

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17010

研究課題名（和文）オルガノイド培養による原発性硬化性胆管炎の細胞外小胞を介した新規炎症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a Novel Inflammatory Mechanism Mediated by Extracellular Vesicles in Primary Sclerosing Cholangitis Using Organoid Culture

研究代表者

勝見 智大 (Katsumi, Tomohiro)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70637355

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）：原発性硬化性胆管炎に特徴的な胆管障害が細胞外小胞（EVs）により誘導される新規機序の解明を目的としているが、本研究では胆管上皮細胞の培養とそこから放出されるEVsの抽出を行った。胆管上皮細胞の管腔側と基底膜側ではEVs蛋白組成が異なり、中でもS100蛋白が特異的な発現であった。shRNAを行いノックダウンした細胞からEVsを抽出し、炎症細胞に刺激すると炎症性サイトカインの発現（TNF、IL-1、IL-6）が上昇していた。従って胆管上皮細胞からのEVsが胆管炎などの病態形成に関与することが示唆される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検証では細胆管上皮細胞培養技術によりEVs抽出が可能となった。またそれらのEVs刺激により炎症性サイトカインが上昇することが判明した。これらはPSCの胆管周囲炎症の病態に関与するものと思われる。すなわち胆管障害による細胆管反応が胆管周囲の炎症を惹起するEVsを放出しすることが考えられる。PSCは根治療法として肝移植しかない状況であるが、この炎症誘導機序の解明により、新たな治療が展開され難治性疾患の予後を延長させることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate a novel mechanism by which extracellular vesicles (EVs) induce the bile duct damage characteristic of primary sclerosing cholangitis, we cultured bile duct epithelial cells and extracted EVs released from them. EVs proteins were differentially expressed on the luminal and basement membrane sides of bile duct epithelial cells, with specific expression of S100 protein. shRNA knockdown of EVs from the cells and stimulation of inflammatory cells resulted in increased expression of inflammatory cytokines (TNF, IL-1, and IL-6). These results suggest that EVs from bile duct epithelial cells are involved in the pathogenesis of cholangitis and other diseases.

研究分野：自己免疫性肝疾患

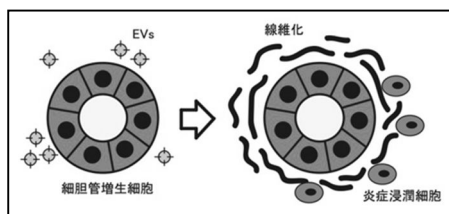
キーワード：細胞外小胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原発性硬化性胆管炎 (PSC) は肝内・肝外胆管の線維性狭窄を来たす慢性進行性胆汁うっ滞性肝疾患である。病理学的には胆管周囲輪状線維化と炎症細胞浸潤、及び細胆管増生が特徴的であるが、そのメカニズムは未だ明らかではない。また有効な根治療法は確立しておらず、肝移植が唯一の根治療法である。これまで申請者は胆管上皮細胞と同等の極性・生理機能を持つ活性化ヒトおよびマウス細胞株から放出される細胞間コミュニケーションの重要な伝達物質である Extracellular Vesicles (EVs) を回収し、proteomics 解析にて EVs 中に複数の DAMPs S100A11 が含まれることを特定した。すなわち胆管上皮細胞は胆管障害のストレス環境下においては DAMPs を含む EVs を放出し炎症細胞が活性化され、炎症・線維化を誘導する可能性が示唆された。従って PSC 障害胆管には細胆管増生反応が起こり、その周囲には線維化が認められることから PSC の炎症・線維化誘導過程においては細胆管増生細胞とその放出 EVs がその主体をなすという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的



本研究では PSC において胆管障害反応として知られている細胆管増生細胞がマクロファージ活性化や線維化を惹起し、その誘導因子として DAMP S100A11 を含む EVs が関与していることの証明を目的とした。通常、細胆管増生細胞はプライマリー細胞として単離することは可能であ

っても、その放出 EVs を十分量回収するまでの継続培養は困難であった。しかし本研究では細胆管増生細胞の培養系としてオルガノイド化を確立することで、目的細胞のより純粋な EVs を回収することが可能となる。このオルガノイドは *in vivo* シグナルを模倣する特定の培地で増殖・自己組織化し生体内における生物学的な環境を保持することが可能である。

### 3. 研究の方法

研究方法は以下の - の計画で実施した。胆管上皮細胞の極性を維持した実験系の確立と両極から放出される EVs の抽出と組成検証、胆管上皮細胞株由来 EVs 中の S100A11 がマクロファージを活性化しさらに線維化をも惹起することの検証、細胆管上皮細胞オルガノイドの培養と放出 EVs による炎症誘導検証すること。の培養系はマイクロポアを持つメンブレン上に胆管上皮細胞株を培養し、管腔側と基底膜側に分離させそれぞれ培養液から超遠心法を用いて EVs を抽出した。では EVs 中の DAMP S100A11 が PSC 炎症誘導因子であることを validation するため shRNA による胆管上皮細胞内 S100 ノックダウンを行い EVs の質的・量的解析を行った。

では PSC モデルマウスである *Mdr2*<sup>-/-</sup> マウスから EpCAM 陽性細胞を免疫沈降法にて単離し、オルガノイド化した。それらから抽出した EVs をマクロファージに添加刺激することで炎症誘導の検証を行った。

### 4. 研究成果

令和 2 年度では胆管上皮細胞株の培養と、細胞から放出される EVs を超遠心法にて回収した。回収 EVs は NTA 解析にて濃度とそのサイズを特定し得た。管腔側に放出される EVs 濃度が基底膜側に放出される EVs と比較して多く、EVs 蛋白濃度も高いことが判明した。また NTA ではサイ

ズは約 100nm 程度で両者には違いは見られなかった。令和 3 年度では S100A11 ノックダウン胆管上皮細胞からの EVs ではマクロファージ BMDM は刺激しても炎症性サイトカイン上昇が緩やかであった。最終年度の検証では胆管細胞オルガノイドから EVs を抽出し、マクロファージへの添加実験を行った。EVs 刺激後のマクロファージの極性を M1 マーカーの炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 など)や、M2 マーカーの CD206, Arg1, Ym1 を測定確認すると、EVs 刺激後の炎症性サイトカインが上昇しており、M2 マーカーは特に変化がなかった。

マウス胆管上皮細胞  
オルガノイド(申請者樹立)



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