

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (2002) 45(13):2301-2306.

【再生医学と生命科学】 再生医療 肝細胞移植による肝不全の治療

葛西眞一, 澤雅之

肝細胞移植による肝不全の治療

葛西眞一・澤 雅之

急性肝不全動物に対する肝細胞移植の有用性が報告され、欧米ではすでに肝移植までの bridge-use として臨床応用が行われている。いずれの場合も、移植肝細胞は全肝細胞数の数%以下で、移植部位も脾臓、門脈、腹腔内と多様である。(本法が治療法として確立されるには、至適移植細胞数、移植部位、移植時期などの検討が必要である。)先天性代謝異常などの慢性肝不全に対しても肝細胞移植の有用性が報告され、Crigler-Najjar 症候群患者への移植も試みられている。いずれの場合も肝機能補助は部分的である。現在、増殖促進因子の投与、肝幹細胞の同定、増殖促進遺伝子導入などが試みられ、今後の成果が期待される。

Key words 【肝細胞移植】【肝不全】【代謝異常】

はじめに 近年、シクロスポリン、FK-506 などの新しい免疫抑制剤の開発、手術手技の確立、術前・術後管理技術の進歩などにより肝移植の成績は飛躍的に向上し(5年生存率:約75%)、欧米では各種肝不全に対する究極的な治療法として定着している。しかし、適応拡大による移植症例数の急激な増加は、ドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。一方、摘出されたドナー肝の約50%が何らかの理由で肝移植に用いられずに棄却されている。

Berry と Friend により確立されたコラゲナーゼ消化法は、動物さらにはヒトの肝臓から活性の高い肝細胞を分離することを可能とし、分離肝細胞を用いた肝細胞移植もしくはバイオ人工肝臓などの肝機能補助法が研究開発されている。本稿では、肝細胞移植に関する最近の基礎研究、臨床応用の現況を概説する。

1. 急性肝不全に対する肝細胞移植

1. 基礎研究

1970年代より実験的急性肝不全動物に対する肝細胞移植の有用性が報告されている。肝不全モデルとしては、さまざまな薬剤性急性肝不全、虚血性肝不全や90%部分肝切除などの外科的急性肝不全が用いられ、移植部位としては、腹腔内、脾内、門脈内、肺内と多様であるが(表1)、肝細胞移植による生存率の改善あるいは生存時間の延長が得られている¹⁾。いずれの場合も、移植肝細胞数が全肝の肝細胞数のわずか数%以下で、生存率の改善が得られている。Sutherland らの報告では、肝細胞移植24時間後に行われた腹腔内検索において、生存肝細胞がまったく認められなかったにもかかわらず、肝不全動物の生存率改善が認められてい

Shinichi Kasai, Masayuki Sawa. 旭川医科大学第2外科(〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目) [Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College, Midorigaokahigashi, Asahikawa 078-8510, Japan] E-mail: kasai@asahikawa-med.ac.jp sawa@asahikawa-med.ac.jp

Hepatocyte Transplantation for the Treatment of Hepatic Failure

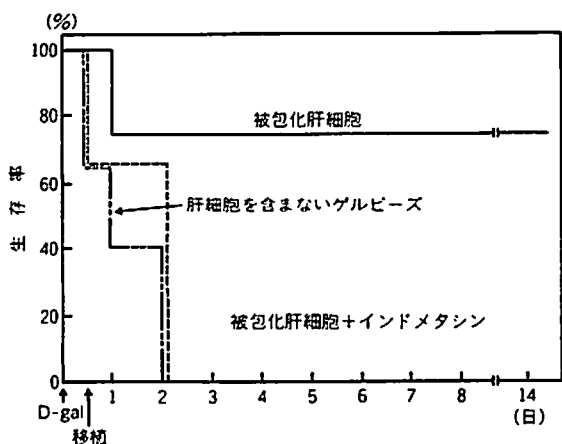


図1 D-gal 誘導急性肝不全ラットに対する被包化肝細胞腹腔内移植²⁾

る²⁾。このことは、肝不全動物の生存率改善あるいは生存時間の延長が、移植された肝細胞による直接的な肝機能補助だけではなく、他の機序の存在も示唆している。

筆者らは、D-ガラクトサミン (D-gal) 投与 12 時間後のラットに、アルギン酸 Ca 被包化肝細胞腹腔内移植と同時に、プロスタグランジン類 (PG) 生合成酵素阻害薬であるインドメタシンを投与し、網内系機能と肝不全動物の生存率改善との関連を検討した。肝細胞移植群では、血清肝逸脱酵素値の上昇および網内系機能の指標である phagocytic index (PI) の低下が抑制さ

れ、生存率は 80% に改善された。移植 1 週間後の肝組織学的検索においてもほぼ正常な肝組織像を呈していた。一方インドメタシン投与群では、PI の経時的な低下と血清肝逸脱酵素値の著明な上昇が認められ、非移植群と同様に D-gal 投与 48 時間以内に全例死亡した (図 1)。また、死亡直前の肝臓の組織学的検索でも、非移植群と同様に広範な肝細胞壊死像を呈していた。以上の結果より、肝細胞移植による急性肝不全ラットの生存率改善に、PG を介した網内系機能が重要な役割を演じていることが示唆された³⁾。この結果も、表 1 に示した初期の報告と類似した結果であり、肝細胞移植の効果は、移植肝細胞の直接的な肝機能補助能だけによるものではないと考えられる。

Eguchi らは、従来の 68% 部分肝切除に 24% の残存肝の温阻血を付加して、障害肝から肝不全物質や各種サイトカインの放出が可能な臨床急性肝不全に類似した外科的急性肝不全モデルを作製し、肝不全誘導 24 時間前に肝細胞脾内移植を行い、生存時間・肝機能および障害肝の再生能を検討している⁴⁾。肝細胞移植群では、非移植群に比して生存時間の有意な延長がみられ、障害肝における肝細胞増殖因子 (HGF) レセプター c-met の発現増強、増殖細胞核抗原 (PCNA) 陽性肝細胞や核分裂像の増加など、肝細胞移植による残存肝の再生促進効果を認めている。

近年の遺伝子操作技術の進歩により、肝細胞へのさまざまな遺伝子導入が試みられている。Nakamura ら

表 1 実験的急性肝不全に対する肝細胞移植

報告者	報告年	肝不全モデル	動物種	移植細胞数・部位	生存率 (%)	対照群 (%)
Sutherland	1977	DMNA, D-gal	ラット (iso)	2~4×10 ⁷ (i. s., i. p., i. v.)	63	(17)
Arranz	1977	D-gal	ラット (iso)	1×10 ⁷ (i. s.)	64	(22)
Makowka	1980	D-gal	ラット (iso)	4×10 ⁷ (i. p.)	70	(0)
Sommer	1980	虚血	イヌ (auto)	2×10 ⁷ (i. s.)	70	(20)
Bismuth	1984	75% PH	ラット (iso)	2×10 ⁷ (i. s.)	53	(30)
Uotsu	1986	CCI ₄	ラット (iso)	1×10 ⁷ (i. s.)	82	(40)
Sano	1989	D-gal	ラット (allo)	胎仔肝組織 100 pieces (大綱)	66.7	(7)
Bengmark	1991	90% PH	ラット (iso)	1×10 ⁷ (i. s.)	85	(0)
Makowka	1980	D-gal	ラット (iso)	骨髓細胞 2×10 ⁷ (i. p.)	62.5	(0)
Miyazaki	1983	5-FU	ラット (iso)	再生肝細胞質ゾル (i. p.)	80	(29)
Baumgartner	1983	D-gal	ラット (iso)	肝細胞培養液 (i. p.)	42.9	(0)

DMNA: ジメチルニトロソアミン, PH: partial hepatectomy, FU: フルオロウラシル

は、レトロウイルスを用いてラット肝細胞に SV40 遺伝子を導入して不死化肝細胞を複製し、従来の正常肝細胞と比較検討した⁵⁾。90% 肝切除 24 時間前に、 1×10^6 個の正常肝細胞もしくは不死化肝細胞を脾内移植した結果、生存率は約 50% と非移植群に比し有意な改善が得られた。また、90% 肝切除と同時に 2×10^6 個の正常肝細胞もしくは不死化肝細胞を腹腔内移植した結果、いずれも約 80% と高い生存率が得られたと報告している。このような遺伝子導入技術によりヒト肝細胞の不死化ができれば、ヒト肝細胞の大量供給が可能となり、緊急を要する急性肝不全患者にも十分対応できるものと考えられる。

Arkadopoulos らは、肝全摘 3 日前に 2.5×10^7 個の同種肝細胞をラットの脾臓内に移植し、肝機能、肝性昏睡の程度、HGF やトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- $\beta 1$ 値などの推移および生存時間を比較検討した⁶⁾。肝全摘後 HGF や TGF- $\beta 1$ 値の著明な上昇がみられたが、肝細胞移植群では非移植群に比して有意な TGF- $\beta 1$ の上昇抑制、血清アンモニア値の低下、血液凝固能の改善、肝性昏睡の発症の遅延がみられ、生存時間の延長が認められた。また、肝全摘後 24 時間以上生存したラットでは、脾内移植肝細胞の著明な増殖も認められた。この脾内肝細胞の増殖は、肝全摘による著明な HGF 値の上昇と移植肝細胞による肝再生抑制因子 TGF- $\beta 1$ のクリアランスを反映しているものと考察している。Nordlinger らは、小型中空糸膜モジュールを免疫隔離法として用い、モジュール内に全肝の約 5% に相当する同種もしくは異種肝細胞を播種した。急性肝不全は 95% 肝切除により誘導し、肝細胞移植は肝不全誘導 7 日前に行った。非移植群の死亡率は 73~93% であるのに対し、同種および異種肝細胞移植群の死亡率はそれぞれ 39, 36% まで低下した。また、移植 1 カ月後の摘出モジュールの組織学的検索では、肝細胞の生存が確認されている⁷⁾。急性肝不全に対する肝機能補助は一時的であるので、ヒトへの安全性が確立されれば、免疫隔離膜を用いることにより異種肝細胞の利用も可能と思われる。

以上のように実験的急性肝不全に対する肝細胞移植

表 2 臨床肝細胞移植

症例	細胞数 (viability)	補助期間 (日)	在院期間 (移植後)	結果
1	2.2×10^7 (30%)	2, 肝+腎移植	76	生存
2	7.5×10^6 (50%)	4, 頭蓋内出血	4	死亡, ICP モニターよりの出血
3	5.2×10^7 (66%)	7, 治療中止	7	改善 (-) のため治療中止
4	2.8×10^7 (86%)	10, 肝移植	62	生存
5	16.9×10^7 (56%)	3, 肝移植	41	生存

(Strom S. et al. 1997)

の有用性に関する報告が多数みられるが、移植時期・移植細胞数によって効果が異なることが考えられる。筆者らの検討では、D-gal 投与 24 時間後に移植した場合には生存率の改善が得られたが、48 時間後では効果を認めなかった。最近の Birraux らの検討でも、D-gal 投与 48 時間後のラットにはすでに非可逆的な肝不全の兆候が認められ、生存率改善は認められなかった⁸⁾。また、外科的急性肝不全に対する肝細胞移植は、肝不全誘導数日前に移植を行わなければ効果が認められず、臨床応用上の問題点と思われる。このように、傷害肝を正常肝で完全に置換する肝移植とは異なり、肝細胞移植においては、移植時期・移植肝細胞数が重要な要素であり、さらなる検討が必要である。

2. 臨床応用

インドの Habibullah らは、劇症肝炎患者 7 人に胎児肝細胞腹腔内移植 (60×10^6 cells/kg) を行い、肝性昏睡からの覚醒が移植後 48 時間以内にみられ、3 例 (43%) の生存が得られたと報告している⁹⁾。米国の Strom らは、急性肝不全患者に対し肝移植までの bridge-use として肝細胞移植を試みている¹⁰⁾。ヒト肝細胞は、減量肝移植の際に余った肝組織や、何らかの理由で移植に用いられなかった全肝から分離され、凍害防止剤に 10% Me₂SO を用いて凍結保存されている。解凍後、肝細胞浮遊液は血管造影用カテーテルを介して脾動脈内に注入され、免疫抑制にはステロイドとシクロスポリン A が使用された。表 2 に示すように、viability も低く移植細胞数が全肝のわずか 1% 以下ときわめて少ないにもかかわらず、移植後に頭蓋内圧および血清アンモニア値の低下が認められ、5 例中 3 例において肝移植までの bridge に成功し、生存している (表 2)。この結果は、従来の実験的急性肝不全に対する肝細胞移植の成績に類似しており、今後至適移植肝細胞

表 3 慢性肝機能不全に対する実験的肝細胞移植

報告者	報告年	動物種	移植部位	その他
Matas	1976	Gunn ラット (con)	i.s	
Groth	1977	Gunn ラット (allo)	i.h	
Vreomen	1985	Gunn ラット (con)	i.s	
Ikebukuro	1987	NAR (con)	i.h, i.s	胎児および成熟肝細胞
Kasai	1987	イヌおよびサル (PCS)	i.s	
Wiederkehr	1990	Watanabe ワサギ (allo)	i.h, i.s	
Dixit	1990	Gunn ラット (allo)	i.p	被包化肝細胞
Ribeiro	1992	ラット (PCS) (iso)	i.s	
Onodera	1994	ODS ラット (iso)	i.s, i.h	
Balladur	1994	NAR (allo)	i.p	被包化肝細胞
Grossman	1994	高脂血症	i.h	体外遺伝子導入

con, iso: 同系, allo: 同種, PCS: 門脈下大静脈吻合, i.s: 脾内, i.h: 肝内, i.p: 腹腔内

数ならびに移植時期などの詳細な検討が必要であろう。

II. 先天性代謝異常に対する肝細胞移植

1. 基礎研究

先天性代謝異常の原因は肝酵素の先天性欠損によるものであり、他の肝機能は正常である。したがって、必ずしも全肝を取り換える必要はなく、欠損した肝酵素を正常肝細胞を移植することにより補正すればよい場合があると考えられる。表3に示すようにUDP-グルクロニルトランスフェラーゼ欠損により高ビリルビン血症を呈する Gunn ラットや、アルブミン合成が不可能な Nagase analbuminemic ラット (NAR) などに肝細胞移植が試みられ、先天性代謝異常の是正が可能であると報告されているが、その効果は生着肝細胞数に左右されるため部分的である¹⁾。筆者らも、NAR への脾内移植肝細胞による経時的な血清アルブミン値の上昇を認めたが、移植後1年以上を経過しても正常ラットのわずか0.4%程度の血清アルブミン値を示すに過ぎなかった(図2)。Benedettiらは、尿酸代謝異常を呈するダルメシアン犬に対し脾内肝細胞移植を行い、30%程度の尿中尿酸排泄の低下を認めた¹³⁾。先天性代謝異常に対する肝細胞移植では、多くの肝細胞が長期に生着することが必要であるが、門脈および脾臓が至適移植部位であることから、門脈塞栓や虚血性肝不全の危険性などのため移植可能な細胞数には限界がある。Benedettiらの報告によると¹⁴⁾、脾内肝細胞移植を行ったダルメシアン犬の約20%を急性門脈圧亢進症と出血のために失っている。したがって、早期に移植肝細胞の増殖を促進する方法の開発が必要不可欠である。

Ilanらは、移植肝細胞の増殖促進を目的として門脈枝の結紮24時間後のGunnラットの非結紮肝葉に肝細胞を移植し、血清ビリルビンの推移を検討した結果、血清ビリルビン値は、移植前値の20%程度まで低下した¹²⁾。これは、門脈枝非結紮群に20倍の肝細胞を移植した場合と同様の効果であった。一方Orenらは、レトロルシン(肝再生を

抑制するアルカロイド)の前投与により肝切除後の再生を抑制し、内因性再生刺激因子の門脈内移植肝細胞に対する増殖促進効果をNARを用いて検討した¹³⁾。移植2ヵ月後のNAR肝におけるアルブミンmRNAの発現は約77%に達し、血清アルブミン値はほぼ正常値を示した。このように、再生肝内に移植された肝細胞は宿主肝と同様に再生刺激を受けて増殖促進されることが証明された。しかし、臨床応用には、門脈枝結紮の安全性確認が必要であり、レトロルシンなどの肝毒性化学物質の投与は非現実的であると考えられる。

筆者らは、培養肝細胞の増殖を促進するとされる、肝切除後再生肝から抽出したhepatic stimulatory substance (HSS)に注目し、四塩化炭素誘導肝硬変ラットの脾内移植肝細胞に対するHSSの増殖促進効果を検討した。肝細胞移植後間欠的にHSSを静脈内投与した結果、非投与群に比して明らかな脾内生着肝細胞に対する増殖促進効果を認め、またその効果は肝硬変の重症度に対応していた¹⁴⁾。つぎに、HSSで増殖を促進さ

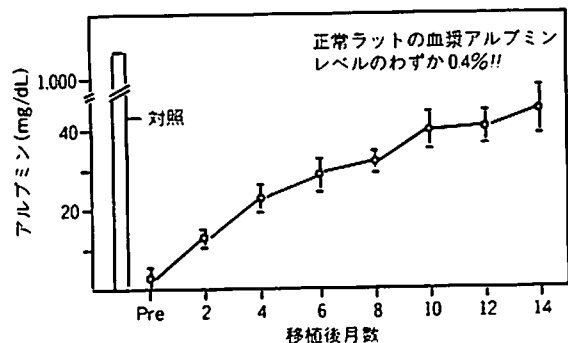


図 2 NAR ラットに対する肝細胞脾内移植

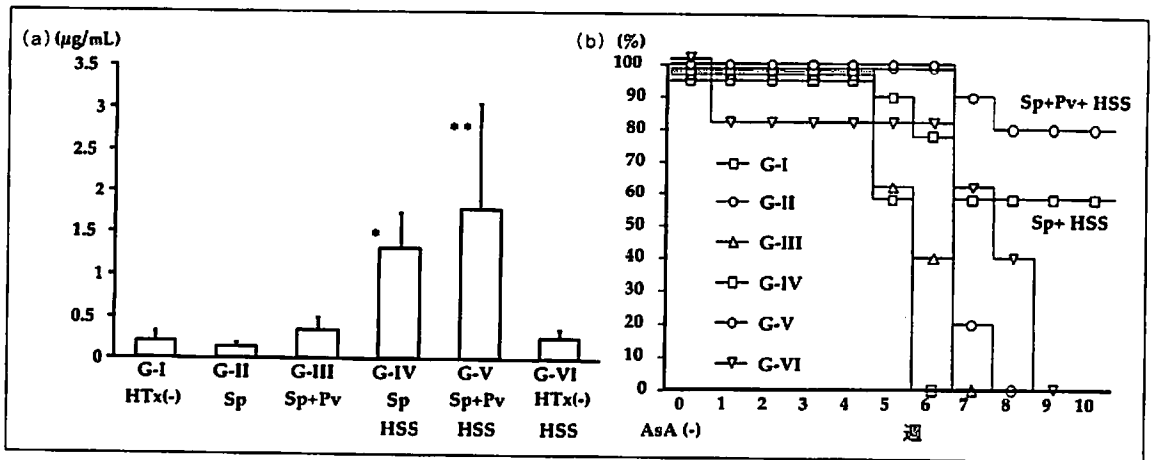


図3 ODS-od/od ラットの肝細胞移植後生存率¹⁴⁾
 HTx: 肝細胞移植, Sp: 脾内, Pv: 門脈内, AsA: アスコルビン酸

れた移植肝細胞の機能発現を, アスコルビン酸合成酵素欠損により壊血病様症状を呈し, 体重減少や大量出血で死亡する ODS-od/od ラットを用いて検討した¹⁵⁾. 脾内もしくは脾内+門脈内の両方に, 酵素欠損がみられない ODS-+/+ラットの肝臓より分離した肝細胞を移植し, 移植後間欠的に HSS を投与して, 体重の変動, 生存率, 血清アスコルビン酸値を比較検討した. 肝細胞移植後 HSS 投与を受けた群の血清アスコルビン酸値は, 非投与群および非移植群に比して有意に高く, 体

重減少も抑制され, 生存率も有意に高く保たれていた (図3). HSS 投与により移植肝細胞の増殖促進が可能であり, さらに増殖した肝細胞は良好な肝細胞機能を発現することが判明した.

2. 臨床応用

Grossmann らは, 低密度リポ蛋白質 (LDL) レセプターの欠損が原因とされる家族性高脂血症患者 5 例に, 体外遺伝子導入自己肝細胞の門脈内移植を試みた. 肝

細胞は, 開腹下に切除された 84~221 g の肝臓より, コラゲナーゼ消化法にて分離後培養された. 翌日, レトロウイルスを用いて正常なヒト LDL レセプター遺伝子の導入を行い, その翌日に腸間膜静脈内に留置されたカテーテルを介して, 遺伝子導入自己肝細胞の門脈内移植が行われた (図4). 移植 4 カ月後に行った肝生検組織で, 導入された LDL レセプター遺伝子が観察され, 5 例中 3 例では一時的ではあるが LDL コレステロールの有意な低下が認められたと報告している¹⁶⁾.

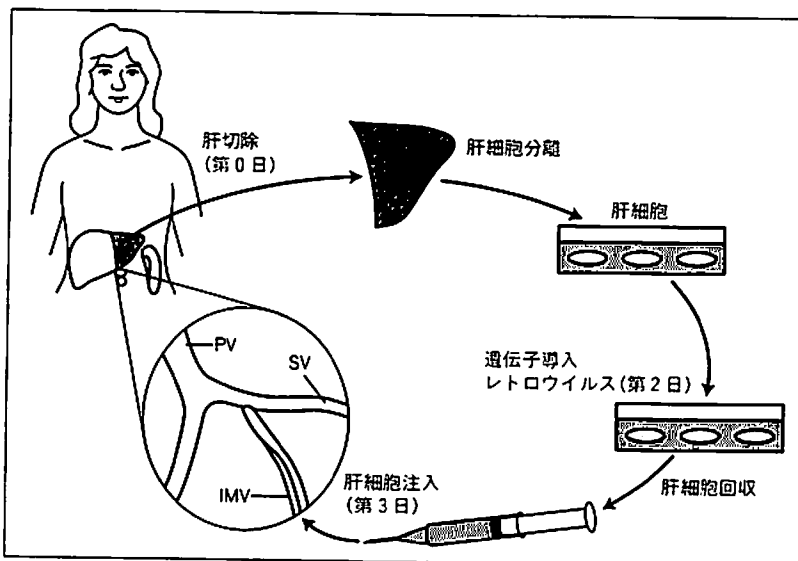


図4 遺伝子導入自家肝細胞門脈内移植¹⁶⁾
 SV: 脾静脈 PV: 門脈 IMV: 下腸間膜静脈

Fox らは, Crigler-Najjar

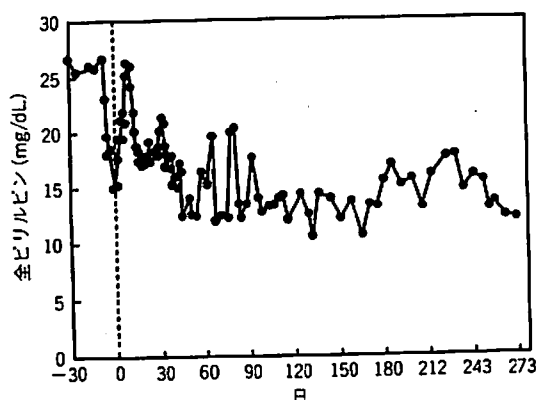


図5 Crigler-Najjar 症候群患者の肝細胞移植後血清ビリルビン値の推移¹⁷⁾

症候群 I 型の少女に同種肝細胞門脈内移植を試みた。肝細胞は肝移植に用いられなかった肝臓より分離し、超音波ガイド下に門脈左枝に留置したカテーテルから、15 時間かけて 2.8×10^{11} 個の肝細胞を門脈内に移植した。移植後の免疫抑制は FK-506 を使用しており、移植後血清ビリルビン値は 27 mg/dL から漸減し、移植 6 カ月後には 10.6~14.0 mg/dL と安定し (図 5)、光線療法 の頻度も移植前の 50% にまで減少させることができた と報告している¹⁷⁾。

以上のように、移植肝細胞は臨床応用においても良好な肝細胞機能を発現し、部分的かつ一時的ではあるが先天性代謝異常の是正が可能であることが証明された。

おわりに 急性肝不全に対する肝細胞移植は、現在臨床応用が進められているバイオ人工肝臓のような複雑かつ高価なシステムが不要で手技も簡便であるため、肝移植までの bridge-use としての役割が期待される。しかし、bridge-use 以外の臨床応用には、ラットなどの小動物を用いた実験では、安全性のみならず有用性などの検討も不十分であり、大動物を用いて移植細胞数、移植部位、移植時期などを詳細に検討する必要がある。

Grossman らが試みたような遺伝子導入自己肝細胞移植は、免疫抑制を必要とせず移植肝細胞の生着が確実であることから、もっとも現実的な方法と思われる。今後は、移植肝細胞の増殖促進法との組合せにより、生

着肝細胞数を増加させたり、生体適合性の高い特殊な細胞外接着基質を用いることにより、移植可能肝細胞数の増加を図り、さらに良好な成績が得られるものと期待される。

本稿で紹介した筆者らの研究の一部は日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業 (JPSP-RFTF 96100202) の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Mito, M., Kusano, M., Sawa, M.: *Transplant Rev.*, 7, 35-43 (1993)
- 2) Sutherland, D. E. R., Numata, M., Matas, A. J., Najarian, J. S. et al.: *Surgery*, 82, 124-132 (1977)
- 3) Hirai, S., Kasai, S., Mito, M.: *Eur. Sur. Res.*, 25, 193-202 (1993)
- 4) Eguchi, S., Lilja, H., Demetriou, A. A., Rozga, J. et al.: *J. Surg. Res.*, 72, 112-122 (1997)
- 5) Nakamura, J., Okamoto, T., Chowdhury, J. R., Fox, I. J. et al.: *Transplantation*, 63, 1541-1547 (1997)
- 6) Arkadopoulos, N., Lilja, H., Demetriou, A. A., Rozga, J. et al.: *Hepatology*, 28, 1365-1370 (1998)
- 7) Roger, V., Balladur, P., Honiger, J., Nordlinger, B. et al.: *Ann. Surg.*, 228, 1-7 (1998)
- 8) Birraux, J., Genin, B., Sinigaglia, C., Le Coultre, C. et al.: *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 8, 224-229 (1998)
- 9) Habibullah, C. M., Syed, I. H., Qamar, A., Taher-Uz, Z. et al.: *Transplantation*, 58, 951-952 (1994)
- 10) Strom, S. C., Fisher, R. A., Ham, J. M., Posner, M. P. et al.: *Transplantation*, 63, 559-569 (1997)
- 11) Benedetti, E., Kirby, J. P., Asolati, M., Pollak, R. et al.: *Transplantation*, 63, 1206-1209 (1997)
- 12) Ilan, Y., Roy-Chowdhury, N., Prakash, R., Roy-Chowdhury, J. et al.: *Transplantation*, 64, 8-13 (1997)
- 13) Oren, R., Dabeva, M. D., Petkov, P. M., Shafritz, D. A. et al.: *Hepatology*, 29, 75-81 (1999)
- 14) Jiang, B., Sawa, M., Yamamoto, T., Kasai, S. et al.: *Transplantation*, 63, 131-135 (1997)
- 15) Nakazawa, F., Sawa, M., Kasai, S., Mito, M. et al.: *Hepatology*, 26, 437-443 (1997)
- 16) Grossman, M., Rader, D. J., Raper, S. E., Wilson, J. M. et al.: *Nature Med.*, 1, 1148-1154 (1995)
- 17) Fox, I. J., Chowdhury, J. R., Kaufman, S. S., Strom, S. C. et al.: *N. Eng. J. Med.*, 338, 1422-1426 (1998)