

## 肝臓再生医療と実践的人材育成 ～培養自己骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の臨床実施と 大学初となる臨床培養士育成コースの開設～

高見 太郎\*<sup>1~3§</sup> 坂井田 功\*<sup>1,2,4</sup>

**[要 旨]** 進行した非代償肝硬変症の根治療法は生体/脳死肝移植であるが、ドナー不足や免疫拒絶などの諸問題があるため、これを補う肝臓再生療法が求められている。そこで我々は「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」を開発し、臨床研究として臨床実施してきた。この取り組みを通して、再生医療・細胞療法が普及および産業化するには専門知識と技術を習得した専任の医療技術者を育成することが必要であると実感した。そこで平成 27 年度に臨床検査技師の国家資格を取得した大学院生を対象とした「臨床培養士育成コース」を山口大学大学院医学系研究科保健学専攻に日本の大学としては初めて開設し、人材育成にも取り組んでいる。

**[キーワード]** 再生医療、肝硬変症、骨髄細胞、間葉系幹細胞、臨床培養士

### はじめに

我が国には約 30 万人の肝硬変症患者が存在し、そのうちの約 3 万人が非代償性肝硬変症である。近年では核酸アナログ製剤や直接作用型抗ウイルス剤(Direct Acting Antivirals; DAA)の開発により肝炎ウイルスの制御・排除が可能となった。しかしアルコール性肝硬変症や非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis; NASH)は増加してきており、多くの肝硬変症が存在する。進行した非代償肝硬変症の根治療法は生体/脳死肝移植であるが、ドナー不足、手術侵襲、免疫拒絶、医療費などの諸問題があるため、これを補う肝臓再生療法が求められる。この現状を受けて我々は、手

術侵襲がなく、経静脈・動脈投与が可能である低侵襲な肝臓再生療法として「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の基礎研究および臨床実施に取り組んできた。具体的には、「自己骨髄細胞投与療法」では患者から採取した骨髄液を洗浄・濃縮し骨髄単核球細胞を培養なしに末梢静脈から点滴投与する方法、「低侵襲肝臓再生療法」では少量の自己骨髄液を採取し培養して得られた間葉系幹細胞を末梢静脈または肝動脈から投与する方法である。そこで前半では、これらの開発状況を概説する。また、これらの肝臓再生医療を開発していくなかで、我々は再生医療・細胞療法を臨床実施し、さらに産業化させるためには専門知識と高度な技術を習得した専任の医療技術者が不可欠であ

\*1 山口大学大学院 医学系研究科 消化器内科学 §t-takami@yamaguchi-u.ac.jp

\*2 山口大学 大学教育推進機構 再生・細胞治療研究センター

\*3 山口大学医学部附属病院 再生・細胞治療センター

\*4 山口大学大学院 医学系研究科 再生医療研究教育センター

ることを実感した。そこで、臨床検査技師の国家資格を取得した大学院生を対象に、平成 27 年度に山口大学大学院医学系研究科保健学専攻(前期博士課程)として「臨床培養士育成コース」を、さらに平成 29 年度に後期博士課程として「医科学者育成コース」を開設し人材育成に取り組んでいるので、あわせて紹介する。

## I. 自己骨髄細胞を用いた 肝臓再生療法の開発と臨床実施

### 1. 自己骨髄細胞投与療法

#### ～非培養・自己・全骨髄単核球細胞を 末梢静脈から点滴投与する方法～

生体肝移植が行われているように、生来、肝臓は再生能を持つ臓器である。ラット部分肝切除モデル(健康な肝臓の約 2/3 を小開腹して切除する)では、残存肝の肝細胞が肥大と細胞増殖することにより短期間でもとの重量まで回復する「代償性肥大(再生)」が起こることが古くから知られている<sup>1)</sup>。そのため以前は肝細胞移植が多く行われたが、肝細胞の生着率の低さなどから治療効果は限定的と評価された。一方、重度の肝障害などにより肝細胞の増殖が阻害されたような場合では、肝内にあらかじめ存在している肝前駆(肝幹)細胞が出現して肝細胞の供給源となる「肝前駆細胞依存性の再生」が誘導される。マウスに 3,5-ジエトキシカルボニル-1,4-ジヒドロコリジン(DDC)含有食やコリン欠乏エチオン添加食を投与すると、門脈域周囲に細胆管反応(ductular reaction)が起こり、小型卵円形の細胞のオーバル(Oval)細胞が出現する<sup>2)</sup>。このオーバル細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を持つため肝前駆(幹)細胞とも考えられており、この制御については、門脈域に存在している Thy-1 陽性かつ CD45 陰性の間葉系細胞から産生された FGF7(fibroblast growth factor 7)<sup>3)</sup>、マクロファージ由来の Wnt3a<sup>4)</sup>や TWEAK(TNF-like weak inducer of apoptosis)<sup>5)</sup>などの関与が報告されている。しかし、持続する肝障害により壊死～炎症～再生が繰り返されると肝臓には肝線維が沈着し、最終的には偽小葉を形成

した「肝硬変症」となる。こうなると肝臓が持つ再生力は発揮できないため、肝臓再生療法の開発が求められている。

2000 年に Theise らは、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性レシピエントの肝細胞に Y 染色体が存在することを報告し、骨髄は肝臓再生療法の細胞源として注目されるようになった<sup>6)</sup>。我々は、四塩化炭素を腹腔内に反復投与して誘導した肝硬変症マウスに、同種同系 GFP 陽性骨髄細胞(非培養・全骨髄単核球細胞)を末梢静脈(尾静脈)投与したところ肝線維化や肝機能の改善が起こることを報告している<sup>7,8)</sup>。そこでこれらマウス基礎研究成果を基盤に、非代償性肝硬変症を対象として、2003 年 11 月に臨床研究「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、2005 年からの多施設臨床研究を経て、現在は先進医療 B として「C 型肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性と安全性に関する研究」を行っている。この ABMi 療法では、全身麻酔下に自己骨髄液を約 400mL 採取し山口大学医学部附属病院 再生・細胞治療センターで骨髄液を洗浄・濃縮したうえで全骨髄単核球細胞を同日中に末梢静脈より点滴投与している。これまでに細胞投与 6 ヶ月後の血清アルブミン値と Child-Pugh スコアの改善と重大な有害事象の発生がないことを報告した<sup>9)</sup>。多施設共同研究を実施した延世大学(韓国)の報告でも、B 型肝硬変症において肝体積の増加と腹水の減少が認められた<sup>10,11)</sup>。ABMi 療法実施症例の肝では、増殖細胞核抗原(PCNA)陽性肝細胞<sup>9)</sup>およびサイトケラチン 7 陽性肝前駆細胞<sup>10)</sup>の増加が認められ、肝臓再生の促進が確認されている。また我々は全骨髄単核球細胞を肝発癌肝硬変症マウスモデルに頻回投与したところ、レドックス制御により肝発癌が有意に抑制されることを確認したこと<sup>12)</sup>、自己骨髄細胞投与は抗肝線維化と肝発癌抑制をあわせもつ再生療法であると考えている。図 1 に、これまでの動物実験と臨床研究の結果から想定される作用機序を示す<sup>13)</sup>。

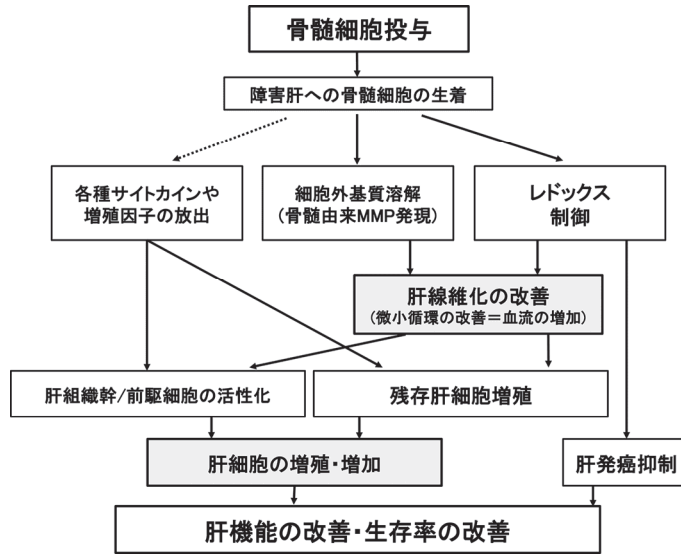


図1 「自己骨髓細胞投与療法」の想定される作用機序

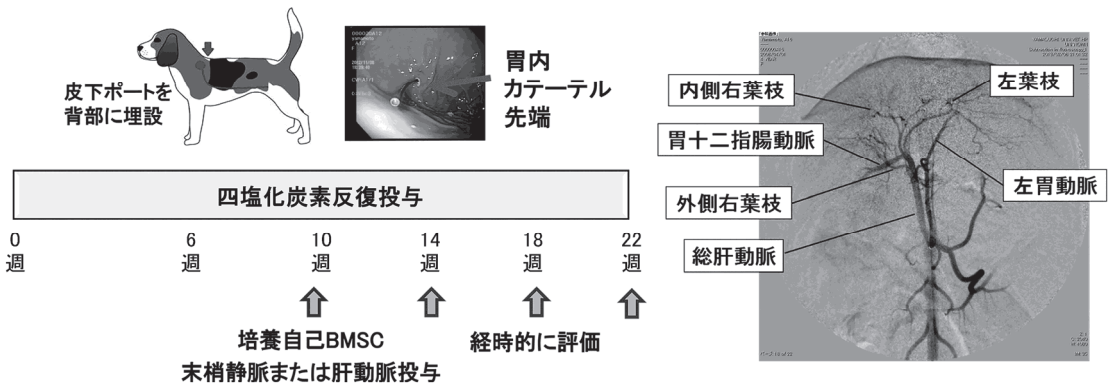


図2 イヌ肝線維化評価モデルの作出

## 2. 低侵襲肝臓再生療法

～培養・自己・骨髓間葉系幹細胞を末梢静脈または肝動脈から投与する方法～

骨髓間葉系幹細胞 (bone marrow derived-mesenchymal stem cell; BMSC) は増殖力に富み、特殊な培養条件を要さないため、*ex vivo* での通常培養で簡便に十分な細胞数を確保することができる。また、凍結保存が可能のため複数回投与や輸送にも対応できることが利点である。ABMi 療法は、十分な細胞数を得るために全身麻酔下に骨髓液を採取する必要があるため、全身麻酔が困難な症例は適応外となる。そこでこの BMSC の特性を活用

し、動物実験 POC (Proof of Concept) 研究を基盤に<sup>14)15)</sup>、全身麻酔が困難な重症の非代償性肝硬変症を対象とした臨床研究「培養自己骨髓細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の安全性に関する研究」を2015年11月に開始した。具体的には、局所麻酔下に採取した約50mLの骨髓液を再生・細胞治療センターにて約3週間接着培養することでBMSCを増殖させ、回収洗浄したのちに患者本人の末梢静脈から点滴投与した。さらに最近では、独自に作出したイヌ肝線維化評価モデル<sup>16)</sup>を用いて細胞投与経路を比較評価した結果、上述の末梢静脈投与(点滴投与)よりも肝動脈投与がより有

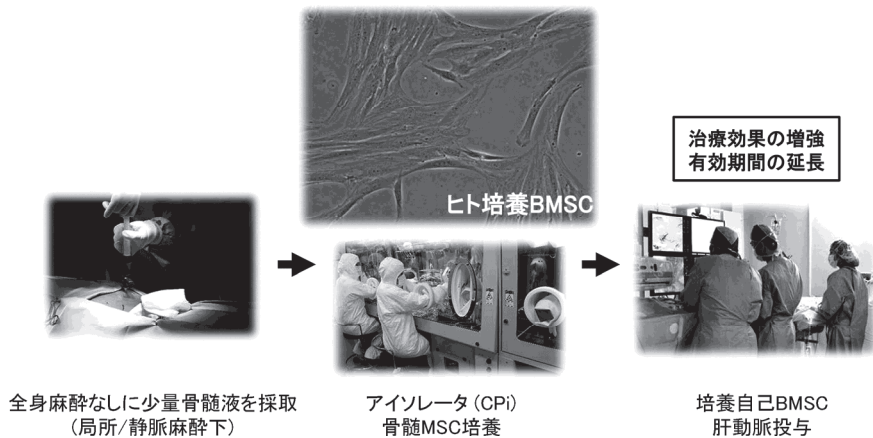


図3 培養自己骨髄間葉系幹細胞肝動脈投与療法の臨床実施

効であることを確認した(図2)。そこで「培養自己BMSCを肝動脈投与する低侵襲肝臓再生療法の安全性に関する研究」の臨床研究を計画し、特定認定再生医療等委員会の審議を経て、2018年2月末には厚生局に受理(承認)された。そこで2018年度から細胞投与経路を肝動脈に変更したプロトコルでの臨床実施を計画している(図3)。

## II. 山口大学大学院医学系研究科保健学専攻 臨床培養士育成コースおよび 医科学者育成コースにおける実践的人材育成

図4のように山口大学の再生医療に関する教育および研究センターは整備されており、以下のように役割分担がされている。まず、山口大学大学院医学系研究科再生医療研究教育センターでは基礎研究～橋渡し研究を行っている。次に、細胞培養加工施設である山口大学医学部附属病院再生・細胞治療センターにおいて、POCが取得されたプロトコルのコールドランを行い、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」のもとで特定細胞加工物の製造を担っている。さらに山口大学大学教育推進機構再生・細胞治療研究センターや山口大学再生医療基盤研究室(宇部市メディカルクリエイティブセンターMCC)では、県内外企業との連携による産業化を目指して、山口県施策として創設された「再生医療研究開発拠点機能強化事業」等を活用した取り組みが行われている。

このように山口大学では、徐々に再生医療・細胞療法に関して基礎研究から産業化までの研究体制が整備されてきた。

しかしながら、高品質の特定細胞加工物を安全かつ安定的に供給し、さらに産業化(再生医療等製品としての薬事承認や再生医療関連機器の開発)させるためには再生医療・細胞療法を担う高度な医療専門技術者を育成する必要があると感じていた。そこで坂井田功医学部長(当時)のもと、教育機関である「山口大学大学院医学系研究科保健学専攻」、再生医療・細胞療法を実践する「山口大学医学部附属病院」、先端医療研究を牽引している「先端医療振興財団」が連携して、平成27年度に臨床検査技師の国家資格を取得した大学院生を対象に日本の大学としては初めてとなる「臨床培養士育成コース」を大学院医学系研究科保健学専攻(前期博士課程)として開設するに至った。

このコースでは、保健学専攻はもちろん再生医療研究教育センターや我々も教育や実習に参画している。特に細胞培養実習では我々の臨床実績がある「肝臓再生療法プロトコル(標準作業手順書)」を教材にして市販ヒトBMSCを培養したり、山口大学再生医療基盤研究室に研究開発目的で導入した細胞培養用アイソレータ(研究開発用)を用いて培養法を実習したり、山口大学医学部附属病院再生・細胞治療センターでの肝臓再生療法コー

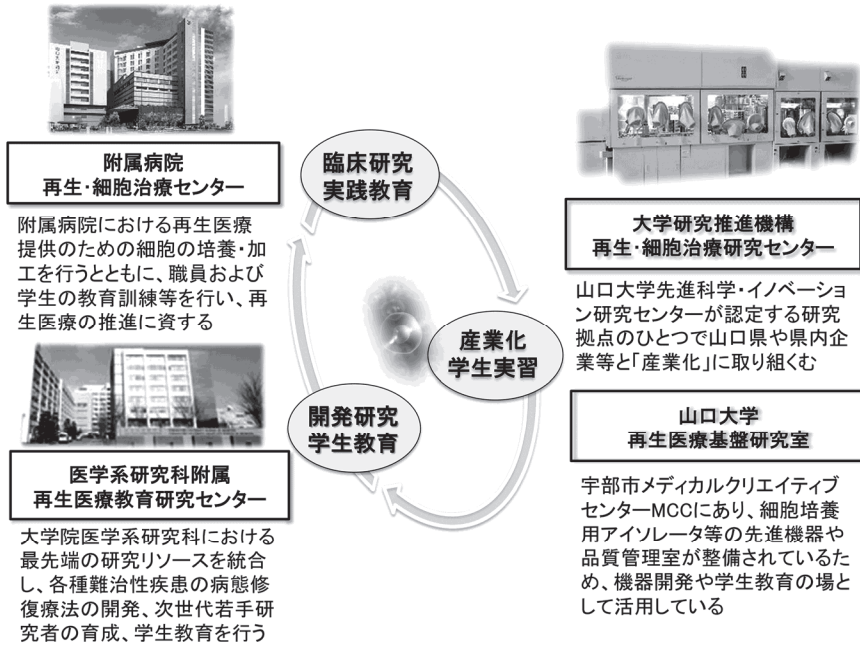


図 4 山口大学の再生医療関連の研究教育施設

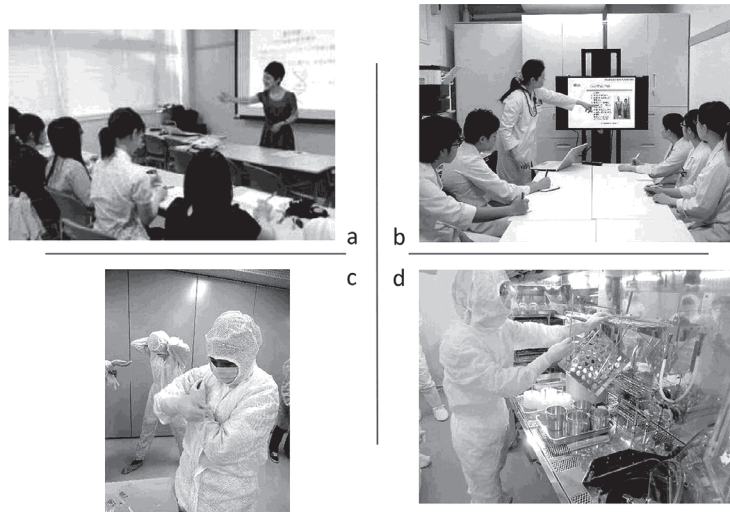


図 5 臨床培養士育成コースの教育風景

- (a) 講義、(b) 再生・細胞治療センターでの教育訓練  
 (c) ガウニング練習、(d) 再生・細胞治療センターでのコールドラン

ルドランを経験したりする等、我々が肝臓再生療法を開発するために整備してきた環境を活用して実践的な人材教育を行っている(図 5)。また日本再生医療学会「臨床培養士制度委員会」とも臨床

培養士育成に関して連携を行っている。さらに臨床培養士育成コース開設から 2 年が経ち修了者がでる平成 29 年度にあわせて、後期博士課程に「医科学者育成コース」を開設した。ここでは、

再生医療・細胞療法の研究シーズや新たな医療技術の開発を担う Medical Scientist (医科学者) の育成を目標に掲げ、おもに大学院医学系研究科再生医療研究教育センターで研究指導を行っている。

### おわりに

前半では、我々が開発してきた自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の状況を概説した。今後、臨床研究や治験の実施によりエビデンスが蓄積し、有効な肝臓再生療法が普及することで肝硬変症の福音になることが期待される。後半では、我々が臨床検査技師の新たな職域として「臨床培養士」の育成に取り組んでいる現状を紹介した。これらの取り組みが、再生医療・細胞療法の普及や産業化につながることを信じている。

### 文 献

- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Path Lab Med* 1931; 12: 186-202.
- Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16(2): 142-8.
- Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 2013; 27(2): 169-81.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 2012; 18(4): 572-9.
- Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, Lincecum JM, Wang MZ, Zheng TS, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 2005; 115(9): 2330-40.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32(1): 11-6.
- Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134(4): 551-8.
- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40(6): 1304-11.
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24(10): 2292-8.
- Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplantation* 2010; 19(10): 1237-46.
- Kim JK, Kim SJ, Kim Y, Chung YE, Park YN, Kim HO, et al. Long-term follow-up of patients after autologous bone marrow cell infusion for decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplantation* 2017; 26(6): 1059-66.
- Maeda M, Takami T, Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusions suppress tumor initiation in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 104-11.
- Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2012; 28(3): 203-8.
- Tanimoto H, Terai S, Takami T, Murata Y, Fujisawa K, Yamamoto N, et al. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell and Tissue Research* 2013; 354(3): 717-28.
- Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, et al. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatology Research* 2014; 44(10): E206-17.
- Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Paredes BD, et al. A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatology Communications* 2017; 1(7): 691-703.