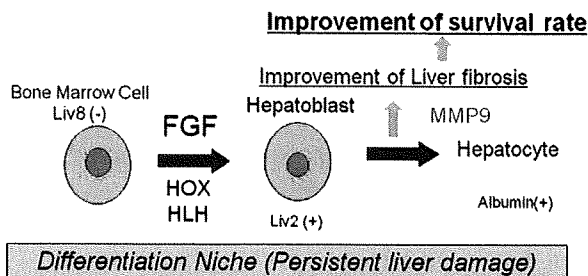


Fig. 1 Summary of basic research using GFP/CCl4 model.

Finally, BMC infusion improved liver fibrosis and the liver microenvironment in cirrhotic mice.⁸⁾ On the other hand, cell fusion is an important mechanism to explain the differentiation of BMC into hepatocytes. The phenomenon of cell fusion is important to consider in the differentiation mechanism of BMC.⁹⁾¹⁰⁾ The karyotype of liver is known to be 2N, 4N, 8N and 16N. The significance of changes in liver karyotype require further analysis. With regard to the differentiation of hepatocytes from stem cells, Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM) was identified as a marker of hepatic stem cells.¹¹⁾ However,

Abbreviations: CCl₄: carbon tetrachloride; GFP: green fluorescent protein; BMI: bone marrow cell infusion; ABMi: autologous bone marrow cell infusion; EGFP: enhanced-GFP; MMP: matrix metalloproteinase; LC: liver cirrhosis; EPCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule; MNC: mononuclear cell; FACS: fluorescent-activated cell sorter; MMP9: matrix metalloproteinase 9