

博士論文（要約）

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）

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、酸素を中心とした生体内肝微小環境を *in vitro* で再現することにより、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、*in vitro* ヒト肝細胞培養系の必要性について述べている。これを構築する上でさまざまな肝細胞ソースが提案されており、それぞれ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 iPS 細胞由来肝細胞の利点について言及している。その後、現在報告されているヒト肝細胞培養系の最新動向をまとめ、これらの問題点を指摘している。さらに、これらを解決するためには簡便に生体内微小環境を再現する必要があることを指摘し、細胞層への酸素供給の改善が必要であることを述べている。そしてこの実現には培養底面に酸素透過膜を用いた培養法が重要であることを示し、本研究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 (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培養に与える効果について述べている。この効果を示すため、酸素透過性の異なる二つのプレート (ポリスチレン (TCPS) プレート, PDMS プレート) 上での培養を行った。さらにより生体内微小環境を模倣した培養系を実現するため、それぞれの酸素供給条件下においてマトリゲルサンドイッチ培養および 3T3 細胞との共培養を行った。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 TCPS 培養と比較し約3倍の酸素消費を獲得していることを示した。また、これらの条件下においてアルブミン合成能やチトクローム P450 (CYP) 3A4 活性の有意な向上が見られた。特に、これらはマトリゲルサンドイッチ培養や 3T3 細胞との共培養を行った系で顕著であった。また、3T3 細胞との共培養では、PDMS 培養において2つの細胞が階層的に積層された構造が確認され、生体内様階層構造の再現が可能であることが示された。しかし一方で、これらの培養系では高い肝機能の獲得による胆汁酸合成能の亢進が確認されており、胆汁排泄経路がないことに起因する胆汁酸毒性が示唆された。高機能を長期間維持した培養系の開発には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を再現が可能であり、ヒト肝細胞培養においてその機能向上に有効であることが示された。

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、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化を異なる酸素供給下 (TCPS, PDMS) かつ酸素濃度下 (5%, 10%, 20%) で行い、それぞれの分化段階における酸素の影響を検討している。まず、肝細胞分化の最初のステップである内胚葉分化について検討を行ったところ、PDMS を用いた酸素直接供給により内胚葉マーカー *GATA4* の発現に向上が見られた。これらの培養系では、細胞の呼吸系の変化は見られなかったものの、*HIF-1α* の発現が抑制されていた。*HIF-1α* 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効果が示された。次に、それぞれの分化誘導条件下で得られた肝細胞の機能を比較したところ、PDMS による酸素直接供給かつ生理学的酸素濃度下 (5%, 10%) で分化誘導を行った肝細胞について高い肝機能が見られた。さらにこれらの細胞では酸素消費量の向上が見られ、高いエネルギー産生の獲得が示唆された。この結果、これらの細胞は自発的に三次元化する様子がみられ、細胞増殖つまり単位面積当たりの細胞生産性についても向上が見られた。以上より PDMS 膜を用いた酸素直接供給が、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化において効果的であることが示された。

第4章では、iPS 細胞由来肝細胞の更なる成熟化を目指した培養系の構築に関する研究成果を述べる。第3章において PDMS 培養が iPS 細胞の肝細胞分化に効果的であることを示したが、これらの細胞は依然として胎児型の肝機能を示しており、分化誘導効率も低い。そこで本章では、分化誘導過程で得られる肝前駆細胞を表面マーカー (CPM) により分取した細胞を用いて、iPS 由来肝細胞の更なる成熟化および *in vitro* 肝細胞培養系の構築を目指した。まず、分取した肝前駆細胞の成熟化を、酸素透過性の異なる二つのプレート (TCPS, PDMS) 上で行い、酸素影響を評価した。様々な肝機能の評価したところ、PDMS 上で成熟化を行った細胞について、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 PXB 細胞 (TCPS, Day7) を超える合成能を、CYP3A4 活性ではこれに近い活性を示した。次に PDMS 上でマトリゲルサンドイッチ培養や 3T3 細胞との共培養を行い、更なる成熟化および *in vitro* 肝細胞培養系の構築を目指した。しかし、これらの系では肝機能の向上は見られず、特にマトリゲルサンドイッチでは有意な低下が見られた。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、モデル構築時期の検討が必要であることが示された。以上より、非実質細胞の導入やモデル構築時期などいくつかの課題は残るものの、ヒト iPS 由来肝細胞を用いた *in vitro* 肝臓モデルの構築において PDMS を用いた酸素直接供給の重要性が示された。

第5章は結言であり、本論分全体のまとめと到達点を示すとともに、生体内肝構造を模倣した *in vitro* 肝臓モデルの構築に対し、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、本論分では、ヒト肝細胞培養において重視されてこなかった、細胞層への酸素供給量の改善に着目した、簡易かつ高い肝機能を保持した肝細胞培養系に関する研究成果をまとめたものである。本論分の知見は、従来の培養に替わる新たな培養系を示しており、創薬過程における候補化合物のスクリーニングや薬動・薬理研究に貢献できると予想される。