

肝硬変に対する再生療法の現状と展望

～ 世界との比較～



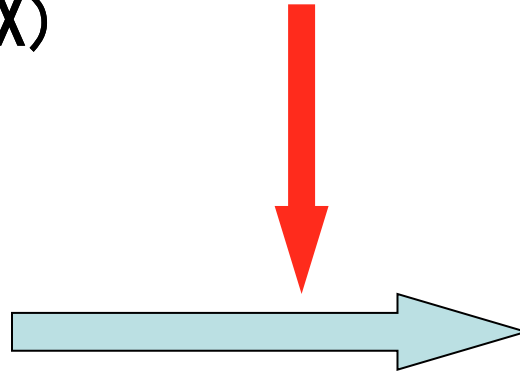
山口大学大学院医学系研究科
消化器病態内科学(第一内科)
坂井田 功



骨髓細胞の肝細胞への分化

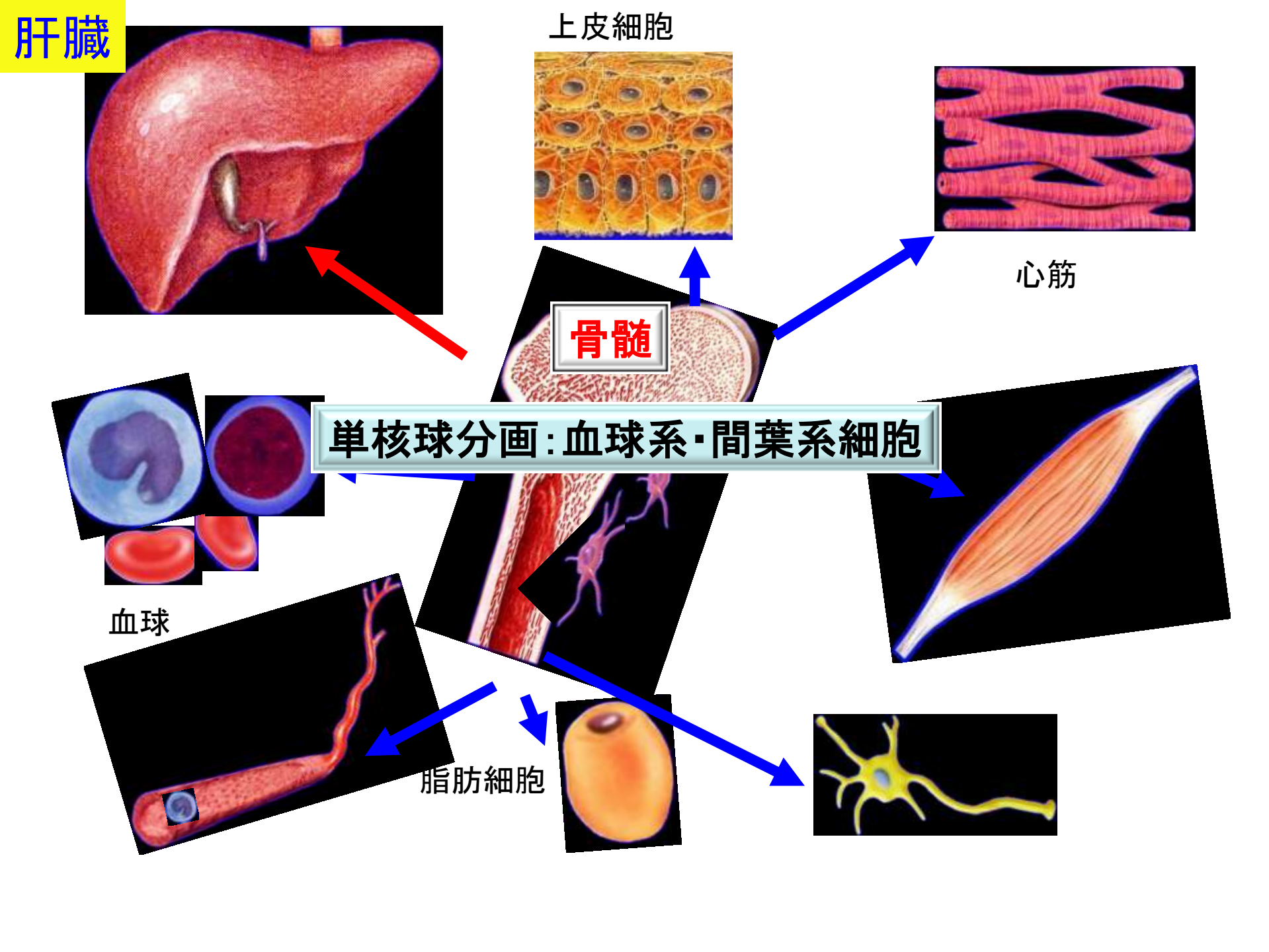
男性患者 (XY) のドナーからの骨髓移植

白血病患者 (女性、XX)



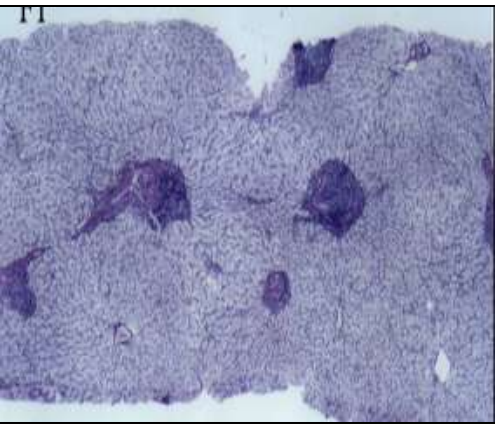
Y染色体陽性の肝細胞

Theise ND et al. Hepatology 32, 11-6, 2000



自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法

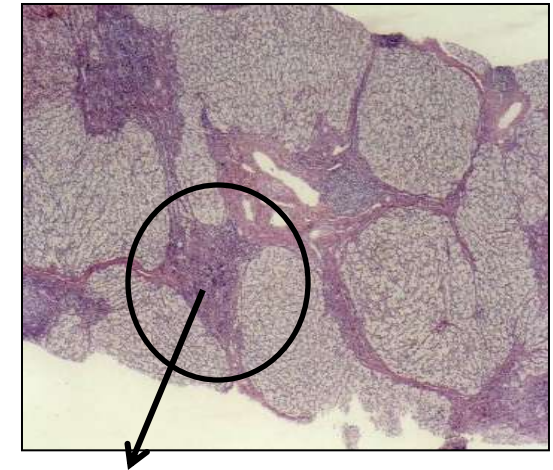
正常



慢性肝炎



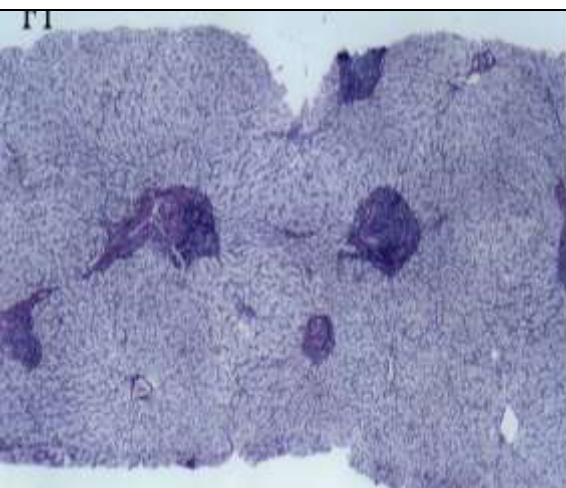
肝硬変症



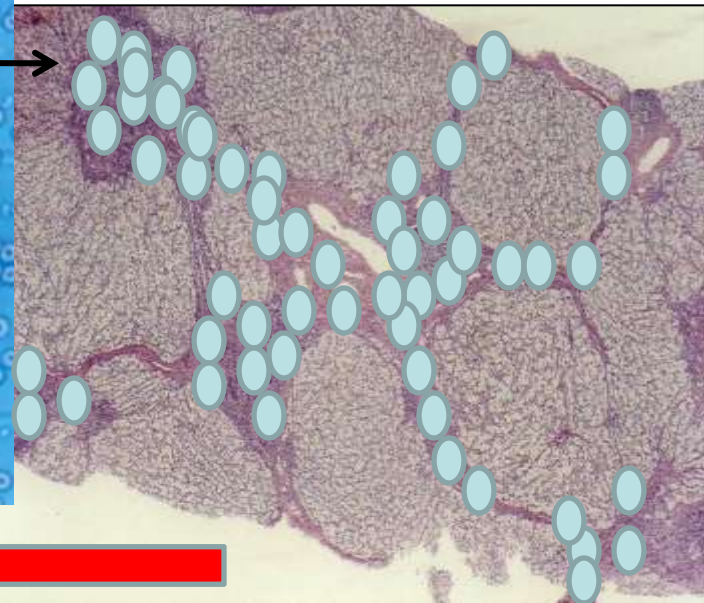
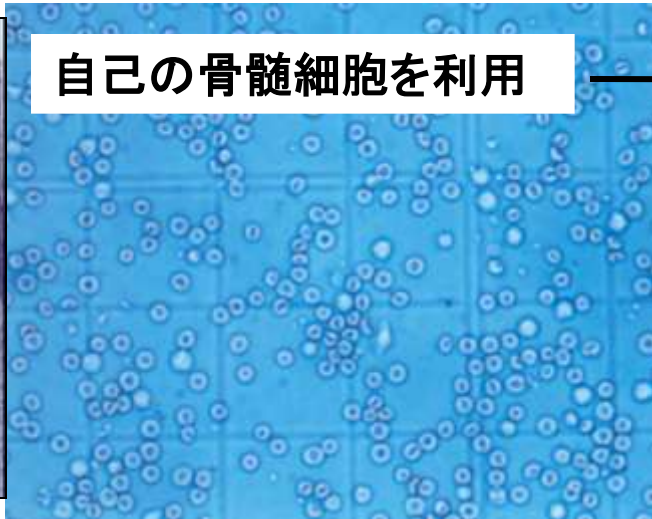
肝線維＝肝臓を硬くする

肝臓が硬く変わる＝肝硬変

肝臓再生 (肝臓を若返らせる)



自己の骨髄細胞を利用



基礎研究

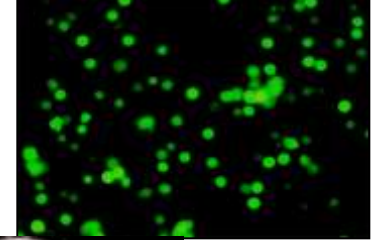
GFP/CCl₄ model)



C57/BL6/EGFP

Mice (35–40g)
1x 10⁵ GFP-positive whole BMCs
(非培養)

単核球分画
血球系・間葉系細胞



No radiation

尾静脈投与

C57/BL6
(same strain)



CCl₄ treated



Normal

Normal

1

2

3

4

w

CCl₄ treated mice

GFP 陽性骨髓細胞投与

1

2

3

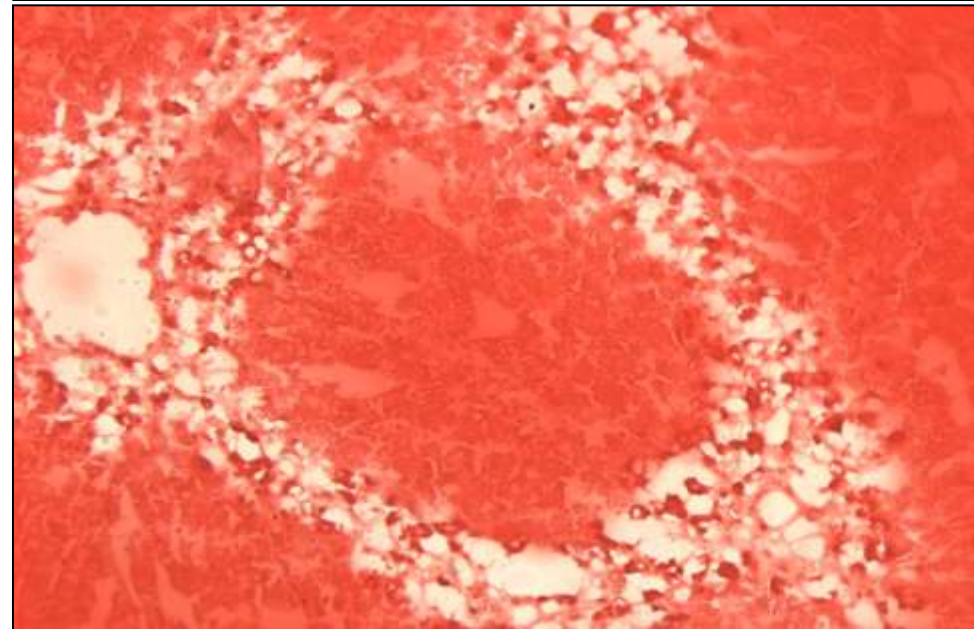
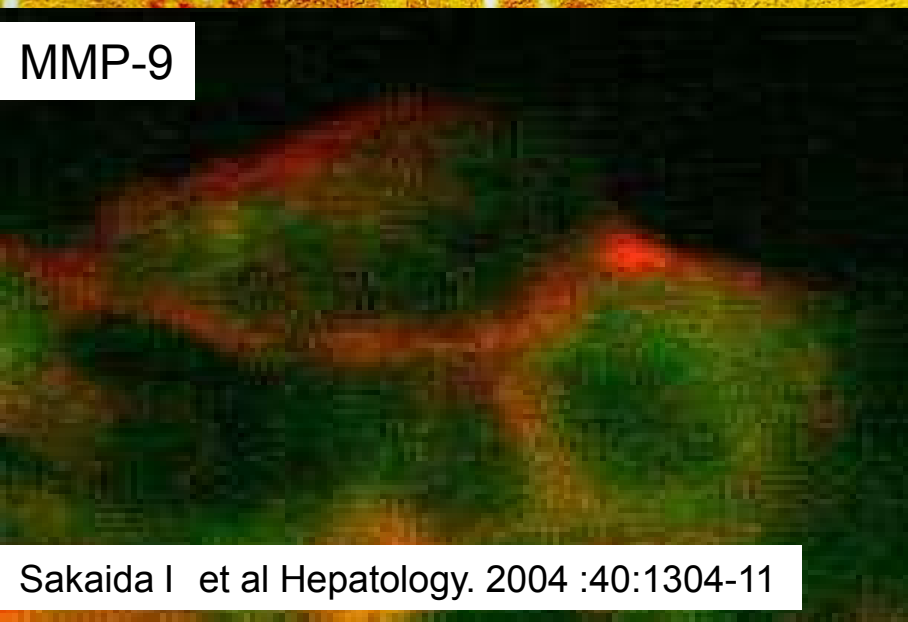
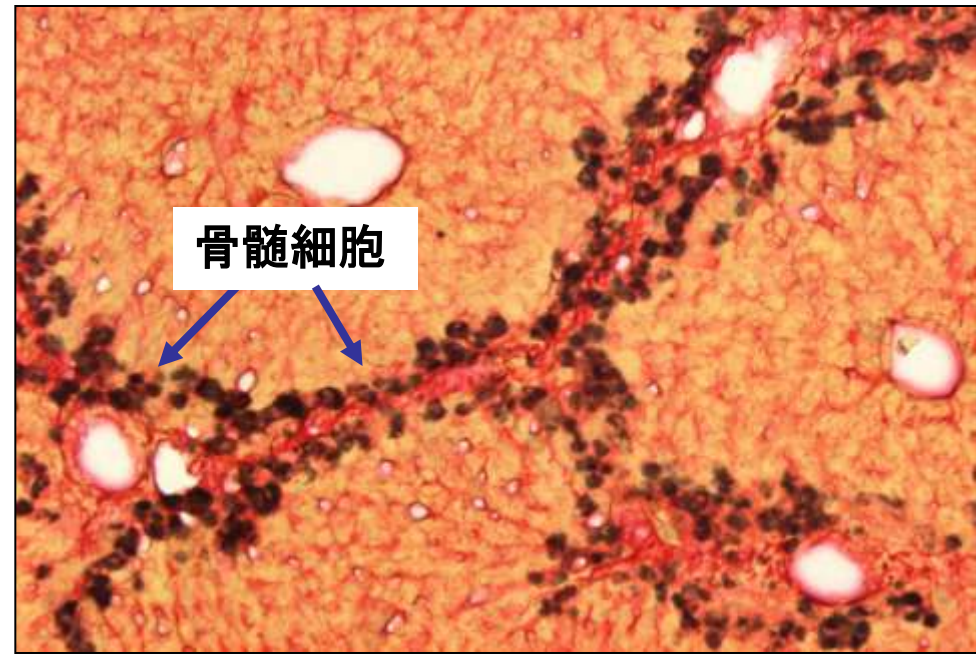
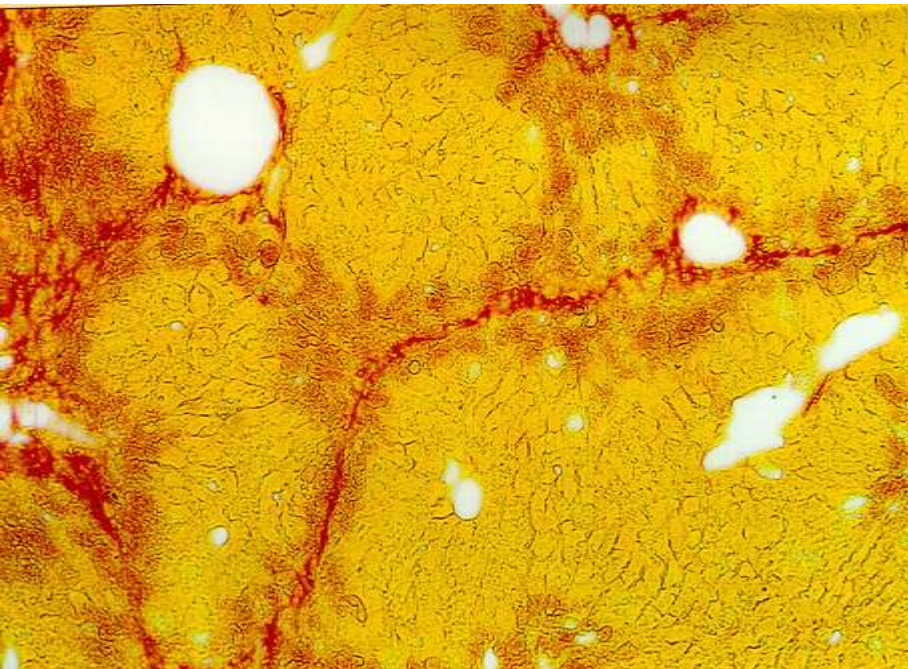
4

w

CCl₄ for 4 weeks

持続炎症

骨髓細胞は線維部に集積



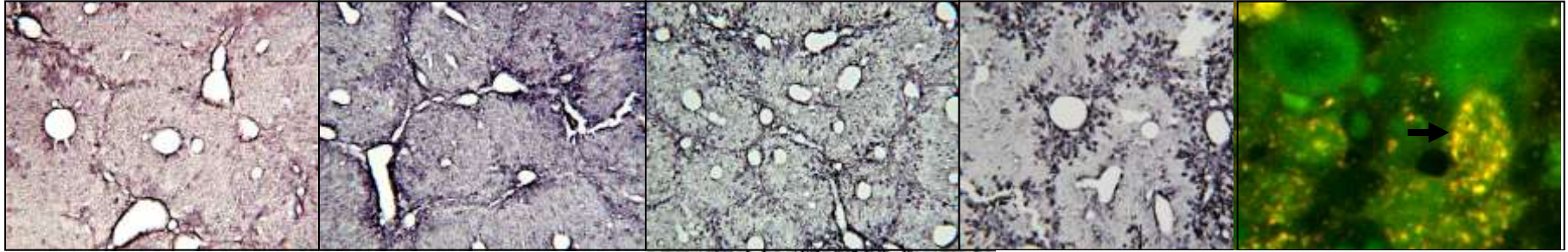
アルブミン産生骨髄細胞

1 week

2 weeks

3 weeks

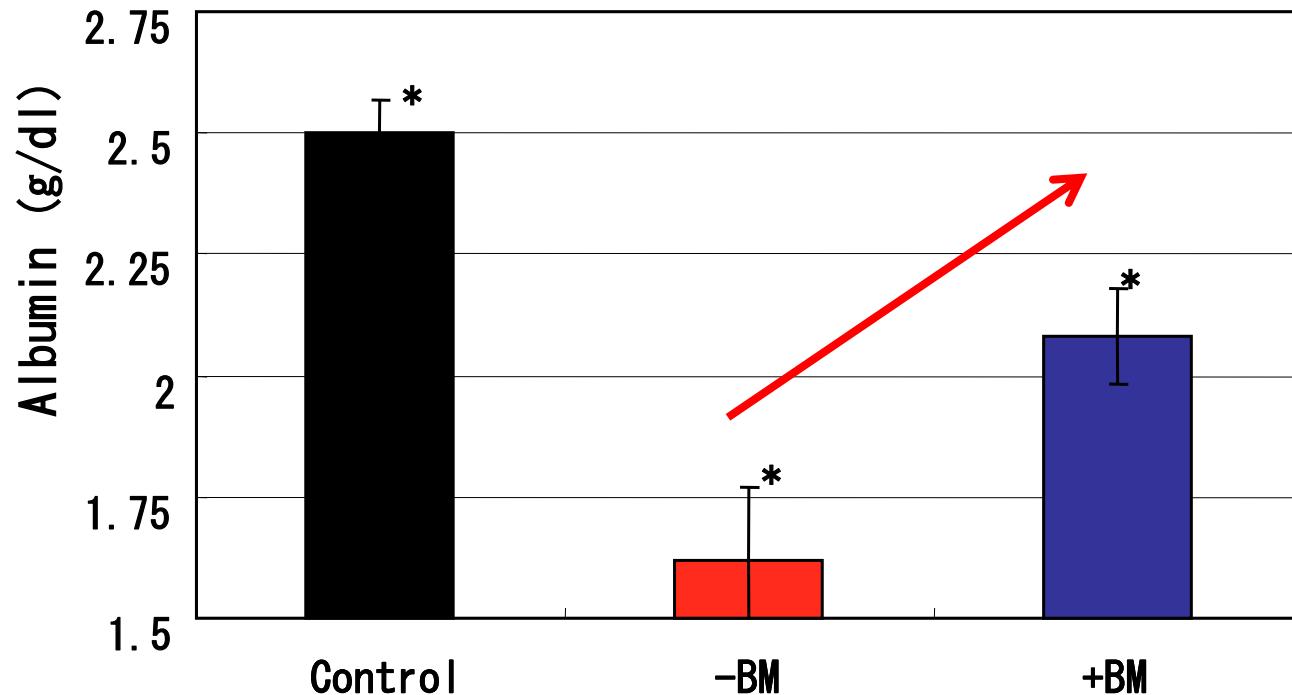
4 weeks



Co-expression with GFP

Serum albumin level

(4 weeks after BMC infusion)

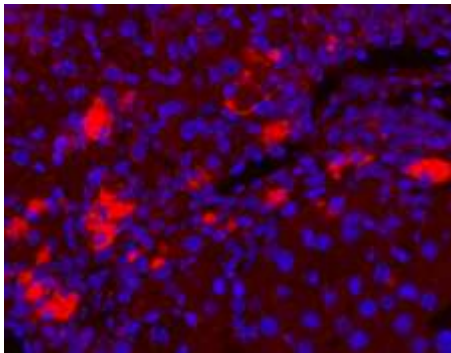


* showed significant difference

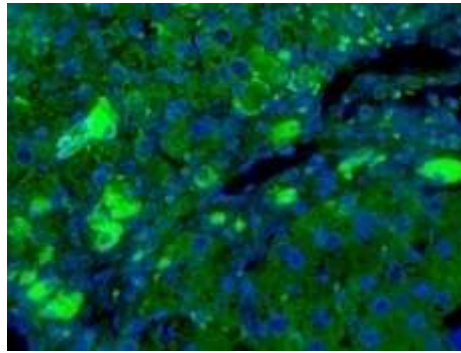
肝臓に定着したGFP陽性骨髄細胞

マクロファージ

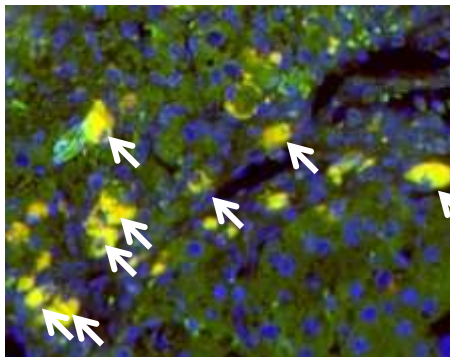
F4/80



GFP

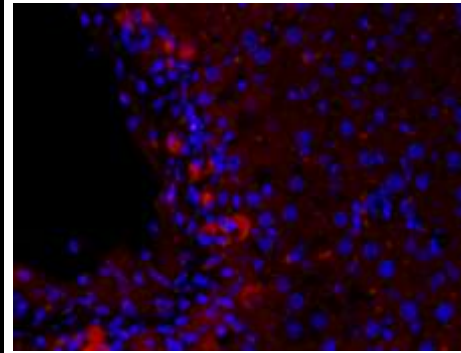


F4/80&GFP

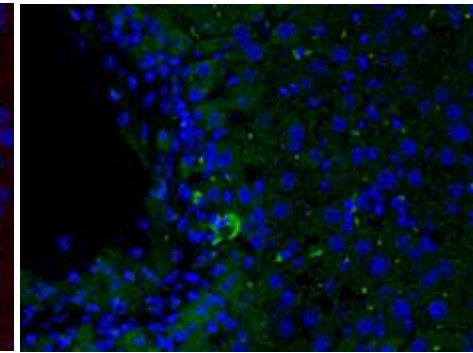


間葉系細胞

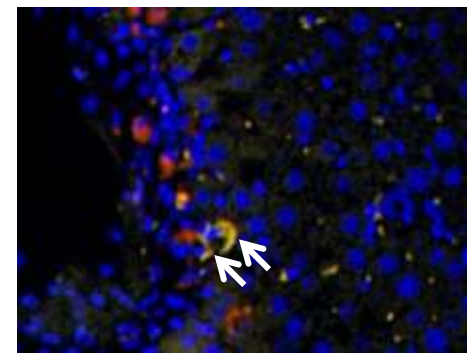
Vimentin



GFP

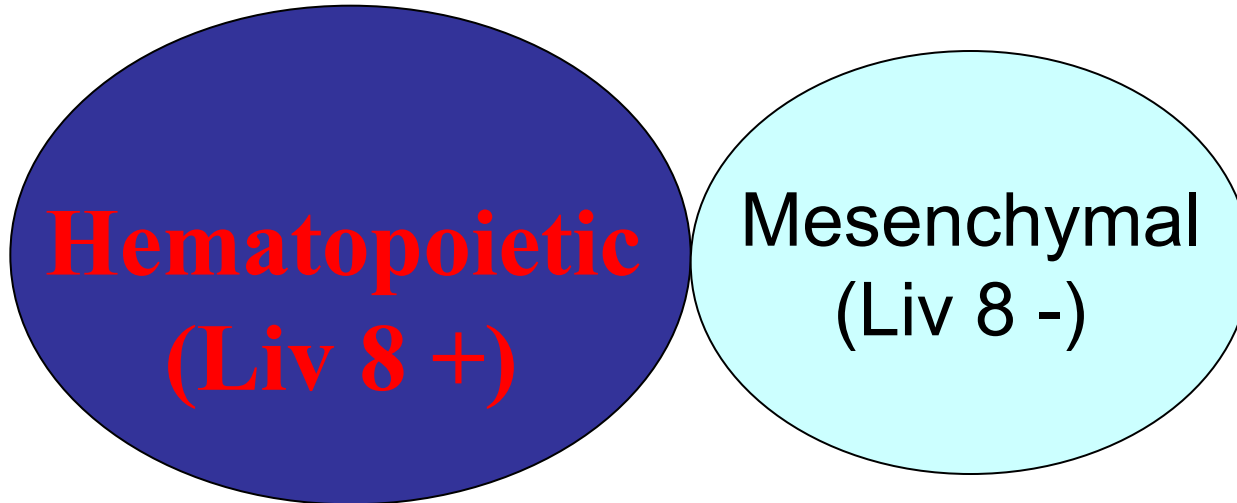


Vimentin&GFP



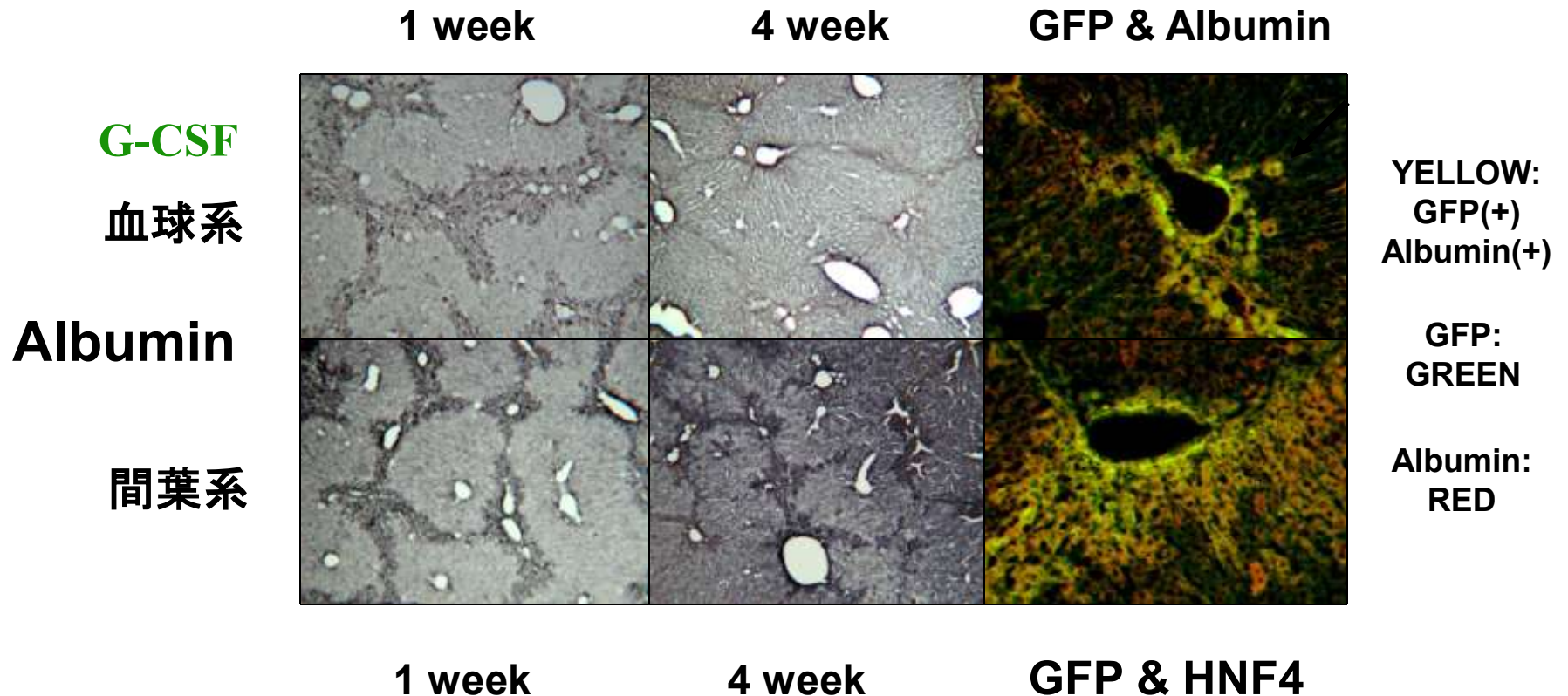
有効な細胞分画

血球系 or 間葉系細胞？



Liv 8 antibody detects hematopoietic cell in bone marrow

アルブミン発現

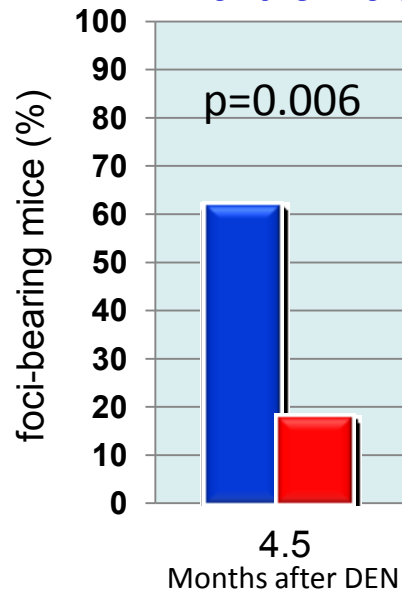


granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)投与は、Liv8(+)骨髓細胞投与と類似した結果を示した。
肝機能改善効果が弱く、持続期間が短い。

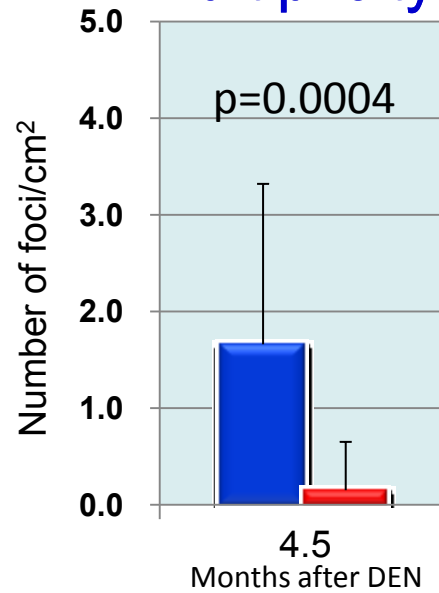
骨髓細胞投与はDEN誘発肝発癌を抑制する

Incidence

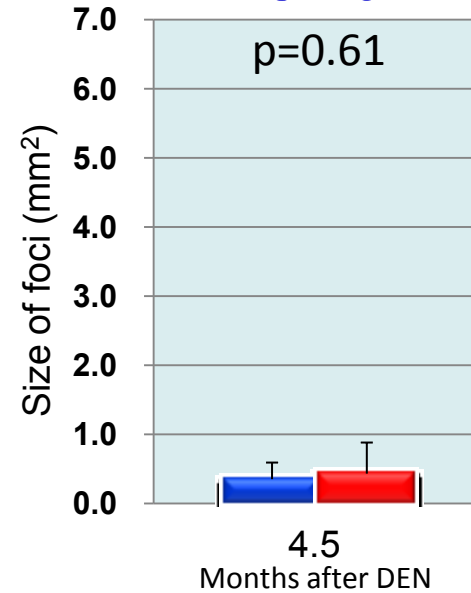
foci



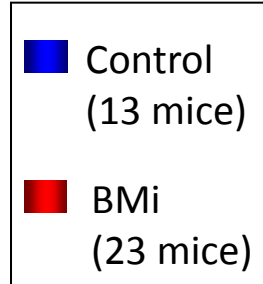
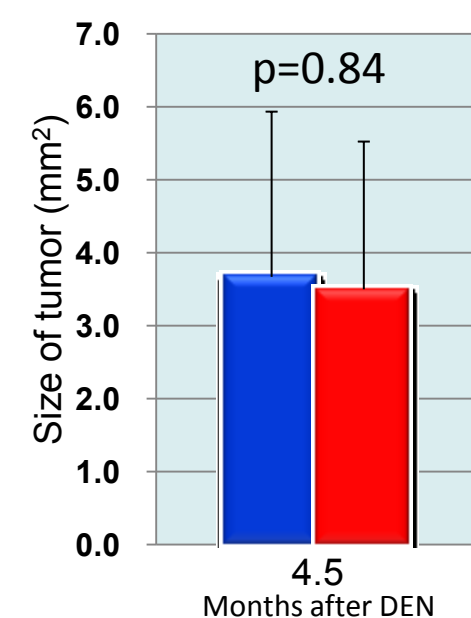
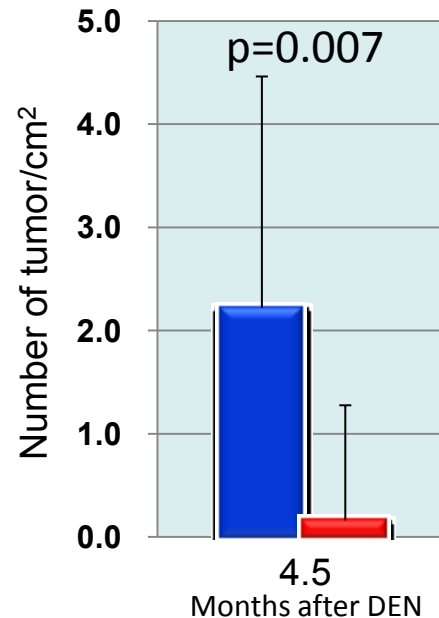
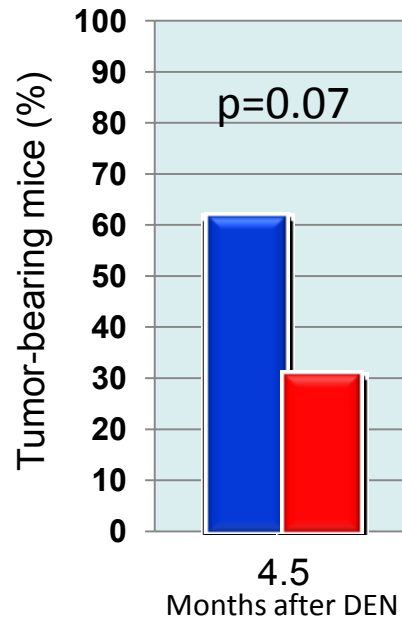
Multiplicity



Size



Tumor



Autologous bone mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes

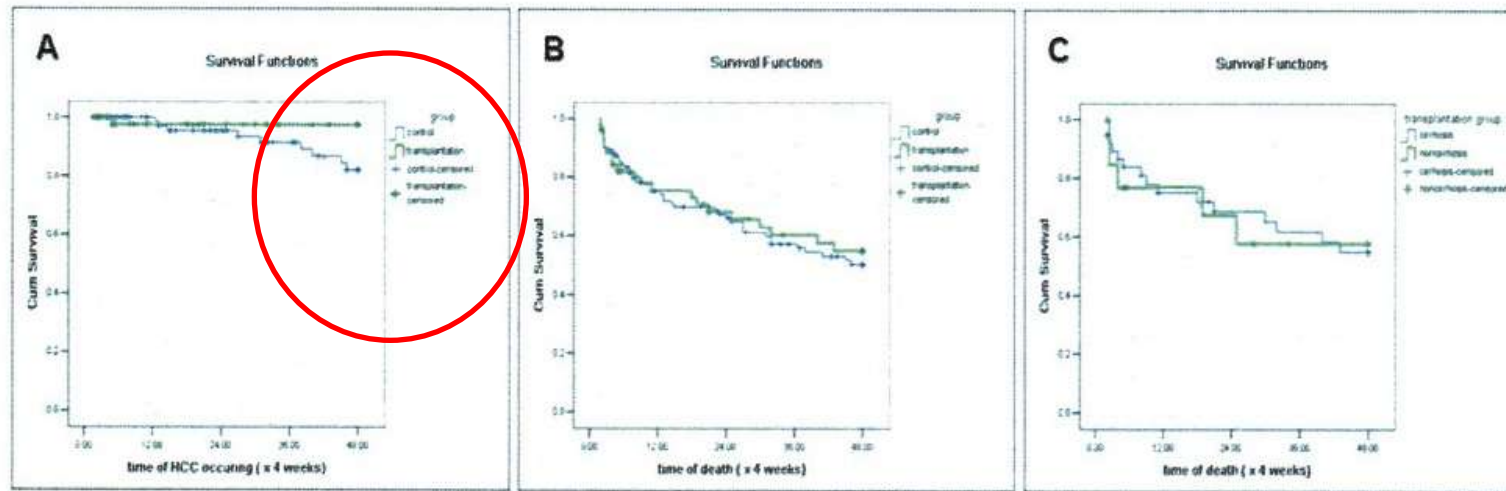


Fig 4: Long-term prognosis.

A: Only 1 case in group A developed HCC at 5 months after transplantation and 9 cases in group B developed HCC through 12 months in the follow up ($P = 0.107$).

Houlihan DD, Hopkins LJ, Suresh SX, Armstrong MJ, Newsome PN.
Hepatology. 2011;54:1891-2;

基礎研究(小括)

- 末梢より投与した骨髓細胞は持続肝障害のある線維肝(肝硬変)に浸潤定着した。
- 間葉系とマクロファージ系細胞を認めた。
- コラーゲンを溶解する作用を認めた。
- 作用の主体は間葉系細胞であった。
- 肝機能改善と生存率改善が認められた。

臨床研究

ABMi:Autologous Bone Marrow Cells Infusion 自己骨髄細胞投与療法の対象

肝硬変症 患者

総ビリルビン値<3.0 mg/dl, 血小板>5万,

肝細胞癌がない(CT, MRI.)

心肺機能良好

(全身麻酔可能)

自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法) の実際

1.5h

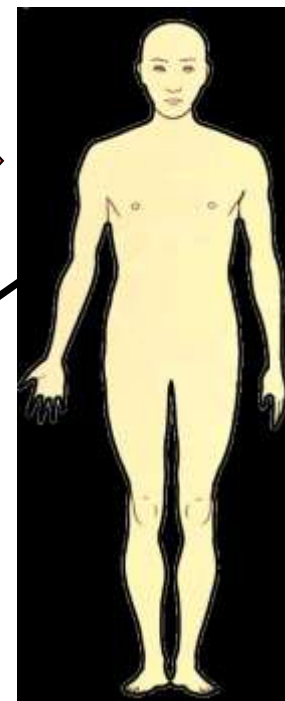
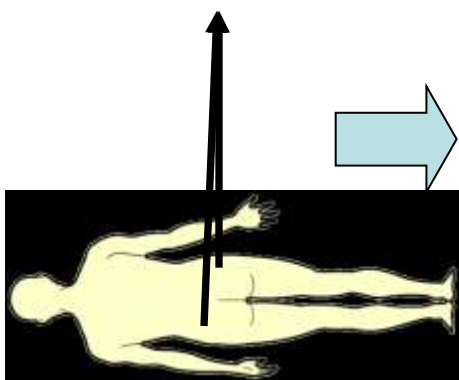
2.0h

1.5h

自己骨髄
細胞の採取

再生細胞療法センター
(細胞の洗浄・収集)

細胞の安全性評価後に
末梢血管より投与



非代償性肝硬変

末梢静脈より点滴

骨髄単核球 10^9 個

骨髓細胞採取(400ml)

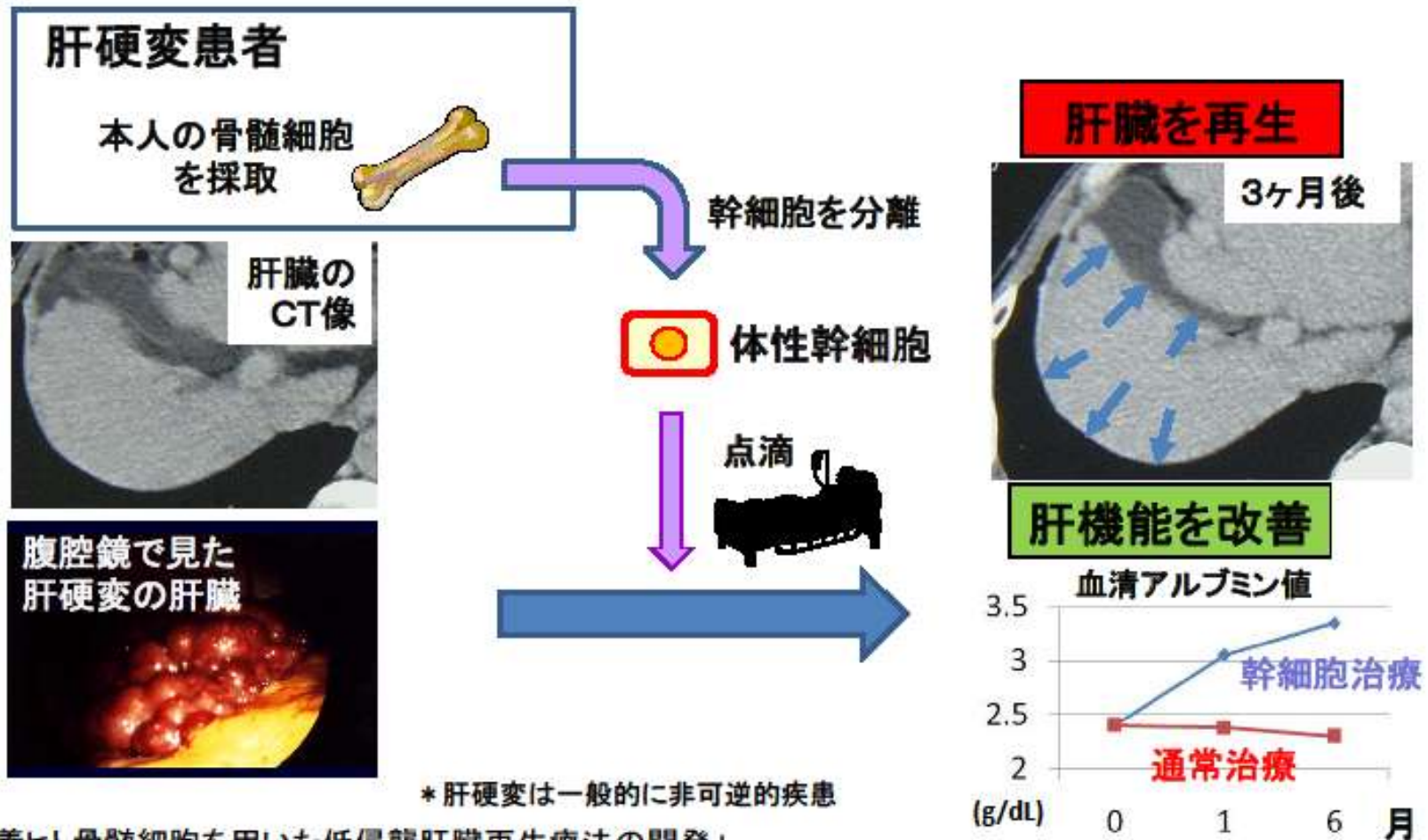
肝再生骨髓細胞画分 特願2005-286546



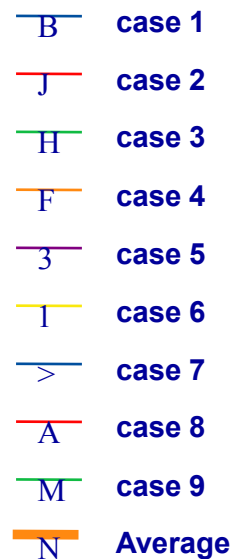
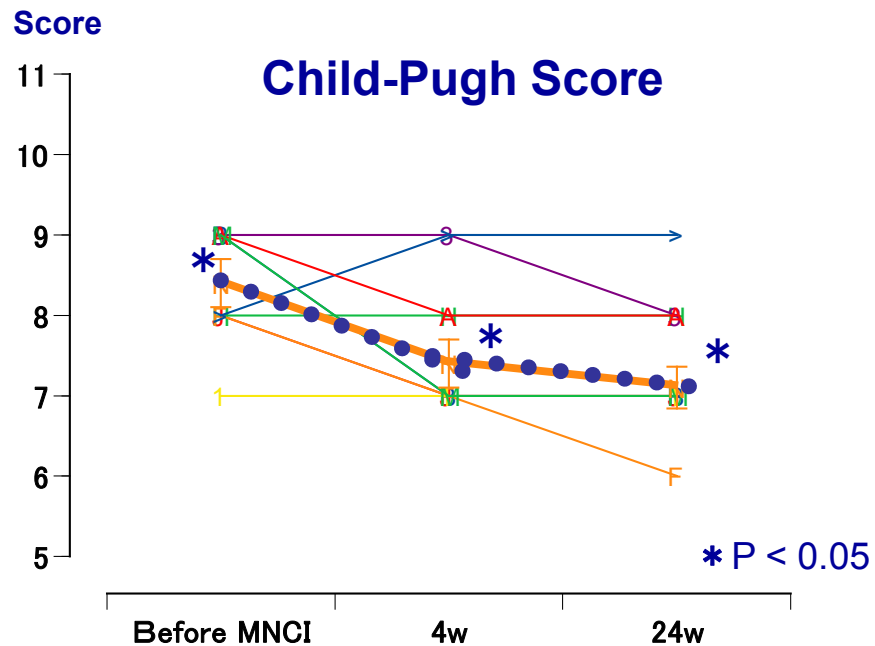
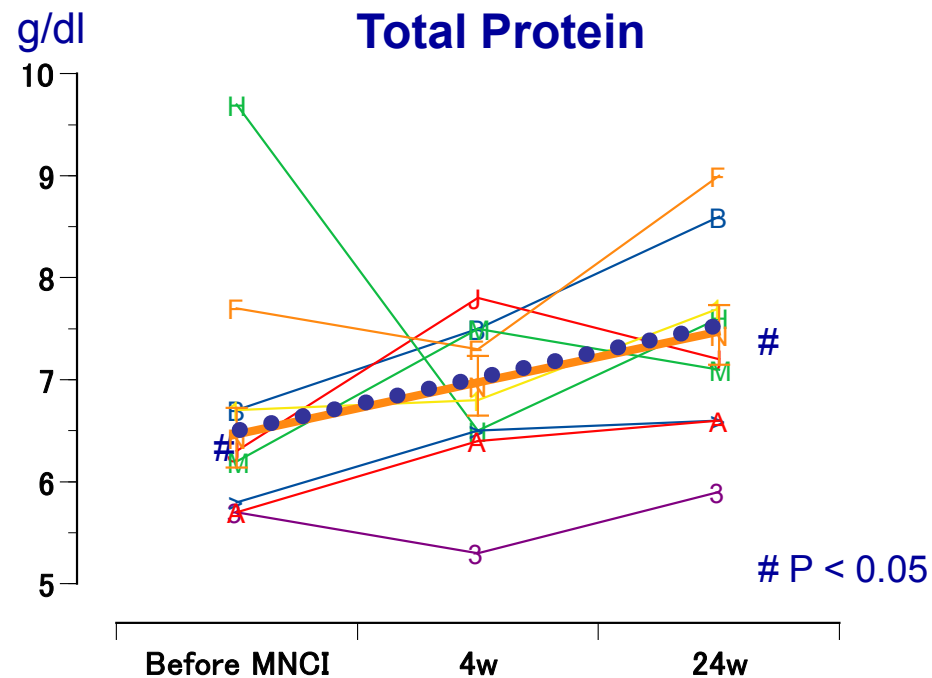
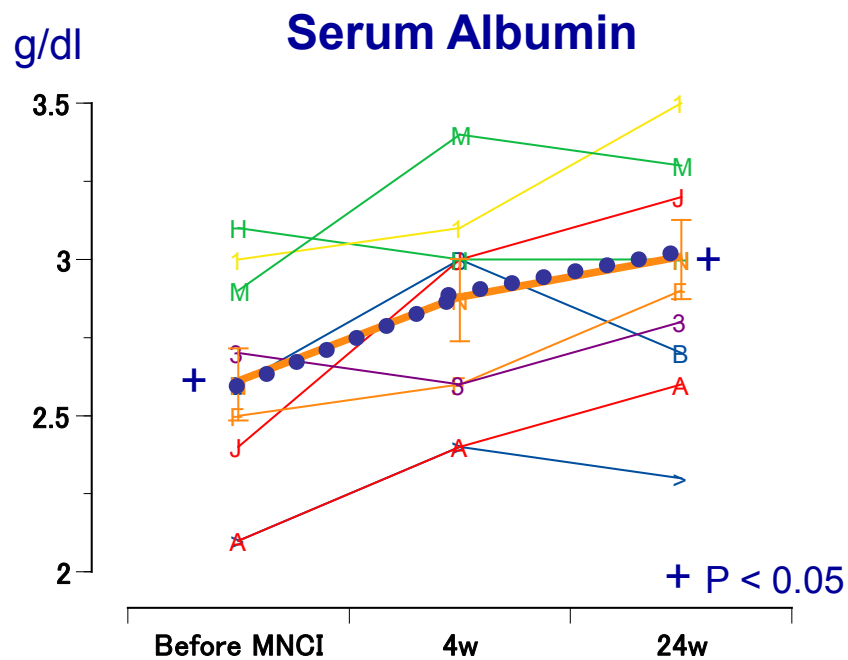
第101回総合科学技術会議

再生医療の臨床応用の実例

アクションプラン対象施策(文部科学省)



「培養ヒト骨髓細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発」
(国立大学法人 山口大学 坂井田 功)



Stem Cells. 2006;24:2292-8.

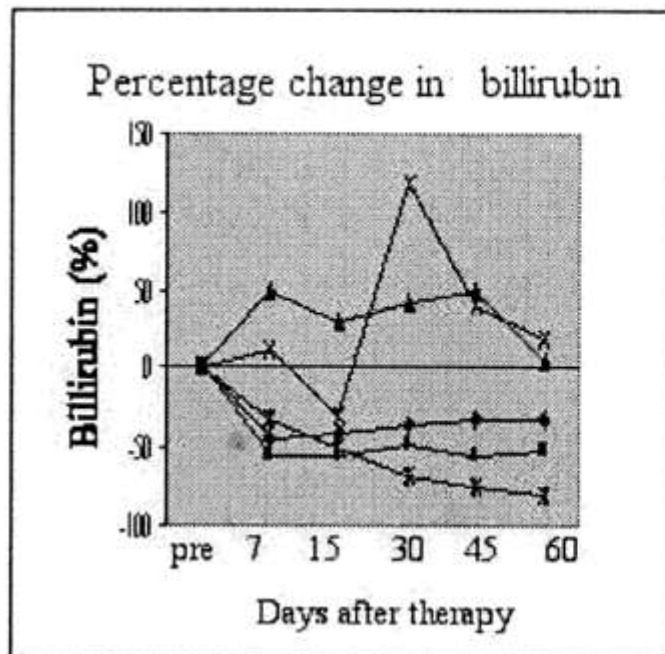
G-CSG投与しある分画を採取

Human data (LC)

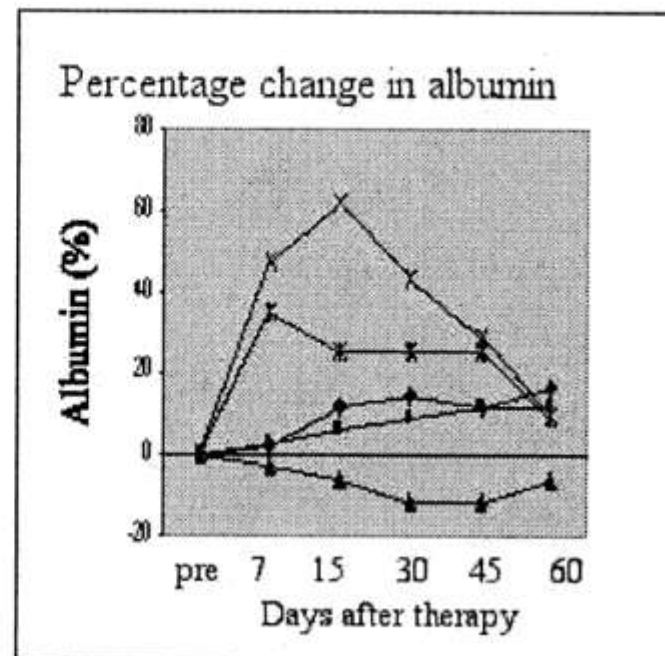
Gordon MY et al. Characterization and clinical application of human CD34⁺ stem/progenitor cell populations mobilised into the blood by G-CSF
Stem cell 2006 23:1066-5099

- 1 肝硬変患者5症例(B型1例、C型2例、アルコール1例、PSC1例)を対象
- 2 G-CSFを5日連続投与し、末梢白血球よりCD34⁺分画を採取し
経門脈的あるいは経肝動脈的に患者自身に全量投与する
($10^6 - 2 \times 10^8$ cells)
- 3 1週間後、外来とし60日間経過観察 (Child -Pugh記載なし)

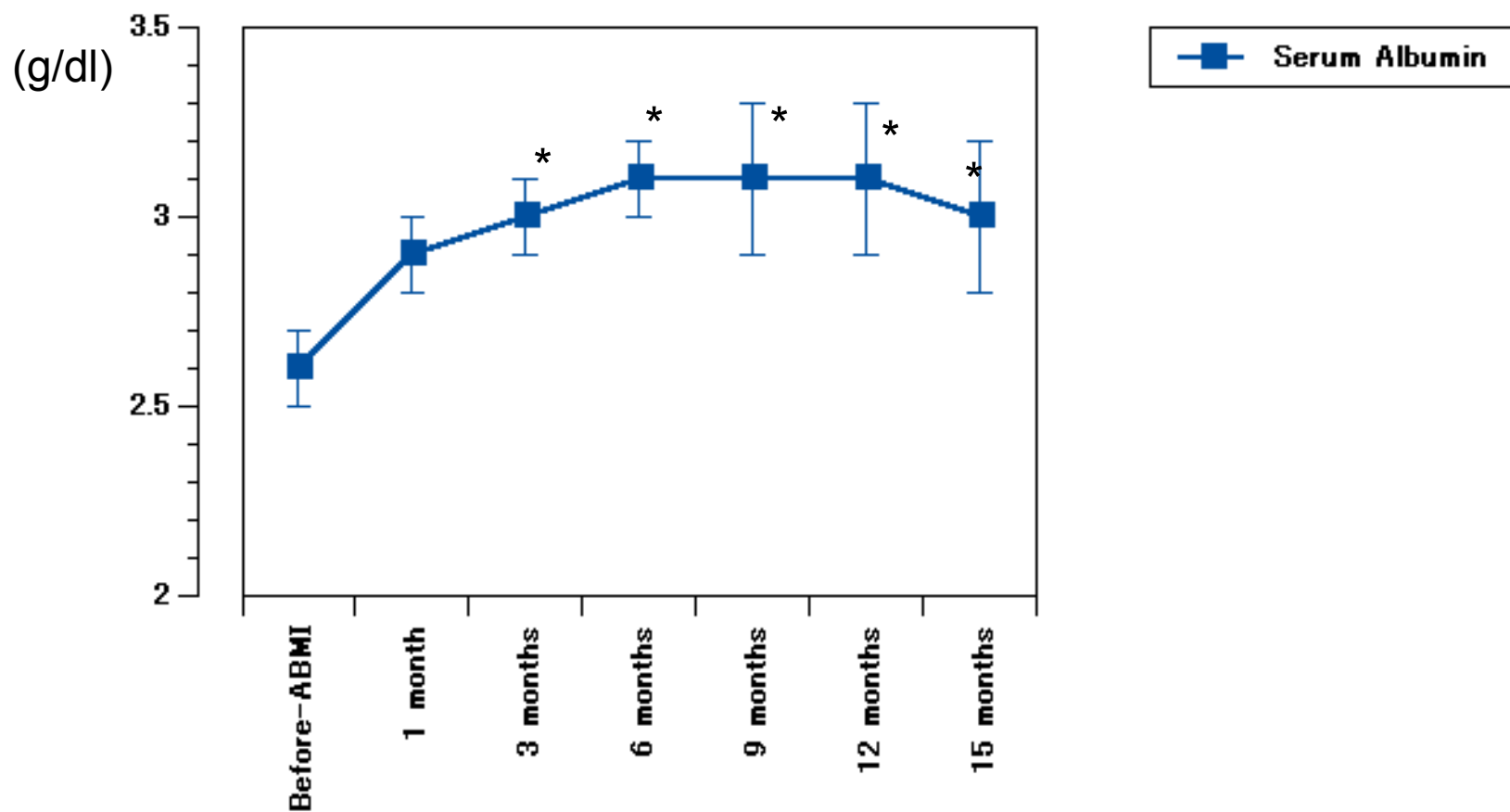
F



G



長期観察 9例
(Age: 61.2, HBV3, HCV6, Male: Female=8:1)
up to 15ヶ月後 ABMI therapy.



*showed significantly different compared with pre-ABMI therapy

多施設共同臨床研究

YAMAGUCHI UNIVERSITY

Liver Regeneration with Cell Transplantation Study (LRCT study)



Yamaguchi University

Yamagata University

国立国際医療研究センター
HIV/HCV

YAMAGUCHI UNIVERSITY

沖縄（準備中）

非アルコール性脂肪肝炎からの肝硬変
（肥満者が多い！）



**（山形大学）
アルコール性肝硬変**

YAMAGUCHI UNIVERSITY

Yamaguchi-Yonsei Project
(1st ABMT therapy was done on November 28th, 2006)



YAMAGUCHI UNIVERSITY



**韓国延世大学
B型肝炎肝硬変**

自己骨髄細胞投与 (ABMi) 療法の実績

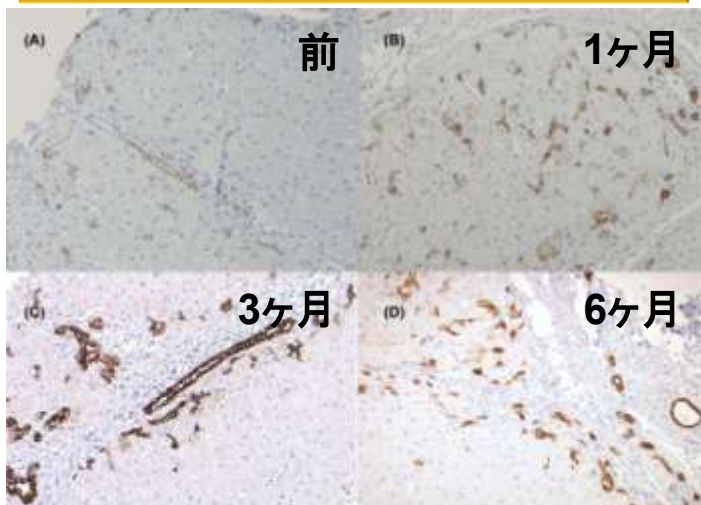
主要論文 (臨床)

1. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. Terai S, et al., **Stem Cells**.;24:2292-2298,2006
(**山口大学:世界初のABMi療法の臨床報告**)
2. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. Kim JK, et al., **Cell Transplant**.;19:1237-1246,2010(韓国延世大学・山口大学:B型肝炎硬変症に対するABMi療法の臨床研究)
3. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. Saito T, et al., **Stem Cells Dev**.; 2011 May 11.(山形大学・山口大学:アルコール性肝硬変症に対するABMi療法)
○肝硬変を有する**HIV感染者**に対する自己骨髄細胞投与療法の安全性と有効性に関する研究 (国立国際医療研究センター・山口大学:H23年3月より2症例実施)

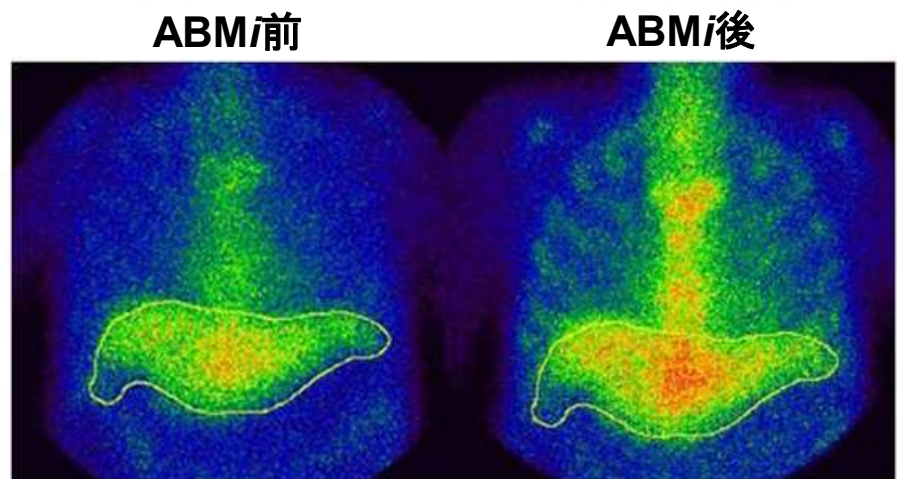
特許

「肝再生骨髄細胞画分」 特許第4752058号 (平成23年6月3日登録)

ヒト肝組織幹/前駆細胞活性化



Indium-111 シンチグラフィー: 骨髄・肝活性化



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

適応患者

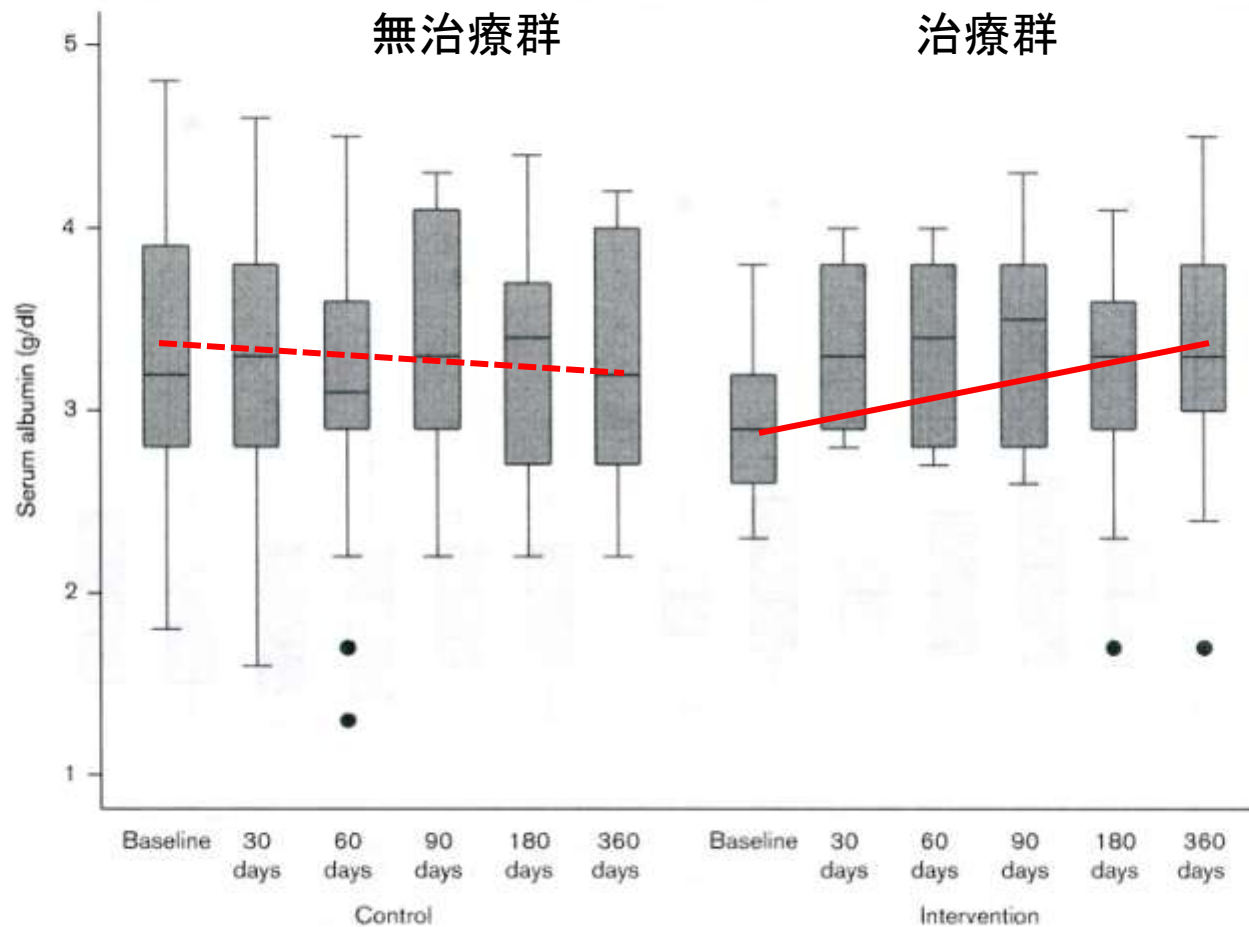
肝硬変患者(18-74才)
血小板>30000/mm³
INR<2.4 IU
クレアチニン<2.5 mg/dl

方法

腸骨より50ml骨髓液採取
Ficoll法で単核球 3×10^8 個採取
肝動脈より20mlにして注入

血清アルブミン値の変化

Fig. 3



Boxplot analysis of albumin levels and individual albumin levels from controls and patients subjected to bone marrow mononuclear cell therapy.

In vivo tracking of ^{111}In -oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis

Ali Gholamrezanezhad^{a,*}, Sahar Mirpour^a, Mohammad Bagheri^b, Mehdi Mohamadnejad^b,
Kamran Alimoghaddam^c, Leila Abdolazadeh^b, Mohsen Saghari^a, Reza Malekzadeh^b



20 min



2 Hr



6 Hr



48 Hr



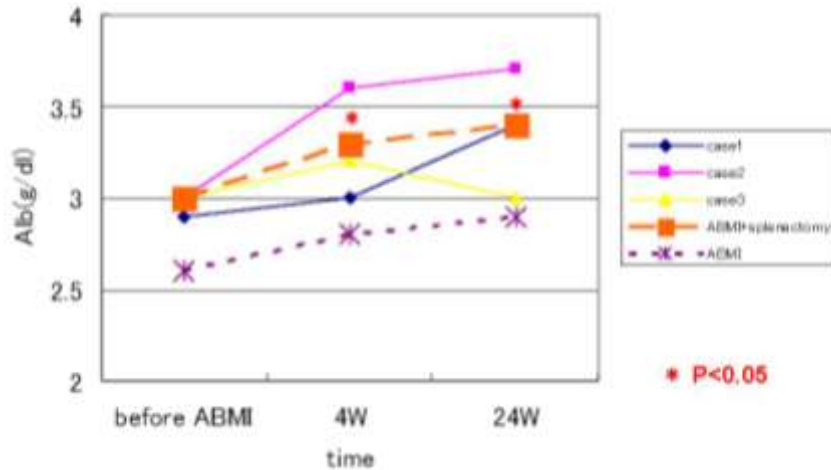
7th Day



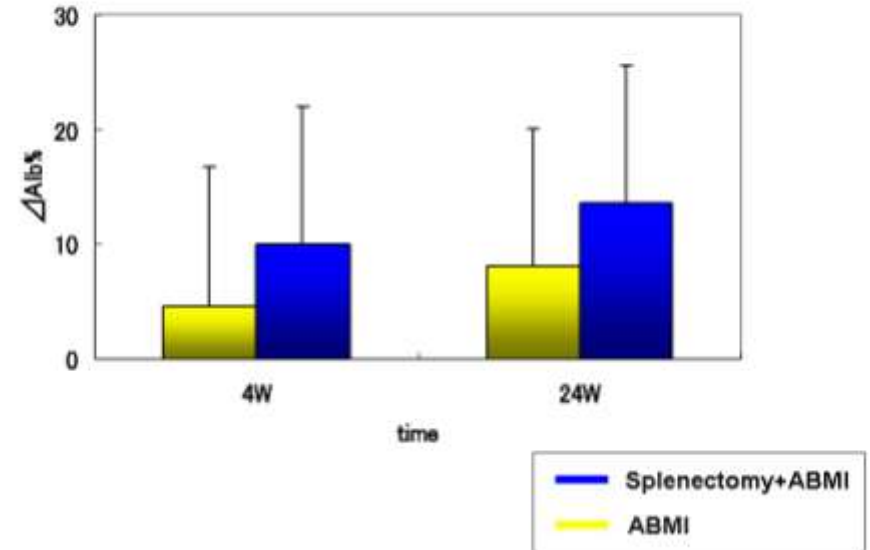
10th Day

Effect of splenectomy on liver function

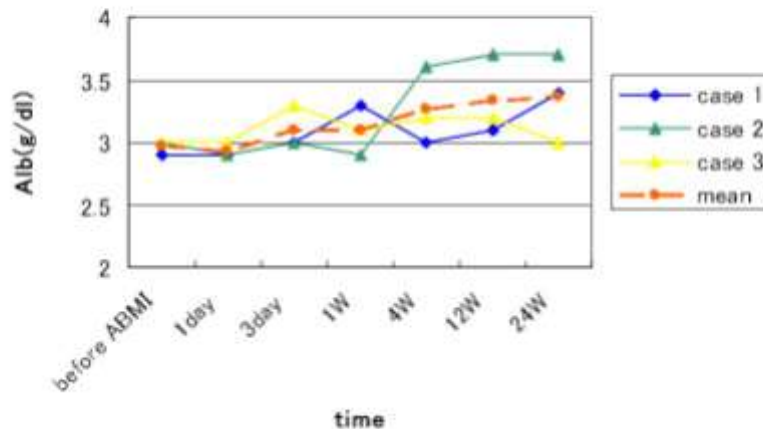
Serum albumin level



The rate of improvement of serum albumin level (Δ Alb%)



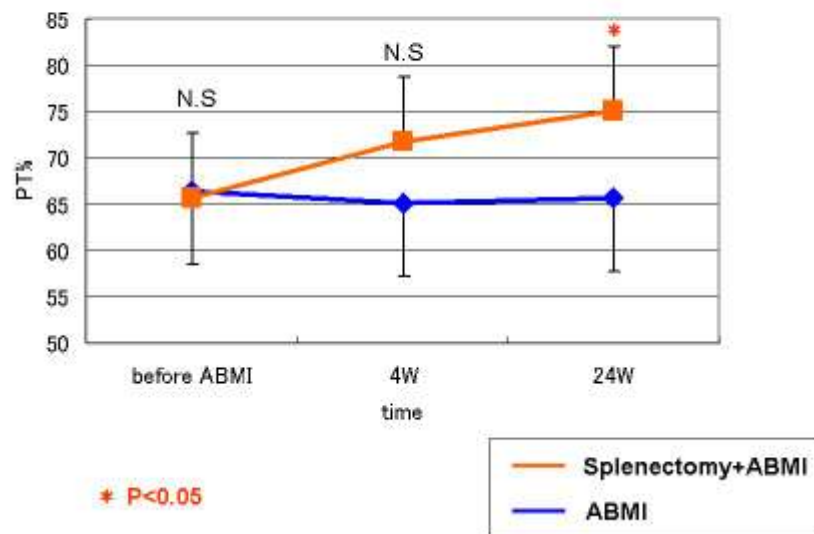
Clinical progress of Serum albumin level after ABMI therapy



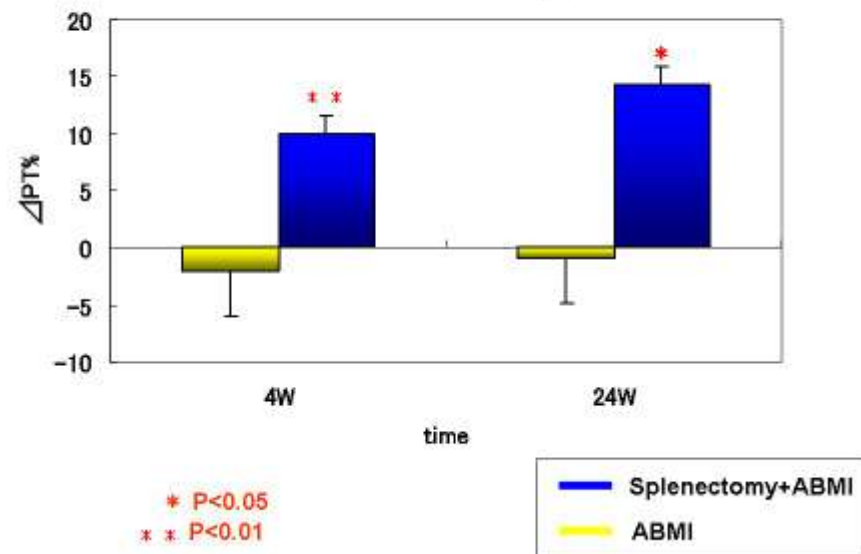
Splenectomy seems to enhance increase of serum albumin level

(Data in Yamaguchi University)

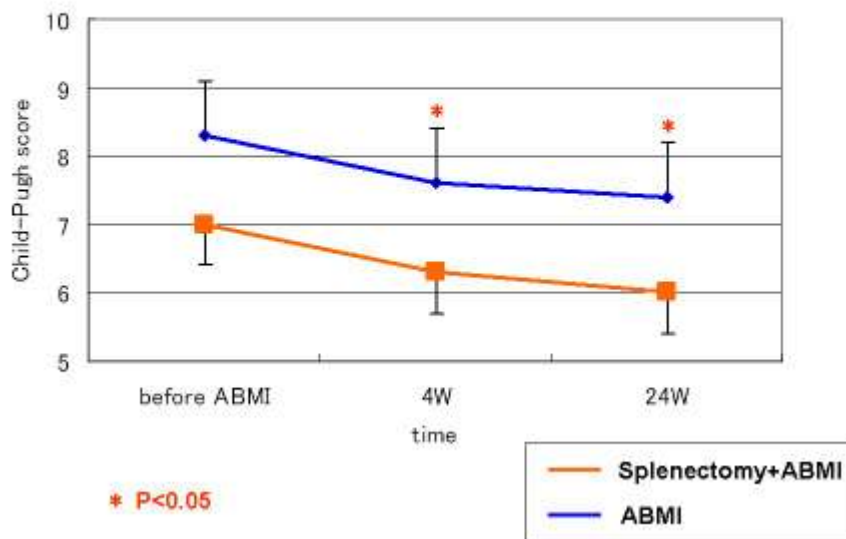
Prothrombin time(%)



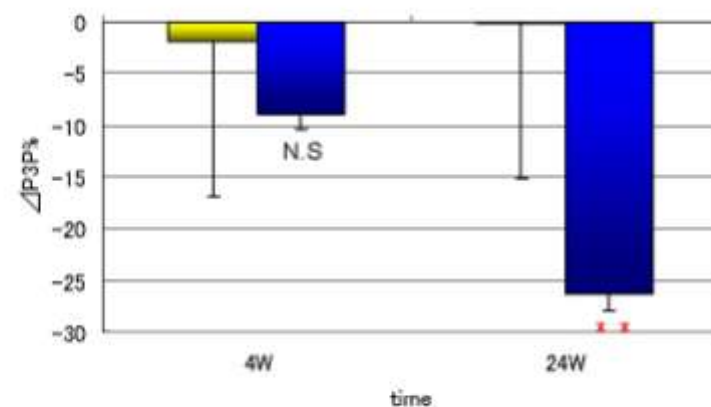
The rate of improvement in prothrombin time [Δ Prothrombin time(%)]



Child-Pugh score

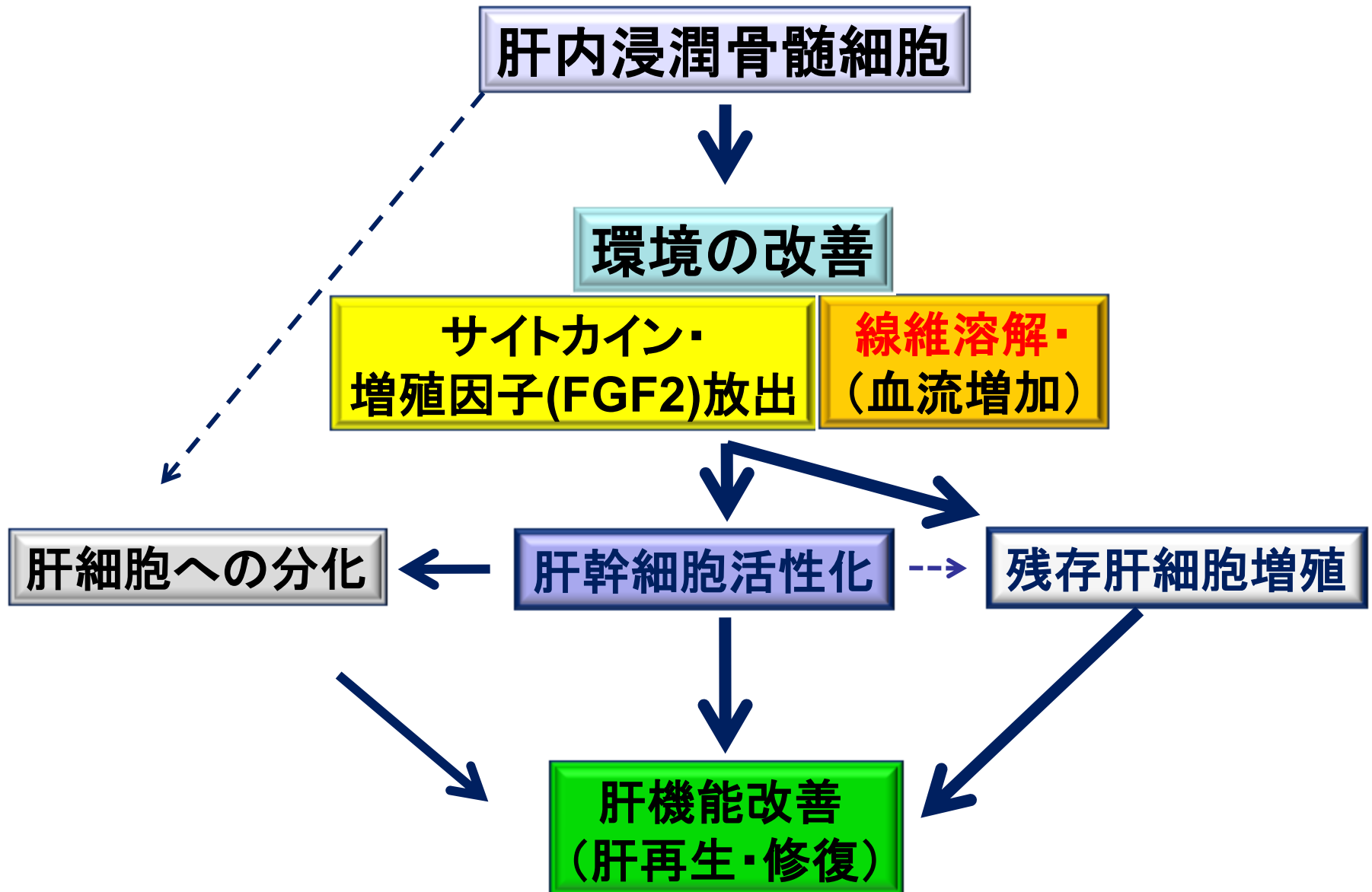


The rate of improvement in type III procollagen-N-peptide [Δ P3P(%)]



** P<0.01 (Data in Yamaguchi University)

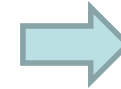
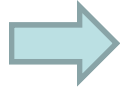
ABMi療法における肝機能改善メカニズム(仮説)



骨髓由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法

現状: 肝硬変患者から入院・全身麻酔下に400mlの骨髓液を採取
100mlの単核球分画を末梢血管から点滴静注(治療半日・1回のみ)

問題点: 患者負担がやや大きい＝適応患者が限定される



主要特許 特許第4752058号
(H23年6月3日登録)

高度医療申請準備中(RCT)

Stem Cells. 2006; 24:2292-8.



体外での細胞増殖による次世代型細胞療法の開発

少量骨髓液または
脂肪組織採取
局所麻酔・外来処置



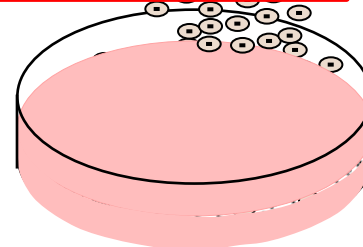
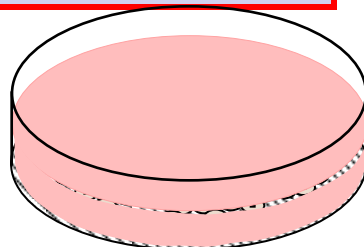
患者負担軽減



適応患者の大幅な拡大
複数回の治療が可能

体外で培養増幅

安全性・有効性評価



平成23年度

国家基幹研究開発推進事業

「再生医療の実現化プロジェクト

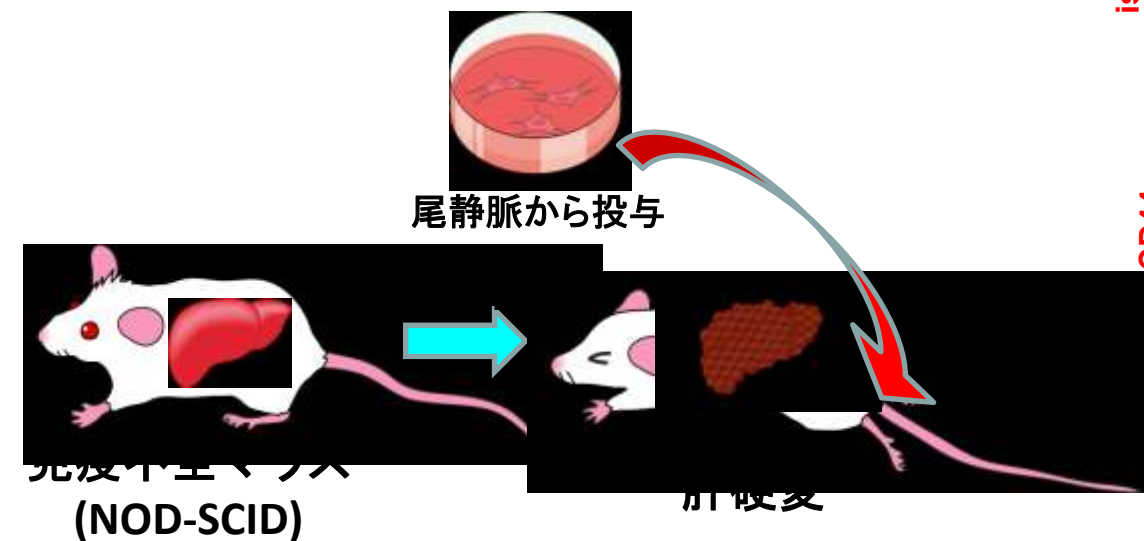
再生医療の実現化ハイウェイ」

募集要項

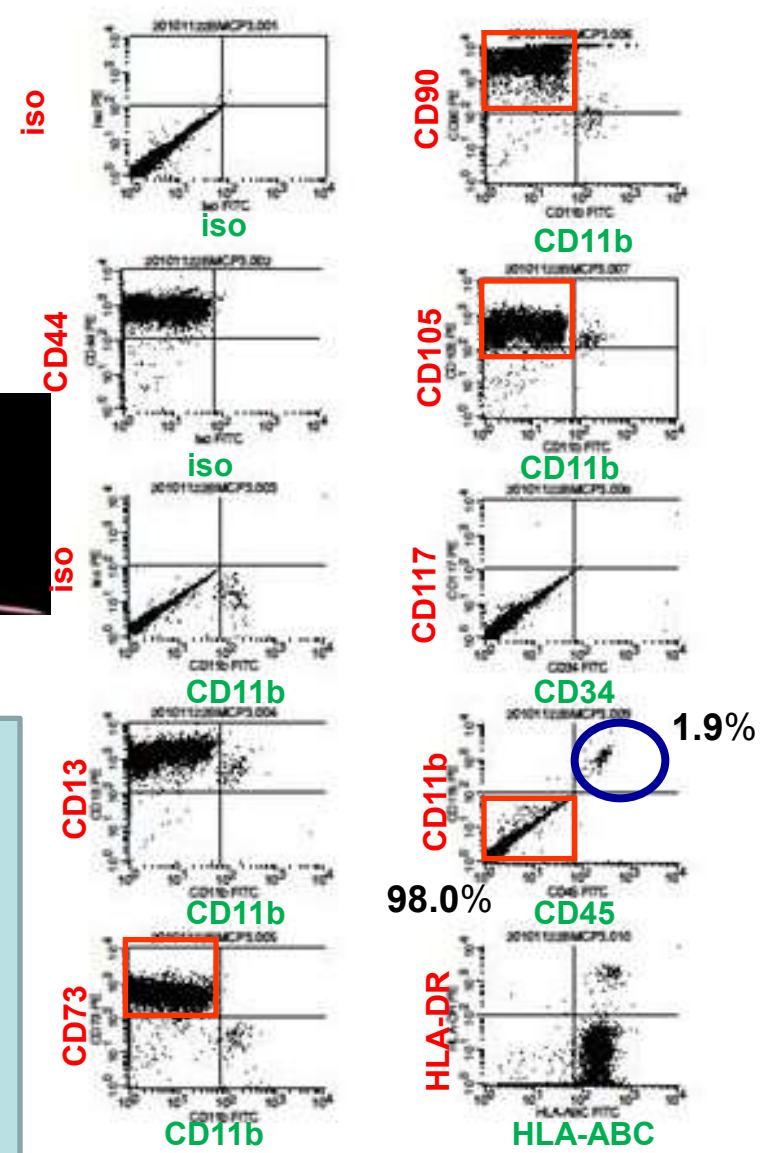
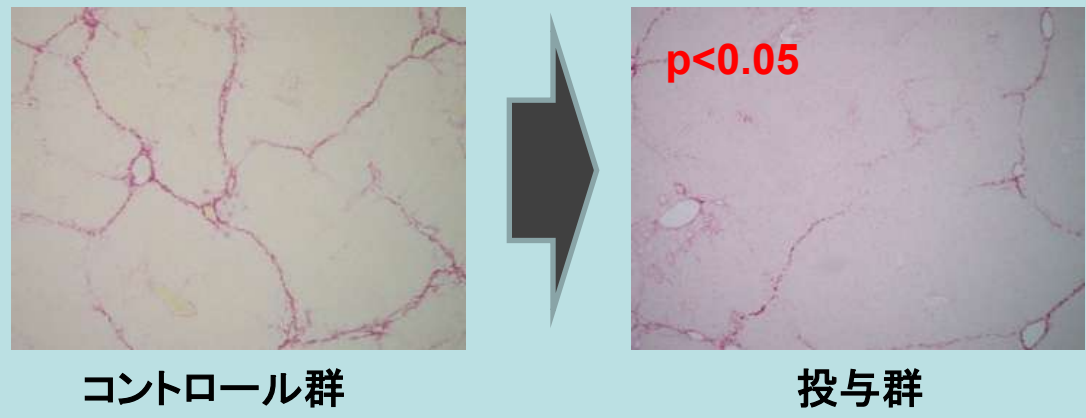
研究課題名	培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発
代表機関	国立大学法人山口大学
代表研究者	坂井田 功(大学院医学系研究科消化器病態内科学 教授)

ヒト培養骨髓間葉系マーカー陽性細胞に肝線維化改善作用

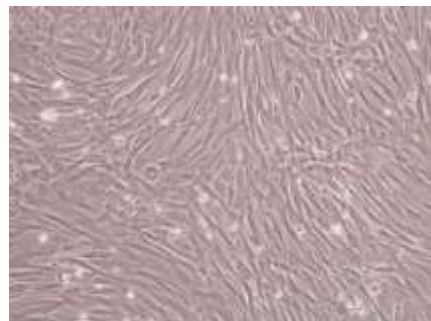
市販ヒト骨髓単核球細胞を通常法(10%ウシ血清含有培地・継代作業あり)で約20日間培養し尾静脈投与



肝線維化評価(シリウスレッド染色)



培養自己イヌ骨髓細胞の安全性評価(Healthy model)



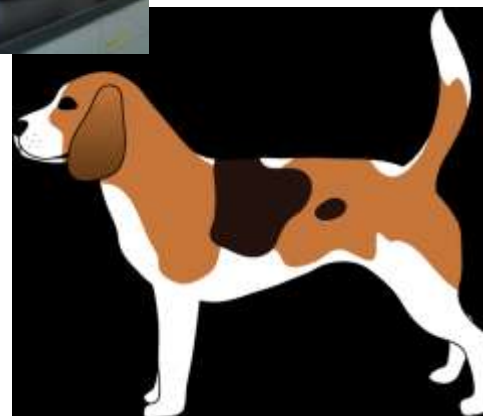
10%ウシ血清含有培地
20日間通常培養(継代2回)



全身麻酔下
骨髓液採取



末梢静脈投与



未処理ビーグル犬

Age; retire
Sex; female

細胞数; 1.07×10^7
投与量; 10mL
速度; 10mL/min

投与前

T. Prot: 6.48 (± 0.19) g/dl
Albumin: 2.90 (± 0.11) g/dl
T. Bil: 0.20 (± 0.00) mg/dl
ALT: 57.33 (± 0.58) U/L
AST: 20.67 (± 0.58) U/L
LDH: <50 U/L
BUN: 25 (± 1.16) mg/dl
UA: <1.0 mg/dl
CREA: 0.70 (± 0.00) mg/dl

投与後 1日目

T. Prot: 6.57 (± 0.23) g/dl
Albumin: 2.97 (± 0.10) g/dl
T. Bil: 0.23 (± 0.06) mg/dl
ALT: 56.33 (± 3.22) U/L
AST: 24.33 (± 1.53) U/L
LDH: <50 U/L
BUN: 17 (± 1.16) mg/dl
UA: <1.0 mg/dl
CREA: 0.95 (± 0.06) mg/dl

変動なし

・イヌを用いた安全性評価をすすめる

Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous **mesenchymal** stem cell injection: a phase I–II clinical trial

Pedram Kharazihaa et al.

対象：肝硬変患者

方法

腸骨より20ml骨髓液採取 (2×10^6 単核球 : Ficoll法)

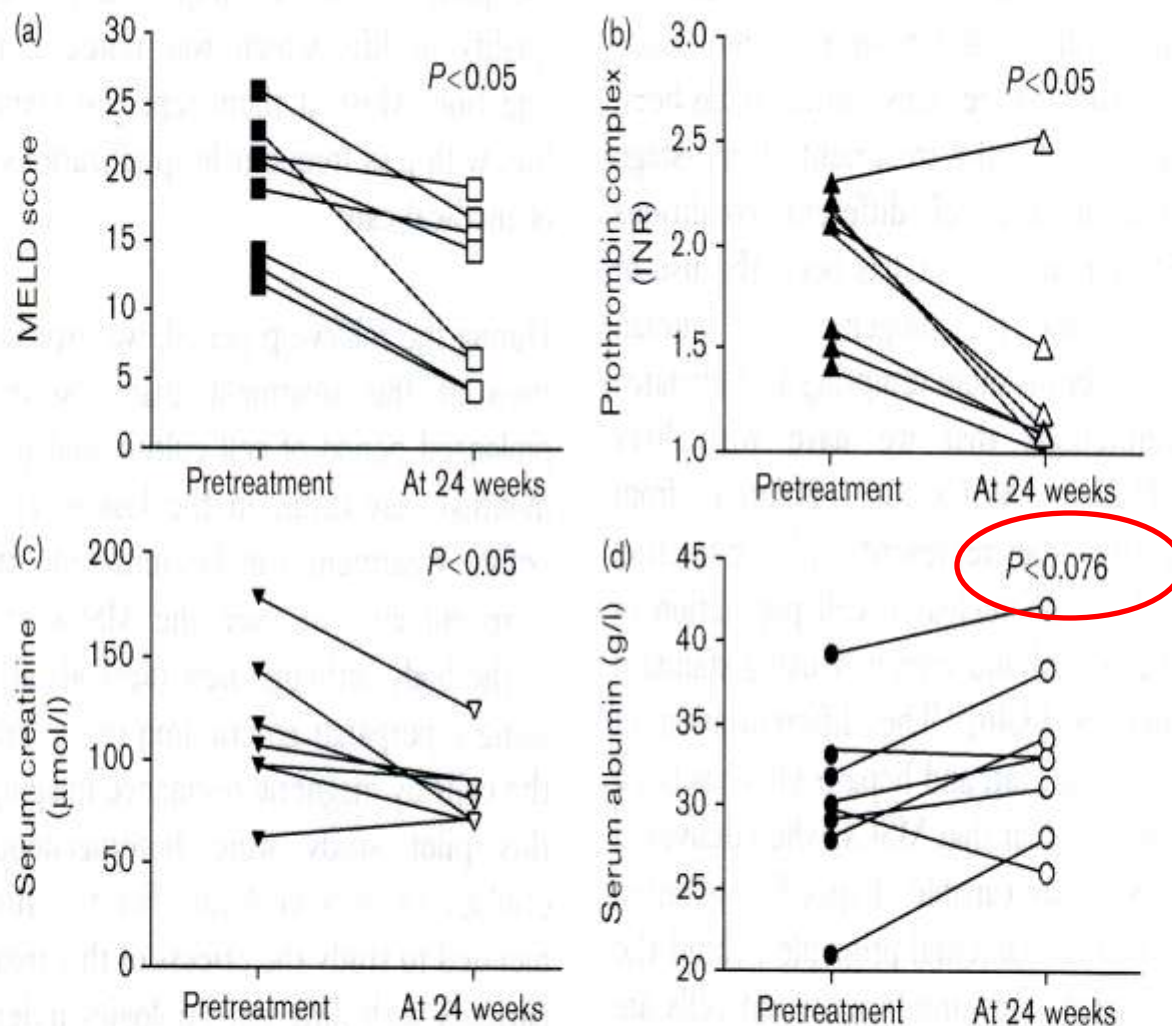
2週間培養しCD13,29,44,45,73,105,166評価

$3-5 \times 10^7$ まで培養

(投与48時間前に肝細胞へ分化誘導HGF,DEX,OSM)

門脈より投与

Fig. 3



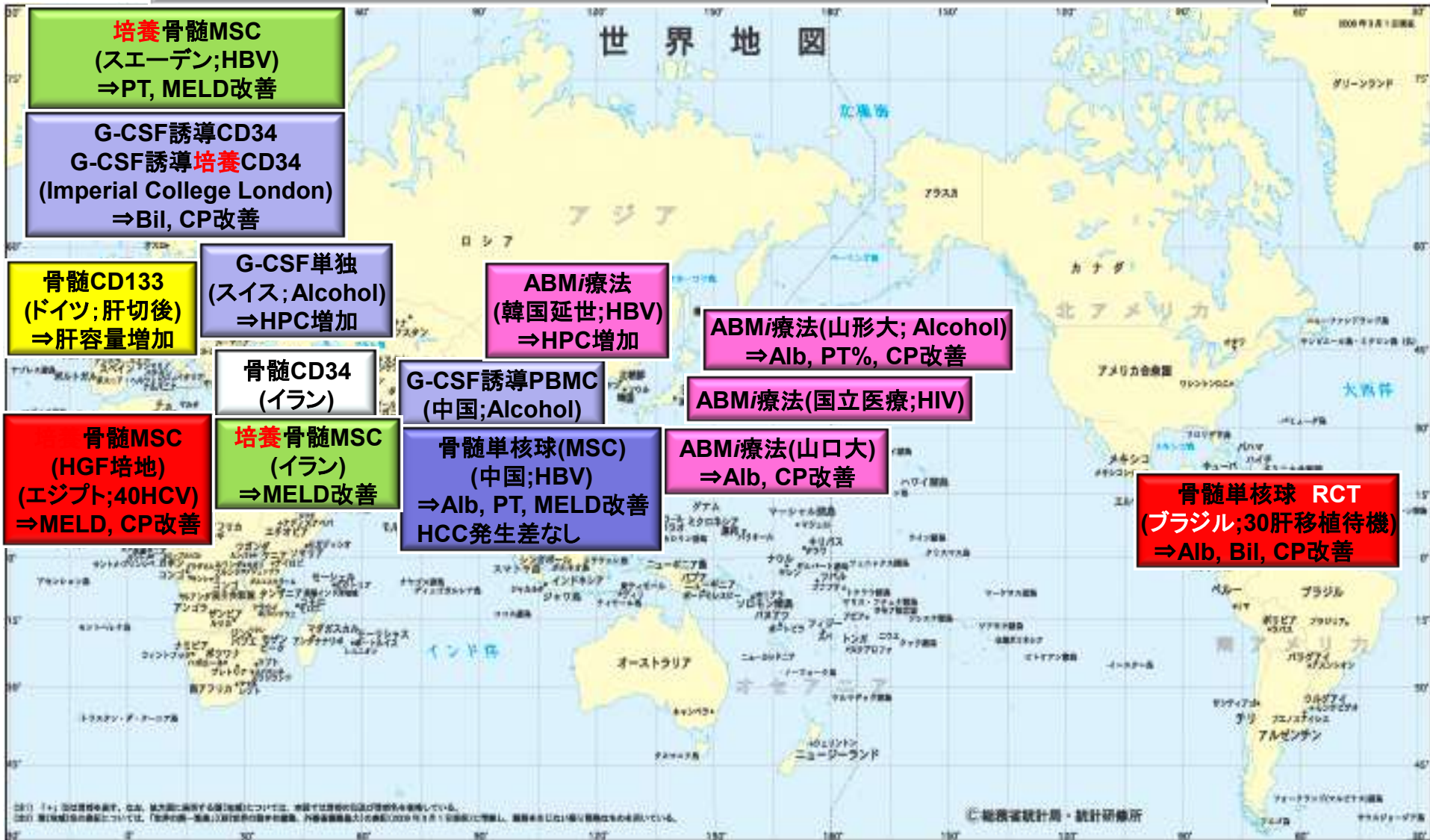
Diagrams of liver function indices before and after injection of mesenchymal stem cells. (a) Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score. (b) prothrombin complex. (c) Serum creatinine. (d) Serum albumin. Filled symbols denote pretreatment values; open symbols denote values 24 weeks posttreatment. INR, international normalized ratio.

Table 1 Potential strategies and targets for augmenting regeneration^{110,122,125}

	Potential targets	Current Status	Human Studies	Potential
Manipulation of signaling pathways	Inflammatory cytokines Growth Factors Regulatory Proteins	Wealth of knowledge GCSF efficacy in animal studies	Reported off label use but no conclusive clinical benefit yet.	Selective delivery to liver attractive option.
Hepatocyte Replacement	Hepatocytes from unused liver graft	Able to harvest and cryopreserve but unable to expand ex vivo	Transplanted in acute liver failure with limited success	Limited graft availability unless successful ex vivo expansion
Progenitor Replacement	Facultative Progenitors Precursors: (ESC/ iPSC/ Fetal) MSC (Bone marrow/ Cord/ Amniotic / Adipose) Germ Cells	Good ex vivo evidence of differentiation and efficacy in rodent studies.	Only Bone marrow and PBSC MSC transplanted in 11 human studies— Differentiation into hepatocytes not proven	Needs large # of functional cells Safety and ethical concerns in some sources Potential for autologous transplants
Modulate repair and regeneration	? MSC ? Endothelial Progenitor ? Cell culture Supernatant ? Metalloproteinase	Mechanism still not elucidated. Animal studies underway	BM or PBSC in 11 human studies show possible benefit	Bone marrow or PBSC sources readily available.

BM, bone marrow; ESC, embryonic stem cells; GCSF, granulocyte colony stimulating factor; iPSC, induced pluripotent cells; MSC, mesenchymal stem cells; PBSC, peripheral blood stem cells.

論文報告された自己(骨髓)細胞を用いた肝再生療法



CP, Child-Pugh score; HPC, hepatic progenitor cell

〈Table1改変〉Takami T, Terai S, and Sakaida I. Curr Opin Gastroenterol. 2012

臨床研究(小括)

- * 非代償性肝硬変患者19症例に対して実施した。
- * 微熱以外の重篤な有害事象は認めなかった。
- * アルブミン値上昇・肝線維化マーカーなどの
肝機能維持・改善が認められた。

自己骨髄細胞治療の可能性と限界

限 界

- 効果期間が限定
- 対象患者が限定
- 効果予測ができない

可 能 性

- 分割投与(冷凍保存)
- 効果増強(増殖因子併用)
- 細胞数増加(培養)
- 細胞ソースの多様化
- 多疾患に適応可能