

特集：肝臓の発生・再生

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¹⁾．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²⁾や骨髄由来細胞と既存肝細胞との融合³⁾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/CCl₄ 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)

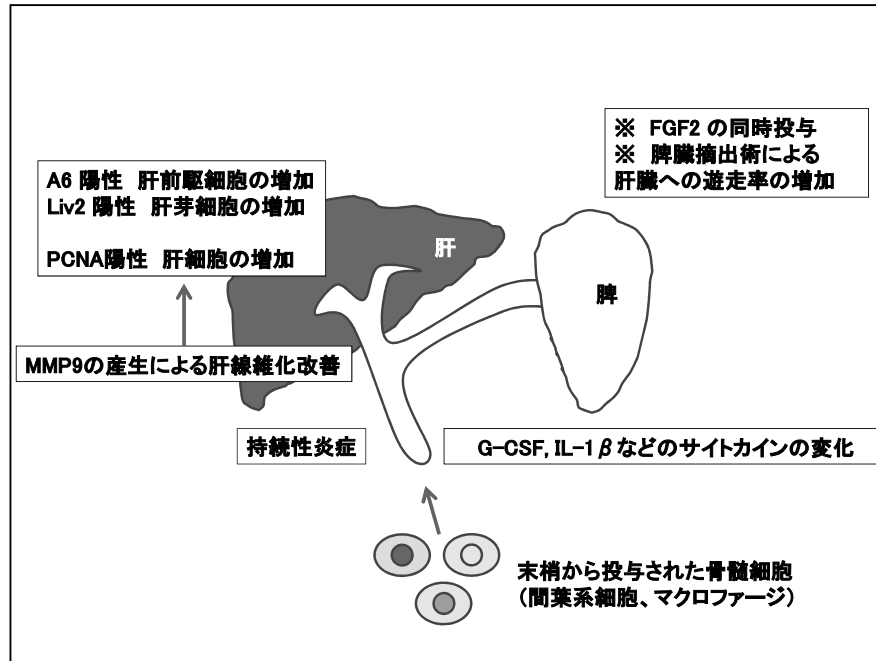


図1 基礎研究より明らかになった知見

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することを確認した^{4,5)}．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 などの線維化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⁶⁾．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⁷⁻⁹⁾，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¹⁰⁾ (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¹⁰⁾．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型肝炎変 (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¹¹⁾．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¹²⁾．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¹³⁾．その他，自己骨髄細胞投与後の血清のマウスGFP/CCl4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-1β (インターロイキン1β) 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¹⁴⁾ (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¹⁵⁾．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，肝がんを誘導せず低下させた¹⁶⁾．

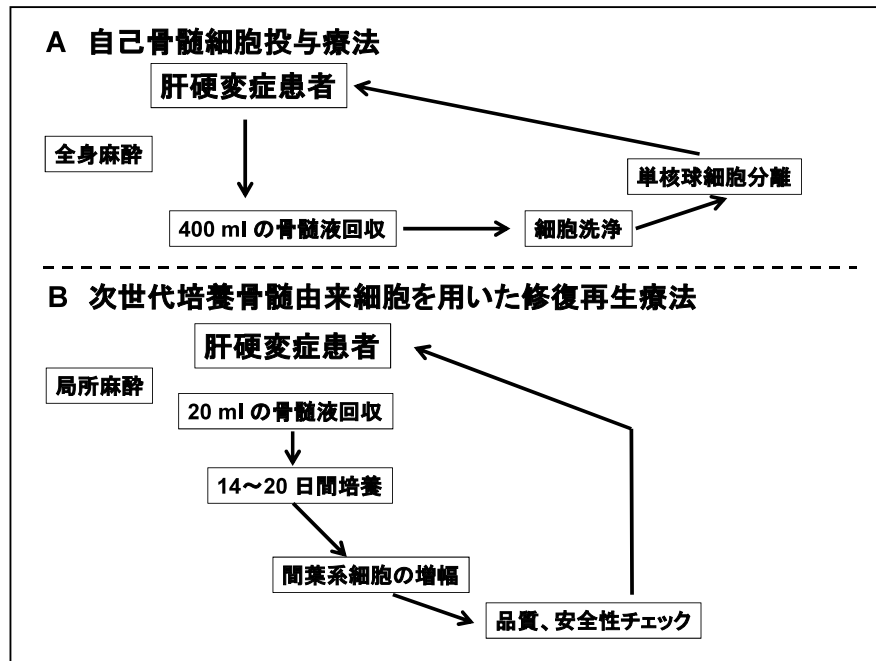


図2 (A) 自己骨髄細胞投与療法. (B) 次世代培養骨髄由来細胞を用いた修復再生療法.

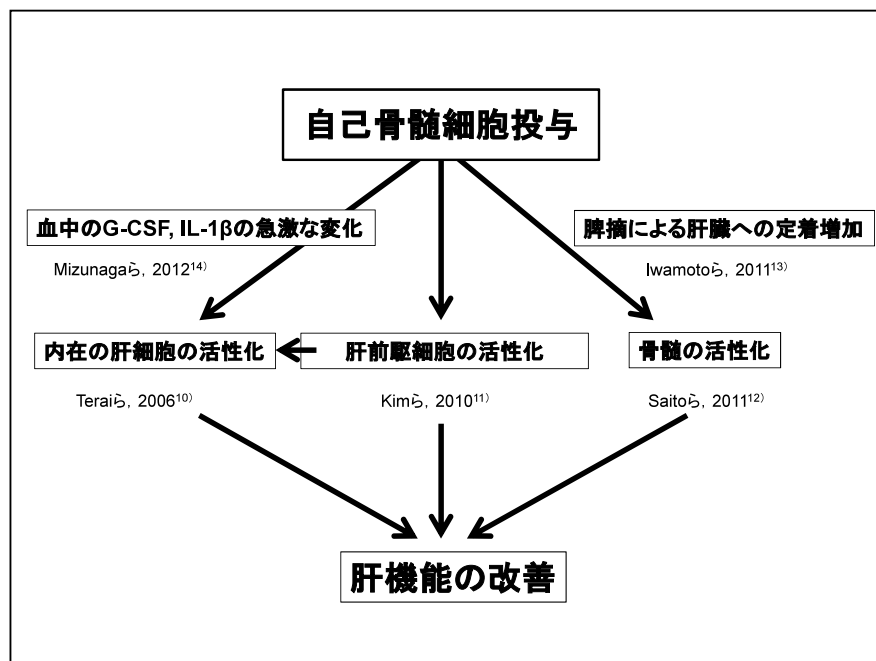


図3 臨床データから明らかになった自己骨髄細胞投与による生体反応

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がなくよ

り多くの細胞が肝臓に定着する¹³⁾. 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¹⁷⁾. 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¹⁷⁾. 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

ないと末梢から投与した骨髓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¹⁸⁾。この結果はTNF- α 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¹⁹⁾。一方で組換えFGF2を骨髓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^{20, 21)}。rFGF2投与により骨髓細胞はTNF- α 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) 骨髓細胞投与により誘導されるサイトカイン、活性化する細胞

臨床と基礎研究の比較により、骨髓細胞投与により血中のG-CSFおよびIL-1 β の変動が急激に起こることが明らかになった¹⁴⁾。この現象の理解としては、本来生体にはない骨髓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 β が大きく変動していた。実際に臨床研究での観察にて、自己骨髓細胞投与が、骨髓を活性化することが明らかになっている¹²⁾。一方で、GFP/CCl4モデルにて骨髓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²²⁾、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²³⁾。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、自己骨髓細胞を投与することで、肝臓にてPCNA陽性肝細胞の増加¹⁰⁾、肝前駆細胞の活性化が明らかになってきた¹¹⁾。このように骨髓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が^{24, 25)}、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²⁶⁾。ヒト臨床研究では、Mohamadnejadらは、非代償性肝硬変4例の自己骨髓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²⁷⁾。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の骨髓液を投与する。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髓液を採取し、その後肝

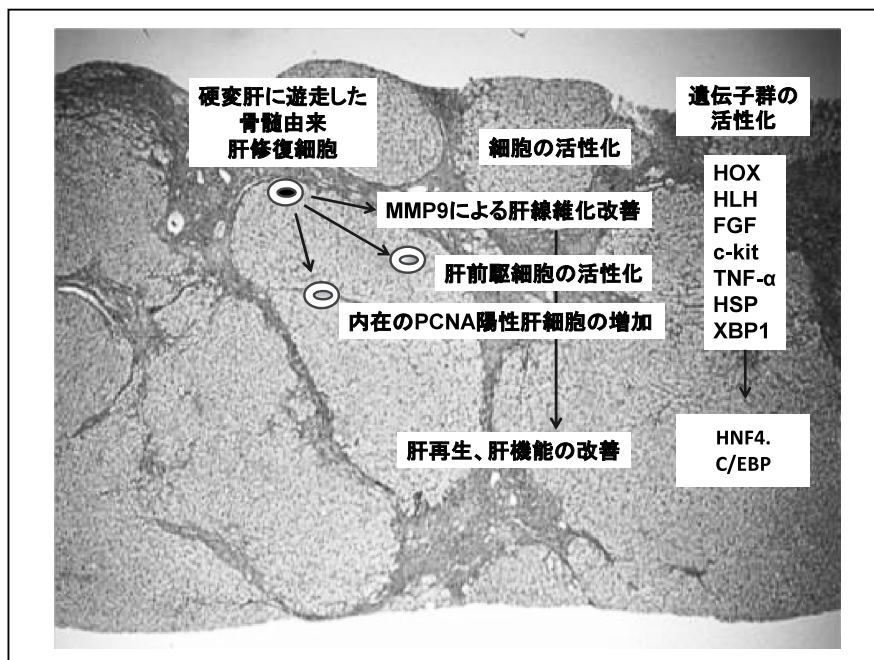


図4 硬変肝に遊走した骨髓由来細胞による硬変肝での細胞の活性化

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²⁸⁾(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の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., Poulsom, 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.