

のホルモン変化が遺伝子異常や細胞増殖能亢進を介して肝細胞癌の発症を促進させると考えられる<sup>1)</sup>。

### ③ 慢性肝疾患患者における肥満・糖尿病の評価

肥満・糖尿病の主な要因は過食と運動不足である。ただし、ライフスタイルは個人により大きく異なる。加えて、慢性肝疾患患者では味覚異常による偏食、C型肝炎ウイルス、鉄・亜鉛などの微量元素異常、アミノ酸インバランス、脂質異常症などによって引き起こされるインスリン抵抗性が肥満・糖尿病に関与している場合も少なくない<sup>4)</sup>。このため、管理栄養士による摂取エネルギー量と摂取栄養素評価を参考にし、日常生活指導を行うべきである。

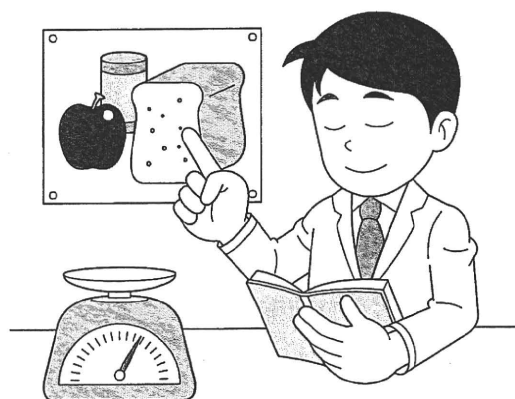


図2 管理栄養士による  
栄養評価の重要性

肥満とは体脂肪が異常に増加した状態で、一般的には Body Mass Index (BMI) 25 以上を肥満とする。BMI は身長と体重より簡便に算出でき、一般診療において有用な指標であることに違いはないが、脂肪量や筋肉量は加味されていない。体脂肪量、特に内臓脂肪量が肝細胞癌の発症と関係することから、体脂肪率や腹囲の測定も併せて評価すべきである。



図3 内臓脂肪は肝細胞癌の発症に関係する

慢性肝疾患患者は肝でのインスリン作用の減弱により高頻度に肝性糖尿病を合併する。肝性糖尿病では過栄養に基づく糖尿病と以下の3点が異なる。1) 肝臓でのグリコーゲン貯蔵量が減少しているため、早朝空腹時では血糖は正常もしくは低血糖となる<sup>5)</sup>。2) 食後、血糖を十分に肝臓に取り込めないため、食後高血糖となりやすい。3) 脾機能亢進のため、赤血球寿命が短縮していることからヘモグロビン A<sub>1c</sub> が過栄養に基づく糖尿病と比較して低値となる。以上のことから、慢性肝疾患患者では食後の血糖測定も併せて耐糖能評価を行うべきである。

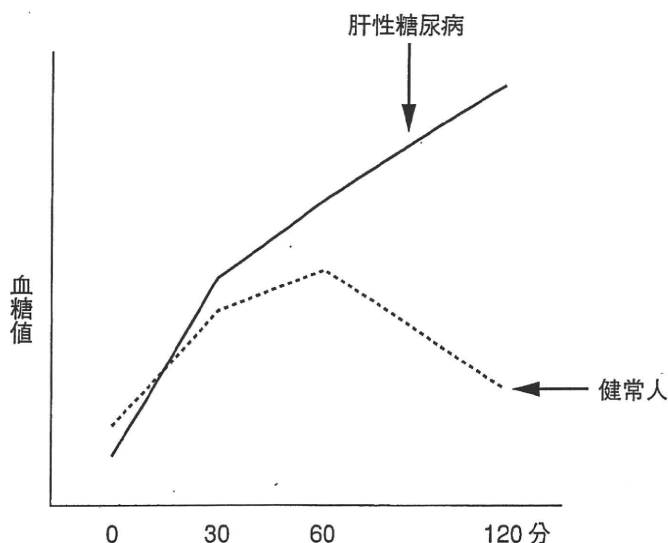


図4 食後血糖測定的重要性

## 文献

- 1) El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2557-76.
- 2) Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, et al. Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism*. 2007; 56: 1682-8.
- 3) Sumie S, Kawaguchi T, Komuta M, et al. Significance of glucose intolerance and SHIP2 expression in hepatocellular carcinoma patients with HCV infection. *Oncol Rep*. 2007; 18: 545-52.
- 4) Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol*. 2004; 165: 1499-508.
- 5) Ito M, Kawaguchi T, Taniguchi E, et al. Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23: 244-51.
- 6) Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1625-38.
- 7) World Cancer Research Found. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. 2nd ed. Washington, USA, 2007.



## サイドメモ 肥満と癌

近年、肥満が肝細胞癌だけでなく他の様々な癌の発症にも影響を及ぼすことが明らかとなった。90万人以上の成人を16年間追跡した疫学研究（米国）の結果、肥満との関連を認めた癌は、食道癌、大腸癌、肝癌、胆嚢癌、膵臓癌、腎癌、胃癌、前立腺癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌と多岐にわたっていることが報告されている<sup>6)</sup>。また、米国癌研究協会と英国の世界癌研究基金による報告書“Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective”においても食道癌、膵癌、大腸癌、子宮内膜癌、腎癌、閉経後の女性の乳癌と肥満の関連が報告されている<sup>7)</sup>。肥満患者を診療するにあたり、虚血性心臓病、脳血管疾患の発症に加えて、上記癌発症の危険性も念頭におく必要がある。

〈川口 巧 佐田通夫〉

## 血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法

中村 徹\* 佐田 通夫\*

索引用語：肝硬変，再生，血管内皮前駆細胞，細胞療法，G-CSF

### 1 はじめに

本邦における肝硬変症の進展に伴う肝不全における死亡者数は年間9,200人にのぼる。さらに、B型やC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を発症する。肝細胞癌による年間死亡者数は年々増加し、肝硬変症に関連した年間死亡者数は40,000人を超える。肝硬変患者の中には医療行為によってC型肝炎ウイルス(HCV)に感染した患者も多く含まれている。現在、C型慢性肝炎患者に対しては、ペグインターフェロンとリビリン併用療法による治療が積極的に行われているが、HCVの駆除率はゲノタイプ1b、高ウイルス量例では40～50%程度にとどまっている。さらに、肝硬変患者での駆除率はさらに低い。インターフェロン療法が無効もしくは行うことができない患者は肝硬変、肝細胞癌へと進行していく確率は高く、これらの患者に対して十分な対策を講じることが急務と考えられる。しかし、進行した肝硬変症に対する根本的な治療法は肝移植(生体肝

移植、脳死肝移植)しかなく、その肝移植も慢性的なドナー不足に悩まされ、手術侵襲や術後の免疫拒絶の問題を考えると一般的な治療法として普及していないのが現状である。

肝臓は優れた予備能力と再生能力を有した臓器であり、肝硬変症に進展しても肝臓全体の70～80%が障害されない限りほとんど症状なく日常生活を送ることが可能である。また、肝硬変症では原因のいかに関わらず、慢性の肝細胞障害と再生不全、活性化された肝星細胞による肝線維化の進展、偽小葉形成、血流障害が疾患の本体をなしている。したがって、肝硬変症の病態を形成するこれらの因子をわずかでも改善できれば、本来肝臓の持つ高い再生能力により、完治はできなくても肝硬変患者の生活の質や予後を改善することは十分可能であると考えられる。

近年、骨髄には血球細胞以外のさまざまな種類の細胞に分化する能力を有する幹細胞の存在が証明され<sup>1)</sup>、これを契機に骨髄由来の細胞を用いた再生療法の基礎的研究が多くの臓器を対象に精力的に行われ、その一部はす

Toru NAKAMURA *et al* : Application of endothelial progenitor cells to hepatic regeneration therapy

\*久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 [〒 830-0011 久留米市旭町 67 番地]



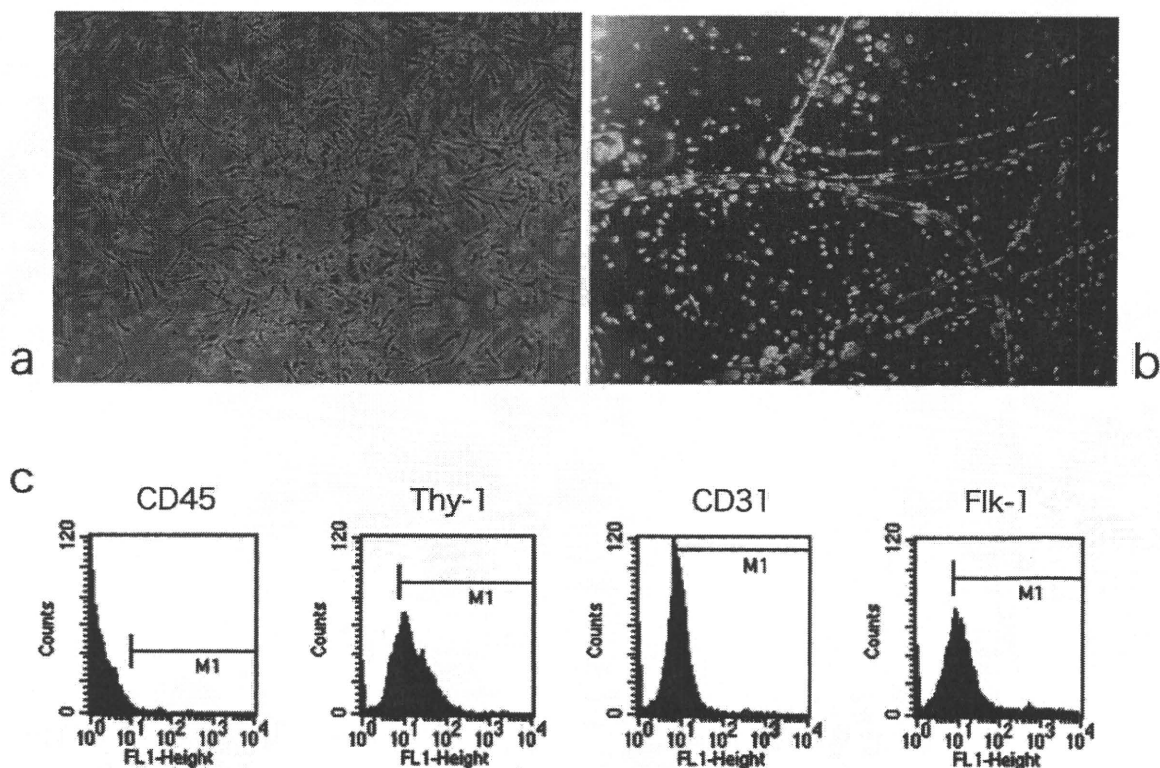


図1 ラット血管内皮前駆細胞 (EPC)

- 単核球細胞を一定以上の細胞密度で7日間培養を行うと、血島(blood island)を形成し、その周囲に紡錘形の接着性細胞(EPC)が出現し、増殖する。
- コード様形態を示したEPC細胞。
- これらの細胞をFACSにて解析すると、血管内皮細胞特異的抗原(Thy-1, CD31, Flk-1)を発現している。(文献6より引用)

で臨床応用もなされている<sup>2,3)</sup>。しかし、そのほとんどは全身麻酔下で患者の骨髓細胞を採取し、そのまま投与するため単回投与に限られるため、したがって治療効果にも限界がある。まして、進行した肝硬変症において全身麻酔による骨髓細胞の採取は患者負担も大きく、たびたび繰り返して行うことは危険である。このため、自己の細胞を用いた肝硬変症に対する肝臓再生療法は患者に負担をかけずに採取できる細胞を用いることが望ましい。

1997年、浅原らによって発見された血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell; EPC)は骨髓由来で内皮細胞に分化する細胞である

が、この細胞は骨髓から動員されて循環血液中(末梢血中)に存在し、新たに血管が形成されつつある局所、つまり炎症部位や腫瘍部位へ特異的に取り込まれ、分化・増殖・遊走して新規血管の形成に関与することが証明された<sup>4)</sup>。われわれはマウスの急性肝障害モデルおよびラットの肝硬変モデルにおいて、健常ヒトおよび正常ラットから採取した血管内皮前駆細胞を経静脈的に投与することで、肝臓内の血管形成の促進に関与するだけでなく、血管内皮前駆細胞の産生する各種増殖因子により肝細胞の再生の促進、肝線維化の抑制、門脈血行動態の改善および予後の改善が認められたことを明らかにした<sup>5-7)</sup>。したがっ

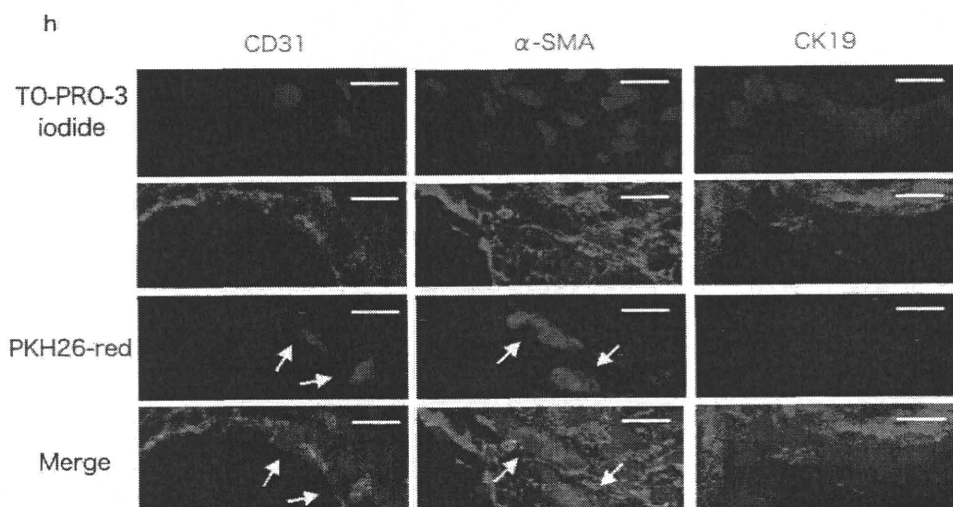
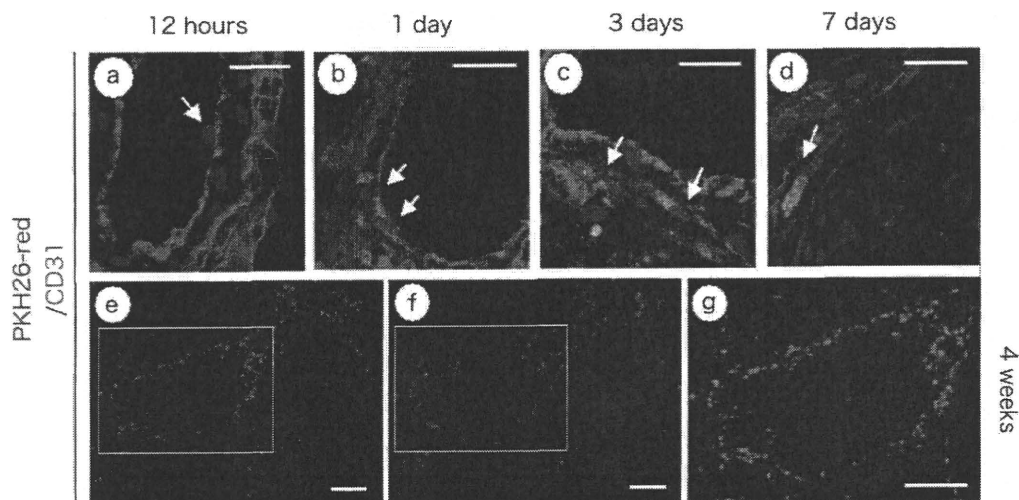


図2 EPC移植による硬変肝での局在と分化

a~g: 赤く蛍光標識(PKH26-red)されたEPC (赤色, 矢印)とCD31で染色した内皮細胞(緑色)の局在の経時的変化を示す。移植したEPCは移植後12時間(a)ほどでCD31陽性血管内腔面に接着し, 24時間後(b)にはCD31陽性を示す血管内皮細胞の一部となる。EPC移植後3日(c)あるいは7日(d)経過すると, 肝の線維中隔部位まで移動し, 4週後(e-g)には門脈周囲や線維中隔に沿って生着していることが確認された。

h: EPC移植4週後のEPC (赤色, 矢印)はCD31 (緑色)陽性であり,  $\alpha$ -SMA (緑色)やCK19 (緑色)は陰性を示した。青色は核を示す。(文献6より引用)

て, 臨床においても進行した肝硬変症の肝臓再生を目的とした細胞療法に用いる細胞として, 患者自身の血管内皮前駆細胞は理想的であると考えられる。本稿では肝硬変症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的研究の成果, さらにその臨

床応用として2006年9月より開始したヒトへの応用についての経過を述べる。

## 2 ラット血管内皮前駆細胞の特性

末梢血中の単核球分画の一部に存在するEPCは, フローサイトメーター (FACS)によ

る解析により、血管内皮細胞特異的抗原であるThy-1 (CD90), CD31 (PECAM-1), Flt-1 (VEGFR-2)を発現しており, RT-PCR法においても, CD133 (AC133), Flt-1, Flk-1 (VEGFR-1), Tie-2の発現を確認した<sup>6)</sup>(図1). さらに, EPCはHGF, TGF- $\alpha$ , EGF, VEGFなど肝臓再生に必要なサイトカインを発現しているのみならず, 細胞外マトリックス(細胞外基質)分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP) -2, -9, -13を活性型で分泌していることが確認された<sup>6)</sup>. EPCの骨髄から末梢血への動員については, SDF-1, G-CSF, GM-CSFなどのサイトカイン<sup>8-10)</sup>, VEGFなどの増殖因子<sup>11)</sup>, アンジオポエチン<sup>12)</sup>などにより調節されていることが知られている. その内, SDF-1, VEGFに関しては, われわれの解析において, 正常肝と比較し硬変肝において発現が亢進していることが確認され, 障害肝への動員に関与しているものと考えられる<sup>7)</sup>.

### 3 血管内皮前駆細胞移植による四塩化炭素障害肝(硬変肝)での局在と分化

EPCを赤く蛍光標識(PKH26-red)し, 肝硬変ラットに尾静脈より移植を行い, 経時的に観察を行った. 蛍光顕微鏡を用いてEPCを追跡すると, EPCは移植後12時間ほどでCD31陽性血管内腔面に接着し, 24時間後にはCD31陽性を示す血管内皮細胞となる. そのままそこに留まるものもあるが, 移植後3日あるいは7日経過するとさらに内部へ移動し, 4週後には門脈周囲や肝の線維中隔に沿って生着することが確認された<sup>6)</sup>(図2a-g). 移植したEPCは将来何に分化しているのかという点だが, もともと前駆細胞として体外で分化・増殖させたのち移植しているこ

とから, EPCはCD31陽性(血管内皮)細胞であり, 活性化肝星細胞のマーカである $\alpha$ -SMAや胆管系マーカであるCK19は陰性, アルブミンも陰性を示した<sup>6)</sup>(図2h). 移植したEPCの肝内への浸潤・分化に伴う既存の肝構成細胞への影響については, 次項目で述べる.

### 4 血管内皮前駆細胞を用いた細胞治療の動物実験(ラット肝硬変モデル)での治療効果

ラット四塩化炭素肝硬変モデルにラットの血管内皮前駆細胞を投与すると, Azan-Mallory染色において肝線維化の抑制が認められ, リアルタイムPCR法, 免疫組織化学的検討法のいずれにおいてもI型コラーゲン, フィブロネクチンの発現の低下が確認された. さらに, 細胞外マトリックス産生の中心的役割を担う活性化肝星細胞のマーカである $\alpha$ -SMAや, 細胞外マトリックスの産生・分解を制御する最も重要なサイトカインであるTGF- $\beta$ の発現もリアルタイムPCR法, 免疫組織化学的検討法のいずれにおいても低下しており, 線維産生系の低下に伴う肝線維化の改善が確認された. MMPとその阻害酵素であるマトロプロテアーゼ組織インヒビター(TIMP)についても検討したところ, *in situ* Zymographyにおいて強いゼラチナーゼ活性とリアルタイムPCR法によるTIMP-1の発現低下が認められたことから, 線溶系酵素の亢進に伴う肝線維化の改善も確認された. このように肝線維化改善効果がみられたので, 引き続き起こると考えられる肝再生についても検討してみた. Ki67に対する免疫組織化学的検討法によるKi67陽性肝細胞数をカウントすると対照群と比較し, 約3倍の細胞増殖活性を示していることが確認され, 肝再生

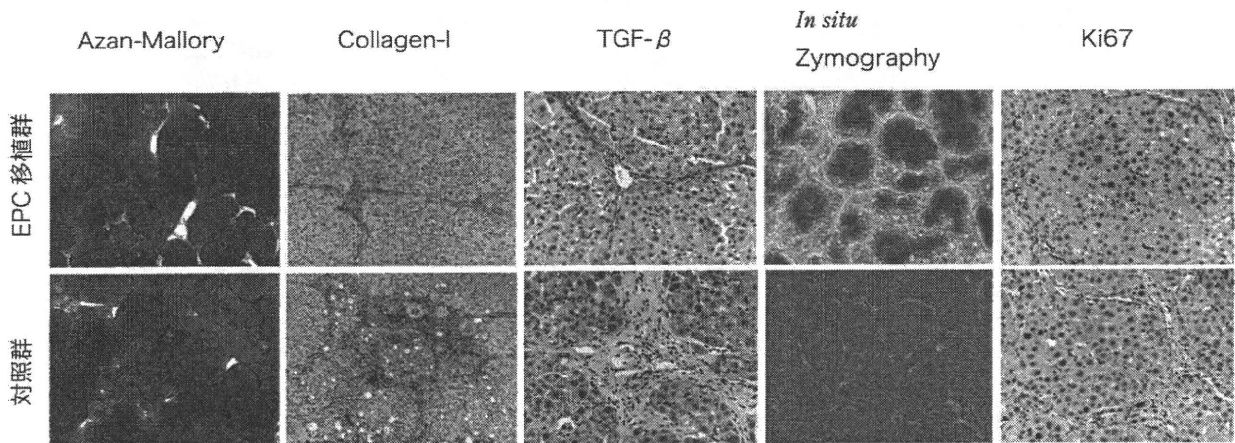


図3 EPCを用いたラット肝硬変モデルにおける治療効果

ラット四塩化炭素肝硬変モデルにおいて、ラットEPCの移植により、肝の線維化が抑制され(Azan-Mallory染色, I型コラーゲン染色), TGF- $\beta$ の発現も抑制され, *in situ* Zymographyにおいて強いゼラチナーゼ活性を示し, 肝細胞の細胞増殖活性(Ki67染色)の亢進を示した。(文献6より引用)

の促進作用が示された<sup>6)</sup>(図3)。さらに、肝臓組織内の血流改善の促進もレーザードブラー法を用いた検討で確認できた。

以上の結果からこれらの治療効果は、血管内皮前駆細胞の前駆細胞としての増殖・分化能をうまく利用した生理的かつパワフルな先駆的医療として注目されている。

### 5 臨床研究「自己末梢血単核球細胞を用いた非代償性肝硬変症に対する肝臓再生療法」の開始

血管内皮前駆細胞移植による肝硬変症治療の有効性が動物実験レベルで明らかにされたことより、われわれはヒト肝硬変患者を対象に、患者自身の末梢血から採取し、血管内皮前駆細胞を多く含む単核球細胞を投与することで肝機能、予後の改善がみられるか否かを明らかにするとともに、安全性と有効性について検討した。肝硬変症の治療に血管内皮前駆細胞を用いた報告は国内外ともに皆無で全く新しい治療法と考える。さらにこの細胞療

法は患者本人の細胞を末梢血から採取するため非侵襲的、安全で倫理的にも問題なく他の疾患にも応用可能な治療法である。本研究のプロトコルを示す。

1) われわれが準備した治療適応基準(下記に詳細明記)を満たし、この治療法についての承諾を得られた患者に対し、治療前検査を行う。

[治療適応基準]

① 非代償性肝硬変症患者、② 同意取得時の年齢が20歳以上、75歳以下の患者(性別不問)、③ 血清アルブミン濃度が3.0 g/dl未満の患者、④ 食道・胃静脈瘤や腹水、浮腫の合併の有無は問わない、⑤ 肝移植治療を望まない患者、⑥ 6か月以上の生存が期待できる患者

2) 入院後、5日間連続してG-CSF製剤を投与する。

3) G-CSF製剤投与開始4日目に、末梢血単核球細胞を採取する。採取は2日間連続して行うが、1回で有核細胞数 $1 \times 10^{11}$ 個に達



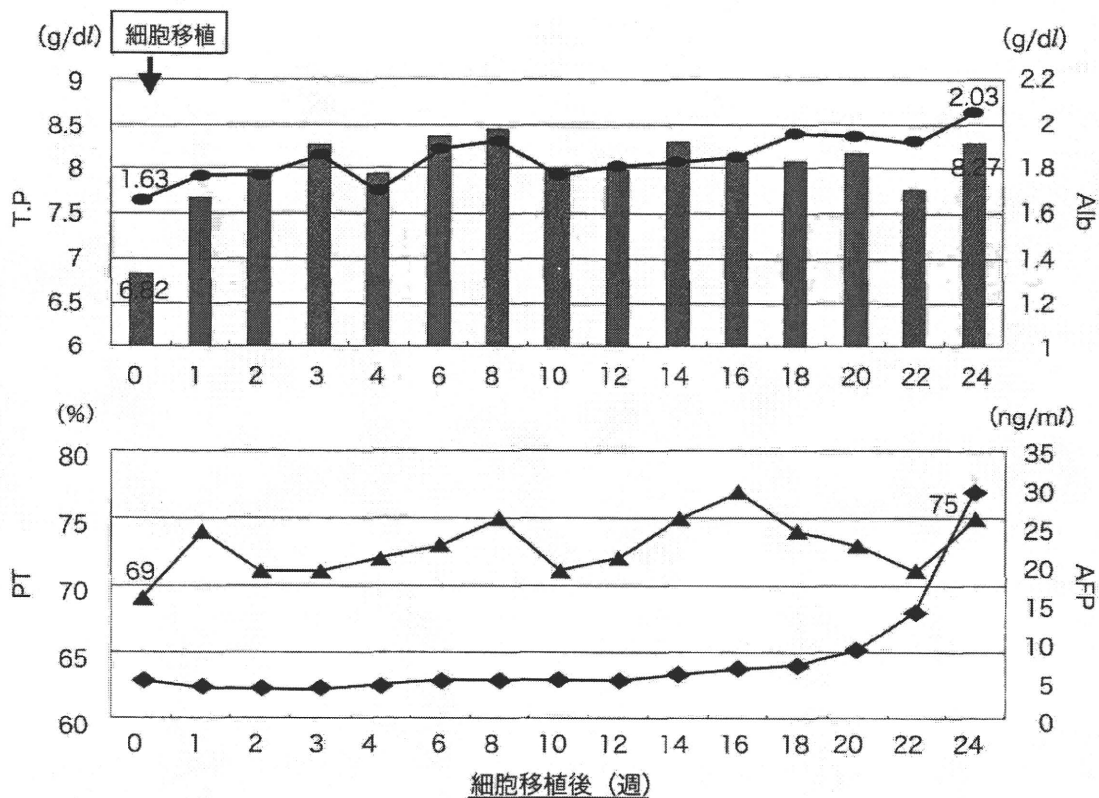


図4 自己末梢血単核球細胞を用いた肝硬変患者における臨床経過  
血清総蛋白値、アルブミン値、プロトロンビン時間の上昇を確認できた。

していれば採取は1日で終了とする。

4) G-CSF製剤投与開始5日目に、採取したすべての末梢血単核球細胞を経静脈的に輸注する。

5)細胞移植後1週間は副作用や合併症を生じないかどうか慎重に経過観察を行い、問題ないことが確認できたら退院とし、そののちは外来にて経過観察を続ける。

6)外来経過観察は移植後2, 4, 8, 12, 24週間まで経過観察(採血, 腹部超音波検査, 腹部造影CT検査など)を行う。

7)移植後24週以上経過したのち、肝機能の低下が認められ、さらに患者の同意を得ることができた患者に対しては、再度細胞移植治療を行う。

本研究課題の臨床研究は、2006年7月久留

米大学倫理委員会による審査・承認を受け、2006年9月より開始し、2007年10月までに3症例(HCV:2例, アルコール:1例)を経験した。結果を以下に示す

1)現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされるChild-Pughスコア、MELDスコアの改善傾向を示した。

2)現時点では統計学的な有意差はないものの、血清アルブミン値やプロトロンビン時間の上昇傾向を示した(図4)。

3)現時点では統計学的な有意差はないものの、肝線維化の血清学的マーカーであるヒアルロン酸値、IV型コラーゲン値、プロコラーゲン3ペプチド(P-3-P)値の低下傾向を示した。

4)腹部超音波検査にて、門脈血流量の明ら

かな増加を認めた。

5) 腹水を認めた患者に対しては、腹水量の低下、内服利尿剤の減量を可能にした。

6) 現時点で治療後に合併症が生じた症例は1例あり、本治療との因果関係は不明であるが肝癌が発生した。

## 6 おわりに

われわれの研究は、血管内皮前駆細胞の有するさまざまな増殖因子により、肝硬変における肝細胞の再生のみならず、肝臓を構成するその他の細胞とのバランスの取れた再生を目指している点が特徴と思われる。血管内皮前駆細胞は他の細胞へ分化する可能性が低いため、副作用などのリスクが低いこと、また患者自らの細胞を用いて治療することより免疫拒絶反応はなく、安全性にもすぐれていると考えられる。本研究により、患者自身の末梢血から採取した単核球細胞を、非代償性肝硬変患者に移植することで患者の予後が改善できれば、極端なドナー不足や高額な医療費のため肝移植を受けることのできない患者を救済する治療法となることが期待され、社会的貢献度も大きいものと推測される。しかし、先に示したように、本治療との因果関係は不明であるが、現時点で治療後に肝癌が1例発生した。今後は症例数を重ねていき、治療の有効性を示すとともに、安全性についても今まで以上に慎重に経過観察を続けて確認したい。もちろん、その症例数を重ねていく中で、より効率の良い治療法に向けての基礎研究も続けていきたい。特に、投与経路については現在行われている末梢からの全身投与ではなく肝臓近くからの投与、すなわち肝動注投与あるいは門脈投与を検討したいと考えている。

## 文 献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
- 2) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B et al : Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) : mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108 : 2212-2218, 2003
- 3) Terai S, Ishikawa T, Omori K et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24 : 2292-2298, 2006
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 5) Taniguchi E, Kin M, Torimura T et al : Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 130 : 521-531, 2006
- 6) Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M et al : Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 133 : 91-107, 2007
- 7) Ueno T, Nakamura T, Torimura T et al : Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol* 39 : 16-21, 2006
- 8) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O et al : Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107 : 1322-1328, 2003
- 9) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5 : 434-438, 1999
- 10) Powell TM, Paul JD, Hill JM et al : Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 : 296-301, 2005
- 11) Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al : VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18 : 3964-3972, 1999

12) Hattori K, Dias S, Heissig B et al : Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of

vasculogenic and hematopoietic stem cells. J Exp Med 193 : 1005-1014, 2001

\*

\*

\*

## 自己末梢血単核球細胞を用いた非代償性肝硬変症に対する 肝臓再生医療の開始—基礎研究から臨床研究へ—

中村 徹\*<sup>1)</sup> 鳥村 拓司\*<sup>1)</sup> 福嶋 伸良\*<sup>1)</sup> 森田 幸彦\*<sup>1)</sup> 坂本 雅晴\*<sup>1)</sup>  
 谷口英太郎\*<sup>1)</sup> 於保 和彦\*<sup>1)</sup> 熊本 正史\*<sup>1)</sup> 今村 理恵\*<sup>2)</sup> 岡村 孝\*<sup>2)</sup>  
 上野 隆登\*<sup>1)</sup> 佐田 通夫\*<sup>1)</sup>

### 1 はじめに

肝硬変症の進展に伴う肝不全による本邦での死者は年間9,200人にのぼる。さらに、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を発症する。肝細胞癌による年間死亡者数は年々増加し、2002年には34,000人となっており、肝硬変症に関連した年間死亡者数は40,000人を超える計算になる。また、肝硬変患者の中には結果的に医療行為によってC型肝炎ウイルスに感染した患者も多く含まれており、これらの患者に対して十分な対策を講じることは急務と考えられる。しかし、進行した肝硬変症に対する根本的な治療法は肝移植しかなく、その肝移植も慢性的なドナー不足に悩まされ、一般的な治療法として普及していないのが現状である。

肝臓は優れた予備能力を有しており、肝硬変症に進展しても肝全体の70～80%が障害されない限り、ほとんど症状なく日常生活を送ることが可能である。また、肝硬変症では原因のいかんに関わらず、慢性の肝細胞障害と再生不全、活性化された肝星細胞による肝線維化の進展、偽小葉形成、血流障害が疾患の本体をなしている。よって、肝硬変症の病態を形成するこれらの因子をわずかでも改善できれば、完治はできないまでも肝硬変患者の予後を改善することは十分に可能と考えられ

る。

近年、骨髄由来の一部の細胞には血球細胞以外にもさまざまな種類の細胞に分化する能力が存在することが証明され<sup>1)</sup>、これを契機に骨髄由来の細胞を用いた再生療法の基礎的研究が多くの臓器において精力的になされ、その一部はすでに臨床応用もなされている<sup>2)</sup>。血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell, EPC)は1997年、浅原らによって末梢血中から発見された骨髄由来で、将来内皮細胞に分化することを運命づけられた細胞であるが、この細胞は炎症部位や腫瘍部位へ特異的に遊走して血管の形成に関与することが示されている<sup>3)</sup>。われわれはマウスの急性肝障害モデルおよびラットの肝線維化・肝硬変モデルにおいて、血管内皮前駆細胞を経静脈的に投与することで、肝内の血管形成の促進と血管内皮前駆細胞の持つ各種増殖因子などにより肝再生の促進、予後の改善、線維化の抑制、門脈血行動態の改善が認められたことを明らかにした<sup>4-6)</sup>。

血管内皮前駆細胞移植による肝硬変症治療の有効性が動物実験レベルで明らかにされたことより、われわれはヒト肝硬変患者を対象とし、患者自身の末梢血から採取し、血管内皮前駆細胞を多く含む単核球細胞を投与することで肝機能、予後の改善がみられるか否かを明らかにするとともに、有効性と安全性について検討した。肝硬変症の治療に血管内皮前駆細胞を用いたとの報告は国内外ともに皆無で全く新しい治療法と思われる。さらに、この細胞療法は患者本人の細胞を末梢血

\*<sup>1)</sup> 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門、  
久留米大学先端癌治療研究センター

\*<sup>2)</sup> 久留米大学医学部内科学講座血液内科部門



から採取するため非侵襲的、安全で倫理的にも問題なく他の疾患にも応用可能な治療法である。

## 2 方法

本研究のプロトコールを示す。

(1)われわれが準備した治療適応基準(下記に詳細明記)を満たし、この治療法についての承諾を得られた患者に対し、治療前検査を行う。

[治療適応基準]

①非代償性肝硬変症患者、②同意取得時の年齢が20歳以上、75歳以下の患者(性別不問)、③血清アルブミン濃度が3.0 g/dL未満の患者、④食道・胃静脈瘤や腹水、浮腫の合併の有無は問わない、⑤肝移植治療を望まない患者、⑥6カ月以上の生存が期待できる患者。

(2)入院後、5日間連続してG-CSF製剤を投与する。

(3)G-CSF製剤投与開始4日目に、末梢血単核球細胞を採取する。採取は2日間連続して行うが、1回で有核細胞数 $1 \times 10^{11}$ 個に達していれば採取は1日で終了とする。

(4)G-CSF製剤投与開始5日目に、採取したすべての末梢血単核球細胞を経静脈的に輸注する。

(5)細胞移植後1週間は副作用や合併症を生じないかどうか慎重に経過観察を行い、問題ないことが確認できたら、入院14日目に退院とし、その後は外来にて経過観察を続ける。

(6)外来経過観察は移植後2, 4, 8, 12, 24週間まで経過観察(採血、腹部超音波検査、腹部造影CT検査など)を行う。

(7)移植後24週以上経過したのち、肝機能の低下が認められ、さらに患者の同意を得ることができた患者に対しては、再度細胞移植治療を行う。

## 3 結果

本研究課題の臨床研究は、2006年7月久留米大学倫理委員会による審査・承認を受け、2006年9月より開始し、2007年10月までに3症例(HCV:2例、アルコール:1例)を経験した。

(1)現時点で治療後に合併症が生じた症例は1例あり、本治療との因果関係は不明であるが肝癌

が発生した。

(2)現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされるChild-Pughスコアの改善傾向、MELDスコアの改善傾向を示した。

(3)現時点では統計学的な有意差はないものの、血清アルブミン値やプロトロンビン時間の上昇傾向を示した。

(4)現時点では統計学的な有意差はないものの、肝線維化の血清学的マーカーであるヒアルロン酸値、IV型コラーゲン値、プロコラーゲン3ペプチド(P-3-P)値の低下傾向を示した。腹部超音波検査にて、門脈血流量の明らかな増加を認めた。

(5)腹水を認めた患者に対しては、腹水量の低下、内服利尿剤の減量を可能にした。

## 4 考察

循環器領域においては、近年この血管内皮前駆細胞に関連する実験の知見も集積されており<sup>7,8)</sup>、その治療応用の有用性が示唆されている。実際、冠動脈疾患や下肢虚血疾患を含む重症虚血性疾患患者に対して、自己血管内皮前駆細胞を虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床応用がすでに開始され、良好な成績が報告されつつある。肝疾患領域では血管内皮前駆細胞を一部含むであろう骨髄細胞を用いた報告がある。坂井田らは、肝硬変症動物モデルに対し骨髄細胞を投与したところ、投与された肝臓では無処理対照群と比較し肝線維化が抑制されたと報告し<sup>9)</sup>、そのヒトへの臨床応用の報告も症例数は少ないが報告されている<sup>10)</sup>。われわれは以前の研究において血管内皮前駆細胞は血管を形成するばかりでなく、さまざまな増殖因子を産生することを明らかにした。本研究における独創的な点は、血管内皮前駆細胞の有するさまざまな増殖因子により肝硬変における肝細胞の再生のみならず、肝臓を構成するその他の細胞のバランスの取れた再生を目指した点である。本研究により、患者自身の末梢血から採取した単核球細胞を非代償性肝硬変症患者に移植することで患者の予後が改善できれば、極端なドナー不足や高額な医療費のため肝移植を受けることのできない患者を救済する治療法となることが期待され、社

会的貢献度も大きいものと推測される。

## 5 結語

先に示したように、本治療との因果関係は不明であるが、現時点で治療後に肝癌が1例発生した。今後は症例数を重ねていき、治療の有効性を示すとともに、安全性についても今まで以上に慎重に経過観察を続け確認したい。もちろん、その症例数を重ねていく中で、より効率の良い治療法に向けての基礎研究も続けていきたい。特に、投与経路については現在行われている末梢血からの全身投与ではなく肝臓近くへの投与、すなわち肝動注投与あるいは門脈投与を検討したく考えている。

## 文献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999
- 2) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B et al : Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) : mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108 : 2212-2218, 2003
- 3) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 4) Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M et al : Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 133 : 91-107, 2007
- 5) Taniguchi E, Kin M, Torimura T et al : Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 130 : 521-531, 2006
- 6) Ueno T, Nakamura T, Torimura T et al : Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol* 39 : 16-21, 2006
- 7) Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al : Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 3422-3427, 2000
- 8) Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K et al : CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 113 : 1311-1325, 2006
- 9) 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
- 10) Terai S, Ishikawa T, Omori K et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24 : 2292-2298, 2006

\*

\*

\*

**【佐々木(座長)】**ありがとうございました。最初に確認したいのですが、先生の入られた細胞数が大体 $10^{10}$ 個ですか。それは末梢の単核球の分画という形で入れられているのですか。

**【中村】**はい。そうです。

**【佐々木】**先生が『Gastroenterology』に出されていた論文では、EPCが106個ぐらいのオーダーだったと思います。今回の実験では計算上はEPCはどれくらい入っているのでしょうか。

**【中村】**EPCが単核球分画に含まれているのはわかりますが、『Gastroenterology』の論文ではそれを培養して増殖させています。実際にどれくらいになるのかというのが計算できませんので、難しくて比較ができません。

**【佐々木】**量的には、動物実験と同等かどうかは今のところはわからないという理解でよろしいですか。

**【中村】**はい。

**【金井(東京医科歯科大学・消化器内科)】**この治療というのは自己血液肝細胞移植などと違って化学療法をやるわけでもないし、放射線療法もやらない。G-CSFでEPCをmobilizationさせて、それをin vitroでenrichさせて戻せば治るというシステムだと思いますが、何故、G-CSFだけで治らないのかというのが不思議だと思いますがいかがでしょうか。

**【中村】**2006年の『Journal of Hepatology』に掲載されたイタリアのグループでは、G-CSF単独で8例やって、4例改善したというデータは実際にあります。われわれもG-CSFを使って、それだけでいいのではないかと考えたことがあります。apheresis前後でCD34陽性細胞数をカウントしてみたのですが、その前後において数に変化はなく、つまりapheresisした後は減っておらず末梢血中レベルが維持されているという結果でした。われわれは二日連続してapheresisしましたので、その分だけG-CSF単独より多く移植できたという位置付けで、単独以上の効果がでているのではないかと期待して現在進行中です。

**【金井】**もう1つ、先生はこの細胞を治療に使われていますが、ひょっとして肝硬変の患者さんにすでに

EPCを作るstem cellが骨髄で少なくなっているから、G-CSFのようなmobilizationを促さなくてはいけないという仮説はあるのですか。

**【中村】**仮説ではなくて実際にあります。CD34陽性細胞数をマーカーとしてですが、健康人よりも慢性肝炎、肝硬変と肝の線維化が進むにつれてCD34陽性細胞数の末梢血レベルが減っていますし、IFN治療でそのレベルが回復するという報告もありますので、G-CSFを投与したほうがいいだろうというのは容易に想像つくと思います。

**【白木(三重大学・消化器内科)】**大変興味深い発表ありがとうございました。2点うかがいたいのですが、1点はG-CSF使うときに、臨床で使うとき脾破裂ということがあって、勇気があるので使いにくいのですが、これに対する対策、もしruptureしたら致命的になると思います。何か基準とか、こういうときには脾摘にいくとかそういう基準があったのでしょうか。

**【中村】**基準は特にないです。もともと大きい方が多いですね。1例目の方はアルコール性肝硬変でしたので、脾臓径は8cmぐらいでした。1例目は容易にapheresisできましたが、2例目の方は脾臓径13.5cmの患者でした。最大6.8%腫大し、一番大きくなったときは15cmでした。脾臓径13.5cmの患者までは私たち自身確認しましたが、それ以上の脾臓径の患者はまだやっていないのでわかりませんが、気をつけなくてはいけないと思います。脾破裂したという報告例が世界ではありますが、随外造血として脾臓内で異常増殖をしたときに破裂するという現象があるようです。G-CSF投与後でも、apheresis中でも起きているという報告もあります。左の背部痛とか、咳をしてその腹圧で破裂したという報告もあるようですので、そういうことを念頭に置いて厳重に観察していかななくてはいけないと思います。われわれは毎日腹部エコーで脾臓径は測っていますのでG-CSF投与にて腫大していつているかどうかは確認しながら治療を行っています。

**【白木】**非常にそれは怖いですが、痛みが強かったりとかいうときに脾摘にいくのでしょうか。インフォームドコンセントはどのようにされておられますか。

**【中村】**脾破裂の可能性も含めて患者さんには十分に説明しています。外科とも連携をとり、G-CSF投与

期間中は待機していただいています。一番簡便なのはエコー検査ですので、脾表面をみて出血があるかどうか、また、採血にてヘモグロビンが下がっていないかどうかという血清学的な評価もします。その次に単純腹部CT検査をします。保存的にみて治ったという報告もありますが、脾摘するか、あるいはPSEにするかについては検討する必要があると思います。

【白木】もう1点ですが、投与方法ですが欧米では門脈投与、動脈投与が非常に有効であったという報告が多いと思います。この辺は今後検討価値はあるのでしょうか。

【中村】投与経路は安全性、簡便ということで全身投与をしているわけですが、将来的には肝動注、あるいは開腹下の門注はを考慮しておりますし、そちらのほうがより肝臓に多く入るといって、*in vivo* レベルのデータはあります。将来的には検討したいと思っています。

【新津(札幌医科大学・分子標的探索講座)】この仕事の一つ心配なのは癌が隠れていたときの血管新生促進だと思っています。血管新生因子、骨髄由来するわけですが、特に肝硬変のケースではそういうことを考慮しなくてはいけません。ラットモデルでは肝癌が普通ありませんので、ヒトの場合にどうそこをクリアするかですね。

【中村】そうですね。肝硬変がベースである以上、肝癌が発生する可能性は十分あります。しかし、何をもちって肝癌がないというのは非常に難しいと思います。われわれは腹部エコー、腹部造影CT・MRI、血清学的な腫瘍マーカーに関してすべて陰性であることを確認して移植しています。唯一やっていない検査は血管造影ですが、血管造影をやることによってどれだけわかるか、detectされない肝癌もあります。そこはどうしていいかわかりませんが、今のところはしていません。

【新津】先生のところのIRBでそういうディスカッションはどんな形だったのか、実務的なことをお聞きしたい。

【中村】先行して久留米大学循環器内科が下肢の虚血性疾患に対する細胞移植療法をやっていたのでやや楽でした。循環器領域には癌がないですので発展の

心配はないのですが、われわれの領域では癌がつかまっています。何をもちってないかという、癌を否定するのは非常に難しいと思います。IRBであったのは、あえていうなら、今まで肝臓を含めて細胞移植療法をやった世界中の論文で、1例も癌が発生したという報告がないことを加味してくれたところもあります。

【新津】癌がすぐ出るのではなくて、促進ですね。

【中村】画像的にはなくても、見えない癌がある可能性は十分あります。癌をヌードマウスの皮下に植えて腫瘍を作ったのちにEPCを入れますと癌の血管に標識されることを確認していますので癌の血管新生に関与していますのでそこは重要なところです。

【西村(慶応義塾大学・消化器内科)】1点目ですが、移植前後で1例脾臓の容積が大きくなったものがあったということで、これについての機序についてはどのようにお考えになられていますか。

【中村】機序はG-CSF製剤投与で脾破裂という報告がある以上、脾臓径が大きくなることはあると思います。

【西村】G-CSFによる影響によるものですか。

【中村】そう考えています。

【西村】もう1点はルーチンで脾動脈塞栓術や脾摘と、今回提示された治療法を組み合わせると、脾摘や脾動脈塞栓術によって肝機能が改善するという報告がありますので相乗的な効果が期待できると思いますがその点についてのアプローチというのはどうでしょうか。

【中村】それも考えています。何cm以上から脾臓が大きいのかというのも問題ではあります。全身に投与すると肺と脾臓にはトラップされますので、脾臓があまりに大きすぎると脾臓にばかり入ってしまって肝臓に入らないという可能性もゼロではないですので、脾臓は小さいに越したことはないです。そういう意味では先生のいうようにPSE、あるいは脾摘術をやってから移植した方がより効果的である可能性は高いと考えます。

【西村】最後ですが、EPCがTGF $\beta$ の産生を抑えているというデータは具体的にはどのような機序によるものでしょうか。

【中村】ダイレクトな作用ではなく、おそらくEPC自身がHGFといったgrowth factorを出していますの

で、それとのバランスでTGF  $\beta$  の産生を抑えているのだらうと思っています。

**【小俣(東京大学・消化器内科)】**臨床的な効果の判定のいくつかですが、先ほどから脾臓の話がでていますが、1例がアルコール性で、2例がHCVですね。昔から学生に、アルコール性の場合には脾臓が小さい、小さいから破裂しないということはないですが、門脈圧亢進症の中でアルコールの場合は脾臓が極めて小さい、というのは臨床では常識的なことです。血流が改善したというのは効果の判定に使われていますが、hyperdynamic stateになっただけかもしれず、それよりもむしろアルブミンとかTotal proteinを改善したとなると理解ができます。Total bilirubinの動きが1.69あたりがもし仮に1.2になって、1.0になって、0.8、になったら素晴らしいと思います。臨床的な経験があるので、注意深くみていけば効果あったかどうかは10～20例もやらなくてもわかると思います。また、ポートを植えている人が大勢いますね。今までの遺伝子治療にしても、細胞療法にしてもそうですが結局効率の問題ですね。先ほどのdendritic cellの問題も同じです。そこが結局超えられないのだと思います。それを動脈に入れた場合はある程度克服できますか？門脈のほうが望ましいでしょうけど。

**【中村】**門脈は内科的には難しい。

**【小俣】**難しいし、すでに、門脈が逆流している。

**【中村】**そうですね。それもあります。

**【小俣】**シャントがあつて入らないですね。動脈に入れたらどうですか。

**【中村】**非常にいいルートだと思います。今後検討したいと思っています。

**【小俣】**肝臓癌の諸問題も、血小板の上がりは、TPOのリガンドの話がでてきて血小板が下がるのは怖くない。進行癌はネクサバルが出てくる。肝臓で残ったのは不全だけです。少し新しい展開がでるのかと思って聞いていました。

**【中村】**血小板の増加に関しては副産物でよくわからないのですが、山口大学でも報告があるように、実際増えるのです。3例とも増える傾向にありました。Total bilirubinに関しては横ばいあるいは、下がる傾向。3例目の方は5を少し超えたところまで一時的に上がりましたが、今は4.1まで下がっています。結構効果はあるのかなと思っています。

**【佐々木】**いろいろ評価法の問題。副作用の問題、特に脾臓の破裂とか、肝発癌とかいろいろあるかと思いますが、症例をこれから集めてご検討ください。ありがとうございました。

\*

\*

\*

# 7) 非代償性肝硬変患者に対する 自己末梢血単核球細胞移植再生療法

久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門

中村 徹

## はじめに

肝硬変症の進展に伴う肝不全による本邦での死亡者数は約 1 万人にのぼる。肝硬変症患者は年率約 7% で肝細胞癌を発症し、肝癌による年間死亡者数は年々増加して 3 万人を超えている。肝硬変に伴う肝不全の治療法として肝移植以外に有効な治療法がないのが現状だが、肝移植は絶対的なドナー不足の状態であり、それに代わる新規治療法の開発が重要である。

われわれは昨年と一昨年に急性肝不全モデルあるいは肝硬変モデルを用いて、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) を投与することにより、死亡率が改善したり、肝硬変での線維化が改善したり、再生が惹起されることを報告してきた。

EPC は骨髄中の hematopoietic stem cell あるいは vascular stem cell の共通の幹細胞である hemangioblast からなることがわかっており、また EPC は末梢血中の単核球成分の一部としても循

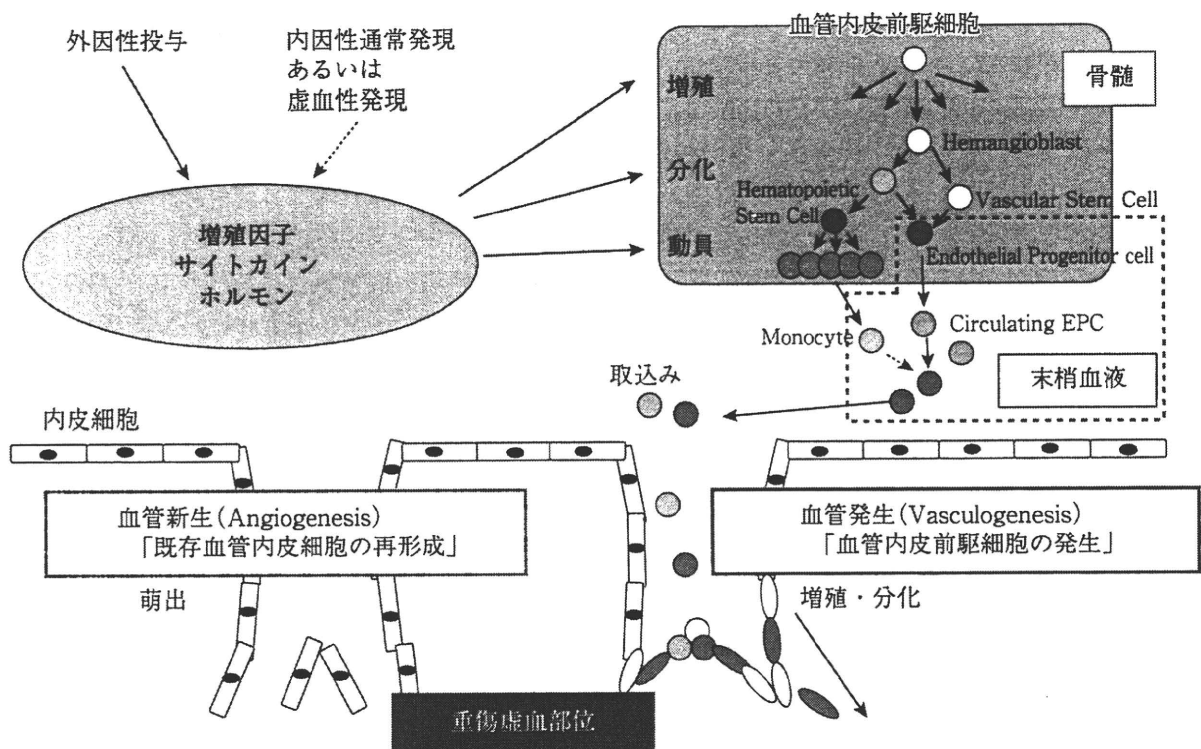


図1 血管内皮細胞前駆細胞および血管新生と血管発生の機序

環していることが1997年、浅原らによって発見された。肝硬変を重症虚血性疾患と位置づけた場合、これまで考えられてきた既存の隣接血管が萌出して再生する血管新生とは異なり、胎児期のみが存在すると言われていた血管発生が成人でも起こっていることがわかり、EPCを含めた諸因子が虚血部位に集積し改善する、というメカニズムが肝臓でも想定可能ではないかということが、われわれの研究のスタートであった(図1)。

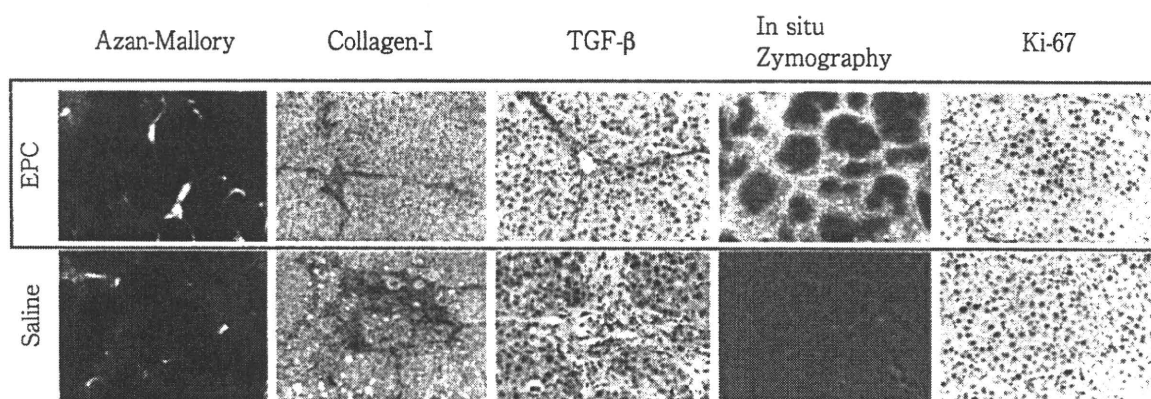
## 1. 肝障害モデルラットでのEPC移植実験

ラットに移植したEPCを免疫組織学的染色法で追跡すると、12時間くらいで血管内腔面に生着し、24時間後にはCD31陽性を示す血管内皮細胞となる。そのまま、そこに留まるものもあるが、3日あるいは1週間経つと線維中隔まで移動し、門脈周囲や線維中隔に沿って生着することがわかった。

移植したEPCは将来何に分化するのかという点だが、もともと前駆細胞としてある程度分化させて移植していることから、EPC自身はCD31陽性であり、肝星細胞マーカーの $\alpha$ -SMAや胆管系マーカーのCK19は陰性であり、アルブミンも陰性を示した。

また、四塩化炭素( $CCl_4$ )で肝障害を起こさせたラットへのEPC移植では、アザン染色で線維化の抑制が認められ、コラーゲン-I、TGF- $\beta$ の発現低下を認めた。一方、in situ ZymographyではMMPの高発現が見られたことから、それによって線維中隔が溶け、肝再生が起こっている(Ki67染色に基づく)ものと考えられ、血液生化学検査およびタイプIVコラーゲンの測定結果もそれを裏付けていた(図2)。

さらに、EPC移植 $CCl_4$ 肝障害ラットで門脈圧と肝血流量を測定すると対照群に比し、門脈圧は有意に低下し、肝血流量は有意に増加していた。また、生存率は単回投与でもある程度は改善するが、



Serum hepatic enzyme and type IV collagen in  $CCl_4$  induced liver.

	Type-IV collagen (ng/mL)	AST (U/mL)	ALT (U/mL)	Total Bilirubin (mg/dL)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)
Intact (Normal)	-	82 ± 4.1	45 ± 6.0	0.07 ± 0.05	4.9 ± 0.14	2.4 ± 0.05
$CCl_4$ 6W	24.6 ± 7.0	268.5 ± 54.6	100 ± 7.8	0.66 ± 0.26	4.82 ± 0.33	2.0 ± 0.2
<b><math>CCl_4</math> 10W + EPC</b>	<b>17.1 ± 6.4*</b>	<b>191.5 ± 21.6</b>	<b>75.9 ± 6.3*</b>	<b>0.2 ± 0.03*</b>	<b>4.76 ± 0.21*</b>	<b>1.75 ± 0.09*</b>
$CCl_4$ 10W + Saline	50.7 ± 13.1	299.1 ± 54.0	109.8 ± 10.0	0.83 ± 0.22	3.82 ± 0.29	1.37 ± 0.10

\*  $p < 0.05$  vs.  $CCl_4$  10W + Saline.

(Gastroenterology 2007; 133: 91-107)

図2 ラットEPC投与による抗線維化、肝再生促進効果

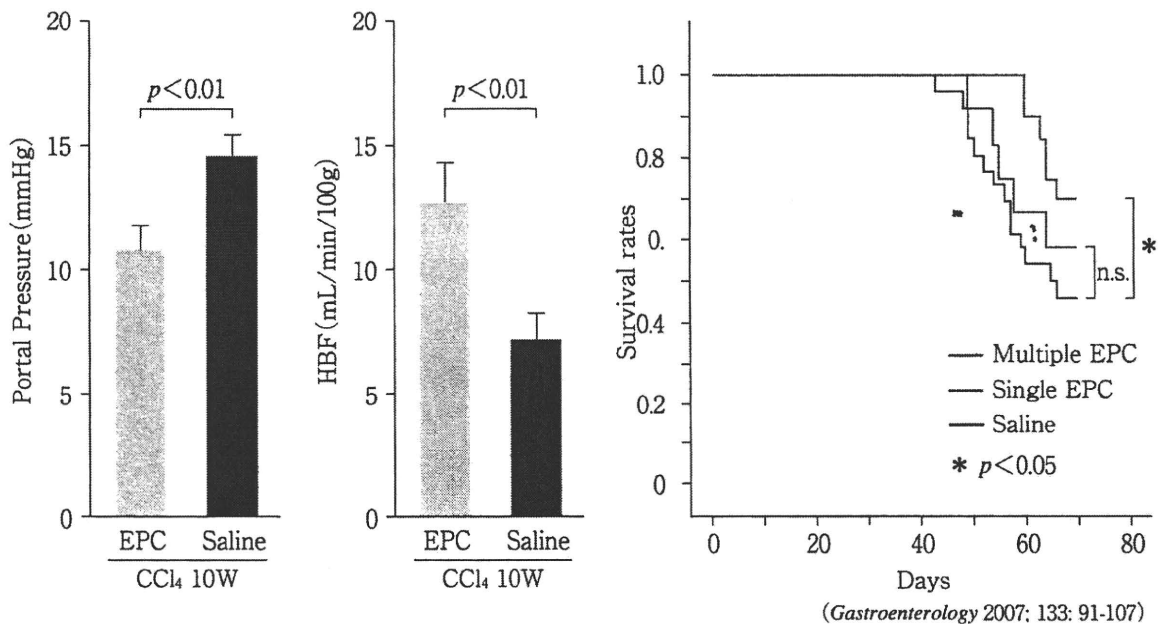


図3 EPC移植による肝血流の改善と生存率向上

頻回投与で有意な改善を示した(図3)。そこで、この方法が臨床応用できないかと考え、2006年9月から自己末梢血単核球細胞移植による肝臓再生療法を開始した。

## 2. 非代償性肝硬変例における自己末梢血単核球細胞移植の検討

対象の選択基準は非代償性肝硬変患者で、年齢は20歳以上75歳以下、血清アルブミン値3.0g/dL未満とした。食道・胃静脈瘤や腹水、浮腫の合併は問わず、肝移植を望まない患者を選択している。

除外規定としては、肝不全が強い症例、PTが30%未満または総ビリルビンが5.0mg/dL以上、また、腎機能低下例や肝性脳症発症例、そのほか肝細胞癌を含めた癌合併例、心肺機能に問題がある例などである。アルコール性肝障害については、最低6か月以上の禁酒期間があれば可としている。

ヒトを対象とした肝疾患に対する幹細胞移植のトライアルは世界でこれまでに5件報告されており、その中にはEPCマーカーのひとつであるCD34あるいはCD133陽性細胞を用いた報告やG-CSF製剤を用いた臨床試験報告が含まれる。

われわれのプロトコルだが、G-CSF製剤を連日5日間投与し、最後の2日間に末梢血単核球細胞を採取する。それをG-CSF製剤投与開始5日目に静脈から全身投与した。治療後、特に問題がなければ、その後は2週間または1か月毎の外来通院で6か月間追跡した。評価項目は身体所見(体重、腹水、浮腫の有無など)、血液学的検査、血液生化学的検査、画像診断検査、肝静脈圧較差測定などである。

先行して臨床研究が開始されている山口大学の方法との違いであるが、山口大学では全身麻酔を行い細胞を採取するため血小板数を5万以上と規定しているのに対し、われわれは制限を設けていない。総ビリルビン値は山口大学では3.0mg/dL以下であるのに対し、われわれは5.0mg/dL以下としている。その他に、われわれは血清アルブミン値3.0g/dL未満、PT値30%以上、クレアチニン値2.0mg/dL以下としている。