

論文の内容の要旨

論文題目

Efficient formation of cellular aggregates and their uses as cultured-tissue models

(細胞凝集体の効率的形成と培養組織モデルとしての利用)

氏 名 篠原 満利恵

三次元細胞凝集体は、二次元単層培養細胞と比較して生体組織に近い機能を保持することから、疾患メカニズム解明・創薬スクリーニングや毒性評価といった用途において培養組織モデルとしての広範な利用が期待されている。その一方で、生体組織と異なり血管が配備されないため、培養液との物質交換は専ら拡散に依存している。このため、過度の三次元化は細胞の代謝機能をかえって阻害することが十分に考えられる。すなわち、培養組織モデル構築においては、代謝に関わる物質移動の影響を最低限に留めながらも、生物学的効果が十分に得られるよう適切な三次元化を行うことが望ましい。しかしながら、前述のように物質交換性の確保に着目して三次元細胞凝集体の最適化を検討した例は極めて少ない。

本論文は、生体と同等の生理学的応答を示す培養組織モデルの構築を最終目的として、酸素透過性ハニカムマイクロウェルを利用した簡便で効率の良い三次元球状細胞凝集体形成法を確立し、形成組織の代謝反応に着目した適切な組織化の重要性、および共培養による極性輸送の付与可能性を示したもので、全5章からなる。

第1章 緒言

本章では、研究背景と目的を述べている。まず、薬物動態や毒性、広くは動物実験代替といった目的のための細胞アッセイにおける三次元細胞凝集体の位置付けと重要性を概説した後、細胞凝集体の従来形成法や各種試験への利用に関する研究を分類・整理し、その到達点を示している。その上で、既往の研究では、凝集体形成時の酸素供給の確保や細胞アッセイへの利用時における生理学的応答の取得を目的とした適切な組織化、組織の極性再構築による代謝物の輸送現象の再現、に関する検討が不十分であり、当該分野における三次元組織の利用拡大に対して障害となっていることを指摘した。これらの考察に基づき、酸素供給を抜本的に改善した効率的形成法の確立、組織

化と代謝機能の関係の系統的な把握、極性輸送能の付与といった本論文の目的を示した。

第2章 大きさを制御した細胞凝集体の効率的形成

本章では、膵島および肝細胞を対象とした効率的な球状細胞凝集体の形成法確立について述べている。本論文で作製した酸素透過性ハニカムマイクロウェルを利用して、細胞に直接的に酸素を供給することで、従来の方法に比べて高密度で迅速な形成が可能となることを示した。特に、播種面密度を単層培養における飽和面密度の最大8倍に高めても、好氣的な条件下で細胞の自己組織化能をフルに利用可能であることを報告した。さらに、このような利点を持つ酸素透過性ハニカムマイクロウェルを用いた凝集体形成について、細胞の大きさや酸素消費量に基づき、任意の細胞に対して適用可能なマイクロウェルおよび播種条件の設計指針を提案した。

第3章 細胞凝集体の機能の大きさ依存性評価

本章では、細胞凝集体を培養組織モデルとして用いる際に、拡散の影響を最小限に抑えながら、外部から負荷された化学物質に対する生理学的妥当性の高い代謝応答を得られる細胞凝集体の大きさと代謝応答との関連について系統的な検討を行った。本章の検討より、汎用的な単層培養系に比べてより生体に近い機能を維持した凝集体について高い代謝能を得るためには、一定範囲の三次元凝集化が望ましく、その大きさは凝集体中央部への酸素供給を指標とし、生存性のみに着目したものよりも遥かに小さい領域であることが示唆された。

具体的には、第2章で確立した手法で形成した膵島様凝集体のグルコース刺激に対するインスリン分泌、肝細胞凝集体のアルブミン分泌能を計測し、いずれにおいても比較的小さな最適直径領域が存在することを示した。また、肝細胞凝集体については解毒代謝酵素である複数種のシトクロム P450 について活性測定を行い、種類によって適切な直径領域が存在し、それらは比較的小さなものであることを報告した。さらに、肝細胞凝集体を用いたメカニズムの異なる複数種の化学物質の毒性試験を行い、適切な直径領域の細胞凝集体の利用によって、薬物の解毒と代謝活性化の複雑なバランスによって生じる生理学的応答を模倣し得る可能性を示した。以上の検討を通じて、酸素供給のみでなく生理学的な代謝応答取得に着目した最小限かつ適切な細胞の凝集が重要であることを指摘した。

第4章 共培養による組織極性の再現に関する検討

本章では、肝に焦点を当て、肝組織を構成する非実質細胞との共培養によって、肝細胞凝集体に生体肝組織で見られる代謝物の極性輸送現象を部分的に再現できる可能性があることを報告した。すなわち、肝毛細血管である類洞の内皮細胞との共培養凝集体では血管側への輸送が、胆管上皮細胞との共培養凝集体では胆管側への輸送が、そ

れぞれ亢進すること示した。

第5章 総括

本論文を通して得られた成果のまとめとその位置づけについて述べると共に、本論文の成果の応用分野での利用可能性やそれを実現するための研究課題についても述べた

以上本論文は、細胞凝集体形成時における酸素供給の問題を解決することで効率的な新規形成法を確立すると共に、任意の細胞を対象とした場合の形成に対して指針を提案するものである。また、異なる大きさの細胞凝集体の代謝反応について系統的に解析することで、生理学的妥当性の高い応答の取得のためには最適な直径領域が存在し、それは酸素供給のみに着目して決定される最大直径よりも遥かに小さなものであることを示した。本論文の提案する凝集体形成法は、他の細胞種へも広く応用が可能であり、また最小限の適切な組織化の重要性を指摘する実験的知見は、三次元細胞凝集体の利用促進に対して重要な示唆を与えるものであることから、バイオエンジニアリング・生体組織工学・創薬における細胞アッセイ分野の発展に大きく貢献するものと考えられる。