

論文の内容の要旨

論文題目 Zonationを実現する肝細胞培養システムの開発

氏名 松本 倫実

近年では、1種類の新薬開発に対し数十～数百億円という莫大な研究開発費と、10～15年という長い年月がかけられている。新薬の候補物質の有効性・安全性の評価においては動物実験が主流であるが、ヒトとの種差の問題、高コスト性および動物愛護の観点からEUを中心に規制されつつあり、代替法の開発が世界中で重要視されている。人体に投与された経口薬の分解・解毒は主に肝機能が担っているため、摘出した肝臓のスライス片や、そこから得られる肝細胞を用いて生体外 (*in vitro*) で候補物質をアッセイする方法が一般的な動物実験の代替法として行われてきたが、未だに候補物質の約90%以上が臨床試験を通過できず、*in vitro*試験方法の改善が必要とされている。このように、*in vitro*における肝機能の再現が長年試みられているが、未だに完全再現されていないことの大きな理由として、肝細胞が複数の機能を有しており、それらを一定のバランスで同時に再現することが難しい点が挙げられる。

生体内 (*in vivo*) において肝細胞は、置かれた環境の酸素濃度の差異によって複数の異なる代謝機能が発現していると考えられている。肝細胞は*in vivo*で肝小葉と呼ばれる六角柱の小葉構造を成し、その中で動脈と静脈が規則的に配置されている。そのため、動脈側から静脈側にかけて酸素が少なくなる酸素濃度勾配が生じる。この酸素濃度勾配のために肝小葉の外側と内側で肝細胞の代謝機能が異なることが報告されている。例えば、

動脈側では糖新生や尿素合成，静脈側では解毒やアルコールの代謝が行われる．このような肝細胞の肝小葉内における位置に応じた代謝能の違いをLiver Zonationと呼ぶ．*In vivo*における肝細胞の代謝機能を生体外で再現し，*in vitro*試験方法を改善するには，酸素濃度勾配を含めた*in vivo*環境およびLiver Zonationの再現が必要であると考えられる．

細胞周囲の微小環境の模倣に関して，MEMS技術を用いて製作した細胞培養用マイクロ流体デバイスにより，生体組織を構成する細胞サイズの影響の制御が可能となり，肺，胃，腸，骨髄などの，複雑で動的な組織・臓器内環境の模倣を目指せるようになった．これらをまとめてOrgan on a chipと呼び，その中でも肝臓内環境の模倣を試みるLiver on a chipは数多く開発されてきた．Zonationに着目しているLiver on a chipとして，内部に酸素濃度勾配を形成可能なデバイスの報告も複数存在する．しかしながら，これらの既存研究では，酸素濃度勾配の形成に合わせて内部環境のモニタリングを行う計測システムが搭載されていない，酸素濃度勾配と物質輸送の向きが*in vivo*と一致しておらず代謝物の流れの違いから正常な肝代謝機能の再現が困難だと考えられる，などの問題点がある．

そこで，本研究では，酸素濃度勾配下で肝細胞を培養するのみにとどまらず，酸素濃度勾配と物質輸送の方向の関係を*in vivo*と一致させ，Liver Zonationを実現可能な肝細胞培養用マイクロ流体デバイスを設計する．加えて，酸素濃度勾配を可視化する機構を搭載し，各細胞の位置と酸素濃度に対する細胞応答の評価までを可能とする肝細胞培養システムを開発する．以上を本研究の目的とする．

本論文では，6章から構成される本篇に，序章と結論を合わせた全8章から構成される．

以下，各章の概略を述べる．

第1章では，本研究の背景となる新薬開発における非臨床試験の現状と問題点を提示する．そして，肝臓内の環境を*in vitro*で再現するデバイス，特に酸素濃度勾配を細胞培養部分に形成するデバイスの必要性を示し，肝細胞を用いた*in vitro*試験方法の現状と問題点について述べ，本研究の目的と概要を示す．

第2章では，生体内環境を模倣するのに適しているとされるマイクロ流体デバイスに関する基礎的な事柄を議論し，本研究における肝細胞培養システムの設計要件を述べる．マイクロ空間を利用した微小環境制御の応用として，臓器をマイクロ空間に模倣したOrgan on a chipを紹介し，薬物代謝に最も大きく関わる肝臓を模倣したLiver on a chipと，本研究で参考にする酸素濃度勾配を考慮した細胞培養マイクロデバイスについて考察する．そして，Liver on a chipの現状および課題として，酸素濃度勾配の形成と，適切な

方向の物質輸送の両方を同時に再現することを挙げ、細胞呼吸によりデバイス内部に酸素濃度勾配を形成するデバイスの設計を行う。また、本研究で開発を目指すのは細胞を培養するデバイスだけでなく、培養時の環境や細胞応答を解析するシステムをも含むため、マイクロデバイス内での細胞応答を解析・評価するための生物学的手法の検討を行う。

第3章では、第2章で議論された設計要件に基づき、酸素濃度勾配を細胞培養部分で形成するために必要な、デバイス内酸素濃度の制御システムおよび計測システムの開発について述べる。代謝機能の検証には特定の酸素濃度勾配において複数回実験を行う必要があるため、デバイス内で特定の酸素濃度勾配を形成する方法に再現性が必要である。特定の酸素濃度勾配を再現性良く形成するためには、デバイスに流入する溶液の酸素濃度を制御できるシステムの開発が必要となる。また、本研究では、開発したシステムを用いて培養した正常な肝細胞の機能と酸素濃度分布との対応の観察を目的とする。従って、細胞に対して非侵襲的な方法でデバイス全体の酸素濃度分布を計測することが求められる。既存の酸素濃度制御システムとセンサの選択肢について述べ、それぞれについて、本研究で開発するデバイスシステムに適したものを検討する。酸素濃度制御システムの開発とその機能評価、および、選択したセンサを搭載したデバイスを用いた酸素センサの感度の確認とキャリブレーションを行い、デバイス内における酸素濃度勾配の評価手法を確立する。

第4章では、第2章と第3章で提示した設計要件と周辺技術に基づき、実際に肝細胞培養デバイスを開発し、主に工学的側面からその全体の機能評価を行う。第2章の設計要件を満たすデバイスを考えた場合、細胞の評価方法として免疫染色法とRT-qPCR法が適していると第3章で述べられている。そこで、免疫染色用とRT-qPCR用の2種類のデバイスシステムを設計・開発し、その手順について述べる。免疫染色用デバイスに関しては、HepG2肝がん細胞株を培養することでデバイス内酸素濃度勾配の形成と制御を試みる。また、RT-qPCR用デバイスに関しては、デバイス内で培養した細胞の局所的な回収機構が機能するかどうかについてHepG2およびRat初代培養肝細胞を用いて確認を行い、HepG2に関しては回収した細胞を用いてRT-qPCRを行う。

続いて、第5章と第6章では、第4章までで開発した肝細胞培養システムを用いて、Rat初代培養肝細胞を培養した場合の肝機能の評価を主軸に置いた、生物学的観点を目的に据えた実験を行う。

第5章では、開発した肝細胞培養システムを用いたRat初代培養肝細胞の還流培養及び免疫染色実験について述べる。Rat初代培養肝細胞を培養した場合にデバイス内で形成さ

れる酸素濃度勾配に関して評価したのち、デバイス内の高酸素領域と低酸素領域に関して、Rat初代培養肝細胞の複数のタンパク質の発現傾向を免疫染色法により評価する。

第6章では、免疫染色用デバイスシステム内で培養したRat初代培養肝細胞に肝排泄型薬剤であるPhenacetinを投与し、高酸素領域と低酸素領域での細胞応答を観察する実験について述べる。細胞形状の変化、活性酸素の生成量およびタンパク質の免疫染色結果から、薬物投与を行っていない実験結果との比較評価を行い、本研究で開発されたデバイスが薬物代謝の観察に応用可能であることを示す。

第7章では、第4章から第6章にかけて述べた各実験を踏まえて、本デバイスシステムに関して全体的な考察を行う。

最後に、第8章では本論文の結論を述べる。本研究で得られた成果についての総括を行い、今後の展望について述べる。