

# 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発
2. 研究開発代表者：坂井田 功（山口大学 大学院医学系研究科）
3. 研究開発の成果

## I. 「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）に基づく第二種再生医療等提供計画申請」

再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）に則り、安全キャビネット版「非代償性肝硬変患者に対する培養自己骨髄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」の第二種再生医療等提供計画について、大阪大学第一特定認定再生医療等委員会の審査を経て厚生労働省（中国四国厚生局）に申請し、平成 27 年 11 月 15 日に承認を得た（計画番号 PB6150001）。

また、培養骨髄間葉系細胞の肝動脈投与がより効率的である可能性が見出され、平成 28 年度の「アイソレーターを用いた非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄間葉系細胞・非凍結・肝動脈単回投与療法」の安全性評価を目的とした新規臨床研究計画の申請に向けて、品質評価試験を含めたコールドランを実施し、SOP 書類の整備を行った。

## II. 「より効率的な培養ヒト骨髄間葉系細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法のための最適な投与方法および細胞保存法の確立」

### 1. イヌ肝線維化モデルにおける細胞投与ルート比較（末梢静脈または肝動脈ルート）

イヌ肝線維化モデルに対して培養骨髄間葉系細胞を末梢静脈または肝動脈から投与し、培養骨髄間葉系細胞投与 4, 8, 12 週後の肝機能および肝線維化を評価した。結果、末梢静脈投与、肝動脈投与ともに肝機能および肝線維化改善を認めたが、末梢静脈投与と比較し、肝動脈投与では改善効果が高く、12 週間以上のより長期に効果が持続することが明らかとなった。

### 2. 最適な細胞保存技術の確立

これまでの検討で細胞生存率について有用な結果を得た「CP-1 液とヒト血清アルブミン液の混合液」を用いた細胞保存法の有効性が担保される保存期間を決定するため、3, 6, 9, 12 ヶ月間凍結保存した培養ヒト骨髄間葉系細胞における細胞生存率を評価した。結果、12 ヶ月間の凍結保存後も 97% 以上の細胞生存率が確保され、長期保存に対応したヒト骨髄間葉系細胞の凍結保存法を確立した。

## III. 「培養骨髄間葉系細胞投与による肝線維化改善効果のメカニズム解析」

### 1. in vivo 骨髄間葉系細胞の肝内分布および MMP 発現の解析

四塩化炭素誘導マウス肝線維化モデルにヒト培養骨髄間葉系細胞を投与すると、同細胞は肝内の線維化領域に接して分布し、周囲に食食後の大型のマクロファージを多数認めた。これらのマクロファージで MMP9 発現を認めており、骨髄間葉系細胞による肝線維化改善効果のメカニズムとして、マクロファージの遊走・食食、MMP 産生促進効果が示唆された。

### 2. in vitro 共培養システムを用いた骨髄間葉系細胞と肝非実質細胞の細胞間相互作用の解析

リポポリサッカライド（LPS）刺激により炎症性マクロファージを誘導し、培養骨髄間葉系細胞と非接着共培養すると、マクロファージにおける MMP12, MMP13 発現の増加を認め、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  発現は低下し、ケモカイン MCP-1 発現は増加した。以上より骨髄間葉系細胞由来の液性因子による抗炎症効果、マクロファージの遊走・MMP 産生促進効果が示唆された。