

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21908

研究課題名(和文)胆汁排泄を実現する肝・胆管組織工学の開拓

研究課題名(英文)Development of liver and bile duct tissue engineering for bile excretion

研究代表者

須藤 亮(Sudo, Ryo)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：20407141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体外における肝臓再生を目指す肝臓組織工学において、肝細胞に毛細胆管を形成させる培養法や胆管上皮細胞に胆管を形成させる培養法は報告されていたが、これらを融合することによって毛細胆管と胆管が直接接合した肝組織を構築する手法は確立されていなかった。本研究では、コラーゲンゲルサンドイッチ培養法を基本としたラット初代培養肝細胞および胆管上皮細胞の共培養における播種濃度やタイミングを検討することで、毛細胆管と胆管の接合を誘導し、蛍光色素の排出や免疫蛍光染色によって、胆管と毛細胆管が直接接合していることを立証した。さらに、接合位置を調節するための新たな培養デバイスを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の組織工学研究において、毛細胆管や胆管をそれぞれ個別に再構築する培養法は報告されていたが、これらを融合した胆汁排泄を実現する培養法の確立は長い間重要な課題であった。本研究により毛細胆管と胆管が直接接合した肝組織を構築する手法が明らかになったため、胆汁排泄機能を有する肝臓の再生を実現した点で、本研究の成果は肝臓組織工学において極めて重要な学術的意義を有する。また、本研究の成果によって、今後は胆汁排泄という新たな観点から創薬研究・再生医療・バイオチップの研究が展開されることが期待される点で、社会的に重要な意義も有する。

研究成果の概要(英文)：In liver tissue engineering for liver regeneration in vitro, a culture method for constructing bile canaliculi by hepatocytes and a culture method for constructing bile ducts by biliary epithelial cells have been reported. However, a method for constructing liver tissue, in which bile canaliculi and bile ducts are directly connected, has not been established. In this study, the connection of bile canaliculi and bile ducts were induced in the coculture of primary rat hepatocytes and biliary epithelial cells by investigating the seeding concentration and timing in collagen gel sandwich culture. Furthermore, we demonstrated that bile canaliculi and bile ducts are directly connected using fluorescence imaging and immunocytochemistry. A new culture device was also developed to regulate the position where bile canaliculi were directly connected to bile ducts.

研究分野：組織工学

キーワード：胆汁排泄 胆管 毛細胆管 共培養

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、生体医工学の立場から肝臓組織工学の研究に取り組んできた。これまでに肝細胞の機能を維持するために様々な三次元培養法が開発されてきたが、胆汁排泄を実現する手法は未だに確立されていない。生体内の肝臓では、肝細胞から分泌された胆汁は毛細胆管を流れていき、胆管へ合流し、肝臓外に輸送される。その後、胆汁は胆嚢に貯蓄され、最終的に十二指腸へ分泌される。胆汁は脂肪の消化や吸収に必要となるだけでなく、不要になったコレステロールや薬物代謝産物の排泄経路にもなっているため、胆汁排泄は肝細胞の機能維持のみならず、創薬研究においても極めて重要となる。しかし、胆汁の排泄経路は、「肝細胞が形成する毛細胆管」と「胆管上皮細胞が形成する胆管」が直接つながった複雑な管腔構造であるため、培養において再現することに成功した例はなく、胆汁排泄経路の構築は極めて挑戦的な課題である。

これまでの研究において、研究代表者は肝臓から小型肝細胞と呼ばれる特殊な肝細胞を分離・培養することによって機能的な毛細胆管を再生することに成功している (Sudo et al., 2004, *J Cell Physiol*; 2005, *Ann Biomed Eng*; 2005, *FASEB J*)。これらの研究によって肝細胞から毛細胆管を再生する独自のノウハウを確立した。しかし、生体内では毛細胆管を流れる胆汁が胆管へ排泄されていくのに対して、毛細胆管の培養系には胆管が欠如しているため胆汁を排泄することができない。その結果、胆汁が過度に蓄積して肝細胞にダメージを与えてしまう。そこで、胆汁の排泄経路となる胆管の再生にも取り組み、胆管上皮細胞の分離・培養法を検討した。その結果、世界に先駆けて内腔の連続した胆管を再生することに成功している (Hashimoto, Sudo et al., 2008, *Am J Pathol*)。この胆管再生技術は極めて独自性が高く、現在も国内外の他のグループから類似の報告がないため本研究に優位性がある。以上より、毛細胆管と胆管を個別に再生することが可能になったが、これらを接合させることによって毛細胆管から胆管へ胆汁を排泄することのできる肝・胆管複合組織を構築する着想に至った。

2. 研究の目的

肝臓は生命維持に不可欠な機能を担うとともに、人工物で機能を代替することができないため、生体外の培養で肝臓を再生する手法の開発が強く望まれている。肝臓の組織工学では、肝機能を担う肝細胞の三次元培養に主眼が置かれてきたが、さらに機能的な肝組織を構築するためには、胆汁排泄機能を有する肝組織を構築する必要がある。研究代表者は、これまでに胆管上皮細胞による胆管形成や、肝細胞による毛細胆管形成の手法を確立してきた。生体内では毛細胆管と胆管がつながっているが、単純にこれらを混合するだけでは、毛細胆管と胆管が接合した肝・胆管複合組織を構築することができない。その結果、肝細胞が分泌した胆汁が毛細胆管に滞留してしまう病的な状態(胆汁うっ滞)になってしまい、機能的な肝組織を構築することができない。そこで、本研究では毛細胆管と胆管を接合させる培養手法を確立し、胆汁排泄機能を有する肝・胆管複合組織を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は2つのフェーズに分けて並行して研究を遂行し、最終的に胆汁排泄を有する肝・胆管複合組織の再生を目指した。フェーズ1では、胆管と毛細胆管を形成させる共培養モデルの確立を目指し、フェーズ2では、培養デバイスの改良を行うことで、胆管と毛細胆管の接合部を調節することを目指した。具体的な方法は以下の通りである。

(1) フェーズ1. 小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルの確立

24 ウェルプレートを用いて小型肝細胞と胆管上皮細胞をコラーゲンゲル上で培養し、胆管上皮細胞がコロニーを形成してからコラーゲンゲルを重層してコラーゲンゲルサンドイッチ培養を行った。まず、この時の小型肝細胞と胆管上皮細胞の播種濃度を検討した。胆管上皮細胞を単独で培養した際に胆管形成に至る播種濃度を基本として、小型肝細胞の播種細胞数を3条件設定し、共培養モデルにおける胆管形成の効率を検討した。次に、播種タイミングを検討した。具体的には、小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルにおいて、小型肝細胞と胆管上皮細胞を同日に播種する場合と、胆管上皮細胞を播種してから3日後に小型肝細胞を播種する場合の2つの播種タイミングを検討した。次に、毛細胆管と胆管の接合部について詳細な解析を進めた。まず、培養液に Fluorescein Diacetate を添加すると、肝細胞で代謝された Fluorescein が毛細胆管へ排出される。この状態を蛍光顕微鏡で観察すると、毛細胆管と胆管の接合部を可視化することができるため、毛細胆管と胆管の接合頻度を計測した。また、毛細胆管から胆管へ胆汁成分が輸送されることを確認するために、培養液に CellTracker を添加し、毛細胆管や胆管に蓄積された CellTracker を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。最後に、毛細胆管と胆管の接合部を構成する細胞の表現型や極性を調べるために、免疫蛍光染色を行った。肝細胞と胆管上皮細胞の分化マーカーや膜タンパクマーカーなどの免疫蛍光染色を行い、胆管上皮細胞が形成する胆管と小型肝細胞が形成する毛細胆管が直接接合しているかどうか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) フェーズ2. 培養デバイスの改良

24 ウェルプレートを用いた小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルで毛細胆管と胆管を接合させることに成功したが、接合部の位置に規則性がなく、解析するための効率が悪かった。そこで、胆管上皮細胞を播種してコロニーを形成させる培養区画と、小型肝細胞を播種する培養区画を分離することで、両区画の境界面で胆管・毛細胆管接合部を誘導するデバイス(マイクロ区画化培養デバイス)を開発した。また、より大きな胆管を形成させるために、テンプレート型培養デバイスを用いた胆管上皮細胞の培養も検討した。このテンプレート型培養デバイスには、円管状の孔が空いたコラーゲンゲルが内蔵しており、胆管上皮細胞をその内腔面で培養することで大型の胆管を形成させることができるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルにおける播種濃度の検討

小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルにおける細胞播種濃度を検討したその結果、小型肝細胞の播種細胞数が胆管上皮細胞よりも優勢になると、胆管上皮細胞がコロニーを形成できず、結果として胆管形成が阻害されることを見出した。一方で、胆管上皮細胞の播種細胞数が小型肝細胞よりも優勢になると小型肝細胞による毛細胆管の形成が阻害される。そのため、小型肝細胞と胆管上皮細胞が拮抗する培養条件を適切に設定することが毛細胆管と胆管を接合させる培養手法における重要な因子であることを見出した。

(2) 小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルにおける播種タイミングの検討

小型肝細胞と胆管上皮細胞の共培養モデルにおいて、小型肝細胞と胆管上皮細胞を同日に播種する場合と、胆管上皮細胞を播種してから3日後に小型肝細胞を播種する場合の2つの播種タイミングを検討した。この時、GFPラットから胆管上皮細胞を分離・培養することで、培養12日目の蛍光画像から胆管上皮細胞コロニーの面積を定量的に評価した。その結果、胆管上皮細胞を播種してから3日後に小型肝細胞を播種する条件の方が培養12日目において有意に大きな胆管上皮細胞コロニーを形成することがわかった。

(3) 蛍光色素の排出による毛細胆管・胆管接合頻度の評価

培養液にFluorescein Diacetateを添加して、毛細胆管と胆管の接合部を可視化し、上記の(1)および(2)において決定した条件で培養した時の毛細胆管と胆管の接合頻度を定量的に評価した。さらに、小型肝細胞と成熟肝細胞の2種類を検討し、接合部の形成確率に違いが生じるかどうか確認した。その結果、肝細胞よりも小型肝細胞の方が接合部を形成する確率が有意に高くなることがわかった。

(4) 免疫蛍光染色による毛細胆管と胆管の接合部の実証

24 ウェルプレートを用いた共培養を行い、肝細胞と胆管上皮細胞の分化マーカーや極性マーカーなどの免疫蛍光染色を行い、胆管と毛細胆管が直接接合していることを立証した。具体的には、共焦点レーザー顕微鏡による三次元的な解析により、肝細胞マーカーを発現する細胞が形成している毛細胆管と胆管上皮細胞マーカーを発現する細胞が形成している胆管が直接接合していることを示した。また、接合部では、小型肝細胞と胆管上皮細胞が共同で内腔を形成している部分も観察された。

(5) 毛細胆管から胆管への輸送機能の検討

毛細胆管から胆管へ胆汁成分が輸送されることを確認するために、培養液にCellTrackerを添加し、毛細胆管中へ排出された蛍光色素を観察した。その結果、毛細胆管と胆管が接合していない部分では胆管内部に蛍光色素が観察されなかったが、毛細胆管と胆管が直接接合した部分では、胆管内部に蛍光色素が観察された。これらの結果は、毛細胆管中に排出された蛍光色素が接合部を通して胆管へ輸送されたことを示唆している。

(6) マイクロ区画化培養デバイスの検討

肝細胞の培養領域と胆管上皮細胞の培養領域を区画化した培養デバイスを新たに開発した。このデバイスによって、先に播種する胆管上皮細胞の培養区画を制限し、胆管上皮細胞がコロニーを形成してから残りの区画に小型肝細胞を追加することで、毛細胆管と胆管の接合部を一定の領域内に誘導した。

(7) テンプレート型培養デバイスの検討

毛細胆管に接続される細い胆管だけでなく、より大型の胆管を構築することを検討するため、テンプレート型培養デバイスを作製し、コラーゲンゲル内部に作製した内腔構造に胆管上皮細胞を被覆させるための培養条件を検討した。初代培養胆管上皮細胞を用いた場合、純度や接着率に課題があり、テンプレート型培養デバイスの内腔全面を被覆させることが困難であることが明らかになった。そこで、胆管上皮細胞の細胞株も使用したところ、テンプレート型培養デバイスの内腔を被覆させることによって、大型の胆管を形成させることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Tanimizu, Norihisa Ichinohe, Yasushi Sasaki, Tohru Itoh, Ryo Sudo, Tomoko Yamaguchi, Takeshi Katsuda, Takafumi Ninomiya, Takashi Tokino, Takahiro Ochiya, Atsushi Miyajima, Toshihiro Mitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of functional liver organoids on combining hepatocytes and cholangiocytes with hepatobiliary connections ex vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-23575-1	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金子翼、杉本葵、山下忠紘、谷水直樹、三高俊広、須藤亮
2. 発表標題 ラット小型肝細胞と胆管上皮細胞を用いた毛細胆管 胆管接合培養法の検討
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsubasa Kaneko, Ryota Kaku, Tadahiro Yamashita, Ryo Sudo
2. 発表標題 Development of an in vitro coculture model connecting bile canaliculi and bile ducts and its miniaturization
3. 学会等名 TERMIS 6th World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子翼、杉本葵、山下忠紘、須藤亮
2. 発表標題 ラット初代培養細胞を用いた毛細胆管 - 胆管接合組織の構築
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤亮、金子翼、杉本葵、山下忠紘、谷水直樹、三高俊広
2. 発表標題 ラット初代培養細胞を用いた毛細胆管 - 胆管接合組織の構築と細胞配置の検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科須藤研究室ホームページ
<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

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

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