

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08589

研究課題名(和文)胆汁排泄機能を伴ったiPS細胞由来肝胆管オルガノイドの作製

研究課題名(英文) Derivation of human iPS cell derived hepato-biliary organoids with bile acid secretion

研究代表者

小川 真一郎 (Shinichiro, Ogawa)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：30419353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：従来のオルガノイド技術では、胆管細胞と胆汁の流れによる相互作用を静置下に観察することは困難である。そこで3D胆管チューブの作成に応用可能なiPS細胞からの機能的胆管細胞の分化誘導法を確立した。3D培養を経ることなく、化学化合物、サイトカイン、レチノイン酸の誘導で、大量の機能的胆管細胞の分化誘導に成功した。これらの細胞は、胆管細胞の機能的一次繊毛を有しており、クロライドイオンの輸送機能を有し、嚢胞線維症患者のiPS細胞より胆管細胞を誘導し病態モデルの作成も可能であった。3Dプリント技術を活用し、3D胆管チューブの作成に成功し、胆汁の流れに伴う胆管細胞の機能を測定することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道上皮細胞は炎症、線維化などに起因する胆管障害により最終的には肝不全に至る。胆汁酸の過度の蓄積は胆管細胞や肝細胞への毒性を引き起こし、炎症プロセスの蓄積により重篤な肝不全を発症する。重症胆汁鬱滞性肝疾患に対する現在の唯一の有効な治療法は肝移植である。胆汁鬱滞性肝疾患の進行における基礎となる病態生理学的メカニズムは、未だに十分に理解されておらず、臨床使用可能な薬剤の胆汁クリアランスを決定することは非常に困難である。ヒトiPS細胞の技術的進歩は、胆汁を排出することができるヒト肝組織をiPS細胞から工学的に作製し、最終的には胆汁性肝疾患を治療するための細胞治療戦略の開発に応用することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：Observing the interaction between cholangiocytes and bile flow under static conditions using conventional organoid technology has proven challenging. To address this, we established a method for obtaining functional cholangiocytes from iPS cells to create 3D bile duct tubes. By bypassing traditional 3D culture techniques, we successfully differentiated a substantial number of functional cholangiocytes through the use of chemical compounds, cytokines, and retinoic acid.

The differentiated cholangiocytes exhibited functional primary cilia and has demonstrated the capability to transport chloride ions. Additionally, we were able to differentiate cholangiocytes from cystic fibrosis patients iPS cells derived from, thereby creating for modeling disease in vitro. Utilizing 3D printing technology, we measured the function of these cholangiocytes in association with bile flow, providing a new insight for studying cholangiocyte-bile flow interactions and related liver functions in vitro.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

胆汁鬱滞性肝疾患は、肝細胞からの胆汁の生成および微細胆管への分泌の阻害、さらに胆管内での胆汁の移行障害により発生する。脂質消化に不可欠な胆汁の肝臓内での過剰な蓄積は深刻な肝毒性を引き起こす。胆汁鬱滞性肝疾患の進行における病態生理の基礎的なメカニズムは殆ど解明されておらず、その原因は多岐に渡るものの、重度の胆汁鬱滞性肝疾患に対する唯一の有効な治療法は肝移植である。しかし、提供可能なドナー臓器の不足のため、代替治療法の開発が切実に求められている。ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSCs) は、細胞移植のための機能的細胞を無制限に提供することが可能であるため多くの期待がもたれている。しかしながら、hiPSCs からの様々な細胞への分化誘導は、胎児期の発生学的プロセスを経由して行われるため、未成熟な性質を保持し、実際の臓器と同等な機能を保持する細胞へ成熟化をさせるには様々な課題の克服が必要である。最近、私たちのグループは hiPSCs から肝細胞 (#1) および胆管細胞 (#2) への分化誘導の過程において、成熟化機能を獲得する因子を解明し、肝前駆細胞から効率よくこれらの細胞へ誘導させる方法を開発した。特に hiPSCs 由来の胆管細胞が、成人の成熟細胞と非常によく似た機能的特性を示すことを証明した。しかしながら、従来の静的培養環境では、胆管細胞のような常に胆汁の流れにさらされている細胞にとって、その細胞が臓器内で存在する細胞周囲の微小環境を模倣することは困難であり、胆管細胞の *in vitro* における生理的機能評価には限界がある。このような背景から、hiPSCs 細胞からの胆管細胞のさらなる成熟には、生体内環境を *in vitro* 培養環境下で模倣することが重要であり、organ-on-chip 技術を活用した動的灌流下での胆管細胞培養モデルの開発が検討されている。

## 2. 研究の目的

この研究において、我々は以下の二つの仮説 (1) 肝胆道系の微小環境を *In vitro* 培養にて模倣することにより hiPSCs 由来の胆管細胞のさらなる成熟化が促進される。(2) 肝胆道輸送を模倣した胆道内の胆汁流路動態が、hiPSC 由来胆管細胞の機能を向上させる。を提唱し、この仮説を検証するために、生理学的な胆道内胆汁輸送機能を示す hiPSC 由来の新しい肝胆道培養システムを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

上述の通り、従来のオルガノイド静的培養環境では、胆管細胞の生理的機能評価を行う上で大きな制限がある。我々は、*in vitro* で肝臓特異的な微小環境、特に胆道内の胆汁輸送環境を確立するために、灌流可能な血管網および分泌管系の導入による改善を加えることを主眼にし、organ-on-chip 技術を活用した。我々は過去に、3D プリント技術を駆使し、384 ウェルプレート内に 124 個の直線的な回路を伴う灌流可能な血管化肝臓モデルを確立している (#3、#4)。この技術をさらに応用し、連続する 3つのウェルが、自己組織化される hiPSC 由来胆管細胞からの胆管ネットワークと接続し、3D プリントされたチャンネルとそれぞれの末端で接続する出口チャンネルを介して交通するようなプラットフォームを作成した。このプラットフォームにおいて、3D プリントされた直線チャンネルはそれぞれのウェルと交通し、培養液をチャンネルと交通するウェルに加えることによって、重力の変化によってチャンネル内に還流可能な微細流路を与えることが可能になる。この特殊なプレートを、プログラム加工された特殊な培養機に設置すると、左右に約 15 度、5 分のインタバールで傾斜させることにより、培養液の液面が上下に動き、微小な重力の圧力変化に伴い、中央のチャンネルのあるウェルに微小な還流を提供できる。このプラットフォームを用いて hiPSC 由来胆管細胞をチャンネル内に播種し、チャンネル内での完全

な上皮化を促進し、オルガノイド作成を経由しない3D胆管チューブ作成をおこなった。

#### 4. 研究の結果

- (1) hiPSCs からの機能的な一次繊毛を有する胆管細胞の生成。我々は過去において世界で初めて hiPSCs 由来胆管細胞分化および3Dオルガノイドの作成のプロトコールを公表している(#2)。このプロトコールをさらに改善させ、ハイスループット薬物スクリーニングや細胞治療への応用のため、多くの細胞収率を確保する必要があるため、単層培養における拡張培養の利点を活用し、胆管細胞への分化誘導をさらに促進する因子を特定した。これらの因子は、発生学的に胆管分化を促進することが知られている誘導因子、誘導シグナルにおける活性剤(アゴニスト)および阻害剤(アンタゴニスト)を精査する過程で特定され、まず、肝前駆細胞(肝芽細胞)からCl<sup>-</sup>(クロライド)イオントランスポーターであるCFTR発現を誘導する因子に注力し、レチノイン酸(RA)のみが有意なレベルのCFTR発現を誘導することを確認した。しかしながら、CFTRを発現するこれらの細胞では、一次繊毛が存在しないため、CFTR陽性胆管細胞のさらなる成熟を促進する調節因子を特定した。RA処理された胆管細胞(37日目の胆管細胞)において一次繊毛の陽性率を誘導する成長因子と低分子化合物アゴニスト/アンタゴニストの異なる組み合わせを検討し、Rho-キナーゼ阻害剤(RI)、Forskolin(FSK)、cAMPアゴニスト、またはBMP阻害剤Noggin(NOG)のいずれかの処理が胆管細胞培養誘導49日目に一次繊毛陽性細胞の発達を促進することを同定した。本研究では、NOG、FSK、およびRI(以下NFR)の組み合わせが、各因子単独よりも効果的であることを確認し、重要なことに、培養49日目のNFR処理胆管細胞の85%以上が免疫染色によって一次繊毛を有していることを確認した。走査型電子顕微鏡(SEM)における精査では、一次繊毛の典型的な形態を示し、ウエスタンブロッティングによる蛋白定量では成熟したCFTRタンパク質の発現を確認した。
- (2) 流路環境下での、hiPSCs 由来胆管細胞におけるカルシウムシグナル伝達およびCFTR機能活性の測定。次に、hiPSCs 由来胆管細胞が灌流環境下における機械感受性機能を誘導し、肝臓内の胆汁の流れに対する一次繊毛の機能を再現するかどうかを確認した。胆管細胞をフローチャンバーに播種し、微量ポンプを用いて培養液の流れを誘導し、流れが伴う環境下でhiPSCs 由来胆管細胞に発現する一次繊毛が屈折することを共焦点顕微鏡で確認した。次に、培養液の流れ刺激に応じたhiPSC 由来胆管細胞におけるCa<sup>2+</sup>シグナル伝達およびCFTR活性を測定した。膜電位染料蛍光色素を使用してApical chloride conductance: ACC(頂端クロライド伝導度)を測定し、CFTRの活性がCa<sup>2+</sup>シグナル伝達の活性化後に誘導されることを確認した。嚢胞線維症(Cystic Fibrosis)患者由来iPS細胞より胆管細胞を作成し、この細胞上に微小灌流ポンプで流れの刺激を行い、流れで刺激に伴うACCを観察した。予想通りCF患者由来iPS細胞胆管では、CFTR蛋白機能喪失により、ACCは観察されなかったが、臨床的にCF患者の治療に使用されているCFTR活性薬(VX809)および新規のCFTR機能改善薬はCFTR機能を回復させることを確認した。これらの結果は、hiPSC 由来胆管細胞が流体の流れに応答して細胞内カルシウムを放出し、CFTR機能を活性化させることができ、胆管生理学の重要な側面を反映していることを示していた。さらに、CFTR機能改善薬の有効性を、微小還流を伴う生体内の生理学的環境を再現する状態で、患者iPS細胞由来胆管細胞で検証することができた。これらの結果は、2021年にNature Communicationsに発表された(#5)。
- (3) 工学的手法を用いた3D胆管チューブ作成：血管化肝臓組織を生成するために、血管および

胆管ネットワークの構造をより制御できる AngioPlate プラットフォームの使用を本プロジェクトに切り替えた。このプラットフォームは血管および胆管ネットワークを肝臓オルガノイドから分離して培養および成熟させることができ、肝細胞分化に関わる複数の培地タイプによる培地最適化の複雑さを大幅に軽減することができた。この新しいアプローチにより、まず胆管ネットワークが形成され、その後、任意の段階で組織スフェロイドを播種することができた。(1)で作成された iPS 細胞由来胆管細胞を使用して完全に上皮化された三次元胆管チューブを作成することに成功した。これらの 3D 胆管チューブは、胆管細胞の機能的成熟を示す重要なマーカーである一次繊毛と CFTR の発現を示し、免疫染色は、一次繊毛が内腔に存在し、CFTR が 3D 内腔チューブの内側の上皮細胞に極性を持って存在していることを確認した。得られた結果は、現在論文投稿準備中である。

**参考論文 Reference:** (#1): Development 140(5), 2013, Ogawa et al, (#2): Nature Biotechnology, 33 (8), 2015, Ogawa et al, (#3): Advanced Material 32(46),2020, Rajasekar S et al, 2020, (#4) Lab on chip 22(10), 2022, Rajasekar S, et al, (#5): Nature communications 12(6504), 2021, Ogawa, et al.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名<br>Rizwan Muhammad, Ling Christopher, Guo Chengyu, Liu Tracy, Jiang Jia Xin, Bear Christine E., Ogawa Shinichiro, Shoichet Molly S.   | 4. 巻<br>11                      |
| 2. 論文標題<br>Viscoelastic Notch Signaling Hydrogel Induces Liver Bile Duct Organoid Growth and Morphogenesis   | 5. 発行年<br>2022年                 |
| 3. 雑誌名<br>Advanced Healthcare Materials  | 6. 最初と最後の頁<br>2200880 ~ 2200880 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/adhm.202200880  | 査読の有無<br>有                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Rajasekar Shrvanthi, Lin Dawn S. Y., Zhang Feng, Sotra Alexander, Boshart Alex, Clotet-Freixas Sergi, Liu Amy, Hirota Jeremy A., Ogawa Shinichiro, Konvalinka Ana, Zhang Boyang  | 4. 巻<br>22                      |
| 2. 論文標題<br>Subtractive manufacturing with swelling induced stochastic folding of sacrificial materials for fabricating complex perfusable tissues in multi-well plates   | 5. 発行年<br>2022年                 |
| 3. 雑誌名<br>Lab on a Chip  | 6. 最初と最後の頁<br>1929 ~ 1942       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1039/D1LC01141C  | 査読の有無<br>有                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Ogawa Mina, Jiang Jia-Xin, Xia Sunny, Yang Donghe, Ding Avrilynn, Laselva Onofrio, Hernandez Marcela, Cui Changyi, Higuchi Yuichiro, Suemizu Hiroshi, Dorrell Craig, Grompe Markus, Bear Christine E., Ogawa Shinichiro                              | 4. 巻<br>12                      |
| 2. 論文標題<br>Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells  | 5. 発行年<br>2021年                 |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>6504-6519         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41467-021-26764-0  | 査読の有無<br>無                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |
| 1. 著者名<br>Gao Wuyang, Vaezzadeh Nima, Chow Kelvin, Chen Haotian, Lavender Patricia, Jeronimo Mark D., McAllister Arianna, Laselva Onofrio, Jiang Jia Xin, Gage Blair K., Ogawa Shinichiro, Ramchandran Arun, Bear Christine E., Keller Gordon M., G?nther Axel | 4. 巻<br>10                      |
| 2. 論文標題<br>One Step Formation of Protein Based Tubular Structures for Functional Devices and Tissues   | 5. 発行年<br>2021年                 |
| 3. 雑誌名<br>Advanced Healthcare Materials  | 6. 最初と最後の頁<br>2001746 ~ 2001746 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/adhm.202001746  | 査読の有無<br>無                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Marsee Ary, Roos Floris J.M., Verstegen Monique M.A., Gehart Helmuth, de Koning Eelco, Lemaigre Fr?d?ric, Forbes Stuart J., Peng Weng Chuan, Huch Meritxell, Takebe Takanori, Vallier Ludovic, Clevers Hans, Takebe Takanori, Peltz Gary, Sancho-Bru Pau, Ogawa Shinichiro, | 4. 巻<br>28              |
| 2. 論文標題<br>Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Cell Stem Cell  | 6. 最初と最後の頁<br>816 ~ 832 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.stem.2021.04.005  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ogawa Mina, Jiang Jia-Xin, Xia Sunny, Yang Donghe, Ding Avri Lynn, Laselva Onofrio, Chin Stephanie, Hernandez Marcela, Cui Changyi, Higuchi Yuichiro, Suemizu Hiroshi, Dorrell Craig, Grompe Markus, Bear Christine E, Keller Gordon, Ogawa Shinichiro | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells  | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>bioRxiv  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1101/2021.03.23.436530  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>MacParland Sonya A., Liu Jeff C, Ogawa S, Keller G, Bader G, McGilvray I                        | 4. 巻<br>9          |
| 2. 論文標題<br>Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations | 5. 発行年<br>2018年    |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>1-21 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-018-06318-7  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Jia-Xin Jiang, Sunny Xia, Donghe Yang, Avri Lynn Ding, Onofrio Laselva, Marcela Hernandez, Changyi Cui, Christine E Bear, and Shinichiro Ogawa |
| 2. 発表標題<br>Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells   |
| 3. 学会等名<br>2022/10/03 Till and McCulloch Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Shinichiro Ogawa   |
| 2. 発表標題<br>hPSC-derived biliary epithelial cells. functional role and future applications |
| 3. 学会等名<br>University of Toronto, Medicine by design, workshop (招待講演) (国際学会)              |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Jia-Xin Jiang, Sunny Xia, Christine E. Bear, and Shinichiro Ogawa |
| 2. 発表標題<br>How do Other Organs Vary  |
| 3. 学会等名<br>North American Cystic Fibrosis Conference 2020 Virtual (招待講演) (国際学会)          |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Yuichiro Higuchi, Hiroshi Suemizu, Donghe Yang, Gordon Keller, and Shinichiro Ogawa |
| 2. 発表標題<br>The efficient production of functional cholangiocyte from human pluripotent stem cells          |
| 3. 学会等名<br>The 19th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine Virtual                     |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Shinichiro Ogawa  |
| 2. 発表標題<br>The efficient production of functional cholangiocytes from human pluripotent stem cells |
| 3. 学会等名<br>International Society for stem cells Research (ISSCR) Annual Meeting (国際学会)             |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Mina Ogawa, Shinichiro Ogawa   |
| 2. 発表標題<br>Drug screening for CFTR modulators in iPSCs derived cholangiocytes from Cystic Fibrosis patients |
| 3. 学会等名<br>Till and McCulloch meeting 2019, Canada (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                         | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 増田 雄一<br><br>(Masuda Yuichi)<br><br>(60467149) | 信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授<br><br><br>(13601) |    |
| 研究分担者 | 小山 誠<br><br>(Koyama Makoto)<br><br>(80712778)  | 信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)<br><br><br>(13601)      |    |

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 |
|---------|---------|