

| | | | |
|------|---|----|-----|
| 京都大学 | 博士（薬科学） | 氏名 | 王夢洋 |
| 論文題目 | <p>Development of perfluoroelastomer-based low-sorption microfluidic devices for drug metabolism and toxicity studies</p> <p>（薬物代謝・毒性研究のための過フッ素化エラストマー製低収着マイクロ流体デバイスの開発）</p> | | |

In recent years, in vitro assay systems using microfluidic devices have gained much attention. Compared to conventional static culture, microfluidic culture systems provide more physiologically relevant conditions, such as shear stress, nutrient supply, and waste removal. Polydimethylsiloxane (PDMS) is the most popular material for the fabrication of elastic microfluidic devices. However, the nature of the cured PDMS resin, which absorb a wide range of hydrophobic compounds, limits its application to ADMET studies. The development of materials that can replace PDMS is a critical issue, requiring ease of processing, transparency, oxygen permeability, biocompatibility, and low sorption. The author focused on perfluoropolyether elastomer (PFPE), which is chemically inert and resistant to both solvents and high temperatures but also has the unique characteristic of being a liquid at room temperature. In addition, PFPE is optically transparent and biocompatible enough to be used for corneal inlay. The author fabricated microfluidic devices with PFPE via soft lithography and investigated their feasibility in ADMET studies.

Chapter 1 Application of Perfluoropolyether Elastomers in Microfluidic Drug Metabolism Assays

At first, PFPE-based microfluidic devices were tested in drug metabolism studies. Most of small molecular drugs are hydrophobic and eliminated through hepatic metabolism. Primary rat hepatocytes were isolated and cultured in the PFPE microfluidic devices. The device had two parallel top and bottom microfluidic channels separated by a porous membrane, and cells were seeded in the top channel. Cultured hepatocytes were polygonal or cuboidal in shape, similar to those cultured in plastic plates. When hepatocytes were exposed to dynamic flow, the production of albumin and urea increased compared with static conditions. Exposure to dynamic flow did not result in obvious changes in the expression of cytochrome P450s, but increased the metabolic activity of hepatocytes compared to under static conditions. Exposing the cells to sufficient air through the bottom channel did not change the metabolism, indicating that the flow-induced increase in metabolism might be due to an increased supply of substrate drugs rather than oxygen. PFPE devices did not absorb midazolam, which was extensively absorbed by PDMS devices. Although sorption into PFPE occurs with certain drugs, it could be predicted by the Hansen solubility parameter (HSP) theory. These results indicate that PFPE-based microfluidic devices can basically suppress the sorption of hydrophobic drugs while allowing cells to retain basic cellular functions and metabolic activities.

Chapter 2 Co-Culture of Primary Rat Hepatocytes and Non-Parenchymal Cells in Perfluoropolyether-Based Devices in Hepatotoxicity Studies

Interactions between hepatocytes and non-parenchymal cells can have significant metabolic and toxicological consequences. However, simple co-culture models cannot mimic the physiologically relevant microenvironment including the structure of the Space of Disse. The role of non-parenchymal cells in the toxicity of hepatocytes was investigated in a two-channel microfluidic device in which each cell type was physically isolated by a porous membrane. Co-culture with non-parenchymal cells increased the gene expression of albumin in hepatocytes, and reduced the release of ALT/AST into the medium following the

48-h exposure to hepatotoxicants, i.e., acetaminophen and coumarin. Moreover, co-culture with non-parenchymal cells restored the level of reduced-form glutathione due to the hepatotoxicants, and alleviated the oxidative stress caused by acetaminophen. In addition, co-culture with non-parenchymal cells elevated the glutathione conjugate of acetaminophen, and reduced the level of o-hydroxyphenylacetic acid, a product from the toxic metabolite (o-hydroxyphenylacetaldehyde) of coumarin. These results suggest that non-parenchymal cells could protect against drug-induced liver injury. Thus, a two-channel microfluidic device could be used to assess hepatotoxicity, which would also account for cell-cell interactions in the liver.

Chapter 3 Perfluoropolyether-Based Gut-Liver-on-a-chip Device for the Evaluation of Oral Drug Bioavailability

Gut-liver-on-a-chip devices, in which two tissue chambers are connected by small-volume microchannels, has potential applications in the bioavailability assessment of oral drugs. Caco-2 cells and primary human hepatocytes were co-cultured in the device. After midazolam was administered on the apical side of the gut chamber, both intact and metabolite forms were detected in the effluent from the liver chamber. However, extensive sorption of midazolam was observed in PDMS-based devices. Experiments using PFPE-based devices indicated that the rate of appearance of the metabolite was dose-dependent for midazolam and was also significantly suppressed by concomitant administration of ketoconazole. When genome-edited CYP3A4/UGT1A1-expressing Caco-2 cells were used, metabolites of midazolam appeared in the apical fluid. Taken together with the data on midazolam injected into the liver, it was clear that most of the metabolites of midazolam produced in the intestinal compartment were secreted into the apical fluid. While further improvements in absolute prediction of human bioavailability are needed, the gut-liver-on-a-chip device should allow for a basic assessment of saturation pharmacokinetics and drug-drug interactions for oral drugs.

In conclusion, PFPE elastomers have been demonstrated to ameliorate the significant sorption problems encountered in PDMS-based organs-on-a-chip devices; PFPE-based microfluidic devices have not lost the fundamental properties of PDMS in manufacturing and functional evaluation. These findings contribute to the development of microphysiological systems intended for in vitro ADMET studies.

(論文審査の結果の要旨)

近年、マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 培養システムが注目されている。従来の静置培養と比較して、マイクロ流体培養システムでは、せん断応力、栄養供給、老廃物除去など、より生理的な条件を再現できる。しかし、通常用いられるポリジメチルシロキサン (PDMS) は、疎水性化合物を吸着してしまい、薬物動態・毒性研究への応用には限界がある。そこで、申請者は、化学的に不活性でかつ生体適合性にも優れるパーフルオロポリエーテルエラストマー (PFPE) に注目し、ソフトリソグラフィ法によりマイクロ流体デバイスを作製して、その利用可能性を検討した。

第1章では、多孔質膜で仕切られた上下2つの平行なマイクロ流路を持つ、PFPE製マイクロ流体デバイスで培養した。ラット初代肝細胞を単離して培養したところ、プラスチックプレートで培養されたものと同様に、敷石状の配列した肝細胞特有の構造を示し、動的流れにさらすと、静止状態に比べてアルブミンや尿素の産生が増加した。シトクロム P450 の発現には影響がなかったが、肝細胞の代謝活性は静止状態に比べて上昇した。脂溶性の高いミダゾラムは、PDMS デバイスに強烈に収着したが、PFPE デバイスではほとんど収着されなかった。一部の薬物では PFPE への収着が起こるものの、ハンセン溶解度パラメータ (HSP) 理論によって予測することが可能であった。

第2章では、PFPE製マイクロ流体デバイスの肝毒性試験への応用を試みるとともに、ラット初代肝細胞と非実質細胞の共培養の効果を検討した。単純な共培養モデルでは、肝細胞と内皮細胞などを分離するディッセ腔の構造を含む生理的な微小環境を模倣できない。そこで、第1章で作成した2チャンネルデバイスで、非実質細胞が肝細胞の毒性に果たす役割を検討した。その結果、非実質細胞との共培養により、肝細胞のアルブミン遺伝子発現が増加するとともに、肝毒性のあるアセトアミノフェンとクマリンに48時間曝露したときの肝細胞からのALT/ASTの放出が抑制された。さらに、非実質細胞との共培養により、肝毒性物質による還元型グルタチオンレベルの減少が抑制されたことに加え、アセトアミノフェンのグルタチオン抱合の上昇、クマリンからの *o*-hydroxyphenylacetic acid 産生の低下が観察された。2チャンネルデバイスの利用によって、非実質細胞が薬物誘発性肝障害に対して保護的に働くことを分析的に示すことが可能となった。

第3章では、経口薬のバイオアベイラビリティ評価への応用を目的として、Gut-liver-on-a-chip デバイスを開発した。本デバイスは、上下2チャンネル構造がマイクロチャンネルを連結された構造をしている。ヒト小腸およびヒト肝臓のモデルには、それぞれ Caco-2 細胞、初代ヒト肝細胞が用いられた。ミダゾラムを腸チャンバーの上側流路に投与したとき、肝臓チャンバーからの流出液には未変化体と代謝物の両方が検出された。PFPE製デバイスでは低投与量でも実験が可能であり、代謝物の出現速度はミダゾラムの用量依存的であること、ケトコナゾールの併用投与で有意に抑制されることが示された。ゲノム編集した CYP3A4/UGT1A1 発現 Caco-2 細胞を用いて実験を行い、その結果を速度論的に解析したところ、ミダゾラムの代謝物のほとんどは Caco-2 細胞の頂側膜に分泌されていることが明らかになった。以上、定量的な予測にはまだ改善の必要があるが、この Gut-liver-on-a-chip により、経口薬の基本的な非線形薬物動態や薬物間相互作用の評価が可能であることが示された。

以上、PFPE エラストマーは、PDMS で遭遇する重大な収着問題を改善でき、マイクロ流体細胞培養システムの素材として極めて有用なことが実証された。これらの知見は、*in vitro* 薬物動態・毒性研究を目的としたマイクロ生体模倣システムの開発に貢献するものである。

よって、本論文は博士(薬科学)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16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、令和8年3月24日までの間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。