

Generation of functional liver organoids on combining hepatocytes and cholangiocytes with hepatobiliary connections *ex vivo*

Nat Commun. 2021 Jun 7; 12(1): 3390. doi: 10.1038/s41467-021-23575-1

Tanimizu N, Ichinohe N, Sasaki Y, Itoh T, Sudo R, Yamaguchi T, Katsuda T, Ninomiya T, Tokino T, Ochiya T, Miyajima A, Mitaka T

要旨 胆管上皮細胞と肝前駆細胞を共培養することで、肝細胞の毛細胆管と胆管が機能的に接続した Hepatobiliary Tubular Organoid (HBTO) の誘導に成功した。HBTO 誘導によって、生体外で高度な肝細胞機能の誘導と長期維持および肝細胞代謝産物の肝組織内動態の再現が可能になった。

【背景】

肝臓は様々な代謝機能を持つ臓器であり、多くの治療薬は肝臓で代謝される。生じた代謝産物が細胞障害性の物質である可能性があるため、新規治療薬開発の過程では必ず肝細胞を使った毒性試験が必要である。しかしながら、凍結肝細胞や肝癌細胞を用いた試験では、長期培養が困難であったり、十分な代謝機能を誘導できないなどの問題点があった。また、胆汁排泄路が存在しないために、生体内と同様な代謝産物の動態を検討することも不可能であった。我々は肝細胞機能の長期維持と肝臓組織内での胆汁輸送を再現するために、肝細胞が形成する毛細胆管と胆管が接続した新規肝臓オルガノイド構築を目指した。

【結果】

これまでの研究により、胆管上皮細胞と肝前駆細胞をマウス成体肝臓から分離し増幅する方法を確立していた^{1, 2)}。そこで、これらの細胞を用いて機能的な肝上皮組織の再構築を目指した。マウスの胆管上皮細胞をコラーゲンゲル上で培養し、コロニー形成を誘導した後、肝前駆細胞を播種した。オンコスタチンM (OSM) を添加して1日培養した後、20% マトリゲルを含むコラーゲンゲルを重層した (図 1A)。ゲル重層後1週間後肝細胞の毛細胆管と胆管の形成が確認できた。さらに2~3週間培養を継続後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細な解析を行った。肝細胞間の毛細胆管が、肝細胞と胆管上皮細胞が形成する接続部構造 (ヘリング管, the Canal of Hering (CoH))

を介して胆管に接続している様子を観察できた (図 1B)。我々はこのオルガノイドを Hepatobiliary tubular organoid (HBTO) と名付けた。HBTO を構成する肝細胞は、アルブミンと薬剤代謝に重要な役割を果たす Cytochrome P450 (CYP) を発現していた (図 1C 左)。また、アルブミン分泌と CYP 活性を一か月程度維持することが可能であった (図 1C 右)。培地に胆汁酸やビリルビンを添加すると、肝細胞が取り込んだ後に毛細胆管へ分泌され、その後、胆管へ輸送された (図 1D)。この結果は、肝細胞の代謝産物が、生体内の肝臓と同様に肝細胞から胆管へ輸送されることを示している。

将来的な治療薬開発や毒性試験への応用を見据えて、ヒト初代肝細胞から誘導されたリプログラミング肝細胞³⁾とマウス胆管上皮細胞の共培養を行い、ヒト肝細胞の毛細胆管とマウス胆管が接続した Hybrid HBTO の作成にも成功した。

【将来展望】

これまでの肝細胞の培養系では組織構造が再現されていないため、化合物の薬理活性や有効性に関わる重要な項目とされる ADME すなわち吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism) および排泄 (Excretion) を一括してアッセイすることができなかった。肝細胞代謝産物の組織内動態を反映している HBTO を用いた ADME アッセイ系を構築することで、より生体内に近い環境で薬物毒性を検証するこ

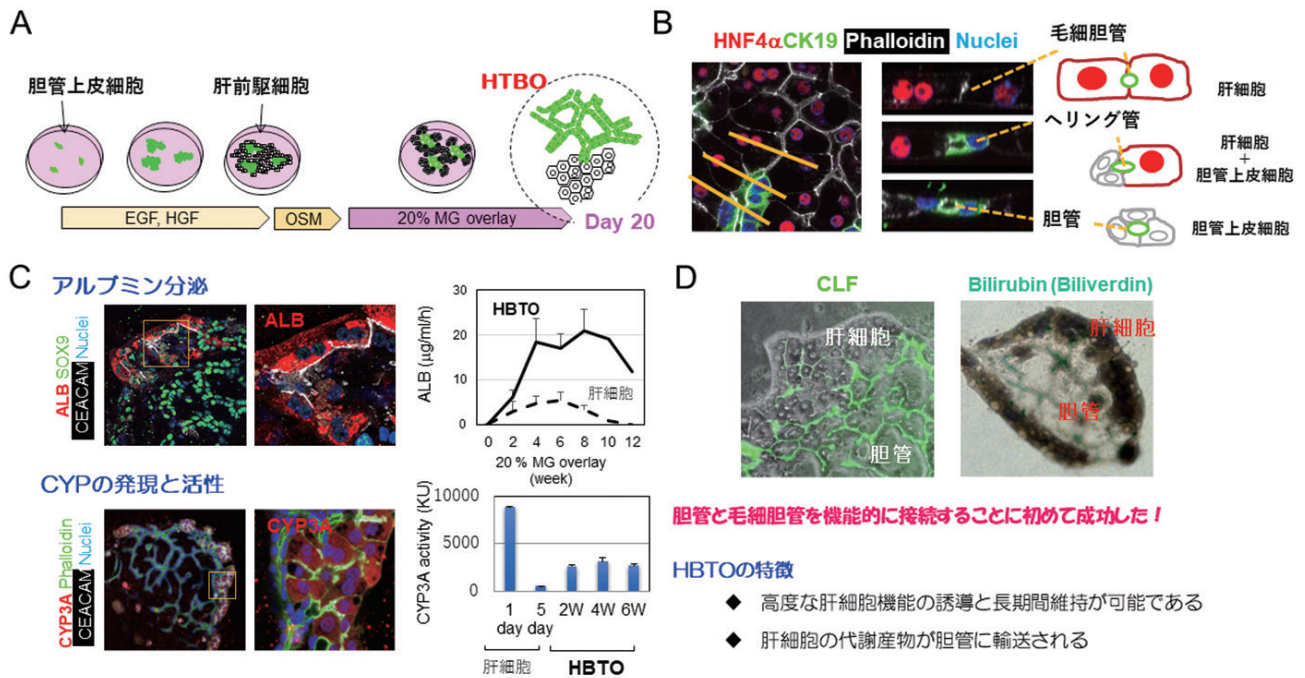


図1 HBTOの誘導と機能解析

とが可能になれば、*in vitro* 試験から動物実験に移行した後の新規薬品開発の中断リスク軽減が期待できる。長期培養が可能というHBTOの特性を生かして、現在、胆汁うっ滞を起点とした慢性肝疾患モデルを開発中である。胆汁うっ滞は薬物障害による肝疾患 (Drug induced liver injury: DILI) を含む多くの慢性肝疾患で見られる病態である。HBTOの胆汁うっ滞モデルを用いて、慢性肝疾患の病態解明や新規治療薬開発を可能にすることも目指している。

参考文献

1. Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes *in vitro* during development. *J Cell Sci* 2013; 126: 5239-5246.
2. Tanimizu N, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Liver Progenitors Isolated from Adult Healthy Mouse Liver Efficiently Differentiate to Functional Hepatocytes *In Vitro* and Repopulate Liver Tissue. *Stem Cells* 2016; 34: 2889-2901.
3. 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; 20: 41-55.

谷水 直樹

略歴

- 1999年 京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了
- 1999年 財) 神奈川科学技術アカデミー 幹細胞制御プロジェクト 研究員
- 2004年 米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 ポスドク
- 2007年 東京大学分子細胞生物学研究所 発生再生研究分野 助教
- 2009年 札幌医科大学医学部附属がん研究所 分子病態病理学部門 講師
- 2014年 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所 組織再生学部門 准教授