◆トピックス◆

肝細胞移植の現況と展望： 血友病の次世代治療の確立にむけて

大橋 一夫*, 中島 祥介*

Hepatocyte transplantation and liver tissue engineering
as a new generation therapy toward liver diseases

Kazuo OHASHI*, Yoshiyuki NAKAJIMA*

Key words: hepatocyte transplantation, liver tissue engineering,
regenerative medicine

大橋一夫

奈良県立医科大学 消化器・総合外科 助手
1990年 奈良県立医科大学医学部卒業
1998年-2002年 米国ワシントン大学, スタンフォード大学ポスドク
トラルフェロー, 日本学術振興会 海外特別研究員

2003年より現職
専門領域: 肝胆膵外科, 組織工学, 遺伝子治療

はじめに

脳死肝移植あるいは生体肝移植が遺伝性酵素欠損症や肝不全をはじめとする, さまざまな末期肝疾患に対する最終治療手段として確立されてきた。しかしながら, 世界的なドナー不足の問題そして生体肝移植においては健常人からの部分肝の提供を必要とする等の問題から, 臓器移植を受けることができない患者が多数存在することも事実であり, この観点から新たな肝疾患治療法の確立が望まれている。肝細胞は分離した個々の状態でも, 多岐にわたる肝機能を保持するという特性から, 分離した肝細胞を移植する臨床試験が行われ, その治療効果が確立されつつある。本稿においては, 肝細胞移植の現状と細胞移植法を用いた次世代療法としての肝 tissue engineering の可能性について概説したい。

肝細胞移植の現状

数々の動物研究の結果を基に, 旭川医科大学の水戸ら¹⁾による臨床例を先駆として表1に示

すごとくこれまでに60例を超える臨床肝細胞移植治療が施行されてきた²⁾。対象疾患は劇症肝不全や慢性肝不全と代謝性肝疾患に大別される。肝細胞はgun shotによる損傷等のために臓器移植に使用されなかった脳死肝あるいは自己の肝臓の一部より分離・精製された後, 新鮮状態あるいは一度凍結保存された状態で移植施設に緊急空輸されている。劇症肝不全においては肝移植が施行されるまでの期間において肝機能維持としてのブリッジ治療に多くの症例において成功していること, 代謝性肝疾患においては程度の差はみられるものの病状の改善が示されていることから, その治療的有用性が立証されている²⁾。なかでも, 3年間肝移植待機患者リストにあった10歳女児のI型Crigler-Najjar症候群の症例では, 光線治療を連日12時間以上必要とする状態から肝細胞移植により血中ビリルビン値は報告までの9カ月間, 安定して低下し, 光線治療の6時間への短縮が可能となっている³⁾。それに伴い, 通学が可能となるなど著明なQOLの向上をもたらしたことにより治療的意義が示されているとともに, 肝臓移植と比較した場合の細胞移植治療の侵襲性の低い点

* 奈良県立医科大学 消化器・総合外科学教室〔〒634-8522 奈良県橿原市四条町840〕
Nara Medical University [840, Shijo-cho, Kashihara City, Nara 634-8522]
Tel: 0744-22-3051 内線3419 Fax: 0744-24-6866

表 1 肝細胞移植が施行された臨床例。# 出版社の許可のもと文献 1) より一部改変の上転載。§ ; Lancet 359: 317, 2002., ‡; Pediatrics 111: 1262, 2003., CE; Transplantation 76: 735, 2003., Ø; personal communication. LC; liver cirrhosis, CH; chronic hepatitis, FHF; fulminant hepatic failure, HF; familial hypercholesterolemia, hAAT; α 1-antitrypsin deficiency, SE; sepsis, OTC; ornithine transcarbamylase deficiency, CN, Crigler-Najjar syndrome, GS; glycogen storage disease, IRD; infantile Refsum disease, FVII; factor VII deficiency, IHC; idiopathic hepatic cholestasis.

報告者	原因疾患	移植患者数	移植ルート
Mito et al., 1992#	LC, CH	10	脾臓内
Habibullah et al., 1994 #	FHF	7	腹腔内
Grossman et al., 1996 # and Raper et al., 1996 #	FH	5	経門脈的
Strom et al., 1997#	hAAT, LC, SE, FHF, OTC	7	経門脈的
Soriano et al., 1997#	FHF	3	脾臓内
Bilir et al., 1997 #	FHF, LC	8	経門脈的
Review by Strom et al., 1999#	FHF, LC, hAAT	10	経門脈的
Fisher et al., 2000#	FHF	1	経門脈的
Fox et al., 1998 (#, 3)	CN	1	経門脈的
Muraca et al., 2002 §	GS Type Ia	1	経門脈的
Horslen et al., 2003 ‡	OTC	1	経門脈的
Sokal et al., 2003 CE	IRD	1	経門脈的
Dhawan et al., (Ø, 15を含む)	CN, OTC, FVII, IHC	6	経門脈的
計 61 例			

表 2 肝細胞移植における細胞源と解決すべき問題点

細胞源	臨床応用	問題点
新鮮肝細胞 (成人由来)	+	ドナー不足による安定供給が困難
凍結肝細胞 (成人由来)	+	viabilityの低下、肝細胞機能の低下
遺伝子導入肝細胞 (成人由来)	+	遺伝子導入効率の向上が必要
肝細胞 (胎児由来)	+	細胞数の確保が困難、倫理的問題
異種肝細胞 (ブタなど)	—	免疫的拒絶と異種ウイルス感染の可能性
不死化肝細胞	—	低い肝細胞機能、腫瘍形成の可能性
骨髓細胞	+	肝細胞への分化過程の解明が必要
未分化細胞由来の肝様細胞	—	低い肝細胞機能、腫瘍形成の可能性

が長所として強調されるべきである。

移植用細胞のソース

肝細胞移植に使用される細胞と問題点につき表 2 に列記した。臨床例においては、成人あ

るいは胎児より分離された肝細胞が使用されているがドナーの確保の問題が存在する。肝細胞は培養系において持続的な細胞増殖がおこらず細胞株化ができない為に、分離新鮮細胞の利用に加えて、凍結保存肝細胞も利用されている。自己肝細胞に欠損している遺伝子をベクタ

ーを用いて導入する試みも、合併症なく行われた(後述). より多くの肝細胞を確保する工夫として、成熟肝細胞にSV40Tなどの不死化遺伝子を導入することで肝細胞を株化(肝細胞の不死化)する試みも興味深い. SV40Tの両側にLoxP遺伝子を配置することで、株化肝細胞よりSV40T遺伝子を取り除くことにより移植後の腫瘍化を防ぐ工夫など安全への考慮もなされている⁴⁾. また、新たな細胞源として、胚性あるいは体性幹細胞をはじめとするさまざまな多分化能をもつ細胞から分化誘導により肝様細胞を産生する試みも、世界で活発に研究されている. その中でYamadaら⁵⁾は、インドシアニングリーンを取り込むなど肝細胞としての機能を一部発揮する細胞の誘導に成功している. 不死化肝細胞も含め分化誘導した細胞において凝固因子を発現/産生したという報告は著者らが知る限りでは見当たらないが、新たな細胞源として、今後の発展が望まれる.

遺伝子導入による移植細胞機能の向上

肝細胞移植による新たな治療展開には、遺伝子導入技術等を用いることにより、治療に必要な機能を高めた肝細胞の移植法(ex vivo gene therapy)の開発は重要な課題の一つである. 特に、単一遺伝子の障害に起因する遺伝性酵素欠損症や血友病、そして慢性肝不全時におけるアルブミン補充等といった状況が、これらの高機能化肝細胞移植の良い適応となり得る. 本手法はGrossmanら⁶⁾により世界で初めてホモ型家族性高コレステロール血症の患者5人に施行された(表1). 切除した自己肝の一部より肝細胞を分離し、培養下でLDL receptor遺伝子を導入した肝細胞を移植するものであるが、手法そのものの安全性については確立されたものの、コレステロール低下効果は極めて限定的であった. その原因として、当時遺伝子導入に使用されたMLVレトロウイルスベクターでは肝細胞への遺伝子導入効率が非常に低いことが挙

図1 ウイルスベクターによる肝細胞への遺伝子導入. LacZ 発現 MLVレトロウイルスベクター(MLV-LacZ)とレンチウイルスベクター(LV-LacZ)によるマウス初代培養肝細胞への遺伝子導入効率を比較した. レンチウイルスベクターを用いることで、MLVレトロウイルスベクターと比較して有意に高い遺伝子導入が得られ、また、培養液にHGFを添加する必要性がないことが判明した. # $P < 0.01$ vs MLV-LacZ (HGF+/+)

げられており、より高い導入効率を可能とするベクター開発が望まれている.

長期間安定した遺伝子発現を期待するには、MLVベクター感染の際にみられるウイルスゲノムの宿主染色体への組み込みが必要とされるが、我々は同様に宿主染色体への組み込みが可能なHIVをもとに開発されたレンチウイルスベクター(LV)に着目し、肝細胞への遺伝子導入実験を行ってきた. 生体内の肝細胞ならびに培養肝細胞に対して、従来型MLVベクターと比較して有意に高い遺伝子導入が可能である(図1)^{7,8)}. さらに、MLVベクターによる遺伝子導入においては対象細胞の細胞分裂が必要である為、肝細胞においては培養液中にHGF等の増殖因子の添加が必要となるという欠点が存在した. 一方、LVにおいては、ゲノムに核移行シグナルを複数有するためにHGF非依存性の高い導入効率が見られる(図1). このことは、HGF添加により肝細胞増殖が誘導されるまでの培養期間(約48時間)が必要でなくなるため、LVではわずか2日間の培養期間で遺伝子導入が可能となる. 通常、肝細胞を1週間培養すると多くの肝特異的機能が低下するが、

図2 マウス腎被膜下に肝細胞移植により作製した肝組織の再生増殖。肝細胞を分離し、至適細胞外マトリックスとともに腎臓被膜下に移植することで、1-2層の肝細胞で構成される小肝組織が作製できる(A)。この肝組織は肝部分切除等による肝再生刺激により自己肝の再生と同レベルの再生増殖力を示し、3-4層の肝細胞からなる組織に成長する(B)。同様の再生刺激を繰り返し与えることで、肝組織に繰り返し再生増殖を誘導することが可能であり、6層以上の肝細胞で構成される肉眼的にも視認可能な肝組織へと成長する。▼;腎実質と作製肝組織の境界、↓;腎被膜、bar:作製肝組織の肝細胞層の厚さ。HE染色像×200。

2日間という短期間培養では移植した後も肝特異的機能を保つことができることを我々は確認している¹²⁾。これらのことから、LVをはじめとする新たな遺伝子導入ツールを用いた高機能化肝細胞移植の臨床での再チャレンジが望まれる。

肝細胞移植と肝組織作製による血友病への次世代治療の確立に向けて

肝細胞は数多くの凝固因子において重要な産生責任細胞であることから⁹⁾、血友病をはじめとする様々な出血性疾患における次世代医療としての確立が望まれている。細胞療法の有用性は、これまでに行われた約30例の血友病患者に対する肝移植(生体部分肝移植を含む)により、治癒レベルの凝固能産生が全症例で得られている結果からも支持される^{10) 11)}。血友病を始めとする多くの出血性疾患では、数%程度の凝固因子の補充で高い臨床的効果が期待できることから、細胞レベルの移植治療の今後の展開が期待される。血友病に対する臨床肝細胞移植はこれまでは報告されていないが、重症の第VII因子欠損症の兄弟2人への肝細胞移植が、

2003年英国Kings College Hospitalにて施行された。この兄弟は英国外の患者で、静脈内に第VII因子をくり返し投与されてきたことにより、ほとんどすべての末梢血管の静脈血栓症を併発したために第VII因子の安定した投与が困難となったことから、肝臓移植を目的に渡英した。臓器移植の待機期間に、移植には使用されなかった肝臓から分離した肝細胞(図3に細胞分離過程を示す)を数回繰り返し移植され、兄弟ともにINRを約2.5に保つのに必要なVII因子投与量を1/4に減少させることに成功している。肝細胞移植の7ヶ月後に予定の肝臓移植が兄弟に行われているが、それまでの期間を通じて持続した治療効果が得られた。(Dr. Dhawanよりの私信による)。この第VII因子欠損症の成果から、血友病への治療展開も今後望まれるところである。

これまで行われてきた分離肝細胞を血流にのせて移植するという1次元の移植に加え、我々は、血友病を含めた疾患に対する治療法開発の新たな展開として、細胞を皮下や腎被膜下などの肝臓外に移植することによる2次元/3次元の肝組織再生という次世代医療としてのtissue engineering法の開発につき研究を重ねて

図3 英国 Kings College Hospital におけるヒト肝からの肝細胞分離風景。A: 肝臓を分離して移植する過程において、肝 segment IV が不要と判断され細胞分離に提供される。B: カニュレーションされた後、細胞分離液循環システムに接続される。C: コラゲナーゼにて消化された肝臓は、ガーゼにて濾過の後、精製される (文献 16 参照)。D: 分離されたヒト肝細胞。ほとんどがシングルセル状態で良好な形態を保っている。E: プロジェクト責任者の Dhawan 博士 (左) と大橋。

きた。組織再生には、移植細胞の長期生着に加え、形態と機能保持そして血管網の構築が必要となる。さまざまな工夫の結果、至適な細胞外マトリックスを供給することで移植初期における生着を改善し¹²⁾⁻¹⁴⁾、HGF/cMet 系をはじめとする増殖因子の供給により長期間の肝細胞維持が腎被膜下で可能となった⁴⁾。皮下においては、それらに加え、移植部位においてあらかじめ血管ネットワークを構築することにより半永久的な生着を得た¹³⁾。これらの手法により長期生着した肝細胞は、肝細胞特異的機能と形態を保持することに加え、血管内皮細胞に裏打ちされた肝類似立体構造をとり、小さいながら肝組織を形成する (図 2)。さらに興味深いことは、本来肝臓は部分的な切除などにより活発な再生力を発揮する優れた臓器であるが、これら肝臓外に作製した小肝組織も自己肝と密に連絡した同等の再生力を有する (図 2)¹⁵⁾。このことは、生体にとって肝臓の一部として認識される第二の肝組織を作製し得ることを示唆しており、新たな

ブレイクスルーと考えている。これらの手法を用いて、腎被膜下へ作製した肝組織の血友病における治療効果を第 VIII 因子ノックアウトマウスを用いて検討したところ、作製組織の量に応じた、治療レベルの凝固活性が得られることを明らかとした¹³⁾。

おわりに

肝細胞移植医療の現状と今後の展開が期待される肝組織作製の展望につき概説した。臓器移植に替わる新たな医療そして、あらたな緩和的治療の確立という観点からも、細胞を用いた治療手段の今後の発展に向けて研究を重ねたいと考えている。

謝辞: 本稿にて紹介した研究の大部分は米国スタンフォード大学 Mark Kay 研究室の多くの人たちの協力のもとに、また、第 VIII 因子ノックアウトマウスの研究は奈良県立医科大学小児科中博士の研究グループの協力のもとに行わ

れたものであり、ここに感謝申しあげます。

文 献

- 1) Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc.* **24** : 3052-3053, 1992.
- 2) Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med. Nov;* **79**(11) : 617-30, 2001.
- 3) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Wardkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* **338** : 1422-1426, 1998.
- 4) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* **287** : 1258-1262, 2000.
- 5) Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizuka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* **20** : 146-154, 2002.
- 6) Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med.* **1** : 1148-1154, 1995.
- 7) Ohashi K, Park F, Schwall R, Kay MA. Efficient gene transduction to cultured hepatocytes by HIV-1 derived lentiviral vector. *Transplant Proc.* **34** : 1431-1433, 2002.
- 8) Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, Kay MA. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet.* **24** : 49-52, 2000.
- 9) Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P. Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Biol Chem.* **274** : 19587-19592, 1999.
- 10) Gordon FH, Mistry PK, Sabin CA, Lee CA. Outcome of orthotopic liver transplantation in patients with haemophilia. *Gut.* **42** : 744-749, 1998.
- 11) Horita K, Matsunami H, Shimizu Y, Shimizu A, Kurimoto M, Suzuki K, Tsukadaira T, Arai M. Treatment of a patient with hemophilia A and hepatitis C virus-related cirrhosis by living-related liver transplantation from an obligate carrier donor. *Transplantation.* **73** : 1909-1912, 2002.
- 12) Ohashi K, Marion PL, Nakai H, Meuse L, Cullen JM, Bordier BB, Schwall R, Greenberg HB, Glenn JS, Kay MA. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med.* **6** : 327-31, 2000.
- 13) Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Yokoyama T, Kuge H, nakajima Y, Yamanouchi T, Naka H, Yoshioka A, May MA. Liver tissue engineering at extra-hepatic sites as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 2005, in press.
- 14) Ohashi K, Nakajima Y, Takashi Y, Kay MA. Providing extracellular matrix proteins improves survival of hepatocytes transplanted at site outside of the liver. *Transplant Proc.* 2005, in press
- 15) Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, Kuge H, Kanehiro H, Hisanaga H, Ko S, Nakajima Y. Stability and repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplantation*, 2005 in press.
- 16) Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec C, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M. One liver, three recipients: Segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* **77** : 1614-1616, 2004.