

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19932

研究課題名（和文）肝毛細胆管・肝内胆管構造・機能のin vitro再構築

研究課題名（英文）In vitro reconstruction of functional bile canaliculus-intrahepatic bile duct structure

研究代表者

堺 裕輔（SAKAI, Yusuke）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：10608904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓をin vitroで立体再構築するためには、肝毛細胆管に蓄積する胆汁の排泄機構を再現しなければならない。本研究では、肝細胞組織体培養とリプログラミングによる胆管作製を組み合わせ、胆汁排泄機構を再現した。具体的には、既報を基に、初代肝細胞をリプログラミングしたCLiP（肝前駆細胞）から培養胆管を作製し、ヒト及びラット初代肝細胞と接着共培養して胆汁酸様蛍光試薬の排泄を実証した。すなわち、肝細胞間に形成される肝毛細胆管と培養胆管が機能的に接合していることを意味する。肝細胞は、肝特異的な遺伝子発現が上昇した。本技術は、創薬スクリーニングの肝臓モデルとして、将来的には再生医療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝毛細胆管と胆管を機能的に接合したモデルはこれまでに報告されておらず、誰も成し得なかった挑戦的かつ世界初の研究である。特に手術検体より得たヒト初代肝細胞を用いた点は、本研究の特徴である。組織工学（再生医療）分野や薬物代謝アッセイツールとして、学術面・社会面の双方に強いインパクトを与え得る。

研究成果の概要（英文）：The excretion system of bile accumulated in the hepatic bile canaliculus must be reconstructed for fabrication of the 3D liver tissue in vitro. In this study, the bile excretion system was reconstructed by combining hepatocyte tissue culture and bile duct preparation. The cultured bile ducts are prepared from CLiPs (chemically-induced liver progenitors) reprogrammed from primary hepatocytes based on the previous report, and co-cultured with human and rat primary hepatocytes. The integrated tissue excreted bile acid-like fluorescent reagents, it means that the hepatic bile canaliculus formed between hepatocytes functionally connected with cultured bile duct. Liver-specific gene expression was enhanced by co-culture. This technology is expected to be applied to a liver model for drug screening and a regenerative medicine in the future.

研究分野：再生医工学

キーワード：肝細胞 胆管 肝毛細胆管 リプログラミング 再生医療 肝臓

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者はこれまでに、細胞シート工学と共培養技術を融合させてヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートを独自開発し、皮下に血管誘導ヒト肝組織を作製する基盤技術を確立した (Sakai Y, *et al.*, *Biomaterials*, 2015, 他)。In vitro と in vivo の双方で多岐にわたる肝特異機能の向上や微小構造の再構築を明らかにしたが、肝毛細胆管に蓄積する胆汁の排泄機構は再構築されていない。

(2) ラット胎児由来肝細胞と成熟胆管上皮細胞を共培養して組織体を形成させると、胆管様管腔構造が再構築する (Katsuda T, *et al.*, *Tissue Eng*, 2013)。また、HepG2 細胞は、インサート膜で隔離した胆管癌細胞 (TFK-1 細胞) との共培養によって、肝毛細胆管に蓄積した胆汁酸様試薬を培地中に排泄する (Takezawa T, *生物学*, 2017)。このように、肝細胞と胆管上皮細胞の共培養は、胆汁を排泄する構造・機能の統合システムの再現が期待できるにもかかわらず未だ確立されていない。

### 2. 研究の目的

(1) 肝細胞組織体培養とリプログラミングによる胆管作製を組み合わせ、肝毛細胆管-肝内胆管構造・機能を in vitro で再構築する。

(2) 胆汁排泄を実証し、肝細胞の肝特異機能発現を向上させる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝細胞スフェロイドの作製

NC 型微細加工機を用い、直径 300  $\mu\text{m}$ 、深さ 300  $\mu\text{m}$ 、ピッチ 330  $\mu\text{m}$  の条件で U 字底のマイクロウェルをアクリルに切削した (チップ当たり 1020 well/cm<sup>2</sup>)。ポリジメチルシロキサン (PDMS) で複数回転重合し、PDMS 製マイクロウェルチップを作製した。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC; リピジュア) をコーティングし、細胞非接着処理を行った。Cholyllysyl-fluorescein (CLF: 肝細胞に取り込まれ毛細胆管に排泄される胆汁酸類似蛍光試薬) を取り込ませたラット初代肝細胞を  $1.7 \times 10^5$  cells/chip で播種し、3 日間培養して球状細胞組織体 (肝細胞スフェロイド) を作製した。共焦点レーザー走査型顕微鏡で CLF の局在を解析した。

#### (2) Chemically-induced Liver Progenitor (CLiP) の作製

ラット初代肝細胞を  $0.1 \sim 5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> でコラーゲンコートディッシュに播種し、3 つの低分子化合物 (ROCK 阻害剤、TGF- $\beta$  阻害剤、GSK3 阻害剤) を添加した DMEM/F12 培地で培養して CLiP (肝前駆細胞) にリプログラミングした。これにより、単位細胞数あたりの低分子化合物の供給量を制御した。

シリコン基材で培養面積を区画し (0.2~9.6 cm<sup>2</sup>)、いずれの条件でも  $0.1 \times 10^4$  cells 播種することで肝細胞の局所密度を  $0.1 \sim 5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> とした。これによって、培養系内の低分子化合物供給量を一定にし、肝細胞間の接着環境を制御した。

培養 7 及び 14 日目に RNA を回収し、肝成熟マーカーである Alb、肝前駆・幹細胞マーカーである Ck19 及び Afp、胆管上皮細胞マーカーである Aqp 及び Cftr の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。ハウスキーピング遺伝子として、Gapdh を用いた。

#### (3) CLiP 由来胆管様組織 (培養胆管) の作製

ラット初代肝細胞を  $0.25, 1.0, 5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 12 日間培養してラット CLiP (それぞれ rCLiP-0.25, rCLiP-1.0, rCLiP-5.0) を作製した。培養 7 及び 12 日目に CLiP を回収して  $1.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> でマウス胎児由来線維芽細胞 ( $5.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) 上に播種し、マトリゲル及び低分子化合物を含む mTeSR1 培地で胆管上皮細胞へ 12 日間分化誘導した。Cell tracker orange (CTO: 生細胞トレーシング蛍光試薬) を取り込ませ、管腔構造への排泄・蓄積を蛍光顕微鏡で観察した。胆管マーカーである Aqp 及び Cftr の遺伝子発現を評価した。

(4) 培養胆管に単離したラット及びヒト初代肝細胞 ( $5.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)、並びにラット肝細胞スフェロイド (125 個/cm<sup>2</sup>) を播種した。CLF 及び Cell tracker orange (CTO: 生細胞トレーシング蛍光試薬) で共染色し、毛細胆管及び管腔構造を共焦点レーザー走査型顕微鏡で 3D 構造を観察した。肝臓特異的な遺伝子発現レベルを評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胆汁うっ滞モデル

ラット初代肝細胞はU字ボトムの中央で凝集し、培養3日目までに肝細胞スフェロイドを形成した。スフェロイド作製後にCLFを反応させたところ、表層のみで取込が確認された (Fig. 1A)。スフェロイド表層からのCLFの取り込み及びスフェロイド中心部のCLF蓄積は効率的に行われず、可視化した胆汁うっ滞モデルとして適していなかった。対照的に、CLFを単離肝細胞に取り込ませた後にスフェロイドを作製すると、スフェロイド中心部までCLFの局在を観察し得た (Fig. 1B)。

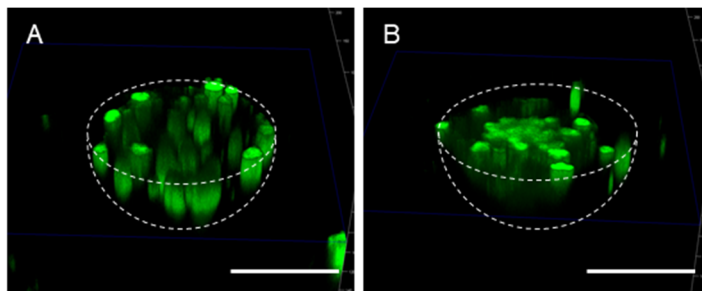


Fig.1. 肝細胞スフェロイドに蓄積したCLF (green) の3D像。(A) スフェロイド作製後にCLF取込、(B) CLF取込した肝細胞からスフェロイドを作製。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

##### (2) ラット肝細胞の播種条件による CLiP へのリプログラミング制御

いずれの条件でも、Alb は培養7日目までに劇的に減少し、かつ Ck19 や Afp は上昇しており、CLiP を作製し得た。培養系内の播種密度を変化させると、Ck19 及び Afp は低密度培養 (単位細胞数あたりの低分子化合物供給量が多く肝細胞間接着が少ない条件) において高値を示した。培養日数が経過するのに伴い Afp は上昇していることから、リプログラミングが進行して肝前駆細胞を経て、さらに肝幹細胞へ脱分化していることが示唆された。一方、胆管マーカーである Aqp は、高密度の培養環境 (単位細胞数あたりの低分子化合物供給量が少なく肝細胞間接着が多い条件) において比較的高値であった。Cftr に有意な違いはなかった。

肝細胞間接着を制御した培養条件では、いずれも Alb 発現は減少し、Ck19 発現は  $0.25 \sim 0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で緩やかなピークがみられた。一方、胆管マーカーである Aqp や Cftr 発現は、高密度の培養環境 (肝細胞間接着が多い条件) において比較的高値であった。

これらの結果から、低分子化合物の供給量が多いほどより肝幹細胞へのリプログラミングが進行することが明らかとなった。一方、肝細胞間接着は肝幹細胞への脱分化が制限され、胆管へのダイレクトリプログラミングが示唆された。肝細胞間接着は、リプログラミングと同時に TGF $\beta$  シグナルや Notch シグナル等を活性化したかもしれない。このように、CLiP へのリプログラミングの程度を制御し得た (Fig. 2)。

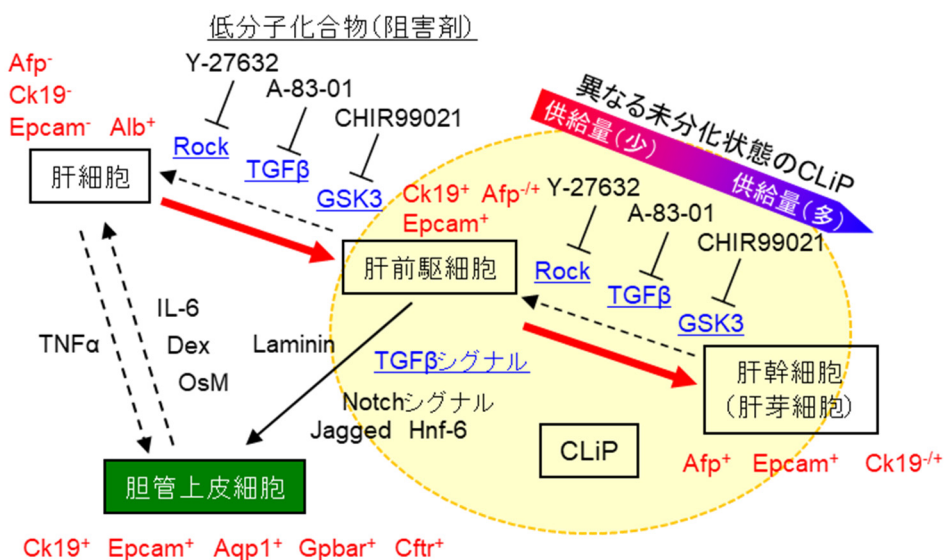


Fig.2. 低分子化合物によるラット初代肝細胞のリプログラミング。

##### (3) 効率的な CLiP 由来胆管 (培養胆管) の作製

培養12日目の rCLiP-1.0 は、MEF を利用することによって胆管形成効率が向上した。MEF の存在が Notch シグナルを活性化して分化を促進するとともに、三次元構造を裏打ちしたと考え得る。一方で、MEF や CLiP の播種密度を高くしても形成効率の劇的な向上は見られなかった。rCLiP-CN-5.0 を利用した場合、微細な管腔構造 (小型肝細胞等の肝前駆細胞から成熟化させた組織に類似) を高密度に形成することを確認したが、立体的かつ成熟した胆管様組織とは異なっ

ていた。CLiP 作製時の肝細胞播種密度を増加させたのに伴い、胆管様組織の Aqp 発現は増加したが、Cftr 発現は減少した。

胆管上皮細胞誘導培地に 3 つの低分子化合物を添加した場合、分化誘導前後で 20~35 倍の Aqp1 遺伝子発現の上昇が見られた。一方、Cftr の発現は、rCLiP-0.25 でのみ 2 倍の上昇が見られた。TGF  $\beta$  シグナルを活性化させるために TGF  $\beta$  阻害剤、もしくは全ての低分子化合物を除いた培地で分化誘導すると、Aqp1 の増減は限定的だったのに対して、Cftr はいずれも分化誘導前後で 1.5~60 倍の発現上昇が見られた。特に rCLiP-0.25 (約 60 倍) や rCLiP-1.0 (約 15 倍) で高発現しており、胆管上皮細胞への分化誘導は肝幹細胞への十分な脱分化が必要であると考えられる。しかしながら、低分子化合物を除くと、胆管様構造の形成数は劇的に減少した。

#### (4) 肝毛細胆管-培養胆管の機能的な接合

培養胆管上に単離ラット及びヒト初代肝細胞を播種して共培養すると、CLF の胆管への排泄が見られた (Fig. 3A)。すなわち、肝毛細胆管と培養胆管が機能的に接合したことを示している。肝特異的な遺伝子発現の上昇が見られた。CLF を蓄積したラット肝細胞スフェロイド (胆汁うっ滞モデル) も同様に、スフェロイド内の局在した CLF 蛍光の減衰して培養胆管に移行が見られたことから、肝毛細胆管と培養胆管が接合し、CLF 排泄が示唆された (Fig. 3B)。しかしながら、いずれも機能的な接合が示唆された肝細胞は 10%以下であり、今後は効率的な接合手法を開発する必要がある。

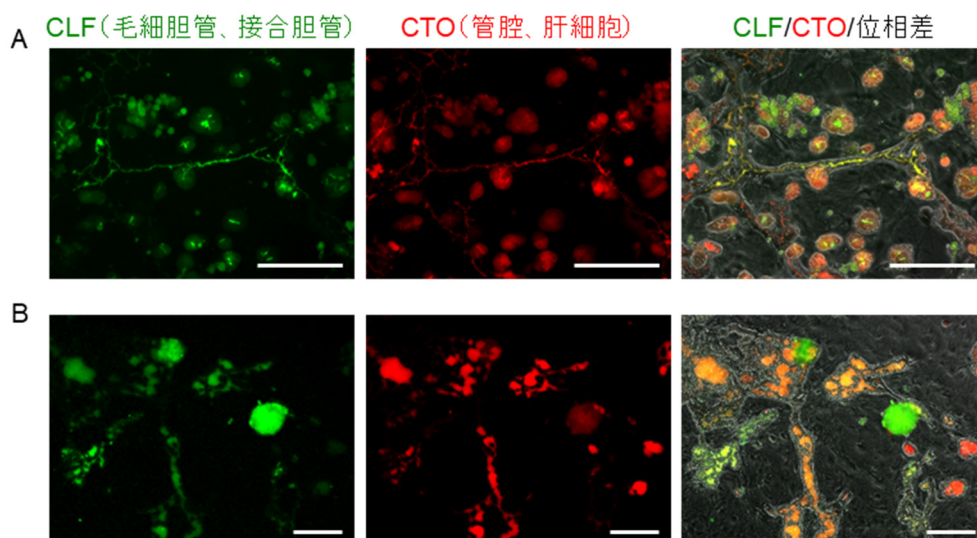


Fig.3. 肝毛細胆管と培養胆管の機能的な接合。(A) ラット肝細胞、(B) ラット肝細胞スフェロイド。スケールバーは200  $\mu$ m。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Huang Yu, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Katsuda Takeshi, Ochiya Takahiro, Gu Wei Li, Miyamoto Daisuke, Hamada Takashi, Hidaka Masaaki, Eguchi Susumu, Kanetaka Kengo, Adachi Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Bioengineering of a CLiP derived tubular biliary duct like structure for bile transport in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.27773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Huang Yu, Miyamoto Daisuke, Li Pei Lin, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Adachi Tomohiko, Soyama Akihiko, Hidaka Masaaki, Kanetaka Kengo, Gu Wei Li, Eguchi Susumu	4. 巻 51
2. 論文標題 Chemical conversion of aged hepatocytes into bipotent liver progenitor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 323 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Huang Yu, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Katsuda Takeshi, Ochiya Takahiro, Gu Wei-Li, Miyamoto Daisuke, Hamada Takashi, Kanetaka Kengo, Adachi Tomohiko, Eguchi Susumu	4. 巻 130
2. 論文標題 Differentiation of chemically induced liver progenitor cells to cholangiocytes: Investigation of the optimal conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 545 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Huang Yu, Miyoshi Takayuki, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Gu Wei-li, Eguchi Susumu	4. 巻 71
2. 論文標題 Role of HGF for reprogramming human liver progenitor cells: Non-essential but stimulative supplement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 438 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2019.03.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Huang Yu, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Katsuda Takeshi, Ochiya Takahiro, Adachi Tomohiko, Hidaka Masaaki, Gu Wei-Li, Eguchi Susumu	4. 巻 2019
2. 論文標題 Development of Bifunctional Three-Dimensional Cysts from Chemically Induced Liver Progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/3975689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakai Yusuke, Koike Makiko, Yamanouchi Kosho, Soyama Akihiko, Hidaka Masaaki, Kuroki Tamotsu, Eguchi Susumu	4. 巻 12
2. 論文標題 Time dependent structural and functional characterization of subcutaneous human liver tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 2287~2298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堺裕輔、井嶋博之、落谷孝広、江口晋
2. 発表標題 肝臓再構築に向けた研究と展望
3. 学会等名 日本再生医療学会 第1回秋季科学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Time-dependent liver-specific gene expressions of vascularized subcutaneous human liver tissue
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Huang, Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhiisa Takatsuki, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Rapid fabrication of engineered human primary hepatocyte/fibroblast sheets for prevention of postoperative hepatic insufficiency
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堺裕輔、中澤浩二、日高匡章、高槻光寿、江口晋
2. 発表標題 管腔構造を有するヒト肝細胞 / 内皮細胞索状組織作製技術の確立
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Huang, Yusuke Sakai, Takanobu Hara, Takeshi Katsuda, Takahiro Ochiya, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Spontaneous formation of three - dimensional cell cysts from chemically-induced liver progenitors
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堺裕輔、高槻光寿、江口晋
2. 発表標題 血管誘導を伴う皮下性ヒト肝組織構築での遺伝子発現解析
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堺裕輔、江口晋、井嶋博之
2. 発表標題 ヒト肝細胞複合シート作製におけるヒト線維芽細胞ドナー年齢の影響
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Huang, Yusuke Sakai, Takanobu Hara, Takeshi Katsuda, Takahiro Ochiya, Tomohiko Adachi, Wei-li Gu, Daisuke Miyamoto, Takashi Hamada, Kengo Kanetaka, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Successful bile drainage through bile duct derived from chemically-induced liver progenitors
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堺 裕輔、中澤浩二、江口晋、井嶋博之
2. 発表標題 管腔構造を有するヒト肝細胞 / 内皮細胞索状組織作製
3. 学会等名 第55回九大生体材料・力学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 シート状物貼付デバイス	発明者 堺裕輔、江口晋、丸屋安広、大橋文哉、鯨島正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-242375	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 培養組織及びその製造方法	発明者 堺裕輔、江口晋、足立智彦、黄宇	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-066417	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 肝前駆細胞を含む細胞集団を製造する方法	発明者 堺裕輔、江口晋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-068911	出願年 2019年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	江口 晋  (EGUCHI Susumu)  (80404218)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授    (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------