

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20945

研究課題名（和文）ラットCLiPを用いた肝小葉様構造の作製および移植の実施、構造並びに機能評価

研究課題名（英文）A novel approach to liver diseases through regenerative strategy.

研究代表者

哲翁 華子（Tetsuo, Hanako）

長崎大学・病院（医学系）・医員

研究者番号：90966847

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：肝細胞シートにCLiP由来胆道構造を組み合わせた肝/胆道複合化シート（Hepato-Biliary sheet：HBS）を作製し評価した。HBSはCLiPを胆管誘導培地で14日間培養し胆道構造誘導後成熟肝細胞を播種し作製した。免疫染色で胆管構造と成熟肝細胞が隣接しており、胆汁排泄アッセイにおいても十分な機能を示した。また、HSに比べCYP3A4活性やアルブミン産生能は有意に高値を示した。肝特異酵素およびトランスポーターの遺伝子発現が有意に高値であった。生体内ではシート内に胆管構造や血管成分がみられた。また、血中ラットアルブミン濃度は、HBS群は術後7日から28日にかけて有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞源が豊富で培養法が確立した肝細胞を用いた肝臓の再生医療に関しては様々な研究がなされてきたが、胆管上皮細胞は培養困難と言われており、同細胞を細胞源とした胆道系の作製は困難とされてきました。今回、低分子化合物刺激により誘導した肝前駆細胞を用いることで胆管上皮細胞を誘導でき、それにより胆道構造を新たに作製しました。胆道構造を有する肝細胞シートは、肝臓により近い高次元の組織として機能することが期待できます。

研究成果の概要（英文）：Hepatobiliary sheets (HBS) were prepared by culturing CLiP in bile duct induction medium for 14 days, inducing biliary structures, and seeding mature hepatocytes. Immunostaining showed that the bile duct structures and mature hepatocytes were adjacent to each other, and the HBS functioned well in the bile excretion assay. In addition, CYP3A4 activity and albumin production capacity were significantly higher than those of HS. Gene expression of liver-specific enzymes and transporters was significantly higher. In vivo, bile duct structures and vascular components were seen in the sheets. Blood rat albumin levels were significantly higher in the HBS group from 7 to 28 days postoperatively.

研究分野：消化器外科再生医療

キーワード：Hepato-Biliary Sheet CLiP 肝細胞シート 再生医療 胆道構造

## 1. 研究開始当初の背景

近年では肝臓移植に代わる代替治療として細胞移植に伴う再生医療技術の開発が行われている。細胞源としては肝細胞以外にも肝前駆細胞や脂肪組織由来幹細胞を移植させ、移植細胞から分泌される因子によって自己肝臓の再生を促す手法が報告され臨床応用へと展開されている。さらには、単一細胞移植ではなく、複数の細胞種を組み合わせる肝細胞の高機能化を誘導させた肝細胞組織移植が主流となっており、例えば iPS 細胞由来肝芽細胞と血管内皮細胞等を混ぜ合わせ肝オルガノイドを作製し肝疾患モデルへの移植する方法が挙げられる。研究代表者の教室においても肝細胞と線維芽細胞を重層させた細胞シートを肝臓表面に移植することで長期的な機能維持することを示した (Miyamoto, Eguchi et al., *Regen Ther*, 2022 他)。一方で、肝細胞組織移植治療においては肝機能や血管様構造の構築を中心とした研究が数多く報告されているものの、肝組織が産生する胆汁の排泄機能にまで着目した研究はほとんどないのが現状である。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに肝組織における胆汁ドレナージシステムの開発として成熟肝細胞より低分子化合物刺激にて化学的誘導された肝前駆細胞 (Chemically induced liver progenitor; CLiP) をより胆管様ネットワークを構築させることで生体外にて独自の胆汁ドレナージシステムを開発してきた (図 1、Huang, Miyamoto, Eguchi et al., *Hepatol. Res*, 2021 他)。そこで本研究では胆汁ドレナージシステムを足場とした肝細胞シート (Hepato-Biliary sheet : HBS) を開発し、その構造および性能を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

温度応答性培養皿にマウス胚性線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast; MEF) と GFP ラット由来 CLiP を順次播種したのちに培養にて胆汁ドレナージシステムを誘導した。さらに作製した胆汁ドレナージシステム上にラット成熟肝細胞を播種・培養することで HBS を作製した。HBS のアルブミン合成能、薬物代謝能、アンモニア代謝能、遺伝子発現を調べ HS と比較した。また、蛍光免疫染色を行い、構造を評価した。HBS を、免疫不全マウスの肝表へ移植し、術後 7 日、14 日、28 日における構造を評価した。またレトリルシン投与により肝障害モデルマウスを作製し、HBS 移植群、HS 移植群の 2 群に分け肝機能や遺伝子発現を評価した。

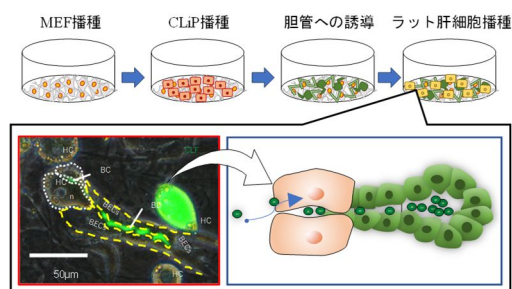


図 1. 胆汁ドレナージシステムの構築過程

## 4. 研究成果

温度応答性培養皿にマウス胚性線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast; MEF) とラット由来 CLiP を順次播種し既報に則って胆汁ドレナージシステムを誘導し、その後ラット由来成熟肝細胞を播種・培養することで HBS を作製した (図 1)。作製した HBS を免疫不全マウス肝表面に移植した結果、レシピエントマウス肝内にてラット由来胆管構造 (CK7 陽性) の周辺

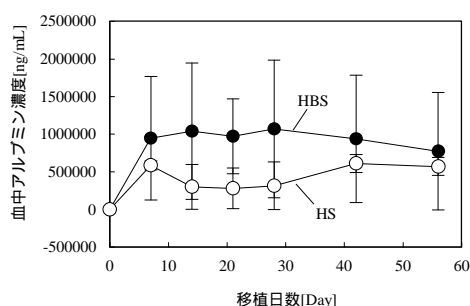


図 2. 移植後の血中ラットアルブミンの変化

部にラット成熟肝細胞 (ALB 陽性) が隣接する構造を確認した。

#### 遺伝子発現

また、

この構造体内にはマウス由来の血管細胞

(CD34 陽性) も確認できており、HBS 移植によって胆管構造ならびに血管様構造を有する新たな肝臓様組織を構築させることに成功した。そこで HBS 移植による肝機能改善を評価するために HBS を肝障害モデルマウスの肝表上に移植させ血中内のラットアルブミンについて解析を行った。HBS 移植群は従来の胆汁ドレナージシステムを持たない成熟肝細胞単独群 (Hepatocyte sheet : HS) に比べ移植 1

週間目より高い数値を示し、アルブミン機能に関しては 2 か月以上同程度の値を維持した (図 2)。これらの結果より、複

数の組織体 (胆汁ドレナージシステムならびに肝細胞シート) を組み合わせることで肝細胞組織をまさに「ミニ肝臓」とも呼ぶべき高次元組織へと誘導させることが可能であった。更には HBS が「ミニ肝臓」であることの裏付けとして RT-PCR 法による遺伝子解析にて評価を行ったところ、HBS は HS と比較し肝特異酵素 (To, Arg1) や胆管系トランスポーター (Besp, Aqp1) の発現が有意に高値であることを示した (図 3)。これらの結果から、HBS は高度な肝機能を有しており肝疾患に対する有効な治療法である可能性を見出した。

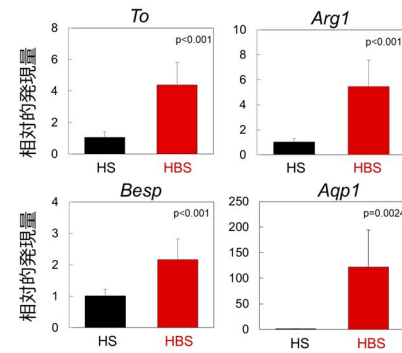


図 3 . HBS の遺伝子発現

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 Hanako Tetsuo, Daisuke Miyamoto, Tomohiko Adachi, Manpei Yamashita, Hajime Imamura, Hajime Matsushima, Takanobu Hara, Akihiko Soyama, Kengo Kanetaka, Susumu Eguchi
2 . 発表標題 A novel approach to liver diseases through regenerative strategy.
3 . 学会等名 34th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Hanako Tetsuo, Daisuke Miyamoto, Tomohiko Adachi, Manpei Yamashita, Hajime Imamura, Hajime Matsushima, Takanobu Hara, Akihiko Soyama, Kengo Kanetaka, Susumu Eguchi
2 . 発表標題 A NEW APPROACH TO LIVER DISEASES THROUGH REGENERATIVE STRATEGY: CLIP-DERIVED HEPATO-BILIARY SHEETS AND EVALUATION OF THEIR STRUCTURE AND FUNCTION IN A RODENT MODEL
3 . 学会等名 uegweek ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Hanako Tetsuo, Daisuke Miyamoto, Tomohiko Adachi, Manpei Yamashita, Hajime Imamura, Hajime Matsushima, Takanobu Hara, Akihiko Soyama, Kengo Kanetaka, Susumu Eguchi
2 . 発表標題 A novel approach to liver diseases through regenerative strategy.
3 . 学会等名 the VIII Congress of Surgeons of Kazakhstan with "The contribution of academician Aliyev M.A. in the Development of Surgery in Kazakhstan " ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 哲翁華子、宮本大輔、足立智彦、山下万平、今村一步、松島肇、原貴信、曾山明彦、金高賢悟、江口晋
2 . 発表標題 肝前駆細胞を用いた肝胆道系複合化シートの作成及び構造・機能評価
3 . 学会等名 第23回日本再生医療学会
4 . 発表年 2024年

1．発表者名 哲翁華子、宮本大輔、足立智彦、山下万平、今村一步、松島肇、原貴信、曾山明彦、金高賢悟、江口晋
2．発表標題 肝前駆細胞を用いた肝胆道系複合化シートの作成及び構造・機能評価
3．学会等名 第124回日本外科学会定期学術集会
4．発表年 2024年

1．発表者名 哲翁華子、宮本大輔、足立智彦、山下万平、今村一步、松島肇、原貴信、曾山明彦、金高賢悟、江口晋
2．発表標題 肝前駆細胞を用いた肝胆道系複合化組織の作成及び構造・機能評価
3．学会等名 第3回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4．発表年 2023年

〔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
---------	---------