

論文要旨

区分	甲	氏名 水 民 敬 浩
<p data-bbox="199 562 325 595">論文題名</p> <p data-bbox="252 609 1179 642">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</p> <p data-bbox="199 703 357 736">論文の要旨</p> <p data-bbox="199 757 1422 1171">現在、抗がん剤などの様々な医薬品が開発されているが、市販化に行き着く医薬品はわずかしがなく、開発期間は10年あるいはそれ以上、研究開発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酵素のアイソザイム分子種及びその他の遺伝子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、実験動物を用いる試験法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、前臨床試験の前の段階で、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し、動物愛護の観点からも動物実験をできるだけ削減することが必要となっている。</p> <p data-bbox="199 1189 1422 1458">また一方、一般的な細胞を用いた薬剤のスクリーニングでは、dish上に単層培養を行う monolayer 培養が主流である。monolayer 培養は、<i>in vitro</i> 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。この差は、monolayer 培養が生体内の三次元構造とは異なった形態をとっており、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 <i>in vitro</i> でいかに <i>in vivo</i> を正確に模倣できるかが重要である。</p> <p data-bbox="199 1476 1422 1700">そこで本研究では、本研究室の三次元(spheroid)培養に加え、日本バイリーン(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)と肝がん細胞である HepG2 細胞の <i>in vitro</i> 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)との共同で、DNA チップ Genopal®に肝臓細胞に関する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、これを用いて解析を行った。</p> <p data-bbox="199 1718 1422 2076">第2章では、肝細胞に関する188の遺伝子の発現量を測定する Genopal® customized Hepatocyte chip 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。その結果、二つの成人肝細胞の scatter plot から得られた正の相関関係により、Genopal® customized Hepatocyte chip 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、全ての Cellbed®培養で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、Cellbed®培養による成人肝細胞の長期維持が確認された。さらに遺伝子発現においては、Cellbed®培養により、monolayer 培養に比べていくつかの遺伝子で特に高い発現上昇がみられ、傾向として CYP 群の遺伝子発現上昇が確</p>		

認められた。薬物代謝に最も重要であることが知られている 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、HepG2 細胞を本研究室の spheroid 培養法で三次元培養し、MDR1 の転写因子として知られている 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。さらにウェ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、薬剤排出活性タンパク質である 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 培養で薬剤排出活性タンパク質である MDR1 の発現量が monolayer 培養と比較し、約 3.5 倍高い発現が確認され、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 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 細胞を三次元培養基材 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、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。さらにウェスタンブロットによる解析では、Cellbed®培養した HepG2 細胞は、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®培養で薬物排出活性タンパク質である MDR1 の発現量が monolayer 培養と比べて約 1.6 倍高い発現が確認され、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。

今回得られた結果は、今後のヒト肝細胞の三次元培養によって、動物実験代替法への応用や新薬開発までの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、それぞれの結果で高い再現性を示し、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。