

博士論文審査報告書

論文題目

Enhancement of Hepatocellular Functionality and Cytotoxicity In-vitro by Nanostructure and Chemical Modification of Materials That Mimic In-vivo Environment

体内を模倣した材料のナノパターン形成とその化学
飾による肝細胞機能と毒性応答の向上

申請者

Shimaa Abdelazim Abdellatef	ABDELAL EEM
アブデラリーム	シーマ アブドア ジム アブドエル ラティフ

ナノ理工学専攻 ナノバイオ材料研究

2014年 7月

肝細胞は医薬品の毒性・代謝試験などに有用である。したがって、創薬の分野では肝細胞を使った多くの試験が実際に行われている。しかし、生体から分離した初代培養肝細胞は高価で個体差があり、さらに、一旦試験管内で培養すると速やかにその機能が低下する欠点がある。また、癌細胞由来の肝細胞株は安価で扱いやすいというメリットがあるが、その機能は実際の肝細胞からは遠くかけ離れたものである。したがって、試験管内で高い機能を保持したまま肝細胞を培養する技術が確立されれば、医薬品開発などに大きなインパクトが与えられることは疑いの余地がない。

一方で、試験管内で培養する細胞が生体内に比べ機能が低下するのは何も肝細胞に限ったことではない。この機能低下の要因の一つは生体内と試験管内の細胞外の環境の違いによると考えられている。特に細胞は体内では細胞外マトリックス(ECM)というタンパク質と糖質からなる複雑なナノ構造をもった複合体に囲まれており、その物理的な性質(ナノ構造, 周期性, 柔らかさなど)および化学的性質(細胞接着分子, 細胞増殖因子など)が細胞活性を調節する重要な環境因子とされている。したがって ECM が持つこれらの特徴の中でも重要と思われる要素を抽出して試験管内で再構築することで、複雑な生体内における ECM 環境を構成的に理解することにもつながる。

これらを踏まえ、申請者は以下の仮説を立てて学位研究に臨んだ。

「ナノテクノロジーでこの ECM の性質を模倣すれば肝細胞の機能を更新して細胞毒性に関する応答も向上する」

この仮説は先述したように、医薬品開発に供しうる肝細胞培養系を探索するという工学的な視点と、生体における ECM 環境を構成的に迫るといふ理学的視点を兼ね備えたものと言える。

申請者は ECM の物理的性質を模倣する目的で電子線描画法にてナノパターンを作成した。ナノパターンの表面は細胞との親和性を考慮してチタニアの薄層で覆った。このナノ構造を有した表面上で肝細胞を培養し、その機能と細胞毒性応答を検証した。また、ECM の化学的性質を模倣する目的で RGD (アルギニン、グリシン、アスパラギン酸の3つのアミノ酸配列からなる細胞接着分子の断片ペプチド) を酵素法で上記のナノ構造表面に固定化し、肝細胞の機能を生化学・細胞生物学的に検証した。結果的に上記の仮説が正しいことをこの博士論文で実証し、このナノパターン上で培養した肝細胞の抗がん剤であるシスプラチンの毒性応答を平面での培養と比較することにより検証した。

本論文は全5章で構成されている。以下にその概要を述べる。

第一章では研究の背景と仮説に関して述べている。まず、肝細胞の体内と試験内での機能の違いについて述べている。肝細胞は生体内では複雑なナノ

構造を持った ECM に接している。一方、試験管内では細胞は平面状のフラスコに接している。そこで、ECM 成分をフラスコに固定化して肝細胞の機能を向上させようと試みた。しかし、肝細胞の機能は上昇するものの、生体内の ECM ナノ構造を保持したまま固定化することは難しく、期待する結果は得られなかった。そこで申請者は次のようなアプローチで肝細胞の機能の向上を目指した。ECM の主成分であるコラーゲンは 260nm-410nm の幅のライン状のナノ構造を持った繊維構造をしている。このナノ構造をナノテクノロジーを用いて模倣すれば、肝細胞の機能や毒性応答が向上すると考えられる。

第二章ではナノパターンの大きさと形が細胞の機能に与える影響に関して検討している。ライン状のナノパターンの幅が異なるナノ構造上に細胞を播種し肝細胞の機能マーカーであるアルブミンの発現量を蛍光免疫染色法で検討した。その結果、240 nmの幅のライン状で培養した肝細胞は平面構造上で培養した肝細胞より 6 倍高くアルブミンが発現していることが明らかになった。ラインの幅が大きくなるほど、アルブミンの発現は低くなった。また、同じ 240 nmの幅のナノ構造でライン状と島状のナノパターンを比較した。その結果、ライン状のナノ構造は島状に比べ約 2 倍高いアルブミンの発現量を示した。作成したライン状のナノ構造では 240 nm幅が一番 ECM の構造に近かった。さらに、ナノ構造と細胞の形態変化を検討する目的で、240 nmの幅のライン状のナノ構造上の細胞を SEMにて観察した。細胞はラインにそって接着していた。その結果、この形態変化と細胞の機能化に何らかの因果関係があることが示唆された。以上のように、申請者はナノテクノロジーで ECM の物理的性質を模倣することで、肝細胞の機能が向上することを初めて明らかにした。

第三章では ECM の物理的性質に加え化学的性質を模倣することで、肝細胞の機能が向上するかを明らかにする目的で、RGD を酵素法でナノ構造表面に固定化し、肝細胞の機能を検証した。その結果、240 nmの幅のライン状の材料に RGD を固定化した材料上で培養した肝細胞は平面で培養した場合と比較して約 10 倍アルブミンの発現量が増加した。従来の研究では、RGD の固定化で細胞の機能が向上することは知られていたが、本研究では ECM の物理的性質に加え、化学的性質を模倣することにより、さらに肝細胞の機能が向上することを初めて明らかにした。

第四章では、ECM の性質を模倣したナノ構造材料が医薬品の細胞毒性試験に有用かを検証した。抗がん剤として実際に臨床で使用されているシスプラチンの細胞毒性を 240 nm の幅のナノ構造でライン状と平面状の材料で培養した肝細胞株を用いて比較した。その結果、240 nm の幅のナノ構造でライン状の材料上で培養した細胞は平面状の材料上で培養した細胞より約 2 倍細胞毒性応答が向上した。この研究はナノパターンと細胞毒性応答の関係を初めて明らかにしたものである。これによって ECM の性質を模倣したナノ構造

材料が医薬品の細胞毒性試験に有用であることが実証された。また、申請者はこの毒性の向上の分子メカニズムを明らかにする目的でシスプラチンの取り込みに関係する受容体、CTR-1 の発現を比較した。その結果、240 nm の幅のナノ構造上の肝細胞は平面上と比較して CTR-1 の発現が上昇していた。この CTR-1 の発現上昇がシスプラチンの毒性向上に関係があることが示唆された。

第五章では、本研究の成果を総括および考察すると共に、将来の研究に対する方向性について述べている。本研究において申請者が立てた「ナノテクノロジーで ECM の性質を模倣すれば肝細胞の機能を更新して細胞毒性に関する応答も向上する」という仮説は正しいことが明らかになったといえる。さらに、今回検討していない ECM の性質を模倣すれば肝細胞の機能は体内と同等に近い機能が得られるだろうと考察している。また、このナノ材料をさらに改良すれば、細胞毒性試験のみならず医薬品の薬物代謝試験にも応用可能であろうと考察している。

以上、本研究において申請者は生体内のナノ構造をナノテクノロジーを用いて模倣することにより肝細胞の機能や毒性応答が向上するということを初めて明らかにしている。このユニークな仮説は生化学や細胞生物学の分野の知見とナノテクノロジーを融合したものである。ナノ構造と細胞の相互作用をこのような視点で検討した例は世界的に見ても皆無であり、この分野の道を開く非常に独創的な研究である。本研究で得られた結果はより機能的なナノ・バイオ材料の設計に有用な知見となるであろう。今後、この成果は創薬支援研究分野のみならず、ナノ材料の医学・生物学分野に多大な貢献をなすものであり、今後のナノバイオ・ナノメディスン分野の進展に大きく寄与すると考えられる。本研究は理学、特に生化学や細胞生物学分野と工学的の分野の融合によりなされたものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2014 年 7 月

審査員

(主査) 早稲田大学客員教授	博士 (薬学) 東邦大学	谷口 彰良
早稲田大学教授	工学博士 東北大学	庄子 習一
早稲田大学教授	博士 (工学) 早稲田大学	谷井 孝至
(独) 物質・材料研究機構	工学博士 早稲田大学	知京 豊裕
(独) 物質・材料研究機構	博士 (理学) 東京大学	中西 淳