

平成 28 年 2 月 16 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 石 井 貴 晃 （ 1 3 1 9 D 0 1 ）

論文題名 ヒト肝細胞三次元培養の医用工学的応用に関する研究

審査委員 主査 教授 松 下 琢



副査 教授 松 本 陽 子



副査 教授 友 重 竜 一



論文審査結果の要旨

本研究は、これまで本研究室で独自に開発されてきた技術を用い、生体内に近い状況で肝細胞を培養できる三次元培養を軸として、亜急性毒性試験、慢性毒性試験(動物実験代替法)を確立するために、機能を長期間(2週間～数ヶ月)維持する為の基礎的検討を行ったものである。

一般的な医薬品の開発においては、市販化にこぎ着けるものはわずかしがなく、8-15年の開発期間、数百億円を上回る研究開発費用等、新薬開発はリスクが非常に高いものとなっている。開発途中で候補化合物がドロップアウトする大きな要因の一つとして、非臨床試験から臨床試験へ移行する際の、ヒトと動物の種差による代謝の違いの問題が挙げられる。そのため、近年、様々な化学物質、医薬品などの代謝に関係するヒト肝細胞が、医薬品の開発の分野において非常に注目されている。現在、正常なヒト肝細胞は、*in vitro*において医薬品の効能や、毒性の評価を行うために使用されてきている。しかし、正常なヒト肝細胞はその培養期間が一週間以内と短いため、動物実験の代替法として確立されているのは急性毒性試験(試験期間：0-7日間)のみで、それ以上の培養期間が必要な亜急性毒性試験(14日-28日間)、亜慢性毒性試験(90日間)、慢性毒性試験(6-12ヵ月間)などは動物実験代替法が確立されていないのが現状である。

そこで本研究では、より生体内に近い状況でヒト肝細胞を長期機能維持できる三次元培養法の開発を目的として、ナノサイエンス学科友重教授と共同で開発したハイドロキシアパタイト(HAp)多孔質担体、三菱レイヨン(株)と共同で開発したナノファイバーを足場とし

た三次元細胞培養モジュール、日本バイリーン(株)製の高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed[®]を用いて、本研究室で培養してきた胎児肝細胞(Hc 細胞)、および肝芽細胞、ヒト凍結肝細胞(成人肝細胞)の生存・増殖及び機能に与える影響について検討を行った。

第2章では、表面形状の異なる HAp 多孔質担体(HAp10%、HAp20%、HAp30%)を作製し、これらの担体上で Hc 細胞及び肝芽細胞の高密度培養を行い、担体の表面形状が細胞へ与える影響について検討を行った。その結果、細胞密度、薬物代謝活性(CYP3A4 活性)については、HAp20%の多孔質担体が、他の担体に比べそれぞれ有意に高いことが示され、特に HAp20%に特徴的に存在する 50-80 μm の細孔径(曲率半径)が、細胞密度、CYP3A4 活性に対し、いくつかの重要な役割を持っていることを明らかにした。

第3章では、ポロアクリルニトリル製ナノファイバーの径の違いが細胞増殖および機能、細胞形態に与える影響を検討するために、170 nm~1300 nm の径のナノファイバーを作製し、Hc 細胞、肝芽細胞、成人肝細胞の培養を行った。その結果、Hc 細胞、肝芽細胞の細胞密度はともに 1300 nm のものが最も高く、CYP3A4 活性は、600 nm が 2.63 pmol/10⁶cells/min で最も高い値となった。この値は、成人ドナー肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95 \pm 1.24 pmol/10⁶cells/min)を超える結果となり、ナノファイバーの有用性が示された。成人肝細胞の培養では、300 nm、600 nm、1300 nm の径のナノファイバーを使用した、肝芽細胞と同様に、600 nm のナノファイバーで活性が最も高く、上記の生体内の CYP3A4 活性値を超えるものとなった。さらに、全てのナノファイバーで培養した成人肝細胞が monolayer より高い活性を示した。通常、成人肝細胞は、付着・生存のために培養 dish 表面をコラーゲン処理する必要があるが、ナノファイバーを使用することで細胞機能を高めつつ、コラーゲン処理の手間を省くことができる可能性も示唆された。以上の結果より、ナノファイバー上で細胞を三次元的に培養する事で、細胞の増殖、機能について向上させる事ができ、特に 600 nm の径が最も有効であるという結果が得られた。

第4章では、第3章で検討したナノファイバーを用いた三次元細胞培養モジュールを使用した灌流培養システムの開発を行った。そして、Hc 細胞、および肝芽細胞、成人肝細胞を本灌流培養システムで培養し、細胞密度、細胞機能および細胞形態にどのような影響を与えるかを検討するとともに、灌流培養システムの評価を行った。結果として、Hc 細胞、肝芽細胞では播種から約 5 カ月(156 日間)もの長期間細胞を培養する事ができ、CYP3A4 活性についても、約 3 カ月(90 日間)にわたり前述の成人肝細胞の値と同等の値を維持し続ける事が出来た。また、成人肝細胞の長期培養を試みたところ、細胞機能を少なくとも 25 日間維持でき、さらに細胞の生存は 33 日目まで確認する事が出来た。今回の結果より、本灌流培養システムを用いることにより、Hc 細胞、肝芽細胞のみならず成人肝細胞についても長期培養が可能となり、将来は、亜急性毒性(薬物の長期服用によって発現する毒性)試験(4 週間)への応用が期待される。

第5章では、高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed[®]を用いて、成人肝細胞の長期機能維持を目的として実験を行った。また、肝細胞の細胞外マトリックス (ECM)として知られている Laminin、Type I Collagen を塗布した Cellbed[®]の成人肝細胞に与える影響についても検討を行った。成人肝細胞を Cellbed[®]上で三次元培養することにより二次元の monolayer と比較して生存率が高くなる傾向が見られ、Laminin、Collagen をコートする事によりさらに細胞数が高くなる傾向が見られた。CYP3A4 活性でも monolayer に比べ Cellbed[®]上で培養したもので有意に活性値の上昇が見られ、肝障害の指標である GOT、GPT の漏出量についても、monolayer では 10 日目以降に増加するのに対し Cellbed[®]ではそれが見られず、成人肝細胞への障害が少ない状態で培養できる可能性が示唆された。以上の結果より、生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点から成人肝細胞の長期培養において、Cellbed[®]は有

用であると思われ、今後動物実験代替法への応用が期待される。

今回得られた結果は基礎的な段階で、さらに詳細な検討が必要であると思われるが、将来的に、正常なヒト肝細胞を用いた人工肝臓及び、亜急性毒性試験法(4 週間)開発、動物実験代替法としての応用、薬剤のスクリーニングや肝臓でのクリアランス予測、代謝予測、また、再生医療分野への応用など、幅広い分野での展開が期待される。

最終試験結果の要旨

本論文は、正常なヒト肝細胞を用いた亜急性毒性試験法(4 週間)開発への可能性を示したものである。また、動物実験代替法としての応用、再生医療分野への応用など、幅広い分野での展開が期待され、医工学の学際領域において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わせた後、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編の学術雑誌に公表済および掲載決定となっている。

1. T. Ishii, H. Saito, Y. Komizu, R. Tomoshige, T. Matsushita, *J. Biosci. Bioeng.* (2016) *in press*
2. T. Ishii, Y. Komizu, N. Shibuya, K. Kuasaka, T. Matsushita, *AATEX*, Vol.20, No.2, 66-72 (2015).

その他の論文

1. 国際特許 Title : CELL CULTURE MODULE, 発明の名称 : 細胞培養用モジュール
国際出願番号 : PCT/JP2013/005172, 国際公開番号 : WO 2014/034146 A1
特許出願人 : Mitsubishi Rayon Co.,Ltd.
発明者 : N. Shibuya, M. Yanagi, T. Matsushita, T. Ishii, K. Harada, T. Gotou, S. Kake.