



TITLE:

Liver ductal organoids reconstruct
intrahepatic biliary trees in decellularized
liver grafts(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tomofuji, Katsuhiko

CITATION:

Tomofuji, Katsuhiko. Liver ductal organoids reconstruct intrahepatic biliary trees in decellularized liver grafts. 京都大学, 2022, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2022-09-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24198>

RIGHT:

京都大学	博士 (医学)	氏名	友藤 克博
論文題目	Liver ductal organoids reconstruct intrahepatic biliary trees in decellularized liver grafts (肝組織由来胆管系オルガノイドは脱細胞化肝臓の肝内胆管を再構築する)		
(論文内容の要旨)			
<p>肝移植は末期肝不全に対する唯一の根本治療であるが、ドナー肝臓不足は現状でも解決できていない課題であるため、人工肝臓をはじめとした代替治療が模索されている。本研究で用いる Bio-engineered liver は、肝臓を脱細胞化した細胞外マトリックスに新たな細胞リソースを生着 (再細胞化) させる技術で、移植可能な生体人工肝臓グラフトとして期待されている。しかし、再細胞化後の脈管構築や適正な細胞配置の実現に課題があり、特に胆管の再細胞化は、胆管上皮細胞の初代培養が技術的に困難なこともあり充分検討されてこなかった。近年、三次元オルガノイド培養技術が発展する中で、肝組織由来胆管系オルガノイド (liver ductal organoid : LDO) は、調製に遺伝子操作を要さず、かつ高い増殖能を持つことを特徴とした培養系として注目されている。本研究では、ラット脱細胞化肝臓グラフトを胆管構築させる細胞リソースとして、マウスやヒト LDO の有用性を検証した。</p> <p>まずマウス LDO を <i>in vitro</i> で培養し、胆管上皮細胞としての性質を検証した。マウス LDO は、肝外胆管組織と同程度に胆管マーカー (<i>Krt19, Sox9, Cfr</i>) を発現している一方で、肝細胞マーカー (<i>Alb, Hnf4a, Cyp3a11</i>) は肝細胞に比べて非常に低い発現であった。このことから、LDO は培養環境では胆管の特徴を強く保持していることがわかった。さらに、LDO では代表的な輸送タンパクである multidrug resistance protein 1 (MDR1) と cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が発現し機能していた。脱細胞化組織については、ラットから肝臓を摘出後、48 時間かけて脱細胞化を行い、全ての細胞成分を除去した。この脱細胞化肝臓の肝内胆管に LDO を総胆管経路で注入し、<i>ex vivo</i> 循環培養システムを用いて 2~5 日間培養を行った。LDO が生着した再細胞化胆管は、本来の肝内胆管に類似した樹枝状構造を呈し、かつ、内部は管腔構造を形成しており、胆管マーカー (<i>Krt19, Sox9, Cfr</i>) の発現も維持されていた。また、全胆管の 40~60%程度が再構築されていることも確認した。さらに肝細胞との共培養が可能であるかを検証するため、まず脱細胞化肝の胆管をマウス LDO で再細胞化して 5 日間循環培養し、次にマウス初代肝細胞を総胆管経路で注入し肝実質を再細胞化した。共細胞化した組織では、再細胞化胆管は細胞生着が維持され、注入された初代肝細胞も主に肝実質腔に生着していることが確認された。また、LDO で再細胞化された胆管と肝細胞で充填された肝実質は、それぞれ胆管マーカーと肝細胞マーカーの特異的な発現を維持していた。さらにこれらを踏まえ、ヒト由来 LDO でも同様に再細胞化胆管が構築可能であることを示した。</p> <p>これらの結果から、LDO はラット脱細胞化肝臓の肝内胆管構築に有用であることを示した。これまで脱細胞化肝臓の胆管細胞リソースとして初代培養の胆管細胞と人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来胆管細胞が報告されているが、LDO のように肝内胆管を広範囲に裏打ちし、かつ、管腔構造を維持できることは示されてこなかった。本手法では、高い増殖能を維持した LDO を脱細胞化肝の胆管構造に再細胞化することによって、管腔構造を維持しながら末梢にまで生着することで、肝内胆管の樹枝状構造の構築を可能とした。移植可能な生体人工肝臓の実現に向けて、新たな胆管細胞リソースとしての利用が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

脱細胞化とは、臓器の細胞外マトリックス(ECM)を残して全ての細胞成分を除去する技術であり人工肝臓の鋳型としての有用性が期待されているが、細胞源に関する検討はまだ十分ではない。今回、友藤氏は、肝組織由来胆管系オルガノイド (LDO) が脱細胞化肝の胆管上皮細胞リソースとして有用ではないかと考えた。まずマウス LDO が胆管上皮細胞マーカーの発現と機能を有することを示した。次に、ラット脱細胞化肝を作製し、LDO を投与 (再細胞化) した。投与された LDO は肝内胆管の ECM に沿って生着しており、胆管上皮細胞マーカーを発現していることを確認し、GFP 恒常発現の LDO を用いて再細胞化された胆管が管腔構造を保ちながら樹枝状構造を呈していることを示した。さらに、初代肝細胞と、LDO 由来の胆管上皮細胞の共再細胞化を行うと、肝細胞は肝実質腔に生着し、LDO は管腔構造を形成して、それぞれの細胞特異的マーカーの発現を認めた。最後に、ヒトオルガノイドを用いて同様に培養し、再細胞化を行なったところ、マウス LDO と同様に脱細胞化肝内において肝内胆管が構築され、胆管上皮細胞マーカーの発現を維持していた。以上より、LDO は脱細胞化肝の胆管構築に有用な細胞源となりうることを示された。

以上の研究は、肝組織由来胆管系オルガノイドの胆管細胞リソースとしての有用性の解明に貢献し、人工肝臓作製に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年8月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降