

平成 24～26 年度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))
総合研究報告書

「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、同年 9 月に先進医療 B における変更手続きを完了し、**12 月 12 日に第 1 例目を自己骨髄細胞投与群として実施し、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 例目を自己骨髄細胞投与群として実施し、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成し、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成した。

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 24 ~ 26 年度に「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を行った。

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, Zaitso 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. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 寺井崇二, 坂井田功 自己骨髄細胞投与による肝再生、修復治療、生化学、2012; 84(8): 707-11
 8. 高見太郎, 坂井田功 肝硬変 Update「自己骨髄細胞投与による肝修復再生療法」、医学のあゆみ、2012; 240(9): 804-808
 9. 前田雅喜, 高見太郎, 藤澤浩一、山本直樹, 寺井崇二, 坂井田功 マウス肝硬変高発癌モデルにおける自己骨髄細胞投与の影

響、分子生物学が可能とした個別化医療
(第19回浜名湖シンポジウム) 2012:
165-170

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Tanimoto H, Terai S, Takami T,
Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N,
Sakaida I. Improvement of liver fibrosis
by infusion of cultured cells derived from
human bone marrow. Cell Tissue Res.
2013;354(3):717-28.

14. Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y,
Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N,
Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I.
Canine mesenchymal stem cells show
antioxidant properties against
thioacetamide-induced liver injury in
vitro and in vivo. Hepatol Res.
2014;44(10):E206-17.

15. 高見太郎、寺井崇二、坂井田功 肝臓
の再生療法、Annual Review 消化器 2014、
中外医学社、p187-193.

16. 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]

17. 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.

18. 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, 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, サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

15. Terai S, Takami T, Sakaida I. Development of new cell therapy using bone marrow derived cell for liver cirrhosis patients. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference Agenda. 2013 Jun. Bethesda, MD, USA.
16. Terai S, Sakaida I. Development of New Cell Therapy for Liver Cirrhosis. The 23rd Conference of APASL. 2013 Jun. Singapore.
17. Takami T, Terai S, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patients. 2nd International Conference on Gastroenterology & Urology. 2013 Jun. Northbrook, IL, USA.
18. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Tanimoto H, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies using human and canine bone marrow derived mesenchymal stem cells for the development of a less invasive liver. 11th Annual meeting of ISSCR. 2013 Jun. Boston, MA, USA.
19. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells (20th JSRH). 2013 Sep. Osaka, Japan.
20. Terai S, Takami T, Sakaida I. The development of a less-invasive liver regeneration therapy using cultured bone marrow derived cells for cirrhotic patient. JDDW2013. 2013 Oct. Kobe, Japan.
21. Takami T, Terai S, Quintanilha LF, Fujisawa K, Yamamoto N, Sakaida I. Basic studies for a less invasive liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. The liver meeting 2013, AASLD. 2013 Nov. Washington D.C., USA.
22. Takami T, Terai S, Sakaida I. Liver regeneration therapy for liver cirrhosis using cultured autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells with stabilization of redox homeostasis. Choshu International Liver Symposium 2014. 2014 Jan. Ube, Yamaguchi, Japan.
23. 高見太郎, 寺井崇二, 村田泰彦, 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およびIL-8の発現検討. 第49回日本肝臓学会総会. 2013年6月. 京王プラザホテル, 東京.
24. 高見太郎, 寺井崇二, 村田泰彦, 廣瀬恵一, 藤澤浩一, 山本直樹, 坂井田功. 肝再生修復療法としての培養ヒト骨髄間葉系細胞投与療法のメカニズム解析. 第49回日本肝臓学会総会. 2013年6月. 京王プラザホテル, 東京.
25. 高見太郎, 寺井崇二, 坂井田功. 自己骨髄細胞による肝臓再生療法の取り組み. 第40回日本肝臓学会西部会. 2013年12月. 長良川国際会議場, 岐阜.

26. 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.

27. 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..

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

29. 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.

30. 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.

31. 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