

## IV. 調査事項

### 1. 肝臓再生に関して

1-1. 肝疾患を対象とする細胞組織利用医薬品医療機器にかかるG L策定にむけて

1-2-1. 再生医療の現状

1-2-2. 再生医療関連規制政策にかかわるわが国の現状

1-2-3. 肝疾患を対象とする細胞組織利用医薬品医療機器にかかるG L策定についての基本的考え方について

1-3. 肝硬変症に対する自己骨髄由来細胞を用いた治療法の現状と今後の展望

1-4. 肝細胞を用いた再生医療の現状と展望

1-5. 現状における再生医療について

1-6. 肝臓の発生・分化機構

### 2. CPC に関して

細胞プロセッシングセンターの管理と運用

ー その現状と課題 ー

## 肝疾患を対象とする 細胞組織利用医薬品医療機器にかかる GL 策定にむけて

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授  
(財) 先端医療振興財団 先端医療センター研究所  
再生医療研究グループ 膝島肝臓再生研究チーム  
松山晃文

肝硬変は、あらゆる慢性肝疾患が原因となり、あるいはこれらの疾患が進行した終末像であり、根治療法はなく、肝硬変の末期に対しては、現状では脳死肝移植あるいは生体肝移植が唯一残された道である。現在、日本には約 25 万人の肝硬変患者がおり、60% が C 型肝硬変、15% が B 型肝硬変、12% がアルコール性肝硬変を基礎疾患として持つとされる。

本邦は、諸外国に比べて C 型肝炎の罹患率が高い。C 型肝炎ウイルスの感染により、慢性肝炎、肝硬変そして肝癌が発症する事は既知の事実であり、肝硬変の初期はほとんど症状がないものの、進行して非代償性肝硬変になると腹水、浮腫、消化管出血、黄疸、発熱、意識障害などが認められる。内科的には慢性肝炎、肝硬変の状態でインターフェロンを主体とする内科的治療に治療効果があるとされる。一方、肝癌が発症してしまえば、内科的に根治することは不可能であり、外科的に腫瘍を摘出することが第一選択となる。しかし、現実には進行した肝硬変が肝癌の発症母地となるため、肝不全のために外科的治療を選択しえず、重篤な症例に至っては、TAE あるいは PEIT さえ試みることができない状況に陥る。上記のような重篤な肝硬変患者さんに対して肝移植が行われるようになって久しい。この治療法が現在第一選択であることは論を待たない。しかし、脳死肝移植に関してはドナーの絶対的不足、また生体肝移植に関してはドナーの安全性という問題、健常人にメスをいれるという抵抗感、倫理的問題がある。そこで、革新的治療法として肝細胞再生による肝不全の治療法の確立が希求されている。

次世代医療機器審査評価指標 WG において、平成 20 年度肝臓 TF を設置し、次世代型肝疾患治療細胞組織利用医療機器の GL 策定にむけた資料収集を行なうこととなった。本報告書では、松山が「再生医療の現状」「再生医療関連規制政策にかかるわが国の現状」および「肝疾患を対象とする細胞組織利用医療機器にかかる GL 策定についての基本的考え方について」、寺井崇二委員と山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学坂井田功教授には「肝硬変症に対する自己骨髄由来細胞を用いた治療法の現状と今後の



## 再生医療の現状

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授  
(財)先端医療振興財団 先端医療センター研究所  
再生医療研究グループ 膝島肝臓再生研究チーム  
松山晃文

### はじめに

「再生医療」とは、疾病や事故により損傷や機能不全を起こした組織・器官・臓器に対して、上記の組織・器官・臓器形成の過程を人為的に再現することにより修復・再生を図り、機能を回復する医療として捉えられている。

1980年代初頭のマウス胚性幹細胞（ES細胞）の樹立以来、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など様々な幹細胞が見出され、その効率的な分離及び培養法が確立されていった。こうして得られた幹細胞は、細胞の分化・個体の発達といった生命のメカニズムを探索する基礎研究を大いに発展させるとともに、幹細胞の多能性・多分化能を活かして生体機能の改善・修復を図る再生医療（regenerative medicine）への期待をもたらしたといえる。また、iPS細胞株樹立法確立は広く国民の耳目を集め、再生医療という言葉の独り歩きさせた。

我々の体は、数多くの種の特定の細胞が一定の配向性をもって集合した構造単位としての「組織」、複数の「組織」が規則性をもって集合し構成している「器官・臓器」から構成されている。組織・器官・臓器は、発生分化の過程で、情報伝達分子によるシグナルに応じて様々な「細胞」が周辺環境（細胞接着分子、細胞外マトリックス等）シグナルを介して相互作用し集合することにより形成される。これは発生の過程で均一性をもって再現されている。一方、我々の損傷を受けた組織・器官・臓器などが一定程度ではあるものの復元する現象は古くから知られている。これらの研究が再生医学であり、発生過程をトレースして再生研究に資するという発想と、炎症あるいは外傷ないしは疾病などにより滅失した組織・器官・臓器の回復をトレースあるいは試みるという発想があろう。事実、再生医学は「鶴学問」と評されるよう食欲に周辺領域を飲み込んできた。従前の例えば「内科学」あるいは「生物学」といった領域を飲み込んだ、幅広くかつ新しい学問領域でもあり、学際研究発展のプロトタイプと言っても過言ではない。であるからこそ、ここで「再生医療」の定義に踏み込むべきである。これから議論しようとしている領域のいわゆる守備範囲を明確にしなければ、議論は踊るのみである。「再生医学」にも触れるべきであることは十分認識しているが、「医療」を志向した領域に限定し、かつ最終製品・製剤の観点から議論する。

## 1. 再生医療 その混乱した用語の定義

### 細胞治療 (cellular therapy)

再生医療を、それに関連する事象と共に歴史的経緯の中でとらえてみよう。プラナリアやミミズ、ヒドラは切っても自己複製し、トカゲは「尻尾きり」をしてもその尻尾は再生する。このように、動物の自己再生機能は古くから知られていた。「再生」というタームをはなれば、輸血は細胞治療の走りであり、血液細胞の投与が血液循環という「器官」の機能を改善させしめたと考えれば、広範は意味では「再生医療」である。ヒトで「再生」が「医療」の現場で応用されるようになったと明らかに言えるものは骨髄移植が最初である。1970年代にその基礎が固まり、現在臍帯血移植ともに確立された手技として世界中で実施されている。これら手技は、わが国においては移植として捉えられ、医師法・医療法の範囲内で医師の手技として行なわれてきたという伝統がある。機能的な組織構成細胞が失われる病態であるさまざまな難治性疾患においては、機能的細胞が臓器に移入されて機能を果たすか、あるいは細胞が移入されることを引き金として臓器が機能しうる状態に再構築されることによって、組織としての機能が劇的に改善する余地がある。このような考えから、細胞治療という新たな治療概念が構築されてきた。すなわち、細胞治療の本質とは、特定臓器の失われた機能を細胞移入により再構築し、機能回復を目指すことにある。これらは医師・医学者の視点で展開である。つまり、医師・医学者や細胞を主体に扱っている研究者にとっては、「再生医療」とは「細胞治療」のことなのである。

### 組織工学 (tissue engineering)

細胞、工学、材料と適当な生化学的／物理化学的因子を組み合わせることで生体機能の改善や代替を図るティッシュ・エンジニアリング (tissue engineering) の動きも1970年代に登場した。ティッシュ・エンジニアリングには、組織の一部又は全部を修復するもの（皮膚、軟骨、骨、血管等）、細胞を装着した（補助）人工臓器（人工腎臓、人工肝臓等）などがある。1970年代半ばにGreenらが開発した皮膚（表皮）の培養法は、1981年のO'Connorらによる熱傷患者への自家培養表皮移植の成功につながり、ティッシュ・エンジニアリングのプロトタイプとされている。わが国においても、Green法に則って製造される自己培養表皮が薬事承認を受け、保険償還価格が設定されている。このように、ティッシュ・エンジニアリングにかかる漠然とした概念はすでに存在していたが、概念として明確に登場したのは近年のことでもあり、Vacantiらによる提唱を待たなければならなかった。細胞を「物」を作る素材として捉えようと試みたのがVacantiらの画期的な発想であって、例えば足場素材のコラーゲンが細胞と同等に論じられうるようパラダイムシフトがなされたともいえよう。再生医療の三要素として「細胞」「足場」「培養液（成長因子）」が挙げられているが、それら三要素のなかでも特に「足場」に軸足を置いているという点がティッシュ・エンジニアリングの提

要である。これらは工学系研究者の視点で展開である。つまり、工学系研究者や足場素材を主体に扱っている研究者にとっては、「再生医療」とは「ティッシュ・エンジニアリング」のことなのである。これら歴史的経緯を紐とくと、足場材のみではティッシュ・エンジニアリングとは言えず、細胞組織を素材として用いることが不可欠なのではないかと考えるものである。

### 再生医療とバイオロジクス

「再生医療」への期待が大きい。諸外国でregenerative medicineというより、cellular therapyあるいはティッシュ・エンジニアリングと「物」によって切り分けて説明するほうが伝わるという経験をする。確かに、生物系研究者からみれば再生医療は細胞治療なのであり、工学系研究者からみれば再生医療はティッシュ・エンジニアリングなのである。ヒトは自らの経験からしかものを語れない。欧米ではこれら2つの概念が独立しており、これらを含め広範な概念としてバイオロジクスとして捉えられている。わが国では再生医療という概念が、実は上記2つの概念を内包していると捉えるべきである。

図に諸外国とわが国の「再生医療」関連の概念を俯瞰してみた。バイオロジクスには、エリスロポエティンや-mabのような抗体製剤、コラーゲン足場材から細胞、複合型細胞組織利用医薬品医療機器まで幅広く含まれている。欧米などではバイオロジクスという概念は周知されているが、regenerative medicineという概念は一般的でないのかもしれない。わが国では、バイオロジクスという用語すら一般的でなく、regenerative medicineという用語が一人歩きしている。図に示したように、「再生医療」という概念にはティッシュ・エンジニアリングと細胞治療という2つの概念が包括されており、バイオロジクスよりも小さい守備範囲であると想定するのが賢明であろう。

## 2. 細胞治療の現状

### 諸外国の状況

バイオロジクスとして実質的に製造販売されているものとして、骨補填材料、再生医療効果を有する医薬品のほか、培養表皮、培養皮膚、培養軟骨などがあり、一定の市場を形成しているとされる。ただし、わが国と諸外国とは大きくバイオロジクス製品の販売システムが異なっていることは特記する必要がある。米国では、特に治験の段階で有償による治験が積極的に行なわれており、製造販売業者が「実質的にかかった費用」を受験者に請求することが行なわれている。「実質的に製造販売」というのはこのような事情による。米国にてFDAからBLA (Biological License Approval) を取得して上市されているのは、わが国から遅れること1週間で承認をうけたEpicelのみである。重ねて述べれば、培養皮膚の薬事承認に関しては、わが国が米国に先んじて行なったのである。わが国では、有償治験という制度が一般的でなく、有償治験が実施可

能であることすら多くの製造販売業者が知らないため、市場形成という点で米国に遅れをとったものと認識している。これまで諸外国を含めて「上市」されている細胞組織利用医薬品医療機器は、ほぼ表皮・皮膚・軟骨に限定されている（表1）。わが国は、これら領域において圧倒的に遅れをとっているのが実情である。

企業による細胞を用いた再生医療に関わる治験は、2008年10月末時点で、世界全体で38社、100件程度実施されている。開発のフェーズではphase 1が約30%、phase 2が約50%、phase 3が約20%を占めている。米国での治験プロトコール数が多いのは、米国発のシーズが多いことと、マーケットとして大きい予測されるためであろう（表2）。

特にphase3に限定して議論する。対象臓器別で議論すると、細胞組織利用医薬品医療機器に相当するもの（more than minimal manipulate）では、心血管系、整形外科領域、皮膚科領域に限定されているのがわかる。細胞種としては、骨髄由来幹細胞（間葉系幹細胞含む）と線維芽細胞、骨格筋芽細胞、軟骨細胞のみである。細胞組織利用医薬品医療機器に相当しないもの（minimal manipulate）、すなわち培養を伴わないものとしては、対象臓器は肝臓と消化管（痔瘻）であり、細胞種としては臍帯血由来幹細胞、肝臓から肝細胞そのものを分離したもの、脂肪組織由来細胞（SVF）に限定されている。肝細胞を用いた細胞治療（再生医療）については、大橋委員が、骨髄由来単核球を用いる細胞治療については寺井崇二委員が詳述する。わが国におけるヒト幹細胞臨床研究が細胞組織利用医薬品医療機器への展開をめざしていることを考えると、骨髄由来幹細胞（間葉系幹細胞含む）と線維芽細胞、骨格筋芽細胞、軟骨細胞を細胞源とした製剤はバイオシミラーを目指すという展開も考慮すべきかもしれない。

## わが国の現状

日本ではジャパン・ティッシュ・エンジニアリングの自家培養表皮であるジェイスが、2008年12月17日の中央社会保険医療協議会において承認され、2009年1月1日付でヒト細胞・組織を利用した再生医療製品として日本初保険適用となっている。現在承認前のものは（治験を含む）、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングの自己培養軟骨と日本ケミカルリサーチ社の培養間葉系細胞によるGVHD治療薬のみである。確かに、再生医療を目指した臨床研究は数多く行われているが、臨床研究から治験・薬事承認あるいは医療技術としての承認への橋渡しは不十分である。制度面でのシームレスな制度設計のみならず、論文偏重施行の研究者へも再考を強く促したい。

なお、わが国と諸外国の再生医療に関する比較を図に示した。

## 胚性幹細胞を用いる細胞治療

胚性幹細胞を用いる細胞治療への展望を追記しておく必要がある。周知の通り、わが国で胚性幹細胞を用いる細胞治療にかかる確認申請・薬事法上の治験届がなされたものは無く、また臨床研究に関してはガイドラインによる規制はなされていない。胚性幹細胞の臨床応用にむけては、昨年（2008年）12月3日に国際幹細胞学会がガイド

ラインを公表し、ここで胚性幹細胞を用いる臨床研究にかかるレコメンデーションが記述されている。今後、とくにスウェーデンあるいは英国で当該臨床研究が開始されるかもしれず、注視に値する。胚性幹細胞株由来細胞臨床使用に関しては、Geron社による胚性幹細胞株由来オリゴデンドロサイトを用いた脊髄損傷患者への臨床研究の開始申請に関し、2008年1月米国FDAはINDとしての承認を与えたとの情報がある。わが国と制度が大きく異なり、FDAはプロトコルを承認するのであって、製品の安全性を担保するのでないため、脊髄損傷患者への胚性幹細胞の利用がリスクベネフィットの観点からのtrade-offによりベネフィットがリスクを凌駕するとの説明に首肯したのであろう。今後、各IRBによる機関承認を得て臨床研究（phase I）に入るものと想定される。

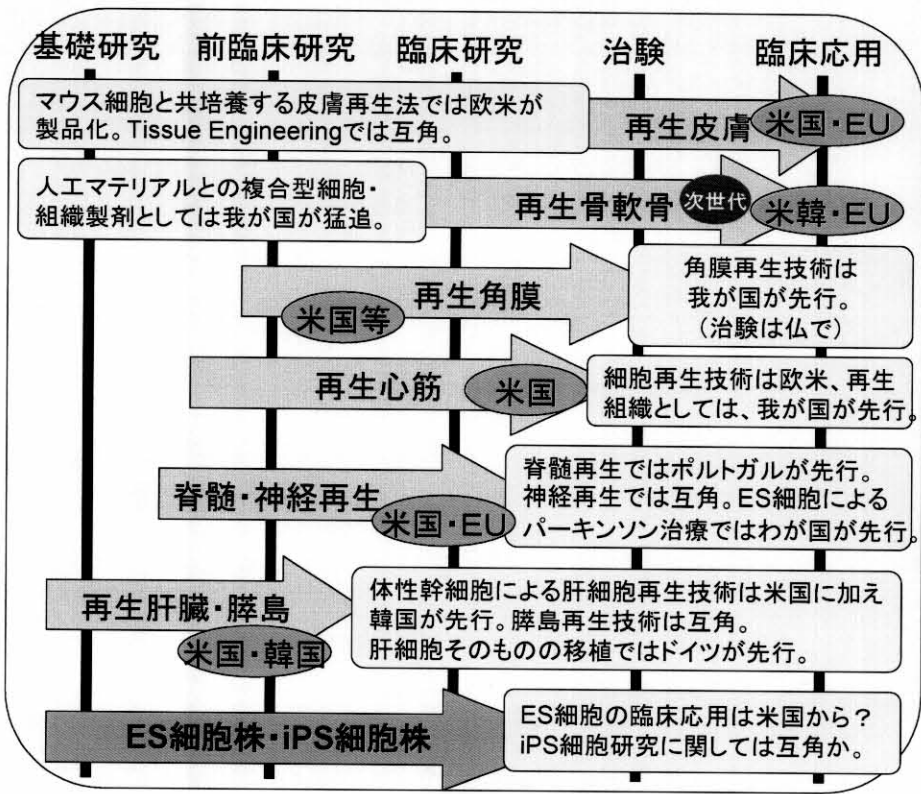
### おわりに

「再生医療」は損なわれた組織・器官・臓器の機能を根本的に修復・回復し、治療方法が存在しなかった患者を救うことを可能にする医療として期待されている。基礎研究の成果が一日でも早く臨床応用され、標準治療として普遍化されてほしい。十分な治療法が確立されていない患者さんは、そう叫ぶかもしれない。細胞治療もティッシュ・エンジニアリングでも彼らにとって自らの病を治しあるいは癒してくれるものであれば十分なのである。わが国と諸外国の研究開発の進捗状況を適切に把握しつつ、大学発シーズをシームレスに展開していくことが肝要である。今後、イノベーションの促進・社会還元の一層の加速・国民福祉への寄与のため、安全かつ有効な再生医療の実現を目指して行きたい。



表1 世界で実質的に販売されている細胞組織利用医薬品医療機器

治療	自家/同種	製品名	企業	国名
皮膚	自家	Epicel	Genzyme BioSurgery	米国
	自家	LASERSKIN	Fidia Advanced Biopolymers	イタリア
	自家	Bioseed-S	BioTissue Technologies	ドイツ
	自家	EpiDex™、eurokinin®	Modex /Euroderm GmbH	ドイツ
	自家	Holoderm	Tego Science	韓国
	自家	ReCell、CellSpray	Avita Medical Ltd.	イギリス オーストラリア
	自家	AutoCel	Modern Cell & Tissue Technologies,Inc.	韓国
	自家	ジェイス	ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	日本
	同種	Dermagraft	Advanced Tissue Sciences /Advanced BioHealing	米国
	同種	TransCyte	Advanced Tissue Sciences/ Advanced BioHealing (Smith & Nephew plc)	米国
	同種	Apligraf	Organogenesis	米国
	同種	OrCel	Ortec International /Forticel Bioscience	米国
	軟骨	同種	Kaloderm	Tego Science
自家		Carticel	Genzyme BioSurgery	米国
自家		Cellactive	Isotis/Integra Lifescience	オランダ
自家		Chondrotransplant chondrosphere	Co.don	ドイツ、 シンガポール
自家		Chondron	Cellontech	韓国
自家		CACI/MACI	Verigen/Genzyme	ドイツ
自家		CARTOGEN	Mercy Tissue Engineering	オーストラリア、 ニュージーランド、 シンガポール
自家		Bioseed-C	BioTissue Technologies	ドイツ
自家		ChondroCelect	TiGenix	ベルギー
自家		Hycel, Hyalograft-C	Cell Matrix AB	スウェーデン
自家		ChondroArt	Educell,d.o.o.	スロベニア
自家		Cartilink-3	Interface Biotech A/S	デンマーク
自家		ACI-Maix	Matricel GmbH	ドイツ
自家		Chondrokin	ORTHOGEN AG	ドイツ



10年後

骨・軟骨    角膜  
神経    心筋

再生皮膚・骨軟骨等製品の普及  
再生角膜・心筋・神経再生の実用化

国民の幸福  
最先端の有効かつ安全な医療を国民へ

国際競争力の強化  
日本の医療技術を世界へ

イノベーションの速やかな社会還元をめざそう！

## 再生医療関連規制政策にかかるわが国の現状

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授  
(財)先端医療振興財団 先端医療センター研究所  
再生医療研究グループ 髙島肝臓再生研究チーム  
松山晃文

### はじめに

ヒトゲノムプロジェクトがほぼ終了、世界はポストゲノム・バイオテクノロジーの実用化時代に突入している。そのなかでも再生医学へ向けられるまなざしは熱く、難治性疾患への光明として話題に上らない日はない。すでに、骨髄、末梢血、臍帯血中の造血幹細胞を用いた細胞治療が盛んに行われており、また骨髄細胞を直接心臓組織内に移植することにより、心筋梗塞などで壊死に陥った組織の機能を補う再生医療臨床研究も行われており、体性幹細胞を体外で増幅させ様々な再生医療に応用する研究も今後一層盛んに行われるものと認識している。加えて、わが国発の技術であるiPS細胞株樹立技術の確立もまた、国民の目耳を再生医療への期待へといざなっているところである。このように、近年の生命科学領域の進歩とその知見を基盤とした細胞工学・組織工学技術が発展する一方で、再生医療を臨床実現するには、科学的にみても医学的に見ても未だ不明な点も残されていることも事実であり、体外増幅による細胞の癌化、未知ウイルスなど感染症伝播の可能性など安全性を危惧する声があることも否めない。特に、ES細胞株・iPS細胞株の臨床応用に向けては移植後の奇形腫形成・腫瘍形成の危険性をはらみ、科学的合理性をもってリスク・ベネフィットが論じられなければ臨床応用への障壁は著しく高いと認識している。

再生医療を社会還元するには、科学的合理性に関する議論に加え、各国社会背景に起因する医療制度論的検討が欠かせない。例えば、わが国においては、国民皆保険制度という世界に誇るセーフティーネットが構築されており、この枠組みの中での再生医療の実現・一般医療化をまずは試みるべきである。なんとなれば、政府の科学研究費補助金に加え、保険料（税）は広く国民が負担しているものであって、先端的医療が都市部市民のみしか享受しえず、地域医療においては実践されえないということは、租税・保険料（税）の公平かつ均等な負担という観点から好ましくないからである。従って、再生医療を実践し、広く社会還元を努めようと考えるのであれば、再生医療研究の成果というイノベーションの出口にむけ、国民に広く良質かつ均等な医療を提供している現行の保険医療制度を理解する必要があるだろう。本報告書においては、わが国における再生医療にかかる保険医療制度を概括するとともに、再生医療の実現への

期待とその課題について述べる。

## 再生医療を取り巻く制度

### 1. わが国における再生医療関連法衛生規制

再生医療を実現化するにあたり、それを細胞組織利用医薬品医療機器という「物」の流通としてとらえるのか、あるいは医師・歯科医師が施す「技術」として捕らえるのか、との観点が重要である。「物」として捕らえる場合は、薬事法（あるいは血液製剤の安定供給に関する法律）による規制をうけ、確認申請から治験届、治験、承認申請、薬事承認、保険収載という一連の流れとその拠り所となる法令通知等を理解する必要がある。一方、「技術」としてとらえる場合は、医師法あるいは歯科医師法による規制を受ける。臨床研究は医師法あるいは歯科医師法のもとで行なわれ、「臨床研究に関する倫理指針」「遺伝子治療の関する指針」、特に再生医療にあつては「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準拠して行なわれているところであるが、これら指針には法的根拠はないため、医師・歯科医師の良心に拠るところが大きい。これら指針には罰則規定がないが、反した場合は何らかの社会的制裁が加えられる可能性があるところのものであり、法令等ハード・ローに対してソフト・ローと捉えられている。

### 2. 「技術」の施術としてとらえる再生医療

再生医療を、医師あるいは歯科医師が施す「技術」として捉える場合、当該技術は医師法（歯科医師法）あるいは医療法の規制をうける。再生医療は一般的医療として確立されたものは少なく、臓器機能再生等を通じて、国民の健康の維持並びに疾病の予防、診断及び治療に重要な役割を果たすものであるとの認識の下、臨床研究を推進し、一般医療として敷衍化することを夢見て策定されたのが、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（厚生労働省平成18年告示第425号）」である。ヒト幹細胞を疾病の治療のための研究を目的として人の体内に移植又は投与する臨床研究を対象としている。本指針はヒト幹細胞を用いる「臨床研究」を対象としているため、骨髄移植あるいは輸血などといった安全性及び有効性が確立され一般的に行われている診療行為、ならびに臨床治験に関しては適用されない。ヒト幹細胞臨床研究においては、採取、調製及び移植又は投与は基本的には同一機関内で実施されるものであるが、薬事法（昭和35年法律第145号）における治験以外で採取、調製及び移植又は投与の過程を複数の機関で実施する場合は考えられ、これに対しては本指針が適用される。ヒト幹細胞あるいはその調整製品の投与を行う研究機関の医師である研究者が自ら調製機関に赴いて調製せず調整を共同研究者などに依頼する場合は、薬事法等関連法規に抵触しないか十分に吟味する必要がある。なお、民間クリニックで行われている細胞移植療法についても、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として行われるものであれば本

指針の対象である。

ヒト幹細胞臨床研究に用いるヒト幹細胞は、その採取、調製、移植又は投与の方法が明確に管理されるものと規定されている。採取、調整、移植又は投与の方法に関しては、その方法により十分に安全対策がとられていることを示す必要がある。すなわち、採取段階における安全対策等については、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成12年12月26日付医薬発第1314号厚生省医薬安全局長通知）の規定を援用している。医療技術を対象とした指針でありながら、薬事法の規定を援用している点が、本指針の肝である。なるとなれば、再生医療関連知見が、適切に社会還元されるためには、医薬品医療機器として承認をうけることが近道であることから、臨床研究から治験、上市への連続性が示されたからである。

### 3. 「業」としての製造販売・「物」の流通としてとらえる再生医療

医師法あるいは歯科医師法の範囲外で行なわれる再生医療においては、細胞組織利用医薬品医療機器という「物」としての薬事規制をうける。薬事法においては、業として反復継続して医薬品等を製造・販売する「者」を規制することを目的としていたが、平成15年の大改正により、頒布されたのちの安全性確保が肝要であるとの観点から、「物」が安全かつ有効に利用されるための規制が強化され、極論すれば「物」の流通とその後の副作用などのフォローアップに比重がおかれている。薬事規制上は、再生医療技術は細胞組織利用医薬品医療機器という「物」として薬事承認をうけ、それが保険収載されて世に出て行くこととなる。

一般的な医薬品医療機器に関しては、薬事承認にむけ治験届、治験、承認申請という流れがある。加えて、再生医療製品を含む細胞組織利用医薬品医療機器の治験の開始にあたっては、治験届・30日審査に加え、いわゆる確認申請を行なうこととなっている。これは、細胞組織利用医薬品医療機器の特殊性から30日審査で十分な審査が可能であるのか、との観点から行なわれているものである。確認申請の承認ののち、治験届の提出となるわけであるが、確認申請にて審査される内容が不明確であるとの指摘もあり、確認申請における論点と書式が明確にされた。アカデミアが医師主導型治験で再生医療の社会還元を目指すには、この確認申請をクリアする必要があり、その申請にかかる製品の安全性・有効性の基本資料作成の基準である平成12年医薬発第1314号通知別添1と平成20年薬食発第0221003号通知と第0912006号通知を熟読する必要がある。また、動物実験のデータとしてGLP水準でのデータ取得が求められており、ISO10933に規定がある項目にあつては、科学的合理性を有する範囲内で遵守することが求められている。特に大学等アカデミアでは、データの散逸を含めその信頼性に疑義が呈されることがまれではないため、再生医療の臨床実現を求めるのであれば、in vivoであれin vitroであれ、十分に動物実験をデザインする必要がある。そのため、

独立行政法人医薬品医療機器総合機構の事前相談制度等を積極的に利用することが社会還元への近道かもしれない。

#### 4. 臨床研究から治験へ ―その橋渡し政策

国民の生活水準の向上や価値観の多様化、医学医術のめざましい進歩にともなう医療サービスの高度化に対応して、必要な医療の確保を図るための保険給付と患者の選択による適当な医療サービスとの適切な調節を図ることを目的として特定療養費制度が設けられている。当該制度には、評価療養と選定療養の2制度があり、評価療養の中に先進医療の項目が認められる。再生医療を社会還元するための制度として先進医療制度あるいは第3項先進医療である高度先進医療評価制度を活用するという方策がある。これは、再生医療を医師が機方の範囲内で行う先端的「技術」として捉えるという考え方である。高度医療評価制度は先進医療制度に内包されることから、先進医療制度に関して述べる。

先進医療とは、一定の要件に該当し知事の承認を受けた医療機関(特定承認保険医療機関)において療養を受けた場合には、先進的医療を除く一般の療養の給付に相当する基礎的な部分については、特定療養費として保険給付の対象とする制度である。根拠法令は、保険医療機関及び保険医療費担当規則：第5条(一部負担金の受領)「保険医療機関は、選定療養に関し、当該療養に要する費用の範囲内において法第44条第2項又は第59条ノ2第4項の規定により算定した費用の額を超える金額の支払を受けることができる。」である。保険外併用療法(いわゆる混合診療)は、保険医療機関及び保険医療費担当規則：第18条(特殊療法等の禁止)「保険医は、特殊な療法又は新しい療法等については、厚生労働大臣の定めるもののほかおこなってはならない。ただし、特定承認保険医療機関において行う第5条の2第2項に規定する厚生労働大臣の承認を受けた療養については、この限りで無い。」に規定されているところであるが、これは医師と患者の情報非対称性による不当な患者負担を抑止すべきであるとの観点、有効性・安全性の確立していない診療行為(治験を除く)を回避すべきとの観点から、行なうべきでないとの思想によるものである。先進医療制度は、あくまでも「臨床研究」として当該「技術」の安全性・有効性を検証するための制度として設計されており、保険診療として一般化するに足りる科学的合理性を有するかを検証するための制度であって、「医療」における特殊療法にはあたらないと解釈されている。したがって、平成20年度より開始された高度医療評価制度は、「未承認医薬品医療機器あるいは適応外医薬品医療機器を用いる手技」を対象としており、治験のショートカットと考えることは誤りである。

### 再生医療をめぐる政策パッケージ

#### 1. 再生医療の科学技術政策パッケージにおける位置づけ

財政・経済一体改革会議決定（平成18年7月6日）の「経済成長戦略大綱」において、わが国の医薬品・医療機器の国際競争力の強化が不可欠とされ、「医薬品・医療機器産業の国際競争力の強化」の項において、「がん等の生活習慣病や感染症等各種疾病対策の推進等国民の保健医療水準の向上に資する医薬品・医療機器産業について、関係府省・機関、企業等の双方向の連携の下、特に基礎・基盤研究、臨床研究及び基礎研究から臨床研究への橋渡し研究を推進するとともに、臨床研究基盤の整備、治験環境の充実等の国民に医薬品・医療機器を迅速に届けるための環境整備を行う。」と言及されている。このような問題意識のもと、「革新的医薬品医療機器創出のための5か年戦略」において、再生医療による国民福祉への貢献、国際競争力強化への寄与としてロードマップに示されているところである。これら革新的医薬・医療機器創出に向けた各省の行政施策を俯瞰すると、厚生労働省、文部科学省、経済産業省、内閣府の4府省とも、社会還元・実用化をめざして競っているという状況が理解できよう。厚生労働省は、前臨床研究から非臨床研究をへて臨床研究までを医療クラスターで、ついで臨床研究から治験第Ⅰ・Ⅱ相を中核病院で、第Ⅱ～Ⅲ相を拠点病院で行なうことし、文部科学省では前臨床研究から臨床研究、第Ⅰ相の入り口までを橋渡し研究で行い、中核・拠点病院として指定された大学病院を基盤として治験を行なうこととしている。経済産業省においては、産業化を見越した規制科学の根拠取得にむけた施策を行なっているところである。

## 2. 世界的な競争の激化

再生医療は未だ未成熟といえ、医薬品・医療機器として承認され販売されている製品は、わが国のみならず米国等においても数は少ない。現状は、多額の研究費を投入した研究開発競争が中心である。しかし、研究開発競争には、研究開発を支える人材の教育、知的財産戦略等ソフト面での競争、国による産業育成基盤の整備、再生医療周辺産業の育成が不可欠であると認識している。

たしかに、医療機器産業においては、頻繁に技術革新が起こっており、その結果として絶え間ない研究開発が産業発展の鍵となっている。加えて、これら再生医療機器の研究開発を推進するためには、再生医療機器周辺産業の育成も不可欠である。今後は、先端的細胞組織工学技術を用いたこれら再生医療等の分野においても、国際的な研究開発競争が進むと見られており、これら競争を勝ち抜くために、周辺技術を含めますます研究開発の重要性が増すものと考えられる。

## おわりに

科学は社会の合意に基づいて実施され、社会に還元され、国民福祉に資するべきものである。とくに人権の確保の観点から、ヘルシンキ宣言（ソウル改定）やベルモントレポート作成の経緯を鑑み、その哲学を十二分に理解した上で行なわれるべきもの

であろう。とくに再生医療は未知の領域であり、腫瘍形成の可能性、未知のウイルスの発生など予期せぬ危険性を秘め、将来的に胚性幹細胞株が利用されるのであれば生命の滅失という倫理的問題、iPS細胞株が利用されるのであればヒトクローン作製が理論的には可能であるという問題点が喚起されよう。閉鎖された空間ではなく、つねにオープンに議論しつつ疾病の治療にむけて社会と連携する必要があるだろう。また現在、これらの臨床研究でもリスクとベネフィットが論じられるが、その均衡という観点からの議論は不十分であると認識している。倫理的観点からのリスクベネフィットの議論に加え、経済的観点からのリスクベネフィットの算出方法を含め、新たな学問領域が創出されることを望む。



## 肝疾患を対象とする細胞組織利用医療機器にかかる GL策定についての基本的考え方について

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授  
(財)先端医療振興財団 先端医療センター研究所  
再生医療研究グループ 髙島肝臓再生研究チーム  
松山晃文

### はじめに

細胞組織利用医薬品医療機器の臨床利用にあつては、公衆に複数の選択肢を提示し、それらについての科学的合理的な範囲でのメリット・デメリットを示すことで、新規治療法を享受せんとする患者さん自らの主体的な判断、すなわち十分な説明と理解によるインフォームドコンセントとインフォームドチョイスにより選択をしていただくことが肝要である。予期せぬリスクは必然的に存在することから、情報の偏在は許容されえない。このような峻烈な想いによってのみ、いわゆる再生医療は実現されると認識している。

細胞組織利用医薬品医療機器は、これまで治療法がなかったかあるいは従来の治療法では患者さんの自己実現に著しく障害のある疾患に対して画期的・革新的治療でありうる。一方で、生命科学は日進月歩の進化をとげているものの、未だ生命の本質を解明するには至っておらず、細胞組織利用医薬品医療機器の使用において未知のリスクが存在するのは必然である。必然を否定することは科学ではない。

近年、「規制科学」という造語が飛び交っている。筆者は、規制と科学は二項対立にあると考えている。何時の日か、この対立が止揚され「規制科学」となる日が来ると信じたいが、今の我々は、それらを止揚する思想をもっていない。

規制とは「折り合いをつける」ことである。換言すれば、ベネフィットとリスクのバランスとtrade offによって社会への貢献を最大化することである。一方、科学とは真理を追い続けるものであり、完成することはない存在でもある。我々は、科学があいまいさを内包している自己矛盾した存在であることを認識すべきである。この自己矛盾を止揚すべく登場したのが統計学、すなわち「たしからしさの学問」である。「たしからしさ」は、「あいまいさ」そのものであつて、統計学的に有意であっても、それが真実ではないことは自明である。細胞組織利用医薬品医療機器が、難治性疾患の患者さん、特に肝疾患の患者さんにとって、真に有効で、真に期待できる治療法となり、未来に疾患に陥った患者さんにとってセーフティーネットたりうるように、精進したい。

## 基本的考え方

### 1. 対象とする肝臓疾患について

遺伝性（先天性）疾患と非遺伝性（後天性）疾患はともに細胞組織利用肝疾患治療医薬品医療機器の対象疾患となりうる。当然、遺伝性疾患においては同種細胞を用いて製造された医薬品医療機器を用いるべきである。一方、非遺伝性疾患、特に肝硬変（ウイルス性・非ウイルス性・アルコール性）にあつては、自己由来・同種由来細胞ともに利用しうる。それら疾患が、既存の治療法との比較、リスク・ベネフィットの観点から細胞組織利用医薬品医療機器の適応が、科学的倫理的に許容範囲かの議論が肝要である。たとえば、肝炎のレベルでは、現状医療で進行を止めることが可能なことから適応にはならないと思われる。

肝癌にたいして細胞医療が可能か否かは不明。リスク・ベネフィットの観点から議論すべき。投与した細胞が、癌の増殖を亢進しないかという議論がある。適応を絞れば可能かもしれない。

### 2. 細胞の供給源について

自己由来細胞か同種由来細胞かにより、GL上異なつた条項を設定すべきかは検討すべき問題である。自己由来細胞を用いる場合、必然的に疾患を有する患者さんから細胞組織を採取し、それを用いて細胞組織利用医薬品医療機器を製造することとなる。一方、同種細胞を用いる場合は、健常人より細胞組織を採取して製造に用いることとなる。例えば、感染症の取り扱いの問題がある。自己細胞の場合、感染症を保有している患者さん由来検体の取り扱いの可能性はあるが、同種の場合は感染症の伝播の危険性低減の観点から、それは許されない。ことに、肝疾患を対象とする場合、わが国ではHCV感染に起因する肝炎肝硬変の頻度が高いことから、本報告書でも特記して述べたところである。このほか、遺伝子導入体・遺伝子導入細胞の取り扱い、細胞株に関する取り扱いも念頭に入れるべきではあるが、広範な疾患を対象とした議論となるため、本報告書では議論をしない。

### 3. 有効性評価指標

有効性に関しては疾患と適応症により個別に対応すべきと認識している。治験プロトコルにあつて、エンドポイントとして有意差が認められない事象に関して幅広く適用症を与えることは困難である。それゆえ、有効性評価指標の選択は重要な課題となる。例えば、適応症が「肝硬変における低アルブミン血症の改善」であれば血中アルブミンの改善をしようとするべきである。その他、浮腫の改善を念頭におくのであれば血中アルブミン、黄疸であればビリルビン、肝性脳症であればアンモニア（但しシャントがあれば高値をとる）、出血傾向の改善であればプロトロンビン時間、解毒機能

であればICG15分值（但しシャントがあれば反映しない）などでも指標となるかもしれない。Child-Pughは全身を評価するにはいい指標である。

一方で、統計学的に有意差があるということと、臨床的有用であるということは常には同等でない。例えば、血清アルブミン2.6g/dLと2.8g/dLで統計学的に有意に差が得られても、臨床的に意義はほとんど無い。エンドポイントは、臨床症状を反映するように設定される必要がある。

#### 4. 安全性評価指標

安全性に関しては共通項目が挙げられている平成20年薬食発第0208003号通知あるいは同0912006号通知をベースとすべきである。ただし、肝硬変のように悪性腫瘍の発生母地となるものは、特に腫瘍増殖・発生のリスクをベネフィットとのtrade offにおいて勘案すべきであり、対象となる疾患群そのものがもつ特異性を勘案すべきである。この特異性の勘案とは、一概に安全性評価項目を増やすということの意味するのではなく、科学的に合理的な範囲内で不要な項目にはとらわれない、という考えである。例えば、肝硬変で余命1年と推定される患者に、10年後に発ガンのリスクの懸念により使用できない、というのはナンセンスであろう。

#### 5. 前臨床・非臨床試験で求められること

多くの疾患の動物モデルは、ヒトの疾患を正確に反映しないし、動物における毒性試験は時には、ヒトにおける毒性を予測できない。また、ヒト細胞が動物に移植される橋渡し研究は、患者体内におけるヒト細胞に対する免疫反応や他の反応を十分予測できない。これらのことを十分に理解したうえで非臨床試験を立案実施すべきであろう。例えば「骨髄由来間葉系幹細胞」といっても、ヒト、ラット、マウスでかなり性格が異なる。ES細胞株、iPS細胞株に関してもヒトとマウスのそれで大きく異なることを十二分に勘案した上で前臨床・非臨床研究を行なうべきである。

前臨床試験の目的は、(a)製品の安全性の証拠を提供すること、(b)設計された治療効果のための原則証明を確立することである。幹細胞を使ってヒト対象の臨床試験開始の前に、適切な生体外且つ／あるいは動物モデルにおける説得力のある証拠が必要である。

可能な限りの範囲で、疾患モデル動物を用いた十分な前臨床試験を行うことが、細胞組織利用医薬品医療機器の臨床研究の倫理的な妥当性を示すために必要である。小型モデル動物と大型モデル動物を用いた細胞治療の前臨床試験プロトコルを作成すべきである。しかし、動物モデルを含む前臨床試験は、背景依存性の性質やヒトの免疫反応により、ヒトレシピエントにおいて移植された細胞がどのように行動するかについては、限られた洞察しか得られないかもしれないことも認識しておくべきである。

細胞組織利用肝疾患治療医薬品医療機器による形態的及び機能的回復を評価するため、さらには組織修復や回復の生物学的メカニズムを明らかにすることが肝要である。そのため、ヒト幹細胞を移植する試験では、小型動物モデルを用いる必要がある。小型動物試験では、目的とする細胞治療製品の投与量、投与ルート、最適年齢、治療効果を得るための疾患段階、細胞分布、生体内での生存性、組織への生着についても評価することが可能であり、それら情報は有用である。

小型動物を用いただけでは得られない疾患に関する幹細胞研究のために、大型動物モデルを使うべきである。選択された大型動物モデルは、目的とするヒト疾患や患者状態を適切に試験するために最適であることが示されなければならない。特に肝疾患ではげっ歯類によるモデル動物までとすべきである。

ヒト以外の霊長類を用いて試験を行う場合の必要性は、ケースバイケースで判断されるべきである。すなわち、その試験が、患者に幹細胞や幹細胞由来細胞を適用するための必要で、他の動物種では得ることのできない情報が選られうる場合のみ、実施されるべきである。例えば、HCVに感染しうる動物モデルは現状ではチンパンジーしか知られていない。しかし、霊長類を用いた動物モデルを作製することは、推奨すべきでない。

## 6. 臨床試験で求められること

細胞組織利用医薬品医療機器の臨床試験を実施する者は、次の評価において、他の研究者やヒトでの臨床研究の評価委員会委員が参照できるように、得られた科学的専門経験をお互いに共有し、かつ協力するべきである。

- i. 臨床試験に使用される細胞の生物学的な特性解析結果；
- ii. 用いた細胞が適切な製造基準で開発されたかどうか；
- iii. 用いた細胞の安全性と有効性の評価のために、動物や他のモデル系においてそれらの細胞に関して得られた前臨床試験データ
- iv. 可能であれば、短期間及び中期間での安全性、さらに長期的影響をみるための持続的観察から得られた安全性に関する早期臨床データ

細胞増殖性、腫瘍形成、動物由来原材料への暴露などのリスク、ウィルスベクターに伴うリスク、未知のリスクなどを含め、幹細胞利用製品に付随するリスクについて考察するべきである。

患者は、合理的な他の代替治療の選択することが可能であるので、幹細胞臨床試験に参加することで得られる可能性のある利益を、できるだけ明確に伝えるべきである。インフォームドコンセントあるいはインフォームドチョイスのプロセスでは、細胞利用製品の使用は新たなものであり実験的側面があることを強調しなくてはならない。治療にどの体での有効性があるのかについて患者が誤解することを最小限に抑えることが重要である。これは、情報の偏在性を防ぎ公平性を担保するとの観点からも重要

である。

研究者、申請者、臨床試験が実施される施設における利益相反について、あるいは非財務的な利益相反について開示するべきである。

長期間にわたる健康への影響を評価するために、対象者をモニターすることが求められる。また、その患者の健康データの機密性の保護を行なう必要がある。

有害事象を報告するための、明確で、適切な期間を設けた有用な報告書提出計画を作成するべきである。

万が一に腫瘍が発症したときの治療も含め、毒性反応が出た場合の治療計画を臨床計画の中に提供するべきである。この計画には、研究関連の傷害に対する補償に関する情報も含むことが望まれる。

臨床試験参加によりおこりうる合併症を補償するための、保険あるいは他の財政的あるいは医療的体制が患者に利用できるように担保することが希求される。

一般的原則として、幹細胞利用製品を用いた臨床試験は、既存の治療と比較し、臨床的に同等性を有するか、優位性を有するようにしなければならない。もし、効果的な治療が既に存在する場合、幹細胞利用製品を用いた治療のリスクは、むしろ低くなくてはならず、幹細胞利用製品を用いた治療では、なんらかの有用性が示されなくてはならない。例えば、より優れた機能結果；簡便な治療行為（細胞投与）対副作用を伴う生涯にわたる医薬品治療；長期にわたる費用の削減などである。もし既存の効果的な治療がない場合、疾患の重症度、特に治療対象の疾患が、深刻な身体障害を伴っていたり、生命を危険にさらすものである場合に、患者における細胞組織利用医薬品医療機器を用いた実験的治療のリスクを正当化する可能性はある。細胞組織利用医薬品医療機器を用いた治療に伴う想定される有害事象のすべてのリスクを最小限に抑えるための最大の努力を払うべきである。

## おわりに

再生医療は科学的にみても医学的に見ても未だ不明な点が多い。このため、再生医療医薬品・医療機器の研究開発及び臨床実現においては、十分に安全性・有効性が確保されるべきである。そのような再生医療こそが国民の健康福祉に資するものであると認識している。イノベーションの促進・社会還元の一層の加速・国民福祉への寄与という観点と、国民の公衆衛生上の安全安心の担保という観点を、両目でにらみつつ、安全かつ有効な再生医療の実現を目指したい。

## 肝硬変症に対する自己骨髄由来細胞を用いた治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

### 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。これを補う治療として、新たな肝臓再生療法の開発が急務である。また現在国内では慢性肝炎に対する肝炎対策事業の整備が進んでいるが、すでに進行した肝硬変症に対する新規治療法の開発も急務である。2000年に血液疾患患者に対する骨髄移植及び末梢血幹細胞移植施行例（女性患者（XX）に男性（XY）より細胞移植した症例）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及び消化管組織内に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>1,2</sup>。我々を含め、世界中で肝臓再生療法に使用する細胞源として骨髄細胞が注目され、基礎・臨床研究が進められてきた<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>。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>。これらの基礎研究成果を基盤にして、2003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、ABMI療法）」を開始した<sup>7</sup>（図1）。さらに2005年度はさらに山口大学で施行した臨床研究のプロトコ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、イラン等でも同様な治療が行われている<sup>8</sup>。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>9,10</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、肝臓病に対する新たな細胞療法の開発が行われてきた<sup>11,12</sup>。今回は現在までの肝臓病に対する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）

我々は、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。我々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。4, 5 (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 (0.5ml/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する。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。

骨髄細胞の投与により血清アルブミン値の経時的改善及び、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 及び 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・成熟した血球細胞以外の間葉系細胞群であること<sup>13</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>14</sup>。また分化過程の早期では、HOX, HLH 型の転写因子が誘導され<sup>15</sup>、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>16</sup>。

### 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、2003 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」を開始した。この臨床研究の適応条件は以下に示す。

(対象)

肝硬変症

- 1) 総ビリルビン値 ; 3.0mg/dl 以下
- 2) 血小板数 ;  $5.0 \times 10^{10}/l$  以上
- 3) 食道胃静脈瘤及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 等の画像診断にて viable な肝細胞癌が存在しないこと。

(プロトコール)

実際のプロトコールは、全身麻酔下にて自己骨髄細胞を 400ml 採取する。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。細胞投与後は 6 ヶ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。また経過観察中に、内服剤、抗ウイルス剤等の使用については、変更を加えなかった<sup>17</sup>。

## 結果

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、6 ヶ月後の血清アルブミン値、総蛋白値、Child-Pugh Score の改善効果が明らかであった<sup>17</sup>。さらに 15 ヶ月間経過観察可能であった 9 例での効果改善についても報告してきた (図 4)<sup>18</sup>。2008 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>19</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、およびブラジルで追試が行われた<sup>20</sup>。このように多施設臨床研究の結果、徐々に 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。肝硬変症に対する骨髄細胞を用いた治療は良好な治療成績を得ている。

## 今後の課題

前述のように、ABMI 療法については有効性が明らかになった<sup>17, 18</sup>。現在も国内外でデータの集積がなされてきている。この治療法は肝硬変症の線維化改善等を誘導し、その結果肝機能が改善すると考えられ期待される (図 5)。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>21, 22</sup>。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>13, 23</sup>、実際にそれらを培養した細胞を使う場合には、使用する細胞の安全性評価のガイドラインが必要になる。その施行において GMP 基準 Cell processing center で SOP 準拠した細胞の加工、医薬品を使うことが必要になる。慢性肝疾患に対する骨髄細胞を用いた治療は、我々の臨床研究を契機に世界的に広がってきており、新たな治療になることが期待される。今後も基礎、臨床をつなぐ橋渡しの研究として精力的に行っていく必要がある。さらに次世代の低侵襲治療として、培養した間葉系幹細胞を用いた治療の安全な実施体制の整備が早急に必要と考える。



## 参考文献

1. Alison MR, Poulson 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;32:11-6.
3. Terai S, Yamamoto N, Omori K, Sakaida I, Okita K. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterol* 2002;37 Suppl 14:162-3.
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;134:551-8.
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;12:203-7.
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;40:1304-11.
7. Terai S UY, Marumoto Y, Ishikawa T, Aoyama K, Omori K, Yamamoto N, Sakaida I, Nishina H, Okumoto K, Saitou T, Kawata S, Okita K. LRCT Study: ABMI therapy for LC patient. *Saiseiryu Gakkai* 2006;5:79-87.
8. Houlihan DD, Newsome PN. Critical Review of Clinical Trials of Bone Marrow Stem Cells in Liver Disease. *Gastroenterology* 2008.
9. Gordon MY, Levicar 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. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006;24:1822-30.
10. Levicar 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 1:115-25.
11. am Esch JS, 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschlader M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Haussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone

- marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005;23:463-70.
12. Furst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschlader M, Eisenberger CF, Modder U, Knoefel WT. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology* 2007;243:171-9.
  13. 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;313:1110-8.
  14. 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;323:221-31.
  15. 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.
  16. 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;6:2564-70.
  17. 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;24:2292-8.
  18. Terai S, Iwamoto T, Mizunaga Y, Omori K, Yamamoto N, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Long time follow up for the patient of autologous bone marrow cell infusion (ABMI) therapy for liver cirrhosis. *Hepatology* 2007;46:246A.
  19. Terai S, Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res* 2008;38:S72-S75.
  20. 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;13:1067-73.
  21. 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;10:459-66.

22. 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;13:3359-63.
23. 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;44:742-8.

# トランスレーショナル研究(ABMI療法の開発)

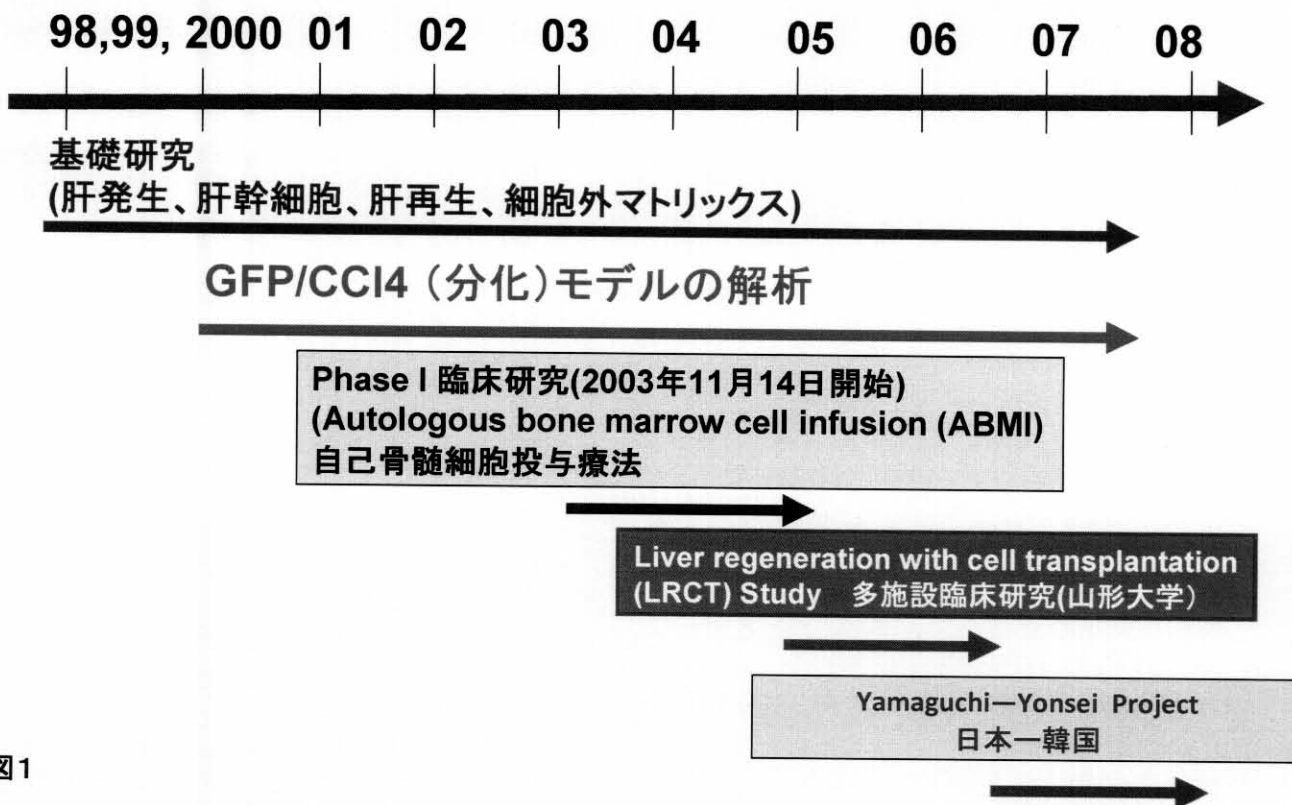


図1

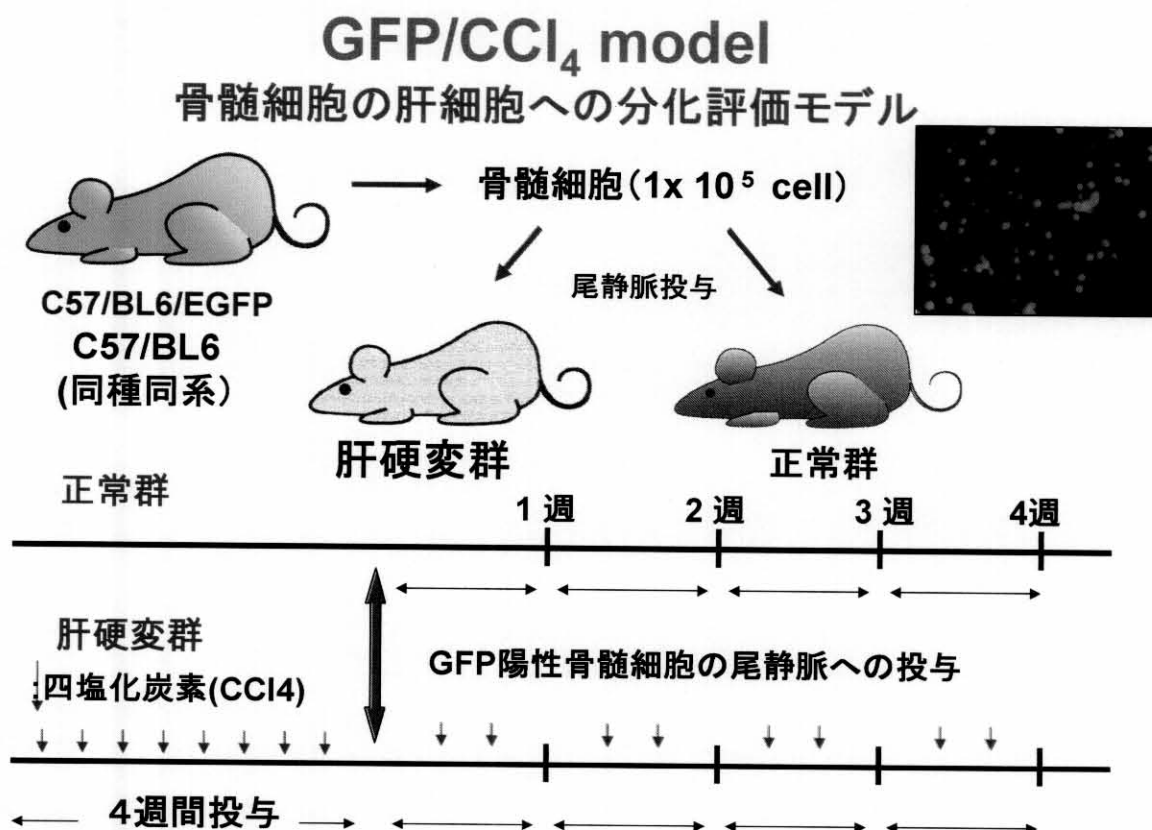
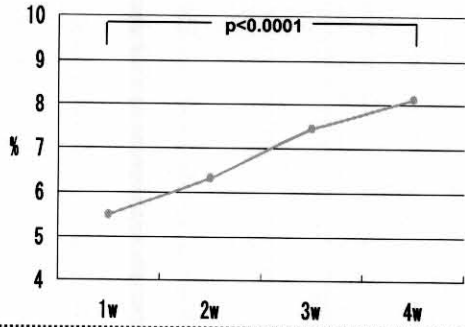
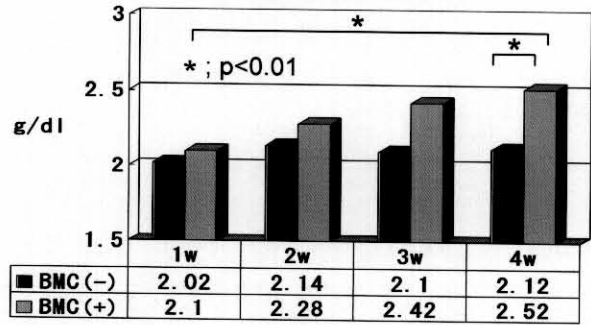


図2

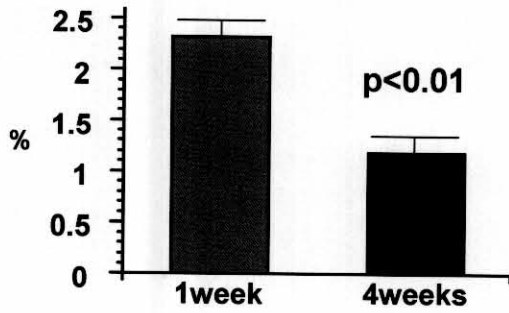
### GFP-陽性細胞の肝臓への定着



### 肝機能の改善



### 肝線維化の改善



### 生存率の改善

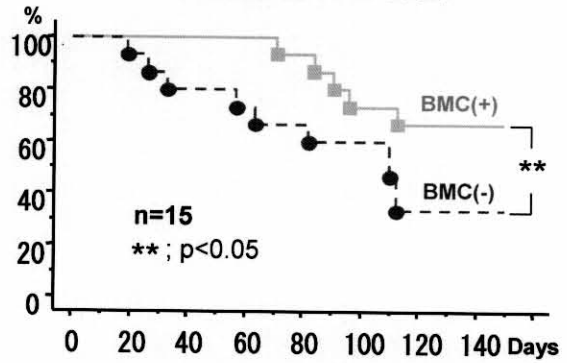
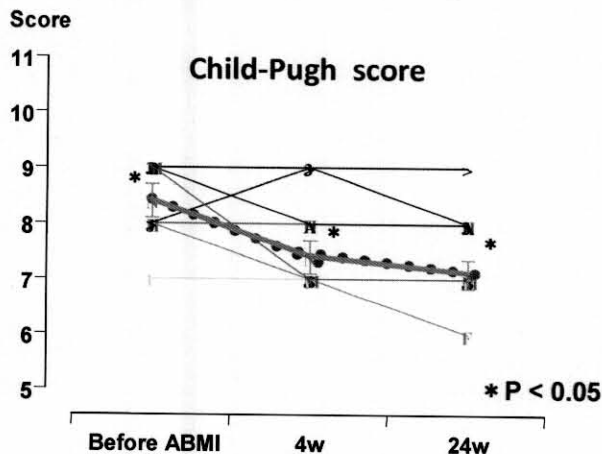
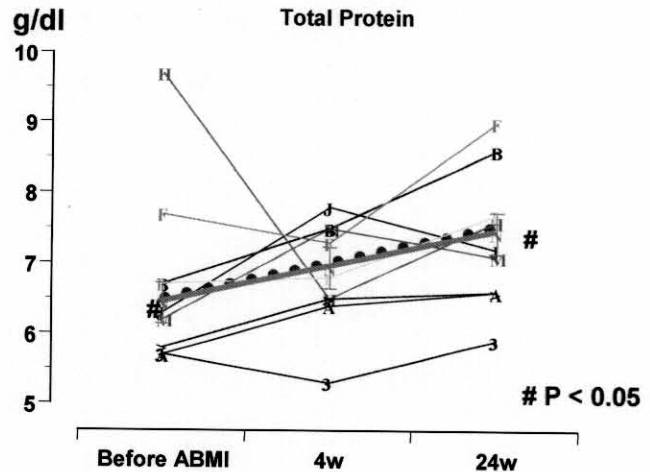
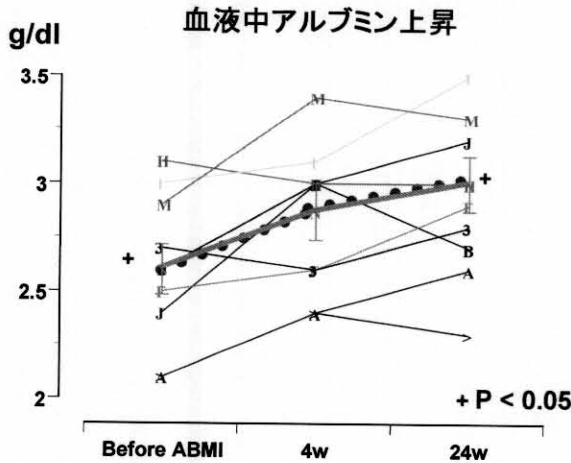


図3



- B — case 1
- J — case 2
- H — case 3
- F — case 4
- J — case 5
- I — case 6
- > — case 7
- A — case 8
- M — case 9
- N — Average

図 4 - 1

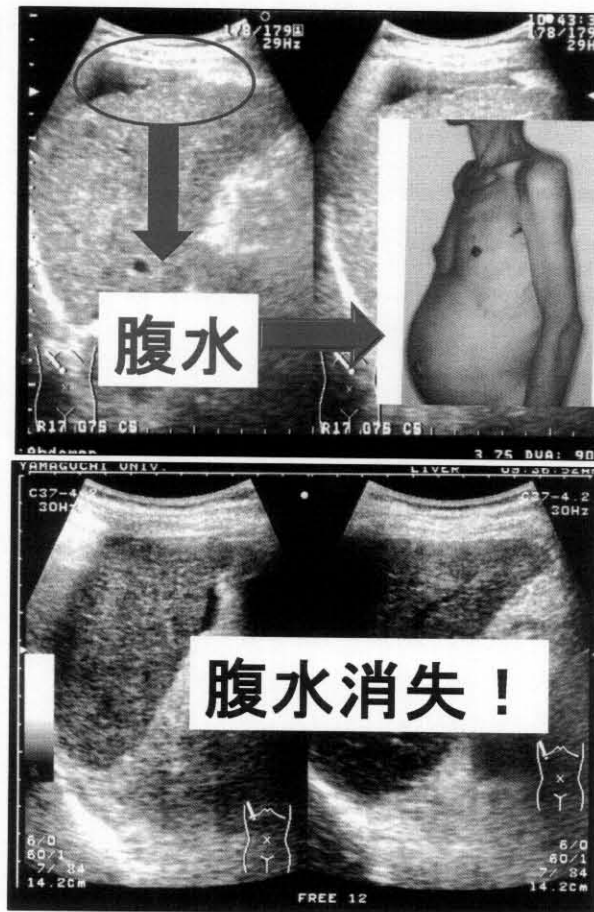


図 4 - 2

## 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法

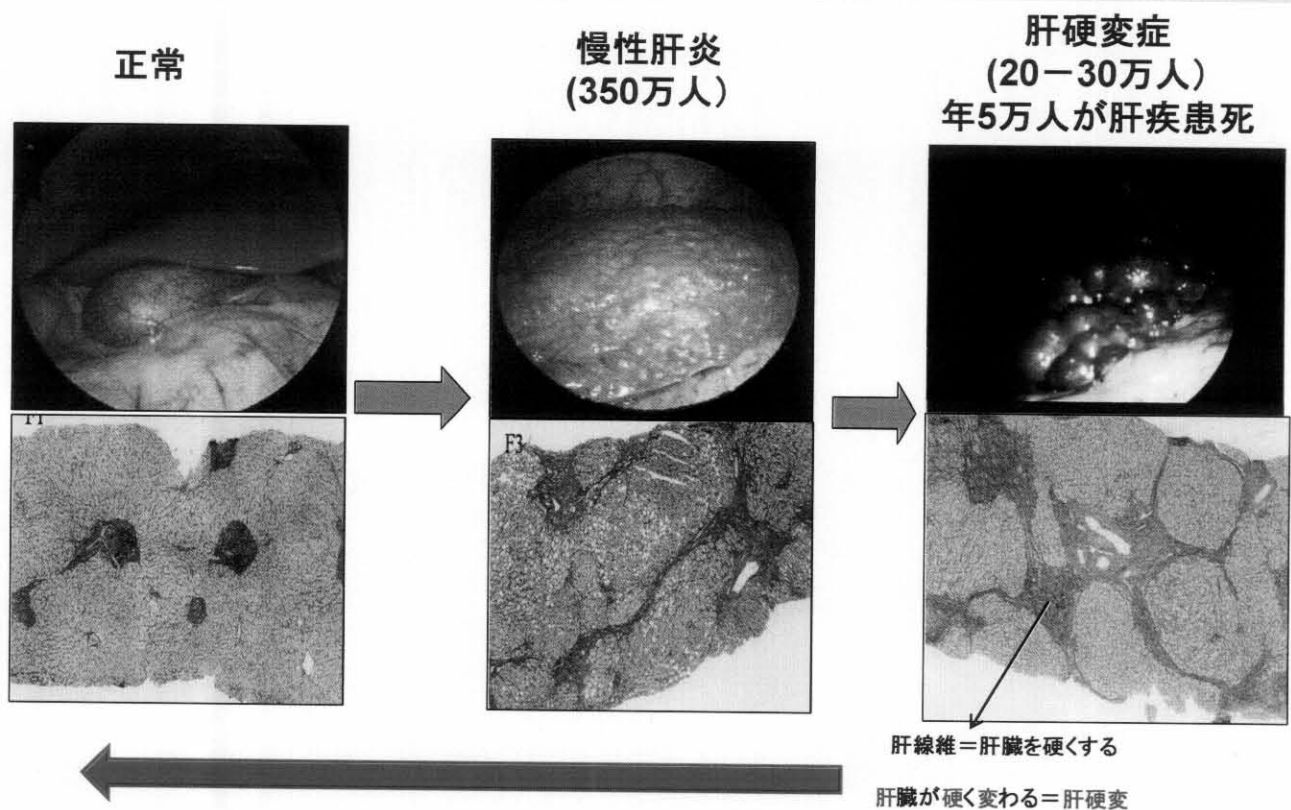


図5

# 肝細胞を用いた再生医療の現状と展望

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

大橋一夫

## はじめに

肝細胞は肝臓が発揮する数千以上の高次機能の大部分を担っていることから、肝細胞を用いる細胞療法は、様々な肝疾患に対応し得る新たな治療法として期待されている(1-10)。治療方法は、門脈血流に注入することにより肝臓内へ移植する肝細胞移植と、肝臓外部位に移植することによる肝組織工学に大別される。前者は、臨床試験が開始されており、後者は、動物モデルを基盤とした研究開発が勢力的になされている。本調査報告においては、肝細胞移植における世界での実施例の調査結果と、肝組織工学の研究開発の現状につき述べる。

## 肝細胞移植による肝再生治療

集計し得た限りでは現在のところ、89 症例に対し肝細胞移植が施行されている。対象疾患は急性肝不全と遺伝子性肝疾患が主である。急性肝不全に対しては、肝臓移植が施行されるまでのブリッジセラピーとして実施され、多くの症例で短期間の肝機能補助に成功している。遺伝子性肝疾患においては、対象疾患は多様であり、明らかな臨床効果が近年相次いで報告されている。世界で施行された肝細胞移植に関する論文・抄録および私信により情報収集を行った上で、今後の肝細胞を利用した治療展開について検討を行ったので、以下に概説する。

### [1] 肝細胞移植の実施国

表1に肝細胞移植を実施した国を示す。世界で初めての肝細胞移植の報告は、1993年に本邦からなされている(8)。しかしながら、本邦においてその後の実施例報告はない。米国が最も多く肝細胞移植を実施している。近年、実施国が随時増加している。

### [2] 肝細胞移植の対象疾患

これまでに世界で行われた肝細胞移植の対象疾患について、論文、学会抄録および私信から集計し得た結果を表2に示す。89症例に対し肝細胞移植が施行され、対象疾患は、肝硬変、薬剤性・特発性急性肝不全と、遺伝子性肝疾患に大別される(1, 3)。遺伝子性肝疾患では Crigler-Najjar 症候群が最も多く、次いでオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症である。肝細胞移植を受けた患者の対象年齢は、肝硬変や急性肝不

全は成人が大半を占めている。一方、遺伝子性肝疾患においては、成人も含まれているものの、新生児や幼児も多く含まれている。

### [3] 肝細胞の供給源と機能評価

肝細胞移植に用いられている肝細胞は、多くの症例において他家由来細胞が用いられている(1, 3)。他家肝細胞は、提供肝臓を用いてコラゲナーゼ灌流法にて消化し、分離・精製して準備されている。提供肝臓には、臓器移植を目的として脳死下に提供されたものの、医学的見地から移植に用いられなかった肝臓や、分割移植 (split liver transplantation) のためにバックテーブルで分割した余剰肝組織片が利用されている。妊娠中絶により提供された胎児肝臓も一部の施設では用いられており、胎児肝細胞あるいは hepatic progenitor cell が移植されている(7)。一方、自己肝細胞も治療に用いられている。自己肝細胞は、外科的肝切除した肝組織片から細胞を分離・精製し、手術後に自己へ戻し移植がなされている(8)。

移植に用いる肝細胞の評価として、多くの報告で細胞純度と細胞 viability が記載されている。肝細胞の純度は、顕微鏡下での形態観察において全ての細胞に占める肝細胞の割合を%で表記する。肝細胞 viability は、トリパンブルー排泄テストにより、肝細胞中の染色陰性細胞の割合を%で表記する。

### [4] 肝細胞移植法

多くの症例においては、門脈血流を介した病態肝への移植が行われている。肝臓への移植は、経皮経肝的門脈穿刺によりカテーテルを門脈内に挿入し、分離肝細胞を細胞浮遊液として門脈血流内に注入して移植している。腹部に小切開を加え、腸管膜静脈末梢からカテーテルを挿入し、門脈内へ先端を留置される場合もある。新生児のカテーテルの挿入には、肝円索から肝臓を経由し、門脈へと挿入した報告もある。脾動脈注入による脾臓への移植や腹腔内への注入移植もなされている。

### [5] 移植肝細胞数

多くの症例で行われている門脈血流を介して肝臓へ移植する場合には、一度に移植できる細胞数には限度があり、体重 kg 当り  $3-8 \times 10^7$  個とされている。より多くの細胞を移植する工夫として、門脈圧や肺動脈圧をモニターリングしながら 15 時間をかけて移植した報告(5)や、複数回あるいは 10 回以上の繰り返し移植の報告がなされている(4, 6)。

### [6] 肝細胞の遺伝子修飾

LDL レセプター遺伝子異常が原因である家族性高コレステロール血症：ホモ型において、自己肝細胞に LDL レセプター遺伝子を付加修飾した後に、肝臓へ移植する臨床



試験が米国にて行われた(10)。自己肝細胞は、外科的に摘出した肝組織片から分離・精製されている。遺伝子の付加修飾は肝細胞培養下に行われた。LDL レセプター遺伝子発現 MLV レトロウイルスベクターを培養液に添加した後に肝細胞を回収し、門脈系へ挿入したカテーテルから肝臓へ移植された。本臨床試験による臨床効果は限定的なものであったが、その結果は治療が行われた当時の MLV レトロウイルスベクターによる肝細胞への遺伝子導入効率と遺伝子発現効率のレベルが低かったことに起因すると考えられている。近年、遺伝子治療用のベクターシステムが数々開発されたことにより、肝細胞への遺伝子発現効率も実験レベルでは向上している。

### [7] 免疫抑制法

他家肝細胞を移植する場合には、免疫抑制を行うことが必須となる。肝細胞移植に特化した免疫抑制法は標準化されておらず、細胞移植を行う施設での肝臓移植用免疫抑制プロトコールに準じている施設が多くを占める。FK506(タクロリムス)が主に用いられており、その多くでは、トラフ値を 6-8 ng/mL(4)、10 ng/mL(5, 6)に設定している。副腎皮質ステロイドも一般に併用されている。FK506 や副腎皮質ステロイドを細胞移植前から投与した症例もみられる(4, 5)。

### [8] 肝細胞移植施行例の具体的経過

集計し得た 89 例の肝細胞移植施のうち、近年の症例報告から 3 報を抜粋し、概説する。

#### 1. Crigler-Najjar 症候群 (米国)

I 型 Crigler-Najjar 症候群 (肝臓の uridine diphosphoglucuronate (UDP) glucuronosyltransferase 完全欠損) の10歳の女兒に肝細胞移植が施行された(5)。核黄疸もしばしば発症し、血中ビリルビン値を24-27 mg/dLに保つために、毎日10-12時間の光線療法を受ける必要があった。肝臓移植の待機患者であった。肝細胞移植は全身麻酔下に15時間をかけて行われた。有害事象の発生はなく、患者は翌日に退院している。肝細胞移植後には、毎日の光線療法時間を6-8時間へと減じてかつ、血中ビリルビン値を10-15 mg/dLと細胞移植前と比較して低下させることに成功している。この治療効果は、細胞移植後11ヶ月間 (論文上観察期間) 安定して持続したと報告されている。

#### 2. 凝固第 VII 因子欠損症 (英国)

肝臓移植が必要と判断された凝固第 VII 因子欠損症の3ヶ月と2歳11ヶ月の兄弟に肝細胞移植が施行された(6)。移植前の凝固第 VII 因子活性は1 u/dL, PT-INR が8以上と重度の凝固第 VII 因子欠損症である。細胞移植は3ヶ月児に3回、2歳11ヶ月児に5回くりかえされた。肝細胞移植により PT-INR を2-3に保つ為に必要な第 VII 因子製剤投与量が移植前の 1/3-1/4 へと減弱させることに成功している。移植後 30 週間

の観察期間において、この治療効果は持続し、健康な発育成長をなし得たことが報告されている。両児は肝細胞移植の7 および8 ヶ月後に肝臓移植をうけ、第VII因子製剤治療から解放されている。

### 3. アルギニノコハク酸分解酵素欠損症（ベルギー）

尿素回路を司る酵素の一つであるアルギニノコハク酸分解酵素の完全欠損と診断された3歳6ヶ月の女兒に肝細胞移植が施行された(4)。既存治療をうけているにもかかわらず、400ug/dL以上の高アンモニア血症をしばしば発症することによる著明な精神運動障害を有し、肝臓移植の待機患者であった。5ヶ月の期間で11回の肝細胞移植が施行された。肝細胞移植により血中アンモニア濃度は正常化し、精神運動機能の顕著な改善と発達を得られ、通学が可能となっている。肝細胞移植後12ヶ月での肝生検標本の遺伝子検索において、病態肝の約12%が移植肝細胞で置換されていたと報告されている(4)。

## [9] 肝細胞移植の問題点と今後の展開

### 1. 肝細胞の安定供給

肝細胞は、生体内では再生刺激に応答して再生増殖するが、培養下で増殖させることは現在の技術では困難である(1)。その為、肝細胞治療を普及させ安定して行うためには、肝細胞分離施設の充実と分離施設への提供肝臓/肝組織の集約が重要と考えられる。良性疾患にて肝部分切除が施行された際の摘出標本も、肝細胞供給源として組み込むことも考慮すべきである。一方、ヒト分離肝細胞の機能を損なうことなくマウス体内にて活発に再生増殖する研究開発も進められている(11)。凍結保存・細胞融解を行うことで分離肝細胞の質が若干低下することが報告されているので、機能損失のより少ない凍結保存法の開発も重要である。凍結保存肝細胞による細胞バンクが設立し得れば、細胞治療の推進力となるものである。隣国との提供臓器交換や細胞相互供給を含めた多国間臨床試験への展開は、肝臓再生医療の発展に寄与するものであり、今後の枠組み形成が期待される。

### 2. 肝細胞生存の向上

門脈内へ移植された肝細胞の肝臓内生着を向上させる技術開発も重要である。門脈血流内において移植細胞周囲に形成される血栓の予防(12)や、他家細胞を用いた際に生じる移植後早期に発生する免疫反応を予防する為の戦略が望まれる。

#### 肝組織工学による肝再生治療

肝細胞を門脈内に移植する細胞移植においては、少なからず改善点があることから、肝細胞を肝臓以外の部位に移植し、機能的な肝組織を作製する肝組織工学の研究開発

が行われている(2, 13-20)。ヒトへの臨床試験の報告はなされていない。多くの疾患において、肝細胞移植部位は必ずしも肝臓内に限定されるものではないことから、肝臓外異所的部位へ肝細胞を移植する肝組織工学アプローチは、次世代の治療法としての期待が高いものである。

#### [1] 肝組織工学の利点と課題

肝組織工学は肝細胞を肝臓以外の部位に移植することを基本とする。肝細胞移植と比較した際の肝組織工学における長所は、少なくとも次の3項目が挙げられる。①移植細胞数における制限をうけにくい、②低侵襲下での治療が可能、③即時型血液媒介性炎症反応や免疫拒絶反応の発生遅延または反応レベルが低いことが推測される。特に③の即時型血液媒介性炎症反応は、ラ島移植や肝細胞移植等の血流中へ細胞移植を行う際、移植細胞の生着低下と直結する課題として近年注目されている。ラ島移植においても、血流外部位への細胞移植を世界の先端施設では積極的に検討し始めている。また、他家肝細胞の移植実験において、免疫拒絶の発生速度とレベルが、肝臓外部位への移植において肝臓内移植と比較して有意に抑制することが報告されている(21)。課題としては、異所における肝細胞の生着を高めるための技術開発と、作成組織を3次元化し、より高機能化を図ることが挙げられる。これらの課題に対して、組織作製局所で血管ネットワークを整備する技術(16, 17)、細胞外マトリックスを供給することにより生着を高める技術(14, 16-20)、肝細胞の相互接着を成す細胞シートを培養下に作製して移植する技術(15)などが開発されている。

#### [2] 作製肝組織の機能的意義と治療効果

小動物モデルにおいて、腎被膜下や皮下等の部位で肝組織を作製した報告がなされている。その作製肝組織の機能は、アルブミン、アンチトリプシン産生、血液凝固因子産生、ならびに糖新生等の肝臓特異的機能を発揮することが明らかとされている(15-17, 20) (図1)。さらに、代謝臓器としての薬物の取り込みと代謝および再生臓器としての肝再生増殖という肝臓の代表的機能においても、自己肝と同レベルで発揮することが報告されている(15-18) (図1)。この2つの機能は、肝細胞のみでなし得るものではなく、非実質細胞との機能的相互構築が必須である。つまり、作製肝組織において、肝細胞と非実質細胞による機能的立体構造をなし得ることを示す結果であり、真の意味での肝臓再生医療への展開が期待できるものである。

#### おわりに

以上調査したように、肝細胞を利用した再生医療は、多くの肝疾患に対する新しい医療展開として期待できるものである。血流を介し肝臓内で肝細胞を正着させる従来

のアプローチのさらなる発展はもとより、異所的部位での正着による生体第二の肝組織を作製する肝組織工学を臨床応用へむけて技術開発を積み重ねることは、新しい再生医療への展開として重要な意義を有する。肝臓／組織片提供者の年齢や背景のばらつきのため、分離した肝細胞にも純度・機能・構造にかなりのバリエーションが存在する。このバリエーションを理解しつつ、多種多様な肝病態へ工夫をこらして適応させていくことが重要と思われる。

#### 参考文献

1. Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 79: 617-630, 2001.
2. Ohashi K. Liver tissue engineering: The future of liver therapeutics. *Hepatol. Res.* 38:S76-87, 2008.
3. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 82: 441-449, 2006.
4. Stephenne X, Najimi M, Sibille C, et al. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 130: 1317-1323, 2006.
5. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338: 1422-1426, 1998.
6. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 78: 1812-1814, 2004.
7. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, et al. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation* 86: 167-170, 2008.
8. Mito M, Kusano M, Kawamura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplantation Proc.* 24: 3052-3053, 1992.
9. Khan AA, Parveen VS, Mahaboob VS, et al. Treatment of Crigler-Najjar syndrome type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: A simple procedure for management of hyperbilirubinemia. *Transplantation Proc.* 40: 1148-1150, 2008.
10. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature Med.* 1: 1148-1154, 1995.
11. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, et al. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: Potential for cell-based therapy for haemophilia B. *Thromb. Haemost.* 99: 883-891; 2008.

12. Stephenne X, Vosters O, Najimi M, et al. Tissue factor-dependent procoagulant activity of isolated human hepatocytes: relevance to liver cell transplantation. *Liver Transplant.* 13: 599-606, 2007.
13. Pipe SW, High KA, Ohashi K, et al. Progress in the molecular biology of the inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 14(S3): 130-137, 2008.
14. Ohashi K, Marion PL, Nakai H, et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nature Med.* 6: 327-331: 2000.
15. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nature Med.* 13: 880-885, 2007.
16. Yokoyama T, Ohashi K, Kuge H, et al. In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *Am. J. Transplant.* 6: 50-59; 2006.
17. Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41: 132-140; 2005.
18. Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, et al. Stability and repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplant.* 14: 621-627; 2005.
19. Kuge H, Ohashi K, Yokoyama T, et al. Genetic modification of hepatocytes towards hepatocyte transplantation and liver tissue engineering. *Cell Transplant.* 15: 1-12; 2006.
20. Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, et al. Engineering liver tissues under the kidney capsule site provides therapeutic effects to hemophilia B mice. *Cell Transplant.* in press 2009.
21. Horne PH, Lunsford KE, Walker JP, et al. Recipient immune repertoire and engraftment site influence the immune pathway effecting acute hepatocellular allograft rejection. *Cell Transplant.* 17: 829-844, 2008.

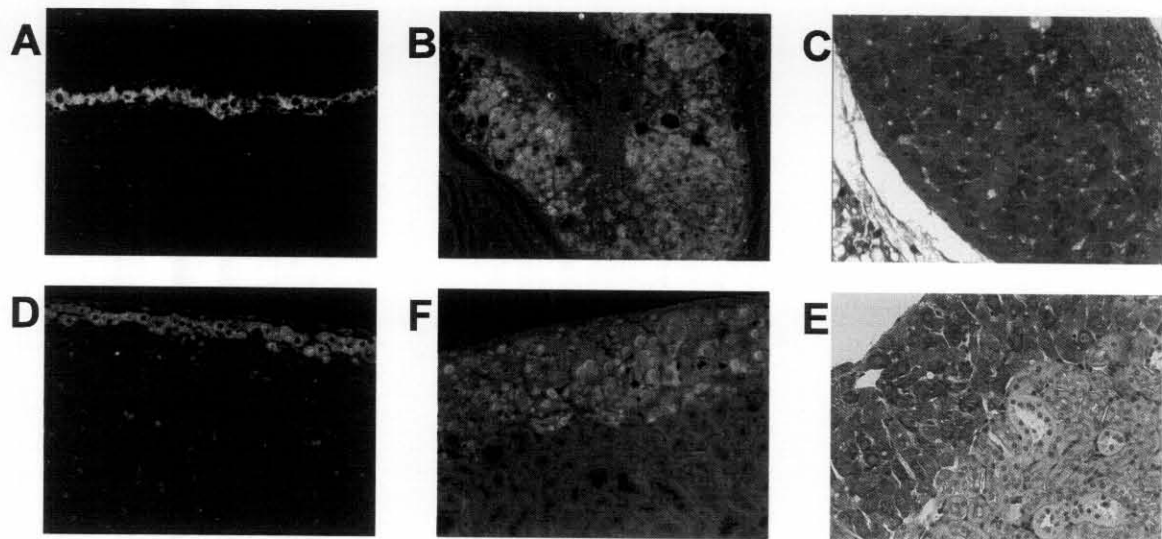


図1 異所作製肝組織の再生増殖力

マウスの実験系において、皮下(A-C)または腎被膜下(D-F)に肝細胞を用いて肝組織を作製する。自己肝臓に2/3肝切除を加えることにより再生増殖刺激を生体内で誘導すると(B, F)、作製肝組織は自己肝と同じレベルで増殖し、約2.5倍の組織量へと増殖する。sham手術群(A, D)。BrdU染色(赤)、肝特異的マーカー染色(緑)。再生増殖した作製肝組織(皮下, C; 腎被膜下, E)の糖新生力(PAS染色)

## 現状における再生医療について

山形大学 理事・副学長  
肝臓病学  
河田 純男

劇症肝炎や進行した肝硬変に伴う急性および慢性肝不全は予後が極めて悪い。これまでに種々の内科的な治療が試みられているが、十分な効果を挙げるところには至っていない。また、肝移植は慢性的なドナー不足および医療経済的な側面から広く実施することができないのが現状である。したがって、重症の急性および慢性肝不全を克服するために、新規な発想を基盤とした抜本的かつ戦略的な治療法の開発が急務である。その最も有力な治療法は肝再生療法である。

肝再生医療の実用化に向けて推進するためには、2つの方策が考えられる。その1つとして、近年の増殖因子に関する研究を基盤として、HGFなどの肝再生促進因子を用いた治療法の開発が試みられている。この方法は理にかなったものである。しかし、必ずしも実用化の目処が立っていないのが現状である。

もう1つは細胞移植療法である。その cell source としては骨髄細胞、肝組織固有幹細胞および iPS 細胞がある。

すでに臨床で試験的に行われているのが、自家骨髄細胞移植療法である。近年、骨髄細胞が肝細胞に分化することが着目され、多くの *in vitro* および *in vivo* 実験がなされてきた。現在、骨髄間葉系幹細胞が肝細胞に *transdifferentiation* するという考えが有力視されつつある。一方、その臨床応用として、自家骨髄細胞移植が非代償期の肝硬変に対する治療として臨床の現場で施行され始めている。

次に検討されているのが肝組織固有の幹細胞を分離して cell source として用いる方法である。肝組織固有の幹細胞の同定・分離に関する研究も盛んに行われ、今後の臨床応用を含めた進展が期待されている。また、これらの肝幹細胞の分化に関する研究が行われ、幹細胞の自己複製にかかわる *musashi-1* 遺伝子をはじめとした "stemness gene" の研究が始まっている。

さらに最近注目されているのが、京都大学 山中教授らにより作製された iPS 細胞を

肝細胞に分化させ、再生療法に使用する方策である。

ここでは自家骨髄移植と肝組織固有幹細胞移植について述べる。

## A. 肝細胞へ分化する細胞の起源

現在、肝幹細胞に関する研究の潮流には2つある。1つの潮流は stem cell biology を追求して、肝炎、肝硬変さらには発がんに至る病態生理における肝幹細胞の役割を明らかにしようとするものである。もう1つは細胞治療の cell source として幹細胞を用いようとするものである(1)。現在、肝細胞に分化する幹細胞には骨髄を起源とするものと肝組織固有のものがあると考えられている。この両者がどのようにかかわって肝再生が進行するかは明らかでない。

### 1. 骨髄を起源とする幹細胞

#### 1) 骨髄細胞の肝細胞への分化

肝幹細胞の正確な起源は、1999年に Petersen らがラット卵形細胞は骨髄細胞に由来すると初めて報告して以来、マウスやヒトにおいても同様の報告がなされてきた。これらの報告の中には、一回の骨髄移植で1%以上の肝細胞がドナー骨髄由来であり、時には10%以上に達するとするものがある。このことは、造血幹細胞が血液細胞に分化するだけでなく、肝再生の重要な細胞供給源になっていることを示すのみならず、一回の骨髄移植を行うことにより肝疾患の治療につながることを示唆している。しかし、骨髄細胞由来肝細胞が増殖するのに有利な条件を満たさない限り、骨髄細胞が肝細胞に置き換わる効率は極めて悪いとする報告もある(2)。

これらの移植モデルを用いた検討では、異性間での移植後に Y 染色体を検索するか、または緑色蛍光蛋白(GFP)を発現するトランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植する方法が用いられていた。そのため、移植細胞に由来する肝細胞は、幹細胞が分化したのか、細胞融合で両細胞の形質を獲得したのかが判然としていなかった。そこで、2003年に骨髄細胞に由来するとされる肝細胞は、実は骨髄由来のマクロファージがすでに肝に存在する肝細胞と細胞融合 (fusion) を起こしたものであるとする細胞融合説が提唱された(3, 4)。しかし、その後、細胞融合を否定する報告がなされ(5)、この問題は未だに結論が得られていない。

最近の報告によると細胞融合が起こるとしても、その意義は小さく、むしろ肝細胞への分化 (transdifferentiation) が重要ではないかとの考え方が有力になりつつあるように見える(6)。事実、骨髄細胞と成熟肝細胞あるいは障害肝細胞を共培養すると、両細胞が膜で隔てられて接触できない条件で、骨髄細胞がアルブミンを産生するなど肝細胞



の形質を発現することが報告されている (7)。私どもは Sca-1 および Thy-1 を発現した骨髄細胞を選択的に回収した分画を成熟肝細胞と共培養し、数日でアルブミン、HNF1 $\alpha$  および CK8 が発現することを見出している。また、この骨髄細胞分画に高濃度の HGF(20 ng/ml)を添加またはマトリゲル上で培養すると同様に肝細胞マーカーを発現することを観察している (8)。このことは微小環境が変化すると、骨髄細胞は可塑性を発揮して肝細胞に分化することを示唆しているかもしれない。

もし細胞融合が起こっているならば、ドナー骨髄細胞は遺伝子を導入する役割を担い、遺伝性肝疾患の治療に用いることができる。しかし、骨髄細胞が肝細胞に分化できるとすると、骨髄は肝疾患に対する細胞療法の重要な細胞供給源として現実に役立つ。

## 2) 肝細胞へ分化する骨髄細胞分画

では、骨髄細胞が肝細胞へ分化 (transdifferentiation) するとして、どの細胞分画が分化するのは今後の研究課題であるが、現在までのところ造血幹細胞よりも非造血系幹細胞 (間葉系幹細胞) が有力である (5)。ヒト骨髄細胞を間葉系幹細胞 (CD34+) と非間葉系幹細胞 (CD34-) とに分画し、それぞれをアシルアルコールで肝障害を起こしたラット肝に直接異種移植した。間葉系幹細胞を移植された場合にのみ、AFP、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19、アルブミンおよびアジアロ糖蛋白受容体を発現した肝細胞様細胞の出現をみた。このことから著者らは骨髄の間葉系幹細胞が肝細胞へ分化する最も高い能力を有すると推論している。

## 3) 骨髄細胞の伊東細胞への分化

肝細胞以外の細胞、例えば伊東細胞などは骨髄に由来する可能性が高いとされており、その細胞が何であれ骨髄から肝への細胞供給はあると考えられている。最近、肝を含めた臓器障害の修復に骨髄由来細胞が関与することが報告されている (9)。すなわち、骨髄の間葉系幹細胞は肝硬変マウスの肝へ移動し、伊東細胞および筋線維芽細胞 (myofibroblast) に高率に分化し、1型コラーゲンを産生して肝線維化にかかわっている。一方、既に骨髄移植により肝線維化が軽減される可能性が指摘されている。この矛盾する結論は、2つの論文における実験条件の違いによると考えられ、微小環境 (niche) が異なると幹細胞の分化様態が変わると推測されている。

## 4) 血管内皮前駆細胞

さらに、骨髄および血中には血管内皮細胞の前駆細胞が存在し、障害肝ではこれらの細胞による vasculogenesis が報告されている。最近、ヒトおよびマウスの血管内皮前駆細胞が急性四塩化炭素肝障害マウスへ移植され、その生存率は対照群の約 30% に対して 80% 台と有意に増加することが報告された (10)。移植された血管内皮前駆細胞は、HGF、HB-EGF、TGF- $\alpha$ 、VEGF などの増殖因子を産生し、同時に内因性の増殖因

子発現を誘導した。移植早期には前駆細胞は肝細胞壊死の多い小葉中心部に集まり、その後、移植された細胞は管状構造を形成し、類洞壁に沿って多くが存在した。同時に肝細胞の著明な増殖が認められた。このことから血管内皮前駆細胞の移植は肝再生を促進する新しい治療戦略になるとしている。

最近、久留米大学の佐田通夫教授グループにより肝硬変症例への血管内皮前駆細胞の移植が開始されている。

#### 5) 骨髄細胞を移植された肝における発現蛋白

山口大学グループにより行われた一連の骨髄細胞移植実験の中で、マウス硬変肝において発現する血清蛋白についての検討がなされた(11)。移植後48時間の肝における蛋白発現を2次元電気泳動により検討した。対照に比較して蛋白量が増加したスポットが6つあり、それらはアポリポ蛋白 A1、アポリポ蛋白 C3、ビタミン D 結合蛋白などであった。とくに、アポリポ蛋白 A1 は血清でも増加しており、この血清蛋白の早期の上昇は骨髄細胞移植後の肝再生を予測する指標になると考えられる。

#### 6) 骨髄細胞移植の臨床応用

自家骨髄細胞移植が9例の肝硬変患者に実施され、肝機能が改善したとする報告が初めて山口大学グループによりなされた(12)。400mlの骨髄液を採取し、細胞洗浄により単核細胞を分離し、抹消から投与された。とくに有害な事象は出現しなかった。24週後にアルブミン値は移植前よりも有意に増加し( $P < 0.05$ )、Child-Pugh score も有意に改善した( $P < 0.05$ )。したがって、自家骨髄細胞移植は非代償期の肝硬変において新規の治療になると結論付けている。その後も症例の追加が行われている。

山形大学消化器内科においても3例の肝硬変患者に自家骨髄細胞移植が実施され、山口大学グループと同様の成績が確認されている。

課題は有効性が約6ヵ月程度と限られており、実用化するには移植を繰り返す必要があることである。しかし、全身麻酔で骨髄細胞を採取するために、治療のたびに骨髄細胞を採取するのは現実的に困難である。そこで、少量の骨髄細胞を採取して、*in vitro*で増殖・分化させてプールし、必要に応じて使用することを可能にする必要があるが、これは動物実験レベルで可能性が示されている。

## 2. 肝組織固有の幹細胞

### 1) 分離・同定

肝において活発な増殖能、多分化能、自己複製能(不均等分裂によって自己と同じ幹細胞を維持する能力; *asymmetric cell division*)を兼ね備えた、いわゆる組織幹細胞が存在する。すでに、わが国の谷口グループはFACS (fluorescence activated cell sorting)と蛍光標識モノクローナル抗体を用いた精度の高い細胞分離法によりマウス胎児肝から肝

幹細胞を分離・同定している(13)。谷口らの分離した幹細胞は c-met+/CD49F+/CD29+/CD45-/CDTER119-であり、肝細胞、胆管上皮細胞、さらに腸上皮細胞や膵細胞に分化することができる。

最近、ヒト胎児肝から多分化能と自己複製能をもった幹細胞が単離された(14)。この幹細胞の免疫フェノタイプは CD34+/CD90+/c-kit+/EPCAM+/c-met+/SSEA-4+/CK18+/CK19+/albumin-/α-fetoprotein-/CD44h+/vimentin+であり、肝細胞および胆管上皮細胞へ分化し、さらに脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞などにも分化する。また、肝障害を有するヌードマウスへの移植により肝細胞へ分化することが確認されている。今後、このようなヒト肝幹細胞を用いた肝発生に関する研究や肝不全への細胞治療への応用が期待される。その他、いくつかの肝幹細胞分離の報告がある(15, 16)。

## 2) 細胞間競合

従来、移植した細胞により肝を再構築するために、広範で持続的な肝障害を有する遺伝子改変動物(uPA 導入マウスおよび FAH<sup>-/-</sup>マウス)を用いて、移植細胞が選択的に生存できる環境が必要であった。その他のモデルでは化学物質により宿主肝に障害を与えるか、あるいは移植する細胞に遺伝子導入を行って、強力な増殖能やアポトーシスに対する耐性を付与し、かつ宿主肝には持続的障害を与えるものであった。

しかし、正常の宿主肝に細胞移植を行い、効率よく肝を再構築するモデルが提示された(17)。ここでは障害を与えない肝に比較的大量の胎児肝細胞を移植することにより、宿主肝を移植細胞で20-30%置換することに成功している。この高い置換率を説明するために、著者らはいくつかの検討を行い、細胞間競合(cell-cell competition)というメカニズムが働いていると推測している。このメカニズムにより肝は過不足なくその体積を維持しながら、細胞の置換が進行すると考えられる。

## B. 肝幹細胞および前駆細胞の分化を制御する分子機構

### 1. 自己複製に関与する遺伝子、いわゆる stemness gene

一般に幹細胞の分化では、すべての段階の細胞分裂において、将来の目的となる、より分化した細胞に向かう本流の細胞と元の(幹)細胞へと、非対象に分裂する。幹細胞生物学における新しい知見として、幹細胞の特性に関与する種々の遺伝子群、stemness genes が同定されている。これらは Wnt/βカテニン、Hedgehog、notch シグナル系などが、幹細胞の自己複製に関与する分子群として明らかになってきたことと連動している。なかでも、脳の神経幹細胞が非対象細胞分裂する際に発現している musashi-1(MSi-1)遺伝子が幹細胞のマーカー遺伝子として注目されている。

## 2. 肝幹細胞における Msi-1 遺伝子発現

この Msi-1 遺伝子はマウスの胎児において、肝原基でいわゆる肝芽細胞(hepatoblast)に発現していることが明らかになった(18)。その遺伝子発現を RT-PCR 法で継時的に追跡してみると、胎生 14.5 日頃に発現しはじめ、17.5 日頃まで発現が持続するが、生後 7 日目にはほとんど消失し、成熟マウスには全く検出されなくなる。この胎生 14.5 日頃は肝芽細胞が肝細胞と胆管上皮細胞に分化する時期に当たる。つまり、肝の個体発生において、Msi-1 遺伝子が将来肝細胞となる前駆的な細胞の分化・増殖に関与している可能性が示唆されたわけである。

Msi-1 がどのような機序で幹細胞および前駆細胞の形質を与えているのかは十分明らかではない。Msi-1 蛋白は RNA 結合蛋白であり、慶應大学の岡野教授らのグループは Msi-1 蛋白が特異的に結合する mRNA は Notch シグナルを抑制的に制御している numb 遺伝子の mRNA であることを見出している。すなわち、Msi-1 は幹細胞の形質を維持するために Notch の発現を持続させる役割の一部を担っていると考えられる。

## 3. 肝前駆細胞の増殖調節因子

最近、卵形細胞の増殖を調節する因子として TWEAK(TNF-like weak inducer of apoptosis)が注目されている(19、20)。TWEAK は TNF ファミリーに属するサイトカインであり、マウス肝において卵形細胞の増殖を促進ことが見出された。この TWEAK シグナルはその受容体である Fn14 を介して伝達される。TWEAK は成熟肝細胞の増殖を促進せず、卵形細胞に選択的に作用することが YWEAK トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを用いて示された。C 型慢性肝炎などヒトの障害肝で TWEAK の発現増加が認められ、TWEAK/Fn14 経路がヒト肝障害でも重要な役割を演じていることが示唆されている。一方、卵形細胞の増殖を抑制する因子として oncostatin M が報告されている(21)。

一方、卵形細胞のアポトーシスを抑制し、再生時に卵形細胞が蓄積することにかかわるものとして、Gas6(growth arrest-specific gene 6)蛋白/Axl 系が見出されている(22)。Gas6 はビタミン K 依存性蛋白で、その受容体がチロシンキナーゼ受容体である Axl である。アセチルアミノフルオレインを投与し、その後部分肝切除を受けたラットモデルを用いて、卵形細胞における Gas6 と Axl の発現が検討された。その結果、卵形細胞の数と両蛋白の発現量に相関性が認められた。肝再生において、Gas6/Axl 系がオートクリン/パラクリン機序により卵形細胞の蓄積に関与することが示唆された。

肝再生において成熟肝細胞が増殖するか、あるいは卵形細胞が増殖するかを調節する

因子は不明であったが、どうも IFN- $\gamma$  がその役割を担っているらしいことが Fausto らのグループにより報告された (23)。すなわち、IFN- $\gamma$  が TNF- $\alpha$  と相俟って *in vivo* で分泌されることが、卵型細胞の増殖にスイッチを入れると推測している。

## C. 肝再生を調節する増殖因子およびサイトカイン

### 1. EGF ファミリー

EGF 受容体の活性化は肝再生に重要な役割を演じているが、最近、この受容体のリガンドである EGF ファミリー増殖因子に属する HB-EGF および amphiregulin の機能が明らかになっている。

HB-EGF は部分肝切除後に HGF や TGF- $\alpha$  よりも早期に発現する強力な肝細胞増殖促進因子として知られている (24)。また、amphiregulin (AR) はヒトおよびラット障害肝において発現しており、部分肝切除およびノックアウトマウスを用いた研究から、肝再生において早期に発現する増殖因子の一つであることが報告されている (25)。私どもは以前より、肝再生の増殖因子ネットワークとして、HB-EGF が第 1 波の増殖因子であり、HGF と TGF- $\alpha$  が第 2 波の増殖因子であると提唱してきた (26)。最近、この増殖因子ネットワークに関する私どもの仮説は HB-EGF と AR が第 1 波、HGF、EGF、TGF- $\alpha$  が第 2 波として国際的にも認められている (27)。

従来、肝再生において、初期の肝細胞プライミングから DNA 合成への移行のメカニズムは明らかではなかった。最近、Fausto らは肝細胞増殖において HB-EGF がセルサイクルの G1 期から S 期への移行における中心的因子として働くことを見出している (28)

HB-EGF 遺伝子導入が *in vivo* で肝再生を促進することが報告されている (29)。anti-Fas 抗体は肝細胞壊死を誘発するが、この抗体を投与して肝障害を生じたマウスにアデノウイルスを用いて HB-EGF と HGF をそれぞれ導入すると、肝再生が誘導された。とくに、HB-EGF を導入したマウスにおいてより強く肝細胞増殖が促進され、HGF 遺伝子導入よりも HB-EGF 遺伝子導入の方がより強力な遺伝子治療になりうることを示された。

### 2. TGF- $\beta$ ファミリー

TGF- $\beta$  は肝細胞の増殖を抑制し、肝再生のブレーキ役を果たしていることは良く知られている。肝細胞特異的な TGF- $\beta$  2 型受容体ノックアウトマウス (Alb-cre TGF- $\beta$  r2 (flx/flx)) を用いて、上皮細胞の増殖制御における TGF- $\beta$  シグナルの意義について検討された (30)。この検討から、TGF- $\beta$  シグナルは肝再生における肝細胞増殖を制御

し、肝体積/体重比を調節することが示され、このシグナルには p 1 3 0 が関わっていることが示唆された。

肝硬変における再生能は障害されており、硬変肝の肝切除後に肝不全を惹起する可能性がある。そこで、HGF により肝再生を促進し、かつ肝機能を保持させると同時に、可溶性 TGF- $\beta$  2 型受容体により肝線維化を抑制することにより、硬変肝の肝切除を安全に行えるようにする実験的な試みがなされた (31)。ラットにジメチルニトロサミンを 3 週間投与し、肝硬変を作製したのちに 10% の部分肝切除を行い、その後に門脈を介してアデノウイルスベクターを用いて両遺伝子を導入した。遺伝子導入後にジメチルニトロサミンをさらに 2 週間投与した。両遺伝子導入群では対照群に比較して、肝線維化が抑制されると同時に肝機能も有意に改善されていた。両遺伝子導入群ではすべてのラットが 60 日を越えて生存し、対照群に比較して部分肝切除後に有意に生存率が高かった。このような複合遺伝子治療は肝硬変における肝切除後の予後を改善するものとして期待される。

### 3. その他

以前から、血小板減少あるいは血小板の機能異常は肝再生に抑制的に働くことが報告されている。最近、この肝再生に対する血小板の役割はセロトニンによることが明らかにされた (32)。まず、肝切除後に肝でセロトニン受容体(5-HT<sub>2A</sub> および 2B)の発現が増加した。ついで、セロトニン受容体阻害剤を投与すると肝再生が抑制され、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素を欠くマウスでは肝再生が抑制されることが示された。この再生の抑制はセロトニン前駆物質を含むセロトニン欠乏血小板の投与で回復することから、肝再生にセロトニンがかかわることが証明された。

interleukin-6 (IL-6)は肝再生の重要なメディエーターであり、肝再生を遅らせたり、逆に促進したりすることが知られている。この IL-6 の矛盾する働きは実は肝が IL-6 に暴露される期間の長さによることが報告されている (33)。すなわち、短期間の IL-6 投与 (1-2 日) では、このサイトカインは重度の障害肝における再生には促進的に働き、より長期 (5-7 日) の投与では肝再生をむしろ抑制した。同様に、短期間の IL-6 投与はアポトーシスを誘導する Fas アゴニスト Jo2 投与時に抗アポトーシス作用を発揮するが、逆に長期投与ではこの作用は消失する。IL-6 は短期的には Bcl-2 や Bcl-xL などの抗アポトーシス蛋白を発現させるが、暴露が長期にわたるとアポトーシスを促進する Bax の誘導をきたす。この結果はカスパーゼー 9 およびミトコンドリアからのシトクロム c の放出ともリンクしていた。したがって、肝障害における IL-6 の慢性的な上昇は肝障害を助長し、肝不全を惹起する可能性が指摘される。

成長ホルモンが肝再生にかかわることが最近報告されているが、成長ホルモンにより産生される insulin-like growth factor-1 (IGF-1)が肝再生を促進することが示された(34)。IGF-1 受容体ノックアウトマウスでは肝部分切除後の Ki67 の免疫染色で評価された肝細胞増殖能が、雄マウスでは約半分にまで抑制され、雌マウスではとくに影響を受けなかった。雄マウスでは肝再生に関連して cyclin D1 および cyclin A1 の発現が対照に比較して半減しており、肝再生における cyclin 誘導は IGF-1 依存性であると考えられ、IGF-1/IRS-1/ERK のシグナル経路が推定された。

また、肝再生における胆汁酸の役割が注目されている(35)。マウスに0.2%コール酸を含む餌を5日間あたえると、肝重量が30%増加する。部分肝切除後に同様に0.2%コール酸を投与すると、やはり肝再生が促進される。また、胆汁酸の核内受容体 FXR ノックアウトマウスを使って部分肝切除を行った実験では、対照に比べて著しく肝再生が阻害された。ここでは胆汁酸が核内受容体、FXR を介して当該の代謝にかかわる標的遺伝子の発現を調節するだけでなく、肝再生をも制御する可能性を指摘している。

## 結論

肝障害後の肝再生が成熟肝細胞の増殖によるのか、幹細胞から前駆細胞の分化・増殖によるのか、その制御機構が漸く明らかになってきている。さらに、肝前駆細胞(卵形細胞)の起源および骨髄細胞の肝細胞への分化機構の解明、肝組織固有の幹細胞の単離など、細胞治療に向けた研究が進展している。今後、肝幹細胞の分化・増殖の分子機構を明らかにすることにより、*in vitro* および *in vivo* で肝幹細胞の分化・増殖を制御できることが可能になる。これにより肝幹細胞を移植することにより、重症の肝不全を克服するための抜本的治療法を開発することが可能になる。具体的には、肝幹細胞を *in vitro* で増殖・分化させた後、肝内に細胞移植を行い、肝内で成熟した肝細胞へ効率的に分化させるシステムを構築する。

## 例示

**Hepatic stem cell transplantation:** 肝硬変あるいは代謝性肝疾患に伴う肝不全に対しては肝幹細胞を異所性に脾臓や大網に移植し、肝機能の代替をはかる。

**Liver reconstruction:** 劇症肝炎では、広範囲に肝細胞の脱落が起こった肝に幹細胞を経門脈的に注入する。なお、このような系統的な治療法は重症の肝不全克服のための新規の治療法たり得る。

これらによって、病態に応じた重症肝不全に対する戦略的治療法を開発できると考えられる。

## 参考文献

1. Grompe M. The origin of hepatocytes. *Gastroenterology* 2005; 128: 2158-2160.
2. Yamamoto N, Terai S, Ohata S, et al. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118.
3. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes? *Nature* 2003; 422: 897-901.
4. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
5. Sato Y, Araki H, Nakamura K, et al. Human mesenchymal stem cell xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763.
6. Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, et al. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004; 22: 897-907.
7. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539.
8. Okumoto K, Saito T, Hattori E, et al. Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage. *J Hepatol* 43: 110-116, 2005
9. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-21.
10. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006; 130: 521-31.
11. Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, et al. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics* 2006; 6: 2564-70.
12. Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in liver cirrhosis patients after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006, in press
13. Suzuki A, Zhen YW, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184.
14. Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9912-7.
15. Nowak G, Ericzon BG, Nava S, et al. Identification of expandable human hepatic progenitors which differentiate into mature hepatic cells in vivo. *Gut* 2005; 54: 972-9.
16. Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem



- cells during liver development. *Front Biosci* 2006; 11: 1302-10.
17. Oertel M, Menthena A, Dabeva D, et al. Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 507-20.
  18. Shu H, Saito T, Watanabe H, et al. Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 150-4.
  19. Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 115: 2330-2340, 2005
  20. Fausto N. Tweaking liver progenitor cells. *Nat Med* 11: 1053-1054, 2005
  21. Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, et al. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 166: 709-719, 2005
  22. Couchie D, Lafdil F, Martin-Garcia N, et al. Expression and role of Gas6 protein and its receptor Axl in hepatic regeneration from oval cells in the rat. *Gastroenterology* 2005; 129: 1633-42.
  23. Brooling JT, Campbell JS, Mitchell C, et al. Differential regulation of rodent hepatocytes and oval cell proliferation by interferon gamma. *Hepatology* 41: 906-915, 2005
  24. Kiso S, Kawata S, Tamura S, et al. Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 2003; 124: 701-7.
  25. Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, et al. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005; 503-6.
  26. 河田純男. 肝再生における幹細胞と増殖因子の役割— 肝臓病学の新しい展開をめざして — *Frontiers in Gastroenterology* 2002; 7: 15-23.
  27. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53.
  28. Mitchell C, Nivison M, Fausto N, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005; 280: 2562-8.
  29. Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, et al. In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: a comparative study to HGF. *J Hepatol* 2006; 44: 1046-54.
  30. Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, et al. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 2005; 24: 3028-41.
  31. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, et al. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF- $\beta$  receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery*

- 2006; 139: 563-73.
32. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006; 312: 104-7.
  33. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, et al. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* 2006; 43: 474-84.
  34. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, et al. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J* 2006; 20: 773-5.
  35. Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006; 312: 233-6.

# 肝臓の発生・分化機構

東京大学分子細胞生物学研究所

宮島 篤

## はじめに

肝臓は代謝、解毒、血清タンパク質の産生など生命の恒常性維持に必須の臓器であり、これらの機能は主に肝実質細胞である肝細胞が担う。肝臓の基本単位である肝小葉には中心静脈域から放射状に肝細胞が並んで層を形成し、その間を肝特有の血管系である類洞が走っている。肝細胞間には毛細胆管があり、肝細胞が産生する胆汁を肝外へと排出する。一方、ほ乳動物の胎児期の肝臓は造血組織であり、肝臓の構造と機能は出生前後で劇的な変貌を遂げる。肝臓は生体における最大の臓器であるが、血液を除けば、肝臓を構成する細胞種は肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞、線維芽細胞、中皮細胞など比較的少ない。しかし、肝臓研究においては、依然として実質細胞と非実質細胞という表現が使われているように、個々の細胞の性状は必ずしも十分に解明されてはいない。肝疾患の発症や肝再生の機構を解析および治療法を開発する上で、個々の細胞の詳細な性状ならびに発生・分化の機構を理解することは極めて重要である。

## 肝発生

肝臓は前腸上皮細胞が心臓由来のFGFおよび横中隔間充織由来のBMPの作用により発生する。前腸上皮細胞から肝臓へと運命決定された肝芽細胞は増殖して肝芽を形成するが、肝芽細胞の増殖には内皮細胞の助けが必要であることが示されている。肝芽細胞は増殖して肝細胞と胆管上皮細胞へと分化することから胎児肝臓における肝幹細胞と考えられている。

我々は、発生初期の肝芽に発現する細胞膜タンパク質としてDlkを同定した。DlkはマウスのE9.5日の肝臓に強く発現しており、肝臓での発現は分化に伴い減少し出生後には検出されない。モノクローナル抗体を用いて分離したDlk陽性細胞には*in vitro*での高い増殖と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を併せ持つ細胞が含まれており、継代培養可能な幹細胞様の細胞株を樹立することも可能である。肝幹細胞の分化を解析するために、*in vitro*での増殖および分化誘導系が開発されている。

## 肝細胞分化

IL-6ファミリーのサイトカイン受容体の共通サブユニットであるgp130を欠損したマウスの肝臓はtyrosine aminotransferase (TAT)の発現やグリコーゲンの蓄積が認められないなど機能的には未熟であることから、このサイトカインファミリーの機能が肝臓の分化・成熟に重要である。我々は、胎児肝臓の初代培養系にIL-6ファミリーのOncostatin M(OSM)を加えると肝分化が強く誘導され、胎児期の未分化肝細胞をTAT、G6Paseなどを発現する出生時期の肝細胞へと分化を誘導することを見いだした。さらに、この培養系に細胞外マトリクスのEHSゲルを添加することでtryptophan oxygenase (TO)やP450などを発現する成熟肝細胞へと分化誘導する。この分化誘導系を利用することで、肝細胞分化の分子機構の解析が可能となった。例えば、細胞内シグナル分子STAT3がTATなどの肝酵素の発現促進およびD1 cyclinの発現抑制を行うことやK-Rasの活性化が細胞接着構造の形成に重要であることなどが明らかにされている。また、肝臓の分化成熟に関与する遺伝子でノックアウトマウスは胎生致死となる場合でも、本培養系により、その肝分化における機能を解析することも可能である。今後もノックアウトマウスとこの本培養系を組み合わせることで、そうした遺伝子の肝臓における機能が明らかにされるであろう。

出生前後に肝臓は胎児期の造血器官から代謝の中心臓器へと変化するために、この時期の肝細胞では様々な代謝酵素の劇的な発現が誘導される。この過程には、転写因子C/EBPaが必須であり、その欠損マウスは出生直後に低血糖と高アンモニア血症を示して死亡する。C/EBPaは胎生肝臓から構成的に発現しており、この転写因子の発現制御のみでは出生時における劇的な遺伝子発現誘導は説明できない。例えば、糖新生に必須のphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)などの発現には、C/EBPaとともに転写因子Foxo1の協調的な作用が必要である。Foxo1の肝臓における発現は出生直前に誘導される。さらに、Foxo1はインスリンのシグナルにより負に制御されること、インスリンのレベルが出生時に劇的に減少する。すなわち、Foxo1がインスリンのセンサーとしてC/EBPaとともに出生時における糖新生を制御する様子が明らかになった。糖新生以外にも、C/EBPaによる遺伝子発現制御に関与する因子の存在が明らかにされている。

## 胆管への分化

肝芽細胞は増殖して肝細胞と胆管上皮細胞へと分化するが、胆管は門脈周囲にのみ形成される。遺伝性のAllagile syndromeは肝内胆管の形成不全を伴い、その原因遺伝子がJagged1であることから、胆管形成へのNotchシグナルの関与が示唆されていた。肝芽細胞にはNotch2が発現しており、Jagged1は門脈周囲に発現すること、分離したDlk陽性

細胞にNotchの活性化型であるNotch細胞内ドメインを強制発現すると肝細胞分化が抑制されて胆管分化が促進された。一方、門脈域のJagged1陽性細胞はp75NTR陽性の間葉系細胞であることも明らかとなった。従って、Notch2を発現するDlk陽性肝芽細胞がJagged1とp75NTRを発現する門脈域線維芽細胞の作用により胆管上皮への分化が誘導されると考えられる。

株化肝幹細胞をEHSゲルとコラーゲンで3次元培養すると極性をもった胆管細胞のシスト構造が作られる。これを使うことで胆管形成の分子機構の解析が可能となってきた。

### 類洞の形成

肝類洞は肝臓に特有の血管系であり内皮細胞と間葉系の星細胞からなる。類洞内皮細胞は基底膜をもたず有窓構造 (fenestrae) を有するユニークな内皮細胞であり、遺伝子発現のプロファイルも他の内皮細胞とは異なる。この細胞には、scavenger受容体であるLyve-1とStabilin-2 (Stab2)を強く発現し、血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞などに比べて強いendocytosis活性を示す。また、血液凝固因子FVIIIの産生細胞でもある。E14の肝類洞内皮細胞はCD34陽性FcγR陰性であるが、成体ではCD34陰性FcγR陽性となる。

一方、成体肝臓の類洞内皮細胞は線維化や肝硬変などの病変時においては基底膜が形成され、fenestraeを有しない連続的な毛細血管へと変化することが知られている。DMNを投与して線維化を誘導した肝臓では、Stab2の発現量に変化は認められないものの、CD34およびLyve-1の発現は顕著に亢進する。このように、肝類洞内皮細胞は発生ステージや病態により、その表現型が大きく変化する。それらマーカー分子の発現を指標とすること、肝特異的な内皮細胞の形質変化の解析が可能となった。

星細胞は類洞内皮細胞と肝細胞との間に存在する間葉系細胞であり、ビタミンA貯蔵細胞としても知られている。肝臓の線維化とともに星細胞は形質転換して線維芽細胞様の形態を呈し、コラーゲンなど細胞外マトリクスの産生を行う。肝臓の線維化が進むと、本来基底膜を有しない類洞に基底膜様構造物が出現し、類洞のcapillarizationが起こる。これにより肝細胞周囲の線維化が形成され、類洞の血流と肝細胞との間の物質交換が著しく障害される。類洞の血流を左右する星細胞は、肝臓の命運を握っている重要な細胞である。しかし、この細胞の起源や類洞内皮細胞とともに類洞を形成するプロセスに関する研究は少ない。

NGFの低親和性受容体であるp75NTRが星細胞に発現しており、その抗体を使ってマウス胎児から星細胞の前駆細胞を同定分離することが可能となった。E14肝臓から分離

したp75NTR陽性細胞はvimentinやdesminなどの間葉系細胞に特有の遺伝子を発現しており、そのうち10%程度が油滴を溜めていること、さらに分離した細胞を培養すると成体肝臓の星細胞が発現するGFAPを発現することから、E14のp75NTR陽性細胞は星細胞の前駆細胞であると考えられる。

さらにp75NTRの発現はE10ですでに認められ、E12では肝臓全体に分布し、E14では実質域と門脈域に発現する。実質域のp75NTR陽性細胞はE10ですでに類洞内皮細胞と接しており、この時期にすでに類洞形成が始まっていると考えられる。また、門脈周辺の線維芽細胞は細胞外マトリクスの産生により肝線維化を引き起こしたり、胆管の障害からの再生を促進したりすると考えられている。この間葉系細胞もp75NTRを発現しており、星細胞と起源を同じにする可能性が示唆された。さらに、この門脈域のp75NTR陽性細胞はJagged1を発現しており、上記の胆管形成を誘導すると考えられる。

### 肝中皮細胞

中皮組織は臓器表面の保護、腹腔液の調節、物質の輸送、免疫的監視などに関わると考えられているが、その詳細は十分に理解されていない。我々は胎児肝臓の中皮細胞にシアロムチンのPCLP1が強く発現しており、その発現が発生に伴い減少し、成体肝臓の中皮には発現が消失することを見いだした。一方、中皮細胞マーカーとして知られているmesothelinは胎児期には発現が見られず、分化とともに発現が増強する。これらの発現を指標に分化段階の異なる中皮細胞を分離することが可能であり、これにより中皮細胞は単なる臓器表面を覆うシートではなく、様々な因子を分泌して、胎生期から新生児の肝細胞の増殖にも積極的に関与することが明らかとなった。

### 成体肝臓の幹細胞

肝臓は再生する臓器として知られているが、肝切除からの再生などは残存する肝細胞および胆管上皮細胞が単に増殖することで修復されるが、肝細胞の分裂が阻害されるような重篤な肝障害においては、門脈域に胆管様の構造（擬胆管）が現れる。その細胞の核が卵形であることから齧歯類ではオーバル細胞とも呼ばれ、未分化な肝細胞と胆管上皮細胞の性質を併せ持つことから、成体肝臓の幹細胞とみなされている。我々はこの細胞に発現する細胞膜抗原としてEpCAMを同定した。3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC) の投与により肝障害を誘導してEpCAM陽性細胞を分離して培養すると、*in vitro*で活発に増殖し、肝細胞と胆管上皮細胞への分化能をもつ細胞が存在することを示した。一方、EpCAMは正常な胆管にも発現することから、正常な肝臓にも肝幹細胞が存在する可能性が考えられる。事実、正常な成体肝臓から分離した

EpCAM陽性細胞にもin vitroで増殖し、肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた細胞が少数存在することが明らかとなった。すなわち、正常な肝臓においても肝幹細胞活性を備えた細胞が潜んでいると考えられる。

多くのがんにおいてがんの元となる幹細胞が存在することが示されている。肝がんにも幹細胞が存在するとの報告はあるが、肝がんには幹細胞が存在するとしても、その起源は必ずしも肝幹細胞とは限らない。しかし、肝がんの多くはa-fetoproteinなどの胎児期肝芽細胞に発現する分子が発現することから、肝がんの発生と肝幹細胞との関連が示唆される。事実、肝細胞がんと胆管がんの混ざった混合型の肝臓がんや肝芽腫の起源は肝幹/前駆細胞である可能性が示唆されている。また、肝障害時に出現するオーバル細胞は肝がんの元となる可能性も示唆されている。しかし、この混合型のがんは肝がんのごく一部であり、大部分の肝がんは肝細胞由来であると考えられている。最近、albumin陽性の肝細胞に初期化因子のc-Myc, Oct3/4, Sox2, Klf4を発現させるとiPS細胞が出現することが示された。これは分化した肝細胞でもごく少数の遺伝子発現の変化で未分化状態に戻り得ることを示しており、分化した肝細胞が未分化状態に戻りがん化する可能性を示唆する。しかし、肝がんの起源の解明にはさらなる検討が必要である。

## まとめ

以上、細胞膜抗原の同定をそれらに対するモノクローナル抗体を利用した細胞の同定と分離により得られた肝臓の発生・分化および肝障害・再生における肝臓構成細胞の性状変化を概説した。肝疾患メカニズムの解明、再生医療や治療薬の開発を行う上で、これら肝臓構成細胞群を厳密に同定・分離し、それらの性状を解析することが必須である。肝細胞は肝機能の大部分を担うが、肝臓の構成と機能維持にはいわゆる肝非実質細胞群が必須であり、これらの細胞による相互作用を理解することが重要である。

## 参考文献

1. Tanimizu N. and Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *International Review of Cytology* 259, 1-48, 2007.
2. Zaret K and Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322, 1490-1494, 2008.
3. Tanimizu N, M. Nishikawa, H. Saito, T. Tsujimura, and A. Miyajima. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J.Cell Sci.* 116, 1775-1786, 2003.

4. Tanimizu N., Saito H., Mostove K. and Miyajima A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk<sup>+</sup> hepatoblasts. *J. Cell Sci.* 117, 6425-6434, 2004.
5. Kamiya A., T. Kinoshita, Y. Ito, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through gp130. *EMBO J* 18, 2127-2136, 1999.
6. Kamiya A., N. Kojima, T. Kinoshita, Y. Sakai and A. Miyajima. Maturation of fetal hepatocytes *in vitro* by extracellular matrices and Oncostatin M; Induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* 35, 1351-1359, 2002.
7. Ito Y., T. Matsui, A. Kamiya, T. Kinoshita, and A. Miyajima. Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and Ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32,1370-1376, 2000
8. Matsui T., T. Kinoshita, T. Hirano, T. Yokota and A. Miyajima. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J. Biol.Chem.* 277, 36167-36173, 2002.
9. Matsui T., Kinoshita T., Morikawa Y., Tohya K., Katsuki M., Ito Y., Kamiya A. and Miyajima A. K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J.* 21, 1021-1030, 2002.
10. Sekine K., Kojima N., Chen Y-R., Fukamizu A. and Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBP $\alpha$  and regulates gluconeogenesis during liver development. *EMBO J.* 26, 3607-3615, 2007.
11. Tanimizu N. and Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J.Cell Sci.* 117, 3165-3173, 2004.
12. Suzuki.K., Tanaka.M.,Watanabe.N., Saito.S., Nonaka.H., and Miyajima A. The p75 neurotrophin receptor marks precursors of hepatic stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology* 135, 270-281, 2008.
13. Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev. Dyn.* 236, 2258-2267, 2007.
14. Chen Y-R., Sekine Ke., Nakamura,K., Yanai,H. Tanaka M., and Miyajima A. YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 by suppressing C/EBP $\alpha$  function, leading to hyperammonemia. *Gastroenterology* in press



# 細胞プロセッシングセンターの管理と運用 ーその現状と課題ー

京都大学医学部附属病院  
分子細胞治療センター  
笠井泰成

## 再生医療と細胞プロセッシングセンター

ヒト由来の幹細胞やiPS細胞などを利用して再生医療に用いる細胞や組織の培養や調整を行う際には、臨床試験の段階から治療を受ける患者の安全性を保証するため、GMP準拠の製造管理および品質管理が必須であり、構造設備と運用の両面が管理されている細胞プロセッシング施設(CPC)が不可欠である。

## 大学や研究施設に設置されているCPC

◆ 約80ヶ所にCPCと呼ばれている施設があるが、その内容は千差万別である。

\* 「ヒト幹細胞を用いる臨床試験に関する指針」にCPCに関する構造施設基準の記載はあるが、全てのCPCが基準を満たしているとは言い難い。

CPCは単なるクリーンルームではない。

CPC管理者が基準を十分に理解をしているか？

# 「ヒト幹細胞を用いる臨床試験に関する指針」

厚生労働省 平成18年7月3日

## 6 研究機関の基準

研究機関は、次に掲げる研究段階において、それぞれ次に掲げる要件を満たすほか、第1章第5に規定する基本原則を遂行する体制が整備されていなければならない。

(2) 調製機関 調製機関は、次に掲げる要件を満たすものとする。

- ◆ ヒト幹細胞の調製及び保存に必要な衛生上の管理がなされており、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成9年厚生省令第28号)第17条第1項に求められる水準に達していること。
- ◆ 調製に関する十分な知識及び技術を有する研究者を有していること。
- ◆ ヒト幹細胞の取扱いに関して機関内に専用の作業区域を有していること。
- ◆ 倫理審査委員会に準ずる委員会が設置されていること。

# 「ヒト幹細胞を用いる臨床試験に関する指針」

厚生労働省 平成18年7月3日

## 6 研究機関の基準

研究機関は、次に掲げる研究段階において、それぞれ次に掲げる要件を満たすほか、第1章第5に規定する基本原則を遂行する体制が整備されていなければならない。

(2) 調製機関 調製機関は、次に掲げる要件を満たすものとする。

- ◆ ヒト幹細胞の調製及び保存に必要な衛生上の管理がなされており、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成9年厚生省令第28号)第17条第1項に求められる水準に達していること。
- ◆ 調製に関する十分な知識及び技術を有する研究者を有していること。
- ◆ ヒト幹細胞の取扱いに関して機関内に専用の作業区域を有していること。

「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」



「治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準(治験薬GMP)」

治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準  
(治験薬GMP)について (平成九年三月三一日)(薬発第四八〇号)

【別添1】 治験薬の製造管理及び品質管理基準

- 定義
- 治験薬品質管理者、治験薬製造管理責任者及び治験薬品質管理責任者
- 治験薬品質管理者の業務
- 治験薬製品標準書
- 治験薬製造管理基準書及び治験薬製造衛生管理基準書
- 治験薬製造管理責任者の業務
- 治験薬品質管理基準書
- 治験薬品質管理責任者の業務
- 外部試験検査機関等の利用
- パリテーション等の手順に関する文書
- パリテーション
- 苦情処理
- 回収処理
- 自己点検
- 教育訓練
- 委託製造

【別添2】 治験薬の製造施設の構造設備基準

- 治験薬の製造施設の構造設備基準
- 治験原薬以外の治験薬の製造施設の構造設備
- 治験原薬の製造施設の構造設備
- 治験無菌製剤の製造施設の構造設備
- 治験無菌原薬の製造施設の構造設備
- 治験生物学的製剤の製造施設の構造設備
- ロットを構成しない治験血液製剤の製造施設の構造設備

平成20年7月に、  
治験薬GMPが改訂



樹状細胞を用いた  
細胞免疫療法  
(血液・腫瘍内科)

臍島移植  
(移植外科)

自家培養真皮  
(形成外科)

骨髄間葉系幹細胞  
を用いた骨再生  
(再生研・整形外科)

末梢血幹細胞の  
保存管理

NETWORK SECURITY SYSTEM

VSS-01

ゲート 002 前扉入口

発表先 現データ 期間 2009/01/01 00:00 ~ 2009/01/29 23:59  
 ゲート 002 前扉入口 カード 全カード  
 対象 全データ

発表データ情報書 PAGE 3 / 5

発表日時	カードID	氏名	所属部署	ゲート名称	備考
2009/01/20 11:32:31	000364	北原年雄	003	前扉入口	退室
2009/01/21 09:36:04	000362	片上幹子	001	前扉入口	入室
2009/01/21 10:12:07	000096	荻井典成	001	前扉入口	入室
2009/01/21 10:13:03	000096	中川陽子	001	前扉入口	入室
2009/01/21 10:14:09	000366	橋本直子	002	前扉入口	入室
2009/01/21 10:16:06	000223	美藤佳子	002	前扉入口	入室
2009/01/21 10:16:10	000223	美藤佳子	002	前扉入口	入室
2009/01/21 10:17:46	000364	北原年雄	003	前扉入口	入室
2009/01/21 10:20:20	000064	北原年雄	003	前扉入口	入室
2009/01/21 10:23:33	000099	ピシター-1	999	前扉入口	入室
2009/01/21 10:40:39	000273	倉本由子	002	前扉入口	入室
2009/01/21 11:07:22	000099	ピシター-1	999	前扉入口	退室
2009/01/21 11:06:41	000064	北原年雄	003	前扉入口	退室
2009/01/21 11:15:20	000273	倉本由子	002	前扉入口	退室
2009/01/21 11:15:34	000223	美藤佳子	002	前扉入口	退室
2009/01/21 11:16:33	000096	荻井典成	001	前扉入口	退室
2009/01/21 11:16:38	000362	片上幹子	001	前扉入口	退室
2009/01/21 11:16:49	000366	橋本直子	001	前扉入口	退室
2009/01/21 11:16:56	000364	美藤佳子	001	前扉入口	退室
2009/01/21 11:17:41	000096	中川陽子	001	前扉入口	退室
2009/01/21 13:04:29	000362	片上幹子	001	前扉入口	入室
2009/01/21 13:05:62	000364	美藤佳子	001	前扉入口	入室
2009/01/21 13:07:23	000096	中川陽子	001	前扉入口	入室

## 入退室管理システム モニター画面

京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター

環境モニタリングシステム モニター画面



膝島分離用細胞調整室

## CPCの運営管理

- ◆ バリデーション・マスタープラン
- ◆ 基準書、標準作業手順書、記録書
- ◆ 教育訓練
- ◆ 製造管理、品質管理
- ◆ 自己点検や外部監査(相互監査)
- ◆ CPCの維持経費

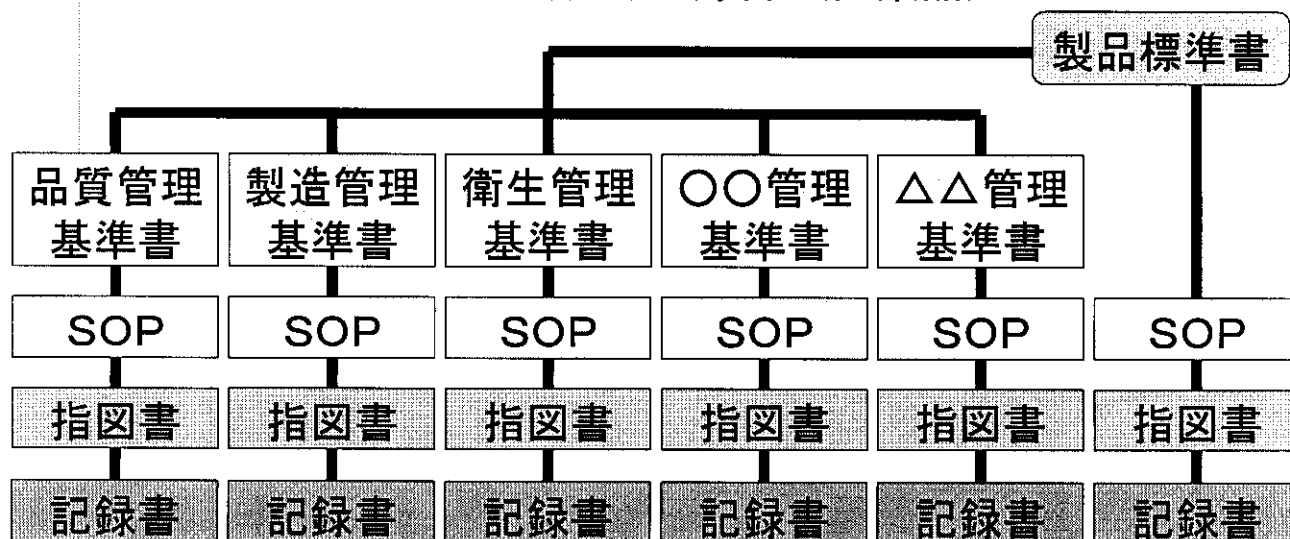
## CPCの運営管理（1）

### ◆ バリデーション・マスタープラン

- DQ(Design Qualification: 設備設計時の適格性確認)
- IQ(Installation Qualification: 設備据付時の適格性確認)
- OQ(Operation Qualification: 稼動性能時の適格性確認)
- PQ(Performance Qualification: 稼働性能の適格性確認)
- 定期的な再バリデーション
- PV(Process Validation: 実生産規模の適格性確認)
- 同時的バリデーション
- 回顧的バリデーション

## CPCの運営管理（2）

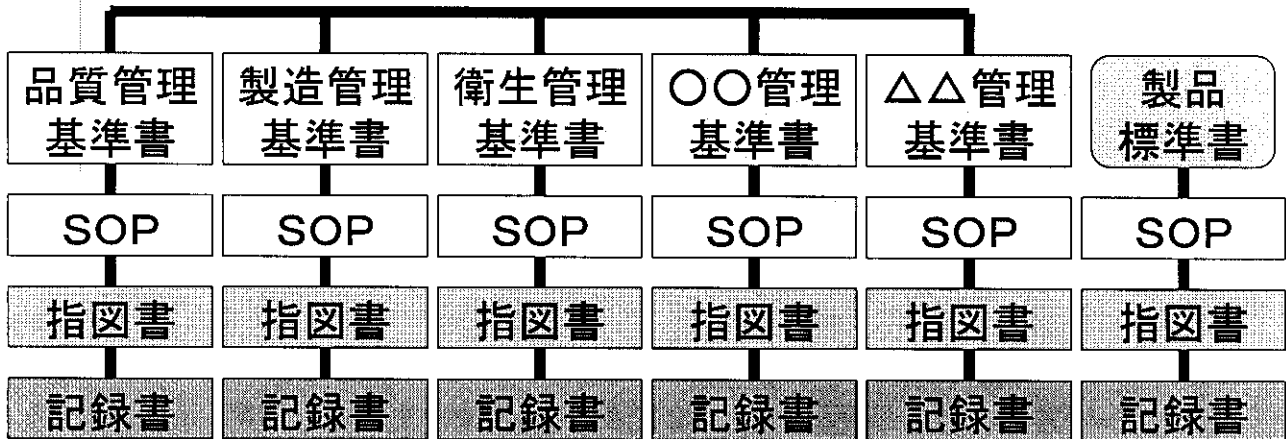
### ◆ 基準書、標準作業手順書、記録書（医薬品）



医薬品では、個々の製品ごとに全ての基準書を作成している。

## CPCの運営管理 (2)

### ◆ 基準書、標準作業手順書、記録書 (京都大学CPC)



京都大学のCPCでは、施設の運用基準として統一の基準書を作成し、各プロジェクトでは製品標準書以下のみを作成する。

## CPCの運営管理 (2)

### 分子細胞治療センター標準一覧

一次文書		三次文書		四次文書
文書管理番号	文書名	文書管理番号	文書名	記録書名
CCMT	品質マニュアル			
二次文書		三次文書		四次文書
文書管理番号	文書名	文書管理番号	文書名	記録書名
CCMT-A01	膝島分離製品標準書	(省略)	(省略)	(省略)
CCMT-A02	CD34分離製品標準書			
CCMT-A03	骨髓単核球分離製品標準書			
CCMT-A04	生体膝島分離製品標準書			
CCMT-A05	DC培養製品標準書			
CCMT-A06	間葉系細胞培養製品標準書			
CCMT-A07	真皮培養製品標準書			
CCMT-B01	文書管理基準書			CCMT標準管理台帳 外部文書管理台帳 SOP制定・改廃管理台帳 配布台帳
CCMT-B02	記録管理基準書			品質記録一覧表
CCMT-B03	購買管理基準書	CCMT-B03-001	購買に関する手順書	発注台帳 新規取引先評価表 継続取引先評価表 取引先リスト
CCMT-B04	是正処置管理基準書			是正要望書 予防処置記録書

# 分子細胞治療センター標準一覧

二次文書		三次文書		四次文書
文書管理番号	文書名	文書管理番号	文書名	記録書名
CCMT-C01	製造管理基準書	CCMT-C01-001	組織・血液の受入に関する手順書	CCMT依頼書
		CCMT-C01-002	不適合品に関する手順書	不適合品連絡票
		CCMT-C01-003	設備機器の点検に関する手順書	設備機器類管理台帳
				設備機器類校正管理台帳
				校正外れの対応記録
		CCMT-C01-004	始業点検に関する手順書	始業終業点検記録書
CCMT-C02	製造衛生管理基準書	CCMT-C02-001	浮遊菌測定に関する手順書	浮遊菌検査試験結果記録書
		CCMT-C02-002	清掃に関する手順書	清掃記録実施記録
		CCMT-C02-003	廃棄物に関する手順書	
		CCMT-C02-004	入退室に関する手順書	入退室記録
		CCMT-C02-005	手洗に関する手順書	
		CCMT-C02-006	血液汚染に関する手順書	針刺し事故検査依頼書兼報告書
		CCMT-C02-007	オートクレーブに関する手順書	
				健康管理記録書
				健康診断記録書
CCMT-C03	品質管理基準書			試験検査報告書(COA)
				試験検査記録書
CCMT-C04	バリデーション管理基準書			バリデーション実施計画書
				バリデーション実施結果
CCMT-C05	苦情・回収処理基準書			苦情処理受付票
CCMT-C06	自己点検管理基準書			自己点検計画書
				自己点検評価報告書
CCMT-C07	教育訓練管理基準書			教育訓練計画書
				資格認定者名簿

## CPCの運営管理 (3)

### ◆ 教育訓練

#### 基本編

GMPの概要説明

CPCの運用基準書とSOPの解説

#### 応用編

SOP原案の作成 ⇔ GMPの理解を深める

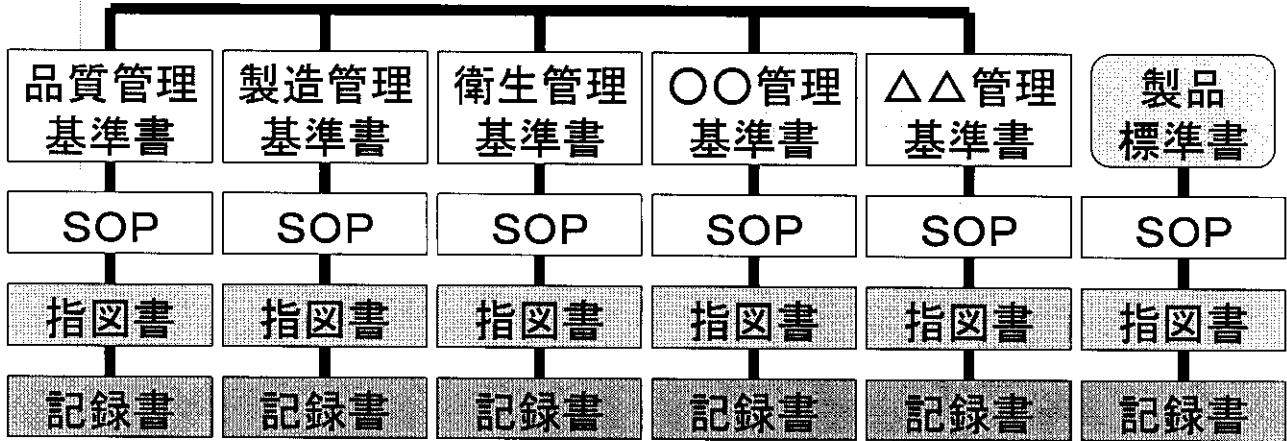
#### 実地訓練

ドライラン、OJT ⇔ SOPの修正



## CPCの運営管理 (2)

### ◆ 基準書、標準作業手順書、記録書 (京都大学CPC)



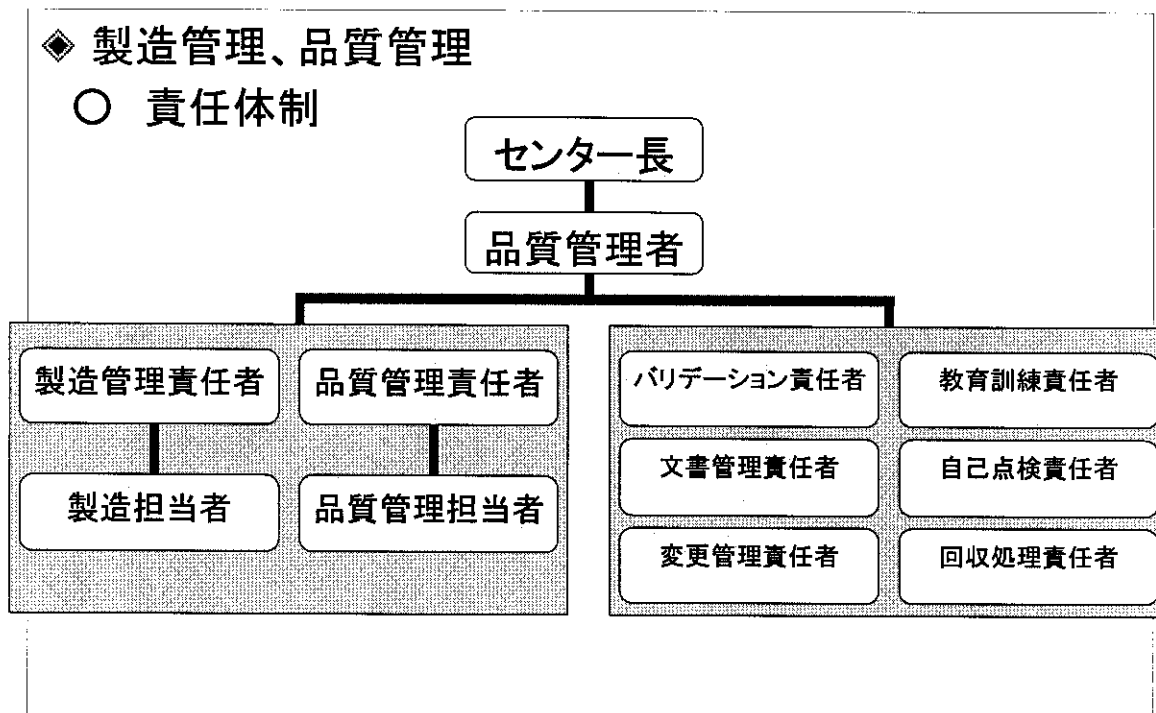
京都大学のCPCでは、施設の運用基準として統一の基準書を作成し、各プロジェクトでは製品標準書以下のみを作成する。

## CPCの運営管理 (2)

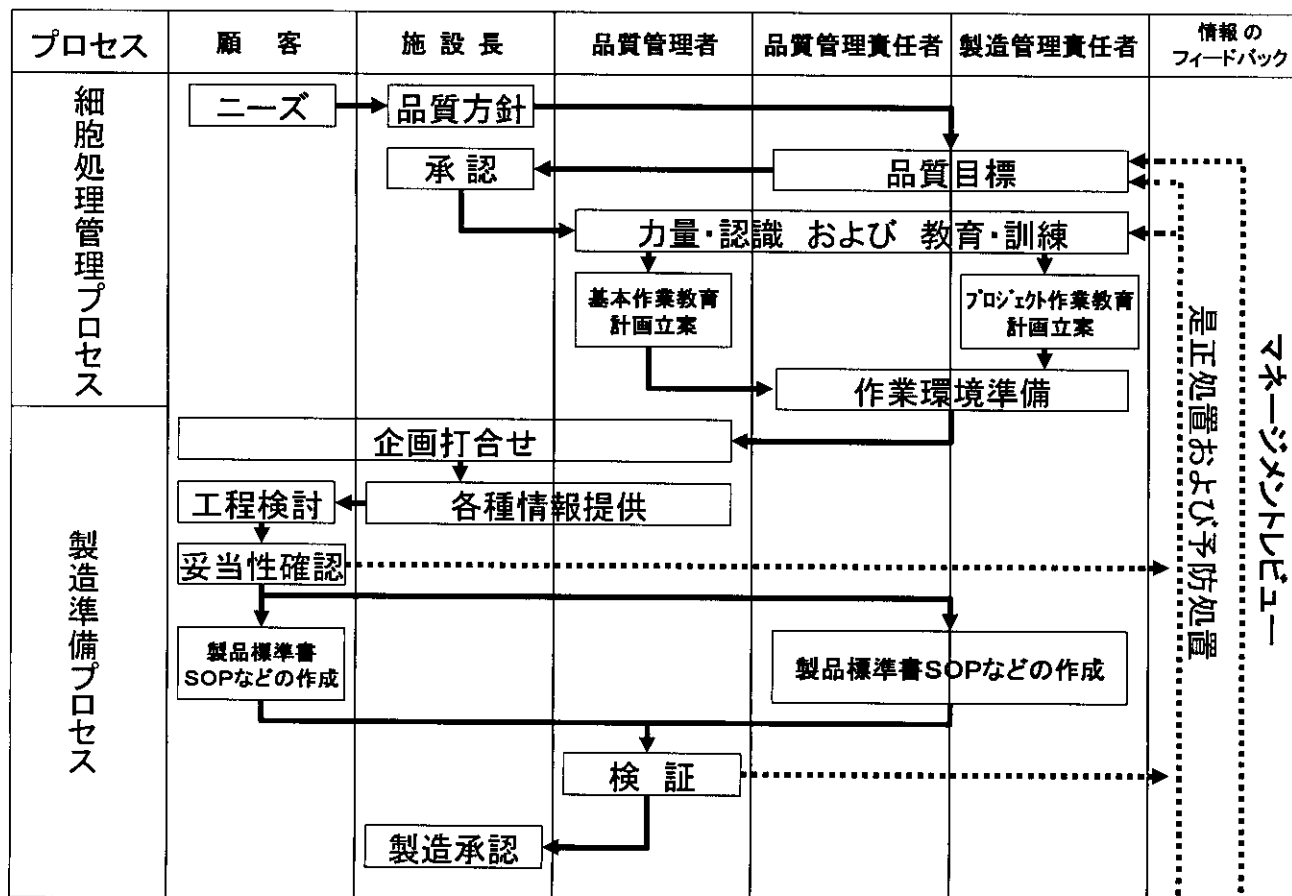
### 分子細胞治療センター標準一覧

一次文書		三次文書		四次文書
文書管理番号	文書名	文書管理番号	文書名	記録書名
CCMT	品質マニュアル			
二次文書		三次文書		四次文書
CCMT-A01	豚島分離製品標準書	(省略)	(省略)	(省略)
CCMT-A02	CD34分離製品標準書			
CCMT-A03	骨髓単核球分離製品標準書			
CCMT-A04	生体豚島分離製品標準書			
CCMT-A05	DC培養製品標準書			
CCMT-A06	間葉系細胞培養製品標準書			
CCMT-A07	真皮培養製品標準書			
CCMT-B01	文書管理基準書			CCMT標準管理台帳 外部文書管理台帳 SOP制定・改廃管理台帳 配布台帳 品質記録一覧表
CCMT-B02	記録管理基準書			発注台帳 新規取引先評価表 継続取引先評価表 取引先リスト
CCMT-B03	購買管理基準書	CCMT-B03-001	購買に関する手順書	是正要望書 予防処置記録書
CCMT-B04	是正処置管理基準書			

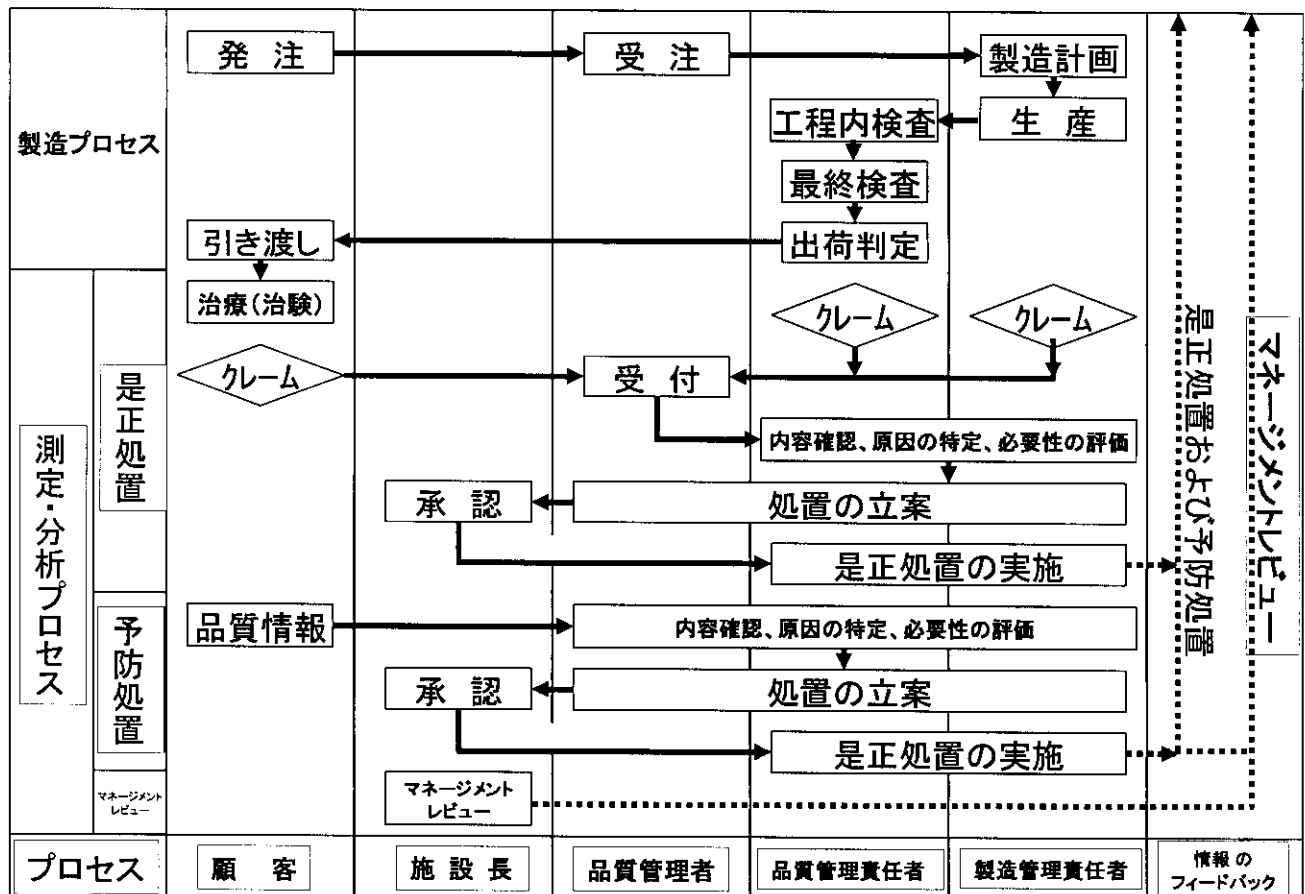
# CPCの運営管理 (4)



京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター 運用フローチャート



京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター 運用フローチャート



## CPCの運営管理 (5)

### ◆ 自己点検(内部監査)

分子細胞治療センターは少人数で構成された組織であるため、客観的な立場からの内部監査が行えていない。

平成22年2月には京都大学iPS細胞研究支援センターにもCPCが設置される予定であり、独自のチェックリストを作成し内部監査の運用を開始する予定。

### ◆ 外部監査

現在、臨床研究を行っている大学や研究施設のCPCを外  
部から監査するシステムはない。

施設間での相互監査などの検討が必要。

## CPCの運営管理（6）

- ◆ CPCの維持経費（京大病院CPCのケース）
  - 人件費  
常勤（2名）、特定有期雇用（2名）、時間雇用（4名）
  - 設備費  
種々の機器や計器類
  - 運営費  
定期バリデーション（点検・整備・校正）  
サニテーション、環境モニタリング  
資材、消耗品、光熱費

## 製品の安全性および品質の評価

- ◆ 無菌試験やマイコプラズマ、エンドキシンなどの測定方法は日本薬局方に準ずる。 ← 試料により非特異的な反応が出る？
- ◆ 細胞や組織の機能評価法の開発  
臨床試験と承認後に用いられる組織・細胞の同等性を保証  
加工された組織・細胞の特性や出荷基準
- ◆ 最終製品に残留する目的以外の細胞の解析方法の開発

## CPCの管理・運営に関する課題

- ◆ 施設基準や運用基準の整備  
(ヒト幹細胞だけでなく)
- ◆ 査察システムの構築  
(自己満足では不十分)
- ◆ 情報の蓄積  
(個々の施設に課題が山積している)

情報交換が行える環境