

氏	名	高橋 亮介
学 位 の 種 類		博士 (理学)
報 告 番 号		乙第302号
学 位 授 与 年 月 日		2014年 3月31日
学 位 授 与 の 要 件		学位規則 (昭和28年4月1日文部省令第9号) 第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目		Three Dimensional Cell Culture Using Nanopillar Plate (ナノピラープレートによる3次元細胞培養)
審 査 委 員	(主査)	花井 亮 真島 恵介 後藤 聡

I. 論文の内容要旨

生体に近い活性と機能を保持できる細胞培養法として、培養器材表面に極微細な突起（ナノピラー）が配列されたナノピラープレートの評価した。ナノピラープレートにラット初代肝細胞を培養したところ、3次元凝集体（スフェロイド）が形成された。中心部の細胞が壊死しないスフェロイド（直径 50-100 ミクロン）が最も多く形成されたのは、ナノピラープレートのピラーの直径が 2.0 ミクロンのときであり、予め塗布する I 型コラーゲン濃度は 100 ng/mL が至適であった。アクチンと E-カドヘリンを指標にした免疫染色の結果から、スフェロイドは生体の肝臓組織に近い構造を持つことが明らかとなった。また、透過型電子顕微鏡観察により、スフェロイドには微絨毛のある胆管構造が出来ていることが分かり、蛍光顕微鏡観察により、スフェロイドの毛細胆管の排泄能が示された。これらの結果から、得られたスフェロイドは、組織学的、かつ、機能的に生体肝臓に近いことを示された。さらに、スフェロイドでの遺伝子発現を、半定量的リアルタイム PCR、および、マイクロアレイで解析した。その結果、全体のプロファイルは、スフェロイドとサンドイッチ培養による細胞が最も類似しており、スフェロイドは平面培養細胞よりも肝臓に近いことが示された。また、肝臓での低分子の代謝や輸送に関連した遺伝子群の発現も同様の傾向を示した。

次に、新しいデザインのナノピラープレートであるホローナノピラープレートを開発した。ホローナノピラープレートはプレートウェル内に直径 200 ミクロン、深さ 80 ミクロンの仕切り構造（ホロー）を有し、ホロー中心部の直径 80 ミクロンの円状エリアにのみピラーが配置されている。これにより、サイズのばらつきが少ない、小さなスフェロイドを得ることができた。得られた個々のスフェロイドの呼吸活性を評価するため、走査型電気化学顕微鏡によって、培地中の溶存酸素濃度分布を測定した。その結果から、直径 70 ミクロン以上のスフェロイドでは嫌気呼吸も行われていることが示唆され、この示唆は、嫌気呼吸の指標である遺伝子とその大きさのスフェロイドで発現していたことから支持された。以上から、走査型電気化学顕微鏡によって、非侵襲的に個々のスフェロイドの品質を評価できることが示された。

II. 審査結果の要旨

多細胞生物の体内で細胞を研究することは非常に困難であり、体外に細胞をとりだして培養する（細胞培養）技術は非常に重要である。現在の細胞培養の方法は接着系と浮遊系のどちらかである。臓器を形成する細胞はお互いに接着して3次元の構造をとっているが、通常の接着系の方法で培養しても容器表面に2次元に接着するだけで、しかも、本来の細胞機能を急速に失ってしまう。そこで、近年では、再生医療のための臓器形成などを目標とし、3次元に細胞を培養する方法が開発されつつある。

申請者は、簡便に3次元細胞培養を達成するための方法として、容器表面にナノピラー構造をもつもの（ナノピラープレート）に着目し、肝臓細胞が3次元凝集体（スフェロイド）を作ることを示した。この着眼は非常に高く評価できる。得られたスフェロイドが、実際に、肝臓細胞としての機能を保持していることを、光学顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察、遺伝子発現解析によって確認したが、これは学術的に重要であるとともに、肝臓での薬物代謝を培養細胞によって評価するという実用性の点でも重要である。

さらに、微細な区画をもつナノピラープレートを考案して、スフェロイド中の細胞数をコントロールできることを示した。さらに、個々のスフェロイドの呼吸活性を電気化学的に測定することに成功し、培養中のスフェロイドの品質を非侵襲的に評価できることを示した。このことは高く評価できる。

本研究は、微細表面加工、細胞培養、電気化学測定という、異分野の技術を有効に組み合わせ、細胞の培養と評価の新しいシステムを創出した点が特に優れている。本研究で開発された技術を用いることで、よくコントロールされた細胞集団を作成できると期待され、細胞生物学一般に寄与する学術的価値は高いと考えられる。

以上の評価により、審査委員会は、本論文が博士学位論文として十分な学術的価値を有するものと結論した。

2014年1月11日午後4時より本論文に関する公聴会を開き、論文内容の説明と質疑を行った。申請者は論文について明快に説明し、質疑に対する応答も満足すべきものであった。