

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K05843  
研究課題名(和文) 新規肝オルガノイドを用いた肝細胞と胆管の接続部構造形成のメカニズム解明とその応用  
  
研究課題名(英文) Establishment of hepatobiliary connection ex vivo  
  
研究代表者  
谷水 直樹 (Tanimizu, Naoki)  
  
東京大学・医科学研究所・准教授  
  
研究者番号：00333386  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胆管上皮細胞と肝前駆細胞を用いて、位相差顕微鏡下でも肝細胞の毛細胆管と胆管がヘリング管を介して接続している新規肝臓オルガノイドを構築し、Hepatobiliary tubular organoid (HBTO)と名付けた。HBTOでは、肝機能が長期間維持され、胆汁酸が肝細胞から胆管へ輸送されるなど、肝臓組織内での物質輸送が再現されていた。さらに肝星細胞およびクッパー細胞を導入したmulticellular HBTO (mcHBTO)を作成することにより、肝疾患モデルの作成が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
我々は肝臓の上皮組織である肝細胞の毛細胆管と胆管の接続をin vitroで再現することに初めて成功した。臓器再生において、隣接する組織の空間配置を制御することは非常に重要であり、上皮組織形成の理解および応用のいずれの面からも本研究成果は学術的・社会的意義が高いものである。

研究成果の概要(英文)： Inside the liver, hepatocytes and biliary epithelial cells (BECs) form bile canaliculi and bile ducts, respectively, which are interconnected to establish the bile excretion system for transporting the bile produced by hepatocytes into the duodenum. We applied an organoid culture technique on hepatocyte progenitors and BECs, we established a novel hepato-biliary tubular organoid (HBTO) in which bile acid and bilirubin up-taken by hepatocytes are secreted into bile ducts within the organoid.  
We targeted two types of liver injury, steatosis and cholestasis, to generate hepatic injury models with HBTO. By incubating HBTOs with free fatty acids, lipid droplets were accumulated inside hepatocytes. When troglitazone that inhibits bile salt export pump (BSEP) was added to culture medium, bile acids were accumulated in hepatocytes instead of secreted into bile canaliculi and bile ducts.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮組織

## 1. 研究開始当初の背景

隣接する上皮組織間の接続部は、臓器機能の要となる組織構造である。肝臓の肝細胞と胆管の接続部はヘリング管 (CoH) と呼ばれている。肝細胞が合成する胆汁は毛細胆管に排泄された後、CoH を経て胆管上皮細胞 (BEC) が形成する胆管に輸送される。これまで、肝上皮組織構造を忠実に再現した培養系がなかったために、CoH の形成メカニズムの解析は進んでいなかった。我々は、マウス成体肝臓から分離した肝細胞と BEC を共培養し、肝細胞と胆管が CoH を介して機能的に接続した Hepatobiliary Tubular Organoid (HBT0) の作成に成功した。肝細胞の培養系は、薬物代謝アッセイなどで需要が高いが、初代肝細胞は培養開始後速やかに代謝活性を失う事、肝細胞癌細胞株や iPS 細胞などの肝細胞から代謝活性を有する肝細胞を誘導することは難しいなどの課題があった。また、代謝活性の維持が難しいために、in vitro で慢性肝疾患を再現する培養系の構築は困難であった。

本研究計画では、HBT0 を用いて CoH 形成を制御する分子メカニズムの解明に取り組むとともに、HBT0 内の肝細胞が持続的に高い代謝活性を示すかについて慢性肝疾患モデルの構築に向けて、疾患関連性が指定される肝星細胞 (Hepatic stellate cell, HSC) およびクッパー細胞 (Kupffer cell, KC) を HBT0 に導入したオルガノイドを構築することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、HBT0 内の肝細胞機能の解析、HBT0 で形成される肝細胞と胆管の接続部構造である CoH の形成メカニズムの解明、HBT0 からの肝細胞代謝産物の回収方法の検討、HSC および KC の導入した HBT0 の構築、を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### 1. HBT0 の機能解析

#### 1 - 1. HBT0 内の肝細胞機能の解析

肝細胞の分化程度および機能維持を検討する。HBT0 作成後、培地への ALB 分泌および薬剤代謝酵素 CYP3A4 の活性について、継続的な変化を解析する。

#### 1 - 2. HBT0 内での代謝産物動態の解析

肝細胞と胆管の機能的な接続を証明するために、HBT0 に蛍光標識胆汁酸を添加し、経時的にオルガノイドへの取り込みを検証する。

### 2. CoH の形成メカニズムの解明

#### 2 - 1. 成熟肝細胞と小型肝細胞の比較

- トランスクリプトーム解析を行うことにより、両細胞の遺伝子発現プロファイルを解析する。
- Cadherin や Claudin (Cldn) などの細胞間接着分子の発現量に注目してデータ解析を行う。

#### 2 - 2. ヘリング管形成効率化の解析

プレート底面を酸素透過性フィルムに取り換えたプレートで HBT0 を作製する。酸素濃度上昇によってヘリング管形成効率が上昇するか検討する。

#### 2 - 3. HBT0 形成における肝細胞および胆管上皮細胞の分化状態の変化解析

CAG-Cre:Tomato マウス由来の胆管上皮細胞あるいは肝前駆細胞を用いて HBT0 を作成する。HBT0 内の肝細胞を HNF4 $\alpha$ 、胆管上皮細胞を CK19 で染色することにより、胆管上皮細胞、肝細胞、胆管上皮細胞の分化転換が CoH 形成に寄与しているのかを検証する。

### 3 . 肝細胞代謝産物の回収方法の開発

#### 3 - 1 . 細胞膜からの CLDN 除去

細胞膜から CLDN を除去する作用がある Methyl  $\alpha$ -cyclodextrin (M $\alpha$ CD) を添加する (Shigetomi et al. *J Cell Biol* 2018)。肝細胞への影響を最小限にし、胆管から肝細胞代謝産物を取り出すために最適な M $\alpha$ CD 濃度を決定する。

#### 3 - 2 . CLDN 阻害ペプチドを用いたタイト結合機能低下

*Clostridium perfringens* 由来の CPE-peptide は、BEC 特異的な CLDN3、CLDN4 に対して選択的に結合して、機能を阻害することが知られている。HBO に蛍光ラベルされた胆汁酸(Cholyl-Lysine-Fluorescein (CLF)) を取り込ませた後、CPE-peptide を添加する。CLF を取り出すために最適な濃度を決定する。

### 4 . 肝病態モデルの構築

#### 3 - 1 . 胆汁うっ滞モデル

肝細胞の胆汁酸トランスポーター-BSEP に対する阻害効果を示す Troglitazone の存在下で培養を行った後、CLF を添加して、HBT0 内の CLF 輸送の変化を検証する。

#### 3 - 2 . 脂肪肝モデル

予備実験によって、遊離脂肪酸を添加すると、肝細胞に脂肪滴が蓄積することがわかった。肝細胞死や残存した肝細胞の増殖がみられるか、コラーゲン線維が蓄積するか、検討する。

#### 3 - 3 . 線維芽細胞、マクロファージの導入

- マウス由来の KC, HSC を HBT0 に添加して培養する。脂肪酸添加によって、HSC 活性化が誘導されるか検証する。

### 4 . 研究成果

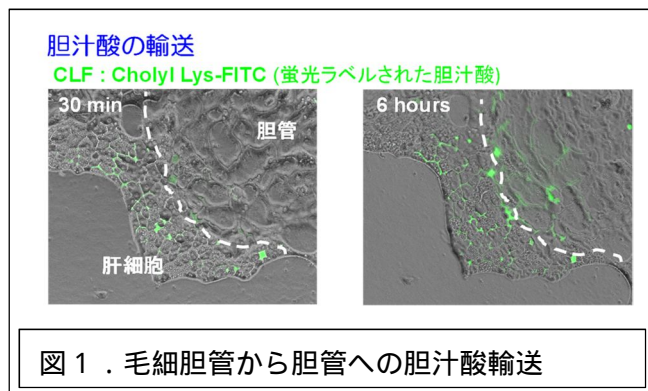
#### 1 . HBT0 の機能解析

##### 1 - 1 . HBT0 内の肝細胞機能の解析

経時的に ALB 分泌を解析したところ、HBT0 誘導後、1 か月程度、高い ALB 分泌が維持されていた。また CYP3A4 活性についても、約 1 か月、安定して活性が維持されていることが分かった。肝

##### 1 - 2 . HBT0 内での代謝産物動態の解析

HBT0 に蛍光標識胆汁酸 (Cholyl-Lys-Fluorescein) を添加し、経時的にオルガノイドへの取り込みを検証した。肝細胞に取り込まれた後速やかに毛細胆管に排泄され、その後胆管へ輸送されることがわかった (図 1)。



#### 2 . CoH の形成メカニズムの解明

##### 2 1 . 成熟肝細胞と小型肝細胞/肝前駆細胞の比較

- 成熟肝細胞 (Mature hepatocyte, MH) と小型肝細胞/肝前駆細胞 (Hepatocyte progenitor cells, HPC) の RNAseq 解析を行ったところ、HPC は ZONE1 および ZONE2 に局在していることが明らかになった。
- HPC を共培養に用いた場合に、より効率よく CoH が形成されることが明らかになった (図 2)。ECAD<sup>+/high</sup> 細胞として分離した MH を用いた場合に CoH 形成効率が高かったことから、肝細胞と胆管上皮細胞の間の ECAD を介した細胞間結合が重要であることが明らかになった。

●

## 2 2 . CoH 形成プロセスの解析

HBTO での CoH 形成過程を解析した。その結果、CoH は比較的早い時期に形成されており、その後の培養期間中に CoH の数に変化はないことが明らかになった。一方、HBTO 誘導後、肝細胞間に形成される毛細胆管構造が発達することがわかった ( 図 3 )。

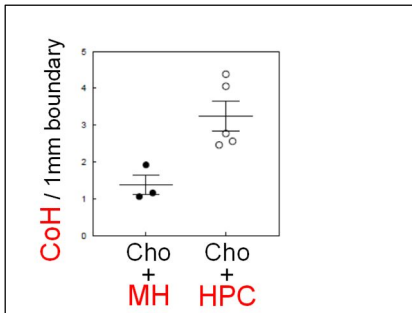


図 2 . 肝細胞の違いによる CoH 形成効率の変化

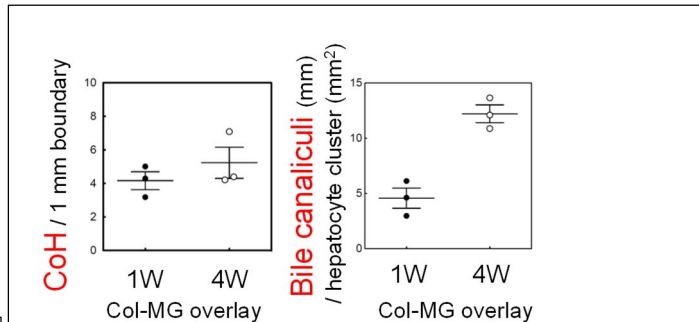


図 3 . HBTO 培養中の CoH および BC の形成

### 2 - 3 . HBTO形成における肝細胞および胆管上皮細胞の分化状態の变化解析

CAG-Cre:Tomatoマウス由来のBECと野生型の肝前前駆細胞を用いてHBTOを作成し、HBTO内の肝細胞をHNF4α、胆管上皮細胞をCK19で染色した。Tomato(+)の細胞はCK19+HNF4α-の状態を維持してオルガノイドを構築していたことから、胆管上皮細胞肝細胞への分化転換がCoH形成に寄与していないことが明らかになった ( 図 4 )。

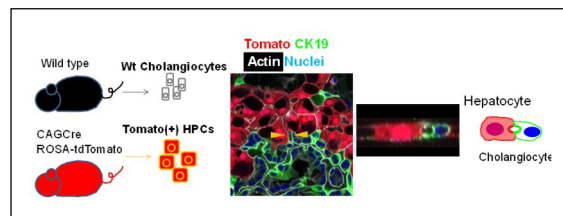


図 4 . 胆管上皮細胞と肝前駆細胞による CoH の形成

## 3 . 肝細胞代謝産物の回収方法の開発

### 3 - 1 . 細胞膜からの CLDN 除去

細胞膜から CLDN を除去する作用がある Methyl®-cyclodextrin (M®CD) を添加し、培地中での蛍光強度を定量した。経時的に蛍光物質が培地中に放出されていた。

### 3 - 2 . CLDN 阻害ペプチドを用いたタイト結合機能低下

Clostridi(Cholyl-Lysine-Fluorescein (CLF))と HBTO に取り込ませた後、BEC 特異的な CLDN3、CLDN4 に対して選択的に結合する CPE-peptide を HBTO に添加した。胆管と毛細胆管の管腔内の CLF は外へ流出する傾向が見られたものの、培地中での蛍光強度を定量して解析することができなかった

## 4 . 肝病態モデルの構築

### 4 - 1 . 胆汁うっ滞モデル

HBTO に Troglitazone の存在下で培養を行った。肝障害の誘導と、CLF の肝細胞内に蓄積し、胆管への排泄が抑制されていた。

### 4 - 2 . 線維芽細胞、マクロファージの導入

- HBTO を用いた肝病態モデル構築のために、マウスの KC と HSC を HBTO に導入した multicellular HBTO (mcHBTO) を作製した。
- パルミチン酸およびオレイン酸添加、さらにリポ多糖(LPS)の添加によって、肝細胞への脂肪滴蓄積が観察された。脂肪酸と LPS 添加群では炎症性サイトカイン TNF が検出された。さらに、活性化 HSC のマーカーである SMA 染色を行ったと

ころ、脂肪酸と LPS 添加群において星細胞が活性化していることを確認した。また、Clodronate liposome を添加することで KC を除去した後に脂肪酸を添加すると、脂肪酸と LPS による HSC の活性化が抑制された。以上のように、HSC および KC を含む mCHBT0 への脂肪酸添加によって、KC の存在依存的に HSC の活性化が誘導されることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanimizu Naoki, Ichinohe Norihisa, Sasaki Yasushi, Itoh Tohru, Sudo Ryo, Yamaguchi Tomoko, Katsuda Takeshi, Ninomiya Takafumi, Tokino Takashi, Ochiya Takahiro, Miyajima Atsushi, Mitaka Toshihiro	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 3390 ~ 3401
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 -
1. 著者名 Koui Yuta, Himeno Misao, Mori Yusuke, Nakano Yasuhiro, Saijou Eiko, Tanimizu Naoki, Kamiya Yoshiko, Anzai Hiroko, Maeda Natsuki, Wang Luyao, Yamada Tadanori, Sakai Yasuyuki, Nakato Ryuichiro, Miyajima Atsushi, Kido Taketomo	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of human iPSC-derived quiescent hepatic stellate cell-like cells for drug discovery and in vitro disease modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3050 ~ 3063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.002	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 Ichinohe Norihisa, Ishii Masayuki, Tanimizu Naoki, Mizuguchi Toru, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Suzuki Hiromu, Mitaka Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 312-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02387-6	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 Tanimizu Naoki	4. 巻 27
2. 論文標題 The neonatal liver: Normal development and response to injury and disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Fetal and Neonatal Medicine	6. 最初と最後の頁 101229 ~ 101229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.siny.2021.101229	査読の有無 無
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 Tanimizu Naoki, Ichinohe Norihisa, Suzuki Hiromu, Mitaka Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Prolonged oxidative stress and delayed tissue repair exacerbate acetaminophen-induced liver injury in aged mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 18907 ~ 18927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.103973	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 Tanimizu Naoki	4. 巻 1
2. 論文標題 The neonatal liver: Normal development and response to injury and disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seminars in Fetal and Neonatal Medicine	6. 最初と最後の頁 101229 ~ 101229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.siny.2021.101229	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 3D analyses of liver tissue structures and reconstitution of the hepatobiliary connection ex vivo
3. 学会等名 FACS SRC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹、三高 俊広
2. 発表標題 肝オルガノイドを用いた肝疾患モデルの構築
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 胆汁輸送路を備えた肝臓オルガノイドの開発
3. 学会等名 創薬フォーラム第7回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹、三高 俊広
2. 発表標題 肝臓の3次元構造解析に基づく肝臓オルガノイドの構築
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 胆管接続型肝臓オルガノイドを用いた肝疾患モデルの構築
3. 学会等名 薬物動態談話会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 胆汁排泄型肝臓オルガノイドを用いた応用研究の展開
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会(招待講演)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 胆汁排泄型肝臓オルガノイドを用いた肝疾患モデル構築
3. 学会等名 CBI学会2021年大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 Modeling of liver tissue structures ex vivo
3. 学会等名 East Asia Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 胆汁排泄路を備えた肝オルガノイドの構築とその応用
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 肝臓創出のためのEx vivo組織構築
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷水 直樹
2. 発表標題 Ex vivoにおける肝組織の再構築
3. 学会等名 肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肝細胞と胆管上皮細胞との接続部構造を有する肝上皮様組織の培養方法	発明者 谷水 直樹、三高 俊広	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/014421	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

札幌医科大学附属フロンティア医学研究所組織再生学部門ホームページ <a href="https://www.smu-tisdevreg.jp/">https://www.smu-tisdevreg.jp/</a>
---

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	三高 俊広  (Mitaka Toshihiro)  (50231618)	札幌医科大学・医学部・教授        (20101)	

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