

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16406

研究課題名（和文）胆道閉鎖症に対する胆管オルガノイド移植による新規治療技術開発の基礎検討

研究課題名（英文）Development of novel therapies for biliary atresia using bile duct organoids

研究代表者

須田 一人（Suda, Kazuto）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60784725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：重症な乳児胆汁うっ滞疾患である胆道閉鎖症では、肝門部空腸吻合術の後に黄疸が消失しない症例が存在し、肝移植が適応となることもある。しかし、ドナー不足など重大な課題が未解決であり、肝予備能を向上させる新規治療開発が必要である。本研究は、胆管上皮に純化したラットオルガノイド培養を確立し、総胆管結紮による閉塞性黄疸モデルラット脾臓に移植することで、その治療効果検証を目的とした。これまで、充分量かつバイアビリティの高い胆管上皮を単離する条件検討を進めたが、オルガノイドとして安定して培養できるまでの実験系確立に至っていない。また、マウスやラットの閉塞性黄疸モデルとしての組織・生化学評価を進めてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、閉塞性黄疸モデルラットの脾臓に胆管上皮ラット由来オルガノイド細胞を移植して、肝組織内への定着および肝機能改善効果を検証する目的で進められた。予備検討としてのマウスや、ラットの閉塞性黄疸モデル作成は予定通り行えた。これによるコントロールとしての病的意義は示せたものの、胆管上皮オルガノイドの安定した培養系確立に難渋したため、移植実験の施行やその効果判定まで検証できていない。今後、培養系のプロトコルを変更して再試行する予定とし、本研究による治療効果としての学術的意義を見出せるよう計画を継続していく。

研究成果の概要（英文）：Biliary atresia is a devastating infantile cholangiopathy due to obstruction of the intrahepatic bile duct and can be treated with portoenterostomy. However, a liver transplant is required in some patients due to prolonged postoperative jaundice. As there is a shortage of liver transplant donors, the development of new treatment is required to improve liver function reserve. This study was designed to establish the organoid culture from the differentiated bile duct epithelium, and to determine the therapeutic effect of splenic inoculation of these organoid cells in the rat model of obstructive jaundice induced by ligation of the common bile duct. So far, successful isolation of the bile duct epithelium with a high quantity and viability has been achieved. We also evaluated biochemical and histological characteristics of the common bile duct ligation model of mouse and rat. On the other hand, we have not achieved the establishment of a stably culturing system for organoid cells.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 肝線維化 総胆管結紮 ラット 胆管オルガノイド 脾臓注入モデル

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症 (以下、BA)は、新生児・乳児に発症し閉塞性黄疸をきたす胆汁うっ滞性肝疾患である。手術にて肝門部と挙上空腸を吻合して肝外への胆汁流出路を形成するが、黄疸が改善しない症例が存在し、その場合に肝移植の適応となる。ただ、肝移植にはドナー不足や継続的免疫抑制剤投与の必要性など課題があり、これまでにない新規治療開発が望まれる。

一方、基礎研究領域では、体外培養細胞の移植で肝障害を治療する試みが進んでいる。ラット成熟肝由来細胞、またはマウス由来肝前駆細胞を、Mdm2 欠損マウスや DPPIV 欠損 F344 ラットなどの肝障害モデル動物をレシピエントに移植するなど(Yovchev et al., J Hepatol, 2016; Olszewski et al., Transplant Proc, 2014; Lu et al., Nat Cell Biol, 2015)、様々な報告がある。しかしながら、胆管上皮細胞障害に着目したモデルを用い、胆管上皮に純化した細胞群をこれらモデルに移植した効果を示した研究はこれまでにない。

近年、組織上皮幹細胞能を利用した 3D 培養であるオルガノイド技術の進歩が目覚ましく、再生医療に向けた移植マテリアルの候補として期待される(Date and Sato, Annu Rev Cell Dev Biol, 2015)。たとえば、ヒト iPS 細胞・マウス ES 細胞などからの肝細胞オルガノイド培養が可能である(Prior et al., Gut, 2019)。また最近では、ラット肝組織から肝細胞と胆管上皮性質を併せ持つオルガノイド培養も報告された(Kujik et al., Sci Rep, 2016)。さらに最近、ヒト iPS 細胞から前腸・中腸組織を別々に誘導し、これを混合し前腸-中腸境界を作成する手法で、肝臓・膵臓様組織に加え、胆管組織を含むオルガノイド培養技術も示された(Takebe et al., Nature, 2019)。しかしながらこれまで、生体内の胆管上皮に似た分化度を示す細胞を、純化しておこなうオルガノイド培養法について報告はない状況である。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの項目達成を目的とした。

(1) 胆管上皮ラットオルガノイド培養技術の確立

まず、純化した胆管細胞オルガノイド培養確立を目指した。ここでは、代表者が以前マウス膵管オルガノイド培養に用いた独自の技術を用い、ラット肝構成細胞群から胆管上皮のみを収集し培養することで、胆管上皮に特化した性能を持つ新規培養法を見出すこととした。

さらにヒト iPS 細胞から分化誘導して作成する前腸と中腸を混合して培養し、両者の境界から肝臓・膵臓細胞に加えて胆管成分を含む最新オルガノイドの作成既報をもとに、ラット iPS 細胞を用いて独自の胆管上皮由来胆管オルガノイド培養をおこなう研究にも着手することとした。

(2) 総胆管結紮BAモデルラットに対する胆管上皮移植法の最適化

BA の病態を完全に形容するモデルはないものの、開腹下に総胆管を結紮することで胆汁うっ滞性肝硬変を誘導する胆汁うっ滞モデルを、準備実験としてまずマウスモデルを用い、安定した手術会得後にラットを用いて作成することとした (Yovchev et al., J Hepatol, 2016)。血液学的・組織学的肝上皮細胞障害や線維化の程度を評価し、長期観察死亡率も確認する予定とした。

続いて(3)でおこなう移植に先立ってラット膵臓内細胞注入法を立ち上げるため、すなわち代表者が独自に開発し、高効率に肝内細胞生着が得られる膵臓内細胞注入技術が、胆道系細胞でも同様に有効であるかを、ラット正常胆管性質をもつ肝上皮細胞株(WB-344)を用いて検討することとした。胆汁うっ滞モデルラットに対して、混濁液に含む胆管細胞株の数、密度、および添加する細胞外基質に関する条件を検討する予定とした。

(3) 胆管オルガノイドの膵臓内注入法による胆管上皮置換治療とその臨床効果の評価

(1)と(2)をもとに、純化した胆管上皮オルガノイドをグラフトとし、膵臓内注入により肝内生着させ、それが BA モデルラットの特に胆管上皮の形態改善・黄疸改善などの臨床効果を示すことを目指した。さらに、ラット iPS 細胞から作成した前腸-中腸境界由来の胆管成分オルガノイドをグラフトとした際に、より効率のよい生着率や臨床効果を示せるか検討することとした。

本研究は、改良した手法により胆管上皮を単独収集して培養した胆管オルガノイド、または iPS

3. 研究の方法

(1) 純化した胆管上皮ラットオルガノイド培養技術の確立

まず、肝組織上皮収集のためにタンパク分解酵素のコラゲナーゼか、キレート剤の EDTA どちら

が効率的か検討した。続いて代表者が以前見出した、独自に作成したチューブ回路により仕分けすることでマウス膵組織から顕微鏡下に膵管上皮細胞のみを採取し、膵管オルガノイドを培養した経験をもとに、ラット胆管に特化したオルガノイド培養方法を立ち上げた。胆管形質を誘導する培養に必要とされる R-spondin・Wnt・HGF・EGF・FGF・TGF inhibitor・Forskolin などの成長因子を用いて、増殖・分化に与える変化を検討した。

(2) 総胆管結紮 BA モデルラットに対する胆管細胞移植法最適化

既報にある、全身麻酔下開腹手術にて総胆管結紮を施行する胆汁うっ滞モデル動物を作成した。マウス操作から着手し、手術後 1-4 週間で血液学的所見(ビリルビン・肝胆道酵素・アルブミン・血小板数)や、組織学的所見(肝細胞及び胆管細胞の形態変化・ヒアルロン酸や α -SMA などの肝線維症マーカー発現)を、開腹のみの群と比較し、良好な胆汁うっ滞モデルを作成できているか確認した。

4. 研究成果

肝組織上皮収集のためにはタンパク分解酵素のコラゲナーゼがキレート剤の EDTA よりも効率よく効果を示すことがわかった。顕微鏡下に膵管上皮細胞のみを採取する方法と併せ、充分量かつバイアビリティの高い胆管上皮を単離する条件検討を進めてきたが、オルガノイドとして安定して培養してその後のアッセイに使用できるまでの実験系確立に至っていない。すなわち、R-spondin・Wnt・HGF・EGF・FGF・TGF inhibitor・Forskolin などの成長因子の組み合わせを複数検討したが、てオルガノイド形成が継続される条件を見出せなかった。

全身麻酔下開腹手術にて総胆管結紮を施行する胆汁うっ滞モデル動物を作成した。前年度までは予備実験としてマウス総胆管結紮により安定して生存しつつも閉塞性黄疸を示すモデルを作成してきたが、最終年度はラットでのモデル作成に取り組んできた。術中操作や術後生存率を安定させ、どちらも手術後 2 週間まで肝酵素・ビリルビンの経時的な上昇を認め、術後 7 日目から進行性の肝線維化の所見を観察し、良好な胆汁うっ滞モデルを作成できていることを確認した。一方、オルガノイド培養が上記のごとく予定通り進行し得なかったため、移植実験以降の解析には使用できていない状況である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------