

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04445

研究課題名(和文)肝細胞/類洞/胆管を複合した新規肝再構築技術の創出

研究課題名(英文) Reconstruction of liver from arranged-hepatocytes/liver sinusoidal endothelial cells/cholangiocytes tissues

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：孔貫通型シリコンフィルム(Multi-Pored Silicone Film; MPSF)をベースとして、内皮細胞をネットワーク状に配置させた肝細胞/内皮細胞索状組織を作製した。HUVECやLSECをラット初代肝細胞と配列培養すると、肝臓に特徴的な機能や構造の遺伝子を高発現した。肝細胞/内皮細胞索状組織は、マウス皮下でも機能を維持し、管腔構造を有する毛細血管の再構築を示唆した。肝前駆細胞から効率的に胆管組織を作製する手法を検討し、肝毛細胆管との接合を実証した。これらの技術を複合することにより、肝/類洞/胆管複合組織を作製する革新的な手法を確立する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝小葉に代表される秩序立った構造と多岐にわたる機能を持つ肝臓の再構築は、困難を極めている。本研究では、初代肝細胞、類洞内皮細胞、胆管細胞を立体配置して“効率的な物質交換を実現する肝細胞/類洞索状構造”と“胆汁排泄を担う胆管”の複合組織を実現する世界初の技術を確立した。再生医療や薬物代謝アッセイ等に有望な肝組織を作製する技術であり、ドナー不足の解消や薬剤代謝予測に繋がることから社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Hepatocytes/endothelial cell tissue arranged in a network was prepared using a multi-pored silicone film (MPSF). Rat primary hepatocytes cultured with arranged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) or liver sinusoidal endothelial cells (hLSECs) showed highly expressed liver-specific genes. The tissue maintained its functions subcutaneously in mice, suggesting the reconstruction of capillaries with luminal structure. A method for efficiently producing bile duct tissue from hepatic progenitor cells were established. The junction between bile duct tissue and hepatic bile canaliculus were demonstrated. By combining these techniques, we will establish an innovative method for creating a “liver” with sinusoid and bile duct structures.

研究分野：再生医工学

キーワード：肝細胞 内皮細胞 胆管 類洞 肝再生医療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の立体組織化は再生医療や薬物代謝アッセイ等に有望なアプローチの1つであるが、複雑多岐な構造・機能を持つ組織・臓器の再構築は困難を極めている。

(2) 肝臓は、類洞（多数の小孔を有し索状に配列した毛細血管）や肝内胆管（及び肝細胞間に形成する肝毛細胆管）によって高い物質交換効率と豊富な細胞間相互作用を実現して細胞生存と肝特異機能を維持しており、大きな肝組織を作製するほどこれらの重要性は高い。

(3) これらの課題を打開するため、肝小葉を構成する初代肝細胞、類洞内皮細胞、胆管細胞を立体配置して“効率的な物質交換を実現する肝細胞/類洞索状構造”と“胆汁排泄を担う胆管”を作製する技術の創出が期待されている。

(4) 肝臓に特徴的な立体的かつ秩序立った類洞や胆管を再構築し得る技術は存在しない上、肝細胞間に形成する肝毛細胆管と胆管が機能的に接合した報告もない。

### 2. 研究の目的

(1) “ヒト初代肝細胞と類洞内皮細胞の二次元配列・三次元培養”と“リプログラミングに基づく肝毛細胆管-肝内胆管構造・機能の再構築技術”を融合し、肝細胞/類洞内皮細胞（類洞）/胆管細胞（胆管）配列組織（Arranged-Hepatocytes/liver sinusoidal Endothelial cells/Cholangiocytes Tissues; A-HECT）を作製する。

(2) マウスの皮下等に A-HECT を移植して立体組織化を促し、機能的な類洞及び胆管の再構築を実証する。

(3) 機能的な類洞と胆管を有する“ヒト肝臓”を立体再構築し得る新たな技術を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット初代肝細胞/内皮細胞配列組織体の作製及び移植

① 矩形の孔貫通(300×1000 μm<sup>2</sup>)を有するPDMS製格子状フィルム(Multi-Pored Silicone Film; MPSF、格子幅300、500、800 μm)を作製した。温度応答性培養皿(TRCD)にMPSFを貼り付け、Ptスパッタリングした。MPSFを除去した後、PEF-SH(Mw:10,000)を修飾して細胞接着/非接着表面を作製した。

② ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を $5.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、ヒト脂肪由来幹細胞(hADSC)を $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種し、共培養した。HUVECとhADSCの混合播種(Mix)、hADSCを3日間培養した後にHUVECを播種(hADSC/HUVEC)、HUVECを3日間培養した後にhADSCを播種(HUVEC/hADSC)する3条件で培養した。細胞トレーシング試薬や免疫組織化学染色を利用し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で細胞分布や立体構造を解析した。

③ ラット初代肝細胞をFBSコートしたTRCD上に $8.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種し、3日間培養した。上記①の培養基材(格子幅500 μm)にHUVECを3日間培養した後にhADSCを2日間共培養した。それぞれ温度を低下させて細胞シートを作製し、重層して接着するまで静置した。細胞分布や立体構造を解析した。NOD SCIDマウスの皮下に移植し、1週間後の組織を回収してmRNA発現レベルを解析した。肝細胞シート(Hep)、肝細胞/HUVEC/hADSC混合シート(Mix)、肝細胞シート/HUVEC-hADSCネットワーク組織(Network)を比較した。

#### (2) ラット初代肝細胞/ヒト類洞内皮細胞(hLSEC)配列培養

① TRCDにMPSF(格子幅500 μm)を貼り付け、ラット初代肝細胞を $4.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種し、3日間培養した。MPSFを除去した後、hLSECを $5.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種して3日間培養した。続いて、hADSCを $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種して2日間培養した。細胞トレーシング試薬を利用し、細胞分布を解析した。

② 培養8日目のラット初代肝細胞/hLSEC配列組織からTotal RNAを回収した。肝特異的な機能に関連する遺伝子発現レベルをリアルタイムRT-PCRで評価した。肝細胞のみ及びランダムな共培養と比較した。

#### (3) ラット肝前駆細胞由来胆管の作製

① 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、低分子化合物(ROCK阻害剤、TGF-β阻害剤、GSK3阻害剤)を添加したDMEM/F12培地で培養して肝



管腔形成に特徴的な遺伝子の高発現が見られた。類洞内皮細胞に特徴的な hLYVE1 の発現上昇も見られた。

⑤ *In vivo* では、Network 移植群で rCyp1a1、rCyp1a2、rTtr、rG6pc、rOrc、rCps1、rNtcp 等の肝特異的な遺伝子が高発現した。周皮細胞に特徴的な hPDGFRB や hCSPG4、内皮細胞の管腔形成に特徴的な hIFITM1、類洞内皮細胞に特徴的な hLYVE1 の高発現が見られた。アポトーシス rCasp3 の発現が抑制されており、肝細胞の良好な生存が示唆された。

## (2) 肝細胞/hLSEC 配列組織の機能発現

① MPSF を利用したパターンニング培養では、ラット肝細胞が矩形、格子状の間隙に hLSEC が存在しており、肝細胞/hLSEC の配列培養に成功した。(Fig. 3)

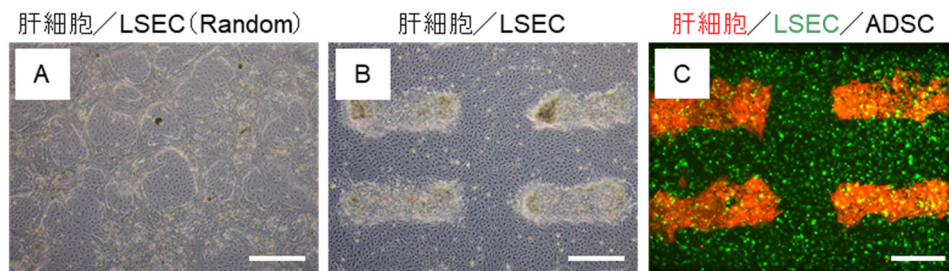


Fig.3. ラット初代肝細胞とLSECの共培養。(A) コラーゲンコートディッシュ(肝細胞培養5日目)。(B) MPSFによるパターンニング培養(肝細胞培養5日目)。(C) MPSFによるパターンニング培養(肝細胞培養8日目)。赤: 肝細胞、緑: LSEC。スケールバーは500  $\mu\text{m}$ 。

② 肝細胞/hLSEC 配列組織では、肝細胞のみ及びランダムな共培養と比較して、rAlb、rAat、rLdlr、rTat、rTdo2、rCps1、rArg1、rTtr、rG6pc 等の肝特異機能の高発現を維持した。

## (3) 効率的な培養胆管の作製及び肝毛細胆管との接合

① 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。

② MEF を利用することによって胆管形成効率が向上したが、MEF や CLiP の播種密度を高くしても形成効率の向上は見られなかった。MEF の存在が TGF- $\beta$ 、Notch、Jagged シグナルの活性化して分化誘導するとともに、三次元構造を裏打ちしたと考えられる。

③ 0.25、1.0、 $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で作製したラット CLiP (rCLiP-CN-0.25、rCLiP-CN-1.0、rCLiP-CN-5.0) を比較すると、rCLiP-CN-5.0 で微細な管腔構造(小型肝細胞等の肝前駆細胞から成熟させた組織に類似)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。

④ 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. 4A)。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。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 の蛍光が減衰して培養胆管に移行が見られた(Fig. 4B)。今後は、肝細胞/hLSEC 配列組織と培養胆管を複合し、肝特異的な構造・機能の再構築を明らかにすると共に、移植治療への展開を推進する。

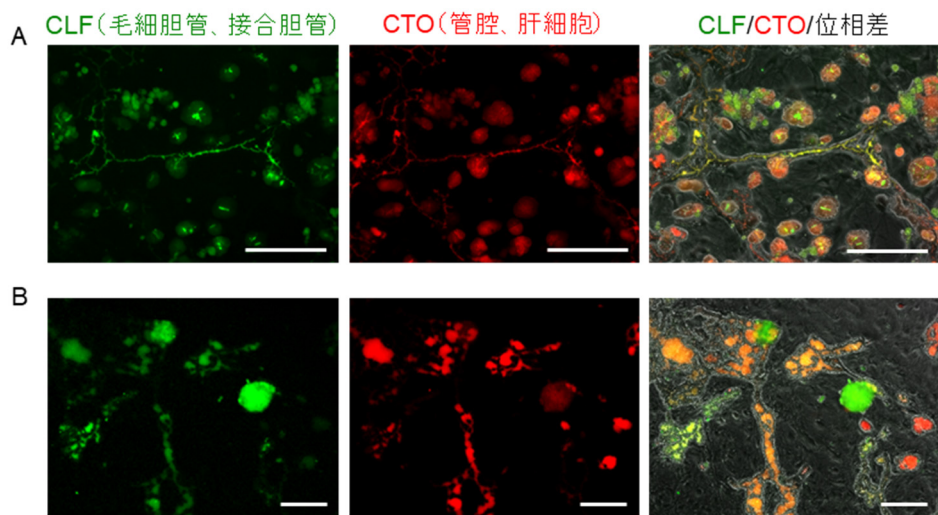


Fig.4. 肝毛細胆管と培養胆管の機能的な接合。(A) ラット肝細胞、(B) ラット肝細胞スフェロイド。スケールバーは200  $\mu\text{m}$ 。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Huang Yu, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Katsuda Takeshi, Ochiya Takahiro, Gu Wei Li, Miyamoto Daisuke, Hamada Takashi, Hidaka Masaaki, Kanetaka Kengo, Adachi Tomohiko, Eguchi Susumu	4. 巻 118
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 2572 ~ 2584
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Yu, Sakai Yusuke, Hara Takanobu, Katsuda Takeshi, Ochiya Takahiro, Gu Wei Li, Miyamoto Daisuke, Hamada Takashi, Hidaka Masaaki, Kanetaka Kengo, Adachi Tomohiko, Eguchi Susumu	4. 巻 118
2. 論文標題 Cover Image, Volume 118, Number 7, July 2021	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.27410	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 -

1. 著者名 Miyamoto Daisuke, Sakai Yusuke, Huang Yu, Yamasaki Chihiro, Tateno Chise, Hasegawa Hideko, Murai Tomomi, Hara Takanobu, Adachi Tomohiko, Soyama Akihiko, Hidaka Masaaki, Ito Shinichiro, Kanetaka Kengo, Eguchi Susumu	4. 巻 18
2. 論文標題 Functional changes of cocultured hepatocyte sheets subjected to continuous liver regeneration stimulation in cDNA-uPA/SCID mouse: Differences in transplantation sites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 7 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.02.004	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 -

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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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 -

1. 著者名 Sakai Yusuke, Koike Makiko, Murai Tomomi, Hidaka Masaaki, Soyama Akihiko, Takatsuki Mitsuhsa, Eguchi Susumu	4. 巻 128
2. 論文標題 In vitro and in vivo fabrication of stable human hepatocyte tissue in combination with normal fibroblasts derived from donors of various ages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 766 ~ 772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.05.009	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 -

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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、中澤浩二、日高匡章、高槻光寿、井嶋博之、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1回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2019年

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 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



1. 発表者名 森翔一郎、堺 裕輔、井嶋 博之
2. 発表標題 胆管様組織と肝細胞スフェロイドの共培養による生体外での胆汁排泄機構の再構築
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森翔一郎、堺 裕輔、井嶋 博之
2. 発表標題 リプログラミング技術を用いた肝内胆管の作製と胆汁排泄評価
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口晋、宮本大輔、黄宇、原貴信、足立智彦、金高賢悟、堺裕輔、落谷孝広
2. 発表標題 胆道排出路を持った肝組織構築の試み
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黄宇、堺裕輔、原貴信、勝田毅、落谷孝広、足立智彦、宮本大輔、古維立、金高賢悟、江口晋
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 黄宇、宮本大輔、堺裕輔、原貴信、曾山明彦、日高匡章、村上俊介、松隈国仁、足立智彦、伊藤信一郎、金高賢悟、江口晋
2. 発表標題 Chemical conversion of aged hepatocytes into bipotent liver progenitor cell
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1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、鮫島正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/036978	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
研究分担者	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)	
研究分担者	中澤 浩二  (NAKAZAWA Kohji)  (00304733)	北九州市立大学・国際環境工学部・教授   (27101)	

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