

審査の結果の要旨

氏名 肖文晋

本論文は、Development of hepatocyte culture systems for drug screening through optimization of culture microenvironments（培養微小環境の最適化を通じた創薬スクリーニング用肝細胞培養系の開発）と題し、2つの優れた肝細胞培養系—三次元細胞凝集体培養及び単層培養を基礎とするサンドイッチ培養—について、更なる細胞周りの微小環境の高度化—特に今まで根本的な解決が図られてこなかった培養肝細胞への酸素供給の抜本的改善—の有効性を示したもので、全5章からなる。

第1章は緒言であり、本研究の背景と目的とを述べている。まず、人体における薬物の効果・毒性の発現に支配的な因子について概説すると共に、その中でも肝臓での代謝や胆汁経由の排泄の果たす役割が大きいことを指摘し、その機能を担う肝細胞をできるだけ正常な状態で長期間、培養条件下で維持することの重要性を述べている。次に創薬スクリーニング系としての肝細胞培養系が具備すべき条件について述べ、その観点から上述の2つの培養系の到達点と課題とを総括している。一方、肝細胞培養系における微小環境再現に関する別の問題点として、肝細胞の旺盛な酸素消費能が従来の酸素非透過性のポリスチレン製の培養器における気相からの培養液相中拡散のみでは満たされないことを指摘し、その簡便かつ抜本的な解決方法の一つとして、培養器の底面を酸素透過膜とし、その上に直接細胞を培養する手法の有効性を述べ、本論文の目的とアプローチとを示している。

第2章では、三次元細胞凝集体培養及び単層培養を基礎とするサンドイッチ培養の2つについて、酸素透過膜培養による肝細胞への酸素直接供給の効果を、血漿タンパク質合成能や薬物代謝酵素活性、84種の肝薬物代謝酵素の発現に関する定量的PCR (Polymerase chain reaction)アレイ解析で評価し、いずれの培養系においても、酸素直接供給が機能及びその維持について顕著な効果があることを報告している。また、サンドイッチ培養では三次元細胞凝集体培養に比べて機能維持が良好なこと、後者では胆汁排泄能の評価が本質的に不可能であることから、創薬スクリーニング系としてはサンドイッチ培養がより優れていると結論付けている。

第3章では、酸素透過膜上の単層培養を基礎とするサンドイッチ培養においては、細胞近傍での実酸素濃度を正確に制御可能であることに着目し、通常20%とより生理学的な10%や5%酸素濃度で、血漿タンパク質合成能や薬物代謝酵素活性、肝薬物代謝酵素遺伝子に関する定量的PCRアレイ解析を実施、10%酸素濃度での培養が最も優れていることを示している。特に胆汁排泄の評価に重要な細胞間微小胆管の形成について、より生理学的な10%酸素濃度培養に顕著な効果が見られたことを報告している。さらに、細胞近傍の酸素濃度の直接計測と簡単な拡散消費モデルによる解析を行い、通常酸素非透過性のポリスチレン製培養器での培養と細胞近傍の濃度が同じであっても、酸素透過膜上の細胞の酸素消費速度が8-10倍高いことを見出し、細胞が利用できる酸素量を増やすことで、培養条件下においてもより生体内に近い好氣的な呼吸を行わせることが可能であることを指摘している。

第4章では、より高度な微小環境の再現を目指し、酸素透過膜を用いるサンドイッチ培養にて、酸素肝を構成する他の細胞（非実質細胞）のうち肝毛細血管（類洞）内皮細胞との共培養による更なる機能向上を報告している。まず酸素の十分な供給により、培養器底面で肝細胞層と類洞内皮細胞層とが完全に重層化するという、生体内と同様の高度な共培養状態が初めて達成可能であることを示している。またこのことが、肝細胞の血管側細胞膜と胆汁側細胞膜の明確化（細胞極性の再現）に極めて有効であることを、それぞれに細胞膜部分に特異的な輸送タンパク質の組織学的評価によって示している。

第5章は総括であり、本論文全体のまとめと到達点を示と共に、本研究の成果のヒト肝細胞への適用に関する展望とそこでの課題について述べている。

以上本論文は、酸素透過膜上に肝細胞を直接培養することで、細胞へ暴露される酸素濃度を生理学的な範囲に留めながらも、肝細胞の旺盛な酸素消費能を完全充足することが可能となり、その結果として初めて可能となる高度な共培養の効果と相まって、培養系における肝細胞の機能及びその維持を顕著に向上させ得ることを示している。以上の結論は、生体内の肝細胞が置かれた微小環境をより高度に模倣する完成度の高い肝細胞培養系の開発にとって極めて重要な知見であり、化学システム工学、生体組織工学、創薬のための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。

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。