

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
研究分担報告書

「脂肪組織由来間葉系幹細胞からの迅速肝細胞分化誘導」に関する研究

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療研究センター研究所  
細胞組織再生医学研究部・部長

**研究要旨：**

目的：脂肪組織由来間葉系幹細胞からの迅速かつ高機能な肝細胞の分化誘導  
方法：ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に対して、Banasらが2009年にJ Gastro Hepatolに報告した三段階誘導法を検証するとともに、第一段階においてNTP付加型タンパク質の添加による細胞への影響を検証した。  
結果：5種類のヒト脂肪由来間葉系幹細胞を使用した。細胞成長因子やサイトカインに対する反応性がそれぞれ異なることが判明した。NTP付加型タンパク質の導入そのものによる細胞への影響については問題なかった。  
考案：ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、最初の内胚葉への分化ステップが重要であり、導入する転写因子の種類と至適濃度をさらに詳しく検討する必要がある。

**A.研究目的**

本研究計画では3段階の肝細胞分化誘導法と新しい蛋白導入法を組み合わせ、肝細胞への分化の鍵となる転写因子等を導入することで、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞からより高機能な肝前駆細胞や肝細胞へ分化誘導する方法を開発することを目的とする。

**B.研究方法**

**a. 三段階分化法による肝細胞の分化誘導**

**法：**ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に対して、Banasらが2009年にJ Gastro Hepatolに報告した三段階誘導法の分化誘導効率を検証、確認するために、市販のヒト脂肪組織由来幹細胞含む5株の細胞を用いて三段階誘導法を行い、それぞれ処理の第一段階の3日目、第二段階の10日目、そして第三段階の4日目で細胞を回収し、RT-PCR法を用いてHNF-1、HNF-3、HNF-4、HEX、およびAlbumin、TPOの発現を調べ

た。

**b. 分化誘導NTP付加型タンパク質による**

**影響を検証：**三段階誘導法の第一段階においてNTP付加型タンパク質の添加による影響を検証するために、96wellのマルチプレートに1wellあたり5000個のヒト脂肪細胞由来の間葉系幹細胞を播種した。1wellあたり最大210ngまでのNTP-TEVタンパク質と最大70ngまでのNTP付加型のHNF-3またはHNF-4を加えて培養して細胞の変化を調べた。また、対照群として無処理のヒト脂肪由来幹細胞に対して同様にNTP-TEVタンパク質とNTP付加型のHNF-3またはHNF-4を添加して細胞の変化を観察した。

（倫理面への配慮）

ヒトの脂肪組織から細胞を分離したが、倫理委員会の承認を受けた上で、術前に

書面による同意の得られた患者からの検体を用いた。

### C. 研究結果

#### a. 間葉系幹細胞からより高機能な肝細胞の分化誘導法の確立

報告されている3段階のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞から肝細胞へ分化誘導する培養方法の再現および確認を行った。誘導には市販されているヒト脂肪組織由来幹細胞であるASC-F(DS Pharma)およびHADSC(Lonza)と同意を得て採取した皮下脂肪から培養した間葉系幹細胞3株など合計5株を用いた。3段階誘導法の効果を確認するために、それぞれの処理の最終日で細胞を回収し、RT-PCRを用いて遺伝子発現を調べた。その結果、大半の細胞株では第一段階においてHNF-1、HNF-3およびHNF-4

の発現を確認できず、第二および第三段階において一部の細胞株でのみアルブミンの微弱な発現を確認できた。また、第二段階の処理によって細胞死および剥離をおこす細胞株があり、ほかの細胞株においても外形上に典型的な肝臓前駆細胞に近い細胞集団と典型的な肝臓前駆細胞とは異なる細胞集団が認められるなど、三段階誘導法による分化誘導効率は細胞毎に異なり、安定しないことが判明した。

論文報告では三段階誘導法の第一段階の処理が終わる三日目にHNF-3の発現を確認できるとされていたので、第一段階においてHNF-3が発現する条件を検討した。また、肝臓発生過程では前腸内胚葉がFGFとBMPの刺激を受けて肝芽が形成するという発生学の知見から、第一段階誘導法に用いられるFgf4とActivin

Aの濃度を論文より2倍、3倍に引き上げた条件を用い、これまでもっとも良い分化誘導効率を示したヒト細胞株に対して3日間処理したのち、PCRを用いてHNF-3の発現を調べた。その結果、FGF4またはActivin Aの濃度を倍以上引き上げるとHNF-3の発現が確認され、その発現様式はActivin Aの濃度に応答して濃度依存性を示した。また、FGF4とActivin Aの濃度を同時に引き上げるとより強いHNF-3の発現を引き起こすことが確認された。

#### b. 分化誘導NTP付加型タンパク質による影響を検証

本研究ではNTP付加型タンパク質による遺伝子導入によって高機能な肝細胞の分化誘導法の確立を目指している。NTP付加型タンパク質による実験を実施する際に、まずNTP付加型タンパク質の導入そのものによる影響について検証した。96wellのマルチプレートにヒト脂肪細胞由来の幹細胞を播種し、Fgf4とActivin Aを加えると同時に切断タンパクと共にNTP付加型のHNF-3およびHNF-4を加えて培養して細胞の変化を調べた。タンパク質を加えていない細胞と比べて、一部のNTP付加型タンパク質を添加された細胞では、細胞死の減少がみられた。また、NTP付加型タンパク質が添加された細胞では顕著な変化が認められず、HNF-3およびHNF-4単独の添加ではASCに対して顕著な誘導効果が認められなかった。

## D. 考 察

ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、5種類の細胞を使用した。それぞれ細胞成長因子やサイトカインに対する反応性が異なることが判明した。特に同じ細胞でも継代による違いも認められたことから、至適条件は変わりうると認識する必要がある。特に3段階分化法の第一段階は内胚葉に分化させるための重要なステップであり、本研究の主眼とする転写因子の蛋白導入法を併用することで、この第一段階の内胚葉分化を効率的に行えると考えている。NTP 付加型蛋白導入による細胞への影響は問題ないと考えられるので、今後導入する転写因子の種類と至適濃度を詳細に検討していきたい。

## E. 結 論

ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、最初の内胚葉分化へのステップが重要であり、NTP 付加型蛋白導入法の効果が鍵を握っている。

## 研究発表

なし。

なし。

## 1.論文発表

- 2) Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 110(16):6412-7, 2013
- 3) Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, **Okochi H**, Sato S. CXCR3 Deficiency Prolongs Th1-Type Contact Hypersensitivity. *J Immunol*. 190(12): 6059-70, 2013
- 4) Kimura T, Sugaya M, Blauvelt A, **Okochi H**, Sato S. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. *J Leukoc Biol* 94(1): 137-45, 2013.

## 2.学会発表

無し。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

「大動物移植モデルを用いた分化細胞の効果と安全性評価」に関する研究

研究分担者 霜田 雅之 国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト研究長

研究要旨 本課題では、新規ペプチドベクター（NTP）付加型蛋白質を用いて「ヒト間葉系幹細胞 肝臓細胞への分化誘導」や「ヒト iPS 細胞の作成 肝臓細胞への分化誘導」するためのシステムを確立することが目的である。

分担研究者の分担は、本技術を最終的に肝硬変患者に臨床応用するために、小型動物での技術確立の次段階として中、大動物を用いた移植実験によってその有効性と安全性を検証することである。

研究方法： 中動物として、ミニブタもしくはさらに低体重のマイクロブタ、もしくはマーモセットがあるが、なかでも小型霊長類であるマーモセットに注目した。H25 年度は、基礎データ収集および実際に移植部位となる腹腔内の検証を行う。

成果、結果： H25 年度はマーモセットを用いて血液・尿検査・肝機能を含む生化学検査のデータを収集した。全身麻酔下に開腹手術を行い、肝臓および周囲血管、腹腔内臓器の検証を行った。

考察・結論：H25 年度はマーモセットを用いた基礎データの収集を行った。H26 年度からの肝障害モデル作製と移植実験を予定している。

A. 研究目的

本課題では、新規ペプチドベクター（NTP）付加型蛋白質を用いて「ヒト間葉系幹細胞 肝臓細胞への分化誘導」や「ヒト iPS 細胞の作成 肝臓細胞への分化誘導」するためのシステムを確立することが目的である。しかし、幹細胞由来肝細胞の評価を肝障害中動物モデルで行う方法は確立されていない。分担研究者の分担は、分化細胞の臨床応用のために小型動物での技術確立の次段階として中、大動物を用いた移植実験によってその有効

性と安全性を検証することである。

B. 研究方法

分化細胞の評価を行うモデルを確立する。本研究では、小型霊長類であるマーモセットに注目した。初めに、正常な個体を用いて細胞の移植実験を行い、移植方法や移植細胞の生着性、グラフト機能の評価および腫瘍化の有無や全身への遊走性などレシピエントの安全性を検証する。次段階として、肝障害モデル動物に対する移植実験を行う。まず、治療を

施さなければ致死に至る程度の肝障害モデルを作成するが、細胞移植は同所性の肝臓をターゲットに血管を通して行われるため、肝実質および血管系は保たれている必要がある。また、肝は再生能力の強い臓器であるため、軽度の障害では自己回復してしまう。移植細胞効果の評価のためには、ある程度の期間肝障害が持続することが望ましいが、まずは急性期の障害に対する効果の検証を目的として、これらの特性を踏まえて再現性の高い急性肝障害モデルを確立する。さらに、移植後の免疫抑制剤使用が必要であるので、薬剤投与法の最適化を行う。モデル確立後、細胞移植を行い、最適な移植方法、細胞量を検討し、肝機能を評価する。

年次計画は以下である。

平成25年度：正常な個体を用いて細胞の移植を行い、移植方法や移植細胞の生着性、グラフト機能の評価および腫瘍化の有無や全身への遊走性などレシピエントの安全性を検証のための実験を開始する。

平成26年度

前年度の実験を引き続き行う。  
肝障害モデルを作製する。  
肝障害モデルに細胞移植実験を開始する。

平成27年度

引き続き細胞移植実験継続  
評価項目のデータ収集

## C. 研究結果

H25年度は正常なマーマセットを用いて生理的、血液学的基礎データの収集を行った。霊長類であるマーマセットはヒトに近い生理・代謝機構をもつと考えられるが、実際にデータを評価し、文献値と比較した。特に肝機能、糖代謝、タンパク量・脂質等を評価した。これらの項目は、ヒトとほぼ同等であった。また、開腹手術を行って細胞を移植する部位となる肝臓や門脈等血管の解剖およびサイズ等の検証を行った。

また、臨床試験の際に細胞調製を行うに当たって細胞の品質管理に必要な GMP 基準を満たす細胞調製施設(CPC)を NCGM 内に稼働させた。

## D. 考察

H25年度の計画は順調に経過したが、全体の研究進捗を鑑みて時期尚早であるため、マーマセットへの移植実験は行っていない。

## E. 結論

H26年度からはマーマセットの肝障害モデル作製や移植実験を開始する予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. Tamai M, **Shimoda M**, Matsumoto S. Questionnaire Survey on the Perception of Type 1 Diabetic Patients and Family Members about Allogeneic and Bio-artificial Islet Transplantation, DNA Vaccine, and iPSC Cellular Therapy. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th AASD Scientific Meeting Seoul, Korea November 6-9th, 2013
2. **Shimoda M**, Tamai M, Matsumoto S. MOTIVATION FOR RECEIVING ALLOGENEIC AND XENOGENIC ISLET TRANSPLANTATION AMONG JAPANESE TYPE 1 DIABETIC PATIENTS. 12<sup>th</sup> CONGRESS INTERNATIONAL XENOTRANSPLANTATION ASSOCIATION

OSAKA JAPAN November 13<sup>th</sup>

3. Chujo D, Foucat E, Nguyen TS,  
Chaussabel D, **Shimoda M**, Matsumoto S,  
Yagi K, Banchereau J, Ueno H. An  
Integrated Approach to Determine  
ZnT8-specific T Cell Repertoire in Type 1  
Diabetes Patients and Healthy Adults. The  
13th International Congress of the  
Immunology of Diabetes Society Mantra  
Lorne, Victoria, Australia 7-11th December  
2013

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし