

<h2>学 位 論 文 要 旨</h2> <p>(Summary of the Doctoral Dissertation)</p>	
学位論文題目 (Dissertation Title)	The study on proliferation, differentiation and maintenance of functional expressions of human hepatocytes <i>in vitro</i> (ヒト肝細胞の <i>in vitro</i> における増殖、分化、機能発現メカニズムに関する研究)
氏 名(Name)	山崎 ちひろ
<p>肝臓を構成する肝細胞は、様々な物質の合成や代謝によって生体の恒常性維持に主要な役割を担っており、創薬研究にとっても必須の材料である。しかし、ヒト肝細胞は脳死検体や切除肝から得られるため供給源が限られているだけでなく、<i>in vitro</i> 培養条件下では増殖能や薬物代謝能が著しく低く、創薬研究を進めるボトルネックとなっている。本研究は培養下で高い薬物代謝活性を維持できるヒト肝細胞を多量に増殖させる手法の確立を目的としており、以下の項目から構成される。</p> <p>(1) ヒト肝細胞を <i>in vitro</i> で大量に増やす方法の開発 (J Hepatol, 2006)</p> <p>肝臓を構成する肝細胞の一部の細胞が、<i>in vitro</i> において増殖能を示す事は知られていたが、このような細胞を大量に増やす培養法はこれまでに確立されていなかった。本研究では様々な年齢(生後9ヶ月から72才)のドナー由来のヒト肝組織から分離された肝細胞から、コロニーを形成して増殖する細胞を見出し、colony forming parenchymal hepatocyte、CF-PHと命名した。CF-PHの出現頻度は分離肝細胞画分の0.1%以下だが、最大で7回の継代が可能で、細胞数を1ヶ月で約10倍に増やすことができた。培養日数の経過とともに、培養細胞の密度が高い領域が生じ、そこでは成熟肝細胞の形質発現が見られた。CF-PHをより高密度で培養するため、3次元的基質を使ったスフェロイド培養を試みたところ、増殖過程で低下していたCF-PHの肝機能発現(アルブミン分泌能、薬物代謝関連遺伝子発現)は、培養前の肝細胞に近いレベルにまで回復した。以上の結果から、CF-PHの高密度培養によって、成熟肝細胞としての形質、機能を示すヒト肝細胞が得られることが示された。しかしながら、ヒト肝組織から得られるCF-PHの数が非常に少ないことから、高機能ヒト肝細胞を大量に得る手法としてはまだ不十分であった。このことから、ヒト肝細胞をより効率的に大量調製できる別のツールが必要であると考えられた。</p> <p>(2)-1 ヒト肝細胞キメラマウスから分離した肝細胞の <i>in vitro</i> 薬物代謝能評価 (Drug Metab Pharmacokinet 2010)</p> <p>筆者らのグループでは、上述した <i>in vitro</i> でのヒト肝細胞の増殖法の検討とは別に、<i>in vivo</i> でヒト肝細胞を増殖させる方法も確立している(文献1、2)。肝障害を持つ免疫不全遺伝子組換えマウス(uPA/SCIDマウス)に、ヒト肝細胞を脾臓経由で肝臓に移植すると、移植されたヒト肝細胞はホストマウス肝臓中で盛んに増殖し、最終的にはヒト肝細胞によって70%以上で置換された肝臓を有する「ヒト肝細胞キメラマウス」が作成される。移植されたヒト肝細胞は宿主マウスの肝臓中で1000倍以上も増殖しており、この増殖した細胞がヒト肝細胞としての性質を維持していれば、ヒト肝細胞をより効率的に大量調製できる別のツールとして、ヒト肝細胞キメラマウスの利用が有用ではないかと考えた。そこで、筆者らのグループが作成したキメラマウス肝臓から得られたヒト肝細胞の薬物代謝能を、第I相薬物代謝酵素活性(チトクロームP450, CYP7分子種)を指標として調べた。その結果、いずれの酵素もキメラマウス作成に用いたドナー肝細胞(凍結肝細胞)と同等以上の活性を示した。キメラマウス肝細胞には、ホストマウス由来の肝細胞も数%含まれる</p>	

ことから、マウス細胞特異抗体を用いて、マウス由来細胞を除去し、除去前の酵素活性レベルとの比較を行った結果、キメラマウス肝細胞に混入するマウス肝細胞の酵素活性レベルは、結果に影響しないと考えられた。また、このケトプロフェン代謝試験において、凍結融解したキメラマウス肝細胞では、未凍結肝細胞と比較して、生成される代謝物量が少ない傾向にあった。このことから、薬物代謝評価において、信頼性の高いデータを得るためには、未凍結肝細胞を用いる必要があると考えられた。以上の結果から、ヒト肝細胞と同等の薬物代謝能を持ち、未凍結の状態で作ることができるキメラマウス肝細胞は、医薬品開発研究において、ヒト肝細胞の代替となる有用な肝細胞である可能性が示唆された。

(2)-2 キメラマウス肝細胞を用いた高機能ヒト肝細胞長期培養系の確立 (PLoS One 2020)

次にキメラマウス由来ヒト肝細胞を用いて肝機能をより長期にわたって維持できる培養系を検討した。細胞密度の高い領域のCF-PHが成熟肝細胞の形質を強く発現する。そこで、キメラマウス肝細胞を高密度条件下で培養する事で、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター活性を含む様々な肝機能が、3週間にわたり安定的に維持される事がわかった。さらに、高密度条件下で肝細胞の機能が維持されるメカニズムの解明を試みた結果、薬物代謝関連遺伝子の発現を制御する転写因子(核内受容体等)の高発現が肝細胞の機能維持に深く関与していることが示唆された。

以上の結果より、正常な機能を備えたヒト成熟肝細胞を、創薬研究に利用できる量で供給するための重要な培養条件を明らかにした。

参考文献

1. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004;165(3):901-12. Epub 2004/08/28. doi: 10.1016/s0002-5294(10)63352-4. PubMed PMID: 15331414; PubMed Central PMCID: PMC1618591
2. Tateno C, Kawase Y, Tobita Y, Hamamura S, Ohshita H, Yokomichi H, et al. Generation of novel chimeric mice with humanized livers by using hemizygous cDNA-uPA/SCID mice. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142145. doi: 10.1371/journal.pone.0142145. PubMed PMID: 26536627.

学位論文審査の結果及び試験、試問の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	山崎 ちひろ
審査委員	主 査： 村上 柳太郎
	副 査： 岩尾 康宏
	副 査： 祐村 恵彦
	副 査： 明石 真
	副 査： 堀 学
論文題目	The study on proliferation, differentiation and maintenance of functional expressions of human hepatocytes <i>in vitro</i> (ヒト肝細胞の <i>in vitro</i> における増殖、分化、機能発現メカニズムに関する研究)
<p>【論文審査の結果及び試験、試問の結果】</p> <p>肝臓を構成する肝細胞は、様々な物質の合成や代謝において主要な役割を担っており、創薬研究にとって必須の材料だが、ヒト肝細胞は供給源が脳死検体などに限られており、創薬研究のボトルネックとなっている。本研究は培養下で高い薬物代謝活性を維持できるヒト肝細胞を多量に増殖させる手法の確立を目的としており、以下の結果が得られた。</p> <p>(1) ヒト肝細胞を <i>in vitro</i> で大量に増やす方法の開発</p> <p>本研究では様々な年齢のドナー由来のヒト肝組織から分離された肝細胞から、コロニーを形成して増殖する細胞、colony forming parenchymal hepatocyte (CF-PH) を見出した。CF-PH の出現頻度は低いですが、1ヶ月の培養で細胞数をで約 10 倍に増やすことができた。培養日数の経過とともに、培養細胞の密度が高い領域が生じ、そこでは成熟肝細胞の形質発現が見られた。さらに、CF-PH をより高密度で培養するため、3 次元の基質を使ったスフェロイド培養を試み、肝機能発現を培養前の肝細胞に近いレベルにまで回復させることができた。以上の結果から、CF-PH の高密度培養によって、成熟肝細胞としての形質、機能を示すヒト肝細胞が得られることが示された。</p> <p>(2)-1 ヒト肝細胞キメラマウスから分離した肝細胞の <i>in vitro</i> 薬物代謝能評価</p> <p>上記の研究で得られる CF-PH の数が非常に少なく、実用的には不十分であったことからヒト肝細胞をより効率的に大量調製できる別の手法を検討した結果、発表者が所属するグループが開発した「ヒト肝細胞キメラマウス」がヒト肝細胞の大量調整に利用できることがわかった。この手法では肝障害を持つ免疫不全遺伝子組換えマウス (uPA/SCID マウス) に、ヒト肝細胞を脾臓経由で肝臓に移植することにより、最終的にはヒト肝細胞によって 70% 以上で置換された肝臓を有するキメラマウスが作成される。本研究では、キメラマウス肝臓から得られたヒト肝細胞の薬物代謝能を、第 I 相薬物代謝酵素活性 (チトクローム P450, CYP7 分子種) を指標として調べた。その結果、キメラマウスから得</p>	

られるヒト肝細胞はヒト肝細胞と同等の薬物代謝能を持つことが示され、医薬品開発研究において、ヒト肝細胞の代替となり得ることが示された。

(2)-2 キメラマウス肝細胞を用いた高機能ヒト肝細胞長期培養系の確立

キメラマウス由来ヒト肝細胞を用いて肝機能を維持できる長期培養系を検討した結果、高密度条件培養によって薬物代謝酵素や薬物トランスポーター活性を含む様々な肝機能が、3週間にわたり安定的に維持される事がわかった。高密度条件下では薬物代謝関連遺伝子の発現を制御する転写因子（核内受容体等）が高発現しており、それによって肝細胞の機能が維持されると考えられる。以上の結果より、正常な機能を備えたヒト成熟肝細胞を、創薬研究に利用できる量で供給するための重要な培養条件が明らかとなった。

本研究で得られた知見の一部は、既に実用化されており、医薬品研究に用いられるヒト肝細胞の培養法として世界でもっとも広く利用されており、その有効性を裏付けるものである。

公聴会における主な質問内容は、*in vitro* 培養のメリット、培養中の細胞数の変化、キメラマウスから得られるヒト肝細胞へのマウス肝細胞の混入率などについてであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士（学術）の論文に十分値するものと判断した。

試験および試問として3名の副査から以下の内容の課題が課された。

1. 肝細胞の機能の指標となる遺伝子発現や酵素活性について。
2. ヒト由来の細胞を用いたキメラ動物作製法とその利用について。
3. 肝細胞を *in vitro* 培養する際の問題や困難さ、他のヒト細胞での工夫について。

これらの試問に対しレポート形式による解答がなされ、口頭試問においても満足のいく回答がなされた。語学については、発表者を筆頭著者とする英文論文、および発表者を著者とする英文論文が多数発表されており、十分な外国語能力を有するものと判断された。また、論文内容および審査会、公聴会での試問応答など総合的に判断して、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記の通りである。（関連論文 計3編）

- (1) C. Yamasaki, C. Tateno, A. Aratani, C. Ohnishi, S. Katayama, T. Kohashi, H.Hino, H. Marusawa, T. Asahara and K. Yoshizato: Growth and Differentiation of Colony-forming human hepatocytes *In vitro*. *Journal of hepatology* 2006, 44: 749-757.
- (2) C. Yamasaki, M.Kataoka, Y. Kato, M. Kakuni, S. Usuda, Y. Ohzone, S. Matsuda, Y. Adachi, S. Ninomiya, T. Itamoto, T. Asahara, K. Yoshizato and C. Tateno: *In vitro* evaluation of cytochrome P450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2010, 25: 539-550.
- (3) C. Yamasaki, Y. Ishida, A.Yanagi, Y. Yoshizane, Y. Kojima, Y. Ogawa, Y. Kageyama, Y. Iwasaki, S. Ishida, K. Chayama, and C. Tateno: Culture density contributes to hepatic functions of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers: Novel, long-term, functional two-dimensional *in vitro* tool for developing new drugs. *PLoS One*. 2020 Sep 11;15(9):e0237809. doi: 10.1371/journal.pone.0237809. eCollection 2020. PMID: 32915792.