

令和元年5月17日現在

機関番号：20101
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K19703
研究課題名(和文)胆汁排泄路を有する肝組織モデルの作成

研究課題名(英文)In vitro reconstruction of hepatic tissue

研究代表者
三高 俊広(Mitaka, Toshihiro)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50231618
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝細胞(または小型肝細胞)と胆管上皮細胞をコラーゲンゲル上で共培養し、Matrigel含有コラーゲンゲルを重層することで、毛細胆管と胆管が接続した胆汁排泄路を持つ類肝組織を形成する手法を開発した。小型肝細胞の親細胞に相当するラット肝前駆細胞(Hepatocytic parental progenitor cells; HPPCs)は laminin111依存性に Integrin beta1シグナルを介して self-renewal 能が維持され、不均等分裂により娘細胞を産生することを見出した。肝細胞を in vitro で増幅させる手法の開発に繋がる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
肝細胞中に self-renewal 能を有する肝前駆細胞(HPPCs)が存在することが分かり、ヒト肝細胞中からも HPPCs を分離増殖させられる可能性がでてきた。またヒト肝細胞を増殖させ胆管を組み込んだ類肝組織を形成することにより、排泄された胆汁が胆管に流れ、その毒性が軽減され、高分化機能を維持したまま長期培養出来ることが期待される。更に、生体内と同様に代謝され胆汁中に排泄された薬剤代謝物の回収が可能になる。この成果は、これまで動物個体を使うしかなかった創薬研究の key になる ADME を in vitro で代替出来る可能性と人工臓器の開発に繋がる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：We developed the method to reconstruct hepatic organoids consisting of mouse hepatocytes and cholangiocytes, which could drain bile juice into bile ducts from bile canaliculi formed by hepatocytes. Cholangiocytes are cultured on collagen gel and then hepatocytes are added. After collagen gel containing Matrigel is overlaid on the cells, hepatic organoids with the connections between bile canaliculi and bile ducts are formed within 2 weeks. Hepatocytic parental progenitor cells (HPPCs) with self-renewal capability exist in a population of small hepatocytes, which is a subpopulation of mature hepatocytes. HPPCs could be passaged several times with maintaining their abilities of basic hepatic functions and production of progeny. Self-renewal capability of HPPCs is maintained when they are cultured on laminin 111, which transduces the signal via integrin beta1.

研究分野：実験病理学

キーワード：小型肝細胞 胆管上皮細胞 毛細胆管 胆管 ヘリング管 胆汁 組織構築 細胞培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肝機能不全患者に対する治療は、肝移植しかないが移植希望者に対するドナー肝臓は圧倒的に不足している。肝細胞移植や人工肝臓がその代替療法として期待されているが、未だ治療法として確立していない。肝細胞移植の問題点はドナー細胞数の確保であるが、機能を補完できるだけの細胞数を肝臓内に配置するための手法の開発はさらに重要である。iPS細胞が樹立され、実用に足る肝細胞の創生も近い。一方、人工肝臓は世界的に研究されいくつかの装置による臨床試験も行われたが、効果は認められず、近年は研究が進んでいない。一番大きな問題は、肝細胞機能を有する細胞を数日すら維持できないということである。

肝小葉において肝細胞は1~2細胞の厚さで索状の形態をとり、細胞間には毛細胆管が形成される。毛細胆管は胆汁を胆管へ輸送するのが主要な機能であるが、胆汁が毛細胆管内にうっ滞する状態になると肝細胞に障害を与え、肝機能低下の原因となる。我々は、小型肝細胞が類肝組織を形成し、高い分化機能を発揮するようになると胆汁を蓄積する嚢胞構造が出現し、機能が長期間維持されることを見出した。このことは培養細胞の肝細胞機能を長期間維持するためには、胆汁の処理が重要であることを示唆している。成熟肝細胞では、コラーゲンゲルのサンドイッチ法やスフェロイド形成などにより組織化させても、毛細胆管様構造は形成されるが、胆汁排泄機構が発達しているか不明である。これまで成熟肝細胞を用いても長期間肝機能を維持することができなかった原因の一つはこの点にあると考えられる。

2. 研究の目的

我々は胆汁排泄機能を持つ小型肝細胞由来の類肝組織の培養法 (Mitaka Tet al. Hepatology 1999) と胆管上皮細胞からの細胆管形成法 (Hashimoto W et al. Am J Pathol 2008) を別々に開発し、組織再生手法のノウハウを培ってきた。本研究の主たる目的は、これらの両培養法を組み合わせ、毛細胆管と細胆管を *in vitro* で結合させ、胆汁排泄路を有する類肝組織を効率的に作成する手法を開発することである。効率化のために、微細加工技術を利用して最適なデバイスを作成し共培養可能な培養装置を開発する。小型肝細胞は索状構造を形成する能力を有していることがわかっており、その能力を活かすデバイスの設計が必要である。単純に小型肝細胞と胆管上皮細胞を共培養しても毛細胆管と胆管は結合しないので、結合する手法を開発すること、加えて細胆管と胆嚢に模した嚢胞を形成させる方法を開発し、細胆管と結合し胆汁を蓄積するシステムを作成することを目的とする。

3. 研究の方法

研究内容と研究者を4つのパートに分けて研究を開始した。

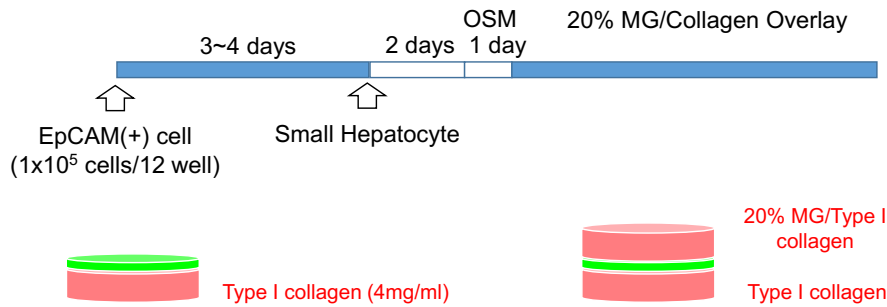
- 肝前駆細胞培養と類肝組織形成（三高、市戸、谷水、吉川）
- 胆管上皮細胞培養と細胆管形成（谷水、須藤、市戸）
- 培養デバイスの設計と作成（須藤）
- デバイスを用いた組織化と機能評価（谷水、市戸、須藤、三高）

研究を進める過程で判明したことに伴い、優先順位をつけて研究を進めた。

- (1) ラット胆管上皮細胞で確立していた管腔構造を有する胆管作成法をマウス胆管上皮細胞に応用して、管腔構造を有する胆管形成法を確立した。
- (2) マウス成熟肝細胞又は小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養により、毛細胆管と胆管が接続した類肝組織の作成に成功した。
- (3) 当初の計画に従い、培養デバイスの試作品を作成し、共培養に用いた。しかしながら、毛細胆管と胆管を接続することは出来なかった。まずは毛細胆管と胆管が接続する条件を確立し、その接続構造に即したデバイスの設計が必要であった。理論的なデバイス設計に細胞を合わせることは出来ないことが判明したことから、培養デバイスを用いた培養は、両組織の接続条件が判明してから行うことにした。
- (4) 肝前駆細胞に存在する self-renewal 能を有する細胞 (Hepatocytic parental progenitor cells; HPPCs) の継代培養法とその能力維持機序を解明すること、前駆細胞から成熟化させる方法の研究を行った。

(1) 肝細胞と胆管上皮細胞による胆汁排泄機能を持つ類肝組織の形成

- ① 健全な雌成体マウス肝臓からコラゲナーゼ2段階灌流法を用いて細胞を分離した。肝細胞を剥離した残渣から EpCAM 陽性胆管上皮細胞を分離した。
- ② 12well plate を用い Type I collagen (4 mg/ml) でゲルを作成する。ゲル上に胆管上皮細胞を 1×10^5 細胞/well で播種し、3~4日培養。肝細胞 (小型肝細胞) を胆管上皮細胞の上から播種し、肝細胞を胆管上皮細胞と接触するようにして培養する。
- ③ 2日間培養後、Oncostatin M (OSM ; 10 ng/ml) を24時間添加する。
- ④ 20% (v/v) Matrigel を含む type I collagen (1.6 mg/ml) を重層する。
- ⑤ 3~4時間静置しゲル化後、ITS, Dexamethasone, 1%DMSO を培地に添加し、培養。



(2) **HPPCs の self-renewal 能維持機序の解明**

- ① **Male F344 rat (8~10 weeks old)**肝臓をコラゲナーゼ 2 段階灌流法を用いて灌流し、小型肝細胞画分を分離する。ヒアルロン酸コート培養皿上で 9 日間無血清培養し、小型肝細胞コロニーを形成させる。
- ② **cell dissociation solution + hyaluronidase** 液でコロニーを分離し、攪拌して単一細胞にした後、抗 **CD44** 抗体を用いて **MACS** 法により **CD44** 陽性細胞を単離する。
- ③ **Matrigel** コート培養皿上に播種し、4 週間培養すると **HPPCs** のコロニーが出現する。
- ④ **Trypsin** で細胞を剥離し、**Matrigel, laminin111, Laminin511** を塗布した培養皿上に播種し、4 週間培養する。

4. 研究成果

(1) **肝細胞と胆管上皮細胞による胆汁排泄機能を持つ類肝組織の形成**

肝細胞を播種して 1 日目には、胆管上皮細胞集塊に接して (小型) 肝細胞が接着していることがわかる (図 1 左-挿入図)。

図1 胆管上皮細胞と小型肝細胞の共培養

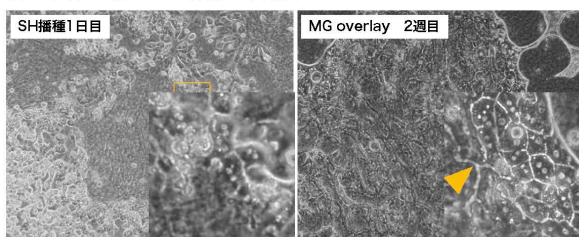
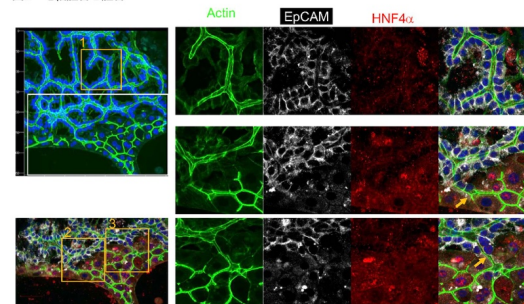


図2 毛細胆管と胆管



Matrigel 含有コラーゲングルを重層後、胆管上皮細胞は、徐々に細い管腔構造を持つ胆管を形成する。小型肝細胞は敷石状に配列し、細胞間に毛細胆管を形成する (図 1 右-挿入図)。矢頭で示す部分は、胆管上皮細胞部分に毛細胆管が侵入しているように見える。

胆管と毛細胆管の接続部を詳細に解析した。胆管上皮細胞は **EpCAM** 陽性で示し、肝細胞は **HNF4α**陽性として識別し、**Actin** を強発現している毛細胆管と胆管の関係を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。図 2 の 2, 3 の merge 写真上に矢印で示した部分に毛細胆管と胆管の接続が認められた。

機能的に毛細胆管と胆管が接続しているか検討するために、培養液中に **Fluorescein Diacetate (FD)** を投与し、胆管に **Fluorescein** が排泄されるか検討した。

図3 類肝組織と胆管への蛍光色素(Fluorescein)の排泄

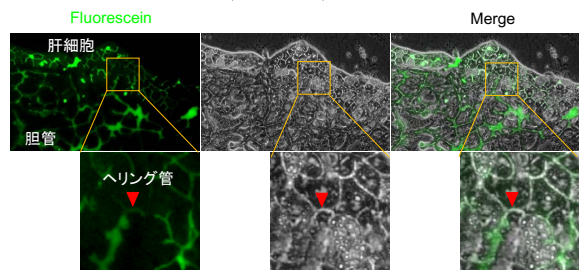
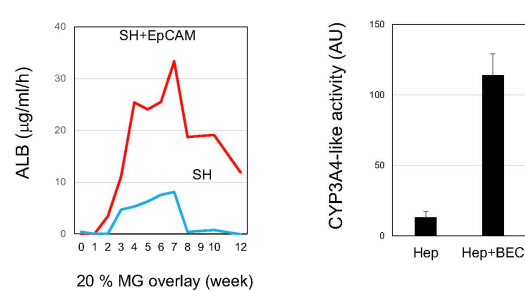


図4 小型肝細胞の肝細胞機能に対する胆管上皮細胞の影響



FD は、肝細胞に取り込まれ蛍光色素である **Fluorescein** に代謝される。**Fluorescein** は **MRP2** を介して毛細胆管内に排泄される。図 3 で示すように緑色の蛍光色素により毛細胆管と胆管が染色されており、毛細胆管と胆管が機能的に接続していることがわかる。

肝細胞単独からなる類肝組織では、毛細胆管内に胆汁が蓄積し、長期間培養すると肝機能が徐々に低下し、肝細胞死が認められるようになる。胆汁が胆管内に運搬され、胆汁の毒性が軽

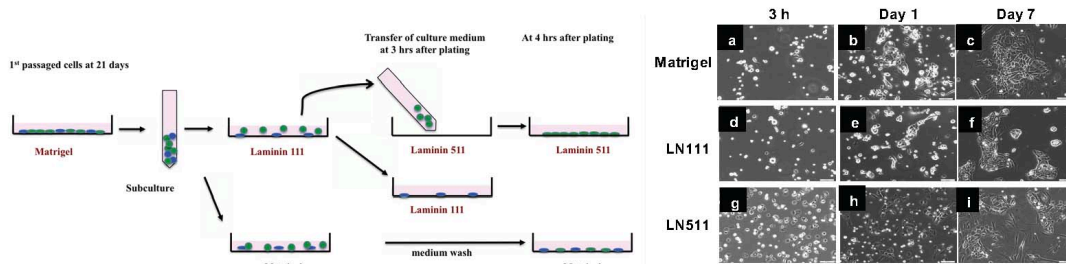
減したと考えられる胆管と肝細胞からなる類肝組織で肝細胞機能が維持されるか検討した。

図 4 で示すように、肝細胞と胆管細胞からなる類肝組織では、アルブミンの分泌量が肝細胞単独に比較して4倍以上高まり、10週間以上高いレベルを維持出来た。また薬物代謝酵素の一つCYP3A4活性も約10倍上昇した。これらの結果は、胆汁を処理することにより、高度の肝細胞機能を長期間維持させることが可能になることを示唆している。本研究成果は、公表前に特許出願した(特願2019-52282)。

(2) HPPCsのself-renewal能維持機序の解明

Matrigelに播種したCD44陽性小型肝細胞を4週間無血清培養するとHPPCsのコロニーが出現する。コロニーをTrypsinで処理し、単離した細胞をLaminin111上に播種し3時間後に付着しなかった細胞を回収し、Laminin5111上に播種して培養する(図5)。コントロールとして

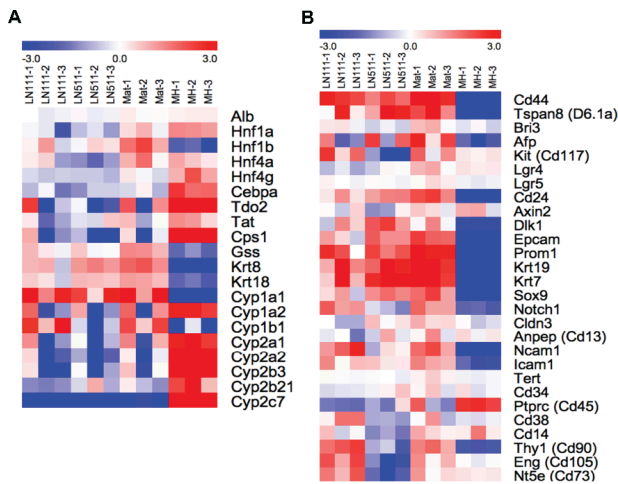
図5 HPPCsのLaminin111依存性増殖



Matrigel上に播種する。

Laminin111及びMatrigel上では、HPPCsは小型の形態を維持し、5代まで継代可能であった。Laminin111に接着しなかった細胞はLaminin511に接着し増殖するが、コロニーは大型の細胞からなり継代培養できなかった。それぞれの基質で培養した細胞の遺伝子発現をマイクロチップ(Agilent)で解析すると、Laminin111及びMatrigel上で培養した細胞はLaminin511に比べて肝分化関連遺伝子や幹細胞に関連した遺伝子をより高く発現していた(図6)。

図6 Matrigel, Laminin111及びLaminin511上でのHPPCsの関連遺伝子発現

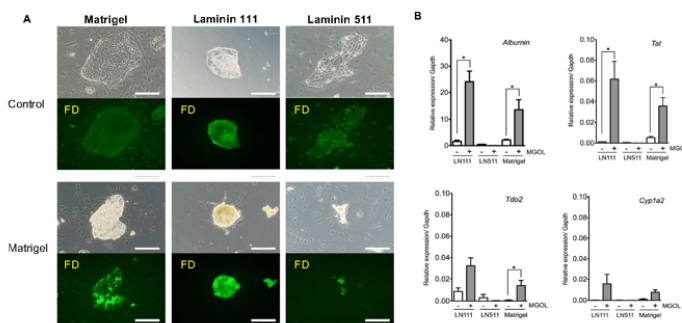


HPPCsがLaminin111依存性増殖を示すことから、受容体であるIntegrinの発現を調べるとHPPCsではIntegrin $\beta 1$ の発現がLaminin511上の細胞に比べて高く、一方Integrin $\alpha 6$ と $\beta 4$ の発現は低かった。

HPPCsを抗Integrin $\beta 1$ 抗体で処理すると、HPPCsは増殖できずコロニー形成は見られなかった。また抗Laminin111抗体で処理すると、HPPCsは接着できず、増殖してコロニーを作ることが出来なかった。

HPPCsにMatrigelを重層すると3次元化し、成熟化した肝細胞間に毛細胆管網が形成される。Fluorescent diacetateは代謝され毛細胆管内に排泄されることも確認した(図7)。一方、Laminin511上に形成されたコロニーでは3次元構造は誘導出来ず、毛細胆管の形成も見られなかった。

図7 HPPCsのMatrigelによる成熟化誘導に対する応答性



裂を行い、Laminin511依存性の娘細胞を作ることが分かった。またLaminin511/521上では、コロニー形成出来ないことから、Laminin a5鎖の存在によりHPPCsとしての機能が抑制されることが示唆された。本研究成果は、現在論文投稿中である。

HPPCsはLaminin111依存性にIntegrin $\beta 1$ を介するシグナルによりself-renewalしている。HPPCsは、増殖過程で不均等分

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- ① Kino J, Ichinohe N, Ishii M, Mitaka T. Isolation and expansion of rat hepatocytic progenitor cells. *Methods Mol Biol*, 1905: 29-41 (2019) doi: 10.1007/978-1-4939-8961-4_4. 査読有
- ② Tanimizu N. Identification and in vitro expansion of adult hepatocyte progenitors from chronically injured liver. *Methods Mol Biol*, 1940:267-273 (2019) doi: 10.1007/978-1-4939-9086-3_19. 査読有
- ③ Sudo R. Reconstruction of Hepatic Tissue Structures Using Interstitial Flow in a Microfluidic Device. *Methods Mol Biol*, 2019;1905:167-174. doi: 10.1007/978-1-4939-8961-4_15. 査読有
- ④ Tanimizu N, Ichinohe N, Mitaka T. Intrahepatic bile ducts guide formation of the hepatic nervous system in developing mouse liver. *Development*, Apr25; 145 (9) pii: dev159095 (2018) doi: 10.1242/dev.159095 査読有
- ⑤ Ishii M, Kino J, Ichinohe N, Tanimizu N, Ninomiya T, Suzuki H, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatocytic parental progenitor cells of rat small hepatocytes maintain a self-renewal capability after long-term culture. *Sci Rep*, Apr 11; 7: 46177 (2017) doi: 10.1038/srep46177 査読有
- ⑥ Tanimizu N, Mitaka T. Epithelial morphogenesis during liver development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(8). pii: a027862 (2017) doi: 10.1101/cshperspect.a027862.1101/cshperspect.a027862 査読有

〔学会発表〕(計 31 件)

- ① 谷水直樹、三高俊広. シンポジウム 18「Ex vivo での機能的な肝組織の再構築」SY-18-4「Ex vivo における肝臓の上皮組織構造の再構築」第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年 3 月 21 日～23 日 (3/22 発表) 神戸国際展示場、神戸市
- ② 須藤 亮. シンポジウム 18「Ex vivo での機能的な肝組織の再構築」SY-18-5「微小血管網と三次元肝細胞組織を組み合わせた組織工学的手法」第 18 回 日本再生医療学会総会、2019 年 3 月 21 日～23 日 (3/22 発表) 神戸国際展示場、神戸市
- ③ 谷水直樹、三高俊広. シンポジウム (1) 肝臓構築のための基盤整備「NGF を介した肝内胆管と自律神経ネットワークの相互作用」第25回肝細胞研究会、2018年7月12-13日 (12日)、東京大学伊藤国際学術研究センター伊藤謝恩ホール、東京都
- ④ Tanimizu N, Mitaka T. “Interactions between intrahepatic bile ducts and autonomic nerves in developing and regenerating liver” FASEB SRC Fundamental Biology and Pathophysiology of the Liver, June 10-15, 2018, Scottsdale, Arizona, USA
- ⑤ 谷水直樹、三高俊広. ワークショップ「多様な臓器再生機構の解明～肝臓を対象とした基礎・臨床からのアプローチ」「肝臓の上皮細胞の分化可塑性の制御機構」Conbio2017、2017 年12月6日(水)–12月9日(土)(9日発表)、神戸ポートピアホテル、神戸市
- ⑥ 須藤亮. マイクロ流体デバイスを用いた三次元肝組織構築の取り組み. 日本薬物動態学会第32回年会、2017年11月29-12月1日 (12/1発表)、タワーホール船堀 (東京都江戸川区) 招待講演
- ⑦ 三高俊広、市戸義久、谷水直樹. パネルディスカッション 4 [肝再生研究の進歩] [肝細胞増幅方法の確立と肝細胞移植による肝再生] 第21回日本肝臓学会大会、2017年10月12日 (木) -13日 (金) (13日発表)、福岡国際会議場、福岡市、Kanzo vol.58 Supplement (2), pA523
- ⑧ 谷水直樹、三高俊広. シンポジウム 1「肝再生と肝幹細胞～肝再生における肝細胞機能と組織修復」「肝細胞のHeterogeneityと分化可塑性の制御機構」第24回肝細胞研究会、2017年6月30日(金)–7月1日(土) (30日口演)、旭川市民文化会館、旭川市、抄録集 p 27

〔図書〕(計 5 件)

- ① Tanimizu N. “Development and Regeneration of Intrahepatic Bile Ducts” Leon V. Berhardt, Ed. In *Advances in Medicine and Biology*. Volume 130, Nova Science Publishers, Chapter 6, pp. 187-216 (2018) (285 pages) ISBN: 978-1-53613-598-5
- ② Tanimizu N, Mitaka T. “Plasticity of Liver Epithelial Cells in Healthy and Injured Livers. In *Stem Cells and Cancer in Hepatology 1st Edition: From the Essentials to Application*. Ed. Yun-wen Zheng. Academic Press, p35-54 (382 pages) (2018) ISBN: 978-0-12-812301-0 doi.org/10.1016/B978-0-12-812301-0.00003-7

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：肝細胞と胆管上皮細胞の接続部構造を有する肝上皮組織の培養方法

発明者：谷水直樹、三高俊広

権利者：北海道公立大学法人札幌医科大学

種類：特許

番号：特願 2019-52282

出願年：平成 31 年 3 月 20 日

国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門
<https://www.smu-tisdevreg.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：谷水 直樹

ローマ字氏名：Naoki Tanimizu

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

職名：准教授

研究者番号：00333386

研究分担者氏名：市戸 義久

ローマ字氏名：Norihisa Ichinohe

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

職名：研究生

研究者番号：80452978

研究分担者氏名：須藤 亮

ローマ字氏名：Ryo Sudo

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号：20407141

研究分担者氏名：吉川 大和

ローマ字氏名：Yamato Kikkawa

所属研究機関名：東京薬科大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号：20274227

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。