

【目的】 肝再生医療や薬剤代謝予測アッセイ技術を確立するため、培養肝組織体を利用した技術が期待されている。培養した肝細胞組織体に血管網を付与する多くの研究が進められているものの、肝毛細胆管（肝細胞間に構築）から胆汁を排泄する肝内胆管の再構築はほとんど報告されていない。管腔構造を有する培養胆管は、一般的に胆管上皮細胞や肝前駆細胞をコラーゲンゲル等に包埋して形成させるため、肝細胞と接着できない。そこで、平板上で胆管形成できる Chemically-induced Liver Progenitor (CLiP：初代肝細胞を低分子化合物でリプログラミングした肝前駆細胞) に着目した。本研究では、CLiP 由来胆管作製と多孔質フィルム（ハニカムフィルム）を組み合わせ、機能性胆管ネットワークを簡便かつ高密度に作製する技術を確立するとともに、肝毛細胆管と胆管を接合させることを目的とする。

【方法】 ラット初代肝細胞を 0.25 、 1.0 、 5.0×10^4 cells/cm² で 12 日間培養してラット CLiP を作製した（それぞれ rCLiP-0.25、rCLiP-1.0、rCLiP-5.0）。コラーゲンコートディッシュに MEF を 5.3×10^4 cells/cm² で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 1.3×10^5 cells/cm² で播種した。また、細胞足場（ハニカムフィルム）が胆管形成に及ぼす影響を評価するため、ポリ乳酸製のハニカムフィルム（ $\phi 25 \sim 30 \mu\text{m}$ ）にコラーゲンをコーティングし、MEF を 1.1×10^5 cells/cm² で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 2.6×10^5 cells/cm² で播種した。2%マトリゲルを含む mTeSR1 培地で胆管上皮細胞へ 12 日間分化誘導した。生細胞トレーシング蛍光試薬（Cell Tracker）による管腔構造解析、遺伝子発現解析による特徴付けにより、CLiP 作製条件やハニカムフィルムが胆管誘導に及ぼす影響を評価した。胆管を誘導した後、ラット初代肝細胞を 3 日間共培養した。胆汁酸類似蛍光試薬（Choly-lysyl-fluorescein：CLF）を反応させ、肝細胞から取り込んだ CLF が培養胆管に排泄されるかを評価した。また、細胞骨格等の蛍光染色によって、立体構造を評価した。

【結果】 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。一方、rCLiP-5.0 を利用した場合、胆管の形成数が向上した。CLiP 作製時の肝細胞密度が高いほど、肝成熟マーカー（*Alb* 等）や肝前駆細胞マーカー（*Afp* 等）の発現が抑制され、胆管マーカー（*Aqp*、*Cfr* 等）の発現は同等に見られた。ハニカムフィルムでは、コラーゲンコートディッシュと比較して遺伝子発現に顕著な違いは見られなかった。rCLiP-5.0 から誘導した培養胆管の一部で、CLF の管腔への蓄積が見られた。肝細胞と共培養すると、CLF の蓄積は広範囲で認められた。ハニカムフィルムで肝細胞を共培養すると、高頻度で CLF の蓄積が見られた。ハニカムフィルムの物理的な仕切りが培養胆管と肝細胞との接触機会を増加させ、効率的な胆管-肝毛細胆管接合が促進したと考えられる。

CLiP 由来胆管とハニカムフィルムを組み合わせた機能性胆管ネットワーク

