

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08598

研究課題名（和文）低分子化合物誘導された肝前駆細胞による胆汁排出システムを兼ね備えた肝組織の開発

研究課題名（英文）Development of regenerative liver tissue with biliary drainage system by chemically liver progenitor cells

研究代表者

日高 匡章（Hidaka, Masaaki）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：10457541

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）：肝疾患は肝移植ドナーの不足と肝疾患の不可逆的進行のため大きな医療負担を強いている。今回の研究では肝胆臓組織オルガノイド（HBO）を作製、肝疾患を治癒することを目標とした。肝硬変から分離したヒト肝細胞を用いて3つの低分子化合物を用いて肝前駆細胞（hCLiPs）を誘導した。その前駆細胞から胆管と成熟肝細胞へ誘導、胆汁分泌および輸送機能を示し、両方の構造を持つオルガノイドを作製することに成功した。胆管と肝細胞両方の遺伝子発現パターンを示した。肝硬変肝組織から採取したhCLiPから、機能的な患者特異的HBOを作製することにも成功した。共培養することで組織内に胆管を有する組織を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝移植ドナーの不足と肝疾患の進行により、肝硬変、肝不全診療では依然として大きな医療負担を強いている。肝胆臓オルガノイド（HBO）は、試験管内ミニ臓器モデルを提供し、再生医療の発展に役立つ可能性がある。本研究により、ヒトHBOは、肝胆道系疾患の研究、創薬、個別化医療のための効率的なモデルとしての可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Liver disease imposes a significant medical burden due to a shortage of liver transplant donors and irreversible progression of liver disease. The aim of this study was to create hepatobiliary tissue organoids (HBOs) and cure liver disease. Hepatic progenitor cells (hCLiPs) were induced using human hepatocytes isolated from cirrhosis using three small molecule compounds. From those progenitor cells, they were successfully induced into bile ducts and mature hepatocytes, exhibited bile secretion and transport functions, and created organoids with both structures. It showed gene expression patterns in both bile ducts and hepatocytes. Functional patient-specific HBOs were also successfully produced from hCLiPs from cirrhotic liver tissue. Hepatobiliary tissue organoids with bile ducts in the tissue were established from human cirrhotic liver.

研究分野：再生医療

キーワード：肝前駆細胞 胆管再生 肝再生

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、我々はラット及びマウス成熟肝細胞を3つの低分子化合物 (ROCK 阻害剤、TGF- 阻害剤、GSK3 阻害剤: YAC) を添加した培地で培養すると、肝前駆細胞 (Chemically-induced Liver Progenitor; CLiP) にリプログラミングすることが先行研究にて報告してきた。

研究代表者はこれまで、肝細胞シートを用いた研究 (ヒト肝細胞と線維芽細胞との共培養シート) にて、マウスに移植した後、ヒト肝細胞の培養に成功している。現在の肝臓再生医療では、肝細胞が産生した胆汁は胆管への排泄経路がなく、肝細胞から胆管への胆汁排泄経路構築が大事な解決すべき問題点となっている。本研究では、これらを解決すべく肝様組織を作製することを試みた。

2. 研究の目的

ラットおよびヒトから分離した成熟肝細胞から誘導した CLiP を用いて、肝胆管細胞への効率的な分化誘導、さらに胆管形成された肝様組織 (オルガノイド) を作製することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト成熟肝細胞から誘導したヒト CLiP (hCLiP) を用いて、胆管への誘導を図ると同時に肝細胞から胆管への胆汁排泄経路構築を行った。

(1) ヒト CLiP (hCLiP) 誘導

hCLiP は低分子化合物 (YAC) によって変換された

ヒトクライオ肝細胞 (CHH) を、コラーゲンタイプ I をコートしたディッシュに、プレート表面への接着を促進するため、STIM 培地中で 2×10^4 細胞/cm² の密度で播種した。使用した STIM 培地は、1x ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン (100X) と 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む 10 ng/ μ L 上皮成長因子 (EGF) 入り肝細胞培養培地キットであった。4 時間後、培養液を化学的に再プログラムされた小型培養液に交換した。小型肝細胞培地 (SHM) は、DMEM/F12 に 2.4g/L NaHCO₃ および L-グルタミンを含み、5mM HEPEs、30mg/L L-プロリン、0.05% BSA、10ng/mL EGF、インスリン-トランスフェリン-セリン (ITS) -X、10⁻⁷M デキサメタゾン (Dex) を添加した DMEM/F12、10mM ニコチンアミド、1mM リン酸アスコルビン酸-2、100U/mL ペニシリン、100mg/mL ストレプトマイシンに、0.5 μ M A-83-01 (TGF- β タイプ I 受容体阻害剤) 3 μ M CHIR99021 (GSK-3 阻害剤、10% FBS を添加し、FAC 培地と呼ぶことにした。培地は播種後 1 日、その後は 2~3 日ごとに交換した。CHH から 90% までの hCLiP を生成するには 14-16 日かかった。

(2) 肝細胞と胆管細胞を一体化した HBO 作製

90-100%コンフルエント状態の hCLiP を TrypLE Express で 15-20 分間処理した後、hCLiP を $0.5-1 \times 10^5$ cells/cm² の超低接着プレートに播種し、低分子誘導培地で培養した。比較のため、3 種類の低分子誘導培地を用意した: FAC 培地は上述の hCLiP 誘導培地であった; 胆道上皮細胞誘導培地 (BIM) は、mTeSRTM1 キットであり、mTeSRTM1 培地に 10 μ M Y-27632、0.5 μ M の A-83-01、および 3 μ M の CHIR99021 を添加した mTeSRTM1 培地; YAC 培地は、FBS の代わりに 10 μ M の Y-27632 を添加した以外は FAC 培地と同様であった。播種後 1~3 日目に、培地を交換することなく、5mL ピペットで細胞を穏やかに混合した。4 日目から、HBO を 15 mL チューブに集め、7xg で 2 分間遠心した。HBO ペレットを新鮮な培養液に懸濁し、元の培養皿に静かに移した。培地は 3-5 日ごとに交換した。

(3) リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) による遺伝子発現解析

サンプルを様々な条件下ディッシュ中で培養し、スピнкаラム (NucleoSpin RNA II) を用いて mRNA を抽出した。cDNA は大容量 cDNA 転写キットを用いて合成した。この PCR は、Applied Biosystems StepOne Plus Real-time PCR System with TaqMan Gene Expression Assay Kits を用いて行った。簡単に説明すると、PCR 混合物、1 μ L の cDNA、1 μ L の TaqMan Gene Expression Assay プローブ、5 μ L の TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems 社製) および 13 μ L のヌクレアーゼフリー水を含んでいた。サーモサイクリング条件は、95 で 20 秒間、続いて 95 で 1 秒間、60 で 20 秒間を 40 サイクル行った。サイクル閾値 (Ct) 値は Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR System を用いて自動的に決定した。発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子および内部コントロールであるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現レベルに対して正規化した。

(4) 免疫蛍光染色

細胞および HBO をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。その後、固定したサンプルを PBS 中 0.1% Triton X-100 で 10 分間インキュベートし、1% BSA を含む PBS で室温で 1 時間ブロッキングした。その後、PBS+1% BSA で希釈した一次抗体とともに 4 で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、PBS+1% BSA で希釈した適切な二次抗体と 2 時間インキュベートした。核は 4',6'-ジアミジオノ-2-フェニルインドール (DAPI) で 30 分間染色した。サンプルを PBS で 30-60 分間 3 回洗浄した。蛍光および明視野画像を顕微鏡 (Ti-

U および C-HGFI ; Nikon, Tokyo, Japan) で撮影した。

(5) ローダミン 123 アッセイ

ローダミン 123 アッセイを行った。100 μ M のローダミン 123 を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) と HBO を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、HBSS で 2 回洗浄した。多剤耐性タンパク質 1 (Mdr1) のトランスポーター活性を阻害するため、ローダミン 123 を添加する前に、サンプルを 20 μ M ベラパミルと 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。顕微鏡 (Ti-U および C-HGFI) を用いて、蛍光像および明視野像を撮影した。

(6) Cholyl-L-lysyl-fluorescein (CLF) 色素アッセイ

HBO に 1 μ M CLF (Corning Life Sciences, Bedford, USA) を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間負荷し、HBSS で 2 回洗浄した。細胞を観察し、共焦点顕微鏡を用いて画像を撮影した。蛍光および明視野画像は、顕微鏡 (Ti-U および C-HGFI) を用いて撮影した。CLF の代謝を観察するため、オルガノイドを元の培地でさらに 2 日間培養した。

(7) 患者由来 hCLiP からの肝胆膵オルガノイドの形成

この研究は、長崎大学病院の倫理委員会 (ID 09022449-6) により承認され、すべての患者からインフォームド・コンセントを得た。検体および試料は、各個人から書面によるインフォームド・コンセントを得た後に入手した。肝組織は外科的切除標本から採取し、採取後速やかに洗浄した。洗浄後、肝標本は冷 UW 液に浸漬し、迅速に研究室に搬送した。肝細胞 (MH) は、2 段階コラゲナーゼ灌流法を改良して、取得した組織から単離した。単離された細胞は、コットンメッシュメンブレンと 63 μ m のステンレスメッシュで濾過された。この後、50 \times g、各 2 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離を行い、三重精製を行った。得られた細胞懸濁液を 25% Percoll Plus 溶液と混合し、70 \times g、7 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心した。単離した MH を FAC 培地で数週間培養し、CLiP 化を誘導した。誘導された患者由来ヒト CLiP は Tryple 溶液で剥離し、YAC 培地でコンディショニングし、超低接着プレート (Lot.3471, Life Science, Corning, NY, USA) に播種した。

4. 研究成果

(1) 異なる誘導培地における超低接着ディッシュでの HBO 形成誘導

hCLiP は低分子培養液で誘導され、分化能を備えた肝前駆細胞としての明確な特徴を示し

ヒト肝胆管組織 (HBO) は特定の低分子の組み合わせによって、超低接着性ディッシュ内でヒト CLiPs から作製された (図 1A)。約 20 日後、hCLiP は、異なる低分子培地によって誘導された超低接着プレートにおいて、様々なタイプのオルガノイドを発生させる能力を示した。異なる誘導培地の影響

を受けたこれらのオルガノイドは、多様な形と大きさを示し、その成長は培養時間が長くなるにつれて拡大し続けた (図 1B)。20 日目には、オルガノイドの平均直径は約 200 μ m となった (図 1C)。これらのオルガノイドの断面から、複数のオリフィスと管腔構造の存在を特徴とする内部構造が明らかになった (図 1D)。以上の結果から、誘導培地を変化させることで、超低接着性培養ディッシュ上で hCLiP から肝胆膵様オルガノイドをワンステップで効率よく作製できることが示された。

(2) 肝細胞と胆管細胞を一体化した HBO

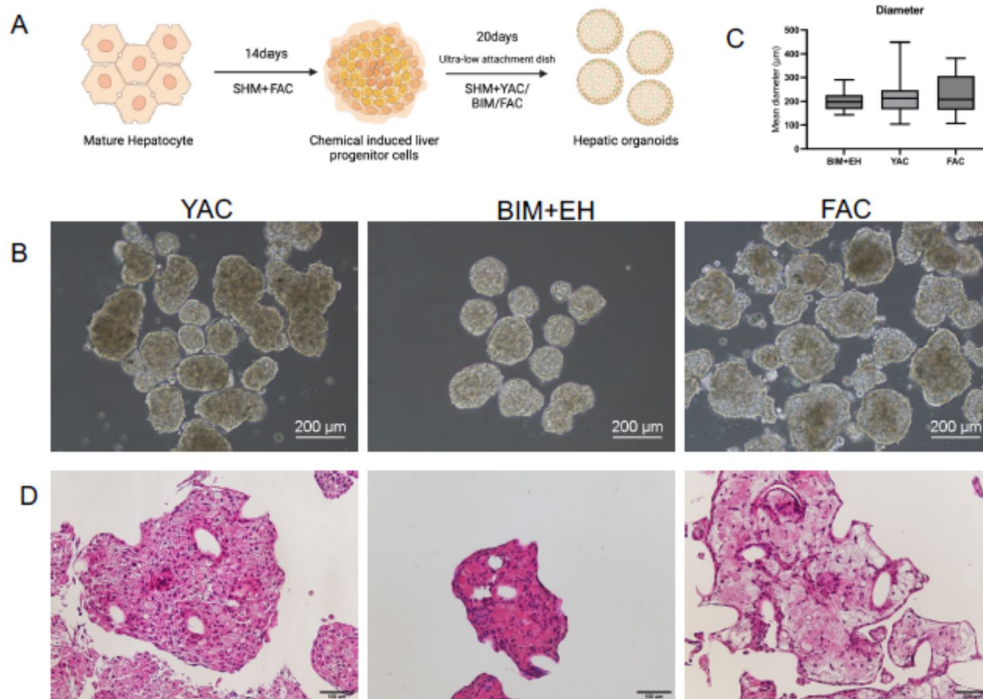
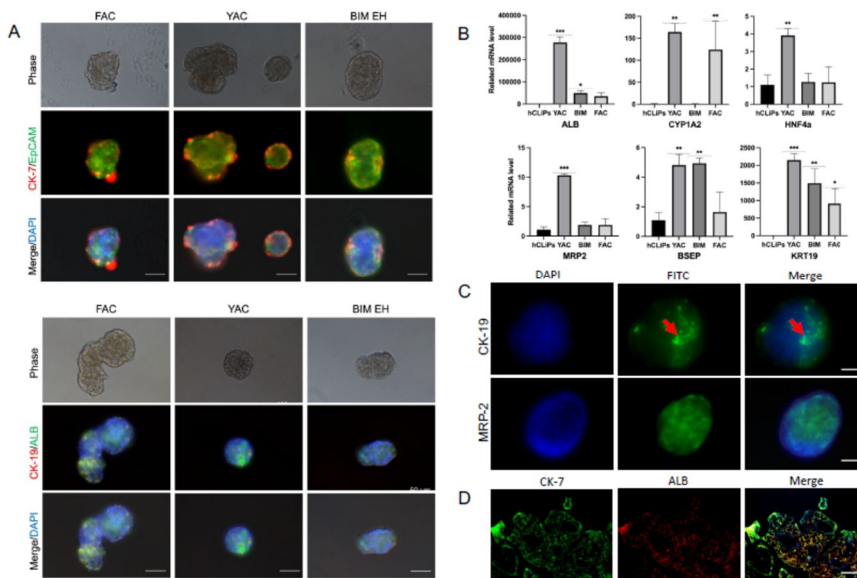


Fig1.

異なる条件培地から得られた HBO は、多様な形態を示す。FAC-HBO と YAC-HBO では、CK-7 陽性の管がオルガノイドの表面と内部に確認され、オルガノイド表面には BD 構造の存在を示す重要な指標となる囊状の膨らみが観察された (図 2A)。さらに、ALB の陽性発現により、オルガノイド内に MH が存在することがさらに確認された (図 2A)。さらに qRT-PCR の結果、20 日目に YAC 培地で誘導したオルガノイドでは、CYP1A2、HNF4A、ALB などの成熟肝細胞マーカーとともに、MRP-2、BSEP、KRT-19

Fig. 2



などの胆道マーカーの顕著な発現上昇が認められた。逆に、FAC 培地と BIM 培地で培養したオルガノイドでは、選択された胆道系および成熟肝細胞マーカーのアップレギュレーションが見られた (図 2B)。このデータから、オルガノイドの内部構造は 3 次元 BD 構造と MH を包含し、YAC-HBO の胆汁輸送と肝代謝の基本構造を形成していることが明らかになった。

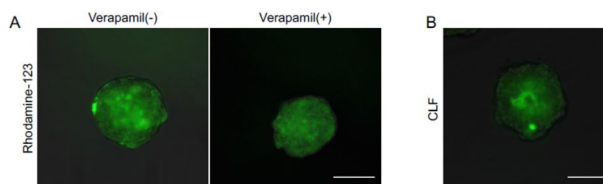
さらに、CK-19 と MRP-2 は、BD と胆管に共通するマーカーとして機能した。免疫蛍光の結果から、YAC-HBO における胆管と BD 構造の特徴が明らかになった (図 2C)。YAC-HBO をパラフィン固定し、切片にして免疫蛍光染色を行った。その結果、内腔を取り囲む細胞は胆道上皮細胞を示す CK-7 陽性であったが、隣接する間質細胞は MH の存在を示す ALB 陽性であった (図 2D)。これらの所見は、YAC-HBO が BD 構造と MH の両方を含む多細胞・多組織の肝胆道オルガノイドであることを強く示している。特筆すべきは、YAC 培地を用いることで、超低接着プレート上で、hCLiP を HBO に効率よく形質転換できることが示されたことである。

(3) 胆汁代謝・輸送機能を有する HBO

YAC-HBO の胆汁輸送機能を調べるために、胆汁酸トランスポーター MDR-1/2 および MRP-2 を介して輸送可能な胆汁酸アナログとして機能するローダミン-123 を利用して、胆汁輸送能を評価した。ローダミン-123 は内腔内に蓄積することがわかった。この輸送過程は、MDR-1 の阻害剤として知られるベラパミルによって阻害された (図 3A)。

CLF は胆汁のアナログであり、肝細胞には直接吸収されるが、胆汁上皮細胞には吸収されない。YAC-HO 細胞は培養液中に CLF を蓄積した (図 3B)。これらのデータは、hCLiPs から誘導された YAC-HBOs が、胆汁輸送に関連する構造と機能の両方の特性を示すことを示している。

Fig3.

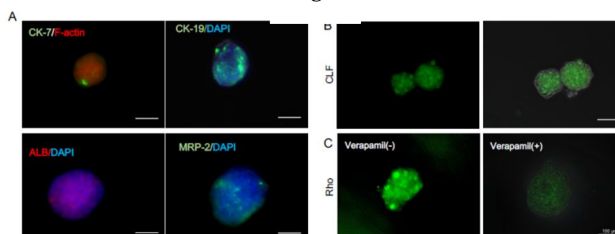


(4) 肝硬変患者から誘導したヒト CLiP からの HBO 形成

成熟凍結肝細胞から誘導した hCLiP からの HBO 形成に成功した後、我々は疾患肝から得た MH 由来の hCLiP を HBO 形成に利用できる可能性を探った。細胞形態、RT-qPCR、免疫蛍光染色の結果、hCLiP は肝前駆細胞の特徴を示していた。BD 特異的マーカーである CK-7、MRP-2、CK-19 に陽性の細胞と構造が、HBO の内部と表面の囊胞構造の両方で観察され、ALB (成熟肝細胞マーカー) はオルガノイドの内部に主に分布していた (図 4A)。

これらの HBO は、肝胆汁代謝の胆汁アナログである CLF を取り込む能力を示した (図 4B)。さらに、BD の胆汁輸送機能を代表するローダミン 123 も D-HBO の特定の領域に輸送され、これらのトランスポーターはベラパミルによって阻害された (図 4C)。これらのデータは、疾患肝由来のヒト CLiP が HBO を形成し、健常肝由来のものと同様の肝胆道系オルガノイド機能を示すことを示唆している。

Fig4.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidaka M, Eguchi S, Hasegawa K, Shimamura T, Hatano E, Ohdan H, Hibi T, Hasegawa Y, Kaneko J, Goto R, Egawa H, Eguchi H, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Soyama A, Hara T, Takatsuki M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Impact of sustained viral response for hepatitis C virus on the outcomes of liver transplantation in hemophilic patients with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection: A nationwide survey in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology research	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13833. Epub 2022 Sep 5.	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 Murakami S, Soyama A, Miyamoto D, Hara T, Matsuguma K, Imamura H, Matsushima H, Tanaka T, Maruya Y, Adachi T, Miura S, Hidaka M, Kanetaka K, Ochiya T, Eguchi S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Transplantation of chemically-induced liver progenitor cells ameliorates hepatic fibrosis in mice with diet-induced nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 571-583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.11.001. eCollection 2022 Dec.	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 Miyoshi T, Hidaka M, Miyamoto D, Sakai Y, Murakami S, Huang Y, Hara T, Soyama A, Kanetaka K, Ochiya T, Eguchi S.	4. 巻 57
2. 論文標題 Successful induction of human chemically induced liver progenitors with small molecules from damaged liver.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 441-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-022-01869-5.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日高匡章, 宮本大輔, 原 貴信, 曾山明彦, 足立智彦, 松島 肇, 今村一步, 丸屋安広, 松隈国仁, 福本将之, Li Peilin, 金高賢悟, 江口 晋
2. 発表標題 低分子化合物を用いた肝前駆細胞からの肝・胆道システム構築
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日高匡章, 宮本大輔, 原 貴信, 曾山明彦, 足立智彦, 田中貴之, 松島 肇, 松隈国仁, 吉野恭平, 福本将之, 伊藤信一郎, 金高賢悟, 江口 晋
2. 発表標題 低分子化合物を用いた肝前駆細胞からの肝・胆道システム構築
3. 学会等名 122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日高匡章, 曾山明彦, 江口 晋
2. 発表標題 低分子化合物を用いた肝前駆細胞からの肝・胆道システム構築
3. 学会等名 108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------