

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21543

研究課題名(和文)胆管上皮細胞のゲノム解析による原発性硬化性胆管炎の病態および発がん基盤の解明

研究課題名(英文) Study on pathogenesis and cancer development in primary sclerosing cholangitis by genetic analysis of biliary epithelium

研究代表者

垣内 伸之(Kakiuchi, Nobuyuki)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：90839721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis;PSC)患者の胆汁および胆管から上皮オルガノイドを作製し、全ゲノム解析によりPSCおよび対照群の体細胞変異を解析した。また、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ン解析を行い、変異クローンの広がりを評価した。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、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。本研究により、上皮クローンの綿密な解析が可能となり、PSC病態および発癌に関連する可能性のある遺伝子変異を同定し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、胆管オルガノイドをモデルとして、胆管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。本研究は、将来さらにPSC症例の解析を重ねることで、PSC病態や胆管発がんの解明に資すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial organoids were prepared from bile and bile ducts of primary sclerosing cholangitis (PSC) patients and analyzed for somatic mutations in PSC and controls by whole genome sequencing. In addition, bile ducts from PSC liver transplant recipients were multi-sampled, and organoid cultures were used to purify the epithelium for whole exome analysis to assess the spread of mutant clones. We observed clones expanded across adjacent samples and clones with cancer driver mutations such as ARID2 and PIK3CA. This study allowed for in-depth analysis of epithelial clones and identification of genetic mutations that may be associated with PSC pathogenesis and carcinogenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：原発性硬化性胆管炎 胆管がん 体細胞変異 陽性選択 クローン拡大

## 1. 研究開始当初の背景

最近、血液や皮膚などの組織において、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、発がんリスクとなっていることが明らかとなった。申請者らはこのような知見に着目し、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事を明らかにした(Yokoyama, Kakiuchi et al., Nature, 2019)。これらの知見は、多細胞生物であるわれわれ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従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、慢性炎症性疾患の病態を解明することも可能であることを、申請者ら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から最近発見した(Kakiuchi et al., Nature, in press)。この解析手法は他の慢性炎症性疾患にも応用可能であり、有効な動物モデルがなく研究困難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。

原発性硬化性胆管炎(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(Sun-Gou Ji et al., Nat Genet., 2017)により免疫の関与が示唆され、また腸内細菌の関与を示唆する研究(Nakamoto et al., Nat Microbiol., 2019)も報告されたが未だ病態に関して未知の部分が多い。胆管は皮膚や消化管とは異なり生体外からアクセスすることが困難な臓器の一つであり、また胆管壁は間質が豊富で相対的に上皮細胞の分画は小さく正常胆管上皮のゲノム解析の報告は未だ皆無である。申請者は PSC 診療において日常的に行われる胆管ドレナージ術に着目し、胆汁中に正常胆管上皮細胞が豊富に存在することを新たに見いだした。オルガノイド培養にあたり真菌感染が大きな障壁となったが、細胞の洗浄方法と抗真菌薬の投与方法を工夫することで少量の胆汁から安定的に胆管上皮オルガノイドを樹立することに成功し、これにより胆管上皮細胞のゲノム解析が可能となった。PSC は 10 万人に 1 人の罹患率で希少疾患であるが、長期間の慢性炎症による上皮細胞の進化の痕跡を解析するゲノム解析研究においては、個体内の多様性を利用して一人の患者から複数のオルガノイドを樹立することで多くの変異情報を抽出することが可能であり、少数の患者からでも解析に要する十分な変異情報が得られる。

## 2. 研究の目的

本研究では正常胆管上皮細胞のゲノム解析により、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis; PSC)の病因・病態を解明し、新規治療法確立や発がんリスク予測因子特定への展望を得ることを目的とする。

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 は今後増加する事が予想されているが、その原因は未だ不明で病態の理解が進んでおらず、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。

PSC 患者の正常胆管上皮細胞の遺伝子変異プロファイルを得ることにより、上皮細胞にとっての選択圧たる PSC の炎症病態の解明と、PSC 胆管がんの祖先クローンを特定することで発がんメカニズムの解明が可能であることに着目した。

## 3. 研究の方法

PSC 患者が細菌性胆管炎ないし胆管結石などの合併症を発症した際、内視鏡を用いて一時的に胆管内にカテーテルを留置し、胆汁を体外に排出(ドレナージ)する。ドレナージされた胆汁中に含まれる胆管上皮細胞を、幹細胞因子を含む培地とラミネンゲルを用いた三次元培養(オルガノイド培養)により純化する。また、肝移植時のレシピエント肝を肝区域毎に分割し、肝内胆管および肝外胆管から胆管上皮細胞を採取しオルガノイド培養を行う。

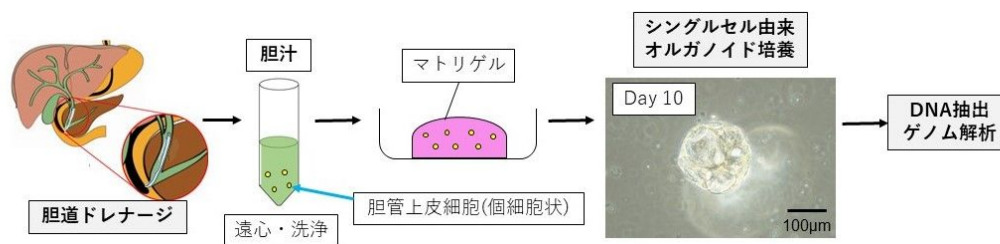
胆管上皮オルガノイドから抽出した DNA を、同一 PSC 患者の末梢血由来 DNA をコントロールとして用いた全エクソン解析を行うことで胆管上皮細胞に生じた遺伝子変異を検出する。検出した変異から統計学的手法を用いて有意に変異頻度の高い遺伝子を抽出し、PSC による慢性炎症下で上皮細胞が獲得するドライバー変異を同定し、既知の分子経路との関連をエンリッチメント解析により特定し、PSC 病態の解明を試みる。肝移植症例では各肝区域から採取した胆管上皮の変異の異同から系統樹を作製し、これらドライバー変異が炎症環境下で実際にクローン拡大に寄与しているかを確認する。

DNA に刻まれた変異は、変異原によって変異が起きやすい塩基配列や塩基置換のパターン(変異シグニチャ)が決まっていることが知られている。PSC 患者の胆管上皮の変異情報から変異シグニチャを抽出し、既知の変異原の変異シグニチャと比較することにより PSC 胆管上皮の変異原、すなわち PSC の病因についての知見が得られる可能性がある。この際、非 PSC 患者として他

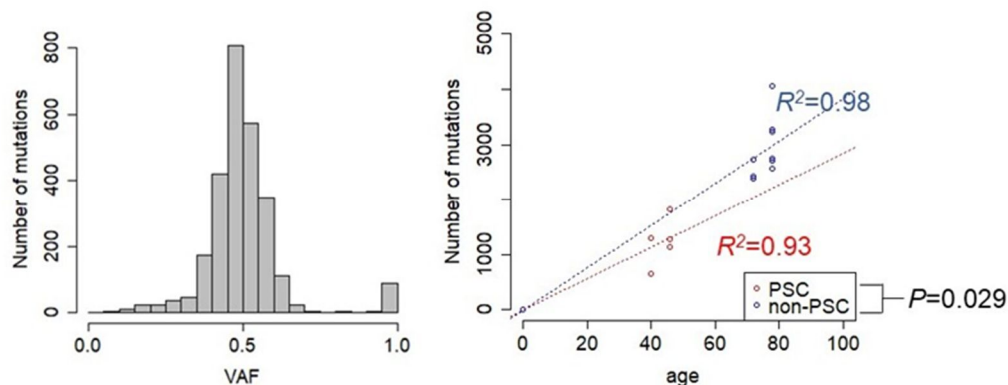
の非炎症性疾患(胆石症など)からもオルガノイドを樹立しその変異情報をコントロールとして用いる事でPSC 特異的変異シグニチャを特定する。

#### 4. 研究成果

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 1-5ml 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 105 個程度をマトリゲル 30  $\mu$ l に懸濁し、12 well dish の中心に 3D ドームを作製した。37  $^{\circ}$ C で 10 分間、CO<sub>2</sub> 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 800  $\mu$ l 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。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、200  $\mu$ m 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(下図)。



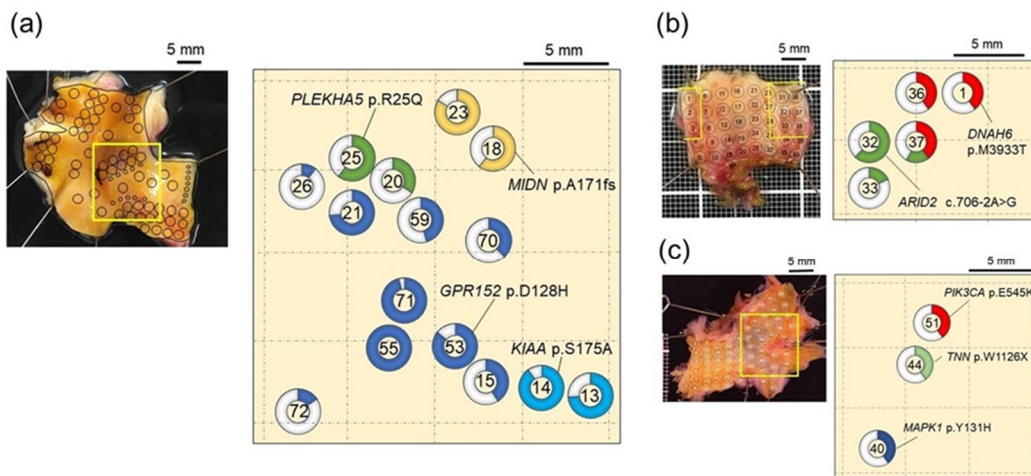
胆汁から樹立したシングルセル由来オルガノイドの全ゲノム解析では、変異の Variant allele frequency (VAF) は 0.5 を中心とする正規性を示し、シングルセル由来クローンに合致した。PSC 患者 2 症例 (各 40 歳、46 歳) から合計 5 個、非 PSC 患者 3 症例 (72-78 歳、平均 76 歳) から合計 9 個のシングルセル由来オルガノイドを全ゲノム解析した。PSC 群、非 PSC 群で、切片を 0 とする線形回帰分析 (0 歳での体細胞変異は 0 個という仮定に基づく) を行い、加齢に伴う変異の蓄積を比較した (決定係数; PSC 群=0.93, 非 PSC 群=0.98, 回帰係数; 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が (P=0.029, Two-sided Mann-Whitney U test)、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、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(下図)。



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。

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 13mm)。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

一変異を認めましたが、3 症例に共通する遺伝子変異は認めなかった(下図)。



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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakiuchi Nobuyuki, Ogawa Seishi	4. 巻 21
2. 論文標題 Clonal expansion in non-cancer tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Cancer	6. 最初と最後の頁 239 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41568-021-00335-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田 紘奈, 垣内 伸之, 平野 智紀, 竹内 康英, 伊藤 孝司, 小川 絵里, 塩川 雅広, 宇座 徳光, 田中 洋子, 南谷 泰仁, 牧島 秀樹, 上本 伸二, 宮野 悟, 小川 誠司
2. 発表標題 慢性炎症に伴う胆管上皮におけるクローン拡大
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 紘奈, 垣内 伸之, 伊藤 孝司, 小川 絵里, 塩川 雅広, 宇座 徳光, 田中 洋子, 南谷 泰仁, 牧島 秀樹, 保田 宏明, 児玉 裕三, 上本 伸二, 宮野 悟, 小川 誠司
2. 発表標題 Clonal expansion in bile duct associated with chronic inflammation
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------