

京都大学	博士 (工学)	氏名	楊 建 東
論文題目	Gut-Liver Axis Microphysiological System Fabricated by Multilayer Soft Lithography for Studying Disease Progression (疾患機序の解明に向けた多層ソフトリソグラフィ加工による腸肝軸生体模倣システム)		

(論文内容の要旨)

本論文は、マイクロ流体デバイスによる生体外細胞培養技術として多層ソフトリソグラフィ加工による腸肝軸生体模倣システムを提案し、小腸-肝臓の相互作用を再現する循環灌流システムを流体デバイスに搭載するための設計法と三次元微細加工技術を開発するとともに、これらを用いて非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) および炎症性腸疾患の機序の一端を明らかにした結果をまとめたものであって、6章からなっている。

第1章は序論であり、まず、マイクロ流体デバイス技術を駆使して臓器レベルの細胞機能の再現を目指す生体模倣システムが注目されるようになった背景を概説している。次に、腸肝軸を介した肝疾患が、肝硬変や肝細胞がんへと進行する肝がん誘導機構モデルを提示し、肝疾患の予防やその治療薬の開発には、腸肝軸生体模倣システムによって肝疾患発症メカニズムを解明することが不可欠であることを述べている。その後、本論文の目的について示している。

第2章では、まず、従来の *in vitro* 試験系の上位に位置する生体模倣システムについて、黎明期からの研究開発を総括し、組織レベルおよび臓器レベルの生理的機能と異種臓器間の相互作用を同一流体デバイス上で再現することにより、創薬スクリーニングや疾患モデリングなど幅広い応用を提供できることを論じている。次に、腸肝軸生体模倣システムを開発するために活用する多層ソフトリソグラフィ技術とこれに関連する微細加工技術、流体デバイス内に培養した組織の生理的機能の向上を目指した機械的刺激の印加を実現するデバイス要素技術について述べるとともに、微細加工技術を用いて臓器間相互作用を模倣する循環灌流システムを流体デバイスに集積することの重要性を論じている。

第3章は、循環灌流システムを構成する圧力駆動型バルブ・ポンプの設計とその加工技術の確立を目的としている。まず、生体模倣システムで広く用いられるシリコーン樹脂製のダイヤフラム構造を使った圧力駆動型バルブについて、シリコーン樹脂の機械的特性を考慮した基本的な構造設計法を示している。次に、正方形のダイヤフラム構造を用いたペリスタルティックポンプで高効率に流体を制御することを目的に、ダイヤフラム構造の膜変形の解析結果に合わせてポンプチャンバ部を形成する三次元微細加工技術を議論している。一方、円形のダイヤフラム構造を用いたポンプ流量の有限要素解析では、圧力印加の制御シーケンスとポンプチャンバ内壁における膜の接触を考慮した解析における計算コストの削減が課題であった。そこで、ポンプチャンバ容積の経時変化を解析する三次元モデルと同容積の円柱に簡略化した二次元有限要素モデルを考案した。二次元有限要素モデルと流体-構造連成解析に基づいて、ポンプ流量の制御シーケンス依存性を有限要素解析で求め、解析結果が実験結果とよく一致していることを示した。さらに、異なるダイヤフラム径を有するポンプ構造やディフューザ・ノズル型チャンネルを有するポンプ構造による実験的な検証結果から、提案した二次元有限要素モデルによる圧力駆動型ポンプの設計法が、生体模倣システムの構築において有用であることを示している。

第4章は、多層ソフトリソグラフィ加工による腸肝軸生体模倣システムを用いて、NAFLDをモデル化することを目的としている。まず、腸肝軸生体模倣システムを構成する細胞培養チャンバや循環灌流システムなど異なる高さを有するモールド構造をウェハレベルで加工するために、膜厚数十 μm のポジ型・ネガ型感光性樹脂の露光・現像特性を活用した多層ソフトリソグラフィ加工を提示している。その後、流体デバイスに搭載された圧力駆動型ポンプの性能評価実験を行い、小腸-肝臓相互作用に必要な培養液の流れを実現できることを示している。次に、流体デバイス内における小腸細胞(Caco-2)と肝臓細胞(HepG2)の細胞培養条件や遊離脂肪酸の蓄積を定量的に評価するための流路内壁の表面処理条件、圧力駆動型ポンプによる循環灌流条件の最適化について論じている。その結果、NAFLDの発症と進行については、小腸細胞、肝臓細胞ともに遊離脂肪酸投与による脂肪酸の蓄積を確認し、流体デバイス内で共培養することで腸肝軸による細胞死誘導への抵抗性が向上したことを確認している。さらにRNAシーケンス法による全mRNA発現を解析した結果、遊離脂肪酸がアルブミン発現などの肝臓細胞における肝機能へ影響するだけでなく、小腸細胞・肝臓細胞の共培養による遊離脂肪酸の細胞周期や代謝活性への効果が確認できた。そして、本章の腸肝軸生体模倣システムによるNAFLD現象の再現性について生体においても前述の細胞周期や代謝活性の異常が報告されていることから、本システムの有用性について議論している。

第5章は、前章の結果をふまえて、流体デバイス内でヒト体内の腸肝軸をさらに高度に再現する方法として、細胞培養チャンバと循環灌流チャンネルが多孔膜で仕切られた多層構造の生体模倣システムの構築を目的としている。まず、機械的刺激による小腸細胞と肝臓細胞の機能発現を制御し、かつ多孔質膜による細胞膜の物質透過を再現する細胞培養チャンバ構造を考案し、これと圧力駆動型ポンプや循環灌流チャンネルで構成される生体模倣システムの多層ソフトリソグラフィ加工を提示している。次に、小腸細胞と肝臓細胞による腸肝軸生体模倣システムを作製し、疾患機序の再現に必要な小腸細胞と肝臓細胞の生存率と機能発現が向上したメカニズムについて議論している。さらに、炎症性腸疾患を誘導するリポポリサッカライドを小腸細胞にのみ添加したときに、小腸・肝臓細胞の誘導性一酸化窒素合成酵素の発現増加を確認できたことから、小腸炎症時における肝臓との相互作用と炎症発症機序について議論している。最後に、本章の腸肝軸生体模倣システムについて、その有用性や腸肝軸以外の異種臓器連結モデルへの適用性について議論している。

第6章は結論であり、本論文で得られた成果について要約し、将来の展望を提示している。

氏名	楊建東
----	-----

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、マイクロ流体デバイスとヒト由来細胞を用いて生体内の微小環境を再現する生体模倣システムにおいて、小腸－肝臓の相互作用を再現する循環灌流システムを流体デバイスに搭載するための設計法と三次元微細加工技術を開発するとともに、作製した腸肝軸生体模倣システムによる疾患機序の解明を目指した研究の成果をまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. 異種臓器間の相互作用を再現するための圧力駆動型バルブ・ポンプで構成される循環灌流システムで用いるシリコン樹脂製ペリスタルティックポンプの有限要素解析を使った設計法を考案し、設計したポンプ構造を膜厚数十 μm の感光性樹脂の三次元微細加工技術を応用した多層ソフトリソグラフィ加工で実現した。細胞培養チャンバとマイクロポンプをマイクロ流路で接続し、そこで小腸と肝臓のヒト由来細胞を培養し、小腸－肝臓相互作用のモデル化に必要な標的薬剤や代謝物を含む培養液の流れを生体と同等環境に再現できることを示した。
2. 圧力駆動型の循環灌流システムを用いた腸肝軸生体模倣システムを作製し、そこに小腸細胞 (Caco-2) と肝臓細胞 (HepG2) を培養することで、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) をモデル化した。流体デバイス内での細胞培養条件や表面処理条件、循環灌流条件を最適化して NAFLD の発症と進行を調べ、Caco-2 細胞、HepG2 細胞ともに脂肪酸の蓄積を確認するとともに、デバイス内で共培養することで腸肝軸による細胞死誘導への抵抗性が向上していることを確認した。
3. ヒト体内の腸肝軸をより高度に再現するため、細胞培養チャンバと循環灌流チャネルが多孔膜で仕切られた多層構造マイクロ流体デバイスからなる腸肝軸生体模倣システムを構築した。小腸と肝臓の個々の細胞に異なる機械的刺激を印加できる構造により、疾患機序の再現に必要な小腸・肝臓細胞の生存率と機能発現の向上を達成した。炎症性腸疾患を誘導するリポポリサッカライドを小腸細胞にのみ添加した時の小腸・肝臓細胞の誘導性一酸化窒素合成酵素の発現増加を確認したことで、提案した腸肝軸生体模倣システムの有用性を実証した。

以上、本論文は、生体模倣システムでの臓器間相互作用の再現性の向上を目指して循環灌流システムの設計法と三次元微細加工技術を開発し、これらを用いて構築した腸肝軸生体模倣システムにより NAFLD および炎症性腸疾患の機序の一端を明らかにしたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 2 月 13 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。