

## 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と今後の展望

寺井 崇二 坂井田 功

山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学

## Current Status and Future Perspective for Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients

Shuji Terai and Isao Sakaida

Department of Gastroenterology &amp; Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

## はじめに

非代償性肝硬変をはじめとした重症肝疾患の根治療法は肝移植（生体肝移植・脳死肝移植）であるが、ドナー不足や手術侵襲・免疫拒絶といった問題がつきまとうため、現状では対症療法のみでの対応を余儀なくされるケースが多い。これを補う新たな肝臓再生療法の開発が急務である。2000年に血液疾患患者に対する骨髄移植および末梢血幹細胞移植施行例（女性患者（XX）に男性（XY）より移植した症例の剖検において、FISHによる解析の結果、慢性炎症環境下にあった肝臓および消化管組織内にY染色体の存在が確認され、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞の存在が示唆された<sup>12</sup>（図3）。そこでわれわれは、肝臓再生療法に使用する細胞源として骨髄細胞に注目し、基礎・臨床研究すなわち橋渡し研究を進めてきた（図1）<sup>3</sup>。最初に骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル（green fluorescent protein (GFP)/carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) モデル）を確立し、本モデルを用いての様々な解析・検討結果を報告してきた<sup>4</sup>（図2）。慢性炎症という特殊環境下（分化Niche）において、ある程度の効率で骨髄細胞がアルブミン陽性の肝細胞へと分化し、さらにその過程で肝合成能・肝線維化・生命予後が有意に改善するという動物実験の結果を得た<sup>5,6</sup>（図3）。これらの基礎研究成果を基盤にして、平成15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）」を開始した<sup>7</sup>（図4）。さらに平成17年度は山口大学で施行した臨床研究のプロト

コールを山形大に導入し、多施設臨床研究（Liver regeneration with cell transplantation study）を開始しており、現状ではさらに、韓国、インド、ブラジル、ドイツなどでも同様な治療は現在行われている。一方、イギリスのグループでは同時期にG-CSFにより誘導されたCD34陽性細胞を用いた細胞療法<sup>8,9</sup>、またドイツのグループはCD133陽性単核球細胞の門脈内投与療法など新たな肝臓病に対する細胞療法の開発が行われてきた<sup>10,11</sup>。今回は現在までの肝臓病に対する自己骨髄細胞投与（ABMI）療法の開発状況、そして今後の展望について報告する。

基礎研究成果：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）

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。われわれが開発し報告してきたGFP/CCl<sub>4</sub>モデルの特徴は以下の通りである<sup>4,5</sup>（図2）。

- 1) 四塩化炭素の持続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
- 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C57 BL/6マウス（雌）に四塩化炭素（0.5 mL/kg）を週2回、4週間（計8回）腹腔内投与し、慢性肝障害モデルを作製する（レシピエント）。これに同種同系GFP transgenic mouse（雄；ドナー）の大腿骨より採取した全骨髄細胞を、尾静脈より投与した。この後も四塩化炭素投与は同様に継続した上で、経時的変化を追った。

トランスレーショナル研究(ABMI療法の開発)

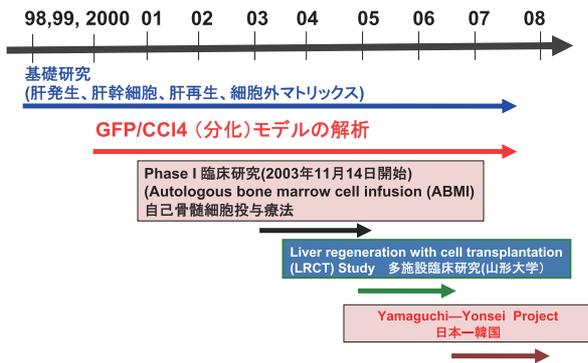
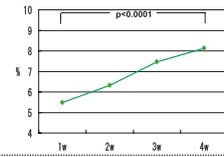
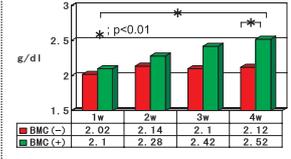


図1 ABMI療法開発への橋渡し研究

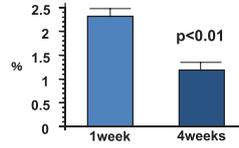
GFP-陽性細胞の肝臓への定着



肝機能の改善



肝線維化の改善



生存率の改善

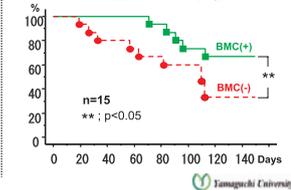


図3 基礎研究の成果1

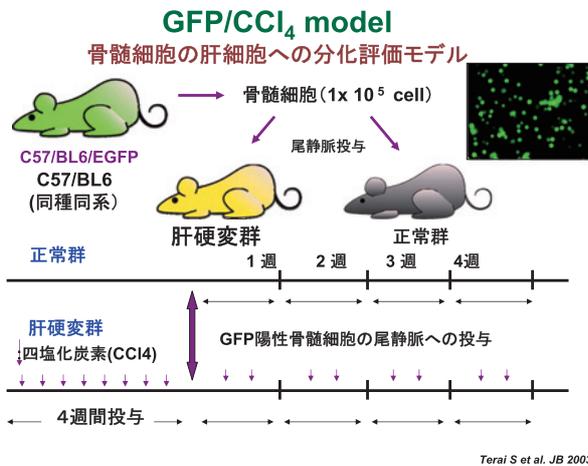


図2 GFP/CCI4モデル

GFP/CCI4 modelから明らかになったこと

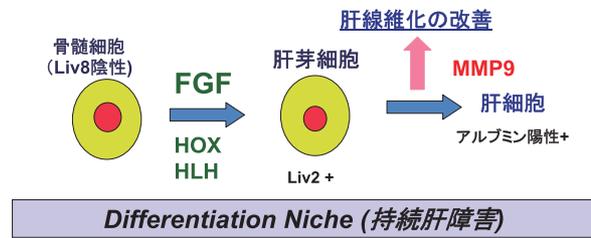


図4 基礎研究の成果2

骨髄細胞の投与により血清アルブミン値の経時的改善および、累積生存率の有意な上昇 ( $p < 0.05$ ), さらには Sirius Red 染色における線維の減少が認められた<sup>6</sup>. 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していることを確認した. 以上の基礎研究より, 慢性肝障害環境下において, 移植された骨髄細胞が肝細胞へと分化し, 肝合成能・肝線維化の改善, さらにはこれらに起因すると考えられる生命予後の有意な改善をもたらすことが示唆された (図3). また, 骨髄細胞中の肝再生に有用な分画は, 分化・成熟した血球細胞を以外の間葉系細胞群であること<sup>12</sup>, 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が, 基礎研究から明らかになっている<sup>13</sup>. また基礎研究からは分化過程の早期では, HOX, HLH型の転写因子が誘導され<sup>14</sup>, また血清マーカーとして Apo蛋白の血清中の誘導が確認された<sup>15</sup> (図4).

臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法」

これら基礎研究を基盤として, 平成15年11月より国内初の臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法」を開始した. この臨床研究の適応条件は以下に示す.

(対象) (図5)

- 1) 総ビリルビン値: 3.0 mg/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, MRIなどの画像診断にて viable な肝細胞癌が存在しないこと.

(プロトコル)

実際のプロトコル (図6) は, 全身麻酔下にて, 自己骨髄細胞を 400mL 採取する (図7). 採取した骨髄液を濃縮洗浄し, その骨髄液を GMP グレード設備

**ABMI(Autologous Bone Marrow Cells Infusion)**  
自己骨髄細胞投与療法の対象

**肝硬変症 患者**  
総ビリルビン値<3.0 mg/dl, 血小板>5 (10<sup>10</sup>/l),  
肝細胞癌がない(CT, MRI.)  
心肺機能良好  
(全身麻酔可能)

図5 ABMI療法の適応

**臨床研究のプロトコール**

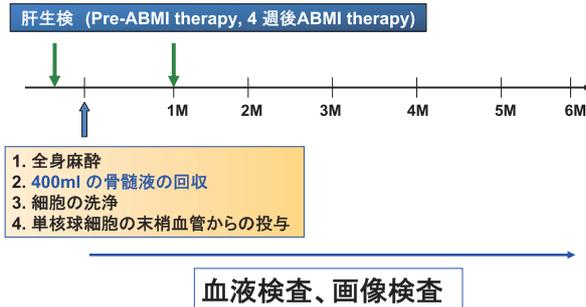


図6 臨床研究のプロトコール

**骨髄液の患者腸骨から採取(400ml)**

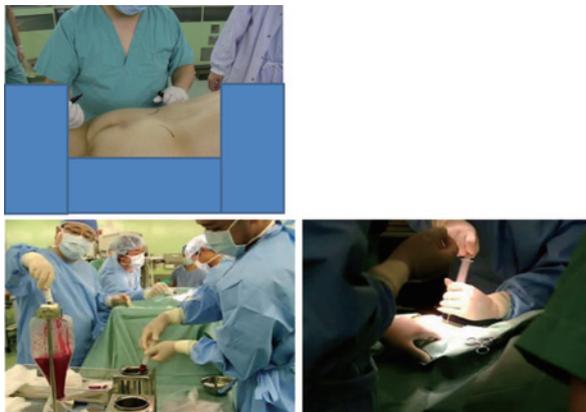


図7 実際の ABMI 療法

が完備された再生・細胞療法センターで SOP に順次洗浄し、単核球細胞を精製し患者本人の末梢静脈より投与する (図8)。細胞投与後は6カ月まで経過観察を続け、血液生化学検査・肝生検組織検査・腹部超音波検査、腹部 CT 検査を行い、安全性および有効性の評価を行った。現在までにわれわれが実施した 23 症例では、肝機能・Child-Pugh 値の改善が得られ、また合併症や重篤な副作用を認めず安全に治療が行われてきた (図8, 9)。また肝生検組織の前後の比較にて骨髄細胞投与後、肝再生のマーカーである PCNA 細

**自己骨髄細胞投与療法(ABMI療法)**

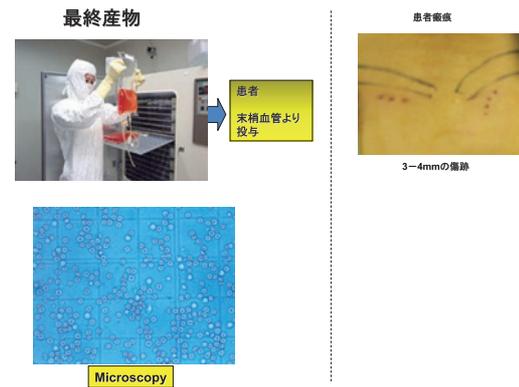


図8 山口大学医学部附属病院再生細胞療法センター

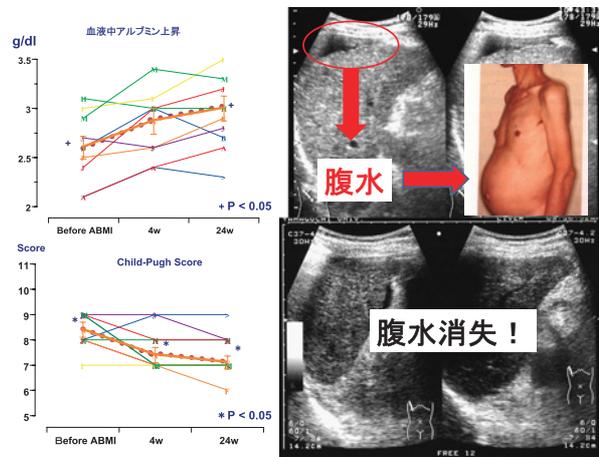


図9 ABMI療法の効果

**PCNAの発現(肝生検組織)**

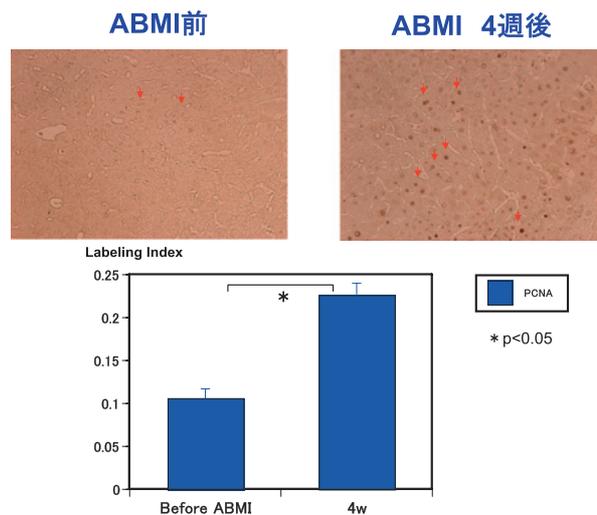


図10 ABMI療法後の肝生検組織におけるPCNA陽性細胞

胞の増加を確認した (図10) また経過観察中において、内服剤、抗ウイルス剤などの使用については変化

させない状態で行った。

### 結果：6カ月以上長期観察可能であった症例経過

施行症例のうち長期に経過観察可能であった症例については、骨髄細胞投与後、血清アルブミン値、総蛋白値、Child-Pugh Scoreの改善効果が明らかになってきており、平成20年8月現在までに23症例を経験したが問題になる有害事象の発生はなかった<sup>7</sup>。また我々が開発したこのABMI療法は、山形大学で3例（山口大学チームと共同実施）、韓国の延世大学で8例（論文投稿中）、インドの日印再生医療センター関連施設で30例、ブラジルで10例の追試が行われた<sup>16</sup>（ただしブラジルのグループの場合は肝動脈からの投与）。このように多施設臨床研究の結果、徐々にそのABMI療法および自己骨髄細胞を用いた治療の安全性、また効果が明らかになってきた。

### ABMI療法の意味とは、基礎研究および臨床研究の結果を踏まえ

ABMI療法の開発のきっかけは骨髄中の肝細胞に分化する細胞の発見であった<sup>12</sup>。この結果は、肝臓自体が再生不全状態になっている肝硬変症患者の治療の新たな細胞源として骨髄細胞を使える可能性を示唆するものであった<sup>3</sup>。そこで、われわれはABMI療法の開発にあたり、われわれは骨髄細胞の肝細胞への分化増殖評価モデルとして、GFP/CC14モデルを開発した<sup>4</sup>。骨髄細胞の投与により、肝硬変症状態にしたレシピエントマウスには血清アルブミン値の改善や生存率の上昇が認められた。また投与した骨髄細胞からはMatrix metalloproteinase (MMP) 2およびMMP9などのコラゲナーゼ産生も確認され、組織学的検討でも肝線維化の改善が認められた<sup>6</sup>。これらの結果から、骨髄細胞投与により肝合成能・肝線維化・生命予後の改善をもたらすことが明らかになった<sup>5</sup>。一方で骨髄幹細胞の肝細胞への分化については細胞融合がより重要であるという報告もあり、骨髄細胞が肝細胞になるのは細胞融合の関与も忘れてはならない問題である<sup>17,18</sup>。肝臓自体マウスにおいて核型は2N, 4N, 8N, 16Nの核型の細胞が混在していることがわかっており、その生物学意味は以前結論がでていない状況である。肝臓に存在する肝幹細胞についても依然として明確な抗原はなく、最近になりEPCAMなどのマーカーがようやく分子をしてわかってきており<sup>19</sup>、細胞の分化については非常に注意し、検討して行く必要がある。一方で、われわれの最初の報告と同様に骨髄細胞投与<sup>20</sup>および間葉系幹細胞の投与<sup>21</sup>が肝線維化に有用

であるとの報告があり、少なくとも現状の理解では、投与した骨髄細胞は肝硬変症の肝臓の肝線維化などを改善しその結果、肝硬変状態の肝臓の微小環境を改善すると考えられている。これらの結果をまとめると、骨髄細胞投与により肝硬変症の“修復機構”の誘導が起こりその結果肝機能が改善したと考える。今後は、さらに基礎研究においては、このメカニズムの解明が重要と考えている。

### 今後の課題

全く新しい治療法については、最初の段階は、ランダム化したコントロールスタディができない状況である。ABMI療法についてもその開発においては、安全性およびフィージビリティそして効果について検討がなされ、まず我々の施設で安全性、有効性が明らかになった<sup>7,22</sup>。その後、国内の山形大学および韓国延世大学（論文投稿中）においても有効性が明らかになってきており、データの集積がなされてきている。またインド、ブラジルなどでも同様の追試の臨床研究が行われ、その有効性が徐々に明らかになっている。一方、イランでは末梢から投与した骨髄幹細胞の有用性を報告した<sup>23,24</sup>。基礎研究成果より予測された結果が、臨床現場において証明されたことは非常に重要なことであると考えている。今後の検討すべき課題として我々は過去の解析より、間葉系幹細胞が肝硬変症治療に有効と考えているが<sup>12,21</sup>、人については依然としてどの細胞が有用か明らかになっていない。血管内皮前駆細胞が有効とする報告もある<sup>25,26</sup>。今後はさらに患者の侵襲を少なくするため、培養した脂肪由来幹細胞<sup>27</sup>、間葉系幹細胞<sup>21</sup>を用いた治療の基礎研究成果の臨床研究への展開が進むと考える。しかしながら、実際にそれら培養した細胞を使う場合は、厚生労働省の定めた（ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針）を遵守しながら、慎重に治療開発のための臨床研究を進めていくことが重要になる。またその施行においては、GMP基準 Cell processing centerでSOP準拠し細胞の加工、医薬品を使うことが必要になる。慢性肝疾患に対する細胞を用いた治療は、われわれの臨床研究を契機に世界的に広がってきており、生体肝移植までのブリッジの治療になることが期待されており、基礎、臨床をつなぐ橋渡しに研究として行う必要がある。

**謝辞：**本臨床研究は厚生労働省科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業、平成14年～16年度）の助成により遂行されたが、平成17年度より厚生労働省

科学研究特別研究事業として同一プロトコールによる多施設研究を推進された。また文部科学省の科学研究費補助金、知的クラスター創出事業のサポートを得て研究を行った。

## 文 献

1. Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
2. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16.
3. Terai S, Yamaoto N, Omori K, Sakaida I, Okita K: A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterology* 2002; 37 (Suppl XIV): 162-163.
4. 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 (Tokyo)* 2003; 134: 551-558.
5. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K: Lesson from the GFP/CCl4 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.
6. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K: Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311.
7. 寺井崇二, 浦田洋平, 丸本芳雄, 石川 剛, 青山浩司, 大森 薫, 山本直樹, 仁科博史, 奥本和夫, 齊藤貴史, 河田純男, 沖田 極: 多施設臨床研究: 肝硬変症に対する ABMI 療法の開発. *日本再生医療学会誌* 2006; 5: 79-87.
8. Gordon MY, Levcicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M'Hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davies J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA: Characterisation and Clinical Application of Human Cd34+ Stem/Progenitor Cell Populations Mobilised into the Blood by G-Csf. *Stem Cells* 2006; 24: 1822-1830.
9. Levcicar N, Pai M, Habib NA, Tait P, Jiao LR, Marley SB, Davis J, Dazzi F, Smadja C, Jensen SL, Nicholls JP, Apperley JF, Gordon MY: Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif* 2008; 41 Suppl 1: 115-125.
10. Jan Schulte am Esch JS, 2nd Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschräder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB: Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23: 463-470.
11. Furst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschräder M, Eisenberger CF, Modder U, Knoefel WT: Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology* 2007; 243: 171-179.
12. Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K: A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118.
13. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Sakaida I, Murata T, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K: Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res* 2006; 323: 221-231.
14. 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* 2004; 578: 10-20.
15. Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I: Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics* 2006; 6: 2564-2570.
16. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, Braga EL, de Carvalho WA, Genser B, dos Santos RR, Lyra LG: Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1067-1073.
17. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
18. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW: Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
19. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD: Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 636-647.
20. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45: 213-222.
21. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K: Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748.
22. 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* 2006; 24: 2292-2298.
23. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R: Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10: 459-466.
  24. Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, Kazemi Ashtiani S, Malekzadeh R, Baharvand H: Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3359-3363.
  25. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura H, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Mizuno S, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M: Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006; 130: 521-531.
  26. Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, Kumashiro R, Murohara T, Ueno T, Sata M: Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 2007; 133: 91-107 e101.
  27. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 219-228.
-