

20122703/A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝硬変に対する細胞治療法の
臨床的確立とそのメカニズムの解明

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成25（2013）年 3 月

目 次

I. 総括報告書	1
肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明	
坂井田 功	
II. 分担研究年度終了報告	6
1. C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討	
柳瀬 幹雄	
2. A B M i 療法の長期予後の検討およびC型肝炎に対する多施設対照化比較試験への取り組み	
上野 義之	
3. 肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明	
宮島 敦	
4. C T G F による肝繊維化進展機構の解析	
竹原 徹郎	
5. 質量顕微鏡法による再生肝リン脂質動態の網羅的解析	
仁科 博史	
6. N A S H の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義	
小川 佳宏	
7. 骨髄造血幹細胞ならびに間葉系幹細胞の肝繊維化病態への関わり	
稲垣 豊	
8. 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	
大河内仁志	
9. 非アルコール性脂肪肝炎モデルを用いた脂肪組織由来間質細胞の肝再生修復療法の検討	
酒井 佳夫	
10. ヘパリン添加された血漿・末梢血単核球中のH C V R N A 定量	
梅村 武司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究代表者氏名：坂井田 功

所属機関：山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 職名：教授

研究要旨：

＜臨床研究＞我々は C 型・B 型肝炎ウイルス、アルコールに起因する「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi 療法)」を世界に先駆け開発し、欧文報告してきた。今までの知見よりこの治療法の本質は、肝線維化改善と肝臓組織幹細胞活性化による**肝機能改善効果**をもたらす**抗線維化・再生修復療法**と考えられ、その安全性・有効性は、国内外の追試でも確認報告された。さらに 2011 年 12 月 6 日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を得た「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する ABMi 療法」の「**ランダム化比較試験**」を多施設で実施し、本研究でさらにエビデンスレベルの高い有効性を明らかにする。また、「B 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する ABMi 療法」の準備を行い実施していく。

＜基礎研究＞この治療法の作用機序は、これまでの基礎研究により、骨髄細胞中の間葉系細胞の作用だけでなく、マクロファージ系細胞の抗線維化作用の可能性も示唆された。そこで、マクロファージの抗線維化メカニズムの解明や、脂肪肝炎モデルマウスの解析を推進し、非アルコール性脂肪肝炎に起因する肝硬変症に ABMi 療法を適応拡大することを目指す。また、細胞ソースとしての脂肪組織由来間葉系細胞の可能性も継続追求する。

分担研究者(所属機関・職名)

柳瀬 幹雄(独立行政法人国立国際医療研究センター病院・医長)

上野 義之(山形大学医学部消化器内科学・教授)

宮島 篤(東京大学分子細胞生物学研究所・教授)

竹原 徹郎(大阪大学消化器内科学・教授)

仁科 博史(東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授)

小川 佳宏(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授)

稲垣 豊(東海大学医学部再生医療科学・教授)

大河内仁志(独立行政法人国立国際医療研究センター細胞組織再生医学研究部・部長)

寺井 崇二(山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・准教授)

酒井 佳夫(金沢大学医薬保健研究域・准教授)

梅村 武司(信州大学医学部附属病院消化器内科・准教授)

高見 太郎(山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学・講師)

A. 研究目的

肝硬変患者に対する肝臓再生療法として、患者自身から自己骨髄細胞液を 400ml 採取して洗浄後に骨髄単核球分画を分離濃縮し、同じ患者に末梢静脈から再投与方法「**自己骨髄細胞投与療法(ABMi 療法:Autologous Bone Marrow cell infusion therapy)**」を世界に

先駆けて開発し、その臨床的安全性・有効性を報告した(Stem Cells. 2006;24:2292-8)。さらに ABMi療法の技術移転を行った山形大学及び韓国延世大学でも同様の安全性・有効性が改めて確認、報告された(Cell Transplant. 2010;19:1237-46、Stem Cells Dev. 2011;20:1503-10)。また国立国際医療研究センターでは、HIV 合併 C 型肝硬変症に対する ABMi療法を、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認後の 2011 年 3 月より開始し、現在までに 4 例実施している。この ABMi療法では、骨髄単核球分画の細胞が肝硬変症の線維を溶解し、肝組織幹細胞などを活性化することで肝機能が修復・改善すると考えられている(特許第 4752058 号「肝再生用骨髄細胞画分」、登録日:平成 23 年 6 月 3 日)。このように ABMi療方は臨床的に安全性が確認され、有効性が証明されているが、保険適応されるには質の高いエビデンスを明らかにする必要がある。そこでまず、「**C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する ABMi療法のランダム化比較試験**」を計画した。本計画はすでに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」への承認申請を行い、2011 年 12 月 6 日にその承認を得ている。本ランダム化比較試験を山口大学で先行開始し、他施設(国立国際医療研究センター及び山形大学)でもヒト幹指針への申請・承認後に同様に実施する。また基礎研究では、肝線維化マウスモデルや脂肪肝炎(NASH)モデルマウスの解析から、骨髄または脂肪組織由来細胞の抗線維化メカニズムや NASH 病態を解明し、これらモデルマウスへの ABMi療法の治療効果を検討することで、**B 型肝炎ウイルスや非アルコール性脂肪肝炎に起因する肝硬変症への ABMi療法の適応拡大**を目指す。さらに間葉系細胞だけでなくマク

ロファージ系細胞の肝硬変に対する治療効果がマウス基礎研究から示唆されたため、**培養マクロファージ系細胞投与による新規肝臓再生修復療法の開発**のための基礎研究を行う。

B. 研究方法

(1)「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」の推進

「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を先進医療 B として山口大で実施するため、承認申請する。

(2)多施設共同研究のため、国立国際医療研究センターおよび山形大学内への支援

ランダム化比較試験は、山口大で先行実施するが、その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する予定である。そのため、これら実施予定施設の学内倫理委員会の整備や幹細胞研究申請準備を行う。

(3)MMP9 発現解析のための

MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

骨髄由来細胞による肝線維化改善メカニズムを解明するため、MMP9 発現に注目した。そこで初年度は、MMP9 プロモーター下に標識蛋白 LacZ/DeRed を発現する遺伝子改変マウスを作出する。

C. 研究結果

(1)「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」の推進

ABMi療法をより早く多くの肝硬変症患者に提供するためには、質の高いエビデンスを創出することが不可欠である。そこで研究代表者

坂井田の統括のもと、「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を山口大で実施する(その後、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施する)。なお対象は、「90 日以上離れた 2 点において Child-Pugh スコアが 7 点 (Child-Pugh B) 以上の C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変の状態で現行の内科的な治療法では改善が見込めない症例」で、全 34 例 (ABMi 群 17 例、標準的治療群 17 例) であり、ABMi 群は細胞投与後 (標準的治療群は登録後) 24 週の Child-Pugh スコアが 1 点以上改善する割合を主要評価項目としている。なお平成 25 年度からは、先端医療振興財団の西村勉が新規分担研究者となりデータ管理等を行う。このランダム化比較試験は、2012 年 10 月の先進医療との一本化後に、山口大から申請書類を提出し、「条件付き適」との評価であり、現在、厚生労働省と調整中である。

(2)多施設共同研究のため、国立国際医療研究センターおよび山形大学内への支援

国立国際医療研究センターでは当該施設の倫理委員会の承認を受け、厚生労働省でヒト幹倫理審査中である。さらに山形大でも学内倫理委員会の整備や幹細胞研究申請準備に着手した。

(3)MMP9 発現解析のための

MMP9-LacZ/DeRed Tg マウス作出

これまでのマウス GFP/CCl₄ モデル研究で、投与と骨髄細胞が MMP9 を発現し肝線維化を抑制することを確認している。GFP/CCl₄ モデルの MMP9 発現細胞を同定し MMP9 発現メカニズムを解明するため、すでに MMP9 プロモーター下に標識蛋白 LacZ/DeRed を発現する遺伝子改変マウスを作出した。

D. 考 察

平成 25 年度からは、研究代表者坂井田の統括のもと、山口大で先行して「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」を先進医療 B として開始する予定であり、その後は、国立国際医療研究センターや山形大を含む多施設で実施していく。これらの実施により、質の高いエビデンスを創出し、ABMi 療法の普及に努めていく。その一方、基礎研究では、骨髄由来細胞や脂肪組織由来細胞による肝線維化改善メカニズムの解明を進める。

E. 結 論

平成 25 年度から「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」のランダム化比較試験を山口大で先行して実施する。また、マウス基礎研究では MMP9 発現メカニズムの解析を継続する。

研究発表

1. 論文発表

1. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discovery Medicine*. 2012; 14(74):7-12.
2. Terai S, Tanimoto H, Maeda M, Zaitzu J, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, Mizunaga Y, Matsumoto T, Urata Y, Marumoto Y, Hidaka I, Ishikawa T, Yokoyama Y, Aoyama K, Tsuchiya M, Takami T, Omori K, Yamamoto N, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Okita K, Sakaida I. Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and

perspective for future stem cell therapy. J Gastroenterol. 2012; 47(5):491-7.

3. Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. Curr Opin Gastroenterol. 2012; 28(3):203-8.

4. Maeda M, Takami T, Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 2012; 27(Suppl 2):104-111.

5. Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T, Takami T, Yamamoto N, Watanabe S, Sakaida I. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. Cell Tissue Res. 2013; 351(3): 487-95.

6. Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy to repair and regenerate liver. Seikagaku. 2012 Aug;84(8):707-11.

7. Oishi T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I. Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model. Biochem Biophys Res Commun. 2012;422(1):22-7.

8. Mizunaga Y, Terai S, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Nishina H, Fujita Y, Shinoda K, Hamamoto Y, Sakaida I. Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-1 β are important cytokine in repair of the cirrhotic liver

after bone marrow cell infusion -comparison of humans and model mice- Cell Transplant. 2012;21(11):2363-75.

9. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田 功 肝臓の再生治療、Annual Review 消化器 2012、中外医学社、p192-197.

10. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田 功 肝再生医学のトランスレーショナル・リサーチ、肝疾患レビュー2012-2013、日本メディカルセンター、p69-75.

11. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田 功 肝硬変診療のトピックス 自己骨髄細胞を用いた肝修復再生療法の現状、medicina 2012;49(7):1238-1239.

2. 学会発表

1. Takami T, Terai S, Maeda M, Hirose Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Bone marrow cell infusions suppress hepatocarcinogenesis in *N*-nitrosodiethylamine-and carbon tetrachloride-induced hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. 10th ISSCR Annual meeting. 2012年6月13日～6月16日, Yokohama, Kanagawa, Japan (パシフィコ横浜)

2. Takami T, Terai S, Maeda M, Sakaida I. Bone marrow cell infusions suppress hepatocarcinogenesis in *N*-nitrosodiethylamine-and carbon tetrachloride-induced hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. FASEB meeting. 2012年7月29日～8月3日, Snowmass village, CO, USA.

3. Terai S. Invited lecture “Cell therapy using bone marrow cell for liver

fibrosis.” The 29th International Society for Heart Research. 2012年10月26日, Fukuoka, Japan.

4. Terai S. Invited lecture “Current status and future perspective for cell therapy using bone marrow cell for liver cirrhosis patient-Basic study to clinical study.” The NIH seminar. 2012年11月13日, Bethesda, USA.

5. Terai S., Takami T., Sakaida I. Invited lecture “Development of cell therapy for cirrhosis.” The 20th Yonsei International Gastroenterology Symposium. 2012年11月, Seoul, Korea.

6. Terai S., Takami T., Sakaida I. Development of new cell therapy for fibrosis. The 8th JSGE & AGA Joint Meeting: Liver Fibrosis and Cirrhosis, Pathogenesis and Treatment. 2013年3月22日, Kagoshima, Japan.

7. Terai S. Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver cirrhosis patient. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Agenda, Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. 2013年2月28日, Bethesda, USA.

8. 寺井崇二. 肝硬変症患者に対する細胞療法、現状と今後の課題. Bio Japan 2012 現実化しつつある細胞治療・遺伝子治療. 2012年10月11日, 神奈川県横浜市

9. 高見太郎、寺井崇二、前田雅喜、廣瀬恵一、藤澤浩一、山本直樹、坂井田 功. 肝硬変に対する自己骨髄細胞投与 (ABMi) 療法における肝発癌への影響の基礎的検討. 第

11回日本再生医療学会総会. 2012年6月12日～6月14日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

10. 高見太郎、寺井崇二、坂井田 功. 骨髄細胞投与による酸化ストレス制御を介した肝発癌抑制メカニズムの解明. 第20回 JDDW2012. 2012年10月09日～10月12日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

11. 高見太郎、寺井崇二、坂井田 功. 骨髄細胞投与による肝発癌抑制メカニズムの解析. 第19回肝細胞研究会, 2012年6月29日～6月30日, 札幌医科大学 (北海道札幌市)

12. 坂井田 功. 肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と展望. 第12回日本再生医療学会総会. 2013年3月21日～3月23日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

13. 村田泰彦、高見太郎、寺井崇二、坂井田 功. ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子の遺伝子発現解析. 第12回日本再生医療学会総会. 2013年3月21日～3月23日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

14. 寺井崇二. 骨髄由来細胞を用いた肝硬変症治療の現状と今後の展開. 第118回日本解剖学会総会. 2013年3月28日, サンプーホール高松・かがわ国際会議場 (香川県高松市)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する
自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討」

研究分担者氏名：柳瀬 幹雄

所属機関：独立行政法人国立国際医療研究センター病院 消化器内科 職名：医長

研究要旨：

【目的】C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性の検討を目的とする。

【方法】主研究機関（山口大学）との共同研究として行う。肝硬変を有する 20 歳から 75 歳の肝硬変患者のうち、現行の内科的な治療法では改善が見込めない C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変症に限定した症例に対し、本研究への参加に同意が得られ、除外基準のいずれにも該当しない症例をランダムに、細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。

細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。標準的治療群では、登録から 24 週後まで標準的治療を実施する。

【成績】当研究について院内倫理委員会承認後、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に申請を提出した。また自己骨髄細胞採取時の細胞調製室につき、その稼働に向けた調整を進めた。

【考案】本年度においては自己骨髄細胞投与療法開始に向けた手続きならびに体制整備を行った。

A. 研究目的

線維化の進展した慢性肝疾患に対する根本的治療法はいまだ確立されていない。肝移植にあずかる患者は一部に限られ、その侵襲性や医療経済的な問題は大きい。再生医療の一環として今回 C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性を検討する多施設共同研究の一施設として、当該研究費を用い取り組む。

B. 研究方法

肝硬変を有する 20 歳から 75 歳の肝硬変患者のうち、現行の内科的な治療法では改善が見込めない C 型肝炎ウイルスに起因する。

肝硬変症に限定した症例で、本研究への参加に同意が得られ、除外基準のいずれにも該当しない症例を登録する。

登録された症例をランダムに、細胞投与群、標準的治療群に割り付ける。

細胞投与群は、入院のうえ治療前評価と全身麻酔下での自己骨髄細胞採取・投与を行う。術後 1 週間は原則として入院下で厳重な観察を行い、以後定期的に経過を追跡する。規定された時期以外でも担当医が必要と認めた場

合は調査を行う。治療効果の判定は臨床所見、血液所見ならびに画像所見により行う。

標準的治療群では、登録から 24 週後まで標準的治療を実施する。

細胞投与治療を実施した場合には、投与後 24 週時までの安全性を確認する。

C. 研究結果

当研究について院内倫理委員会承認後、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に申請を提出した。また自己骨髄細胞採取時の細胞調製室につき、その稼働に向けた調整を進めた。院内肝疾患患者リストを整備し、研究開始に際する該当患者さんへの案内が遅滞なく行われるよう準備を行った。

D. 考 察

本年度においては自己骨髄細胞投与療法開始に向けた手続きならびに体制整備を行った。次年度実施を予定する。

E. 結 論

C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与療法開始に向けた体制整備を行った。

研究発表

1.論文発表

本研究に関する発表はなし。

2.学会発表

本研究に関する発表はなし。

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。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

「ABMi療法の長期予後の検討およびC型肝硬変に対する
多施設対照化比較試験への取り組み」

研究分担者：上野 義之

所属機関：山形大学医学部 消化器内科学 職名：教授

研究要旨：

【目的】当科ではアルコール性肝硬変患者に対する自己骨髄細胞投与（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法の有用性を報告してきたが、ABMi施行後の肝機能検査値の改善に及ぼす長期間の効果を明らかにする。また、C型肝硬変患者に対する多施設対照化比較試験に参加するため、当院の対象患者数調査を行い、ヒト幹細胞臨床研究の倫理指針に則るための研究組織を整備する。

【方法】1. 当科で先行研究としてABMi療法を施行した5例のアルコール性肝硬変患者について、72週間の肝機能検査値の変化について検討した。2. 当院におけるABMi療法の適応となるC型肝硬変患者数の調査を行った。3. ヒト幹細胞に関わる臨床研究申請のための当院倫理委員会の審査を受けた。

【成績】1. アルコール性肝硬変患者では、ABMi療法施行後、72週間の経過経過中、血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性の有意な改善の継続が認められた（ $p<0.05$ ）。これらの肝機能検査値の有意な変動は、対照群では先行研究における24週間の観察期間を通して認められなかった。2. 2006年より2011年までの5年間に、当院通院中のC型肝硬変患者でABMi療法の適応となる臨床研究の候補者は49名（男性26名、女性23名）であった。3. C型肝硬変患者に対する多施設対照化比較試験について、当院における倫理審査にて認可された。今後、厚生労働省への研究申請を行う予定である。

【考案】アルコール性肝硬変に対するABMi療法は、肝機能改善効果（血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性）が2年間の長期にわたり継続することが確認された。当院における、新年度からのC型肝硬変に対する本療法の臨床研究の準備を整えた。

共同研究者

齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科学 准教授

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学 助教

富田恭子 山形大学医学部消化器内科学 大学院生

A. 目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変患者の生命予後の改善のため喫緊の課題である。骨髄内には multipotent progenitor cell の存在が知られており、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法が、主にC型肝炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に

対して施行され、24週間の術後経過において Child-Pugh スコアや血清アルブミン値などの肝機能検査値全般の改善が報告されている（Terai S et al. Stem Cell 2006）。

私たちは、アルコール性肝硬変患者に対するABMi療法を、山口大学チームとともに当大学医学部附属病院で施行した。ABMi療法を施行されたアルコール性肝硬変5症例の症例対照研究では、24週間にわたり臨床データの

改善がみられることを報告した(Stem Cells Dev 2011; 20: 1503-1510)。肝炎ウイルス慢性持続感染のない、アルコール性肝硬変症では、本療法の肝機能改善効果がウイルス性肝疾患よりも期待出来るものと考え、72 週間(2 年間)の長期間にわたる肝機能検査値の変動を評価した。また、C 型肝硬変患者に対する多施設対照化比較試験に参加するため、研究予定表にしたがい、当院における臨床研究候補者数の調査、ヒト幹細胞に関わる臨床研究を行うための研究組織の整備を行った。

B. 方法

1. アルコール性肝硬変に対するABMi療法の肝機能改善に関する長期経過

当科では、ABMi療法施行前に6か月間以上の禁酒を確認できた6例(男性)のアルコール性肝硬変患者に対しABMi療法を施行した。肝生検にて肝硬変(F4)が確認され、かつ、総ビリルビン値 3.0 mg/dl 未満、血小板数 50,000/ μ l 以上、画像検査で肝細胞癌がなく、腹水や脳症がコントロールされ心肺機能良好で全身麻酔が可能な患者、を対象とした。自己骨髓細胞は、全身麻酔下で 400mlの骨髓液を採取し、洗浄後に静脈内投与を行った。平成 22 年度までに 6 例(男性)に施行した。ABMi療法施行後の 24 週間の経過観察中に飲酒により脱落した 1 例を除外し、5 例を解析対象とし、対照(コントロール)として、年齢、性別、血清アルブミン値、プロトロンビン活性、服薬内容、等の合致するアルコール性肝硬変 5 症例を用いた。その結果、肝機能検査値に及ぼす効果として、血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性について、ABMi療法施行群(5 例)では、有意な上昇が見られたのに対し、対照群では、観察期間中に、これら検

査値の有意な変動は認められなかった。そこで、これらの臨床マーカーについて、さらに長期間の経過観察を行い、本療法施行後2年間の臨床マーカーの変動について、評価を行った。

2. C 型肝硬変に対する ABMi 療法の多施設対照化比較試験への取り組み

新年度より新たに予定される C 型肝硬変に対する ABMi 療法の臨床研究への準備として、2006 年より 2011 年まで、継続して当科へ通院中の非代償性肝硬変患者数の調査を行った。

C. 結果

1. 肝機能検査値・血小板数に及ぼす長期効果

ABMi療法施行群(5 例)では、血清アルブミン値は、移植前(3.3 ± 0.2 g/dl)に比し移植 24 週後(3.8 ± 0.2 g/dl) ($P < 0.05$)、総蛋白は、移植前(6.9 ± 0.2 g/dl)に比し移植 24 週後(7.7 ± 0.1 g/dl) ($P < 0.05$)、プロトロンビン活性は、移植前(76.6 ± 6.1 %)に比し移植 24 週後(87.6 ± 6.0 %) ($P < 0.01$)、にそれぞれ有意な上昇が見られた。そしてこれらの効果は、血清アルブミン値($P < 0.05$) (図 1)、総蛋白($P < 0.05$) (図 2)、プロトロンビン活性($P < 0.01$) (図 3)ともに、本療法施行後 72 週間の長期間にわたり持続した。

2. C 型肝硬変の患者数調査

2006 年から 2011 年度にかけて、当院へ通院中であり、臨床研究の適応基準に合致する C 型肝硬変患者数は、男性 26 名、女性 23 名、の計 49 名であった(図 4)。また、倫理委員会での本研究の承認を平成 25 年 3 月に得た。

D. 考察

アルコール性肝硬変患者に対する ABMi療

法の治療後 24 週間の短期的な有効性については既に報告してきたが、本研究により、ABMi 施行後 72 週間にわたり、血清アルブミン値、総蛋白、プロトロンビン活性、等の肝機能改善効果が維持されることが示された。したがって、ABMi 療法は、アルコール性肝硬変患者の肝機能改善を長期間持続させ、また、門脈圧亢進に合併する症候も出現しなかったことから、アルコール性肝硬変には有用性が高いものと思われる。ウイルス持続感染の影響がないアルコール性肝硬変において、ABMi 療法は、禁酒が守られた場合には良好な肝機能の持続的改善が得られ、良い適応であることが示された。

C 型肝硬変に対して、新年度より予定される ABMi 療法の新臨床試験に参加するための準備を怠りなく継続していきたい。

E. 結 論

72 週間にわたる長期経過観察により、ABMi 療法には、禁酒のみでは得られない、良好な肝機能改善効果(血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性)があることが示された。肝の組織学的改善の評価、生命予後の評価は今後の検討を要する。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue J, Ueno Y, Kawamura K, Yamamoto T, Mano Y, Miura M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Kimura O, Obara N, Kawagishi N, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis. J Clin Virol.

2012 Oct;55(2):147-152

- 2) Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Kimura O, Miura M, Yamamoto T, Kobayashi T, Igarashi T, Shimosegawa T. Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. J Gastroenterol. 2012 Dec;47(12):1323-1335

2. 学会発表

- 1) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之：ABMi 療法を施行したアルコール性肝硬変患者の骨髓シンチグラフィと肝予備能の変化についての検討 第 54 回日本消化器病学会大会、神戸；2012 年 10 月
- 2) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之、河田純男：自己骨髓細胞投与療法を施行したアルコール性肝硬変患者の 2 年間による長期予後. 第 48 回日本肝臓学会総会、金沢；2012 年 6 月
- 3) 西瀬雄子、斎藤貴史、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、渡辺久剛、今井康陽、堀田 博、上野義之、河田純男：C 型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質 2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する前向き研究 (第 2 報). 第 48 回日本肝臓学会総会、金沢；2012 年 6 月
- 4) 西瀬雄子、渡辺久剛、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、斎藤貴史、上野義之：当院における 70 歳

- 以上 C 型肝炎患者の IFN 治療の現状 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸；2012 年 10 月
- 5) 富田恭子、芳賀弘明、渡辺久剛、佐藤智佳子、石井里佳、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：神経性食欲不振症における肝障害リスク因子の検討 第 16 回日本肝臓学会大会、神戸；2012 年 10 月
- 6) 佐藤智佳子、渡辺久剛、上野義之：非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝癌症例の臨床的特徴 第 16 回日本肝臓学会大会（シンポジウム 8「NASH からの発癌：基礎と臨床」）、神戸；2012 年 10 月 11 日
- 7) Okumoto K, Saito T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Nishise Y, Watanabe H, Ueno Y. The serum level of B-FGF and Scf in hepatitis C patients and its prognosis with hepatocellular carcinoma. DDW2012, San Diego, USA, May 20, 2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**
1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他なし。

図 1 血清アルブミン値 (g/dl) の長期経過

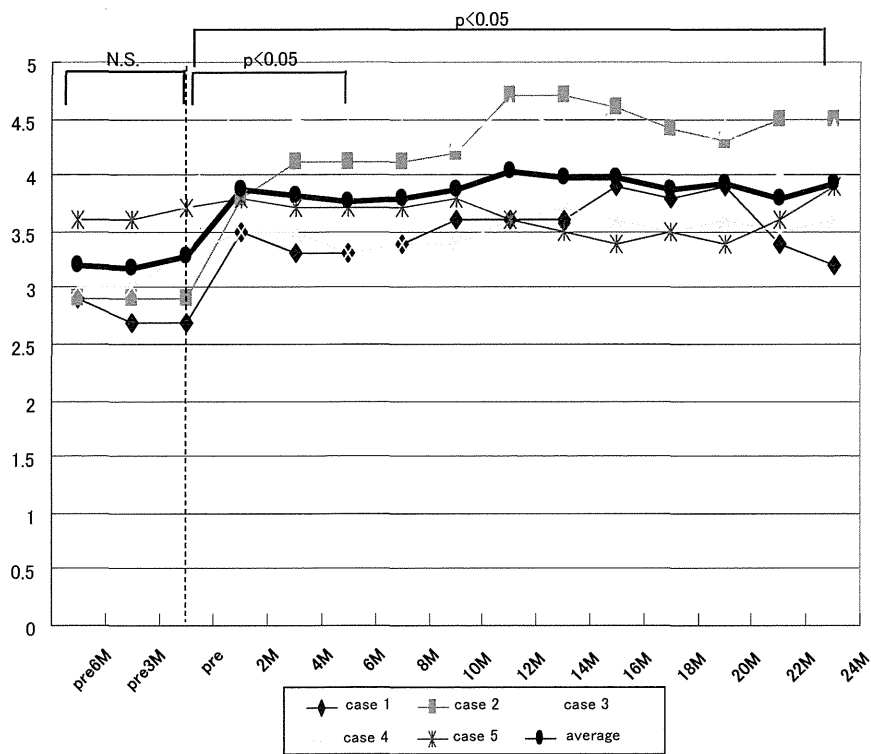


図 2 血清総蛋白 (g/dl) の長期経過

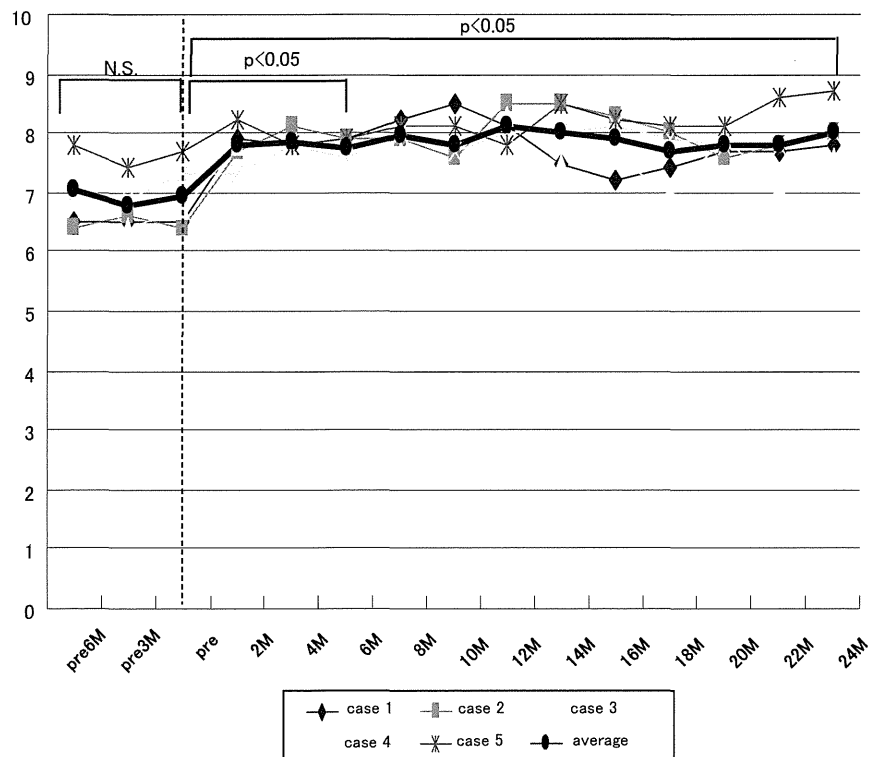


図 3 プロトロンビン時間 (%) の長期経過

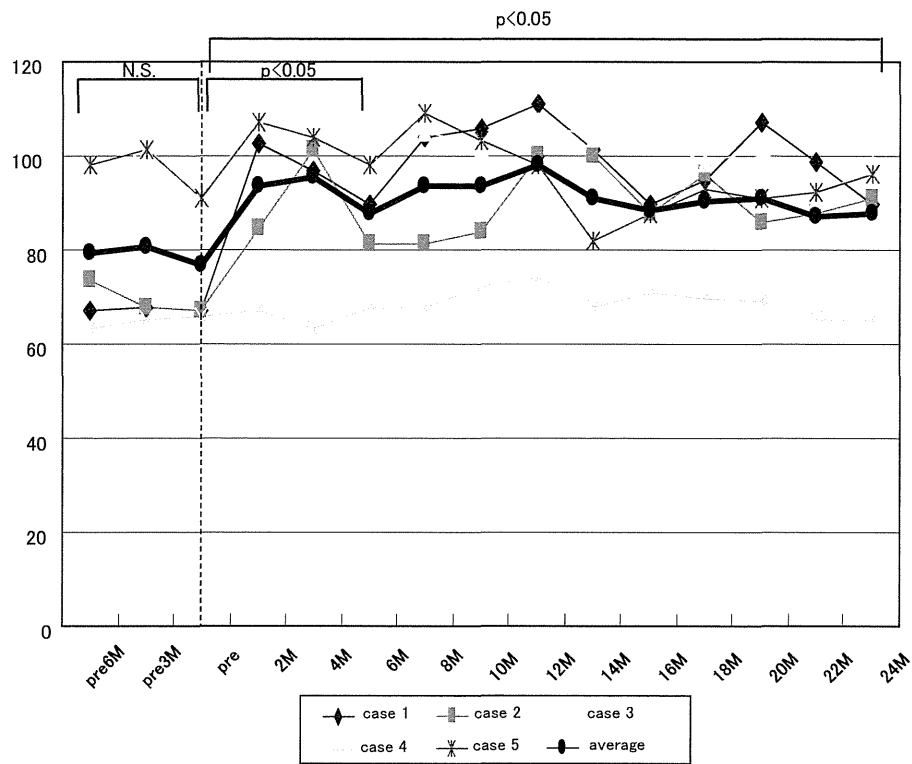


図 4 当院における C 型肝炎患者数

C型肝炎患者数		
性別	年齢グループ	2006-2011
		肝硬変患者数
男性	-59	6
	60-64	2
	65-69	2
	70-74	9
	75-	7
計		26
女性	-59	2
	60-64	2
	65-69	5
	70-74	5
	75-	9
計		23
合計		49

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究分担者氏名：宮島 篤

所属機関：東京大学分子細胞生物學研究所 職名：教授

研究要旨：

【目的】肝線維化あるいはその改善に関わる細胞種および因子の解析

【方法】マクロファージはその場の環境や、状況の変化に応じてその性質を変えるヘテロな細胞集団である。そこで、肝臓のマクロファージであるクッパー細胞がその性質を変化しうるかを確認するため、マウスのクッパー細胞を灌流法により採取し IL-4 や IFN γ などのサイトカインで刺激し、性状を解析する。また、どのような性質を持ったマクロファージが線維化の改善効果が高いかを骨髄由来マクロファージを用いて解析する。

【成績】マクロファージの性質を変化させるサイトカインである IL-4 や IFN γ で刺激したところ、クッパー細胞は M2 マクロファージ、M1 マクロファージにそれぞれ変化することを明らかにした。一方、骨髄由来マクロファージを IL-4 で刺激した際に、肝線維を融解するとされる MMP-9 の発現が上昇し、GM-CSF で刺激した際に MMP-13 の発現が上昇することを明らかにした。さらに、肝線維の改善に寄与すると考えられる好中球を遊走させるケモカインである MIP-2 は、GM-CSF で刺激した骨髄由来マクロファージで発現が上昇することが認められた。

【考案】クッパー細胞がサイトカイン刺激によってその性質を変化させる可塑性を持った細胞であることが明らかになった。今後は、肝線維化過程でクッパー細胞がどのような性質変化を示すかを解析する。さらに、線維化を誘導したマウスに各種の刺激により性質が変化したマクロファージを移植して、それぞれの線維化の改善効果を検討する。

共同研究者

田中稔、伊藤暢、榎本豊

A. 研究目的

肝臓にはクッパー細胞と呼ばれる特殊なマクロファージが多く存在し、線維化の促進にも修復にも寄与することが知られている。また、自己骨髄細胞投与方法 (ABMi 法) による肝硬変の治療効果を示す細胞種の候補としてマクロファージが示唆されている。そこで、肝線維化あるいはその改善に関わる細胞種としてマクロファージに着目し解析を進める。

マクロファージは単一な細胞集団ではなく、非常にヘテロな細胞集団である。しかし、肝臓の線維化の促進過程でクッパー細胞がどのような性質変化を起こしているのか、未だ詳細が明らかになっていない。さらに、どのような性質を持ったマクロファージを移植するのが肝線維

化の改善に効果的なのかは検討がなされていない。そこで、クッパー細胞が刺激に応じてその性質を変化させるのかどうか、また移植するマクロファージはどのような性質を持ったものがよいのか骨髄由来マクロファージを用いて検討する。

B. 研究方法

クッパー細胞の性質変化を解析するため、フローサイトメーターを用いてクッパー細胞を特定した。方法としては、マウスの肝臓から灌流法により血球を採取し、各種表面マーカー解析により肝臓におけるマクロファージ分画を決定した。次に特定したクッパー細胞がサイトカインなどの刺激に応じて性質を変化させるかど

うか、フローサイトメーターを用いて表面マーカーの発現変化により評価した。

また、マウス骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養し、マクロファージを誘導した。そして、マクロファージの性質を変化させるサイトカインである IL-4 や IFN γ 、GM-CSF で刺激してその性質変化をフローサイトメーターや遺伝子発現解析により評価した。

さらに、マクロファージの移植法の検討を行った。具体的には、マウスの骨髄細胞から誘導したマクロファージを尾静脈、あるいは脾臓への注入を行い、肝臓へ流入したマクロファージをフローサイトメーターにより評価した。

C. 研究結果

クッパー細胞の解析

我々の先行研究により、マウス肝臓中の F4/80 陽性細胞が少なくとも3つの集団に分けられることを明らかにしている。本研究では、さらなる細胞膜抗原の解析により、CD11b^{mid}/F4/80^{high}/SSC^{low} 分画が CD68 陽性であり、マクロファージであることを特定した。その他は、CD11b^{mid}/F4/80^{high}/SSC^{high} 分画が SiglecF 陽性の好酸球、CD11b^{high}/F4/80^{mid} 分画が Ly-6G 強陽性の好中球であることを明らかにした。

次に、この特定したクッパー細胞をマウス肝臓から採取し、サイトカイン存在下で培養した。その結果、IL-4 で刺激した際には、他のマクロファージと同様に M2 マクロファージへ、IFN γ で刺激した際には、M1 マクロファージへと性質を変化させることを確認した。この結果は、クッパー細胞の性質は固定されたものではなく、可塑性があることを示している。さらに、肝臓の線維化過程では、肝臓中で発現するサイトカインに変化が生じることが知られており、本結

果と合わせて考慮すると、線維化に応じてクッパー細胞がその性質を変化させていることが強く示唆された。

骨髄マクロファージの誘導

移植するマクロファージはどのような性質を持ったものがよいのか、未だ解析がなされていない。そこで、マウス骨髄を M-CSF 存在下で培養し、さらに性質を変化させるサイトカインである IL-4 や IFN γ 、GM-CSF で刺激を行った。その結果、IL-4 や GM-CSF で刺激したマクロファージは CD11c の発現上昇が確認された。一方、IFN γ で刺激したマクロファージでは NK1.1 の発現上昇が確認された。また、IL-4 刺激では、M2 マクロファージのマーカーである YM-1、Arg1 発現が上昇し、IFN γ 刺激では、M1 マクロファージマーカーである iNOS 遺伝子の発現上昇が確認された。この結果は、これらのサイトカインによる刺激でマクロファージの性質が変化することを示している。

また、IL-4 により肝線維を融解するとされる MMP-9 の発現上昇、GM-CSF により MMP-13 の発現上昇が確認された。さらに、肝線維の改善に寄与すると考えられる好中球を遊走させるケモカインである MIP-2 が GM-CSF により発現上昇することが確認された。今後は、これらの特徴を持ったマクロファージを移植して、肝線維化の改善効果を検討する。

マクロファージの移植法の検討

上述の性質変化を起こさせたマクロファージによる肝線維化の改善効果の検討に先立ち、マクロファージの移植法の検討を行った。マウスの骨髄細胞から誘導したマクロファージを尾静脈あるいは脾臓への注入により移植を行った。そして、24 時間後に肝臓へ流入したマクロ

ファージをフローサイトメーターにより評価した。その結果、移植したマクロファージは肝臓への定着率は非常に低かった。今回は正常肝への移植を行ったために定着率が低かったことが考えられ、今後は線維化肝への移植を試みる。さらに細胞をどのような状態にしてどのような手法で移植を行うのが最もよいか、さらなる検討を行う。

D. 考 察

肝臓内のクッパー細胞と呼ばれる特殊なマクロファージは、線維化の促進にも修復にも寄与すると考えられている。しかしその実体や、線維化の促進又は修復機能の切替えなど十分な理解が得られていない。本研究では、肝臓の F4/80 陽性細胞の中でクッパー細胞を特定し、さらにそれが性質変化を起こす可塑性を持った細胞であることを明らかにした。今後、線維化の過程でどのような性質の変化が起きるのか解明が待たれる。

また、骨髄由来のマクロファージについては、刺激に応じて線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現が変わることを見いだした。つまり、それぞれのマクロファージで線維化の改善効果が異なることが考えられる。各細胞の働きを解析し、どの細胞が線維化の改善に効果的か解明したい。

さらに、細胞の性質のみではなく、どのような手法で細胞を移植するのがよいか検討する必要がある。

E. 結 論

肝臓内のクッパー細胞及び骨髄細胞由来のマクロファージは、ともにサイトカイン刺激によって性質が変化することが示された。今後は、線維化の進行において、クッパー細胞がどの

ように関与しているのか、その進行を抑制するマクロファージの機能は何かを明らかにし、治療法の改善につなげたい。

研究発表

1. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013.
2. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.
3. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. $\alpha 1$ - and $\alpha 5$ -Containing laminins regulate the development of bile ducts via $\beta 1$ -integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012.
4. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.
5. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A.

Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.

2.学会発表

1. 谷貝 知樹, 田中稔、宮島篤. 肝再生および肝線維化における Semaphorin 3E の機能, 第 85 回日本生化学会大会. 福岡, 2012 年 12 月 16 日
2. 佐藤 郁、田中稔、宮島篤. オンコスタチン M による骨髓造血環境の制御機構の解明. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡、2012 年 12 月 14 日～16 日.
3. 田中稔、小森 忠祐、森川吉博、仙波恵美子、宮島篤. オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する. 第 85 回日本生化学会、福岡、2012 年 12 月 16 日.
4. 西條栄子、内木隆寛、宮島篤. 肝臓の発生および代謝機能獲得における Tribbles 遺伝子の役割. 第35回分子生物学会, 福岡, 2012年 12月12日
5. 稲垣冬樹、田中稔、稲垣奈都子、國土典宏、宮島篤. 肝炎におけるネフロネクチンの病態生理的意義. 第19回肝細胞研究会, 札幌、2012年6月29日
6. 金子 洸太、伊藤 暢、宮島 篤
A novel 3D imaging technique reveals dynamic behavior of the biliary tree in regenerating livers. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡, 2012 年 12 月 12 日
7. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima, "Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration

in damaged livers" International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. Pacifico Yokohama, June 14th, 2012

8. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima. "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration" Keystone Symposia "Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease" Banff, February 28, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

「CTGF による肝線維化進展機構の解析」

分担研究者：竹原 徹郎

所属機関：大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学・消化器病学 職名：教授

研究要旨：

肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。そこで線維化を進展させる因子を検討するため、肝線維化が自然発症する P53 が持続活性化したマウスの肝組織を用いてマイクロアレイ発現解析を行った。その結果、線維化の進行したマウスにおいて CTGF(connective tissue growth factor)の著しい上昇が認められた。総胆管結紮術(BDL)を施行したマウス肝線維化においても、高脂肪・高コレステロール食投与により誘導したマウス肝線維化においても肝組織中での CTGF の発現上昇が認められた。さらに臨床検体を用いた検討でも慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織で上昇しており、肝線維化進展への CTGF の関与が示唆された。そこで次に、線維化進展における CTGF の産生細胞を検討するために、肝細胞特異的に CTGF を欠損するマウス、もしくは polyI:C 誘導性に肝細胞及び肝非実質細胞で CTGF を欠損するマウスを作成した。これらのマウスに BDL を施行したところ、肝細胞特異的 CTGF 欠損マウスではコントロールマウスと同程度に肝組織中の CTGF の遺伝子発現の上昇を認めた。一方、BDL を施行した polyI:C 誘導性 CTGF 欠損マウスでは、CTGF の上昇が著明に抑制されていた。さらに、polyI:C 誘導性 CTGF 欠損マウスは、BDL 後の線維化もコントロールマウスに比し軽度であった。以上より、BDL 刺激により主に非実質細胞 CTGF が産生され、この産生された CTGF が肝線維化を進展させると考えられた。今後は CTGF を標的とした治療の開発が期待される。

共同研究者

疋田 隼人 大阪大学消化器内科学

小玉 尚宏 大阪大学消化器内科学

川口 司 大阪大学消化器内科学

うことで、肝線維化抑制を目指した新規治療標的を見出し、新規治療法の開発につなげることを目的とした。

B. 研究方法

A. 研究目的

肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。そこで今回、マウス肝線維化モデル、ヒト臨床検体を用いて肝線維化進展に関与する因子を同定し、線維化進展機構の解析を行

まず、肝線維化進展させる因子を検討する為、肝線維化を自然発症する肝細胞特異的な P53 活性化マウス (*Alb-Cre MDM2^{fllox/fllox}*) の肝組織を用いてマイクロアレイ発現解析を行った。得られた候補遺伝子である CTGF(connective tissue growth factor)が、総胆管結紮術(BDL)に