

## 審査の結果の要旨

氏名 木村 圭一

本論文は、Development of human hepatocytes culture systems through the improvement of oxygen supply（酸素供給の改善による高機能ヒト肝細胞培養系の開発）と題し、創薬スクリーニングツールとして期待される高機能を保持したヒト肝細胞培養系の確立を最終目的とし、酸素供給を中心とした生体内肝微小環境を *in vitro* で再現することで、従来法と比較し高い機能を持った培養系をヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞およびヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて構築した成果を示したものであり、全 5 章からなる。

第 1 章は緒論であり、現在の創薬過程における問題点を指摘し、生理学的妥当性の高い *in vitro* ヒト肝細胞培養系の必要性について述べている。まず、さまざまな肝細胞ソースの特徴および問題点について述べ、ヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞およびヒト多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPS 細胞）由来肝細胞の有意性を指摘している。一方、現在報告されているヒト肝細胞培養系の最新動向と問題点をまとめた上で、より生理学的で簡便な生体内微小環境の再現が必要であることを述べ、その大前提として細胞層への酸素供給の抜本的改善が必要であることを指摘している。そしてこの改善のために、培養底面に酸素透過膜を用いた培養法が極めて有効であることを述べた上で、本論文の目的およびアプローチを示している。

第 2 章では、高い酸素透過性を持つポリジメチルシロキサン（polydimethylsiloxane, PDMS）膜を用いた酸素直接供給がヒト肝臓キメラマウス由来肝細胞（PXB 細胞）培養に与える影響について述べている。本章では、酸素透過性の異なる二つのプレート（TCPS, tissue culture-treated polystyrene; PDMS）上で PXB 細胞を培養し、肝機能の比較検討を行っている。まず、細胞層酸素濃度測定に基づく酸素消費量の推算から、PDMS 膜を用いた酸素直接供給により、細胞が生理学的な酸素消費を行うことを示している。その結果、アルブミン合成や胆汁酸合成、チトクローム(cytochrome, CYP) P450 3A4 活性などの肝主要機能の亢進に成功している。一方、本培養系には胆汁酸排泄経路がないことから、高機能化に伴い高濃度の胆汁酸蓄積が見られ、これが細胞毒性を引き起こすという現象も報告している。以上より、胆汁酸排泄等の更なる検討が必要ではあるが、PDMS を用いた酸素直接供給を基にした培養は生体内微小環境の再現が可能であり、ヒト肝細胞培養における機能向上に極めて有効であると結論している。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導過程における酸素濃度および酸素供給の影響について述べている。本章では、異なる酸素濃度（5, 10, 20%）および酸素供給法（TCPS, PDMS）の下で肝分化誘導を行っており、内胚葉分化および肝細胞分化のそれぞれの分化ステージで、生理学的酸素濃度下での酸素直接供給が効果的であることを報告している。内胚葉分化では、細胞の呼吸系に変化は見られなかったものの、PDMS

培養で低酸素誘導因子 1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , *HIF-1 $\alpha$* ) の発現抑制を報告している。*HIF-1 $\alpha$*  の抑制は内胚葉分化に寄与する Wnt シグナリングを活性化することが知られており、内胚葉分化における酸素直接供給の有効性を示している。肝細胞分化では、生理学的酸素濃度 (5%, 10%) かつ PDMS による酸素直接供給下での分化誘導で、肝機能の成熟化を報告している。また、これらの条件下での酸素消費量の向上も観測しており、好氣的呼吸を通じた高いエネルギー産生の獲得を示唆している。さらに、細胞が自発的に三次元的に重層化する現象を報告し、単位面積当たりの細胞生産性が向上することも示している。以上より PDMS 膜を用いた酸素供給の改善が、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化において効果的であると結論している。

第 4 章では、カルボキシペプチターゼ M を細胞表面マーカーとして分取した肝前駆細胞を用い、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の更なる成熟化および *in vitro* 肝細胞培養系の改善について述べている。PDMS 上で成熟化を行った細胞では、TCPS 上と比較してアルブミン合成能および CYP3A4 活性の有意な向上が見られ、アルブミン産生ではほぼ正常肝細胞と同レベルとされる PXB 細胞 (TCPS, Day 7) を凌ぐ高い合成能の獲得に、CYP3A4 活性ではこれに近い活性の獲得に成功している。しかし、PDMS 上でのマトリゲルサンドイッチ培養や 3T3 細胞との共培養では、肝機能の更なる向上は見られず、特にマトリゲルサンドイッチでは有意な抑制を示した。これは、マトリゲルが肝前駆細胞の胆管上皮細胞への分化を誘導することに起因すると考えられ、サンドイッチ培養や共培養開始時期の更なる検討が必要であることを指摘している。以上より、共培養の対象細胞やその開始時期に課題は残るものの、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた *in vitro* 肝臓モデルの構築においても、PDMS を用いた酸素直接供給が重要であると結論している。

第 5 章は結言であり、本論文全体のまとめと到達点を示すとともに、肝微小環境を模倣した *in vitro* 肝臓モデルの構築を目指す上で、残された課題およびそれらの展望について述べている。

以上、本論文では、ヒト肝細胞培養において細胞層への酸素供給量の抜本的改善を始めとする生理学的培養環境の再現を通じ、簡便かつ高い肝機能を保持した肝細胞培養系の構築に成功している。これは、創薬過程における *in vitro* での候補化合物のスクリーニングや薬物動態評価での利用を通じて、創薬過程の科学的効率化に大きく寄与するものである。さらにこの成果は、広範な利用が期待される *in vitro* 肝細胞培養系の改善にとって重要なものであり、バイオエンジニアリング・生物化学工学・生体組織工学の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。