

AMCoR

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

日本アフェシス学会雑誌 (2002.05) 21巻2号:127~131.

肝細胞移植と肝の再生医学

小野寺一彦, 葛西眞一

肝細胞移植と肝の再生医学

小野寺 一彦・葛西 眞一

旭川医科大学第二外科

Hepatocyte Transplantation and Hepatic Regenerative Medicine

Kazuhiko Onodera and Shinichi Kasai

The Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College

Summary Although hepatocyte transplantations have been expected to be a potential clinical treatment for patients with fulminant hepatic failure and inborn errors of metabolism because of their efficacy demonstrated in several animal models, a reliable long-term correction of inherited metabolic liver disorders has not yet been proven in humans. Problems still exist: the percentage of engraftment of functional donor hepatocytes is very small, and allogeneic hepatocytes are immunogenic not tolerogenic and stimulate strong cell-mediated host-immune responses. Recent progress in gene technology and regenerative medicine offer new ideas toward increasing the number of donor cells or inducing the efficient regeneration of transplanted hepatocytes. Three components such as growth factors, cell resources (fetal hepatic tissue, hepatic stem cell, embryonic stem cell, mesenteric stem cell, immortalized hepatic cell), and scaffolds are discussed in terms of the feasible contribution to hepatocyte transplantations. Moreover, we should always be aware of the rejection, the convenience, the risk, the tumorigenicity, and the importance of bioethics when applying any new techniques to the hepatocyte transplantation system.

Key words: hepatocyte transplantation, metabolic liver disorders, regenerative medicine, hepatic stem cell, embryonic stem cell

1. はじめに

肝細胞移植は実験的にも臨床的にも、従来、コラゲナーゼ消化法によって得られた肝実質細胞を、一部では凍結保存されたものも用いているが、主には新鮮肝実質細胞として使用したものである。この方法の問題点は移植時にいちいち新鮮肝臓を要することと、移植後の新鮮肝実質細胞の生着と増殖に限界があることである。

最近、発生学の発展、それもサイトカインや転写因子を培養へ応用する技術の進歩から、自己複製能と多能性と増殖性を持ち、しかも保存がきくES細胞や成体内あるいは胎児内の幹細胞の研究が進み、肝細胞移植の分野でもこれらを用いた新たな移植システムが想定されている。その中には自己細胞の利用の可能性も秘められており、そうならば細胞移植における最大の課題である拒絶反応を回避できる。そしてこの研究は肝再生研究そのものにもおおきなインパクトを与えている。

ここでは肝細胞移植研究の変遷を顧みながら、肝細胞

を用いた細胞療法（移植や人工肝臓）から見た再生医学の寄与について検討をしてみたい。

2. 肝細胞移植の臨床応用までの変遷

肝細胞移植は、分離肝細胞を採取できるようになってから発展してきた研究分野である。Matasらは、先天的にビリルビン抱合酵素 (uridine diphosphate glucuronyl transferase) が欠損している Gunn ラットに、正常ラット肝細胞を門脈内に注入し、血清ビリルビン値が低下したことを報告した¹⁾。また Mito らは、同系ラットの脾臓内へ肝細胞を移植し2年以上すると、脾組織の赤脾髄のほとんどが肝細胞に置き換わることを組織学的に観察した²⁾。さらに Makowka らは、D-ガラクトサミン誘発肝不全ラットの腹腔内へ肝細胞移植を行い、その生存率を改善した³⁾。

大動物では十分な成果は得られなかったが、基礎研究から十数年を経て肝細胞移植の臨床応用がなされた。Mito らは肝硬変患者に自己肝細胞脾内移植を、Strom らは劇症肝不全患者に保存同種肝細胞の脾動脈内注入を、Fox らは Crigler-Najjar 症候群 I 型の

患者に同種肝細胞門脈内移植を試み、それぞれ肝機能の改善、脳症の改善、血清ビリルビン値の低下などをみている⁴⁻⁶⁾。現在、米国において劇症肝炎や Crigler-Najjar 症候群 I 型のほか、血友病やチロシン血症 1 型などに同種新鮮肝細胞や凍結肝細胞を移植してその経過が観察されているが、まだ長期にわたる効果については報告されておらず、評価が定まるには至っていない。同種移植ゆえの拒絶反応が大きな壁になっているものと思われる。自己肝細胞については準備できる細胞数に大きな制約がかかることは当然である。

一方、最近では肝細胞をターゲットとした遺伝子治療への応用も報告されている。自己の分離肝細胞へ欠損している遺伝子を導入し、体内へ移植するものである。Chowdhury らは、先天性の LDL レセプター欠損により高脂血症を呈するワタナベラビットに、LDL レセプター遺伝子を導入した肝細胞を脾内移植し、血清コレステロールレベルの低下を示し、Grossman らは、本法を家族性高コレステロール血症の患者に応用し、血中 LDL 値の低下を報告した^{7,8)}。

以上の適応疾患を考えると、急性肝不全への肝細胞移植は、自己肝温存肝移植と同様に、生命維持に必要な肝機能は移植直後に生着した肝細胞と自己肝の総和にあると考えられる。すなわち、移植時の移植肝細胞の機能が生命維持に寄与するものでなくてはならない。しかし慢性肝不全や先天性肝酵素欠損症では、移植直後に十分な機能を発揮するに越したことはないが、移植時の生命維持を担うものではなく、先述のラット脾のとおり移植した肝細胞が自然に増殖する現象があることから⁹⁾、この増殖が早まれば、移植後早期の生着肝細胞数に依存するよりもはるかに高い機能を、慢性肝不全や先天性肝酵素欠損症などの、急を要さない疾患において期待できる。つまり、可及的多数の肝細胞を脾内や門脈内に移植して高い肝機能の発揮を期待したいが、門脈圧亢進症や肺塞栓といった合併症もあるので至適移植細胞数はかなり少ない。しかも移植肝細胞の多くは壊死に陥ったり貪食されるものであり、その歩留まりはかなり低い。従って、最終的に生着した肝細胞をそこからいかに早く増殖させ、目的とする肝機能を代償する容量にできるかが、肝細胞移植が意義を持ちその臨床応用を拡げる鍵となる。しかし、いずれにしても現在肝移植や部分肝移植といった確実な治療法があるので、肝細胞移植はドナー不足を補う代替療法としての役割を越えない。

3. 移植肝細胞の増殖に関する研究

脾内肝細胞の増殖のメカニズムについて、江端らは、門脈下大静脈吻合をすると宿主肝が萎縮し脾内肝細胞が著明に肥大、増殖すること、一方門脈下大静脈交叉吻合では、宿主肝の萎縮も脾内肝細胞の増殖も起こらないこと⁹⁾、さらに草野らは移植肝細胞は、宿主肝切除の度合いに応じた強さの肝再生刺激を同調して受けることなどを明らかにした¹⁰⁾。門脈枝結紮なども同じ発想である。これらの事実から、異所性移植肝細胞も肝再生因子・抑制因子の制御を受けることが推測された。次に、肝再生を抑制する肝毒物質、2-acetylaminofluorene (2-AAF) をレシピエントに投与した後に、宿主肝の部分肝切除と同時に脾内肝細胞移植を行うと、宿主肝の再生が遅延している間、脾内の肝細胞は著明に増殖する事が判明した¹¹⁾。この増殖操作を、ビタミン C 生合成酵素欠損ラットモデルに応用したところ、全く生存率を改善できなかった通常の肝細胞移植の成績を著明に改善させることができた¹²⁾。

また、脾内肝細胞移植と同時に宿主肝切除を行い、その後 4 回にわたり CCl₄ をレシピエントマウスに筋注するという、肝障害後の肝再生を移植肝細胞に促した実験モデルでも、移植肝細胞の増殖が観察された¹³⁾。

ほかにも、前述の 2-AAF の代わりに肝細胞周期をブロックする pyrrolizidine alkaloid (Retrorsine) をラットに投与して、4 週後に 2/3 肝切除を加え DPP IV⁺ の肝細胞を DPP IV⁻ の mutant ラットの門脈内へ移植すると、2 ヶ月でほぼ全肝を移植肝細胞が占めるほど自己肝を移植肝細胞で置き換えるという報告もある¹⁴⁾。あるいは、非分泌型ウロキナーゼを肝細胞内で産生することで、内因性に慢性の肝障害を引き起こすトランスジェニックマウス (Alb-uPA) をレシピエントとして用いると、持続的な肝再生刺激が続くために、幼若マウスの脾内へ移植した肝細胞は移植後 4~5 週後には全肝の 80% までを占めるに至る¹⁵⁾。またトランスジェニックマウスを用いずに、レシピエントにこの uPA 遺伝子を導入することでも同様の現象をある程度再現できる¹⁶⁾。さらにチロシン血症タイプ 1 のマウスモデルでは fumarylacetoacetate hydrolase の欠損のために集積した物質が肝毒として作用する一方、遺伝子治療により是正された肝細胞が *in vivo* selection される¹⁷⁾。

いずれも危険な状況に肝臓が追い込まれた状況であ

り臨床に直接応用はできないが、チロシン血症タイプ1のように先天性肝酵素欠損症自体が自身の肝細胞を障害し肝再生を抑制するものであれば、最適な肝細胞移植の対象疾患なのかもしれない。

4. 肝再生因子の応用

臨床的には、肝毒物質の投与や肝を障害する遺伝子操作は採用できないと考え、肝再生因子を外來投与する試みも行われている。肝再生時の血清、EGF、HGF、HSSなどいずれも繰り返し静注することで、宿主肝に操作を加えなくともその量に応じて肝再生が起こることが示されたが、効果の持続と副作用についてさらに詳細な検討が必要である¹⁸⁻²¹⁾。

5. 肝細胞源

5.1 胎児肝細胞移植

胎児肝細胞移植はもともと骨髓移植の一つとして研究されていたが、江端らは肝細胞を生着させる目的で、胎児肝の方が成体肝より増殖が旺盛であると考え、胎生18~19日の胎児肝細胞を脾臓内へ移植して組織学的に観察した。ミンスただけの胎児肝は組織片も含まれ、細胞塊として機能が高いことや抗原性が弱いことなども推測された^{22,23)}。遺伝子導入効率では胎児肝細胞の方が成体肝細胞より優れていた²⁴⁾。

5.2 肝幹細胞

先天性肝酵素欠損症に対する肝細胞移植では、必要な機能を果たせる最小数の生着細胞でよいけれども、その機能は永続的であることが要求される。まさにこの必要最小数が最終的に賄われればよいのであるが、この永続性に立ち足る壁として、まず同種細胞を使う時の拒絶反応がある。移植肝細胞の免疫抑制は肝臓の臓器移植のようにはいかないのが現状である。そして同系、自家でも移植効率に影響する生着率と生着後増殖の課題がある。そもそも自家移植では欠損酵素を付与する遺伝子導入が必要であり、その導入遺伝子発現の永続性も要求される。まずこの拒絶と着床後増殖の問題を乗り越えるために、そして遺伝子導入の有利性からも自己肝の幹細胞を用いる方法が有望視されている。しかし実際には、成体肝幹細胞としては肝障害時にみられる oval cell や small hepatocyte があげられるが、正常肝ではまだ同定されていない。胚性肝幹細胞としては、谷口らが FACS と single cell culture 法によってマウスのそれを同定、分離、解析している段階である²⁵⁾。

またこれを肝細胞移植に利用するにはいくつかの課題があると思われる。まず第一に、移植肝細胞が生着するにはある程度の細胞数を要するので、ごくわずかしかな幹細胞が採取できないのなら幹細胞単独ではどこに移植しても着床は難しいのではないかと。まず *in vitro* で増やすにしても十分な数まで増やせるのであろうか。第二に、幹細胞単独の移植で正常に近い肝組織が構築できるかである。できなければ実質細胞や非実質細胞との混合移植となるだろうが、そうすると、従来のコラゲナーゼによる肝臓からの細胞分離の中にも幹細胞が混在していれば、結局移植細胞の内容はあまり変わらないことになる。第三に、移植された幹細胞の生体内での増加をどうコントロールし、かつ分化させて十分機能させるかである。この際 *in vitro* の方法が *in vivo* で適用できるだろうか。 *in vivo* においてはさらに複雑な調節機構があろうし、何より宿主肝が存在していることから幹細胞と競合関係が働くはずである。

いずれにしても肝幹細胞移植においてもこれらのことが動物モデルで試されていくものと思われる。もちろん、従来言われているように肝障害後肝再生が幹細胞によるならば、先述の移植肝細胞による宿主肝置換のメカニズムが解明されてくるとさらなる発展があると思う。

5.3 骨髓(造血幹)細胞

肝臓から幹細胞を分離しようとする、同種なら脳死者からの全肝を灌流することになるが、自己の肝臓からとなると肝臓を一部切除しそこから肝細胞を分離することとなり、採取に危険と煩雑さを伴う。最近、分化転化 (transdifferentiation) という、ある系統の細胞がそれとは異なる系統の細胞に分化する現象が多く報告され、肝細胞も骨髓細胞から誘導されることが示された^{26,27)}。このことは骨髓や末梢血造血幹細胞の採取手技によって自己からも肝幹細胞の元を得られる可能性を示唆している。また骨髓幹細胞は種々の臓器の損傷を修復するように働いているようでもあり、oval cell や small hepatocyte との異同にも興味もたれる。

5.4 ES細胞

胚盤胞と言われる初期胚から樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell) は万能細胞と呼ばれ、未分化状態を維持する LIF (leukemia inhibitory factor) を培地から除去したり、他の種類の細胞と共培養することで種々の分化細胞に誘導することができる。ES細胞はヒトでも1998年から樹立されているから、ク

ローン技術と組み合わせると自分のES細胞も作ることができ、これを保存しておけばいつか細胞療法が必要になった時に利用できるわけである。しかし、当然ヒトに対するクローン技術の実施は将来的にも厳しく規制される。一方、ES細胞には受精卵であることで倫理的問題があるが、卵子だけでもES細胞を樹立できるという報告もある。

5.5 不死化肝細胞

ここまでは移植肝細胞を増やすという目的のために、宿主肝臓の再生抑制操作や宿主への肝細胞増殖因子の投与、ひいては成体肝の中で増殖力の旺盛な肝幹細胞、あるいは未熟だが増殖力の旺盛な胎児肝細胞、そしてもっと発生初期のES細胞を利用するなどの発想について解説してきた。次なる発想はヒト肝細胞にSV40 Tag 遺伝子を導入して不死化して増殖力を高めて細胞療法に応用しようという小林らの研究である²⁹⁾。腫瘍化の危惧を拭うために自殺遺伝子であるHSV-TKを組み込んだり、充分増殖させた後に不死化肝細胞から不死化遺伝子を取り除けるCre/loxP システムなどの工夫が進んでいる。ヒト肝細胞なので動物での肝機能評価が難しいが、肝の非実質細胞の不死化株も開発されており、今後肝構築に向けた進展も期待される。

6. 移植部位の新設と培養形態

肝細胞移植部位としては、脾、経門脈的肝内、腹腔内のほか大網、腸間膜、腎被膜下、臍臓、肺などがあげられる。その選択には、一時的に移植肝細胞数をかせぐために多くの場所を利用しようとする場合と生着の永続性や副作用の回避に重点を置く場合がある。さらに移植部位の新設あるいは拡大のため、polyurethane form (PUF) などの人工基質や microcarrier などの接着物質を利用したり、その場に血管新生を促進するなどして、いままで生着の良くなかった場所での生着率を上げたり、そこでの機能維持を計ろうという研究もある^{29,30)}。また高い肝機能の実現のために三次元培養などの培養形態で移植する場合も着床自体に有利に働く可能性を持っている。これら肝細胞の足場 (scaffold) や培養形態の応用は人工肝の発想と共通のものである。

7. 移植時期

肝不全に対する肝細胞移植は発症時の移植となるが、致命的な先天性肝酵素欠損症では診断が確定した段階、それは出生前であってもよく、その方が望ましい疾患

もあろう。この胎児期に肝細胞移植を行うことは今日の子宮内胎児外科技術をもってすると安全かも知れず、周産期治療の意義があるかもしれない。また胎児期における移植は免疫寛容を誘導する可能性もあり、今後肝臓の発生学の進歩と相俟って話題になるかもしれない。

8. おわりに

以上、肝細胞移植を進展させる可能性のある魅力的なテクノロジーは豊富だが、肝細胞移植実験の初期に示された、単純に脾内に注入した以外全く何の処置もしなかった同系肝細胞が脾を置き換えた組織像、あるいは同種肝細胞ならサイクロスポリン A 投与の継続だけで生着延長させようとしたものを凌駕するデータはまだ上記の新しい技術からは示されてはいない。今一度、採取保存から拒絶、簡便性、危険性、腫瘍性、倫理までトータルにヒトに応用できる条件を備えた肝細胞移植法かを吟味しなくてはならない。

肝再生についても、その開始から終結までの分子生物学的機序の多くはラットやマウスの70%肝切除モデルを基にした知見であるが、今後ヒトを中心として、肝臓の幹細胞の動きのみならずサイトカインや細胞外マトリックスを含めた肝再生のメカニズムの解明が進めば、新たな肝再生促進法が開発される可能性がある。

また、アフレスシスと肝細胞移植の関係は、肝不全が肝臓の合成能と解毒代謝機能の低下によることから、ハイブリッド人工肝の根拠のごとく、その前者を主に肝細胞移植で補い、後者をアフレスシスでカバーすることにあると考えられる。この場合、肝細胞移植の効果を維持するためのアフレスシスが必要になると思われる。再生医学の進歩により肝不全の治療としてアフレスシスと肝細胞移植を組み合わせる方法がより現実的なものになっていくことが期待される。

文 献

- 1) Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, et al: Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* **192**: 892-894, 1976
- 2) Mito M, Ebata H, Kusano M, et al: Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* **28**: 499-505, 1979
- 3) Makowka L, Rotstein LE, Falk RE, et al: Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic, and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surgery* **88** (2): 244-253, 1980
- 4) Mito M, Kusano M: Hepatocyte transplantation in

- man. Cell Transplantation 2: 65-74, 1993
- 5) Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al: Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. Transplantation 63: 559-569, 1997
 - 6) Fox IJ, Roy-Chowdhury J, Kaufmann SS, et al: Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med 338: 1422-1426, 1998
 - 7) Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, et al: Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* gene therapy in LDLR-deficient rabbits. Science 254: 1802-1805, 1991
 - 8) Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al: Successful *ex-vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. Nature Genet 6: 335-341, 1994
 - 9) 江端英隆, 水戸勉郎: 脾内移植肝細胞成長, 増殖からみた門脈性因子の意義について—宿主門脈下大静脈, 端側および交叉吻合の影響—. 肝臓 22: 1493-1494, 1981
 - 10) 草野満夫, 紀野修一, 木下 透, 他: 脾内移植肝細胞の細胞動態と肝再生因子の影響. 肝臓 30: 345-351, 1989
 - 11) Finkelstein SD, Lee G, Medline A, et al: An experimental method for rapid growth of liver in spleen. Am J Pathol 119: 110-126, 1983
 - 12) 小野寺一彦, 葛西真一, 水戸勉郎: 先天性肝アスコルビン酸合成酵素欠損ラットに対する肝細胞移植. 日外会誌 96: 301-308, 1995
 - 13) Gupta S, Rajvanshi P, Aragona E, et al: Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl₄ treatment and hepatocyte growth factor infusion. Am J Physiol 276: G 629-638, 1999
 - 14) Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, et al: Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. Am J Pathol 153: 319-329, 1998
 - 15) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al: Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science 263: 1149-1152, 1994
 - 16) Peeters V, et al: Expansion of donor hepatocytes after recombinant adenovirus-induced liver regeneration in mice. Hepatology 25: 884, 1997
 - 17) Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, et al: Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nature Genet 12 (3): 266-273, 1996
 - 18) 小野寺一彦, 江端英隆, 葛西真一, 水戸勉郎: 肝再生因子投与による脾内移植肝細胞の生着と増殖の促進. 今日の移植 4: 69-73, 1991
 - 19) Kato K, Onodera K, Sawa M, et al: Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats. Biochem Biophys Res Commun 222: 101-106, 1996
 - 20) Jiang B, Sawa M, Yamamoto T, Kasai S: Enhancement of proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in cirrhotic rats by hepatic stimulatory substance. Transplantation 63: 131-135, 1997
 - 21) Nakazawa F, Sawa M, Jiang B, et al: Functional assessment of proliferating hepatocytes stimulated by hepatic stimulatory substance in ascorbic acid biosynthetic enzyme-deficient rats. Hepatology 26 (2): 437-443, 1997
 - 22) Ebata H, Mito M: Intrasplenic fetal rat hepatic tissue is transplantation. Transplantation 39: 77-79, 1985
 - 23) Ebata H, Oikawa I, Sawa M, et al: Survival of adult hepatocytes and fetal hepatic tissue transplanted into the spleens of allogeneic rats. Transplantation Proceedings 19 (1): 998-1001, 1987
 - 24) Inagaki M, Ogawa K: High sensitivity of neonatal rat hepatocytes to retroviral-mediated gene transfer and their transplantation into the spleen of adult rat. Cell Structure & Function 16 (4): 283-288, 1991
 - 25) Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, et al: Evidence for the presence of hepatic stem cells in the murine fetal liver. Transplantation Proceedings 31 (1-2): 454, 1999
 - 26) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284: 1168-1170, 1999
 - 27) Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. Nature 406: 257, 2000
 - 28) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al: Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science 287: 1258-1262, 2000
 - 29) Nakazawa F, Onodera K, Kato K, et al: Multi-local hepatic transplantation for treatment of congenital ascorbic acid deficiency rats. Cell Transplantation 5 (5 Suppl 1): S 23-25, 1996
 - 30) Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D, et al: Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. Science 233: 1190-1192, 1986