

**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

研究分担者氏名：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基本とし、第一段階において NTP 付加型の HNF-3、HNF-4 または 3 + 4 を加えて培養して細胞の変化を検討した。RT-PCR 法を用いて分化誘導処理を終えた段階の細胞において肝細胞の分化マーカーである Albumin、Alpha-fetoprotein、Tryptophan-2, 3-dioxygenase(TDO)などの発現を検討した。

【成績】

3種類のヒト脂肪由来間葉系幹細胞を使用し、NTP 付加型タンパク質の導入を試みた。HNF-3 と HNF-4 の両者を添加した場合にわずかに遺伝子レベルで TDO の発現が上昇した。

【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、NTP 付加型タンパク質の導入効率や TEV による切断効率の評価ならびに核内移行後の転写活性の評価を検討する必要があると思われた。

**A. 研究目的**

本研究計画では既報の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**

三段階分化法に NTP 付加型タンパク質を添加して肝細胞の分化誘導を検討

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基

本とした。まず Activin と FGF4 により内胚葉への分化を方向付け、次に HGF, OsM, FGF1, FGF4, Dexamethason などを添加し、最終段階で nicotinamide と Dex を加えて、間葉系幹細胞を Hepatocyte へ分化させる方法である。

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、24 well のマルチプレートに 1 well あたり 80000 個のヒト脂肪細胞由来の間葉系幹細胞を播種した。1 well 当たり最大 10 nM の NTP-TEV タンパク質と最大 30 nM までの NTP 付加型の HNF-3、HNF-4 または 3 + 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。

RT-PCR 法を用いて分化誘導処理を終えた段階の細胞において肝細胞の分化マーカーである Albumin、Alpha-fetoprotein、Tryptophan-2, 3-dioxygenase(TDO)などの発現を調べた。

(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

三段階分化法における NTP 付加型蛋白質機能評価

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など合計 3 株を用いた。

各段階における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は内在性の HNF-1、HNF-3 および HNF-4

の発現を確認できず、第三段階において ASC-F および nn-sc の細胞株でアルブミンの発現を確認できた。また、NTP 付加型タンパク質の投与によって細胞死および剥離をおこして細胞密度が低下する現象が見られ、HNF-3 および HNF-4 が投与された細胞株では Spheroid を形成しやすいという傾向が認められた。両方同時に投与された細

胞では Spheroid の形成が抑えられた。

qPCR を用いて NTP 付加型タンパク質投与の効果を見ると、HNF-3 および HNF-4 の単独投与では Albumin および Alpha-fetoprotein などの発現に低下傾向がみられたが、Tryptophan-2, 3-dioxygenase(TDO)の発現は影響されなかった。しかしながら、HNF-3 と HNF-4 の増加が認められなかったのに対し、HNF-3 と HNF-4 同時投与された細胞では TDO 発現の若干の増加が認められた。

### D. 考 察

NTP 付加タンパク質の投与によって三段階誘導法で処理された脂肪組織由来幹細胞の分化誘導に変化が生じたことが認められた。これまでのところ HNF-3 と HNF-4 の投与での明らかな分化促進効果は認められておらず、両者の同時投与でわずかに TDO の発現上昇が認められ、分化促進作用が認められた。今後 NTP 付加型タンパク質の導入効率や TEV による切断効率の評価ならびに核内移行後の転写活性の評価を検討する必要があると思われる。

### 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、NTP 付加型蛋白導入法を試みた。さらなる検討が必要である。

#### 研究発表

なし。

#### 1.論文発表

なし。

様式 3

**2.学会発表**

なし。

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし。