

審査の結果の要旨

氏名 松本 倫実

本研究は、肝臓を構成する肝細胞が部位特異的に異なる機能を発現するとされる、いわゆる **Liver Zonation** を実現するような新たな肝細胞培養系について検討したもので、特に酸素濃度勾配を形成して、これを可視化する機能に着目したマイクロ流体デバイスを提案し、酸素濃度に対応する細胞応答の評価を可能とする肝細胞培養システムの構築を試みたものである。

本論文は全8章から構成される。

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し、生体内における肝細胞の代謝機能と **Liver Zonation** について概観するとともに、これを *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、本研究の目的について述べている。

第2章では、マイクロ流体デバイスに関する基礎的事項を議論し、本研究における肝細胞培養システムの設計要件を述べている。臓器をマイクロ空間に模倣した **Organ on a chip** や薬物代謝に最も大きく関わる肝臓を模倣した **Liver on a chip** 等を概観し、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している。さらにデバイス内部での細胞応答を解析するために用いる手法について検討した上で、酸素濃度勾配の形成と適切な方向の物質輸送を同時に再現することに着目して、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を提案している。

第3章では、デバイス内部の酸素濃度を制御する手法について述べるとともに、酸素濃度分布を可視化し、計測する手法を提案している。肝細胞の機能と酸素濃度分布との対応関係の観察を行うためには、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が、その要求を満たす手法として、酸素感応性蛍光材料を用いたシート状センサを採用し、その感度の確認とキャリブレーションを通じて、デバイス内における酸素濃度勾配の評価方法を確立している。

第4章では、実際に肝細胞培養デバイスを製作し、その機能評価を行っている。細胞の評価手法として、免疫染色と **RT-qPCR** の2種類の手法を想定し、それぞれに対応したデバイスシステムの作製プロセスについて述べている。免疫染色用デバイスについては、**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、複

数の流量条件で実験を行った結果、流量に応じた酸素濃度勾配が再現性よく形成できることを確認している。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初代培養肝細胞の2種類の細胞を用いて確認を行い、HepG2については回収してRT-qPCRが行えることを確認している。

第5章では、開発した肝細胞培養システムを用いてRat初代培養肝細胞の灌流培養ならびに免疫染色実験を行っている。デバイス内で形成される酸素濃度勾配を評価したのち、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している。その結果から、培養開始してからの2日間が経過すると、1日目に比較して酸素濃度勾配は緩くなるもののZonationに伴うタンパク質の発現傾向は強くなることを見いだしている。

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の解熱鎮痛剤である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を行っている。その結果、Phenacetinを投与した場合、そうでない場合に比べてCYP3A2の発現が下流、すなわち低酸素領域において高まる結果が得られており、Phenacetinの代謝が再現されている可能性が示されている。このことは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唆するものである。

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っている。シート状センサを用いることにより、酸素濃度分布が2次元平面上で可視化できることの優位性について述べるとともに、今回デバイス内で実現した酸素濃度勾配が実際の体内に比べてかなり大きいため、さらにデバイスを小型化するなどの改善が必要であること等の考察がなされている。

第8章では本研究で得られた成果を総括し、肝細胞が置かれる酸素濃度勾配を再現性よく実現し、これを可視化するとともに細胞応答の計測を可能とする新しい培養システムが確立されたと結論するとともに、残された課題と今後の展望について述べている。

以上のように本論文では、肝細胞の機能に関わるZonationを実現しうる新しい培養システムを提案し、その有効性を実証している。本論文の成果は、新しい学問的な議論を行う基盤的な実験技術をもたらすもので、精密工学の学術的発展に貢献するものである。

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。