

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 シャイデカ ベネディクト

本論文は、” Systematic Integration of a Biomimetic Hepatic Microenvironment *in vitro* for Improved Physiological Drug Toxicity Assays” (薬物評価のための生理的肝細胞培養系の構築を目指した肝微小環境の統合的再現)と題し、薬物性肝障害で重要となる肝組織の代謝区画化(Metabolic zonation)を *in vitro* にて再現することを目的として、培養微小環境の影響に関して系統的に明らかにした研究成果をまとめたもので、全5章からなる。

第1章は緒論であり、まず、医薬品開発プロセスにおける有効性と安全性の評価を概説し、薬物動態評価、中でもヒトにおける肝臓での代謝予測の重要性を述べている。この予測のためには、*in vitro* で培養したヒト肝細胞モデルが最も有効であるものの、現状のモデルの信頼性は必ずしも高くはなく、より生理的な培養モデルが必要であると述べている。生理的な培養肝細胞モデルに求められる重要な達成目標として、肝での薬物による毒性発現に重要な肝小葉内の代謝区画化(Metabolic zonation)の再現を挙げている。この代謝区域化を形成する要因は、肝小葉内で小葉の外側(門脈域)から中心部(中心静脈域)に向かい肝毛細血管(類洞)における酸素やサイトカイン・ホルモン等の濃度勾配であると推察されているが、*in vitro* の培養系にてそれらを明確に明らかとした研究はないと述べている。さらに、生理学的な酸素消費能を実現した上で、実酸素濃度の影響と流れによるせん断応力の影響とを、実際に血流に曝される肝血管内皮細胞(類洞内皮細胞)の共存下にて評価することの重要性を指摘している。これらを踏まえ、生体肝での代謝区画化を形成する微小環境を *in vitro* にて再現すべく、培養工学的条件を系統的に検討するという本研究の目的とその達成のためのアプローチを述べている。

第2章では、静置培養系における培養液中の酸素拡散律速の問題を回避し、細胞の酸素消費量を充足することを目的とした酸素透過膜上での肝細胞の直接培養において、濃度と供給フラックスといった酸素供給条件を変えて、代謝区域化の再現への影響を検討している。まず、酸素透過膜を用いない従来の低酸素フラックス培養では、虚血条件に近い酸素消費しか達成されないのに対して、酸素透過膜上での培養では生体肝と同等の酸素消費が達成され、より生理学的なエネルギー代謝プロファイルが実現されることを報告している。薬物代謝関連の遺伝子発現解析から、従来の低フラックス培養時と比較して、酸素透過膜上での高フラックス条件下で酸素暴露濃度を変えた場合において、代謝区域化がより良く再現されるものの、多細胞からのパラクラインシグナルに依拠する遺伝群には、改善が見られなかったことを述べ、肝を構成する非実質細胞の共存が求められると結論している。

第3章では、第2章で用いた酸素透過膜上での肝細胞培養に、肝細胞と類洞の間に存在し

て肝細胞と密な相互作用を行う類洞内皮細胞を重層化し、代謝区域化再現への更なる影響を検討している。肝小葉内において類洞内皮細胞は、パラクリンシグナルである Wnt/ β カテニンとサイトカインシグナルを肝細胞へと与える主要な細胞である。重層化培養にて曝露酸素濃度を変えると、類洞内皮細胞は酸素濃度の高い小葉外側（門脈域）の培養条件では Wnt 阻害因子と IL-6 を高発現し、酸素濃度の低い中心静脈域の培養条件では Wnt 遺伝子自体を高発現することが観測され、中心静脈付近の低酸素濃度で共培養した肝細胞では、単培養で得られなかったゾーン特異的な活性 β カテニンシグナル伝達を示すことを明らかにしている。この点は第 2 章の肝細胞単培養に比べて大幅に改善されたといえるものの、薬物代謝酵素の発現プロファイルや薬物代謝活性の計測では、生体肝の代謝区画化で見られる明確な薬物代謝を示すには至らず、さらに他の要因を考慮する必要があると結論している。

第 4 章では、第 2 章・第 3 章で構築した酸素直接供給を行う静置共培養培養系に、さらに培養液の灌流操作を加え、類洞内皮細胞にせん断応力を暴露した結果について報告している。せん断応力の付加により、肝細胞からの血管内皮細胞増殖因子の産生が顕著に向上し、類洞内皮細胞との共培養ではそれが速やかに類洞内皮細胞によって消費されるという現象を観測している。この結果、第 3 章の静置共培養で中心静脈付近を模した低酸素濃度にて一定の亢進が見られた Wnt 遺伝子について、更なる顕著な亢進が見られ、第 3 章の静置共培養では明確ではなかった薬物曝露時の代謝酵素活性プロファイルが、より活性生体肝での代謝区域化でのそれに近づいたことを報告している。

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、生理学性をより高めた培養肝組織モデルに向けて、残された課題およびそれらの解決への展望を述べている。

以上、本論文は、特に薬物性肝障害の予測に重要な肝小葉で見られる代謝区域化を再現する培養系の構築に向けて、実消費に着目した酸素供給方法の採用・類洞内皮細胞との共培養・類洞内皮細胞への血流を模した流れの有無といった培養微小環境の寄与を系統的に明らかにし、薬物代謝を中心とした生体肝で見られる代謝区域化を概ね表現することに成功している。また、開発した培養デバイスは、その簡便性とも相俟って、薬物肝障害のみならず環境汚染物質や食品の肝への影響や代謝物の予測等にも極めて有効であり、動物実験の削減や代替にも役立つものである。以上、本論文の成果は、生体組織工学・薬物動態学・毒性学・再生医療等の専門学術分野および化学システム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。