

オルガノイドを用いた胆道閉鎖症の肝線維化の病態解明

シンシナティ小児病院メディカルセンター

栄養消化器科 吉丸耕一朗

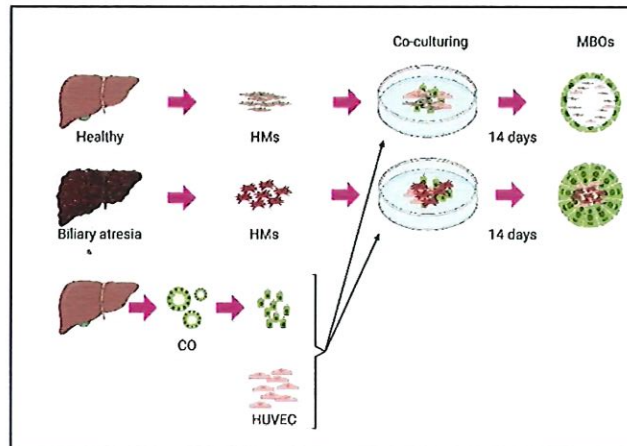
申請番号 2022K1014

当該分野の状況や課題の背景

胆道閉鎖症 (Biliary Atresia, BA) は、1 万人に 1 人の発生率であり、本邦を含むアジアでやや発生頻度が多い。先天的もしくは後天的に肝内および肝外の胆管が閉塞するため、胆汁うっ滞性肝硬変となる進行性の疾患であり、治療介入がなされない場合は、進行的で重篤な肝硬変・肝不全により予後はおよそ 2 年とされ、乳児早期に肝門部空腸吻合術による胆汁排泄手術 (葛西術) が必須な疾患である。術後も肝線維化は確実に進行し、70%は、成人までに肝硬変に進行し、肝移植を必要とする。しかし、本邦において最終手段である肝移植の実施にはドナー不足というハードルのあるため、BA の病因・病態を解明し、根源的治療を開発することは、喫緊の課題である。申請者は、胆道閉鎖症の診療を通じ、原因不明の BA の線維化の進行メカニズムを解明したいと強く考えてきた。

研究目的・研究方法

<目的> BA 患者の肝生検検体から作成した胆管オルガノイド (cholangiocyte organoid, CO) および肝間葉系細胞 (hepatic mesenchymal cells, HMs) による共培養オルガノイド (multi-lineage biliary organoid, MBO) を用いて



BA における線維化進行の病態を解明すること。

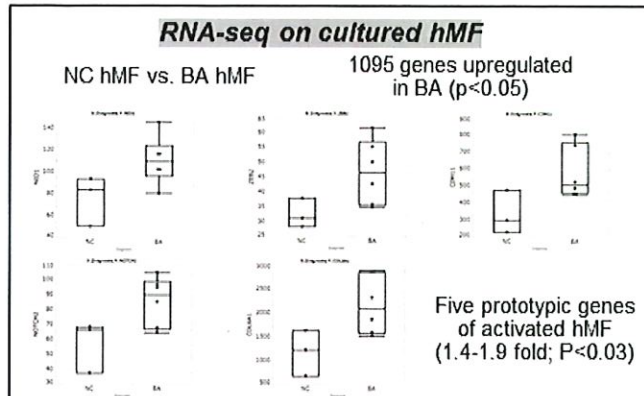
<方法> 健常コントロールおよび BA 患者から採取した肝臓より HMs を培養し、また健常コントロールから胆管細胞を培養する。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) はコマーシャルベースで購入し使用する。これらを 14 日間共培養し、作製された MBO を用いて以下の解析を行った。scRNA seq に関しては、正常コントロールとして肝線維化のない胆道拡張症 (Choledochal Cyst, CC) の検体を用いた。

研究結果

RNA-seq

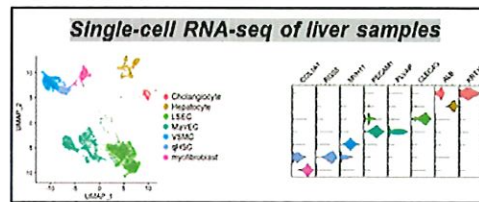
先行研究にて、われわれが用いた HMs は筋線維芽細胞 (myofibroblast, MF) の特徴を有

していることを確認している (data not shown here)。正常コントロールの MF (NC hMF) および BA 患者由来の MF (BA hMF) を用いて bulk RNA-seq を施行した。結果、1095 個の遺伝子が BA hMF にて有意に upregulate していた。中でも、NID1, ZEB2, CDH11, NOTCH2, COL6A1 は、著明な差を認めていた。



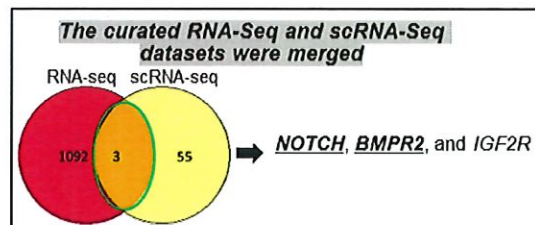
Single cell RNA seq

BA 検体と CC 検体を用い、scRNAseq を施行し、血管内皮細胞、肝星細胞、筋線維芽細胞の 3 種類の細胞に着目し、Cell Phone DB を用いて、cholangiocyte proliferation や liver fibrosis に関連する cell-cell interaction を探索した (data not shown here)。結果的に 58 個の関連遺伝子を抽出した。



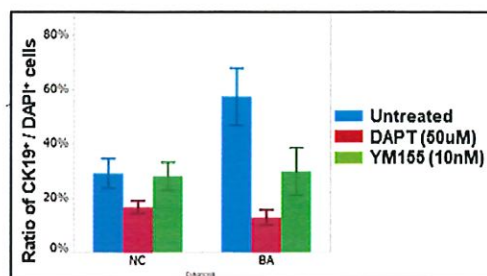
強く関連する遺伝子の抽出

上記の 2 つの解析で抽出された遺伝子の中から共通する遺伝子を検索するに、NOTCH および BMP2, IGF2R が挙げられた。この中から、NOTCH および BMP2 に対する阻害試験を行うことで BA hMF を用いた MBO における cholangiocyte proliferation が抑制されるかを解析することとした。

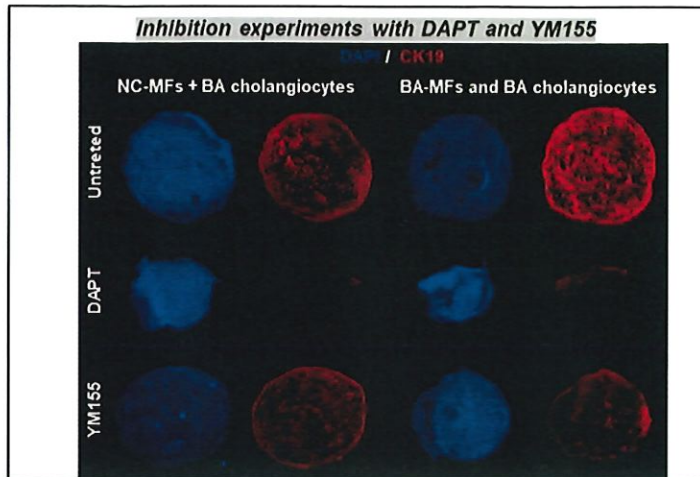


DAPT および YM155 による抑制試験

まず、NC-MBO に比較し、BA-MBO にて CK19+細胞の DAPI+細胞における比率が有意に高いことを確認した上で (青 Bar)、NOTCH シグナル抑制を DAPT にて (赤 Bar)、BMP2 シグナルの抑制を YM155 に



て（緑 Bar）行った。
Confocal Image にて撮影した MBO を IMARIS software にて解析した結果、CK19+/DAPI+ cells の比率は、非抑制群（ $59 \pm 11\%$ ）に比較し、それぞれ、DAPT 群（ $13 \pm 3\%$ ）、YM115 群（ $30 \pm 9\%$ ）と CK19+ Cells の比率は抑制された。



結語

筋線維芽細胞は、NOTCH や BMP pathway を介して、cholangiocyte proliferation を促進していることを解明した。これらの研究成果は、BA 患者における胆管増生のメカニズムに対する新規知見であると考えられる。これらの研究成果は AASLD Liver meeting 2022 にて発表した。今後、これらの Pathway に着目した新規治療薬の可能性を模索する。