

**Figure 5.** Expression (a–e) and labeling index (f) of G-CSF in liver tissues from model mice. Immunohistochemistry of G-CSF expression in model mice shows that liver G-CSF expression is essentially absent before BMCs (a) and at 1 week (b) after, but obviously increased at 2 (c), 3 (d), and 4 (e) weeks after BMC infusion. Original magnification: 200× (a–e). (f) Summary of (a–e). Time course of ratio (%) of G-CSF expression in mouse liver shows increases from 2 weeks after BMC infusion. \*Significant difference compared with value before and at 1 week after BMC infusion ( $p < 0.01$ ).

control values. Although the values of the two serum cytokines changed soon after the BMCs, we speculate that these cytokines interacted with others, which led to similar values to those of the control group over time. We also analyzed G-CSF and IL-1 $\beta$  expression in the cirrhotic mice liver after BMC infusion. Neither G-CSF nor IL-1 $\beta$  were expressed in mouse liver tissues before or at 1 week after BMC infusion, but the rate of expression significantly increased starting from 2 weeks thereafter. During the early phase of BMC infusion, G-CSF and IL-1 $\beta$  were induced in the blood, but not in the liver. Also during the early phase of BMC infusion, G-CSF and IL-1 $\beta$  expression in liver tissue was suppressed, but at 1 week thereafter, their expression might not have been suppressed. This also suggests that suppressing changes in G-CSF and IL-1 $\beta$  during the early phase of BMC infusion might be important to repair of cirrhosis liver.

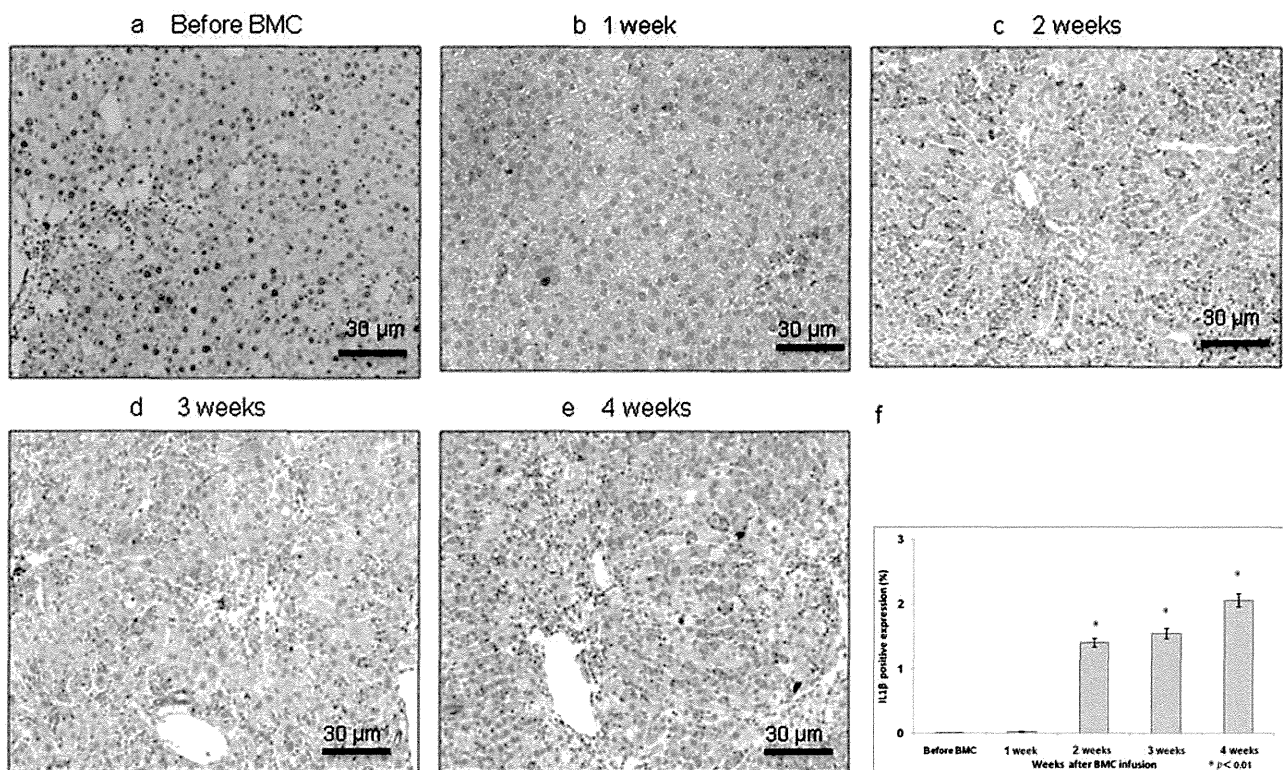
Recent human studies have found that transplantation with bone marrow stem cells after peripheral induction with G-CSF confers therapeutic effects against acute myocardial infarction (4,7). In addition, clinical studies of neo-vascularization for peripheral vascular diseases based on small doses of G-CSF injected subcutaneously are under way, and the therapeutic effects are comparable to those of

autologous BMC transplantation (2). Monotherapy with G-CSF does not appear to significantly improve liver function and in fact might hinder liver regeneration (10,16). Here, the rapid decrease in serum G-CSF following BMC infusion might have induced the recovery of liver function. These results indicate that chronological changes in G-CSF are more important than its simple administration. Human and mouse IL-1 $\beta$  transiently decreased and then increased after BMC infusion. IL-1 $\beta$  is an inflammatory cytokine that is secreted by various cells including macrophages, T-cells, and B-cells, and it suppresses liver repair after hepatectomy or after acute liver dysfunction (3,9). Such decreases in IL-1 $\beta$  might have helped to improve liver function after BMC infusion.

Still many unknown things remained, but the finding of early cytokine change such as G-CSF and IL-1 $\beta$  might be important to understand the repairing mechanism for cirrhosis liver after BMC infusion.

### CONCLUSION

Changes in cytokines after BMC infusion defined herein appear to be important for understanding the repair mechanisms involved in nitrating liver cirrhosis patient by ABMi therapy.



**Figure 6.** Expression (a–e) and labeling index (f) of IL-1 $\beta$  in liver tissues from model mice. Immunohistochemistry for IL-1 $\beta$  in model mice infused with BMCs show similar distribution of areas of liver that are positive for expression of IL-1 $\beta$  and G-CSF. Interleukin-1 $\beta$  is essentially absent before (a) and at 1 week after (b) BMC infusion, but obviously increased at 2 (c), 3 (d), and 4 (e) weeks thereafter. Original magnification: 200 $\times$  (a–e). (f) Summary of (a–e). Time course of ratio (%) of IL-1 $\beta$  expression in mouse liver shows gradual increase from 2 weeks after BMC infusion. \*Significant difference compared with value before and at 1 week after BMC infusion ( $p < 0.01$ ).

**ACKNOWLEDGMENTS:** This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (Nos. 18590737, 19390199, and 22390150) and by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan Science and Technology Agency, and the Knowledge Cluster Initiative for translational research. The authors declare no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Alison, M. R.; Poulson, R.; Jeffery, R.; Dhillon, A. P.; Quaglia, A.; Jacob, J.; Novelli, M.; Prentice, G.; Williamson, J.; Wright, N. A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406(6793):257; 2000.
- Arai, M.; Misao, Y.; Nagai, H.; Kawasaki, M.; Nagashima, K.; Suzuki, K.; Tsuchiya, K.; Otsuka, S.; Uno, Y.; Takemura, G.; Nishigaki, K.; Minatoguchi, S.; Fujiwara, H. Granulocyte colony-stimulating factor: A noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ. J.* 70(9):1093–1098; 2006.
- Boulton, R.; Woodman, A.; Calnan, D.; Selden, C.; Tam, F.; Hodgson, H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$ : A mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 26(1):49–58; 1997.
- Burt, R. K.; Loh, Y.; Pearce, W.; Beohar, N.; Barr, W. G.; Craig, R.; Wen, Y.; Rapp, J. A.; Kessler, J. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA* 299(8):925–936; 2008.
- Hardjo, M.; Miyazaki, M.; Sakaguchi, M.; Masaka, T.; Ibrahim, S.; Kataoka, K.; Huh, N. H. Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow. *Cell Transplant.* 18(1):89–99; 2009.
- Iwamoto, T.; Terai, S.; Mizunaga, Y.; Yamamoto, N.; Omori, K.; Uchida, K.; Yamasaki, T.; Fujii, Y.; Nishina, H.; Sakaida, I. Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients. *J. Gastroenterol.* 47(3):300–312; 2012.
- Kang, H. J.; Kim, H. S.; Koo, B. K.; Kim, Y. J.; Lee, D.; Sohn, D. W.; Oh, B. H.; Park, Y. B. Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the myocardial regeneration and angiogenesis in myocardial infarction with G-CSF and intra-coronary stem cell infusion (MAGIC Cell) 1 trial. *Am. Heart J.* 153(237):e231–e238; 2007.

8. Kim, J. K.; Park, Y. N.; Kim, J. S.; Park, M. S.; Paik, Y. H.; Seok, J. Y.; Chung, Y. E.; Kim, H. O.; Kim, K. S.; Ahn, S. H.; Kim, D. Y.; Kim, M. J.; Lee, K. S.; Chon, C. Y.; Kim, S. J.; Terai, S.; Sakaida, I.; Han, K. H. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.* 19(10):1237–1246; 2010.
9. Nagaki, M.; Muto, Y.; Ohnishi, H.; Moriwaki, H. Significance of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of fulminant hepatitis: Possible involvement of serine protease in TNF-mediated liver injury. *Gastroenterol. JPN.* 26(4):448–455; 1991.
10. Ogiso, T.; Nagaki, M.; Takai, S.; Tsukada, Y.; Mukai, T.; Kimura, K.; Moriwaki, H. Granulocyte colony-stimulating factor impairs liver regeneration in mice through the upregulation of interleukin-1 $\beta$ . *J. Hepatol.* 47(6):816–825; 2007.
11. Okabe, M.; Ikawa, M.; Kominami, K.; Nakanishi, T.; Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407(3):313–319; 1997.
12. Omori, K.; Terai, S.; Ishikawa, T.; Aoyama, K.; Sakaida, I.; Nishina, H.; Shinoda, K.; Uchimura, S.; Hamamoto, Y.; Okita, K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 578(1–2):10–20; 2004.
13. Peng, L.; Xie, D. Y.; Lin, B. L.; Liu, J.; Zhu, H. P.; Xie, C.; Zheng, Y. B.; Gao, Z. L. Autologous bone mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 54:820–828; 2011.
14. Saito, T.; Okumoto, K.; Haga, H.; Nishise, Y.; Ishii, R.; Sato, C.; Watanabe, H.; Okada, A.; Ikeda, M.; Togashi, H.; Ishikawa, T.; Terai, S.; Sakaida, I.; Kawata, S. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev.* 20:1503–1510; 2011.
15. Sakaida, I.; Terai, S.; Yamamoto, N.; Aoyama, K.; Ishikawa, T.; Nishina, H.; Okita, K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40(6):1304–1311; 2004.
16. Salama, H.; Zekri, A. R.; Zern, M.; Bahnassy, A.; Loutfy, S.; Shalaby, S.; Vigen, C.; Burke, W.; Mostafa, M.; Medhat, E.; Alfi, O.; Huttinger, E. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant.* 19(11):1475–1486; 2010.
17. Terai, S.; Ishikawa, T.; Omori, K.; Aoyama, K.; Marumoto, Y.; Urata, Y.; Yokoyama, Y.; Uchida, K.; Yamasaki, T.; Fujii, Y.; Okita, K.; Sakaida, I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24(10):2292–2298; 2006.
18. Terai, S.; Sakaida, I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 18(1):23–25; 2010.
19. Terai, S.; Sakaida, I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol. Res.* 38 (Suppl 1):S72–S75; 2008.
20. Terai, S.; Sakaida, I.; Nishina, H.; Okita, K. Lesson from the GFP/CC14 model—Translational Research Project: The development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 12(3):203–207; 2005.
21. Terai, S.; Sakaida, I.; Yamamoto, N.; Omori, K.; Watanabe, T.; Ohata, S.; Katada, T.; Miyamoto, K.; Shinoda, K.; Nishina, H.; Okita, K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.* 134(4):551–558; 2003.
22. Terai, S.; Segawa, M.; Omori, K.; Iwamoto, T.; Mizunaga, Y.; Matsumoto, T.; Urata, Y.; Marumoto, Y.; Ishikawa, T.; Yamamoto, N.; Uchida, K.; Yamasaki, T.; Sakaida, I. Long time follow up for the patient of autologous bone marrow cell infusion (ABMI) therapy for liver cirrhosis. *Hepatology* 46(4):246A–247A; 2007.
23. Terai, S.; Yamaoto, N.; Omori, K.; Sakaida, I.; Okita, K. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J. Gastroenterol.* 37(Suppl XIV):162–163; 2002.
24. Theise, N. D.; Nimmakayalu, M.; Gardner, R.; Illei, P. B.; Morgan, G.; Teperman, L.; Henegariu, O.; Krause, D. S. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32(1): 11–16; 2000.

## 自己骨髄細胞投与による肝再生，修復治療

寺井崇二，坂井田 功

進行性肝疾患は，肝炎から肝硬変症さらに肝細胞がんへと進行する．肝臓は正常では高い再生能を持つが線維化が進行した肝硬変症では，改築された肝小葉，肝細胞を取り囲む肝線維のため増殖，再生ができない．この問題を解決するには，永年，肝線維化を改善し，内在の肝細胞の増殖を誘導する治療法の開発が求められ，多くの線維化改善を誘導する薬物の開発が試みられた．しかしながら動物実験の段階で様々な副作用が報告され，臨床応用には至っていない．我々は，骨髄細胞投与による硬変肝の肝線維化改善，それに引き続く肝前駆細胞の活性化，肝細胞の増殖を確認し，生存率の改善を基礎研究で明らかにし，それを基盤に自己骨髄細胞投与療法（Autologous Bone Marrow Cell infusion, ABMi）療法の臨床研究を世界で初めて実施し有効性を確認した．本稿では，ABMi 療法の開発を通じて明らかにしてきた基礎研究，臨床研究の成果，また今後の課題について報告する．

### 1. はじめに

我々は，肝不全に対する新たな治療として，平成 15 年 11 月より，適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して，臨床研究「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法 [自己骨髄細胞の投与療法，Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy (ABMi 療法)]」の開発を推進してきた．現在までに山口大学および国内外の臨床研究の実施にて，その安全性，有効性が多施設にて確認された．本稿では，過去の基礎研究および臨床研究より得た知見をまとめる．

### 2. 肝修復と再生

肝臓は，肝細胞のみならず，胆管細胞，星細胞，内皮細胞やクッパー細胞から構成される．肝臓を再生させるには，これらの肝臓構成細胞のシステマティックな再生が必

要になる．肝臓は再生しやすい臓器であるが，慢性炎症が進行し，その結果，肝線維化が進行し肝硬変状態になった場合は，周囲の線維化のため肝再生しにくく肝機能不全を進行する．この病態を考えた場合，肝線維化改善の誘導が肝再生において重要になる．我々が開発してきた自己骨髄細胞投与療法の理解には，骨髄細胞投与による生体の反応，骨髄との複雑な細胞間相互作用を解明することが重要である．

### 3. 骨髄細胞投与による肝線維化改善機構

2000 年に男性ドナー由来の造血幹細胞移植を受けた女性の肝組織中に Y 染色体が確認されたことが報告された<sup>1)</sup>．このヒトでの結果より肝再生を誘導するのに有効な細胞として骨髄細胞の可能性が示唆された．骨髄由来細胞の肝細胞への分化<sup>2)</sup>や骨髄由来細胞と既存肝細胞との融合<sup>3)</sup>など様々な機序が，骨髄由来細胞の可塑性機序として考えられている．我々は肝硬変症患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性を検討するために，臨床の病態に立脚した基礎研究モデルとして，四塩化炭素の持続投与による肝硬変モデルマウスに対して GFP トランスジェニックマウス由来の全骨髄細胞（ヘテロな細胞集団）を投与する GFP/CC14 モデルを開発し投与した．末梢血管より投与された細胞は，持続肝障害がある硬変肝において，Liv2 陽性の

山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学（〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1）

Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy to repair and regenerate liver

Shuji Terai and Isao Sakaida (Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Minami-Kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan)

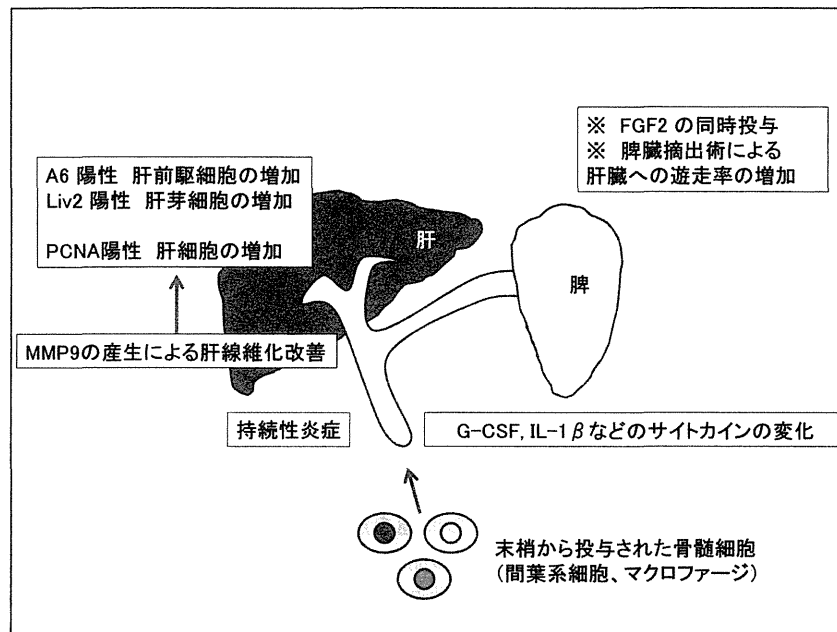


図1 基礎研究より明らかになった知見

肝芽細胞の表現型, およびアルブミン分泌を起こすこと, さらに周囲の A6 陽性肝芽細胞を活性化することを確認した<sup>4,5)</sup>. さらにドナー由来の骨髄細胞が硬変肝の線維部分に定着し matrix metalloproteinase (MMP) 2 および MMP9 などの線維分解酵素を産生することで肝線維化が改善したこと, これに伴い肝機能の改善および生存率の改善が得られたことを 2004 年に報告した<sup>6)</sup>. この現象をサポートする基礎研究として, アデノウイルスベクター等を用いて MMP を肝臓に発現させたところ肝線維化が改善したとの報告が複数され<sup>7-9)</sup>, 骨髄細胞投与による MMP の産生を介した肝線維化および肝機能の改善効果は, 肝臓修復, 再生の重要なメカニズムと考えられた (図 1).

#### 4. 自己骨髄細胞投与療法の方法, 結果

上記の基礎研究の成果のもと, 臨床研究を開始した. 対象は 18 歳から 70 歳までの肝硬変症の患者, 総ビリルビン値が 3 mg/dl 以下, 血小板値が 5 万以上, MRI, CT 診断にて肝細胞がんがない. 全身麻酔下で 400 ml の骨髄液を採取し, 細胞を洗浄, 単核球成分を採取する. 最終産物を末梢静脈から投与し, その後経過観察を行う<sup>10)</sup> (図 2A). この臨床研究は世界に先駆けて 2003 年より山口大学にて開始し, 重篤な有害事象なく肝硬変症例の肝機能が改善したことを示した<sup>10)</sup>. 解析可能な症例の生検組織解析にて肝臓に PCNA 陽性肝細胞の増加を認め, この結果は骨髄細胞投与による内在の肝細胞の増殖誘導を確認した. 一方で山口大学と延世大学の共同研究では, B 型肝炎 (Child-Pugh B) の 10 例に対して ABMi 療法を行い, 肝機能・

Child-Pugh score の有意な改善をみた. 治療効果は 12 ヶ月にわたり維持された. 経時的な肝生検では, 肝前駆細胞画分の活性化が確認された<sup>11)</sup>. 山形大学, 山口大学との共同研究では 5 例のアルコール性肝硬変に対して ABMi 療法を行い, Child-Pugh score の有意な改善を認め, ABMi 療法のアルコール性肝硬変症に対する有用性を明らかにした<sup>12)</sup>. またこの臨床研究ではシンチグラフィにて細胞投与後の骨髄の活性化を確認した. 一方で我々の解析では, 脾臓摘出術併用 + 自己骨髄細胞投与群にて, 末梢から投与した骨髄細胞がより効率よく肝臓に定着するため, 肝機能の改善効果があることが明らかになった<sup>13)</sup>. その他, 自己骨髄細胞投与後の血清のマウス GFP/CCI4 モデルとの比較解析では, 血清 G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) および IL-1 $\beta$  (インターロイキン 1 $\beta$ ) の急激な減少がその後の肝臓機能改善に何らかの影響を与えている可能性が新たに示唆された<sup>14)</sup> (図 3). 一方中国では, 527 人の B 型肝炎ウイルス (HBV) に起因した肝不全患者をリクルートし, 120 ml の骨髄液を肝動脈から投与する群 53 人と, 投与しない群 105 人に分け解析した結果, 投与による副作用はなく, さらに早期 (2~3 週) 観察群と 192 週観察した群に分け解析した結果, 早期の肝機能の改善を確認した. また長期観察では, 骨髄細胞投与による肝細胞がんの発生率には変化がなく, 生存率の改善の可能性が示唆された<sup>15)</sup>. 実際に我々の基礎的検討においても骨髄細胞の頻回投与は, 肝臓がんを誘導せず低下させた<sup>16)</sup>.

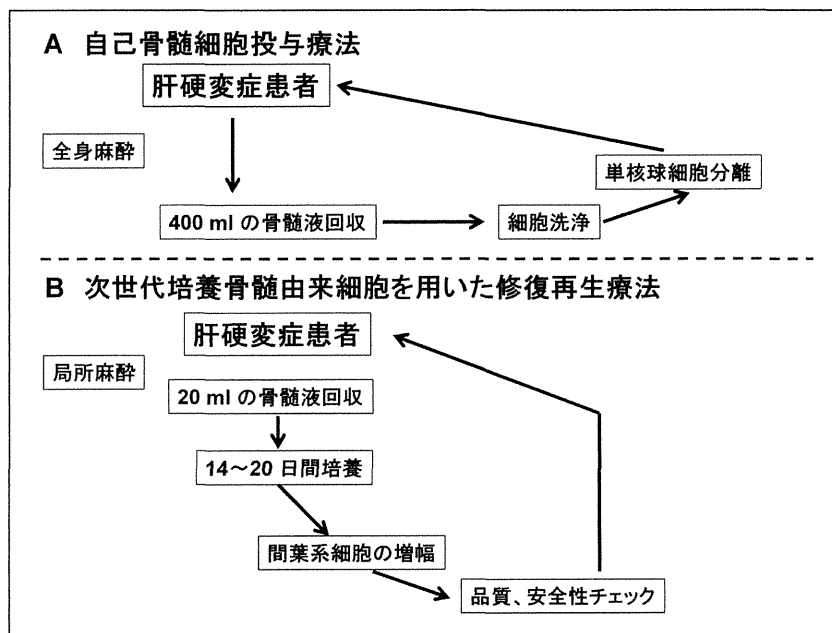


図2 (A) 自己骨髄細胞投与療法、(B) 次世代培養骨髄由来細胞を用いた修復再生療法。

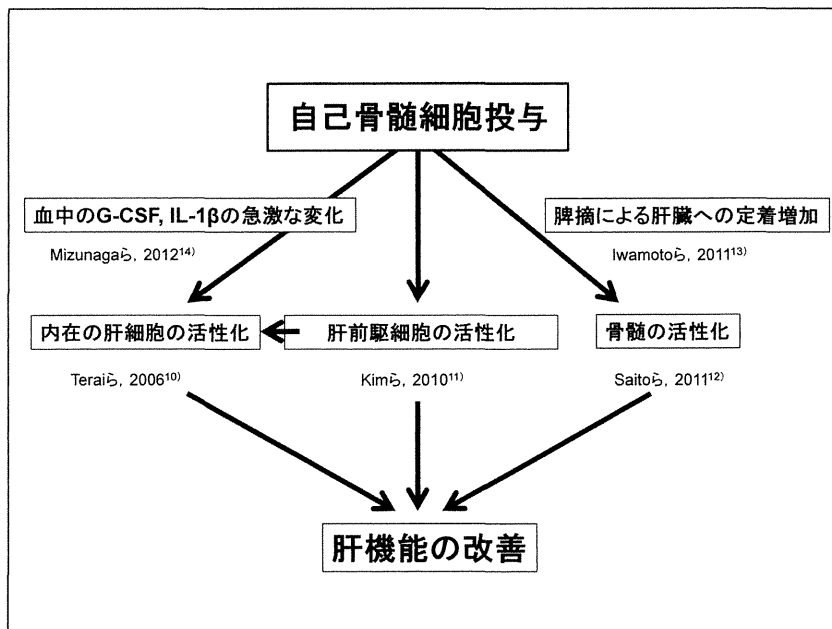


図3 臨床データから明らかになった自己骨髄細胞投与による生体反応

5. 基礎，臨床研究より明らかになったこと

A) 末梢から投与した骨髄細胞を肝臓により定着させるには？

臨床例および基礎研究より，末梢血管から投与した骨髄細胞の多くは，肺，脾臓，肝臓に定着するが，脾臓を摘出することにより，細胞は脾臓にトラップされることなくよ

り多くの細胞が肝臓に定着する<sup>13)</sup>。最近になり，放射能標識した間葉系細胞の動態をヒトで観察したところ，細胞投与直後は，まずは肺，次に脾臓，最後に肝臓に定着する結果が示された<sup>17)</sup>。このことから我々の検討で脾臓摘出により肝臓により多くの骨髄細胞が定着しその結果肝機能が改善することは理解しやすい<sup>17)</sup>。一方で，TNF-R1 ノックアウトマウスを用いた検討では，TNF-α シグナルが働か

ない末梢から投与した骨髄細胞は肝臓に定着されにくく、肝臓の機能改善は認めにくい<sup>18)</sup>。この結果はTNF- $\alpha$ シグナルの重要性を示すものである。実際に肝芽細胞の発生には炎症シグナルが重要であり再生と発生との共通性を示唆する<sup>19)</sup>。一方で組換えFGF2を骨髄細胞と同時投与した場合、肝臓への細胞定着は増加し、肝線維化、肝機能の改善を示した<sup>20,21)</sup>。rFGF2投与により骨髄細胞はTNF- $\alpha$ などの発現をより促進する結果も得ており共通のメカニズムが存在する可能性が示唆された。

## B) 骨髄細胞投与により誘導されるサイトカイン、活性化細胞

臨床と基礎研究の比較により、骨髄細胞投与により血中のG-CSFおよびIL-1 $\beta$ の変動が急激に起こることが明らかになった<sup>14)</sup>。この現象の理解としては、本来生体ない骨髄細胞が急激に投与されることで、生体内のサイトカインの動態に急激な変化が誘導されることを示唆する。特にG-CSF、IL-1 $\beta$ が大きく変動していた。実際に臨床研究での観察にて、自己骨髄細胞投与が、骨髄を活性化することが明らかになっている<sup>12)</sup>。一方で、GFP/CCl4モデルにて骨髄細胞投与により起こる遺伝子変化を解析したところ、初期に体の形成に関与する遺伝子群が活性化し、最終的には代謝系に関与する遺伝子群が変動すること<sup>22)</sup>、またこの過程で熱ショックタンパク質(HSP)、小胞体ストレスの活性化が起こることがGFP/CCl4モデルにて明らかになった<sup>23)</sup>。一方で、GFP/CCl4モデルではLiv2陽性肝芽細胞の出現、A6陽性肝前駆細胞の活性化が認められていた。さ

らに実際のヒトの臨床研究の結果より、自己骨髄細胞を投与することで、肝臓にてPCNA陽性肝細胞の増加<sup>10)</sup>、肝前駆細胞の活性化が明らかになってきた<sup>11)</sup>。このように骨髄細胞投与により硬変肝にて、肝前駆細胞の活性化、さらに内在の肝細胞の増殖が誘導されることが明らかになった(図4)。

## C) どの細胞が肝臓修復、再生に関与するか？

我々のGFP/CCl4モデル、ヒトで解析では、投与した細胞はヘテロな細胞集団であり、どの細胞が肝臓の再生、修復に最も重要であるかは、今後の次世代治療の開発において重要である。我々の基礎研究としては、Liv8(CD44)陰性画分が特に肝臓の再生に有用であるという結果を得た<sup>24,25)</sup>、一方でマクロファージ系細胞の有用性が示唆されている<sup>26)</sup>。ヒト臨床研究では、Mohamadnejadらは、非代償性肝硬変4例の自己骨髄細胞を採取し間葉系幹細胞を培養し、末梢静脈より投与した。有害事象はなく、24週時点のMELD scoreおよび肝容積はそれぞれ2例、3例で改善、健康関連QOL尺度(SF-36)は全例で改善していた<sup>27)</sup>。現時点ではどの細胞が最も効果があるかについては明確な結果はでていないが、さらに詳細を解析中である。

## 6. 今後の課題

現在の方法は、全身麻酔下にて400 mlの骨髄液を投与する。しかしながら、肝不全患者の中では、全身麻酔が困難で、ABMi療法の対象にならない患者が多い。この問題の解決には、局所麻酔で少量の骨髄液を採取し、その後肝

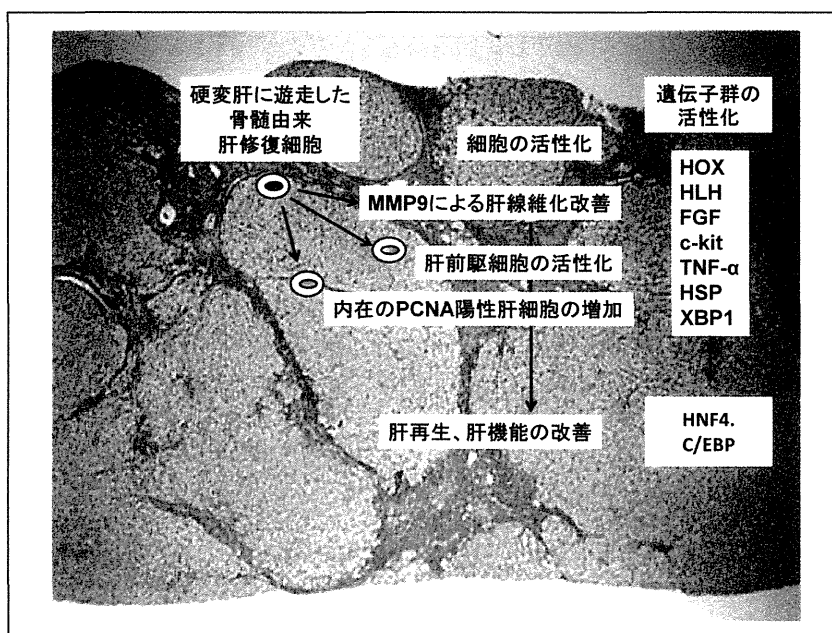


図4 硬変肝に遊走した骨髄由来細胞による硬変肝での細胞の活性化

硬変症の修復再生に有効な画分を増殖し、投与する方法の開発が求められる<sup>28)</sup>(図 2B)。現在我々は、培養自己骨髄由来細胞を用いた再生療法を開発を推進しており、ヒトの場合、間葉系細胞が治療に応用しやすいと考えている。この治療法は、今まで全身麻酔困難な患者に対しても適応拡大可能でありその開発は急務である。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、文部科学省、科学技術振興機構、厚生労働省の助成を受け行った。紙面を借り深謝いたします。また本プロジェクトは多くの共同研究者の助力により達成できたことを深謝いたします。

## 文 献

- 1) Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M., & Krause, D.S. (2000) *Hepatology*, 31, 235-240.
- 2) Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., & Wright, N.A. (2000) *Nature*, 406, 257.
- 3) Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., & Scott, E.W. (2002) *Nature*, 416, 542-545.
- 4) Terai, S., Sakaida, I., Yamamoto, N., Omori, K., Watanabe, T., Ohata, S., Katada, T., Miyamoto, K., Shinoda, K., Nishina, H., & Okita, K. (2003) *J. Biochem.*, 134, 551-558.
- 5) Terai, S., Sakaida, I., Nishina, H., & Okita, K. (2005) *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 12, 203-207.
- 6) Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H., & Okita, K. (2004) *Hepatology*, 40, 1304-1311.
- 7) Iimuro, Y., Nishio, T., Morimoto, T., Nitta, T., Stefanovic, B., Choi, S.K., Brenner, D.A., & Yamaoka, Y. (2003) *Gastroenterology*, 124, 445-458.
- 8) Higashiyama, R., Inagaki, Y., Hong, Y.Y., Kushida, M., Nakao, S., Niioka, M., Watanabe, T., Okano, H., Matsuzaki, Y., Shiota, G., & Okazaki, I. (2007) *Hepatology*, 45, 213-222.
- 9) Siller-Lopez, F., Sandoval, A., Salgado, S., Salazar, A., Bueno, M., Garcia, J., Vera, J., Galvez, J., Hernandez, I., Ramos, M., Aguilar-Cordova, E., & Armendariz-Borunda, J. (2004) *Gastroenterology*, 126, 1122-1133.
- 10) Terai, S., Ishikawa, T., Omori, K., Aoyama, K., Marumoto, Y., Urata, Y., Yokoyama, Y., Uchida, K., Yamasaki, T., Fujii, Y., Okita, K., & Sakaida, I. (2006) *Stem Cells*, 24, 2292-2298.
- 11) Kim, J.K., Park, Y.N., Kim, J.S., Park, M.S., Paik, Y.H., Seok, J.Y., Chung, Y.E., Kim, H.O., Kim, K.S., Ahn, S.H., Kim do, Y., Kim, M.J., Lee, K.S., Chon, C.Y., Kim, S.J., Terai, S., Sakaida, I., & Han, K.H. (2010) *Cell Transplant.*, 19, 1237-1246.
- 12) Saito, T., Okumoto, K., Haga, H., Nishise, Y., Ishii, R., Sato, C., Watanabe, H., Okada, A., Ikeda, M., Togashi, H., Ishikawa, T., Terai, S., Sakaida, I., & Kawata, S. (2011) *Stem Cells Dev.*, 20, 1503-1510.
- 13) Iwamoto, T., Terai, S., Mizunaga, Y., Yamamoto, N., Omori, K., Uchida, K., Yamasaki, T., Fujii, Y., Nishina, H., & Sakaida, I. (2011) *J. Gastroenterol.*, 47, 300-312.
- 14) Mizunaga, Y., Terai, S., Yamamoto, N., Uchida, K., Yamasaki, T., Nishina, H., Fujita, Y., Shinoda, K., Hamamoto, Y., & Sakaida, I. (2013) *Cell Transplant.*, 2012 Apr 10. [Epub ahead of print]
- 15) Peng, L., Xie, D.Y., Lin, B.L., Liu, J., Zhu, H.P., Xie, C., Zheng, Y.B., & Gao, Z.L. (2011) *Hepatology*, 54, 820-828.
- 16) Maeda, M., Takami, T., Terai, S., & Sakaida, I. (2012) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 27 (Suppl 2), 104-111.
- 17) Gholamrezaezhad, A., Mirpour, S., Bagheri, M., Mohamadnejad, M., Alimoghaddam, K., Abdolazadeh, L., Saghari, M., & Malekzadeh, R. (2011) *Nucl. Med. Biol.*, 38, 961-967.
- 18) Hisanaga, T., Terai, S., Iwamoto, T., Takami, T., Yamamoto, N., Murata, T., Matsuyama, T., Nishina, H., & Sakaida, I. (2011) *Cell Tissue Res.*, 346, 79-88.
- 19) Nishina, H., Vaz, C., Billia, P., Nghiem, M., Sasaki, T., De la Pompa, J.L., Furlonger, K., Paige, C., Hui, C., Fischer, K.D., Kishimoto, H., Iwatsubo, T., Katada, T., Woodgett, J.R., & Penninger, J.M. (1999) *Development*, 126, 505-516.
- 20) Ishikawa, T., Terai, S., Urata, Y., Marumoto, Y., Aoyama, K., Sakaida, I., Murata, T., Nishina, H., Shinoda, K., Uchimura, S., Hamamoto, Y., & Okita, K. (2006) *Cell Tissue Res.*, 323, 221-231.
- 21) Ishikawa, T., Terai, S., Urata, Y., Marumoto, Y., Aoyama, K., Murata, T., Mizunaga, Y., Yamamoto, N., Nishina, H., Shinoda, K., & Sakaida, I. (2007) *Cell Tissue Res.*, 327, 463-470.
- 22) Omori, K., Terai, S., Ishikawa, T., Aoyama, K., Sakaida, I., Nishina, H., Shinoda, K., Uchimura, S., Hamamoto, Y., & Okita, K. (2004) *FEBS Lett.*, 578, 10-20.
- 23) Marumoto, Y., Terai, S., Urata, Y., Matsumoto, T., Mizunaga, Y., Yamamoto, N., Jin, H., Fujisawa, K., Murata, T., Shinoda, K., Nishina, H., & Sakaida, I. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 546-552.
- 24) Yamamoto, N., Terai, S., Ohata, S., Watanabe, T., Omori, K., Shinoda, K., Miyamoto, K., Katada, T., Sakaida, I., Nishina, H., & Okita, K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 1110-1118.
- 25) 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. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 817-823.
- 26) Thomas, J.A., Pope, C., Wojtacha, D., Robson, A.J., Gordon-Walker, T.T., Hartland, S., Ramachandran, P., Van Deemter, M., Hume, D.A., Iredale, J.P., & Forbes, S.J. (2011) *Hepatology*, 53, 2003-2015.
- 27) Mohamadnejad, M., Namiri, M., Bagheri, M., Hashemi, S.M., Ghanaati, H., Zare Mehrjardi, N., Kazemi Ashtiani, S., Malekzadeh, R., & Baharvand, H. (2007) *World J. Gastroenterol.*, 13, 3359-3363.
- 28) 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. (2012) *J. Gastroenterol.*, 47, 491-497.



## 14. 肝臓の再生治療

山口大学医学部附属病院検査部 高見太郎

同 大学院医学系研究科消化器病態内科学准教授 寺井崇二

同 教授 坂井田功

**key words** liver cirrhosis, liver regeneration, stem cell, bone marrow cell

### 動 向

近年のインターフェロン療法の進歩や新規抗ウイルス剤の開発により、B型またはC型肝炎ウイルスによる慢性肝炎の段階であれば、多くの症例でウイルスを排除したり鎮静化させたりすることができ、その後の肝硬変や肝がんといった重篤な病態への進展を防ぐことが可能となってきた。さらにC型肝炎ウイルス排除を目的としたインターフェロン治療やB型肝炎ウイルスに対する核酸アナログ製剤治療にかかる医療費が公費助成されるなど、国の肝炎対策事業の整備も進んでいる。

しかしすでに進行した肝硬変症にはインターフェロンの適応はなく、非代償性肝硬変症をはじめとする重症肝疾患の現時点における根治療法は肝移植（生体肝移植あるいは脳死肝移植）であることに変わりはない。2010年7月には改正脳死臓器移植法が施行され、「本人が拒否していない限り家族（遺族）の同意で臓器提供ができる」ことになったが、依然として、慢性的ドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶や医療経済面などの諸問題は解決されておらず、対症療法のみで対応せざるを得ない非代償性肝硬変症例が多いのが実状である。したがって、これを補う新たな肝硬変症に対する再生治療・細胞療法の開発が求められている。肝移植以外の肝臓再生療法としては、増殖因子を用

いた治療法や細胞（肝細胞、骨髄由来細胞、肝組織固有幹細胞やiPS細胞）を用いた治療の可能性が考えられ、これまでも盛んに研究が行われている。

2000年にTheiseらが、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性患者の剖検例において、慢性炎症があった肝臓および消化管組織内にY染色体陽性細胞を確認したと報告したことから、骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された<sup>1)</sup>。これ以降、肝臓の再生治療・細胞療法に使用する細胞源として骨髄（幹）細胞が注目され、世界中で基礎・臨床研究が進められている<sup>2-5)</sup>。

これまでの臨床研究としての肝臓再生療法は、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を使ったものとしては、GordonらのG-CSFで誘導した自己末梢血CD34陽性細胞を門脈または肝動脈から投与したところ血清アルブミン値が上昇したとの報告<sup>6)</sup>、アルコール性肝硬変症に対するG-CSF投与が肝前駆細胞の増殖を促進させたとのSpahrらの報告や<sup>7)</sup>、Child-Pughスコアを改善させたとのPaiらの報告<sup>8)</sup>、またHanらによるB型肝炎に対するG-CSF投与の報告がある<sup>9)</sup>。しかしながら、G-CSF投与により健常人でも脾破裂を起こしたとの報告があることから、脾腫を

伴う肝硬変症例へのG-CSF投与には注意が必要である<sup>10)</sup>。またドイツからは、肝悪性腫瘍切除術後の残肝に自己CD133陽性細胞を経門脈投与する細胞療法の有効性が報告されている<sup>11,12)</sup>。

その一方で我々も、骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価マウスモデル「Green fluorescent protein (GFP) /carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)モデル; GFP/CCl<sub>4</sub>モデル」を確立し、これまでに、慢性炎症という環境下において、ドナー由来の骨髄細胞が門脈域周囲の線維に沿って生着しmatrix metalloproteinase (MMP) 2および9などのコラゲナーゼを産生することで既存の肝線維の溶解に働き、肝合成能・肝線維化・生命予後を有意に改善させることを報告してきた<sup>13-16)</sup>。さらに2003年11月からは、これらの基礎研究成果を基盤にした臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 autologous bone marrow cell infusion therapy (ABMi療法)」を開始し<sup>17)</sup>、2005年からは多施設臨床研究(Liver regeneration with cell transplantation study)を開始した<sup>18,19)</sup>。また韓国延世大学のKimらは

非代償性B型肝硬変症を対象にABMi療法を施行し、血清アルブミン値の上昇やChild-Pughスコアが改善したと報告し、そのメカニズムとして経時的な肝生検からhepatic progenitor cell (HPC)を活性化させる可能性が示唆された<sup>20)</sup>。さらには山形大学の齊藤らはアルコール性肝硬変症に対するABMi療法の有効性と安全性を報告した<sup>21)</sup>。

以下、これまで我々が行ってきたABMi療法の開発状況、そして今後の展望について概説する。

### A. 基礎研究; 骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖モデル(GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)

我々は、四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)による肝細胞直接障害モデルを用いて基礎研究を進めてきた。我々が開発し報告してきたマウスGFP/CCl<sub>4</sub>モデルの特徴は以下である<sup>13,15)</sup>(図1)。

- 1) 四塩化炭素の反復投与により慢性肝障害環境下にあること、
- 2) 骨髄移植後も四塩化炭素投与を継続し、この炎症環境を維持すること、

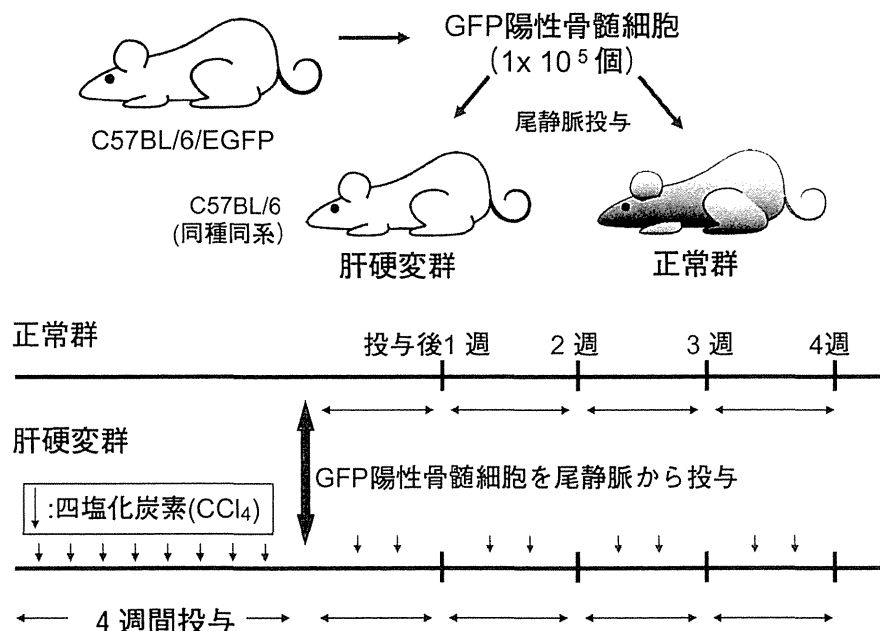


図1 骨髄細胞の肝細胞への分化評価モデルとしてのマウスGFP/CCl<sub>4</sub>モデル

3) 自家骨髄移植を想定して、レシピエントと同種同系の GFP transgenic mouse をドナーとしたこと、である。

本モデルでは、6週齢の C57BL/6 マウス (雌) に四塩化炭素 (1.0ml/kg) を4週間 (計8回) 腹腔内に反復投与し、慢性肝障害 (肝硬変) モデルを作成しレシピエントとした。これに同種同系 GFP transgenic mouse (雄; ドナー) の大腿骨より分離した全骨髄細胞を洗浄後、尾静脈 (末梢静脈) から投与した。この後も四塩化炭素投与は同様に継続したうえで、経時的に肝機能改善効果を評価した。

骨髄細胞を投与することにより、血清アルブミン値の改善 (図2b)<sup>13)</sup>、生存率の有意な上昇 (図2d)、さらには、Sirius-red 染色における肝線維

の減少 (図2c) が認められた<sup>14)</sup>。またこの過程で、骨髄由来 GFP 陽性細胞が matrix metalloproteinase (MMP) 2 および 9 などのコラゲナーゼを産生することで、肝線維の溶解に働くことを確認した<sup>14)</sup>。これらの基礎研究結果から、慢性肝障害環境下に自己骨髄細胞を末梢静脈から投与することにより、レシピエントの肝合成能・肝線維化さらには生命予後を改善させたと考えられた (図2)。さらにその後の検討により、本過程に関与する因子として線維芽細胞増殖因子 (FGF) が重要な働きをすることも明らかとなった<sup>22)</sup>。さらに自己骨髄細胞投与の早期には HOX や HLH 型転写因子が誘導され<sup>23)</sup>、血清マーカーとして Apo 蛋白の血清中への誘導も確認されている<sup>24)</sup>。

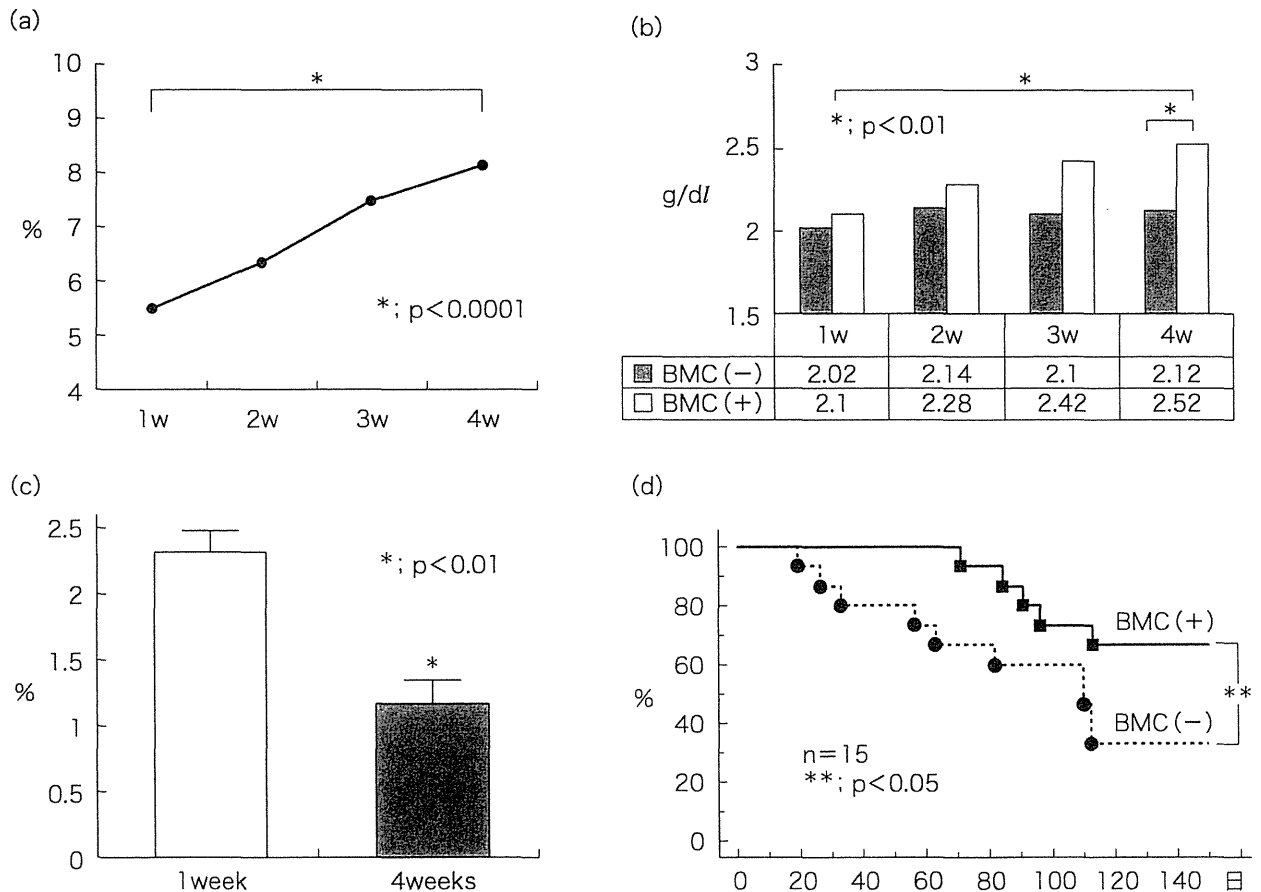


図2 マウス GFP/CCl<sub>4</sub> モデルにおける肝機能改善

(a) GFP 陽性細胞占有率(%), (b)血清アルブミン値(g/dl), (c)Sirius-red 染色による肝線維(%), (d)生存率(%)

## B. 臨床研究; 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)

マウスGFP/CCl<sub>4</sub>モデルの基礎研究を基盤として、2003年11月より臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (autologous bone marrow cell infusion therapy, ABMi療法)」を開始した。この臨床研究の適応条件などの詳細は以下のとおりである。

### 対象疾患：

肝硬変症

### 治療適応基準：

- 1) 総ビリルビン値; 3.0mg/dl以下
- 2) 血小板数;  $5.0 \times 10^{10}/l$ 以上
- 3) 食道胃静脈瘤および肝細胞癌のコントロールが良好である
- 4) 心肺機能が良好で、その他に重篤な併存疾患が認められない
- 5) CTやMRIなどの画像診断にて肝細胞癌が存在しないこと

### プロトコール：

全身麻酔下に自己骨髄細胞を400ml採取する。採取した骨髄液は濃縮洗浄し、さらにその骨髄液はGMPグレード設備が完備された再生・細胞療

法センターでSOP(Standard Operating Procedures)に準じて骨髄単核球細胞を精製濃縮し、患者本人の末梢静脈より点滴投与する。細胞投与後は6カ月間経過観察を行い、血液生化学検査、肝組織検査(肝生検)、腹部超音波検査や腹部CT検査により安全性および有効性の評価を行う。また経過観察中は、内服薬剤、抗ウイルス剤などは変化させない<sup>17)</sup>。

### 結果：

骨髄細胞投与後6カ月間経過観察可能であった症例については、投与6カ月後の血清アルブミン値、総蛋白値やChild-Pughスコアは有意に改善していた<sup>17)</sup>。さらに15カ月間経過観察可能であった9例でも同様の改善効果を認めた(図3)。2011年7月現在、山口大学で19症例を経験しているが特に問題となる有害事象の発生はなかった<sup>18)</sup>。さらに我々が開発したこのABMi療法は、山形大学で6例(山口大学チームと共同実施)<sup>21)</sup>、韓国の延世大学で10例の追試が行われ安全性および有効性が報告された<sup>20)</sup>。このように多施設臨床研究の結果、ABMi療法および自己骨髄細胞を用いた治療の安全性や効果が確認されてきたといえる。

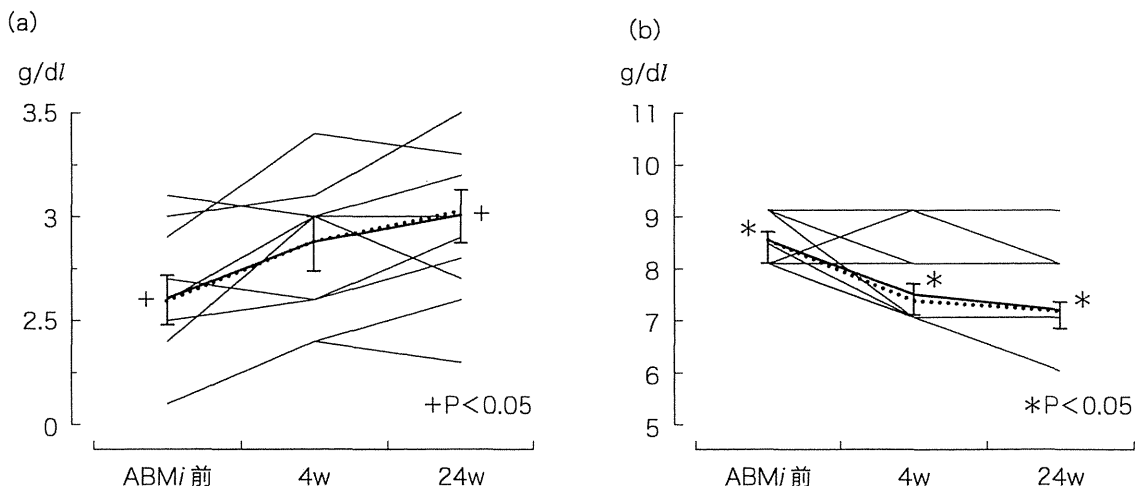


図3 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)における肝機能改善

(a)血清アルブミン値(g/dl): 太実線が平均値<sup>17)</sup>, (b)Child-Pughスコア(点): 太実線が平均値<sup>17)</sup>

## むすび

肝硬変症に対する骨髄（幹）細胞を用いた再生治療・細胞療法の報告は、我々のABMi療法<sup>17,18)</sup>だけでなく、肝移植待機例10例に対して腸骨から採取した自己骨髄細胞を肝動脈から投与し血清アルブミン値の上昇と血清ビリルビン値の低下を認めたとのLyraらの報告<sup>25)</sup>、さらには培養自己間葉系幹細胞投与により肝機能が改善したとの報告<sup>26,27)</sup>などがある。またPengらはB型非代償性肝硬変症を対象とした自己骨髄細胞投与療法の長期観察で、肝細胞癌の発生は細胞投与群で低い傾向であったと報告しており興味深い<sup>28)</sup>。

しかし一方で、培養自己間葉系幹細胞を肝動脈から投与するPhase I臨床研究において、造影剤投与が原因と考えられる腎不全による死亡例があったとMohamadnejadらは報告している<sup>29)</sup>。このことは治療適応基準を明確にすることはもちろん、より侵襲の少ない治療法の開発が必要であることを示唆している。

今後、肝臓再生療法の有効性をより明確化するためには、randomized controlled studyの臨床研究が必要になっていくものと考えられる。その一方で基礎研究では、骨髄細胞群から治療効果を有する細胞を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることが重要となる。少量の骨髄液から肝再生・修復作用を有する細胞を分離培養し再投与することができれば、全身麻酔下に骨髄液を採取する必要がなくなるため、適応は拡大し、さらには凍結保存した培養細胞を分割投与することも不可能ではなくなるかもしれない。しかし実際に自己骨髄由来培養細胞を扱うには、培養細胞の安全性評価ガイドラインが必要で、GMP基準cell processing centerでSOPに準拠したシステムが必須となる。このように今後は、これまでに確認された肝硬変に対する骨髄（幹）細胞投与による肝機能改善効果を基盤にして、より低侵襲な骨髄由来培養細胞を用いた新たな治療法の開発が必要

になると考えている。

## 文献

- 1) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000; 32(1): 11-6.
- 2) Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology*. 2008; 135(2): 438-50.
- 3) Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA, et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant*. 2009; 18(12): 1261-79.
- 4) Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl*. 2010; 16(2): 118-29.
- 5) Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl*. 2010; 16(7): 827-36.
- 6) Gordon MY, Levicar N, Pai M, et al. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*. 2006; 24(7): 1822-30.
- 7) Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology*. 2008; 48(1): 221-9.
- 8) Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103(8): 1952-8.
- 9) Han Y, Yan L, Han G, et al. Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis: peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy. *Cytotherapy*. 2008; 10(4): 390-6.
- 10) Falzetti F, Aversa F, Minelli O, et al. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor. *Lancet*. 1999; 353(9152): 555.
- 11) am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support

- hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005; 23(4): 463-70.
- 12) Furst G, Schulte am Esch J, Poll LW, et al. Portal vein embolization and autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology*. 2007; 243(1): 171-9.
  - 13) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring the transdifferentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*. 2003; 134(4): 551-8.
  - 14) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2004; 40(6): 1304-11.
  - 15) Terai S, Sakaida I, Nishina H, et al. Lesson from the GFP/CCl<sub>4</sub> model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005; 12(3): 203-7.
  - 16) Takami T, Terai S, Sakaida I. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Current state and future prospects for our liver regeneration therapy using autologous bone marrow cells for decompensated liver cirrhosis patients. *J Pharmacol Sci*. 2011; 115(3): 274-8.
  - 17) 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*. 2006; 24(10): 2292-8.
  - 18) Terai S, Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res*. 2008; 38 (s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan): S72-S5.
  - 19) Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011; 18(1): 23-5.
  - 20) Kim JK, Park YN, Kim JS, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant*. 2010; 19(10): 1237-46.
  - 21) Saito T, Okumoto K, Haga H, et al. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev*. 2011 May 11. [Epub ahead of print]
  - 22) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al. Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res*. 2006; 323(2): 221-31.
  - 23) Omori K, Terai S, Ishikawa T, et al. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett*. 2004; 578(1-2): 10-20.
  - 24) Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, et al. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics*. 2006; 6(8): 2564-70.
  - 25) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(7): 1067-73.
  - 26) Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med*. 2007; 10(4): 459-66.
  - 27) Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 21(10): 1199-205.
  - 28) Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011 May 23. [Epub ahead of print]
  - 29) Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al. Phase I human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(24): 3359-63.

## 4 その他—肝病態理解のために

# 2. 肝再生医学のトランスレーショナル・リサーチ

高見 太郎, 寺井 崇二, 坂井田 功

### 重要なポイント

- 肝硬変症に対して自己の骨髄単核球細胞, G-CSF 誘導末梢血 CD34 陽性細胞や骨髄間葉系幹細胞投与による肝再生療法が実施され, 一部症例で改善報告あり.
- エビデンスレベルの高い有効性を示すためには, Randomized Controlled Trial の実施が求められる.
- 低侵襲な骨髄由来培養細胞を用いた新たな治療法の開発が求められる.

## I. 肝再生医学の現状

### 1. 肝再生療法の必要性

最近のインターフェロン療法の進歩や新規抗ウイルス薬の開発により, B 型または C 型肝炎ウイルスによる進行した肝硬変でなければ, 多くの症例でウイルスの排除や鎮静化が可能となり, その後の肝硬変や肝臓といった重篤な病態への進展を防ぐことができるようになった. さらに, C 型肝炎ウイルス排除を目的としたインターフェロン治療や B 型肝炎ウイルスに対する核酸アナログ製剤治療にかかる医療費に対しても公費助成されるなど, 国の肝炎対策事業の整備も進んでいる. しかしすでに進行した肝硬変にはインターフェロンの適応はなく, 非代償性肝硬変をはじめとする重症肝疾患の現時点における根治療法は肝移植(生体肝移植あるいは脳死肝移植)であることに変わりはない. 2010 年 7 月には改正脳死臓器移植法が施行され, 「本人が拒否していないかぎり家族(遺族)の同意で臓器提供ができる」ことにな

ったが, 依然として, 慢性的ドナー不足, 手術侵襲, 免疫拒絶や医療経済面などの諸問題は解決されておらず, 対症療法のみで対応せざるをえない症例が多い. したがって, 肝硬変に対する再生療法の開発が求められている.

### 2. 骨髄(幹)細胞による肝再生療法

2000 年に Theise らが, 男性ドナーから骨髄移植を受けた女性患者の剖検例において, 慢性炎症があった肝臓および消化管組織内に Y 染色体陽性細胞を確認したと報告したことから, 骨髄細胞中には多分化能を有する幹細胞が存在することが示唆された<sup>1)</sup>. これ以降, 肝再生療法に使用する細胞源として骨髄(幹)細胞が注目され, 世界中で基礎・臨床研究が進められている<sup>2)~4)</sup>.

### 3. 四塩化炭素を用いた基礎研究

われわれは, 四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)による肝細胞直接障害モデルを用いて基礎研究を進めてきた. われわれのマウス Green fluorescent protein/carbon tetrachloride モデル(マウス GFP/CCl<sub>4</sub>モデル)

の特徴<sup>7,8)</sup>は、① 四塩化炭素の反復投与により慢性肝障害環境下にあること、② 骨髄細胞投与後も四塩化炭素投与を継続し、この炎症環境を維持すること、③ 自家骨髄細胞投与を想定して、同種同系の GFP トランスジェニックマウスをドナーとしたこと、である。

本モデルでは、6週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 (1.0 ml/kg) を4週間 (計8回) 腹腔内反復投与することで慢性肝障害 (肝硬変) 状態とし、これをレシピエントとした。これに同種同系 GFP トランスジェニックマウス大腿骨から分離した全骨髄細胞を、洗浄後に末梢静脈である尾静脈から投与した。この後も四塩化炭素投与は同様に継続したうえで、経時的に肝機能改善効果を評価した。

骨髄細胞を投与することにより、血清アルブミン値の改善 (図 1-4-3b)<sup>7)</sup>、生存率の有意な上昇 (図 1-4-3d) さらにシリウスレッド染色で評価した肝線維の減少 (図 1-4-3c) が認められた<sup>9)</sup>。また投与した骨髄細胞は肝障害がないマウス肝臓には生着しないものの、四塩化炭素による持続肝障害環境下で投与した骨髄細胞は投与後1日目から門脈域周囲の線維に沿って生着し、さらに週を追うごとに既存の線維の中にも観察された (図 1-4-4)<sup>9)</sup>。またこの過程で、障害肝に生着した骨髄由来 GFP 陽性細胞が Matrix Metallo Proteinase (MMP) 9 などのコラゲナーゼを産生し、肝線維の溶解に働くことを確認した<sup>9)</sup>。

これらの基礎研究結果から、慢性肝障害環境下に自己骨髄細胞を末梢静脈から投与することにより、レシピエントの肝合成能・肝線維化さらには生命予後までも改善させたと考えた。さらにその後の検討により、本過程に関与する因子として線維芽細胞増殖因子 (FGF) が重要な働きをすることも明らかとなった<sup>10)</sup>。また高発癌肝硬変マウスに対して骨髄細胞を頻回投与したモデル系において、肝発癌は有意に抑制されることが示され、このことは肝移植以外では根治できないような肝硬変患者に対して積極的に自己骨髄細胞を用いた肝再生療法を行っていくうえで安全性の根拠とな

る<sup>11)</sup>。

## II. 臨床応用

これまでに論文報告されたおもな自己 (幹) 細胞を用いた肝再生療法の概要を表 1-4-1 にまとめた<sup>9)</sup>。進行した肝硬変症に対する臨床研究としての肝再生療法は、G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) を使ったものとしては、Gordon らの G-CSF で誘導した自己末梢血 CD34 陽性細胞を門脈または肝動脈から投与したところ血清アルブミン値が上昇したとの報告<sup>12)</sup>、アルコール性肝硬変症に対する G-CSF 投与が肝前駆細胞の増殖を促進させたとの Spahr らの報告<sup>13)</sup> や、Child-Pugh スコアを改善させたとの Pai らの報告<sup>14)</sup>、また Han らによる B 型肝硬変症に対する G-CSF 投与の報告がある<sup>15)</sup>。しかしながら、G-CSF 投与により健常人でも脾破裂を起こしたとの報告があることから、脾腫を伴う肝硬変症例への G-CSF 投与には注意が必要である<sup>16)</sup>。またドイツからは、肝悪性腫瘍切除術後の残肝に自己 CD133 陽性細胞を経門脈投与する細胞療法の有効性が報告されている<sup>17), 18)</sup>。われわれもマウス GFP/CCl<sub>4</sub> モデル研究成果を基盤に 2003 年 11 月から、「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy; ABMi 療法)」の臨床研究を開始し<sup>19)</sup>、2005 年からは多施設臨床研究を開始した<sup>20), 21)</sup>。

この臨床研究の適応条件などの詳細を以下に示す。

### 1. 対象疾患

肝硬変症

### 2. 治療適応基準

- 1) 総ビリルビン値は 3.0 mg/dl 以下。
- 2) 血小板数は  $5.0 \times 10^9/l$  以上。
- 3) 食道胃静脈瘤および肝細胞癌のコントロールは良好。
- 4) 心肺機能が良好で重篤な併存疾患を認めな



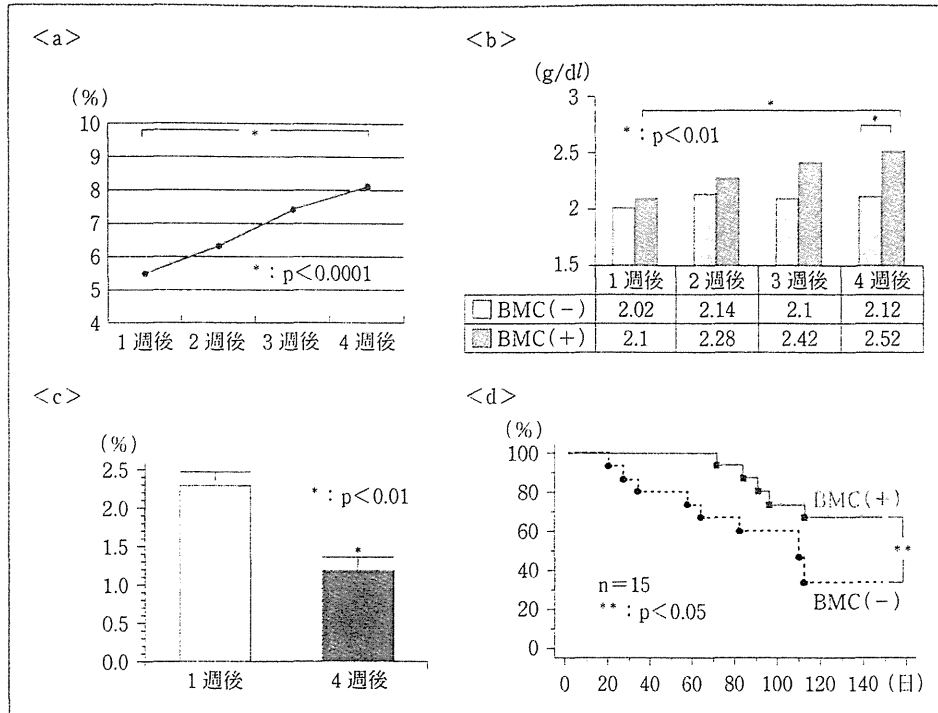


図 1-4-3 マウス GFP/CCl<sub>4</sub> モデルにおける自己骨髄細胞投与の効果

- a : GFP 陽性細胞の面積占有率 (%). 投与骨髄細胞の慢性障害肝への生着を GFP 陽性細胞の面積占有率で評価したところ, 経時的に増加していた.
- b : 血清アルブミン値 (g/dl). 骨髄細胞投与後のレシピエントマウスにおける血清アルブミン値を測定した. 骨髄細胞投与群である BMC (+) において血清アルブミン値は漸増しており肝合成能の改善効果を認めた.
- c : シリウスレッド染色陽性面積率 (%). 骨髄細胞投与後の肝線維化をシリウスレッド染色で評価した. 骨髄細胞投与により肝線維化は有意に改善された.
- d : 生存率 (%). 骨髄細胞投与マウスにおいて生存率は有意に改善された.

[Terai S, et al: J Biochem 2003; 134: 551-558<sup>7</sup>, Sakaida I, et al: Hepatology 2004; 40: 1304-1311<sup>8</sup> より引用]

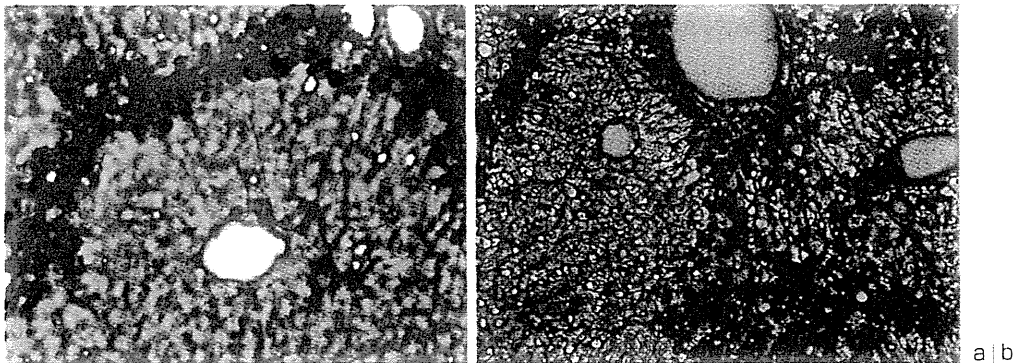


図 1-4-4 マウス GFP/CCl<sub>4</sub> モデルの肝線維化と投与骨髄細胞の局在

- a : 骨髄細胞投与 2 週後の肝線維をシリウスレッド染色 (赤色) で, 投与骨髄細胞の局在を GFP 免疫染色 (黒色) で評価したもの. 肝線維束に沿って投与骨髄細胞が生着している.
- b : 骨髄細胞投与 4 週後, 肝線維束の中に生着した投与骨髄細胞が確認でき, 肝線維の沈着量も減少している. [Sakaida I, et al: Hepatology 2004; 40: 1304-1311<sup>8</sup> より引用]

表 1-4-1 論文報告されたおもな肝再生療法 (すべて自己由来細胞)

投与細胞の種類	投与細胞数	改善効果	対象症例	文献番号
CD34 陽性細胞 (G-CSF 誘導末梢血由来)	$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$	血清アルブミン・ ビリルビン改善	5 Alcohol	12
5 日間 G-CSF 投与のみ	記載なし	血清 HGF 上昇 肝 Ki67 <sup>+</sup> /CK7 <sup>+</sup> 細胞増加	24 Alcohol (うち 11 コントロール)	13
培養 CD34 陽性細胞 (G-CSF 誘導末梢血由来)	平均 $2.3 \times 10^8$	血清アルブミン・ Child-Pugh スコア改善	9 Alcohol	14
末梢血単核球細胞 (G-CSF 誘導末梢血由来)	$10^7 \sim 10^8$ /kg	血清アルブミン・ Child-Pugh スコア改善	40 HBV (うち 20 コントロール)	15
骨髓単核球細胞 : ABMi 療法	$5.20 \pm 0.63 \times 10^9$	血清アルブミン・ Child-Pugh スコア改善	5 HCV, 3 HBV, 1 成因不明	19
骨髓単核球細胞 : ABMi 療法	$0.48 \sim 1.48 \times 10^8$ /kg	肝 CK7 陽性細胞増加 肝容量増加 Child-Pugh スコア改善	10 HBV	22
骨髓単核球細胞 : ABMi 療法	$8.0 \pm 7.3 \times 10^9$	血清アルブミン・PT% Child-Pugh スコア改善	10 Alcohol (うち 5 コントロール)	23
骨髓単核球細胞 (MSC 含む)	記載なし	血清アルブミン・ ビリルビン・PT% MELD スコア改善 HCC 増加なし	158 HBV (うち 105 コントロール)	24
骨髓単核球細胞	$>1 \times 10^8$	血清アルブミン・ ビリルビン改善	10	25
骨髓単核球細胞	$3.78 \pm 2.69 \times 10^8$	血清アルブミン・ ビリルビン・ Child-Pugh スコア改善	30 (うち 15 コントロール)	28
骨髓由来 CD133 陽性細胞	$2.4 \sim 12.3 \times 10^6$	肝切除後の肝容量増加	6 肝癌 (うち 3 コントロール)	17
骨髓由来 CD34 陽性細胞	平均 $5.25 \times 10^6$ (CD34, 90.5%)	造影剤による腎不全死亡 (1 例)	1 HBV, 1 PBC 1 AIH, 1 成因不明	27
培養骨髓由来 MSC	平均 $31.7 \times 10^6$	MELD スコア改善 (ただし 2 例のみ)	3 成因不明, 1 AIH	26
培養骨髓由来 MSC	$3 \sim 5 \times 10^7$	MELD スコア・ 血清クレアチニン改善	4 HBV, 2 成因不明 1 HCV	29
HGF 含有培地培養 MSC	$2 \times 10^8$	MELD スコア改善	40 HCV (うち 20 コントロール)	30

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor, HGF : hepatocytes growth factor, PT : prothrombin time, MSC : mesenchymal stem cell, MELD : Model for End Stage Liver Disease

(Takami T, et al : Curr Opin Gastroenterol 2012 ; 28(3) : 203-208<sup>ii</sup> 表 1 より改変)

い.

- 5) CT や MRI などの画像診断で肝細胞癌が存在しない。

### 3. プロトコル

全身麻酔下に自己骨髓細胞を 400 ml 採取する。採取した骨髓液は濃縮洗浄し、さらにその骨髓液

は GMP グレード設備が完備された再生・細胞療法センターで SOP (Standard Operating Procedures) に準じて骨髄単核球細胞を精製濃縮し、採取同日に患者本人の末梢静脈から点滴投与する。細胞投与後は 6 カ月間経過観察を行い、血液生化学検査、肝組織検査 (肝生検)、腹部超音波検査や腹部 CT 検査により安全性および有効性の評価を行う。また経過観察中は、内服薬剤、抗ウイルス薬などの変更は行わない<sup>19)</sup>。

#### 4. 結果

骨髄細胞投与後 6 カ月間経過観察可能であった症例については、投与 6 カ月後の血清アルブミン値、総蛋白値や Child-Pugh スコアは有意に改善していた<sup>19)</sup>。さらに 15 カ月間経過観察可能であった 9 例でも同様の改善効果を認めた (図 1-4-5)。2012 年 3 月現在、山口大学で 19 症例を経験しているが、とくに問題となる有害事象の発生はなかった<sup>20)</sup>。さらに 2011 年には、非代償性 B 型肝硬変を対象とした ABMi 療法が血清アルブミン値や Child-Pugh スコアを改善させたとの報告が Kim らによりなされ、そのメカニズムとして経時的な肝生検から Hepatic Progenitor Cell (HPC) を活性化させる可能性が示唆された<sup>21)</sup>。さらにア

ルコール性肝硬変に対する ABMi 療法の有効性と安全性が Saito らにより報告された<sup>22)</sup>。また Peng らは、527 人の B 型肝硬変症を対象に、120 ml の自己骨髄単核球細胞 (間葉系幹細胞を含む) を肝動脈から投与する 53 人の群と、投与しない 105 人の群に分けた。解析の結果、骨髄投与により副作用はなかった。短期間 (1~48 週) 観察した群と長期間 (192 週まで) 観察した群に分け解析を行った結果、早期には肝機能の改善を確認した。また長期観察では、骨髄細胞投与による肝細胞癌の発生率に変化はなく、生存率を改善させる可能性が示唆された<sup>23)</sup>。このように、自己骨髄由来細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法の有効性が強く示唆されている。

われわれの ABMi 療法だけではなく、肝硬変に対する骨髄 (幹) 細胞を用いた再生治療・細胞療法との報告としては、肝移植待機例 10 例に対して腸骨から採取した自己骨髄細胞を肝動脈から投与し、血清アルブミン値の上昇と血清ビリルビン値の低下を認めたとの Lyra らによる報告がある<sup>24)</sup>。さらに Mohamadnejad らは、自己骨髄細胞中の間葉系幹細胞を培養し末梢静脈より投与することにより一部の例で改善することを示した<sup>25)</sup>。しかし一方で、骨髄由来 CD34 陽性細胞を肝動脈

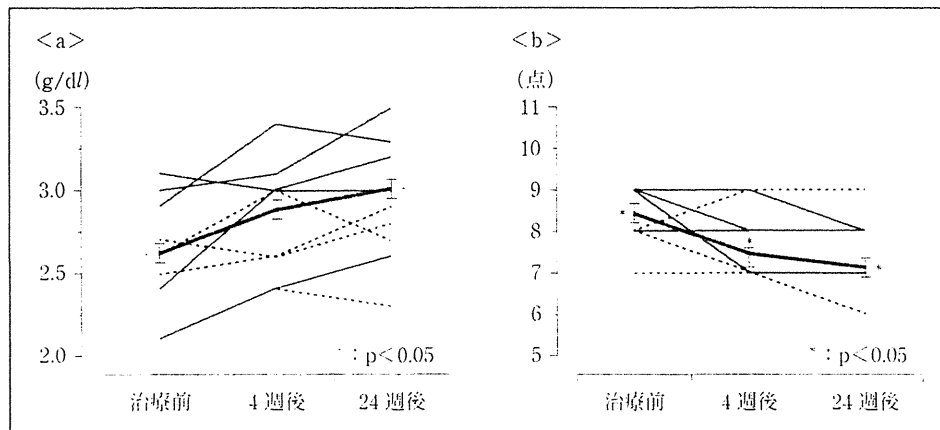


図 1-4-5 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABMi 療法) における肝機能改善  
a: 血清アルブミン値 (g/dl), b: Child-Pugh スコア値 (点)。

ABMi 療法の治療効果を血清アルブミン値と Child-Pugh スコア値で評価したところ、治療後 6 カ月において有意に血清アルブミン値は増加し、肝機能も改善されていた。いずれも太実線が平均値。〔Terai S, et al: Stem Cells 2006; 24: 2292-2298<sup>19)</sup> より引用〕

から投与する Phase I 臨床研究において、造影剤投与が原因と考えられる腎不全による死亡例があったと Mohamadnejad らは報告している<sup>27)</sup>。このことは治療適応基準を明確にすることはもちろん、より侵襲の少ない治療法の開発が必要であることを示唆している。

今後、エビデンスレベルの高い有効性を示すためには Randomized Controlled Trial の実施が必要になると考えられる。またその一方で、骨髄細胞

群から治療効果を有する細胞を同定し、その作用機構を明らかにすることも重要である。少量の骨髄液から肝再生・修復作用を有する細胞を分離培養し再投与することができれば、全身麻酔下に骨髄液を採取する必要がなくなるため、適応は拡大し、さらには凍結保存した培養細胞を分割投与することも不可能ではない。したがって今後は、低侵襲な骨髄由来培養細胞を用いた新たな治療法の開発も求められる。

## 文 献

- 1) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000 ; 32 : 11-16
- 2) Houlihan DD, Newsome PN : Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 438-450
- 3) Gilchrist ES, Plevis JN : Bone marrow-derived stem cells in liver repair : 10 years down the line. *Liver Transpl* 2010 ; 16 : 118-129
- 4) Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ : Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl* 2010 ; 16 : 827-836
- 5) Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA, et al : Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant* 2009 ; 18 : 1261-1279
- 6) Takami T, Terai S, Sakaida I : Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012 ; 28(3) : 203-208
- 7) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al : An in vivo model for monitoring the transdifferentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003 ; 134 : 551-558
- 8) Terai S, Sakaida I, Nishina H, et al : Lesson from the GFP/CCl<sub>4</sub> model-translational research project : the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005 ; 12 : 203-207
- 9) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004 ; 40 : 1304-1311
- 10) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al : Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res* 2006 ; 323 : 221-231
- 11) Maeda M, Takami T, Terai S, et al : Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012 ; 27 (Suppl 2) : 104-111
- 12) Gordon MY, Levicar N, Pai M, et al : Characterization and clinical application of human CD34<sup>+</sup> stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006 ; 24 : 1822-1830
- 13) Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, et al : Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis : a randomized trial. *Hepatology* 2008 ; 48 : 221-229
- 14) Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al : Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2008 ; 103 : 1952-1958
- 15) Han Y, Yan L, Han G, et al : Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis : peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy. *Cytotherapy* 2008 ; 10 : 390-396
- 16) Falzetti F, Aversa F, Minelli O, et al : Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilization in a healthy donor. *Lancet* 1999 ; 353 : 555
- 17) am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al : Portal application of autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow cells to the liver : a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005 ; 23 : 463-470
- 18) Furst G, Schulte am Esch J, Poll LW, et al : Portal vein embolization and autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow stem cells for liver regeneration : initial experience. *Radiology* 2007 ; 243 : 171-179
- 19) 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* 2006 ; 24 : 2292-2298
- 20) Terai S, Sakaida I : Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res* 2008 ; 38 (The 6 Japan Society of Hepa-