

論文要旨

区分	甲	氏名 石井 貴 晃
<p data-bbox="197 465 325 499">論文題名</p> <p data-bbox="252 562 1018 595">ヒト肝細胞三次元培養の医用工学的応用に関する研究</p> <p data-bbox="197 658 357 692">論文の要旨</p> <p data-bbox="197 710 1423 981">現在、一般的に行われている細胞培養は、dish を用いた単層培養が主流である。単層培養は <i>in vitro</i> での因子・薬剤などと細胞の相互作用の観察や研究に便利な方法であるが、近年、付着依存性の細胞を生体外で培養すると、細胞が付着面に対して平面(二次元)状に増殖し、生体内の三次元構造とは異なる形態をとる為、生体内の環境を反映できていないとする研究が数々報告されている。そのため、生物素材・人工素材等を種々の形状に加工し、細胞の生死、付着形態、増殖、分化、極性、自己組織化などの挙動を制御するための三次元培養担体が開発されている。</p> <p data-bbox="197 999 1423 1317">また一方、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、<i>in vitro</i> 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。</p> <p data-bbox="197 1335 1423 1606">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培養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。</p> <p data-bbox="197 1624 1423 1895">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が示唆された。</p>		

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±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る、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。