

京都大学	博士 (工学)	氏名	高田 裕司
論文題目	近位尿細管上皮組織における細胞動態評価のためのインピーダンス計測		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、インピーダンス計測が可能な生体模倣システム (microphysiological systems : MPS) の開発と実証について報告したものである。具体的には、腎臓の近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) の動態をインピーダンス計測により定量的かつリアルタイムに評価可能であることを実証してその有用性を示したもので、6章からなる。</p> <p>第1章は緒論であり、背景、目的、論文全体の構成について述べている。創薬において、非臨床試験の段階においてヒトの薬剤性腎障害を適切に検出できないことが課題である。この原因は、静的な細胞評価系と薬剤性腎障害の検出手法にあると問題提起をしている。細胞評価系の課題は、従来用いられてきた培養皿による細胞培養法ではヒトの尿細管流を模倣することができないため、RPTECが近位尿細管上皮組織と同等の生理活性を示さないことである。この課題は、マイクロ流体デバイスにより尿細管流を模した灌流可能なMPSを用いて、RPTECに培地を頻繁に交換しながら培養し生理活性を高めることにより解決可能である。また、検出手法の課題は、エンドポイントの細胞生存率のみで評価していることである。薬剤性腎障害の進行の早さは数日から数ヶ月と幅があり、全てを網羅的に評価するためには長期的かつ定量的にモニタリング可能な検出手法が必要である。</p> <p>本研究では、検出手法の課題に対応するため、インピーダンス計測に着目した。従来のインピーダンス計測用MPSについて検討したところ、上皮組織の基底膜側から薬剤を導入する流路を設けたMPSでは、電界が上皮組織の一部のみに印加されることにより細胞接着・増殖・剥離など上皮組織全体で生じる細胞動態を検出できないことが明らかとなった。これは、流路を介して上皮組織と電極が配置されていること、また細胞の顕微鏡観察のため光透過性の低い金電極を上皮組織全体を覆うように配置できないことが原因である。そこで、透明な酸化インジウムスズ (ITO) を使用した上皮組織全体を覆う対向電極を提案し、インピーダンス計測用の近位尿細管MPS (PT-MPS) を開発して細胞動態を評価した。</p> <p>第2章では、PT-MPSの設計と製作、細胞評価方法、インピーダンス計測手法について述べている。ITOを使用することにより、上皮組織全体の明視野観察が可能でありながら、上皮組織に印加される電界が均一であることを電位シミュレーションにより示した。そして、このITO電極でRPTECのインピーダンスを計測可能であることを、インピーダンスの周波数スペクトルにより確認している。この電界の不均一性の課題を解決したPT-MPSを細胞動態の評価の実証に適用する。</p>			

第3章では、PT-MPSを用いてRPTECを培養し、抗がん剤であるシスプラチンの導入により薬剤性腎障害を引き起こし、抵抗 (TEER) 値の評価で細胞毒性、静電容量値の評価で細胞剥離を検出した結果について述べている。TEER 値による細胞毒性の評価では、濃度依存性、シスプラチンを輸送する膜輸送体の阻害剤の効果、薬剤の導入方向による効果を定量的にモニタリング可能であることを示した。これらの結果は、TEER 値によりシスプラチン特有の毒性を評価できたことを表しており、PT-MPS が薬剤性腎障害の評価に有用であることを示している。一方、TEER 計測には、上皮組織に細胞のない領域 (無細胞領域) が存在する場合、電流が無細胞領域へと集中し、TEER 値が過小評価される課題がある。これは、細胞毒性をモニタリングする際に、静電容量値により細胞剥離を同時に検出することで、細胞剥離前に TEER 値のモニタリングを終了することで回避できる。これにより、無細胞領域が存在しない上皮組織でのみ TEER 計測を行うことができ、TEER 値の過小評価を防ぐことが可能な手法を提案している。

第4章では、無細胞領域が存在する上皮組織の細胞動態を捉えるためのインピーダンス計測による評価手法について述べている。まず、印加信号の周波数を 100 kHz とした際の系全体の静電容量値から、細胞培養領域における上皮組織の細胞被覆率が算出できることを示し、細胞の接着・増殖・剥離過程をモニタリング可能であることを示した。次に、測定した抵抗値を細胞被覆率によりスケーリングする手法を提案し、無細胞領域が存在する上皮組織の TEER 値を正確に計測できることを示した。これらの結果から、インピーダンス計測が薬剤性腎障害における上皮組織の様々な動態の評価に活用できることが実証された。

第5章では、カルシウム受容体を介して制御される上皮組織のバリア機能を TEER 計測により評価した結果について述べている。上皮組織は、細胞間にイオンの透過を制限するバリア機能を持ち、この機能は細胞外カルシウムイオン濃度によってカルシウム受容体を通じて調節されることが知られている。しかし、バリア機能変化のダイナミクスはこれまで定量的に評価できていなかった。本研究では、TEER 計測を用いたイオン透過性の評価により、バリア機能変化のダイナミクスを定量的にモニタリング可能であることを示した。これにより、PT-MPS を用いた TEER、およびインピーダンス計測が生理学的研究においても有用であることを示している。

第6章はまとめであり、本論文における研究の成果とその意義について示すとともに、今後の展望について述べている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、インピーダンス計測用 PT-MPS を開発して、従来のインピーダンス計測用 MPS では計測困難であった細胞動態に関する評価を実現した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 電極に透明な ITO を使用することで、培地を介して上皮組織全体を対向電極により覆った状態での顕微鏡観察を可能にした。そして、その電極配置により、上皮組織全体の評価を可能にする均一な電界の印加を実現した。
2. シスプラチン毒性の濃度依存性、シスプラチン輸送阻害剤の効果、薬剤導入方向による効果を TEER 値により定量的にモニタリング可能であることを実証し、PT-MPS が薬剤性腎障害評価ツールとして有用であることを示した。また、静電容量値の急増により細胞剥離を検出できることを示し、細胞剥離による TEER 値の過小評価を回避する手法を開発した。
3. 印加信号の周波数を 100 kHz とした際の評価系全体の静電容量値から細胞被覆率が算出できることを示した。そして、細胞被覆率の計測により細胞接着・増殖・剥離過程を定量的にモニタリング可能であることを示した。加えて、細胞被覆率を用いた抵抗値のスケーリングにより、無細胞領域を含む上皮組織における TEER 値を算出する手法を開発した。これらは無細胞領域を含む上皮組織であってもインピーダンス計測により様々な細胞動態を評価可能であることを示している。
4. TEER 値により、細胞外カルシウムイオン濃度に依存したカルシウム受容体を介したバリア制御機能のダイナミクスの評価を実現した。

本論文は、PT-MPS の開発とその実証について述べたものである。ここで実証された細胞動態評価は、定量的な実験結果によって十分に確立されており有用であると認められる。PT-MPS は、非臨床試験において新薬候補化合物における薬剤性腎障害の高効率な検出に貢献できると考えられ、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 6 年 8 月 23 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。

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、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。