<総 説>

肝臓領域における再生医療の現状

坂井田 功*

要旨：抗ウイルス剤の進歩によりウイルス性肝炎の制御が可能になったが、アルコール多飲や非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変は増加しており、依然として肝移植待機患者が多数存在する。肝移植の治療効果は劇的だが、ドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶、医療費などの問題のため、肝移植の実施は限られているのが実情である。この肝移植の実施を補う肝硬変治療として、幹細胞による肝臓再生療法の基礎研究とそれに続く臨床研究が進められてきた。これまでに報告された臨床研究では主な細胞源として骨髄が用いられてきた。近年、複数のランダム化比較試験が実施され、幹細胞を用いた肝臓再生療法の有効性が示されてきたが、規模も小さく、各臨床研究で投与細胞数や経路が異なるため、今後はこれらの標準化が必要である。また、iPS 細胞の登場により肝臓再生療法是新たな局面を迎え、人工的に肝芽などの臓器原基の作成が可能となり、新たな概念として臓器原基移植療法の提唱されている。今後、これらの肝臓再生療法の実用化が「再生医療等製品の実用化に対応した承認制度」の実施に伴い加速することが期待される。

索引用語： 肝臓再生療法 自己骨髄細胞 造血幹細胞 間葉系幹細胞
iPS細胞

1. はじめに

近年の抗ウイルス剤の進歩により、これまで根治が困難であった多くのウイルス性肝炎患者でウイルスの排除や病勢の制御が可能となった^{1)~4)}。しかし、現行の抗ウイルス剤の適応とならない症例や無効であった症例も少なからず存在する⁵⁾。また、ウイルス性肝炎患者が減少する一方で、アルコール多飲や非アルコール性脂肪肝炎などに起因する非 B 非 C 肝硬変症例は増加しており、これらの症例が非代償性肝硬変まで進行した場合、根治を期待できる治療は肝移植のみである⁶⁾⁷⁾。肝不全に陥った肝臓を正常肝に置換できる肝移植の治療効果は劇的だが、ドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶、医療費などの問題を抱えており、その実施は限られている。一方で、肝移植と比べ、幹細胞を用いた肝臓再生療法的は以下の点において低侵襲かつ簡便である。手術侵襲がなくドナーおよびレシピエントへの侵襲が少ない、自己細胞を用いるなど免疫拒絶を伴わない移植が可能、複数回の移植が可能、経静脈・動脈投与が可能、比較的低コストなどである。

この現状を受けて、肝移植を補う非侵襲的な治療法の開発に向けて、骨髄や脂肪組織などに存在する幹細胞や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた肝臓再生療法について基礎および臨床研究が進められている。iPS 細胞の登場により肝臓再生療法的は新たな局面を迎えており、本総説では幹細胞を用いた肝臓再生療法的の現状と今後の展望について概説したい。

2. 肝臓再生療法の変遷

前述の如く現在は幹細胞を用いた治療法に重点が置かれているが、肝疾患に対する細胞治療の歴史を紐解くと、初期には肝細胞移植が試みられた。日本で第 1 例目の自己肝細胞移植が行われ、肝硬変患者に対して部分肝切除を行い、切除肝から肝細胞を分離した後、脾臓への移植が行われた⁸⁾。以降、他家肝細胞移植や細胞投与経路の工夫について多くの試みがなされたが、肝再生は十分とはいえず、肝機能の改善効果は限定的なものであった^{9)~11)}。その原因として、必ずしも最適とは言えないドナー肝から良質の肝細胞を分離することが困難であること、移植肝細胞の生着率や増殖率が低いこと、免疫拒絶のため長期の効果が得られにくいこと、培養により細胞を増やすことが困難であったこと

などが挙げられる。

本来肝臓は他の臓器に比べて再生能力に富む臓器だが、慢性肝障害の結果として起こる肝線維化のために肝臓の再生力は低下する。肝硬変では肝実質細胞の減少、細胞外マトリックスの増加や血管新生による肝小葉構造の改築が生じており、肝再生に必要な微小環境の乱れが肝再生不全の原因と考えられている。そこで、肝細胞移植による直接的な肝細胞の補充から、線維溶解を刺激し、内因性の肝再生を促進することができる幹細胞を用いた肝再生療法へと研究対象が推移してきた経緯がある。

2000 年に、男性 (XY) ドナーから骨髄移植を受けた女性血液疾患レシピエント (XX) の剖検例において、肝臓および消化管組織内に Y 染色体陽性細胞が確認され、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞の存在が示された¹²⁾¹³⁾。以降、肝臓再生療法の細胞源として骨髄細胞に関心が寄せられるようになった^{14)~19)}。骨髄細胞には造血幹細胞 (CD34/CD133 陽性) と間葉系幹細胞 (CD73/CD90/CD105 陽性) が含まれており、これまでに報告された骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法では、①採取した骨髄液から幹細胞を含む骨髄単核球分画を精製する、または②顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与により造血幹細胞を骨髄から末梢血に誘導する、③骨髄細胞に含まれる間葉系幹細胞を培養により増殖するなどの方法が用いられてきた。これらの骨髄由来幹細胞投与による肝臓再生メカニズムについては、肝内線維の溶解、内因性の肝細胞増殖の活性化、肝細胞への分化、免疫調節の関与が示唆されている^{20)~22)}。

一方、新たな肝臓再生療法の細胞源として期待される iPS 細胞を用いて、*in vitro* で立体的な肝臓の原基 (肝芽, Liver Bud) を形成し、*in vivo* でこの iPS 細胞由来肝芽を移植すると生体内で総合的な機能を発揮する肝臓に分化誘導できることが報告され、臓器原基移植療法 (Organ bud transplantation therapy) という新たな治療概念が提唱されている²³⁾。

3. 幹細胞を用いた肝臓再生療法

3.1 自己骨髄細胞 (Autologous bone marrow cells)

我々は、2003 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 (ABMi 療法)」を開始し、2005 年からの多施設臨床研究を経て、現在は先進医療 B として多施設・ランダム化比較試験「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」を実施して

いる (Table 1)。ABMi 療法のプロトコールでは、全身麻酔下に自己骨髄液を約 400 mL 採取し、GMP グレード設備が完備された再生・細胞療法センターで骨髄液中の骨髄単核球分画を洗浄・濃縮し、患者本人の末梢静脈より点滴投与する。これまでに細胞投与後の安全性と有効性評価として、血液生化学検査、肝生検による組織学的検査、腹部超音波検査、腹部 CT による経過観察を行い、細胞投与後 6 カ月経過した時点での血清アルブミン値と Child-Pugh スコアの改善と重大な有害事象の発生がなかったことを報告した²⁴⁾。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、15 カ月経過時点でも、血清アルブミン値と Child-Pugh スコアの改善が認められている²⁵⁾。国際共同研究を実施した韓国の延世大学 Kim らの報告では、B 型肝炎硬変症例において血清アルブミン値と Child-Pugh スコアの改善に加え、肝体積の増加と腹水の減少が確認された²⁶⁾。さらに、山形大学で行われたアルコール性肝硬変患者を対象とした ABMi 療法でも同様の有効性と安全性が報告されている²⁷⁾。

我々は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発に際し、骨髄細胞投与による肝線維化改善および肝再生の評価のため、Green fluorescent protein/carbon tetrachloride (GFP/CCl₄) モデルを開発した²⁸⁾。本モデルでは、四塩化炭素を持続投与した C57BL/6 マウスに、尾静脈から GFP トランスジェニックマウス由来の全骨髄細胞を投与すると、慢性障害環境下にある肝臓に骨髄細胞が効率的に生着する。その過程で骨髄細胞が産生する matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) により線維溶解が起こり、血清アルブミン値の増加、累積生存率が改善することを報告した²¹⁾。また、Kim らは骨髄細胞投与症例の肝において CK7 陽性の肝前駆細胞の増加を確認している²⁶⁾。以上より、骨髄細胞投与による肝機能改善のメカニズムとして、線維溶解に伴う肝微小環境の改善に伴い、硬変肝で失われていた修復機構が回復し、肝再生が促進されると考えている。

一方、ブラジルのグループでは、非代償性肝硬変患者に対する自己骨髄細胞の肝動脈投与について検討が行われた^{29)~31)}。Couto らは、(99 m) Tc-SnCl₂ ラベルした骨髄細胞を肝動脈投与し、シンチグラムにより体内動態を評価した結果、肝動脈投与で骨髄細胞が効率的に肝に集積することを報告している³¹⁾。さらに、Lyra らによって行われた非代償性肝硬変患者 30 例を対象としたランダム化比較試験では、これまでに末梢静脈投与で用いられたよりも少ない骨髄細胞数で試験が実施

Table 1 Clinical trials using autologous bone marrow mononuclear cells in liver disease

Reference	Type of cells	No. of cells, route	No. of patients	Etiology	Follow-up	Type of study	Result
Terai, 2006 ²⁴⁾	Autologous BMNCs	$5.20 \pm 0.63 \times 10^9$, peripheral vein	9	5 HCV, 5 HBV, 1 cryptogenic	6 months	Cohort (ABMi)	Improved serum albumin and CP score
Kim, 2010 ²⁶⁾	Autologous BMNCs	$0.48 - 1.48 \times 10^8$ /kg, peripheral vein	10	10 HBV	6 months	Cohort (ABMi)	Improved CP score, decreased ascites, increased liver volume
Saito, 2011 ²⁷⁾	Autologous BMNCs	$8.0 \pm 7.3 \times 10^9$, peripheral vein	5 Treatment 5 Control	10 alcohol	6 months	Case control (ABMi)	Improved serum albumin, PT and CP score
Lyra, 2007 ²⁹⁾	Autologous BMNCs	$1.6 - 13.1 \times 10^8$, hepatic artery	10	Various etiologies	4 months	Cohort	Improved bilirubin and serum albumin
Lyra, 2010 ³⁰⁾	Autologous BMNCs	$3.78 \pm 2.69 \times 10^8$, hepatic artery	15 Treatment 15 Control	Various etiologies	12 months	Randomized control	Improved serum albumin, bilirubin and CP score
Couto, 2011 ³¹⁾	Autologous BMNCs	$2 - 15 \times 10^8$, hepatic artery	8	Various etiologies	12 months	Cohort	Improved serum albumin and bilirubin
Spahr, 2013 ³³⁾	Autologous G-CSF → BMNCs	$0.47 \pm 0.15 \times 10^8$ /kg, hepatic artery	28 Treatment 30 Control	58 alcohol	3 month	Randomized control	No significant difference between the groups
Bai, 2014 ³²⁾	Autologous BMNCs	$1.0 - 11.2 \times 10^8$, hepatic artery	32 Treatment 15 Control	43 HBV, 4 alcohol	24 months	Case control	Improved serum albumin, bilirubin and PT

G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; BMNC, bone marrow mononuclear cell; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; ABMi, autologous bone marrow infusion therapy; CP, Child-Pugh; MELD, model for end-stage liver disease; PT, prothrombin time

(文献 73 より引用)

され、血清アルブミン値およびビリルビン値などの肝機能の改善が報告されている³⁰⁾。

最近 Bai らにより、B 型肝炎変 43 例とアルコール性肝硬変 4 例を含む非代償性肝硬変症例における自己骨髄細胞投与の長期的な効果 (24 カ月間) についての報告があった³²⁾。この臨床研究では骨髄細胞の肝動脈投与が行われ、血清アルブミン値およびビリルビン値、プロトロンビン活性の改善は 3~12 カ月間であったが、肝性脳症や特発性細菌性腹膜炎の発症予防効果は 12 カ月以上経過した後も持続したとされている。一方、Spahr らはアルコール性非代償性肝硬変患者 58 例を対象としたランダム化比較試験を行い、肝硬変症に対する一般治療群と G-CSF 併用自己骨髄細胞肝動脈投与群の比較では、両群の治療効果に差がなかったとしている³³⁾。しかし、同試験においては 31% の症例で経過観察中に飲酒の再開があったことが考察されており、検証の余地が残されている。

過去 5 年間で、自己骨髄細胞投与療法についてのランダム化比較試験は前述の 2 つの試験が実施されたのみであり、Lyra らの試験では有効性が示唆されたが、Spahr らの試験では有効性は認められていない³⁰⁾³³⁾。今後、自己骨髄細胞投与療法のエビデンスを確かなものにするためには、ランダム化比較試験の実施が必須であり、現在我々が実施している「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」により有効性が明らかになることを期待する。

3.2 造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell) と顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

G-CSF は造血幹細胞の増殖と末梢血への動員に作用する。この G-CSF の作用により末梢血中に動員された CD34 陽性造血幹細胞を用いて多くの肝臓再生療法が実施されている^{34)~45)} (Table 2)。2006 年に報告された Gordon らの第 1 相試験では、G-CSF 投与により CD34 陽性

Table 2 Clinical trials using autologous hematopoietic stem cells in liver disease

Reference	Type of cells	No. of cells, route	No. of patients	Etiology	Follow-up	Type of study	Result
Gordon, 2006 ³⁴⁾	G-CSF → PB-CD34 +	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^8$, portal vein or hepatic artery	5	Various etiologies	60 days	Cohort	Improved serum albumin and bilirubin
Yannaki, 2006 ³⁵⁾	G-CSF → PB-CD34 +	Unclear	2	2 alcohol	30 months	Cohort	Improved CP score and MELD score
Mohamadnejad, 2007 ³⁶⁾	BM-CD34 +	$0.3 - 1.0 \times 10^7$, hepatic artery	4	Various etiologies	6 months	Cohort	Improved serum albumin and bilirubin
Levicar, 2008 ³⁷⁾	G-CSF → PB-CD34 +	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^8$, portal vein or hepatic artery	5	Various etiologies	18 months	Cohort	Improved bilirubin
Khan, 2008 ³⁸⁾	G-CSF → BM-CD34 +	1×10^7 , hepatic artery	4	3 HCV 1 HBV	6 months	Cohort	Improved serum albumin and bilirubin
Pai, 2008 ³⁹⁾	G-CSF → cultured CD34 +	2.3×10^8 (mean), hepatic artery	9	9 alcohol	3 months	Cohort	Improved bilirubin and CP score, decreased ascites
Han, 2008 ⁴⁰⁾	G-CSF or G-CSF → PBMC	1×10^7 , hepatic artery	20 G-CSF, 20 G-CSF + PBMC	40 HBV	6 months	Cohort	G-CSF + PBMC group significantly improved liver function.
Spahr, 2008 ⁴¹⁾	G-CSF	—	13 Treatment 11 Control	24 alcohol	7 days	Randomized control	Increased HGF and proliferating hepatic progenitor cells
Salama, 2010 ⁴²⁾	G-CSF → BM-CD34 + CD133 +	0.5×10^8 , portal vein	90 Treatment 50 Control	Various etiologies	6 months	Randomized control	Improved CP score
Salama, 2010 ⁴³⁾	G-CSF → PB-CD34	1×10^9 , portal vein	48	36 HCV 12 AIH	At least 26 weeks	Cohort	Improved serum albumin and bilirubin
Garg, 2012 ⁴⁴⁾	G-CSF	—	23 G-CSF 24 Placebo	Mainly alcohol	2 months	Randomized control	Improved CP score and MELD score
Kedarisetty, 2015 ⁴⁵⁾	G-CSF + erythropoietin	—	29 Treatment 26 Control	Mainly alcohol	12 months	Randomized control	Improved survival rate, CP score and MELD score

G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; AIH, autoimmune hepatitis; HGF, hepatocyte growth factor; CP, Child-Pugh; MELD, Model for end-stage liver disease

(文献 73 より引用)

細胞を末梢血に動員し、採取した CD34 陽性細胞の肝動脈投与が行われ、短期 (60 日) の観察期間ではあるが、血清アルブミン値とビリルビン値の改善が認められた³⁴⁾。その後、Levicar らが同一症例の投与後 12 カ月までの経過観察により、血清ビリルビン値の改善は 6 カ月まで持続し、12 カ月までには再上昇することを報告しており、治療効果の持続期間が 6 カ月程度であることが示唆された³⁷⁾。また Pai らは、G-CSF により動員された

CD34 陽性細胞を採取後に *in vitro* で培養して肝動脈投与し、アルコール性肝硬変症例の肝機能が改善することを報告している³⁹⁾。

G-CSF 投与単独による治療効果については、アルコール性肝硬変患者における肝細胞増殖因子 (HGF) や肝前駆細胞の増加⁴¹⁾、アルコール性および B 型肝硬変の急性増悪症例での生存率の改善が報告されている⁴⁴⁾。しかし、G-CSF により動員された造血幹細胞の投与と比

べ、G-CSF 単独投与に同等の治療効果があるかについては結論が出ていない。B 型肝硬変患者 40 例を対象としたランダム化比較試験では、G-CSF 単独投与群と造血幹細胞・G-CSF 併用群の比較で、投与後 6 カ月の時点で両者とも肝合成能の改善が認められるが、後者でアルブミン値および Child-Pugh スコアの有意な改善を認めている⁴⁰⁾。

最近、Kedarisetty らにより興味深い報告がなされた⁴⁵⁾。主にアルコール性肝硬変患者からなる非代償性肝硬変患者 55 例を対象にランダム化比較試験が行われ、プラセボ群に比べ、G-CSF とエリスロポエチンの併用により Child-Pugh スコアおよび MELD スコアの改善、敗血症性ショックの発症率低下が認められている。

過去 5 年で、造血幹細胞を用いた肝臓再生療法の治療効果については、3 つのランダム化比較試験が実施され、いずれも有効性を認めている^{42) 44) 45)}。しかし、G-CSF 投与後の造血幹細胞の採取の有無やエリスロポエチンの併用など、治療内容が異なっており、十分なエビデンスを得るためには、今後、治療内容を統一した大規模なランダム化比較試験の実施が望まれる。また、これまでの肝硬変症に対する G-CSF を用いた肝臓再生療法の報告では、重篤な有害事象は認められていないが、血液疾患における末梢血幹細胞移植ドナーでは脾破裂の報告があり、注意を要することに触れておきたい⁴⁶⁾。

3.3 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells)

骨髄細胞に存在する幹細胞である造血幹細胞と間葉系幹細胞のどちらがより肝臓の再生に有効であるかについては、意見が分かるところである⁴⁷⁾。我々の ABMi 療法では、十分量の骨髄単核球分画を得るために全身麻酔下での骨髄液採取が必要であり、全身麻酔が困難な症例は適応外となる^{24)~27)}。そのため、全身麻酔が困難なより重症の肝硬変患者を救命するためには、局所麻酔下で少量の骨髄液を採取し、肝臓の再生に有効な細胞分画を培養して、再び患者本人に投与する治療法が必要となる。この点において間葉系幹細胞に利点がある。間葉系幹細胞は増殖力に富み、特殊な培養条件を要さないため、*in vitro* での通常培養により簡便に十分な細胞数を確保することができる。また、虚血性心疾患などの心疾患、脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患、自己免疫疾患などにおいて、間葉系幹細胞は成長因子やサイトカインの産生および免疫調節を介して、障害された組織の再生を促進することが報告されており、肝臓の再生においても有用な可能性が示

されている^{22) 48)~51)}。我々はこれらの知見を踏まえ、独自に行った基礎研究を基にプロトコールを作成し、臨床研究「非代償性肝硬変患者に対する培養自己骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の安全性に関する研究」を実施している。また、間葉系幹細胞の肝硬変症に対する治療効果を評価する新規イヌモデルを作製し、メカニズムの解明とより有効な治療法の開発を進めている。これまでに間葉系幹細胞の肝硬変症に対する作用メカニズムとしては、hepatocyte-like cell への分化、プロスタグランジン E2 やインターロイキン 10 などの液性因子を介した免疫細胞および肝星細胞の活性化抑制などが諸家から報告されている⁵¹⁾。

2007 年に報告された Mohamadnejad らの第 1 相試験で、非代償性肝硬変症例に対する自己骨髄細胞由来間葉系細胞の末梢静脈投与により MELD スコアの改善が認められて以降⁵³⁾、これまでに B 型・C 型肝硬変、アルコール性肝硬変、自己免疫性肝炎および原発性胆汁性胆管炎に起因する肝硬変など、様々な原因による肝硬変症に対して間葉系細胞を用いた肝臓再生療法が行われてきた^{54)~64)} (Table 3)。そのうち我々の知る限りでは、4 つのランダム化比較試験が実施され、3 つの試験で有効性が示されている。Amer らは C 型非代償性肝硬変患者 40 例を対象として、骨髄由来間葉系幹細胞を HGF 添加培地で培養し肝細胞への分化誘導を行ったものを肝臓または脾臓に投与し、標準治療群と比べ、Child-Pugh スコアおよび MELD スコアが有意に改善することを報告している⁵⁵⁾。また、Salma らは C 型非代償性肝硬変患者 40 例を対象に、5 日間 G-CSF 投与した後に骨髄由来間葉系幹細胞を末梢静脈投与し、肝酵素の正常化、血清アルブミン値およびビリルビン値の改善を確認している⁶¹⁾。最近の Xu らの報告では、B 型肝硬変 39 例を対象としたエンテカビル・間葉系幹細胞投与併用群とエンテカビル単独投与群の比較により、間葉系幹細胞併用により血清アルブミン値、ビリルビン値、MELD スコアの有意な改善が認められている⁶²⁾。一方、Mohamadnejad らが行った自己免疫性肝炎または原因不明の肝硬変症例 27 例を対象として検討では、骨髄細胞由来間葉系幹細胞投与による肝機能の改善効果は得られていない⁵⁹⁾。

このように、ウイルス性肝硬変症例に対しては一定の治療効果が示されているが、その他の原因による肝硬変に対する間葉系幹細胞の治療効果は明らかになっていない。また、投与細胞の分化誘導の有無や投与経路、併用薬剤などについては標準化されておらず、今

Table 3 Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver disease

Reference	Type of cells	No. of cells, route	No. of patients	Etiology	Follow-up	Type of study	Result
Mohamadnejad, 2007 ⁵³⁾	Autologous BM-MSCs	$1.02 - 6.0 \times 10^7$, peripheral vein	4	3 Cryptogenic, 1 AIH	12 months	Cohort	Improved MELD score (two of four patients)
Kharaziha, 2009 ⁵⁴⁾	Autologous BM-MSCs	$3.0 - 5.0 \times 10^7$, peripheral vein or portal vein	8	Various etiologies	6 months	Cohort	Improved MELD score and PT
Amer, 2011 ⁵⁵⁾	Autologous BM-MSCs (stimulated to hepatocytes)	2×10^7 , intrahepatic or intrasplenic	10 Intrahepatic 10 Intrasplenic 20 Control	40 HCV	6 months	Randomized control	Improved CP score and MELD score
Peng, 2011 ⁵⁶⁾	Autologous BM-MSCs	Not described, hepatic artery	53 Treatment 105 Control	158 HBV	48 months	Case control	Improved serum albumin, bilirubin, PT and MELD score
El-Ansary, 2012 ⁵⁷⁾	Autologous BM-MSCs	1×10^6 /kg, peripheral vein	15 Treatment 10 Control	25 HCV	6 months	Case control	Improved MELD score, serum albumin and bilirubin
Zhang, 2012 ⁵⁸⁾	Allogenic UC-MSCs	0.5×10^6 /kg, peripheral vein	30 Treatment 15 Control	45 HBV	12 months	Case control	Improved MELD score, serum albumin and bilirubin
Mohamadnejad, 2013 ⁵⁹⁾	Autologous BM-MSCs	$1.2 - 2.95 \times 10^8$, peripheral vein	15 Treatment 12 Placebo	Various etiologies	12 months	Randomized control	No significant difference between the groups
Jang, 2014 ⁶⁰⁾	Autologous BM-MSCs	5×10^7 twice, hepatic artery	11	11 alcohol	12 weeks	Cohort	Improved CP score and liver histology
Salama, 2014 ⁶¹⁾	Autologous G-CSF → BM-MSCs	1×10^6 /kg, peripheral vein	20 Treatment 20 Control	40 HCV	6 months	Randomized control	Improved serum albumin, bilirubin
Xu, 2014 ⁶²⁾	Autologous BM-MSCs + ETV or ETV	$0.75 \pm 0.5 \times 10^6$ MSC, hepatic artery	20 BM-MSC + ETV 19 ETV	39 HBV	6 months	Randomized control	BM-MSCs + ETV group improved better
Lukashyk, 2014 ⁶³⁾	Autologous BM-MSCs	1×10^6 /kg, intrahepatic	6	6 HCV	6 months	Cohort	Improved jaundice and histology

BM, bone marrow; MSC, mesenchymal stem cell; UC, umbilical cord; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; ETV, entecavir; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; AIH, autoimmune hepatitis; CP, Child-Pugh; MELD, model for end-stage liver disease

(文献 73 より引用)

後の課題である。また、これまでに述べた間葉系細胞の性質を顧みれば、腫瘍免疫の抑制による肝発癌や肝線維化の促進などの懸念がある^{65)~67)}。この点について考える上で重要な報告として、B 型非代償性肝硬変に対する間葉系細胞投与後の長期経過観察の報告があり、間葉系細胞投与群 53 例と非投与群 105 例について 4 年間の経過観察が行われ、両群間で肝癌の発症に差が

ないことが報告されている⁵⁶⁾。

近年、間葉系細胞から分泌されるエクソソーム (Exosome) が、急性肝障害の軽減や慢性肝障害における肝線維化の改善に働くことが明らかになり、間葉系細胞の組織修復作用のメカニズムの一つとして注目されている⁶⁸⁾⁶⁹⁾。今後はこれらの細胞外小胞 (Extracellular vesicles) が肝臓治療の重要なソースになっていく可

能性がある。

3.4 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)

近年、最も注目されている幹細胞である人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、周知の通り、体細胞に Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc を導入し、リプログラミングした多能性幹細胞である⁷⁰⁾。iPS 細胞は培養による増殖が可能で、Hepatocyte-like cell への分化誘導が報告されており、肝臓再生療法の細胞源として有用である⁷¹⁾⁷²⁾。さらに、*in vitro* の特定の環境下で iPS 由来内胚葉細胞を血管内皮細胞と間葉系細胞と共培養すると立体的な肝臓の原基 (肝芽, Liver Bud) が形成され、この iPS 細胞由来肝芽を移植することで、生体内で総合的な機能を発揮する肝臓に分化誘導できることが報告された²³⁾。iPS 細胞は多能性幹細胞であるがゆえに腫瘍形成のリスクをもつが、これを克服する方法の開発が注力されている。

4. おわりに

一般的に先進国における再生医療の承認手続きは複雑であり、臨床研究の開始に時間を要するのが実情である。日本では「再生医療等製品の实用化に対応した承認制度」が施行され、再生医療等製品の有効性が推定され、安全性が確認されれば、条件・期限付きで早期に承認がなされ、市販後に有効性とさらなる安全性を検証する仕組みが導入された。再生医療の早期承認については今後の検証も必要であるが、この早期実用化への取り組みがモデルケースとなり、新たな肝臓再生療法の実用化が加速されることを期待する。

文 献

- 1) Pearlman BL. Protease inhibitors for the treatment of chronic hepatitis C genotype-1 infection: the new standard of care. *Lancet Infect Dis* 2012; 12 (9): 717—728
- 2) Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 2012; 366 (3): 216—224
- 3) Sulkowski MS, Gardiner DR, Rodriguez-Torres M, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; 370 (3): 211—221
- 4) Woo G, Tomlinson G, Nishikawa Y, et al. Tenofovir and entecavir are the most effective antiviral agents for chronic hepatitis B: a systematic review and Bayesian meta-analyses. *Gastroenterology* 2010; 139 (4): 1218—1229
- 5) Kowgier M, Sherman M, Wong DK, et al. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol* 2015 [Epub ahead of print]
- 6) Dienstag JL, Cosimi AB. Liver transplantation—a vision realized. *N Engl J Med* 2012; 367 (16): 1483—1485
- 7) Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, et al. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011; 141 (4): 1249—1253
- 8) Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24 (6): 3052—3053
- 9) Fox IJ, Daley GQ, Goldman SA, et al. Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. *Science* 2014; 345 (6199): 1247391
- 10) Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol* 2014; 62: 14.12.1—14.12.23
- 11) Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7 (5): 288—298
- 12) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32 (1): 11—16
- 13) Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406 (6793): 257
- 14) Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135 (2): 438—450
- 15) Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA, et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant* 2009; 18 (12): 1261—1279
- 16) Kisseleva T, Brenner DA. The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis. *J Hepatol* 2012; 56 (4): 965—972
- 17) Behbahan IS, Keating A, Gale RP. Concise review: bone marrow autotransplants for liver disease? *Stem Cells* 2013; 31 (11): 2313—2329

- 18) Moore JK, Stutchfield BM, Forbes SJ. Systematic review: the effects of autologous stem cell therapy for patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39 (7): 673—685
- 19) Terai S, Takami T, Yamamoto N, et al. 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—210
- 20) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109 (10): 1291—1302
- 21) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40 (6): 1304—1311
- 22) Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells induce proliferative, cytokinic and molecular changes during the T cell response: the importance of the IL-10/CD210 axis. *Stem Cell Rev* 2015; 11 (3): 442—452
- 23) Takebe T, Sekine K, Taniguchi H, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013; 499 (7459): 481—484
- 24) 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—2298
- 25) Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med* 2012; 14 (74): 7—12
- 26) 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—1246
- 27) 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; 20 (9): 1503—1510
- 28) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134 (4): 551—558
- 29) 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—1073
- 30) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22 (1): 33—42
- 31) Couto BG, Goldenberg RC, da Fonseca LM, et al. Bone marrow mononuclear cell therapy for patients with cirrhosis: a Phase 1 study. *Liver Int* 2011; 31 (3): 391—400
- 32) Bai YQ, Yang YX, Yang YG, et al. Outcomes of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in decompensated liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (26): 8660—8666
- 33) Spahr L, Chalandon Y, Terraz S, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with decompensated alcoholic liver disease: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2013; 8 (1): e53719
- 34) 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—1830
- 35) Yannaki E, Agnagnostopoulos A, Kapetanios D, et al. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 2006; 34 (11): 1583—1587
- 36) Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13 (24): 3359—3363
- 37) Levicar N, Pai M, Habib NA, et al. 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
- 38) Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, et al. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the

- treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 2008; 40 (4): 1140—1144
- 39) 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—1958
 - 40) 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—396
 - 41) 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—229
 - 42) Salama H, Zekri AR, Bahnassy AA, et al. Autologous CD34+ and CD133+ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16 (42): 5297—5305
 - 43) Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant* 2010; 19 (11): 1475—1486
 - 44) Garg V, Garg H, Khan A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012; 142 (3): 505—512
 - 45) Kedarisetty CK, Anand L, Bhardwaj A, et al. Combination of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin improves outcomes of patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2015; 148 (7): 1362—1370
 - 46) 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 (9152): 555
 - 47) Baligar P, Mukherjee S, Kochat V, et al. Molecular and Cellular Functions Distinguish Superior Therapeutic Efficiency of Bone Marrow CD45 Cells Over Mesenchymal Stem Cells in Liver Cirrhosis. *Stem Cells* 2016; 34 (1): 135—147
 - 48) Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant* 2015 [Epub ahead of print]
 - 49) Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart J* 2015; 36 (27): 1744—1753
 - 50) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011; 134 (Pt 6): 1790—1807
 - 51) Lunn JS, Sakowski SA, Feldman EL. Concise review: Stem cell therapies for amyotrophic lateral sclerosis: recent advances and prospects for the future. *Stem Cells* 2014; 32 (5): 1099—1109
 - 52) Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med* 2015; 30 (5): 580—589
 - 53) 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—466
 - 54) Kharaziha P, Hellström 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—1205
 - 55) Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23 (10): 936—941
 - 56) Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 2011; 54 (3): 820—828
 - 57) El-Ansary M, Abdel-Aziz I, Mogawer S, et al. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis. *Stem Cell Rev* 2012; 8 (3): 972—981
 - 58) Zhang Z, Lin H, Shi M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 (Suppl 2):

- 112—120
- 59) Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Bagheri M, et al. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2013; 33 (10): 1490—1496
 - 60) Jang YO, Kim YJ, Baik SK, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int* 2014; 34 (1): 33—41
 - 61) Salama H, Zekri AR, Medhat E, et al. Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5 (3): 70
 - 62) Xu L, Gong Y, Wang B, et al. Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29 (8): 1620—1628
 - 63) Lukashyk SP, Tsyrukunov VM, Isaykina YI, et al. Mesenchymal bone marrow-derived stem cells transplantation in patients with HCV related liver cirrhosis. *J Clin Transl Hepatol* 2014; 2 (4): 217—221
 - 64) Wang L, Li J, Liu H, et al. Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 (Suppl 1): 85—92
 - 65) di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008; 57 (2): 223—231
 - 66) Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 2009; 4 (8): e6657
 - 67) Zhu W, Xu W, Jiang R, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80 (3): 267—274
 - 68) Tan CY, Lai RC, Ho HK, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5 (3): 76
 - 69) Li T, Yan Y, Xu W, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev* 2013; 22 (6): 845—854
 - 70) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663—676
 - 71) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, et al. An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 29 (3): 237—243
 - 72) Ishikawa T, Kobayashi M, Ochiya T, et al. Human induced hepatic lineage-oriented stem cells: autonomous specification of human iPS cells toward hepatocyte-like cells without any exogenous differentiation factors. *PLoS One* 2015; 10 (4): e0123193
 - 73) Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 10 (5): 639—648

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

The current state of liver regeneration therapy

Isao Sakaida*

Recent advancements of antiviral agents have enabled control of viral hepatitis. Meanwhile, liver cirrhosis caused by alcohol abuse or nonalcoholic steatohepatitis is continuing to increase; still, many patients with decompensated liver cirrhosis are awaiting liver transplants. Liver transplantation yields dramatic therapeutic effects, but problems such as shortage of donors, surgical invasiveness, immunological rejection, costs limit the number of transplantations. Basic studies and clinical trials of liver regeneration therapy through stem cell transplantation are advancing to supplement this restriction to the number of liver transplants. Clinical trials for liver cirrhosis have mainly utilized autologous bone marrow cells as a source of stem cells. Several recently reported randomized controlled studies have shown the effectiveness of these approaches. However, these studies differed in terms of the cell preparations utilized. Future clinical trials should be standardized in terms of cell numbers and injection route. With the advent of induced pluripotent stem cells, liver regeneration therapy has entered a new phase. The generation of a liver bud from induced pluripotent stem cells was reported, and a concept of organ bud transplantation therapy has been advocated. In Japan, the regulations have been revised to facilitate the implementation of regenerative medicine. These efforts towards early implementation may serve as a model for fast-tracking the implementation of new liver regeneration therapies.

Key words: liver regeneration therapy autologous bone marrow cells hematopoietic stem cell
mesenchymal stem cells induced pluripotent stem cells

Kanzo 2016; 57: 269—279

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

*Corresponding author: sakaida@yamaguchi-u.ac.jp