

学位論文題名

植物由来素材 PHA の医療応用に関する研究

－肝芽腫細胞 (HepG2) を用いた in vitro 実験－

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

生体材料(バイオマテリアル)は、生体の器官や組織や機能に対してそれを評価、治療、増強あるいは置換するような生物システムとの接点になることを意図したものと定義される。生分解性ポリマーは広くバイオマテリアルとして利用されており、外科手術時の組織の縫合、固定、被覆、ステントなどの形態保持・補強や骨欠損の補填、組織誘導の足場として用いられている。このような生分解性ポリマーの中でポリヒドロキシアルカノエート(PHA)は、多くの微生物において基礎栄養素が限定されたときにエネルギー貯蔵媒体として蓄えられる生分解性ポリエステルとして知られている。PHAは生体親和性、生分解性、調整可能な力学特性を有するため、医療用途や工業用途への適応性を与えている。しかしながら、これまでもPHAを用いた組織工学の足場などの研究が進められてきたが、医療応用に対して十分な研究が成し遂げられているとは言えない。本研究は、PHA薄膜上での癌細胞の増殖および毒性の実験による医療応用の基本的な安全性の検証を目的とした。さらに、PHA薄膜上で培養した癌細胞の遺伝子発現特性の解析により、再生医療をはじめとする医療応用への可能性を探ることを目的とした。

【材料と方法】

薄膜を作成するポリマー材料として3種類のPHAを用いた(HV2.5, HV10およびZ)。培養用の薄膜の作製には、溶媒としてクロロホルムおよびアセトンの2種の有機溶剤を用い、溶解したPHA溶液をガラス皿上に塗布することにより薄膜を無菌的に作成した。この薄膜に対してヘッドスペースGC法を用いた残留有機溶剤の測定を行った。また、PHAは大腸菌などのバクテリアが産生する材料であるため、リムルス試験によるエンドトキシン測定を行った。薄膜上の培養にはヒト肝芽腫細胞の培養株HepG2細胞を用い、細胞の生存率はトリパンプルを用いた色素排除テストにて判定した。培養細胞の形態は光学顕微鏡および走査電子線顕微鏡により観察した。細胞増殖能は、還元発色試薬WST-8を利用して測定した。培養した細胞からは全RNAを抽出し、逆転写反応を行い、cDNAを得た。このcDNAに耐熱性DNAポリメラーゼと目的遺伝子として選択した肝細胞と胆管上皮細胞に特異的に発現する遺伝子のプライマーを加え、PCRを行った。PCR産物は、アガロースゲルにて電気泳動した後、観察を行った。

【結果】

細胞培養用薄膜中には有機溶剤の残留は認められなかった。また薄膜中のエンドトキシン含有量が実験に影響を及ぼさないことが確認された。光学顕微鏡やSEMによる観察結果からは、薄膜の違いにより、細胞の成長のパターンや細胞の凝集性が異なっていることが確認された。また、薄膜上での細胞増殖能をWST-8法で調べた結果、Z薄膜上で培養した細胞増殖能はHV2.5, HV10およびコントロール薄膜上に比べて低かったことから、細胞の増殖に薄膜の種類による影響が認められた。さらに、細胞死が発生し細胞生存率が低下している可能性を調べるためにViabilityアッセイを実施した結果、HV2.5, HV10およびZともにコントロー

ルと同様に細胞生存率は 100%に近いことが確認された。一方、細胞数を比較した場合、コントロールに対して HV2.5 では約 70%, HV10 はほぼ 100%であったのに対し、Z では約 15%であり、Z においては細胞生存率が高いにもかかわらず細胞数が少ないことが確認された。RT-PCR とアガロースゲル電気泳動では、48 時間培養後の遺伝子発現の比較において、A1b はすべての薄膜上での結果が同じであった。一方、CYP 7A1 では HV2.5 および HV10 はコントロールと同様に遺伝子発現が低いのにに対して、Z においてはその遺伝子発現が亢進していた。未分化細胞に特異的に発現する AFP, DLK では、すべての薄膜における結果は同様の傾向を示した。また、KRT-19 においては、48 時間培養後では差が出ていなかった。次に、細胞培養の時間を伸ばすことによって、上記の結果がさらに顕著になるか否かを確認するために、120 時間培養後の比較を行った。これによって、とくに Z 上での CYP 7A1 の発現の亢進がさらに顕著となった。また KRT-19 は、HV2.5 および HV10 において、他のものに比べて遺伝子の発現が亢進していることが確認された。

【考察】

本研究においては、対象とした植物由来素材 PHA が生分解性および生体吸収性を備えていることから、医療応用に対する基礎データ取得のため、PHA 薄膜上における肝癌細胞 HepG2 の培養による反応を見るところから開始した。HepG2 を選定するにあたり、他のヒト肝癌細胞についても検討したが、その中で HepG2 は分化・成熟した肝細胞のマーカー、未分化の肝細胞のマーカーおよび胆管上皮細胞のマーカーなどをもともと発現している細胞であり、今回研究対象とした PHA という材料によって、細胞がどのような方向に分化するのかを比較的幅広く見ることができると考えた。PHA 薄膜上における HepG2 の形態的特長を観察および細胞増殖能の測定や細胞生存率の測定によって *in vitro* で細胞に対する毒性のないことを確認した。これにより PHA の医療応用への可能性の端緒が見えてきた。また、PCR 法による遺伝子発現の解析によって特定の遺伝子の発現の亢進をみることができた。例えば、CYP7A1 遺伝子の発現が亢進していることから、Z 系の PHA 上での培養によって、コレステロール代謝機能の活性が上昇することにより、成熟した肝細胞への分化誘導が生じている可能性が考えられる。また、V 系においては KRT-19 の遺伝子発現が亢進しており、V 系 PHA 上における培養によって、肝癌細胞から胆管上皮細胞への分化が誘導されている可能性が考えられる。しかしながら、調べるべき遺伝子は十分ではなく、さらなる研究が必要である。今後は *in vivo* において生体に与える影響についての観察が必要であり、まず動物実験において炎症反応や免疫反応を見ることで、今回 *in vitro* にて確認された医療応用の可能性について調べる予定である。これらの段階を経た後、細胞培養用の基材など再生医療用材料としての可能性を探っていくことが期待される。

【結論】

PHA は医療応用に多くの可能性を有する素材であり、*in vitro* の実験により細胞に対する毒性がないことが確認された。また、PCR 法による遺伝子発現の解析によって、特定の遺伝子の発現の亢進をみることができた。しかしながら、PHA を医療材料として応用していくためには、*in vivo* における生体に与える影響について研究する必要がある。今後の研究の進展によって、PHA には細胞培養用の基材や組織誘導の足場などの再生医療用材料あるいは生体機能材料としての応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 田 中 伸 哉

副 査 教 授 佐々木 文章

学 位 論 文 題 名

植物由来素材 PHA の医療応用に関する研究

－肝芽腫細胞 (HepG2) を用いた in vitro 実験－

生分解性ポリマーは広くバイオマテリアルとして利用されており、外科手術時の組織の縫合、固定、被覆、ステントなどの形態保持・補強や骨欠損の補填、組織誘導の足場として用いられている。このような生分解性ポリマーの中でポリヒドロキシアルカノエート (PHA) は、生体吸収性、生分解性、調整可能な力学特性を有するため、医療用途や工業用途への適応性が考えられている。本研究は、PHA 薄膜上での癌細胞の増殖および毒性の実験による医療応用の基本的な安全性の検証を目的とした。さらに、PHA 薄膜上で培養した癌細胞の遺伝子発現特性の解析により、再生医療をはじめとする医療応用への可能性を探ることを目的とした。

薄膜を作成するポリマー材料として 3 種類の PHA を用いた (HV2.5、HV10 および Z)。培養用の薄膜の作製には、溶媒としてクロロホルムおよびアセトンの 2 種の有機溶剤を用い、溶解した PHA 溶液をガラス皿上に塗布することにより薄膜を無菌的に作成した。

細胞培養用薄膜中には有機溶剤の残留は認められなかった。また薄膜中のエンドトキシン含有量が実験に影響を及ぼさないことが確認された。光学顕微鏡や SEM による観察結果からは、薄膜の違いにより、細胞の成長のパターンや細胞の凝集性が異なっていることが確認された。また、薄膜上での細胞増殖能を WST-8 法で調べた結果、Z 薄膜上で培養した細胞増殖能は HV2.5、HV10 およびコントロール薄膜上に比べて低かったが細胞生存率は 100%に近いことが確認された。一方、細胞数を比較した場合、コントロールに対して HV2.5 では約 70%、HV10 はほぼ 100%であったのに対し、Z では約 15%であり、Z においては細胞生存率が高いにもかかわらず細胞数が少ないことが確認された。RT-PCR による 48 時間培養後の遺伝子発現の比較において、Alb はすべての薄膜上での結果が同じであった。一方、CYP7A1 では HV2.5 および HV10 はコントロールと同様に遺伝子発現が低いのにに対して、Z においてはその遺伝子発現が亢進していた。未分化細胞に特異的に発現する AFP、DLK では、すべての薄膜における結果は同様の傾向を示した。また、KRT-19 においては、48 時間培養後では差が出ていなかった。次に、細胞培養の時間を伸ばすことによって、上記の結果がさらに顕著になるか否かを確認するために、120 時間培養後の比較を行った。これによって、とくに Z 上での CYP7A1 の発現の亢進がさらに顕著となった。また KRT-19 は、HV2.5 および HV10 に

において、他のものに比べて遺伝子の発現が亢進していることが確認された。つまり、Z系のPHAでは、分化・成熟した肝細胞のマーカである CYP 7A1 の発現が亢進し、一方、HV2.5 および HV10系で胆管上皮細胞のマーカである KRT-19 の発現が亢進した。これらの研究により PHA の成分比率によってさまざまな医療応用の可能性が開けると考えられた。

結論として、PHA は医療応用に多くの可能性を有する素材であり、*in vitro* の実験により細胞に対する毒性がないことが確認された。また、PCR 法による遺伝子発現の解析によって、特定の遺伝子の発現の亢進を見ることができた。しかしながら、PHA を医療材料として応用していくためには、*in vivo* における生体に与える影響について研究する必要がある。今後の研究の進展によって、PHA には細胞培養用の基材や組織誘導の足場などの再生医療用材料あるいは生体機能材料としての応用が期待される。

質疑応答では、副査の田中伸哉教授から植物プラスチックのPHAを研究材料に選んだ理由、これを使用するオリジナリティ、発見者について、およびPHA上での細胞の形態の違いについて質問があり、次いで、佐々木文章教授から、マウスを用いた *in vivo* モデルでの実験の有無、個々のHepG2細胞での神経突起などの形態学的情報について質問あった。最後に主査の守内教授からは、実験に癌細胞を用いた理由、北海道における産業としてのバイオマテリアルの優位性について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験データと先行論文を引用し、妥当な回答をした。

この論文は生分解性ポリマーであるPHAが細胞培養用の基材や組織誘導の足場などの再生医療用材料あるいは生体機能材料として応用が期待できることを示した点が高く評価され、今後実用化されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。