

特集 臓器再生

肝臓疾患に対する再生医療の現況と展望

昭和大学医学部外科学教室 (消化器・一般外科学部門)

青木 武士 村上 雅彦 榎並 延太

小池 礼子 藤 森 聡 古泉 友丈

山下 剛史 渡 辺 誠 大塚 耕司

加藤 貴史

釧路労災病院

草野 満夫

はじめに

肝移植あるいは生体肝移植は、終末期肝不全の最終治療手段として社会的コンセンサスを得ている。その一方、肝移植の普及に伴う移植希望・適応患者の拡大、それに伴う医療費の増大は医療経済全体をも脅かす問題であり、世界的ドナー不足の中で国際的に急増している肝移植は、すでに飽和状態ともいわれている。

したがって臓器移植に替わる新たな治療戦略を考察することは急務である。細胞あるいは組織移植療法はその代替手段として第一に挙げられる。細胞移植とくに肝細胞移植においては、20年以上前より理論的に実現可能とされながらも¹⁻⁸⁾、大量のドナー細胞獲得の問題から大きく臨床応用へ前進することがなかった。近年、医工学技術の著しい発展に伴い、先天性肝代謝性疾患の分野で増殖を基盤とした幹細胞などの利用や遺伝子操作を含めた細胞治療の臨床応用が期待されている^{9,10)}。しかしながら、長期保存・拒絶反応・癌化などのクリアすべき問題を抱えており、これらの問題を解決するまでにはさらなる研究期間が必要とされている。かかる点において、われわれは即時的な肝再生医療を実用化するための細胞ソースとして肝細胞高次機能を最大限に発現している成熟肝細胞の利用を推進している。これまでの成熟肝細胞移植の成績からその有用性は期待されているものの、大量のドナー細胞確保という問題点に対しては、現在移植不適合肝を利用する

ことで同法の欠点を補うことができ、その有用性が再認識されるはずである。本稿では肝臓疾患に対する再生医療として、幹細胞治療とわれわれが提唱している成熟肝細胞治療の現況と展望について最近の知見をふまえて概説する。

1. 幹細胞治療

1) ES細胞

ES細胞は1981年にEvansらにより、マウスの内部細胞塊から多能性の細胞株として始めて樹立された¹¹⁾。その後1998年にThomson JAらは、余剰胚を用いてヒトES細胞を樹立し、ヒトへの応用の可能性が示された¹²⁾。米国カリフォルニア州のGeron社は、マトリゲルを利用することでヒトES細胞のfeeder-free培養法を確立しており、DMSOやsodium butyrateを培養中に添加することで肝細胞への誘導に成功している。しかしES細胞は受精後6,7日目の胚盤胞から細胞を採取し、それを培養する事によって作製されるため、その使用については倫理的・宗教的問題がある。

2) iPS細胞

山中らが示したiPS細胞は、患者自身の体細胞から核の初期化を可能にした画期的な発見である¹³⁾。現在では、脳細胞などの「中枢神経系」、角膜、網膜色素上皮細胞、視細胞、血小板、赤血球、造血幹細胞、心筋、骨・軟骨、骨格筋、内胚葉系細胞など様々な細胞に分化させる技術が発達している。肝細胞への分化に関する研究としては、小林らのグルー

ブが、マウスのiPS細胞から肝細胞に含まれる「アルブミン」などのタンパク質をつくることに成功しており、iPS細胞を用いた肝再生が期待される場所である¹⁴⁾。また2011年12月には医薬基盤研究所とリプロセルが、iPS細胞から肝細胞の製品化に成功したと発表した。しかしながら臨床現場でのiPS細胞を用いた肝再生医療の実現には、少なくとも5年から10年かかるといわれており乗り越えるべき壁も多いのが現状である。

3) 骨髄細胞

Catherineらは成人ヒト骨髄細胞の中に肝細胞へ分化できる細胞集団が存在することを示した。また坂出らは、平成15年より国内最初の自己骨髄細胞を用いた肝臓再生医療法を開始し、現在までに肝硬変患者に対する肝機能維持の有用性を報告している^{15,16)}。骨髄細胞移植は、比較的採取が容易であり、自己の骨髄細胞を利用し移植するため、免疫拒絶反応を回避できる利点がある。

2. 成熟肝細胞治療

成熟肝細胞を患者の肝臓から採取し移植する方法とその有用性については、臨床の現場で既に数多く報告されている¹⁻⁸⁾。しかしながら、移植時には大量の細胞数が必要であり、さらに繰り返し移植を施行する場合には常時安定的な細胞数の確保が必要である。よって細胞移植においても臓器移植同様ドナー細胞の確保が最大の煩悶とも言われている。ドナー細胞の確保、確保した細胞を効率よく保存する方法を包括的に整備することが、成熟肝細胞治療を行う上で極めて重要な課題である。教室では1)臓器移植不適合な肝臓を新たなドナー肝細胞として有効利用を目指すとともに、供給されている肝細胞の生存率を高め、2)至適な肝細胞凍結保存方法を標準化し、3)移植後の細胞生着高率を高めることに取り組むことで臨床応用に即した成熟肝細胞治療が展開できると考えている。

1) 肝組織冷保存と細胞凍結保存方法の確立

(1) 新たな肝組織冷保存方法の提唱

臓器移植、細胞移植において、獲得した臓器を移植までの時間に、組織/細胞を良好な状態で保存することは、臓器・細胞移植後の生着率/機能維持に関わる重要な課題であると考えられる。教室では、豚島細胞移植で汎用されているPerfluorochemical (2

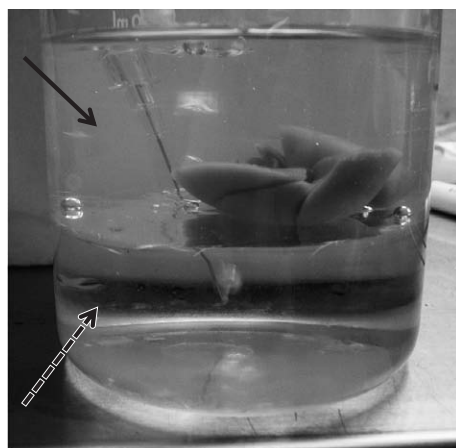


Fig. 1 2層法を用いたラット肝組織冷保存法：
矢印：Perfluorochemical, 点線矢印：
UW液

層法)に着目し^{17,18)}、肝冷保存においても同システムを導入することにより、肝機能の維持、細胞移植への影響を検討した (Fig. 1)。24時間にもわたる肝冷保存においても、2層法群は対照群であるUniversity of Wisconsin solution (UW solution)と比較し、細胞生存率は有意に高値を示しており、さらに移植においてもその有用性が確認された。このことから肝組織冷保存においては、十分な酸素の存在がcold ischemicによって障害された組織・細胞に対する障害を軽減することが示された¹⁹⁾ (Fig. 2)。

(2) 移植不適合肝の細胞移植への応用

また現在臓器移植不適合とされ棄却されている中高度脂肪肝に着目し、それらが細胞移植に利用可能か検証した。高度脂肪肝ラットモデルとしてZucker ratをそのwild typeとしてLean ratを用いた。高度脂肪肝から分離した肝細胞は、正常肝の肝細胞同様、肝細胞機能を有しており、脾臓内移植実験においても脂肪肝細胞は脾臓内にて生着し、正常肝細胞移植同様肝特異的機能であるアルブミンを良好に分泌していることを確認している (Fig. 3)。この研究より、臓器移植不適合とされる脂肪肝であっても、細胞移植においては、利用可能であること示しており、新たなドナー細胞ソースのcandidateとなることが考えられた²⁰⁾。

臓器移植の分野でもドナー肝の拡充に向け心停止後肝 (NHBD) が注目されているが、心停止後に採取されたグラフト肝には温虚血による障害が負荷さ

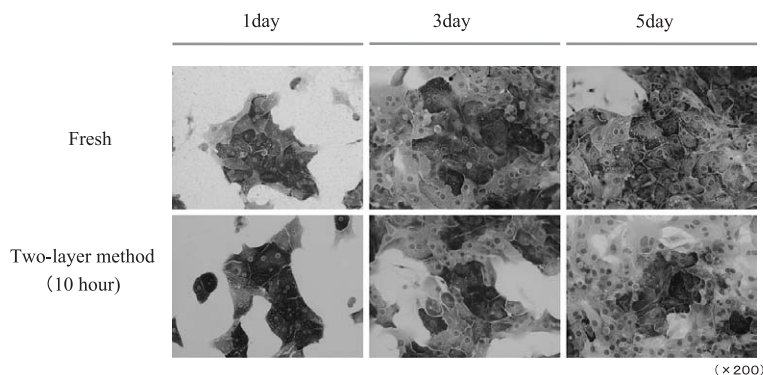


Fig. 2 初代培養肝細胞（上段）と2層法にて肝冷保存（10 Hr）後培養肝細胞（下段）のPAS染色2層法にて肝冷保存（10 Hr）後も培養肝細胞は初代培養肝細胞同様良好な細胞形態とグリコーゲン貯蔵能を有していることが示唆される。

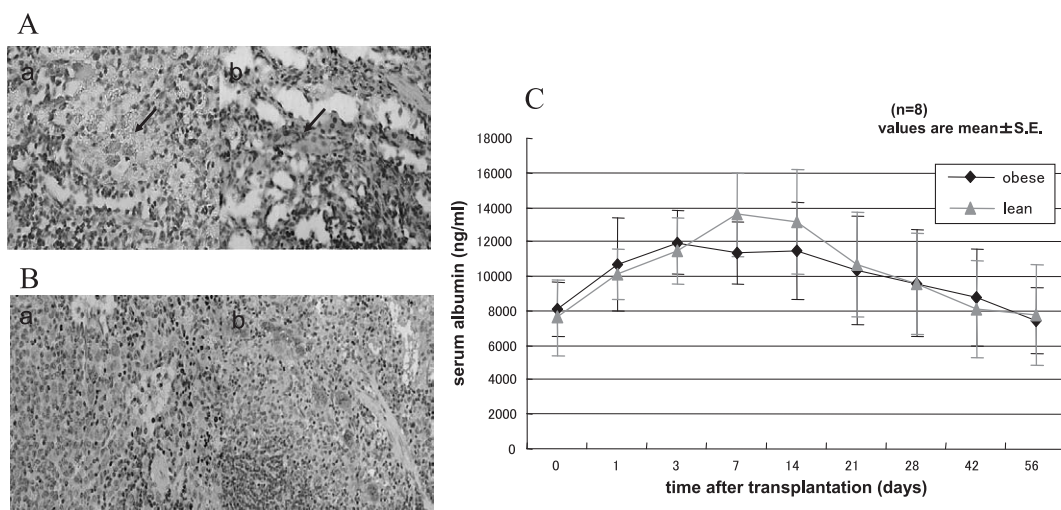


Fig. 3
 A : Sudan III 染色 : a. Zucker ラット群, b : Lean ラット群
 B : Albumin 染色 : a. Zucker ラット群, b : Lean ラット群 Zucker ラット群は Lean ラット群と同様にラット脾臓内で生着し, 肝機能発現を認める.

れ, さらに引き続き冷保存, 再灌流という過程を経て, グraft肝の viability は著しく低下することが知られている. よってこれまで臨床において心臓死肝移植が行われているがその成績は満足すべきものではなく, 移植不適合とされることが多い. われわれはドナー成熟肝細胞の供給源として移植不適合とされる NHBD に注目している. しかし前述したようにドナー肝を確保しても良好な細胞を分離するまでの過程で過酷な条件を克服しなければならず, 従来の臓器保存方法を凌駕する保存技術が要求され

る. NHBD が細胞ドナーソースとして利用可能か検証するためラット心停止モデルを作成し検討した. 心停止直後, NHBD-0 (A 群), 15 分後 NHBD-15 (B 群), 30 分後 NHBD-30 (C 群) に肝を摘出し, それぞれの群に対し速やかに肝細胞分離を施行した (Cont) 群と, 2 層法あるいは UW 液を用いて摘出肝の冷保存を 3 時間, 12 時間施行した群に分類した. A 群, B 群, C 群の viability は時間経過とともに低下したが, 2 層法は, UW 液に比較し, 冷保存 3, 12 時間後も有意に viability が良好であった. ATP

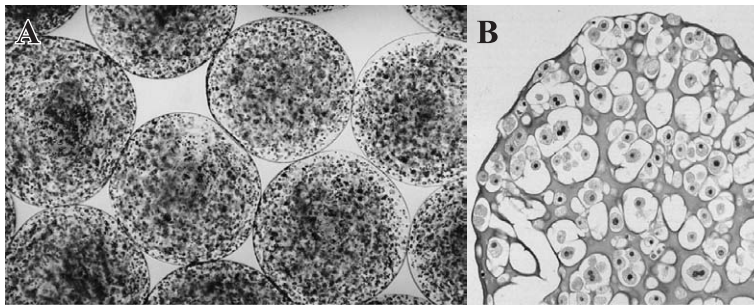


Fig. 4

A : Alginate/poly-L/lisine を用いたマイクロカプセル化肝細胞
 B : マイクロカプセル化肝細胞 : H-E staining

活性, アルブミン合成能においても2層法はUW群に比較し有意に高いレベルを維持していた. さらに脾臓内移植実験においても2層法群は, 移植後28日間にわたり血清アルブミン値はUW群に比較し有意に高値を示した. このことから2層法をNHBDの冷保存に導入することで, 肝細胞機能を良好に維持し, 細胞移植へ応用することが可能であることが確認された.

2) 新規細胞凍結保存方法の確立

(1) Alginate/poly-L/lisine を用いたマイクロカプセル化肝細胞

一般的な細胞凍結保存法は, 細胞外凍結による細胞障害を回避するために特別な凍結防御剤を用い, さらに Programming freezer を用い細胞内脱水をすすめる目的で緩やかに冷却することが望ましいとされている. われわれは高価な機器が不必要で簡便かつ迅速に大量の細胞を凍結できる方法を考案した. 免疫隔離膜として使用されている Alginate/poly-L/lisine を材料としてマイクロカプセル化細胞を作製する (Fig. 4). カプセル化肝細胞を10% DMSO と10% FBS の保存液で混和した後, 液体窒素内で急速冷凍しても, カプセル内肝細胞は氷晶形成から回避され, 良好な細胞形態と機能を有することが確認できた²¹⁾. 液体窒素内で長期凍結・保存後もカプセル内の肝細胞は極めて良好に生存し, かつ肝特異的機能である薬物代謝機能発現などを維持することを確認した²²⁾. さらに急性肝不全モデルにおいて, マイクロカプセル化肝細胞を脾臓内へ移植することにより, 障害肝の肝機能を補助し, 生存率の改善および障害肝の再生を促進することも確認しており, マイクロカプセル化肝細胞脾臓内移植の有

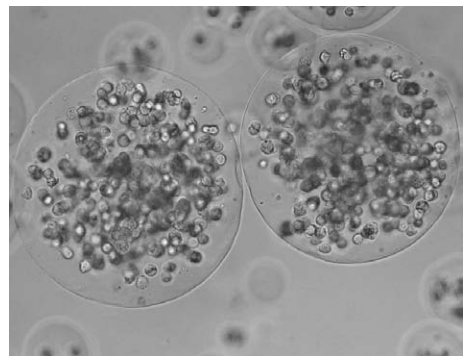


Fig. 5 温度感性ゲルを用いたマイクロカプセル化肝細胞: 温度感性ゲルを用いることにより凍結保存後脱ゲル化細胞を得ることが可能となる.

用性も明らかにしている^{23, 24)}.

(2) 温度感性高分子を用いた細胞凍結保存方法
 マイクロカプセル化肝細胞がラット脾臓内でその細胞高次機能を発揮することを確認しているが, 移植時にカプセルの破壊やカプセルの存在が臨床応用の弊害になる可能性が危惧され, 凍結時はカプセル化し移植時には脱カプセル化にて細胞移植ができるシステムを考案した.

MebiolGel TM (池田理化) は完全化学合成のポリマーで, 温度感性高分子と親水性高分子との共重合体で転移温度以下で流動性のゾル, 転移温度以上でゲル状という特異な物性を示す. よって転移温度以上のゲル状態で, 肝細胞を凍結保存し, 解凍後は転移温度以下のゾル状態で脱ゲル化肝細胞とする. マイクロカプセル化はゾル状態の Mebiol gel で混和し, 37℃でゲル状態とし air jet system で,

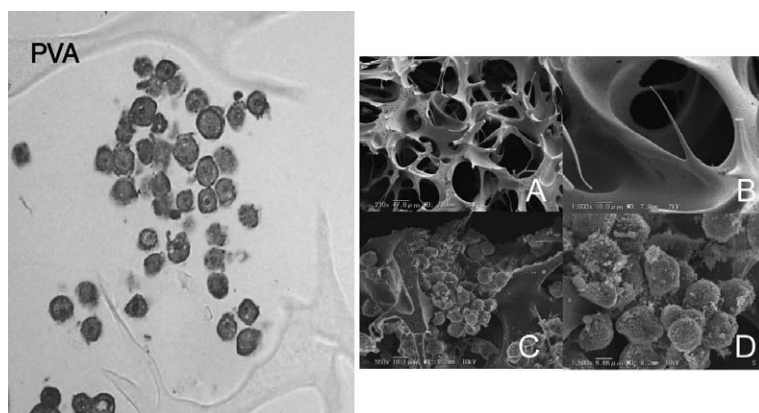


Fig. 6 ラジアルフロー型のバイオリアクターにて培養した肝細胞
 右：H-E 染色：PVA 膜に attach した肝細胞を観察できる。
 左：電子顕微鏡写真：肝細胞はPVA 膜の小孔に cluster を形成している。

肝細胞をゲル化する (Fig. 5)。ゲル化肝細胞は、10% FBS および 10% DMSO を含む DMEM の凍結保存液に浸し、直ちに液体窒素内にて急速凍結保存する。

(3) ゲル化肝細胞凍結保存後の脱ゲル化誘導

MebiolGel は、4℃にてゾル状態となるため、37℃の温槽にて凍結保存したゲル化肝細胞を急速解凍する。ゲル化肝細胞は急速解凍時、ゾル状態となる。(MebiolGel は、4℃にてゾル状態となるため)ゾル状態の肝細胞を遠心分離後、脱ゲル化肝細胞とする。

(4) 細胞移植への応用

本システムの細胞移植の有用性を検証するため、ラット脾臓内に凍結保存後脱ゲル化肝細胞移植を施行した。脱ゲル化肝細胞はラット脾臓内で良好に生存し、肝細胞機能を発現しており、温度感応性高分子を用いた細胞凍結保存技術が細胞移植に応用可能であることが示唆された。

(5) 究極の生物学的人工肝臓の創成を目指して

劇症肝炎あるいは急性肝不全に対する治療として、持続的血液濾過法や血漿交換療法を凌駕する治療法は出現していない。肝細胞には数千といわれる機能が存在しているといわれ、より適切な肝機能補助を行うには生物学的人工肝臓の登場が望まれている。教室では、ラジアルフロー型のバイオリアクターを用い、PVA membrane を細胞支持体として、3次元肝細胞培養実験を行ってきた。同システムを用いることにより、肝細胞は支持体内に cluster

を形成し、肝細胞機能を良好に維持していることを確認した (Fig. 6)。臨床応用における肝機能補助には scale up が重要であり、多くの改良点が残されているが、近未来における至適な肝機能補助として、推進していかなければいけない領域と考える。

おわりに

再生医療は、国民の大きな期待がかけられている医療である。現時点では、治療困難な領域も再生医療の力で予想もできない革新的な技術により完治し得る夢の学問、医療であり、多くの再生医療を待ち望んでいる患者に希望の光を与えたと思われる。深刻なドナー不足により飽和状態となっている今日、再生医療への期待がますます高まっており臨床への展開が急務とされているが、一方安全性と確実性が担保された医療を着実に構築することが最優先すべき事項であることを忘れてはならない。

文 献

- 1) Mito M, Kusano M and Kawaura Y: Hepatocyte transplanatation in man. *Transplant Proc* 24 : 3052-3053, 1992.
- 2) Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, *et al*: Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 58 : 951-952, 1994.
- 3) Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, *et al*: Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6 : 335-341, 1994.

- 4) Sokal EM, Smets F, Bourgois A, *et al*: Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* **76** : 735-738, 2003.
- 5) Fisher RA and Strom SC: Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* **82** : 441-449, 2006.
- 6) 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.
- 7) Muraca M: Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Dig Liver Dis* **43** : 180-187, 2011.
- 8) Hughes RD, Mitry RR and Dhawan A: Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* **93** : 342-347, 2012.
- 9) Woo DH, Kim SK, Lim HJ, *et al*: Direct and indirect contribution of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells to liver repair in mice. *Gastroenterology* **142** : 602-611, 2012.
- 10) Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, *et al*: Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478** : 391-394, 2011.
- 11) Evans MJ and Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** : 154-156, 1981.
- 12) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al*: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998.
- 13) Takahashi K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006.
- 14) Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, *et al*: Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplant* **19** : 841-847, 2010.
- 15) Terai S and Sakaida I: Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **18** : 23-25, 2011.
- 16) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, *et al*: Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* **40** : 1304-1311, 2004.
- 17) Goto T, Tanioka Y, Sakai T, *et al*: Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation* **83** : 754-758, 2007.
- 18) Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T *et al*: Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia using additional preservation by the two-layer (UW Solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* **74** : 1687-1691, 2002.
- 19) Odaira M, Aoki T, Miyamoto Y, *et al*: Cold preservation of the liver with oxygenation by a two-layer method. *J Surg Res* **152** : 209-217, 2009.
- 20) Hayashi K, Aoki T, Jin Z, *et al*: Hepatocyte transplantation from steatotic liver in a rat model. *J Surg Res* **142** : 104-112, 2007.
- 21) Kusano T, Aoki T, Yasuda D, *et al*: Microencapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury. *Hepatol Res* **38** : 593-600, 2008.
- 22) Koizumi T, Aoki T, Kobayashi Y, *et al*: Long-term maintenance of the drug transport activity in cryopreservation of microencapsulated rat hepatocytes. *Cell Transplant* **16** : 67-73, 2007.
- 23) Aoki T, Jin Z, Nishino N, *et al*: Intrasplenic transplantation of encapsulated hepatocytes decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *Transplantation* **79** : 783-790, 2005.
- 24) Aoki T, Umehara Y, Ferrareso C, *et al*: Intrasplenic transplantation of encapsulated cells: a novel approach to cell therapy. *Cell Transplant* **11** : 553-561, 2002.