

氏 名 露久保 淳

学位の種類 博士 (医科学)

学位記番号 博 甲第 10433 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 (昭和28年4月1日文部省令第9号)

審査組織 グローバル教育院

学位論文題目 Construction of Floating Cell Spheroid Culture System Using Hydrogel Membrane as Culture Scaffold for Expression of Liver-specific Function

(肝特異的な機能発現を目指したハイドロゲル膜を足場とする自立浮遊スフェロイド培養系の構築)

(職名)

(学位)

(氏名)

主査	筑波大学教授	博士(工学)	市川 創作
副査	筑波大学教授 (協働大学院)	博士(工学)	金森 敏幸
副査	筑波大学教授 (協働大学院)	博士(工学)	杉浦 慎治
副査	筑波大学教授 (協働大学院)	博士(工学)	須丸 公雄

論文の要旨

第一章で著者は、本研究の背景および目的について述べている。医薬品開発における前臨床試験では、主に実験動物を用いて候補化合物の安全性や有効性が評価されている。しかし、近年の動物愛護運動の高まりや、種差による薬物応答性の違いといった課題から、動物試験を代替する取り組みが強く求められている。この様に前臨床試験において動物試験が削減される一方で、その後のヒト臨床試験の段階で開発中止となった場合の莫大な費用や時間的損失を抑制するためには、高い信頼性を持って薬効や安全性をヒト臨床試験に外挿するための技術開発が必要とされている。

近年の幹細胞研究や細胞培養技術の進展に伴い、ヒト細胞を用いた *in vitro* 評価(細胞アッセイ)が注目されている。種差の問題がある動物の代わりにヒト細胞を用いることができるため、ヒト特異的な機能評価が期待できる。こうしたアッセイに用いる細胞培養系、特に医薬品の代謝機構や安全性評価に重要な肝細胞培養において、ポリスチレンからなる硬い樹脂基材上での単層培養が従来用いられてきたが、培養環境が生体内環境とは大きく異なるため、薬物代謝といった肝細胞の特異的な機能が十分に発現されない課題が指摘されている。そこで、肝特異的な機能発現を目指した培養系の構築に向けて、著者はハイドロゲルからなる培養足場に着目した。

ハイドロゲルを培養足場として用いた研究は、物質移動の優位性や生体組織に類似した柔軟性といった利点から、これまでも数多く行われてきたが、そのほぼ全てが基材上に固定されたハイドロゲル層を用いたもので、その利点が十分には発揮されていない。そこで著者は、培地中で自立的に浮遊するやわらかなハイドロゲル膜である自立浮遊ハイドロゲル膜を培養足場として用いた、新規細胞スフェロイド培養系の構成を着想した。著者は、従来一般的な単層培養系と比較して、この自立浮遊スフェロイド培養系が、細胞への酸素・栄養分供給を向上させ、足場の柔軟性を供与するとともに、3次元的な細胞-細胞間相互作用を更新させうることで、またそれにより生体内により近い培養環境を通じて肝特異的機能を高発現させることが可能であると論じている。本論文で著者は、フォトリソグラフィ技術を利用して、肝がん由来株化細胞 HepG2 からなる自立浮遊スフェロイド培養系を構築し、細胞におよぼす影響を評価した。

第二章で、著者は、自立浮遊ハイドロゲル膜上での単層培養系の構築について記述している。犠牲層である poly acrylic acid (PAAc)層とその上に形成された hydroxypropyl cellulose (HPC)層を、それぞれ異なるパターンに沿って光架橋した後、PAAc 層のみを NaOH 水溶液で加水分解除去することにより、HPC からなる半立体ハイドロゲル構造体を得た。各層それぞれに対応する照射パターンを変更することにより、ゲルの架橋域および基材からの剥離域をそれぞれ独立に制御し、任意の形状の構造体が形成できることを示した。さらに、ゲル膜表面に poly (styrene-co-maleic anhydride)をコートすることにより、HepG2 を含む様々な細胞が膜表面に接着、培養できることを実証した。

第三章で、著者は、目的の自立浮遊スフェロイド培養系を構築するため、大面積の自立浮遊ハイドロゲル膜の簡便な作製法および、ゲル膜に対して細胞接着性を局所付与する手法について検討した。PAAc 層の上に架橋 HPC を作製後、犠牲層の PAAc 層のみを水で溶解除去することにより、PAAc のコート域でのみ架橋 HPC を基材から剥離・膨潤させ、自立浮遊ハイドロゲル膜を得る条件を特定した。また、poly [(methyl methacrylate)-co-(7-(4-trifluoromethyl) coumarin methacrylamide)] (PCMM)を架橋 HPC 層表面にコート後、パターン照射で光架橋させてドット状の細胞接着域を形成することで、HepG2 からなる自立浮遊スフェロイド培養系の構築手法を確立した。スフェロイドの大きさおよび間隔は、PCMM への照射パターンを変えることで制御可能なことを示した。

第四章で、著者は、HepG2 における呼吸代謝および肝特異的な薬物代謝酵素に関する遺伝子発現量の評価について記述し、構築した自立浮遊スフェロイド培養系が細胞におよぼす影響を論じている。培養基材をシーソーのように交互に傾斜させることで培地を対流させ、細胞への酸素・栄養分供給を促進させた。その結果、固定膜上と比較して浮遊膜上では、細胞のグルコース消費量に対する乳酸産生量のモル分率が低下し、薬物代謝酵素 *CYP1A2* の mRNA 発現量が上昇することを明らかにした。これは、浮遊膜上で細胞への酸素供給性が向上され、好気呼吸が活発化したためと考察されている。さらに、単層培養と比較してスフェロイド培養で *CYP1A2* の mRNA 発現量が上昇した結果から、3次元的な細胞-細胞間相互作用の亢進効果が示唆された。

第五章には結論が記述されている。本論文で著者は、自立浮遊スフェロイド培養系を構築する手法を確立し、本培養系が HepG2 の肝特異的機能を向上させることを明らかにした。

審査の要旨

【批評】

本論文において著者は、肝由来培養細胞の肝特異的機能発現に有効とされる酸素・栄養分供給、柔軟足場および集塊形成の3条件を備えた新規培養系の構築とその効果について報告した。高分子反応、細胞接着制御およびフォトリソグラフィの技術を駆使して、自立浮遊ハイドロゲルからなるパターン化培養足場の構築手法を確立し、肝がん由来株化細胞を用いて、自立浮遊スフェロイド培養系を構築することに成功した。交互傾斜による培地対流促進下で培養し、その特性を解析した結果、細胞の好気呼吸と薬物代謝酵素発現の有意な向上を確認した。構築された新規培養系は、静置培養ベースの従来技術と十分な互換性を有する点において工学的にも重要であり、ヒト細胞活用および動物実験代替の進展が望まれる医工学分野において、有用な要素技術および基礎的知見を提示する成果として高く評価されるものである。

【最終試験の結果】

令和4年1月17日、専門委員会において、著者に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、専門委員全員が合格と判定した。

【結論】

上記の学位論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（医科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。