

氏 名 渡 隆爾  
学位の種類 博士（医学）  
学位記番号 博甲第 10389 号  
学位授与年月 令和 4 年 3 月 25 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
審査研究科 人間総合科学研究科  
学位論文題目 コラーゲンビトリゲルを用いた新規肝細胞長期培養技術による薬物のヒト肝クリアランス予測に関する研究

主査	筑波大学教授	博士（薬学）	本間 真人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	竹越 一博
副査	筑波大学教授	博士（医学）	福田 邦明
副査	筑波大学講師	博士（医学）	三好 浩稔

## 論文の内容の要旨

渡 隆爾氏の博士學位論文は、ヒト肝臓における薬物の代謝クリアランス (CL) を *in vitro* で評価するために、コラーゲンビトリゲルを用いた新規の肝細胞長期培養技術を開発し、ヒトに投与した時の肝代謝 CL の予測性について既存薬剤を用いて検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

著者は、従来の肝細胞評価系では、数日の短期培養しか行なえず、薬物代謝酵素として最も重要な cytochrome P450 (CYP) の活性が培養開始から数時間で低下する課題の克服に着目して研究を立案している。医薬品の臨床試験の実施では、予め医薬品候補化合物のヒト肝 CL を予測することが重要であり、その評価系として生体内の肝臓に匹敵する肝機能を長期間維持できる新しい肝細胞培養法の開発が求められている。著者は新規培養基材であるコラーゲンを高密度に圧縮して精製したコラーゲンビトリゲルを活用し、従来法よりも高い肝代謝能（機能）を有し、その活性を長期間維持できる新規培養法の開発を目的として以下の実験を行なっている。

### 対象と方法：

ヒト肝キメラマウスから単離した新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells) を、新規培養基材であるビトリゲル膜および従来のコラーゲンコーティングプレート上に播種し、3 週間の培養を行い、肝特異的機能を評価している。評価項目は、肝臓で発現している主要な 5 つの CYP 分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A) の活性および肝機能の指標であるアルブミン分泌と尿素合成能、および細胞形態の観察である。さらに、ビトリゲル培養において肝機能が向上する培養 14 日目に、基質薬剤のヒト肝 CL 予測精度を検証するため、CYP の典型基質である 22 化合物の *in vitro* ヒト肝 CL を求め、臨床試験で得られた *in vivo* 肝 CL (既存データの non-renal CL) との相関を評価している。同様の評価を CYP 以外の代謝酵素 (Non-CYP) の基質薬剤である 16 化合物 (アルデヒドオキシダーゼ、グルクロン酸転移酵素などの基質薬剤) でも実施し、ビトリゲル培養による CL 予測の精度を検証している。

### 結果：

著者は、PXB-cells をビトリゲル膜上に播種した場合、3 週間の長期培養が可能であり、さらに従来法と比較して肝臓に発現する主要な 5 つの CYP 分子種の代謝活性が培養開始後 14 日～17 日まで上昇することを見出している。また、毛細胞胆管様構造の形成を含む細胞の形態学的特徴は培養開始 21 日まで維持し、肝機能の指標であるアルブミン分泌や尿素合成能も 14 日間の培養において維持されること

を確認している。これらの知見から著者は、ビトリゲル培養による新鮮ヒト肝細胞について少なくとも培養開始2週間までは肝機能が維持され、種々の評価が可能と考え、CYPとnon-CYPの基質薬剤の肝CLを*in vitro*で検討している。

CYPの典型的な基質薬剤である22化合物を用いた検討において、著者はビトリゲル培養法により得られた*in vitro*ヒト肝CLが臨床試験でのnon-renal CLと正の相関関係を示し、non-renal CLの予測精度の評価では、18化合物(検討した化合物の82%)が、臨床試験との乖離が3倍以内であることを明らかにしている。同様にNon-CYP基質化合物(16化合物)の予測精度に関しても、ビトリゲル培養法により得られた*in vitro*ヒト肝CLと臨床試験でのnon-renal CLとの乖離が3倍以内の化合物が約70%であることを確認している。

#### 考察:

本研究において著者は、臨床試験におけるヒト肝CL(non-renal CL)の予測精度の向上を目指して、PXB-cellsを用いたビトリゲル培養法により、肝機能の向上および医薬品候補化合物に対するヒト肝CLの評価のためのCYP活性の向上に取り組んでいる。その結果、ビトリゲル培養法を新鮮ヒト肝細胞に適用して、従来法と比較して長期間(培養開始後2週間以上)にわたり培養可能であることを見出している。さらに、毛細胞胆管様構造の形成を含む細胞形態と肝機能(アルブミン分泌と尿素合成能)を維持すること、各種CYP活性を賦活化することに成功し、薬物代謝を評価するための各種薬剤のヒト肝CLを求める実験系に適用できることを明らかにしている。

これまで、肝細胞の単層培養の課題を克服するために、肝細胞を3次元化するスフェロイドや肝細胞と他細胞との共培養システムによる複雑な培養モデルが構築され、提案されていた。しかし、これらの培養系を医薬品候補化合物の代謝評価系に用いるには、コストに加えて系の複雑性に起因する再現性が課題であった。これに対して、著者が適用したビトリゲル培養法は、ビトリゲル膜に肝細胞を播くのみで簡便な培養法であり、CYP活性などの肝機能を2週間以上維持できる点、また、CYP基質薬剤以外にグルクロン酸抱合化酵素などで代謝されるNon-CYP基質薬剤や低CL型化合物の評価にも応用できる可能性が示された点で有用性が高いと考察している。一部の薬剤において本評価系で求めた肝CLが臨床試験でのnon-renal CLと大きく乖離するが、その要因として、著者は、高い血漿タンパク結合率と肝臓への取り込みに関わるトランスポーターの影響を考察しており、これらは、別途その特徴を評価する実験により、補正する必要性を指摘している。

本研究により構築したビトリゲル培養法は、肝機能を長期間維持することができるため、短期培養系では検出が困難なヒト特有の代謝物の検出・同定や、反応性代謝物による肝毒性の研究への応用も期待されると述べられている。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

渡氏が開発したビトリゲル培養法は、従来のコラーゲンコーティング単層培養法では困難であったCYP活性を含む肝特異的機能を2週間以上維持する優れた*in vitro*評価系であり、創薬研究に必須であるCYPやNon-CYP基質化合物の代謝研究においてヒト肝CLの予測精度の向上が期待できる点で有用であると評価される。

令和3年12月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。