

平成 29 年 2 月 13 日

崇城大学大学院
工学研究科委員会

研究科長 山 川 烈 殿

論文審査委員

主査 松 下 琢



論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者 水民 敬浩 (1419D02)

論文題名 ヒト肝細胞の三次元培養による機能発現メカニズムに関する研究

審査委員 主査 教授 松 下 琢 (印)

副査 教授 松 本 陽 子 (印)

副査 教授 友 重 竜 一 (印)



論文審査結果の要旨

現在、抗がん剤などの様々な候補医薬品が、市販化に行き着く確率は約 1/30000 で、開発期間は 10 年以上、費用は数百億円を超え、しかも年々膨大化してきている為、新しい医薬品の開発はリスクが非常に高いものとなっている。開発途中で候補医薬品が脱落する大きな要因の一つとして、ヒトとその他の動物では存在する薬物代謝酵素の分子種等に違いがあることが判明しつつある中で、医薬品開発の前臨床試験における化学物質等の安全性評価が、動物実験を中心に標準化されていることが挙げられている。そのため、動物実験の前の候補医薬品のスクリーニングの段階で、できるだけ生体内の環境に近い形でヒトの細胞を用いた評価系を確立することが必要となる。その結果、コストのかかる動物実験の削減につながり、開発費用の低減と成功率の増加が期待できる。また、動物愛護の観点からも重要と思われる。

現在の一般的な細胞を用いた候補医薬品のスクリーニングでは、培養 dish 上での二次元 monolayer 培養が主流である。monolayer 培養は、*in vitro* での観察や研究に便利な方法ではあるが、実際の生体内とは異なり、例えば抗がん剤において重要な、がん細胞の薬剤耐性能が生体内と比べ大きく劣っていることが本研究室で明らかとされている。この差は、monolayer 培養が生体内の三次元構造とは異なった細胞形態をとっており、生体内の環境を反映できていないためと考えられる。そのため、抗がん剤のスクリーニングにおいて *in vitro* でいかに *in vivo* を正確に模倣できるかが重要である。

そこで本研究では、本研究室で開発された三次元(spheroid)培養に加え、日本バイリン(株)の培養基材 Cellbed[®]を使用し、成人肝細胞(初代ヒト凍結肝細胞)と肝がん細胞(HepG2細胞)の*in vitro*での薬剤耐性の発現について検討した。さらに遺伝子発現の変化を追うために、三菱レイヨン(株)及び国立衛研との共同で、DNAチップ Genopal[®]に肝臓細胞に関する188遺伝子のプローブを搭載した肝臓細胞チップ(Genopal[®] customized Hepatocyte chip)を開発し、遺伝子発現解析を行った。さらに、種々の免疫染色を行い、三次元化による細胞機能向上のメカニズム解明を試みた。

第2章では、このDNAチップを用いて、成人肝細胞の機能の長期維持が示唆されたCellbed[®]培養が与える各遺伝子発現への影響を評価した。初めに、二つの成人肝細胞サンプル間のscatter plotから得られた正の相関関係により、本チップの再現性の高さが確認された。また、培養終了後のSEMの観察により、Cellbed[®]培養で成人肝細胞がファイバーに接着し、細胞層を形成するとともに、肝機能の発現に有利とされる球状の形態を有している様子が観察された。さらに遺伝子発現においては、Cellbed[®]培養により、monolayer培養に比べて、薬物代謝に最も重要であるCYP群の遺伝子発現上昇が確認された。中でもヒト肝細胞で重要なCYP3群の一つであるCYP3A4の発現はmonolayer培養と比較して約3.5倍高い遺伝子発現が確認された。また、薬物トランスポーターの一種であるSLCトランスポーター群のSLC22A1も約2.9倍の発現の上昇が確認された。以上の結果より、Cellbed[®]培養は、成人肝細胞の生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点からの長期培養だけでなく、生体内の肝臓の機能再現にも有用であることが示唆された。

第3章では、肝がん細胞(HepG2細胞)を本研究室のspheroid培養法で三次元培養し、薬剤耐性のもとになる薬剤排出トランスポーターであるMDR1タンパク質の転写因子として知られている低酸素誘導転写因子HIF-1 α の関与について検討を行った。その結果、HIF-1 α の発現を免疫染色で確認した所、monolayer培養に比べspheroid培養の方がHIF-1 α の発現が多く見られた。さらにウエスタンブロットによる解析では、spheroid培養したHepG2細胞は、monolayer培養と比べ、HIF-1 α が約6.4倍高く発現していることが示された。また、HIF-1 α の発現が確認されたため、MDR1の発現を免疫染色で解析した所、spheroid培養はmonolayer培養に比べて顕著な増大が確認された。遺伝子発現解析においては、spheroid培養でMDR1の発現量がmonolayer培養と比較し、約3.5倍高いことが確認され、また、9つのSLCトランスポーター群の遺伝子の上昇が確認された。以上の結果より、spheroid培養は生体内のがん組織にみられるHIF-1 α 及び薬剤排出活性タンパク質であるMDR1の発現を*in vitro*で再現し、抗がん剤及び薬剤耐性克服薬のスクリーニングに有用であることが示唆された。

第4章では、HepG2細胞をCellbed[®]で三次元培養し、その薬剤排出活性について検討を行った。その結果、Cellbed[®]培養したHepG2細胞は、DOXに対する50%増殖抑制試験において、monolayer培養と比較してIC₅₀値が約20倍と有意に高い値を示した。このDOXに対する薬剤耐性はMDR1を阻害するVerapamilにより有意に阻害されたため、MDR1の関与が示唆された。そこでMDR1の転写因子であるHIF-1 α の発現を検討したところ、免疫染色ではmonolayer培養に比べCellbed[®]培養の方がHIF-1 α の発現が多く見られた。さらにウエスタンブロットによる解析では、Cellbed[®]培養し

た方が monolayer 培養と比べ、約 1.9 倍高く HIF-1 α が発現していることが示された。また、遺伝子発現解析においては、Cellbed[®]培養で MDR1 の発現量が monolayer 培養と比べて約 1.6 倍高いことが確認され、CYP 群や SLC トランスポーター群の遺伝子も上昇した。以上の結果より、Cellbed[®]培養は HepG2 細胞で高い薬剤耐性を示し、生体内のがん組織にみられる HIF-1 α 及び薬剤排出活性タンパク質である MDR1 を *in vitro* で再現し、抗がん剤のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、三次元培養を Cell-based assay として確立することを考えた場合、増殖性のあるがん細胞の spheroid 培養では、その粒径を均一にコントロールすることが難しく、測定結果のばらつきになりやすい。一方、細胞積層型の Cellbed[®]三次元培養では、細胞が球状集塊にはならず、平面の均一な積層三次元となるため、層の厚みをより均一に制御しやすい特徴が見られ、今後、Cell-based assay として発展する可能性があると思われる。

本研究で得られた知見によって、今後、ヒト肝細胞の三次元培養が動物実験代替法として医薬品候補化合物のスクリーニングに応用され、開発期間や費用の削減が可能になるものと期待される。また、Genopal[®] customized Hepatocyte chip は高い再現性を示し、同じ細胞で異なる培養法においてもその遺伝子発現の差異を測定できたため、将来的に様々な培養法を用いたヒト肝細胞あるいは代替細胞の毒性、代謝、動態の評価系として有用であると考えられる。

最終試験結果の要旨

本論文は、正常ヒト肝細胞の三次元培養による医薬品の安全性評価、肝がん細胞の三次元培養による薬剤耐性克服薬スクリーニングへの可能性を示したものであり、今後、動物実験代替法としての応用など、幅広い分野での展開が期待される。また、肝細胞の三次元培養の高機能発現メカニズムの解明にも意義ある知見が得られており、医工学の学際領域における基礎研究としても重要な研究成果であると考えられる。よって本論文提出者は、博士（工学）の学位を取得する能力があることを認める。提出論文について公開試験を行った後、論文内容および関連する分野についての口頭による試験を行い、専攻内会議を行った結果、最終試験において合格したものと認めた。

なお、本研究内容は、以下の 2 編の学術雑誌に掲載決定となっている。

1. T. Mizutami, T. Ishii, Y. Komizu, T. Iwasa, M. Kawabe, N. Togawa, S. Ishida, T. Matsushita.
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, (2017), Vol.22 No.1, *in press*
2. T. Mizutami, Y. Ohta, M. Nakamura, Y. Komizu, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Watanabe, M. Kawabe, T. Matsushita.
Advances in Biochemistry and Biotechnology (2017) Issue 3, *in press*