

201423004A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業
(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26年度 総括研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成27(2015)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. ABMi療法における血清アルブミン値と生命予後の検討、およびC型肝炎に対する多施設対照化比較試験の実施に向けた取り組み	
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 篤	
4. 成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明	
仁科 博史	
5. NASH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	
6. 新規の線維肝再生促進因子 OGFRL1 の組織特異的分布と機能解析	
稲垣 豊	
7. 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	
8. 肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞の治療効果機序の解明	
酒井 佳夫	
9. 骨髄細胞中の肝炎ウイルスの検出	
梅村 武司	
10. 肝線維化における CTGF の意義と新規治療標的としての可能性	
疋田 隼人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	51

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業(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」は2013年6月1日付で「先進医療B」として承認された。また多施設共同研究の支援を行い、国立国際医療研究センター及び山形大学は2014年9月17日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。これに伴い山口大学では、9月に先進医療Bにおける手続きを完了し、同年12月12日に第1例目を実施し、2015年1月30日に2例目を標準的治療群として登録した。

<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する。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)

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、2015年1月以降、新潟大学医歯学総合研究科消化器内科学分野・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)

疋田 隼人（大阪大学大学院医学系研究科
樹状細胞制御治療学・消化器内科学・特任
助教）

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する方法「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 5 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 療法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。この後、先進医療 B への申請を行い、2013 年 6 月 1 日付で承認を得た。また多施設共同研究の支援を行い、国立国際医療研究センター及び山形大学は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。これに伴い山口大学では、9 月に先進医療 B における手続きを完了し、同年 12 月 12 日に第 1 例目を実施し、2015 年 1 月 30 日に 2 例目を標準的治療群として登録した。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の体制整備を完成させる。

(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支援を行う。

(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、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、その発現動態を解析する。

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、2013 年 6 月 1 日付での先進医療 B の承認を得た。同年 12 月 12 日に第 1 例目を実施し、2015 年 1 月 30 日に 2 例目を標準的治療群として登録した。

(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及び山形大学は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得た。今後先進医療 B への申請支援を行っていく。

(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、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 26 年度より、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 として開始した。国立国際医療研究センター及び山形大は 2014 年 9 月 17 日に厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会を経て大臣承認を得ており、今後先進医療 B への申請を行う予定である。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 26 年度より「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進医療 B として先行して実施した。また、マウス基礎研究では MMP9 発現メカニズムの解析等を継続する。

研究発表

1. 論文発表

1. Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Burganova G, Quintanilha LF, Sakaida I. Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2015 Feb 18. [Epub ahead of print]

2. Terai S, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Ishikawa T, Urata Y, Tanimoto H, Iwamoto T, Mizunaga Y, Matsuda T, Oono T, Marumoto M, Burganova G, Quintanilha LF, Hidaka I, Marumoto Y, Saeki I, Uchida K, Yamasaki Y, Tani K, Taura Y, Fujii Y, Nishina H, Okita K, and Sakaida I. Status and Prospects of Liver Cirrhosis Treatment by Using Bone Marrow-Derived Cells and Mesenchymal Cells. *Tissue Eng Part B Rev.*

2014 ;20(3):206-10.

3. 高見太郎、坂井田功 急性肝不全に対する骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の現状、*Hepatology Practice* 第 4 巻 「難治性肝疾患の診療を極める 基本から最前線まで」(文光堂) 2014、p244-246.

2. 学会発表

1. Takami T, Terai S, Sakaida I. Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow derived cells for liver cirrhosis. 29th International College of Neuropsychopharmacology (CINP). 2014 Jun. Vancouver, Canada.

2. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. FASEB meeting. 2014 Aug. Keystone, CO, USA..

3. Takami T, Terai S, Sakaida I. Our regeneration therapies using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. JDDW2014. 2014 Nov. Kobe, Hyogo, Japan.

4. Matusda T, Takami T, Ishikawa T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I. New canine liver cirrhotic model to develop a less invasive regeneration therapy using cultured autologous bone marrow-derived cells. The Liver Meeting 2014, AASLD. 2014 Nov. Boston, MA, USA.

5. Takami T, Terai S, Paredes BD, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Less invasive liver

regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with redox-regulatory capacity. The Liver Meeting 2014, AASLD.2014 Nov. Boston, MA, USA.

6. 白築祥吾、寺井崇二、村田泰彦、松田崇史、石川剛、高見太郎、山本直樹、坂井田功 骨髄由来及び脂肪組織由来間葉系幹細胞(BMSC・ASC)における生物学的特性の差異に関する検討. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月 京都

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

「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）による当療法の多施設ランダム化比較試験への参加：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で、組み入れ基準を満たす同意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。併せて当試験参加対象となりうる C 型肝炎硬変患者に関する当試験への適格性ならびに血小板値に着目した調査を行った。

【成績】当研究に関し厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会を経て厚生労働大臣承認を得、先進医療 B 施設認定に向け申請手続きを進めている。また対象となる C 型肝炎硬変患者に対する調査では、肝予備能の変動への留意や血小板値に関する他疾患関連肝硬変との違いが示唆された。

【考案】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進めた。次年度の実施を目指し準備を継続する。

共同研究者

野崎 雄一 独立行政法人国立国際医療研究センター病院 消化器内科医師

ランダム化比較試験に参加するにあたりその研究体制の整備、ならびに該当疾患患者に関する調査を行った。

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。肝移植に与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

B. 研究方法

1、自己骨髄細胞投与療法に関するプロトコル

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。

2、C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者に関する調査

1) 平成 24 年度～26 年度において継続通院している非代償期 C 型肝炎硬変患者の一部に関して、上記プロトコルにおける適格性をみた。

2) 2000 年～2013 年に当院で診断された肝硬変患者に関し、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)関連肝硬変と C 型肝炎関連肝硬変患者群において、血小板値ならびに CT 画像を基に脾体積の算出を行い比較検討した。

C. 研究結果

1、当研究について平成 24 年 7 月院内倫理委員会承認後、同年 9 月厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会を経て継続審議となった。その後当研究を先進医療 B として実施するための多施設間調整を経て、平成 26 年 5 月同審査委員会にて審議、

同年 9 月厚生労働大臣承認を得た。現在先進医療 B 施設追加に関する申請準備を行っている。

2、1) 調査対象患者 8 名の内訳は Child-Pugh スコア 7 点 2 名、8 点 2 名、9 点 2 名、10 点 1 名、11 点 1 名。経過中、総ビリルビン値が 3.0 mg/dl 以上になったことのある患者は 2 名、肝細胞がん発生にて調査対象から除外された患者が 1 名いた。2) 619 例の肝硬変患者のうち NASH 関連 32 例、C 型肝炎関連 342 例。NASH 関連肝硬変患者の血小板値は 13.4 ± 5.9 万/ μL 、C 型肝炎関連肝硬変では 11.2 ± 5.6 万/ μL で両群間に有意差をみとめた ($p < 0.05$)。Child 分類別で層別化したところ Child 分類 A において両群間の血小板値に有意差をみとめた (14.8 ± 5.9 万/ μL vs 11.5 ± 5.3 万/ μL , $p < 0.01$)。脾体積に関しては両群間で有意差をみとめなかった (128 ± 61 cm^3 vs 155 ± 117 cm^3)。

D. 考察

自己骨髄細胞投与療法開始に向けた先進医療 B 施設追加手続きならびに体制整備に関しては、来年度の実施を目指し引き続き作業準備に傾注する。

同療法に関する対象患者の組み入れに関しては、潜在候補者のなかにプロトコル基準から逸脱する経過をとる患者が少なからずみられ、安全性を担保する観点から慎重な観察を要すると思われた。

肝硬変患者における成因背景別の血小板値に関しては、B 型肝炎硬変患者において C 型肝炎硬変患者より有意に高値であるとの報告がある。今回当院における後ろ向き検討では NASH 肝硬変患者群と C 型肝炎硬変患者

群間では C 型肝炎患者群での血小板値が低いことが示唆された。血小板値を規定する因子として、循環プールとしての脾体積の他、トロンボポエチンなどの産生因子、血小板関連 PA-IgG などの免疫機序など多岐に亘る因子が挙げられる。C 型肝炎において他の成因背景と画した血小板減少機序が存在するのか関心がもたれる。

特記事項なし。

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。

本療法の対象となる C 型肝炎関連肝硬変患者に関し、プロトコル適格性の検討ならびに血小板値に関する他疾患由来肝硬変との比較検討を行った。

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

1. 三島 沙織、野崎 雄一、正木 尚彦、青木 智則、大武 優希、藤澤 真理子、小森 寛之、櫻井 恵、三神 信太郎、小島 康志、今村 雅俊、柳瀬 幹雄

非アルコール性脂肪性肝炎由来の肝硬変患者の血小板値の検討

JDDW 2014 神戸 2014.10

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

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業))
研究分担報告書

「ABMi療法における血清アルブミン値と生命予後の検討、およびC型肝炎に対する
多施設対照化比較試験の実施に向けた取り組み」

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】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) 療法を行い、治療後 24 週間ならびに 72 週間に亘る持続的な肝機能改善効果 (血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性) について報告してきた。今回、更に長期間の経過観察を行うことで、ABMi療法施行後の患者の生命予後を明らかにする。また、C型肝炎患者に対する多施設対照化比較試験に参加するための準備を進める。

【方法】1.当科で先行研究として ABMi 療法を施行したアルコール性肝硬変患者 5 例について、生命予後ならびに血清アルブミン値と予後の関係を検討した。2.ヒト幹細胞に関わる臨床研究の開始に必要な申請を行った。

【成績】1.アルコール性肝硬変患者 5 例について、ABMi療法施行後の平均観察期間は 5.05 年(range:2.42 年-7.25 年)であった。患者の生命予後は 死亡 2 例、生存 3 例であった。2 例の死因は肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。2.血清アルブミン値を、ABMi直前値、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて検討した。生存例 (3 例) では、全例、血清アルブミン最新値が ABMi直前値に比較し上昇していたが、死亡例 (2 例) では血清アルブミン死亡直前値は ABMi直前値に比較し低下していた。ABMi療法施行 4 週後の血清アルブミン値は、生存例 3 例、肝細胞がん発病までは経過良好であった死亡例 1 例で、ABMi直前値に比較して上昇していた。一方、肝不全・腎不全で死亡した症例では、ABMi療法施行 4 週後の血清アルブミン値は ABMi直前値と差が認められなかった。3. C型肝炎患者に対する多施設対照化比較試験について、平成 26 年 4 月に厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」へ研究申請を行い、同年 9 月に研究許可に関する大臣意見を得た。山口大学先進医療 (B) 協力医療機関として申請手続きを進めている。

【考案】アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法では、長期生存例では血清アルブミン値の改善が見られることが確認された。また ABMi療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値の反応が、その後の血清アルブミン値の改善および生命予後を予測する上で有用なマーカーとなり得る可能性がある。今後の臨床研究において検討する価値があるものと思われる。

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

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)。

私達は、2006年から2009年にかけて、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結果、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) が持続することを確認している。今回、ABMi 療法施行患者の生命予後を明らかにするとともに、血清アルブミン値と予後との関係を検討した。また、C 型肝硬変患者に対する多施設対照比較試験に参加するため、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い、厚生労働省へ臨床研究の申請を行った。

B. 方法

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、画像検査で肝細胞がんがなく、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。自己骨髄細胞は、全身麻酔下で 400ml の骨髄液を採取し、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 例を解析対象とした。平成 27 年 1 月 15 日現在における、患者の生命予後を明らかにした。観察期間のエンドポイントは、生存例は平成 27 年 1 月 15 日、死亡例は死亡時とした。また、血清アルブミン値について、ABMi 療法直前値、ABMi 療法施行 4 週後、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて、生命予後との関係を検討した。

C. 結果

1. ABMi 療法施行患者の生命予後

ABMi 療法施行症例 (5 例) の、生命予後を表 1 に示す。ABMi 療法施行後の平均観察期間は 5.05 年 (range: 2.42 年-7.25 年) であった。患者の生命予後は 死亡 2 例、生存 3 例であった。2 例の死因は、肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。肝機能検査値の最新値 (死亡例は死亡前値) の検討では、生存例 (3 例) では血清アルブミン値の高値と child-pugh スコアの改善が認められるのに対し、死亡例 (2 例) では低アルブミン血症および child-pugh スコアの増悪が認められた、

2. 血清アルブミン値と生命予後の検討

血清アルブミンの ABMi 療法直前値、最新値 (死亡例は死亡前値) を用いて、予後との関係を検討した (図 1)。生存例 (3 例) では、全例、血清アルブミン最新値が ABMi 療法直前値に比較し上昇していたが、死亡例 (2 例) ではいずれも血清アルブミン死

亡前値は ABMi 直前値に比較し低下していた。ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値を加えて、予後との関係を検討した (図 2)。ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は、生存例 3 例、肝細胞がん発病までは経過良好であった死亡例 1 例 (肝細胞がん症例) では、ABMi 療法直前値に比較して上昇していた。一方、肝不全・腎不全で死亡した症例では、ABMi 療法施行 4 週後の血清アルブミン値は ABMi 直前値と差が認められなかった。

D. 考察

アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 療法では、治療後 24 週間ないしは 72 週間の肝機能改善に関わる有効性が確認されている。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、良い適応であると思われる。

今回、ABMi 療法を受けた患者の生命予後を検討した結果、死亡例の死因は肝細胞がん、および肝不全・腎不全であった。死亡例では、死亡前の肝機能検査値において、低アルブミン血症が顕著であり、child-pugh スコアの増悪も見られた。一方、アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法における長期生存例では、血清アルブミン値と child-pugh スコアの改善が確認された。そして、ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値を ABMi 療法直前値と比較検討すると、肝不全・腎不全による死亡例では、早期のアルブミン上昇が認められなかった。ABMi 療法施行 4 週後の早期の血清アルブミン値の反応性が、ABMi に

よる肝再生効果を反映し、その後の血清アルブミン値の改善および生命予後を予測する上で有用なマーカーとなる可能性がある。

今後、実施を予定している C 型肝硬変に対する多施設対照化比較試験において、血清アルブミン値の早期反応と予後の関係を更に検討する価値があるものと思われた。

E. 結論

ABMi 療法により、生命予後の良好な例では、血清アルブミン値の改善が認められる。また、ABMi 療法施行後 4 週目の早期の血清アルブミン値の反応が、本治療法の有効性を予測する上で有用なマーカーとなり得る可能性がある。今後の更なる検討を要する。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Ueno Y: Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014; 307(1): G50-57
- 2) Tomita K, Haga H, Ishii G, Katsumi T, Sato C, Aso R, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, Otani K, Ueno Y: Clinical manifestations of liver injury in patients with anorexia nervosa. Hepatol Res 2014; 44(10): E26-31

2. 学会発表

- 1) 水野 恵、渡辺久剛、阿蘇里香、宇賀神

- 智、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：当院における肝硬変の成因別実態と合併症の臨床的特徴。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月
- 2) 渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：本県における肝炎対策の現状と課題をふまえた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築と肝疾患診療連携体制。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月
- 3) 富田恭子、芳賀弘明、水野 恵、勝見智大、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、斎藤貴史、上野義之：高度肝障害時に Epipegulin は肝前駆細胞を誘導・増殖させることにより肝再生に寄与する。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月
- 4) 佐藤智佳子、渡辺久剛、上野義之：糖尿病患者では潜在的 NASH が混在し NASH では肝病態進展に糖尿病が促進的役割を果たす。第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月
- 5) 渡辺久剛、佐藤智佳子、上野義之：生活習慣からみた非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴と囲い込みのためのリスクファクター。第 18 回日本肝臓学会大会、神戸；2014 年 10 月
- 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得 2. 実用新案登録なし。

表 1 アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法施行症例の生命予後

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
ABMi施行時年齢	59	61	60	75	69
観察期間	2年5ヶ月	7年3ヶ月	5年3ヶ月	5年2ヶ月	5年2ヶ月
生命予後 (2015.1.15)	死亡 (HCC)	生存	生存	生存	死亡 (肝・腎不全)
最新(死亡例は死亡前)臨床データ					
Albumin (g/dl)	2.4	5.2	4.9	3.8	2.6
T.bilirubin (mg/dl)	2.5	1.1	1.3	2.2	1.9
PT (%)	62	101	107	63	71
Ascites	moderate	none	none	none	minimal
Coma	none	none	none	none	grade II
Child-Pugh score () 治療前	11 (8)	5 (7)	5 (5)	7 (8)	8 (6)

図 1 血清アルブミン値の長期経過と生命予後

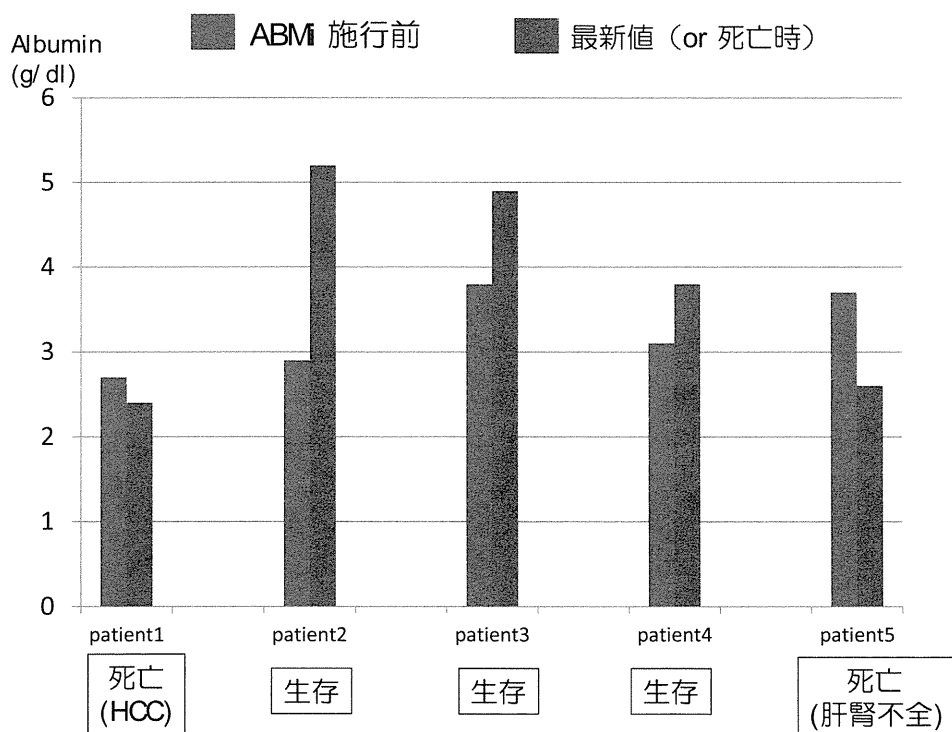
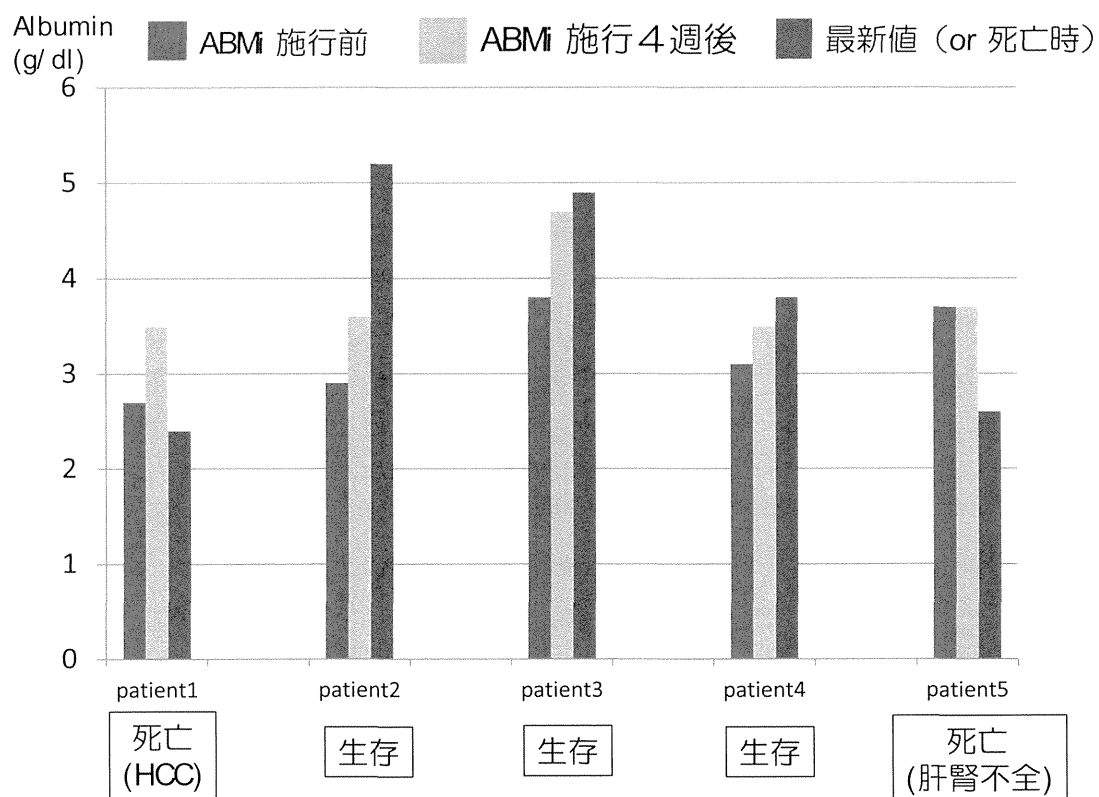


図2 血清アルブミン値の早期反応と長期経過・生命予後



「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学研究所 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骨髄中の細胞種および因子の解析

【方法】 骨髄中で存在比率の高い単球、好中球に着目し、それらの細胞群を単離して、遺伝子発現解析を行う。また、遊走した単球や好中球が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染刺激を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激し、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

【成績】 遺伝子発現解析の結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことが明らかとなった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。また、単球や好中球を DAMPs の一つである HMGB1 で刺激すると、単球は炎症性サイトカインやケモカインを産生し、好中球は MMP13 を高発現することが明らかになった。

【考案】 本実験により、骨髄投与療法による治療効果には単球によるサイトカイン産生、及び好中球の MMP によるコラーゲンの溶解が寄与している可能性が示された。また、遊走した肝臓内で単球や好中球が反応する物質として DAMPs の一つである HMGB1 が候補の一つであることが示された。

共同研究者

榎本豊、田中稔、伊藤暢

の因子で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

A. 研究目的

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は、骨髄球系細胞が示唆されている。しかし、骨髄球系細胞は非常にヘテロな細胞集団であり、どの細胞種が肝硬変治療効果を示すかは特定されていない。今後 ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で、細胞種の特定は不可欠である。

そこでまず、フローサイトメーターにより、マウスの骨髄中に多く存在する細胞種を特定する。そして、各細胞種で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現量の比較検討を行う。次に、肝臓内に遊走した各細胞種が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染色を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をそ

B. 研究方法

骨髄中に多く存在する細胞種を特定するため、フローサイトメーターを用いてマウスの骨髄中の細胞種の比率を解析した。次に各細胞種の mRNA から cDNA を作製し、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量、及び、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量を定量的 PCR により解析した。

四塩化炭素投与では、肝細胞がネクローシスを起こすことが知られている。ネクローシスを起こした細胞からは DAMPs の一つである HMGB1 が放出され、広く免疫細胞を活性化することが知られている。そこで、四塩化炭素投与により傷害を与えたマ

ウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA 法により定量した。また、その肝臓内で HMGB1 と各種免疫細胞のマーカーを抗体により共染色して、HMGB1 を認識する細胞種を特定した。次に、単球や好中球を HMGB1 で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析した。

C. 研究結果

骨髄中の細胞種の特定

マウス骨髄中の細胞種を特定するため、フローサイトメトリー解析を行った結果、CD11b+/Ly-6G+の好中球が約 40%と最も多く存在し、続いて CD11b+/Ly-6C+の単球が約 15%存在することが明らかになった。骨髄中に多く存在するこれらの細胞が、線維化の改善に対して、何らかの機能を持つことが示唆された。

線維化改善関連遺伝子の発現比較

好中球と単球間で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子発現を比較解析した。その結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことがわかった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。このことから、好中球は繊維を溶解し、単球は炎症を抑制することで線維化の改善に寄与することが示唆された。

血清中の HMGB1 の定量解析、及び肝臓内における HMGB1 の蓄積

四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA

法により定量した。その結果、四塩化炭素投与後 24 時間から 72 時間の間、つまり肝細胞の傷害が見られる時間帯に、血清中の HMGB1 レベルが高くなることが明らかになった。さらに、肝臓の免疫染色の結果、その時期には肝臓内でも HMGB1 が傷害部位に広く蓄積していることがわかった。そして、その蓄積した HMGB1 には単球や好中球、好酸球などの免疫細胞が隣接しており、HMGB1 を認識して活性化している可能性が示唆された。

HMGB1 による単球、好中球への刺激

次に単球や好中球を *in vitro* で HMGB1(1000 ng/ml) 24 時間刺激したところ、単球では TNF α や IL-6 などのサイトカイン、MIP1 や MIP2、MCP-1 などのケモカインの発現量が上昇することが明らかになった。一方好中球では、サイトカインの分泌はほぼ見られなかったが、MMP-13 の発現量が上昇することが明らかになった。

D. 考察

肝硬変の治療効果を示す細胞種や遊走した細胞が反応する因子を特定することは、ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で不可欠である。本研究結果により、骨髄中の単球や好中球が重要であることを示唆する結果が得られた。近年では単球や好中球は炎症の抑制にも働く細胞であると考えられており、治療効果が期待できる細胞種である。

また、単球はサイトカインの分泌、好中球は MMP を高発現するなど、その役割の違いを示唆する興味深い結果が得られた。

今後は、投与する細胞数やそのタイミング、刺激の有無など様々な条件を検討し、よりよい治療方法を模索していく。

E. 結論

本研究により、骨髄中の単球や好中球が線維化の改善に重要であることが示唆された。しかし、その具体的なメカニズムの解明や、どのような方法がよりよい治療効果を示すかは未だ明らかでない。今後は、上記の点に留意して研究を進め、実際のヒトへの治療法の改善につなげたい。

研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell. Biol.* 34:900-913, 2014.
2. Komori T, Tanaka M, Semba M, Miyajima A, and Morikawa Y. Deficiency of OSMRb exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J. Biol. Chem.* 289, 13821-13837, 2014.
3. Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* Aug;184(8):2250-2259, 2014.

4. Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A. Mature resting Ly6Chigh natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology.* Sep;44(9):2638-47, 2014.

5. Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A and Tanaka M. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by affecting adipogenesis and osteoblastogenesis. *PLoS One* 2014 Dec 31;9(12):e116209.

2. 学会発表

1. 松田道隆、田中稔、宮島篤、Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M. FASEB Summer Research Conferences. Keystone Resort (U.S.A.)2014/7/6-11
2. 松田道隆、田中稔、宮島篤.オコスタチンMによるマウス肝繊維化促進機構の解析. 第28回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 岡山. 2014.12.13.
3. 谷貝 知樹、松井 理司、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤、田中 稔. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析.第 21 回 肝細胞研究会. 東京、2014.6.27.
4. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤. Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 京都市. 2014.12.10.

あ

5. Tohru Itoh, Seitaro Ino, and Atsushi Miyajima. Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8

6. Kota Kaneko, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima. Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8.

7. 神元健児、金子洸太、伊藤暢、宮島篤. マウス肝臓の再生過程における胆管系前駆細胞の性状解析. 第47回発生生物学会. 名古屋市. 2014.5.27

8. 宮島篤. 肝臓の炎症・再生－基礎から応用へ. 第35回日本炎症・再生医学会 教育講演 2014.7.3.

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

なし