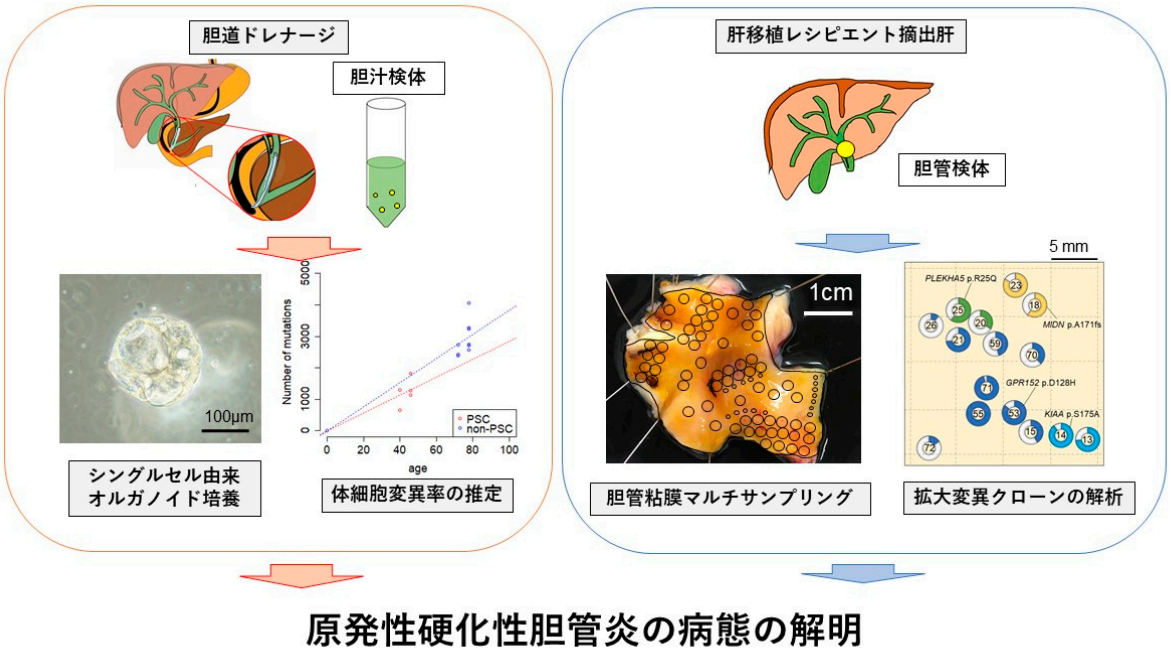
133　ゲノム解析による原発性硬化性胆管炎の病態解明	垣内　伸之

【目的】原発性硬化性胆管炎（primary sclerosing cholangitis：PSC）は、肝内外の胆管の線維性狭窄を生じる進行性慢性炎症疾患である。胆汁鬱滞による肝不全のため患者の 1 割強は肝移植を要し、しばしば胆管がんを合併するが、その病因は未だ不明で病態の理解は進んでいない。近年ゲノム解析から、一見正常な組織にも加齢に伴って遺伝子異常が蓄積し、がんで観察されるような遺伝子異常を有するクローンが拡大しており、発癌リスクとなっていることが明らかになった。このような遺伝子変異の解析はがんの原因を特定するだけにとどまらず、慢性炎症疾患の病態を解明することも可能にする。本研究は、これまで検体収集や純度の高い上皮クローンの採取の難しさからクローン解析が進んでこなかった胆管領域において、胆管上皮オルガノイドを用いた解析方法を確立し、PSC の病態および発がんメカニズムの解明を目指すものである。

【方法】胆汁から胆管上皮オルガノイドを作製し、全ゲノム解析を行い、PSC および対照群の胆管上皮に蓄積する変異を解析しその蓄積を評価した。PSC 肝移植例の胆管をマルチサンプリングし、オルガノイド培養を用いて上皮を純化し全エクソーム解析を行い、変異クローンの広がりを評価した。

【結果】胆汁中には個細胞状に上皮が浮遊しており、単個の上皮細胞からオルガノイドを培養することで単クローン性のオルガノイド培養が可能であった。PSC2 症例（各 40 歳、46 歳）から合計 5 個、非 PSC3 症例（72～78 歳、平均 76 歳）から合計 9 個のシングルセル由来オルガノイドを全ゲノム解析した。変異の蓄積率は両群で有意差は認めた（P=0.029、Two-sided Mann-Whitney Utest）が、慢性炎症下であるにもかかわらず PSC において変異率の上昇はみられなかった。PSC 患者 3 症例の肝移植例の肝門部胆管のマルチサンプリング解析では、うち 2 症例で隣り合ったサンプルで共有される変異クローンの広がりを認めた。*ARID2* や *PIK3CA* などのがんドライバー変異を有するクローンが観察された。今後解析サンプル数を増やし更なる検討を行う。本研究により、胆管オルガノイドをモデルとして、上皮クローンの綿密な解析が可能となり、発癌に関連する可能性のある遺伝子変異を同定するとともに、複雑で異種性の混じた PSC の病態が示唆された。

原発性硬化性胆管炎の上皮クローンのゲノム解析



133. ゲノム解析による原発性硬化性胆管炎の病態解明

垣内　伸之

京都大学 医学研究科 腫瘍生物学講座

Key words：原発性硬化性胆管炎，オルガノイド，ゲノム解析，クローン拡大

緒　言

原発性硬化性胆管炎（primary sclerosing cholangitis：PSC）は、肝内外の胆管の線維性狭窄を生じる進行性慢性炎症疾患である。肝臓で産生された胆汁は胆管を流れて十二指腸に排出されるが、PSC 患者は長期間の慢性胆管炎により胆管が狭窄し、胆汁鬱滞による肝不全のため患者の 1 割強は肝移植を要し予後不良である。患者数の推移から PSC は今後増加することが予想されているが、その原因は未だ不明で病態の理解は進んでおらず、治療は主に対症療法である。また、年率 2%で胆管がんを発症ししばしば死因となる。本研究は PSC および PSC 由来胆管がんに関する分子病態をゲノム異常の視点から解析することにより PSC 病態を解明し、将来の PSC 診療の向上を目指すものである。

近年、血液や皮膚などの組織のゲノム解析から、一見正常な組織にも加齢に伴って遺伝子異常が蓄積し、がんで観察されるような遺伝子異常を有するクローンが拡大しており、発癌リスクとなっていることが明らかとなった。当研究グループは、この知見に着目し、加齢、喫煙・飲酒といった環境因子や炎症によって遺伝子変異クローンが選択され拡大することを明らかにした［1］。これらの知見は、多細胞生物である我々ヒトを構成する細胞は、しばしば 100 年にわたる個体の生涯の間、正常組織においても時間経過や環境因子によって絶えず遺伝子変異を蓄積し続け、細胞同士は環境への適応度の違いから必然的に相互に陽性選択（クローン拡大）もしくは陰性選択（自然淘汰）されるという自然選択の原理にしたがうことを示している。このような遺伝子変異の解析はがんの原因を特定するだけにとどまらず、慢性炎症疾患の病態を解明することも可能であることを、当研究グループは潰瘍性大腸炎において大腸上皮細胞が獲得する IL-17 シグナル経路の遺伝子変異の解析から報告した［2］。

PSC は 1958 年に疾患として報告されて以降、病因・病態解明のための研究が行われてきた。最近、GWAS 研究［3］により免疫の関与も示唆され、また腸内細菌の関与を示唆する研究［4］も報告された。しかし、PSC は 10 万人に 1 人の罹患率で希少疾患であること、また、有効な動物実験モデルがないことから未だ病態に関して未知の部分が大きい。上皮細胞のクローン進化の解析から炎症病態の解明を目指す我々の研究手法は、有効な動物モデルがなく研究困難な PSC のような疾患においても、実際の患者検体を利用し解析することで疾患の本質に迫ることが可能であると考えられた。

上皮クローンの解析には、当然、純度の高い上皮クローンを収集する必要がある。近年、上皮の研究に関して画期的な変革が生じ、幹細胞技術を応用した組織の三次元培養、すなわちオルガノイド培養により、ほぼ全身臓器について上皮組織由来の培養が可能となった。そこで本研究では、まず胆管上皮からオルガノイドを樹立する技術を駆使して、PSC における胆管上皮の遺伝子変異解析、変異率の推定、クローン拡大の有無とその特徴性の解明を目指し、病態の解明に迫ることを目的とした。

方法および結果

1. 胆汁からの胆管オルガノイドの樹立、培養

PSC 患者が胆汁ドレナージ術を受ける際に排出される胆汁を 1～5 ml 程度採取し、速やかに抗菌薬（Antibiotic-Antimycotic）、ウシ胎児血清を加えた PBS 内に検体を入れた。セルストレーナーを通した後、遠心と上清の吸引を行

いsingle cell suspensionを作製し、Advanced DMEM内に回収し生存細胞数を計測した。生存細胞数およそ10^5個程度をマトリゲル30μlに懸濁し、12 well dishの中心に3Dドームを作製した。37℃で10分間、CO2インキュベーター内でマトリゲルを固形化した後、幹細胞のニッチ因子（Wnt-3a、R-spondin1、Noggin、EGF）を含む培地を800μl加え培養を開始した。胆汁中の胆管上皮はシングルセル状に浮遊しており、マトリゲル内にてもシングルセル状に分布していることを顕微鏡下で確認した。培地の組成についてはHans Cleversらのグループの既報に準じた［5］。対照群として急性胆管炎患者の胆汁から同様にオルガノイド培養を行った。10日程度培養後、200μm程度の単個のオルガノイドをマトリゲルから分離し、全ゲノム増幅後に全ゲノム解析を行った。

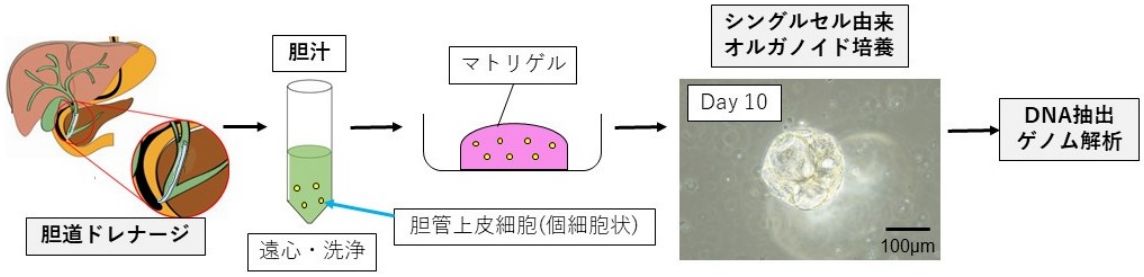


図1. 胆汁からのシングルセル由来オルガノイド培養

2. PSCにおける胆管上皮の全ゲノム解析、体細胞変異率の解析

胆汁から樹立したシングルセル由来オルガノイドの全ゲノム解析では、変異のVariant allele frequency（VAF）は0.5を中心とする正規性を示し、シングルセル由来クローンに合致した。PSC患者2症例（各40歳、46歳）から合計5個、非PSC患者3症例（72～78歳、平均76歳）から合計9個のシングルセル由来オルガノイドを全ゲノム解析した。PSC群、非PSC群で、切片を0とする線形回帰分析（0歳での体細胞変異は0個という仮定に基づく）を行い、加齢に伴う変異の蓄積を比較した（決定係：PSC群＝0.93、非PSC群＝0.98；回帰係：PSC群＝28.4、非PSC群＝38.2）。変異の蓄積率は両群で有意差は認めた（P=0.029、Two-sided Mann-Whitney Utest）が、サンプル数は少ないがPSCにおいて変異率の上昇はみられず、既報［2］の潰瘍性大腸炎でみられたような慢性炎症疾患下での変異率の上昇は明らかでなかった。

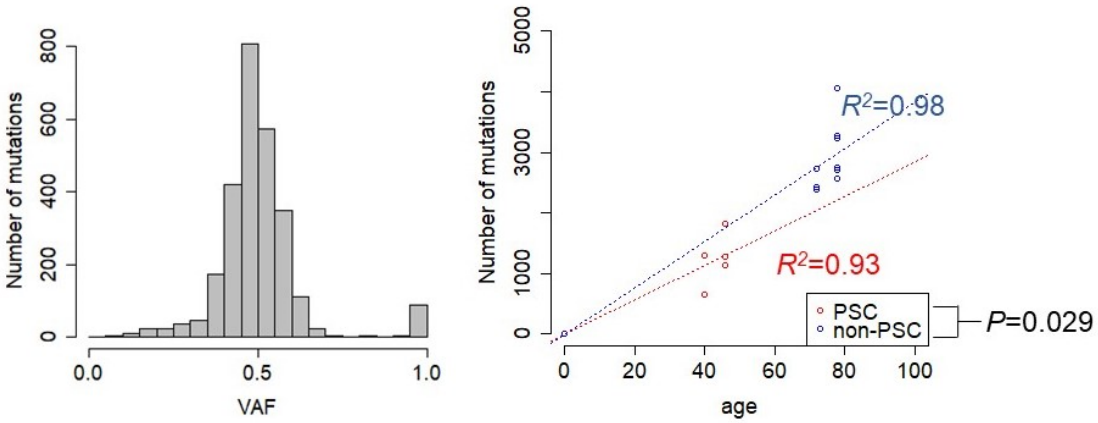


図2. PSCの胆管上皮におけるシングルセル遺伝子変異解析
左図）シングルセル由来オルガノイドの変異VAFのヒストグラムの例。
右図）PSC患者と非PSC患者の加齢に伴う変異の蓄積。

3. PSC 患者の肝移植検体における拡大変異クローンの解析

PSC 患者 3 症例の肝移植例の肝門部胆管を採取し、直径 2～2.5 mm の皮膚トレパンにてマルチサンプリングを行った（平均 42（23-71）サンプル/症例）。上皮を純化するためにパンチアウトしたサンプルをマトリゲル内に入れ、前述の培地にて培養した。約 20 日後、拡大したバルク胆管上皮オルガノイドを分離し、DNA 抽出し全エクソン解析を行った。

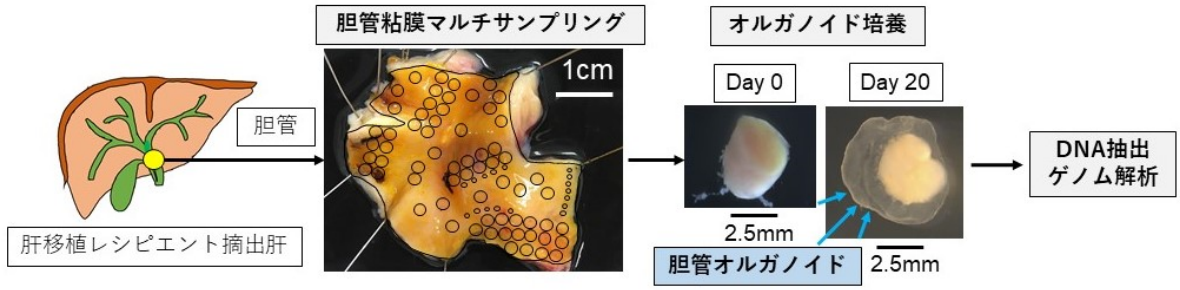


図 3. 胆管上皮におけるクローン拡大の解析手法

3 症例中 2 例にて、複数サンプルで共有される変異クローンの拡大を認めた（最大径 13 mm）。1 例では複数サンプルに跨る変異クローンは認めなかった。ARID2、PIK3CA などのがんドライバー変異を認めたが、3 症例に共通する遺伝子変異は認めなかった。

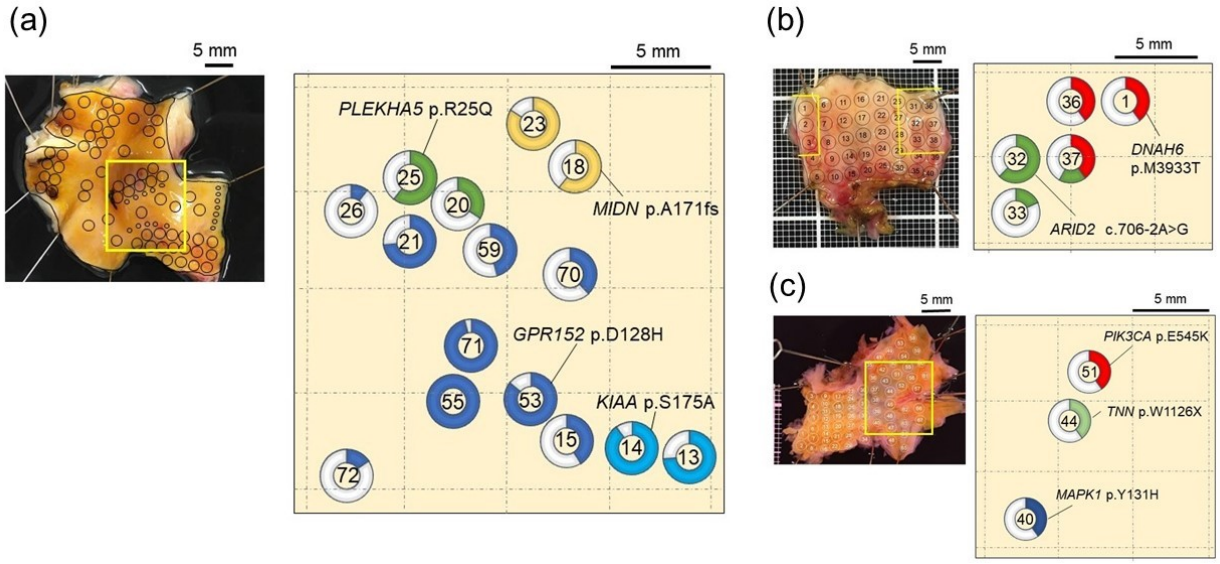


図 4. PSC における胆管上皮変異クローンの広がり

黄色の囲み線内の遺伝子変異クローンの拡大をそれぞれ右に図示する。円グラフ内の数字は各サンプル番号、円グラフは変異クローンの割合を示す。

a）40 歳男性　PSC 罹患歴 16 年。

b）63 歳女性　PSC 罹患歴 21 年。

c）55 歳男性　PSC 罹患歴 20 年。

考　察

胆管上皮の解析にオルガノイド培養は有用であった。胆汁中に含まれる浮遊上皮を利用してシングルセル由来オルガノイドを培養できることは変異率の解析に極めて有効であった。しかしながら、オリエンテーションが不明でありどの胆管のレベルの上皮か同定できない問題がある。慢性炎症の主座に由来する上皮であるかどうかも不明であるため、結果は慎重に検討する必要がある。また、変異クローンの拡大解析において、肝門部胆管を本研究の対象としたが、肝内胆管については解析できていない。PSC が希少疾患であることもあり解析症例数は現時点で限られており、さらなる症例数の蓄積が望まれる。

抱える問題はあるが、本研究により、胆管オルガノイドをモデルとして、上皮クローンの綿密な解析が可能であることが示された。発癌に関連する可能性のあるいくつかの遺伝子変異を同定するとともに、症例間の異種性から、複雑な PSC の病態が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学研究室の小川誠司である。本研究を遂行するにあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団および関係の皆様に厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Yokoyama A, Kakiuchi N, Yoshizato T, Nannya Y, Suzuki H, Takeuchi Y, Shiozawa Y, Sato Y, Aoki K, Kim SK, Fujii Y, Yoshida K, Kataoka K, Nakagawa MM, Inoue Y, Hirano T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Nishikawa Y, Amanuma Y, Ohashi S, Aoyama I, Horimatsu T, Miyamoto S, Tsunoda S, Sakai Y, Narahara M, Brown JB, Sato Y, Sawada G, Mimori K, Minamiguchi S, Haga H, Seno H, Miyano S, Makishima H, Muto M, Ogawa S. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. Nature. 2019 Jan;565(7739):312-317. doi: 10.1038/s41586-018-0811-x. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30602793.

2） Kakiuchi N, Yoshida K, Uchino M, Kihara T, Akaki K, Inoue Y, Kawada K, Nagayama S, Yokoyama A, Yamamoto S, Matsuura M, Horimatsu T, Hirano T, Goto N, Takeuchi Y, Ochi Y, Shiozawa Y, Kogure Y, Watatani Y, Fujii Y, Kim SK, Kon A, Kataoka K, Yoshizato T, Nakagawa MM, Yoda A, Nanya Y, Makishima H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Sugihara E, Sato TA, Maruyama T, Miyoshi H, Taketo MM, Oishi J, Inagaki R, Ueda Y, Okamoto S, Okajima H, Sakai Y, Sakurai T, Haga H, Hirota S, Ikeuchi H, Nakase H, Marusawa H, Chiba T, Takeuchi O, Miyano S, Seno H, Ogawa S. Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. Nature. 2020 Jan;577(7789):260-265. doi: 10.1038/s41586-019-1856-1. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31853061.

3） Ji SG, Juran BD, Mucha S, Folseraas T, Jostins L, Melum E, et al. Genome-wide association study of primary sclerosing cholangitis identifies new risk loci and quantifies the genetic relationship with inflammatory bowel disease. Nat Genet. 2017 Feb;49(2):269-273. doi: 10.1038/ng.3745. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27992413

4） Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. Nat Microbiol. 2019 Mar;4(3):492-503. doi: 10.1038/s41564-018-0333-1. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30643240.

5) Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MM, Ellis E, van Wenum M, Fuchs SA, de Ligt J, van de Wetering M, Sasaki N, Boers SJ, Kemperman H, de Jonge J, Ijzermans JN, Nieuwenhuis EE, Hoekstra R, Strom S, Vries RR, van der Laan LJ, Cuppen E, Clevers H. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. Cell. 2015 Jan 15;160(1-2):299-312. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.050. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25533785; PMCID: PMC4313365.