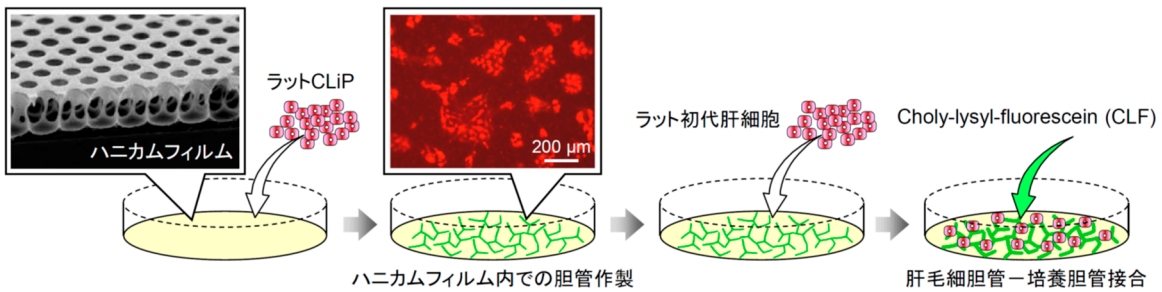
232　機能性胆管ネットワークの高密度形成技術の確立	堺　裕輔

【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/cm^2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/cm^2で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 1.3×10^5 cells/cm^2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（φ25〜30μm）にコラーゲンをコーティングし、MEF を 1.1×10^5 cells/cm^2で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 2.6×10^5 cells/cm^2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*、*Cftr* 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、効率的な胆管ー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



232. 機能性胆管ネットワークの高密度形成技術の確立

堺　裕輔

九州大学 大学院工学研究院 化学工学部門 分子・生物システム工学講座

Key words：胆管，肝細胞，肝前駆細胞，肝毛細胆管，リプログラミング

緒　言

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。我々はこれまでに、細胞シート工学と共培養技術を融合させたヒト初代肝細胞／線維芽細胞複合シートを開発し、皮下に血管誘導ヒト肝組織を作製する基盤技術を確立した［1］。*In vitro* と *in vivo* の双方で肝特異機能の向上や微小構造の再構築を明らかにしたが、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は再構築されていない［2］。

肝毛細胆管と胆管の構造や機能を再現するためのモデル系は、いくつか報告されている。ラット胎児由来肝細胞と成熟胆管上皮細胞を共培養して組織体を作製すると、胆管様管腔構造を形成する［3］。他方、肝癌細胞（HepG2 細胞）は、インサート膜で隔離した胆管癌細胞（TFK-1 細胞）との共培養によって、肝毛細胆管に蓄積した胆汁酸様試薬を培地中に排泄する［4］。にもかかわらず、未だ胆汁を排泄する構造と機能の統合システムは確立されていない。

これらの背景から、肝毛細胆管ー胆管を構造的かつ機能的に再構築する革新的な研究に取り組んでいる。管腔を有する機能性胆管は、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、肝細胞と容易に接着できる環境にない［5］。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）に着目したが、CLiP 由来胆管は短小かつ形成効率が低い［6］。

これらの課題を打開するため、ハチの巣状の細孔が二次元配置されたハニカムフィルムに着目した。内皮細胞を用いた研究では、ハニカムフィルム形状に沿って高密度に血管様ネットワーク組織を形成することが報告されている（中澤ら、第 17 回日本再生医療学会総会、2018）。本研究では、効率的な CLiP 由来胆管作製を実現する CLiP 作製条件を検討すると共に、培養足場にハニカムフィルムを組み合わせて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ことを目的とした（図 1）。また、肝毛細胆管と胆管を接合させ、胆汁排泄機能の再構築を目指した。

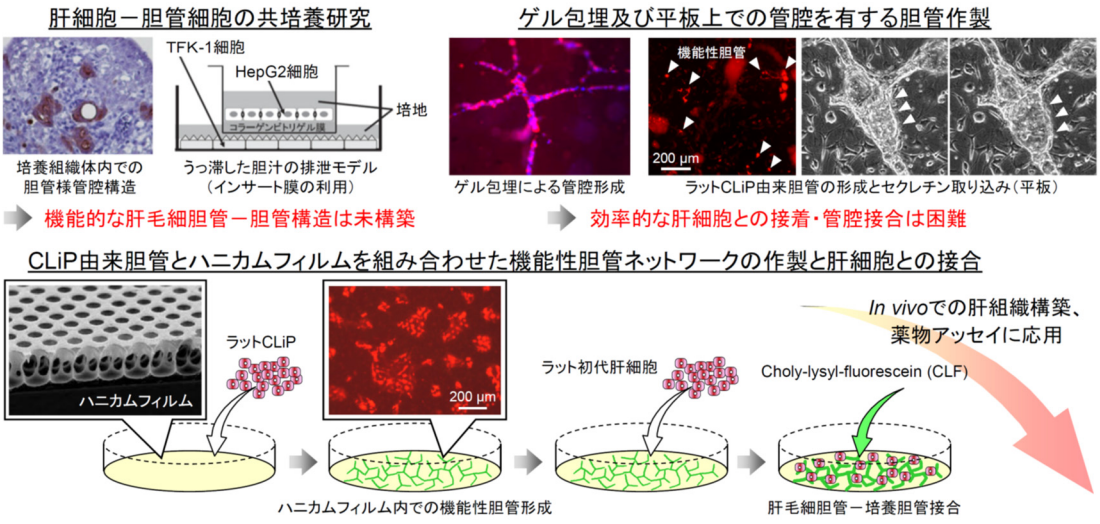


図 1. 本研究の全体構想

方　法

1. ラット肝前駆細胞（CLiP）のリプログラミング

ラット初代肝細胞を 0.1～5.0×10^4 cells/cm^2でコラーゲンコートディッシュに播種し、3 つの低分子化合物（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 CLiP（肝前駆細胞）にリプログラミングした。これにより、単位細胞数あたりの低分子化合物の供給量を制御した。培養 7 及び 14 日目に RNA を回収し、肝成熟マーカーである *Alb*、肝前駆・幹細胞マーカーである *Ck19* 及び *Afp*、胆管上皮細胞マーカーである *Aqp1* 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。ハウスキーピング遺伝子として、*Gapdh* を用いた。

2. ラット CLiP 由来胆管の誘導培養

ラット初代肝細胞を 0.25、1.0、5.0×10^4 cells/cm^2で 12 日間培養してラット CLiP（それぞれ rCLiP-0.25、rCLiP-1.0、rCLiP-5.0）を作製した。培養 7 及び 12 日目に CLiP を回収して 1.3×10^5 cells/cm^2でマウス胎児由来線維芽細胞（MEF：5.3×10^4 cells/cm^2）上に播種し、マトリゲル及び低分子化合物を含む mTeSR1 培地で胆管上皮細胞へ 12 日間分化誘導した。Cell tracker orange（CTO：生細胞トレーシング蛍光試薬）を取り込ませ、管腔構造への排泄・蓄積を蛍光顕微鏡で観察した。肝成熟マーカー（Alb 等）や肝前駆細胞マーカー（Afp 等）、胆管マーカー（Aqp 等）の遺伝子発現を評価した。また、ハニカムフィルムが胆管形成に及ぼす影響を評価した。ポリ乳酸（PCL）製のハニカムフィルム（φ30μm）に 0.3 mg/mL の I 型コラーゲンを 1h コーティングし、MEF を 1.1×10^5 cells/cm^2で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 2.6×10^5 cells/cm^2で播種した。同様の手順で胆管への分化を評価した。

3. CLiP 由来胆管とラット初代肝細胞の共培養による胆管－肝毛細胆管接合評価

培養胆管に単離したラット初代肝細胞を 5.3×10^4 cells/cm^2で播種した。CLF 及び Cell tracker orange（CTO：生細胞トレーシング蛍光試薬）で共染色し、毛細胆管及び管腔構造を共焦点レーザー走査型顕微鏡で 3D 構造を観察した。

結果および考察

1. 肝細胞密度が CLiP の特徴に及ぼす影響

0.1～5.0×10^4 cells/cm^2のいずれの条件でも肝成熟マーカーである *Alb* は培養 7 日目までに劇的に減少し、低値を維持した（図 2）。対照的に、肝幹・前駆細胞マーカーである *Ck19* は低密度において高値を示した。培養日数が経過するに伴い *Afp* はより上昇していることから、リプログラミングが進行し続けていることが示唆された。一方、胆管マーカーである *Aqp1* は、高密度の培養環境において比較的高値であった。

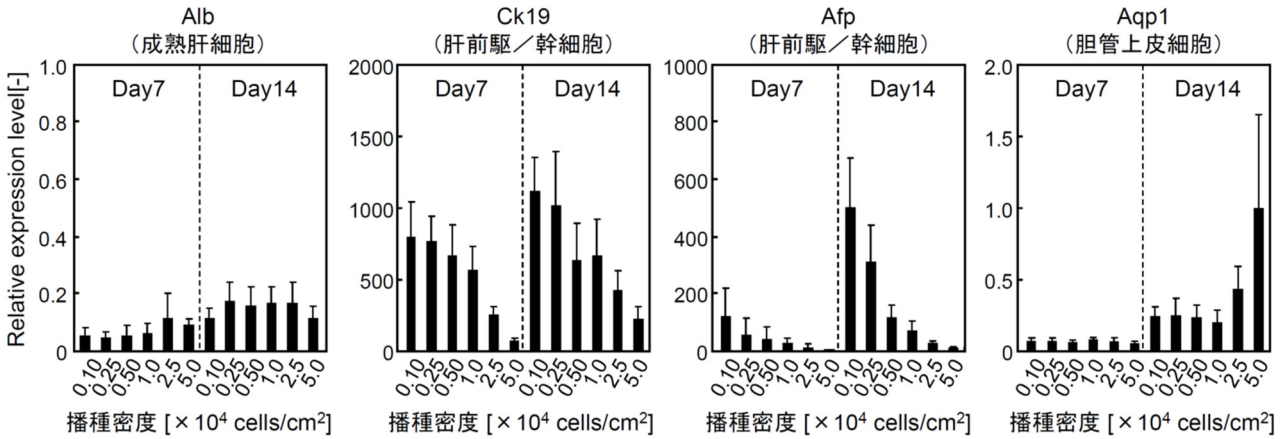


図 2. 培養 7、14 日目の遺伝子発現

成熟肝細胞マーカー*Alb*、肝前駆／幹細胞マーカー*Ck19* 及び *Afp*、胆管上皮細胞マーカー*Aqp1* の発現量を単離肝細胞（培養 0 日目）と比較。ハウスキーピング遺伝子は *Gapdh*。平均値±標準偏差（N＝6）。

肝細胞の播種密度の違いは、肝細胞間接着の頻度や低分子化合物の供給量に影響を及ぼすと考えられる。低分子化合物の供給量が多いほどより肝前駆細胞へのリプログラミングが進行することが明らかとなった。一方、肝細胞間接着は胆管へのダイレクトなリプログラミングが示唆された。

2. ラット CLiP 由来胆管の効率的な形成

MEF は胆管形成効率を向上させたが、播種密度を高くしても更なる向上は見られなかった（図 3）。また、rCLiP-CN-5.0 を利用した場合、胆管の誘導効率が向上した（図 4）。ハニカムフィルム上での培養でも、同様の結果であった（図 5）。これらの結果から、MEF による TGF-β、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。

胆管上皮細胞への成熟度を Aqp1 で評価したところ、rCLiP-CN-5.0 で高い傾向が見られた（図 6）。リプログラミングの程度を肝前駆細胞に留めることによって、効率的な胆管作製ができたと考えられる。一方、ハニカムフィルム内では発現上昇が抑制され、成熟化が制限された。

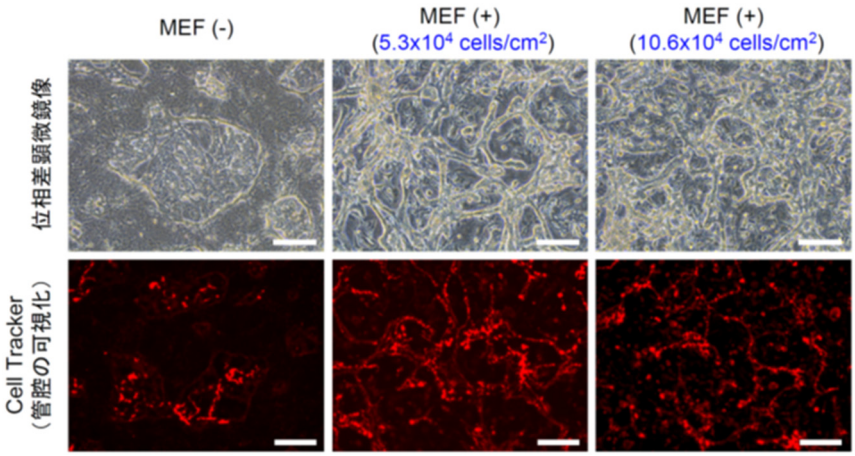


図 3. MEF 上での rCLiP-CN-1.0 の胆管分化誘導

培養 12 日目の rCLiP-1.0 を異なる MEF 密度で培養した際の位相差顕微鏡像（上段）と管腔構造の評価（下段）。スケールバーは 200μm。

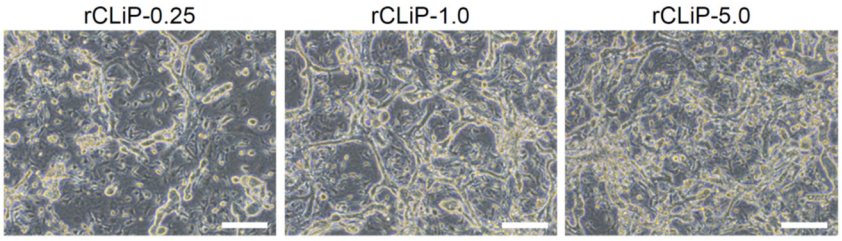


図 4. 異なる播種密度で作製した rCLiP の胆管分化誘導

培養 12 日目の rCLiP を MEF 上で培養した際の位相差顕微鏡像。スケールバーは 200μm。

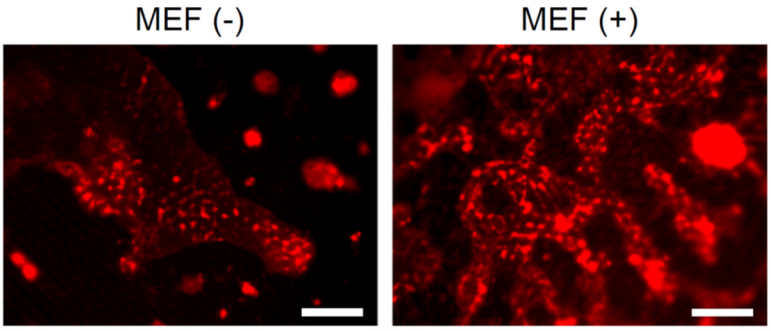


図 5. ハニカムフィルム上での rCLiP-CN-1.0 の胆管分化誘導
培養 12 日目の rCLiP-1.0 をハニカムフィルム上で培養した際の管腔構造の評価。
スケールバーは 200 μm。

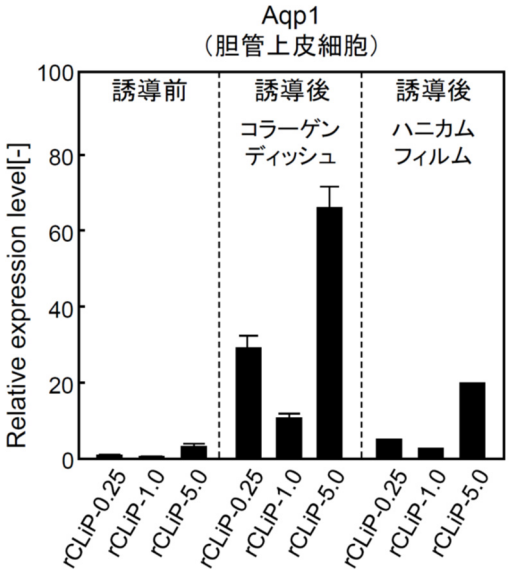


図 6. 誘導 12 日目の遺伝子発現
胆管上皮細胞マーカー*Aqp1* の発現量を単離肝細胞（培養 0 日目）と比較。
ハウスキーピング遺伝子は *Gapdh*。平均値±標準偏差（N=1～2）。

3. 培養胆管と肝細胞の機能的な接合

初代肝細胞と共培養すると、一部に CLF（肝細胞が取り込む蛍光標識された胆汁酸様試薬）の胆管への排泄が見られ、肝細胞と CLiP 由来胆管の接合が示唆された（図 7）。コラーゲンコートディッシュでは、ほんの一部で CLF の排泄が見られたものの、ハニカムフィルムでは比較的多くの領域で排泄が観察された。ハニカムフィルムの立体的な仕切りによって肝細胞がトラップされ、効率的接合が促されたと考えられる。しかしながら、いずれもすべての培養胆管に CLF が排泄されておらず、今後は胆管培養や肝細胞の播種密度等を最適化することにより、効率的な接合を実現する必要がある。

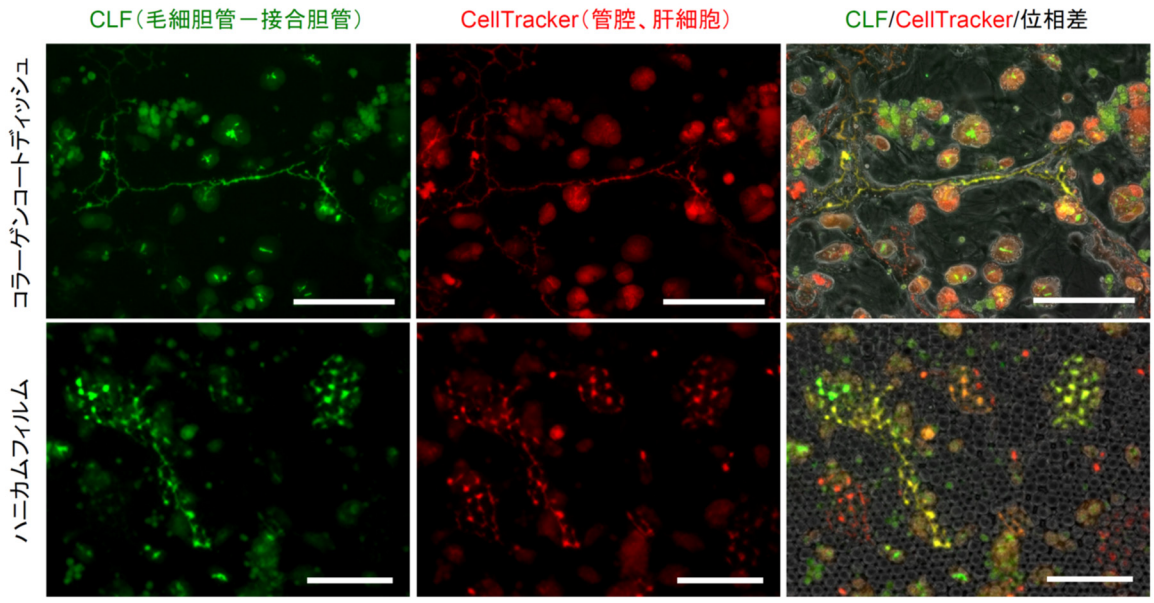


図 7. 培養胆管とラット初代肝細胞の機能的な接合

共培養 3 日目の肝毛細胆管（CLF）と管腔（CellTracker）の蛍光像。スケールバーは 200 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科移植・消化器外科の江口晋教授である。本研究で用いたハニカムフィルムは、富士フイルム株式会社より提供された。

文　献

1) Sakai Y, Yamanouchi K, Ohashi K, Koike M, Utoh R, Hasegawa H, Muraoka I, Suematsu T, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S., Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. *Biomaterials*. 2015 Oct;65:66-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.046

2) Sakai Y, Koike M, Yamanouchi K, Soyama A, Hidaka M, Kuroki T, Eguchi S., Time-dependent structural and functional characterization of subcutaneous human liver tissue. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Dec;12(12):2287-2298. doi: 10.1002/term.2761

3) Katsuda T, Kojima N, Ochiya T, Sakai Y.., Biliary epithelial cells play an essential role in the reconstruction of hepatic tissue with a functional bile ductular network. *Tissue Eng Part A*. 2013 Nov;19(21-22):2402-11. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0021

4) Takezawa T. コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いた組織構築とその化学物質の動態・毒性評価への応用. 生物工学. 2017 95:468-471.

5) Tanimizu N, Miyajima A, Mostov KE., Liver progenitor cells fold up a cell monolayer into a double-layered structure during tubular morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 2009 May 1; 20(9): 2486–2494. doi: 10.1091/mbc.E08-02-0177

6) Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD, Ochiya T., Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. *Cell Stem Cell*. 2017 Jan 5;20(1):41-55. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.007