

胆管オルガノイドを用いた胆道閉鎖症の病態解明

シンシナティ小児病院栄養消化器肝臓科

小西 健一郎

背景：胆道閉鎖症は、1万人に1人の発生率とされ、その救命には乳児早期の手術が不可欠である。しかしながら、手術後の自己肝生存率は30%と予後が悪く、その病因や分子病態を解明し、新しい治療法開発への道を拓くことは、現代医学が直面する課題の一つといえる。

目的：胆管オルガノイドを胆道閉鎖症患者の肝臓より作成し、これと線維芽細胞の細胞間相互作用の観点から、本疾患の病態を解明する。胆管オルガノイドと線維芽細胞を用いた共培養オルガノイドにて、胆道閉鎖症の病態成立機序を解明しようとする試みはこれまでに例がなく独創的である。

方法：胆道閉鎖症患者（BA 群）、その他の肝疾患患者、健常者（NC 群）の肝生検検体から胆管細胞のオルガノイド（CO）を作成する(図 1)。この際、線維芽細胞（以下 FB）も同時に分離する(図 2)。CO・FB・血管内皮細胞（購入）を用いて、共培養オルガノイドを作成し(図 3)、CO と FB の細胞間相互作用を評価する。

図 1. 胆管オルガノイドの作成

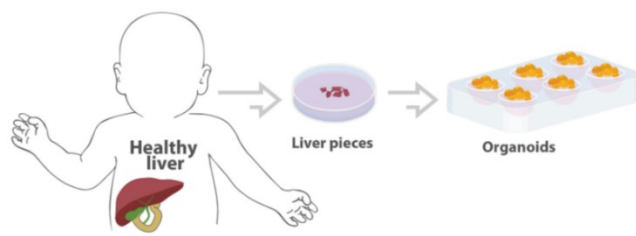


図 2. FB の抽出

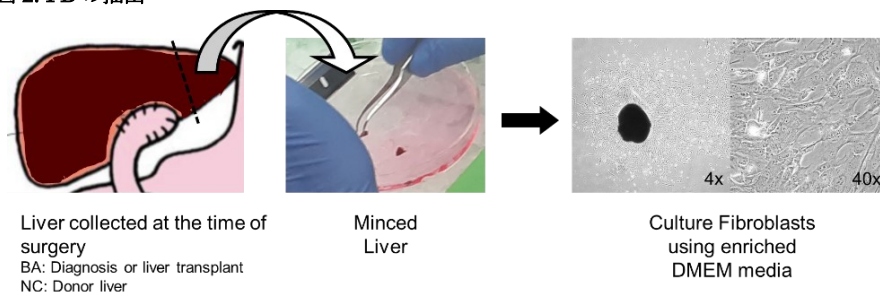
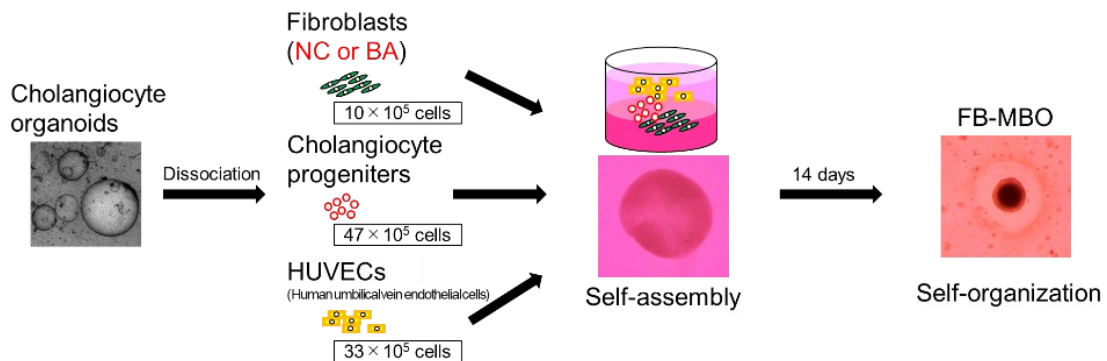


図 3. 胆管オルガノイドおよびFBを用いた共培養オルガノイドの作成



結果：【線維芽細胞の解析】手術時(BA-Dx: BA 診断時、BA-Tx: 肝移植時、NC:健常肝移植ドナー)の肝生検検体からFBを分離培養し、共培養オルガノイド作成に先立ってFBを評価する。まず初めに、培養したFBが、星細胞か門脈周囲線維芽細胞であるかを確認した。95%以上の細胞でCYGB陽性、VCAM-1陽性、ELN陰性であり(図4)、星細胞の可能性が高いと考えた。次に、活性化(aSMAの発現)及び増殖(MTT assay)を評価した。活性化状態および増殖能ともに、BA群とNC群に有意差を見出した。

図 4. FB の表現型

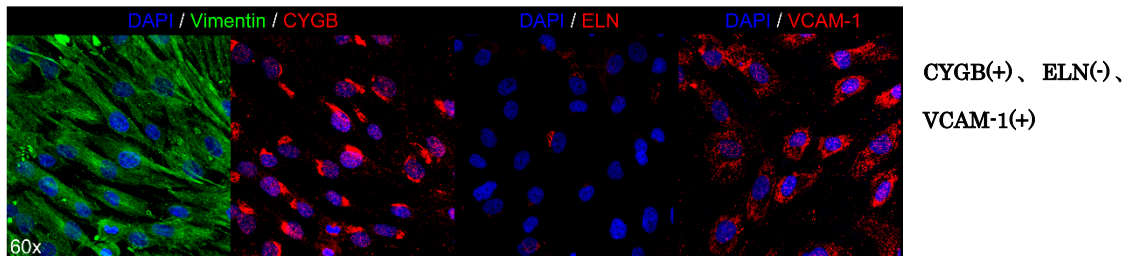


図 5. FB の活性化状態

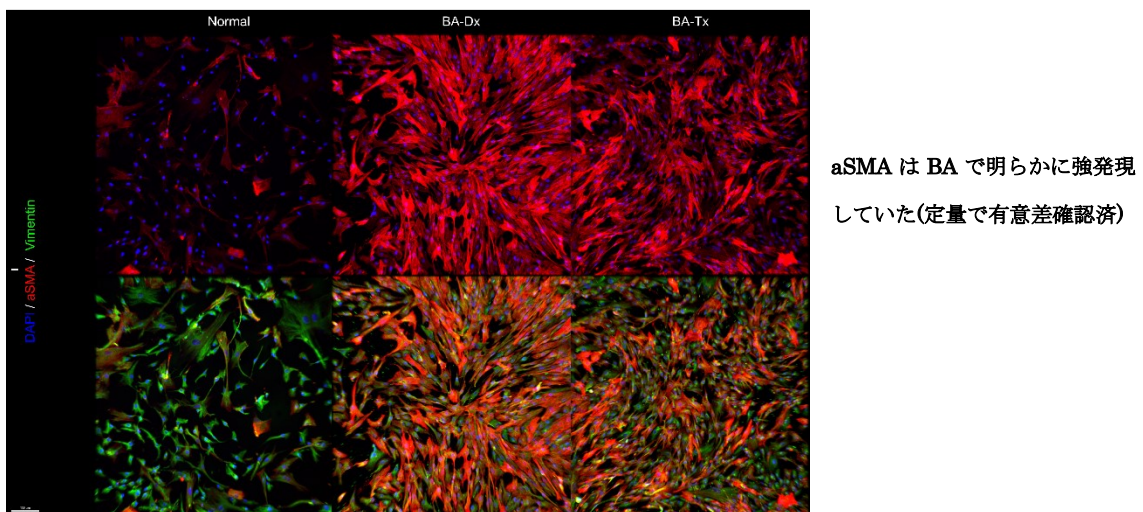
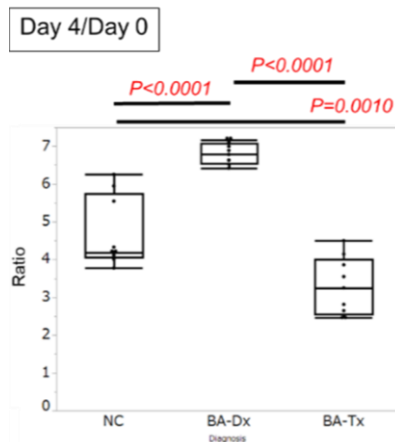


図 6. FB の増殖能(MTT assay)



BA-Dx における FB の増殖能は NC・BA-Tx と比較して有意に高かった

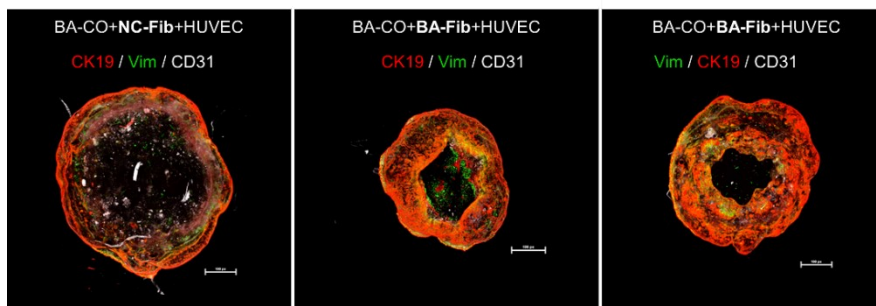
【共培養オルガノイドの作成】NC 群、BA 群について、共培養オルガノイドを、CO・FB・臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)により作成する。HUVEC は市販の細胞を用いる(図 7 共焦点顕微鏡所見、CK19: Red Vim: Green CD31: White)。これまでに、BA 群と NC 群の間に様々な差が見られており、特筆すべき結果として、BA の FB を用いて共培養オルガノイドを作成すると、BA 患者由来の CO の増殖速度が明らかに早いことが挙げられる(図 8 BA-Dx 群 n=3、BA-Tx 群 n=3、NC 群 n=3、定量で有意差確認済)。この結果は、BA 患者の肝組織で観察される Bile duct proliferation を反映しており、その機序に肝星細胞が細胞間相互作用を介して関わっている可能性を強く示唆するものである。この結果に基づいて、現在は、その分子機序解明に向けて、各種実験を進めている。

図 7. 共培養オルガノイド



中心部に FB と HUVEC の細胞塊が存在し、外周に上皮用構造物を形成している

図 8. 共培養オルガノイドにおける NC と BA (BA-Dx および BA-Tx) の比較



BA-FB で作成すると、共培養オルガノイド辺縁の CK19(+)細胞部分が全周に渡って著明に厚い

【研究成果】現時点での研究成果を AASLD Liver meeting 2021 で報告した(図 9)。

図 9. 発表したポスター

