

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)

正田 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 型肝炎症に対する 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

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、質の高い工

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. *Hepatol Res*. 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