

学位授与番号：甲 1 0 0 1 号

氏 名：松本 倫典

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 1 月 27 日

学位論文名：

肝細胞癌細胞株を用いた効率的なフィブリノゲン分泌産生システムの確立

主論文名：

An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line.

（肝細胞癌細胞株を用いた効率的なフィブリノゲン分泌産生システムの確立）

学位審査委員長：教授 馬目佳信

学位審査委員：教授 本間定 教授 横尾隆

# 論文要旨

(2部提出)

論文提出者名	松本 倫典	指導教授名	矢永 勝彦
<p>主論文題名</p> <p><b>An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line.</b></p> <p>(肝細胞癌細胞株を用いた効率的なフィブリノゲン分泌産生システムの確立)</p> <p><b>Michinori Matsumoto, Tomokazu, Matsuura, Katsuhiko Aoki, Haruka Maehashi, Takeo Iwamoto, Kiyoshi Ohkawa, Kiyotsugu Yoshida, Katsuhiko Yanaga, Koji Takada</b></p> <p><b>Hepatol Res. 2015; 45: 315-325.</b></p> <p>&lt;要旨&gt;</p> <p>血液製剤は医療の高度化に伴う需要増大の一方で、大部分の原料を献血に依存しているため、常に安全性の問題を抱えている。フィブリノゲン製剤に関しては、組換えタンパク産生系の開発が試みられてきたが、技術的な問題から実用化が困難である。本研究の目的はヒト肝細胞癌株の無血清培養系を用いて効率的で安全性の高いフィブリノゲン産生システムを構築することにある。目標とする細胞培養システムでは次のような条件が求められる：(1) 無血清培養下で増殖能と肝細胞機能を保持する高分化型肝細胞株を用いること、(2) 長期間に渡り効率的なフィブリノゲン産生能を維持できること、(3) 産生されたフィブリノゲン分子が生物学的機能を有すること。Functional liver cell (FLC) 細胞株は、肝細胞に特有の機能を有し、かつ無血清培養が可能であるため、求められる細胞株の候補と考えられる。今回の研究では、FLC 細胞株を中心とした培養系を比較検討し、上述の条件を満たすフィブリノゲン産生システムを構築した。</p> <p>3種類のヒト肝癌細胞株 (HepG2、FLC-4 および FLC-7 細胞) を2種類の無血清培地 (ASF104N, IS-RPMI) または血清含有培地と組み合わせて培養し、フィブリノゲン産生能を比較したところ、IS-RPMI 培地を用いた FLC-7 細胞の培養系が最も優れていた (fibrinogen production rate: 21.6 g/10<sup>7</sup> cells/day)。ASF104N 培地は IS-RPMI 培地よりも FLC-7 細胞の増殖を効率的に促進したが、フィブリノゲン産生に関しては IS-RPMI 培地の方が適しており、培養時に培地を ASF104N から IS-RPMI に切り換えるとフィブリノゲン遺伝子の発現が有意に増加することも確認された。フィブリノゲンの産生量をさらに増加させるため、Radial flow bioreactor (RFB) を用いた培養系のスケールアップを試みたところ、フィブリノゲン産生量は培養 42 日目に 0.73 µg/mL/day に達した。これは上述の組換えフィブリノゲン産生系の成績に匹敵する値である。FLC-7 細胞由来フィブリノゲンのサブユニット構成は、電気泳動や cDNA 塩基配列の解析等から、血漿フィブリノゲン標品と同じく α、β、γ 鎖から成ることが明らかとなった。さらに FLC-7 細胞由来フィブリノゲンはフィブリン塊を形成する活性を示し、その比活性は血漿フィブリノゲン標品と同等であった。</p> <p>以上、2種類の無血清培地を用いた FLC-7 細胞の RFB 培養システムは、従来にない効率的なフィブリノゲン産生系であると結論された。</p>			

## 論文審査の結果の要旨

松本倫典氏の学位審査論文は主論文 1 編よりなり、「An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line」と題するもので Hepatology Research 誌に掲載され、外科学講座消化器外科分野に於いて矢永勝彦教授の指導によるものである。以下、学位論文の要旨と審査委員会における審査結果について報告する。

外科学の分野においてはフィブリノゲン関連の血漿製剤の必要性が高く広くフィブリノゲン製剤や組織接着剤として用いられている。しかし大部分の血液製剤が献血に由来しているため血液製剤の供給には限りがある上、輸血には肝炎や HIV 感染などのリスクがある。従って安全かつ大量に血液製剤を供給できる生産方法の開発が強く望まれている。松本倫典氏はこの問題を解決すべくウイルスを産生しないヒト肝細胞癌の細胞株を無血清培地で培養し活性を持つフィブリノゲンを安定して産生させるシステムの開発を行った。このシステムは無血清培養下で増殖能と肝細胞機能を保持する高分化型肝細胞株を用いて、長期間、安定して大量に細胞をバイオリアクターの中で培養し、活性のあるフィブリノゲンを効率的に産生させるものである。

学位公開審査会を平成 28 年 1 月 16 日、本間定教授、横尾隆教授、矢永勝彦教授のご臨席の下、開催した。主論文の概要を中心とした松本氏の発表に続いて口頭試問を行った。席上、審査委員から内容に関する以下のような数多くの質疑があった。

- 肝細胞の機能発現には微量元素のセレンの添加が大きく関与するため無血清培地での細胞の発育の違いはセレンの含有量の差ではないのか。
- 癌細胞を生物製剤の原料として用いる際には、ウイルスなどは含まれていなくても癌細胞が産生するサイトカインなどが生体に免疫抑制などの効果を及ぼすことがあるがそれについてはどのように検討していくか。
- 工業化をするときに癌細胞を用いることについて問題はないのか。
- 他のフィブリノゲン製剤とは具体的にどのように作製過程で違いがあるのか。
- 培養細胞から産生されるものと生体から単離されるフィブリノゲンに機能的な差はないのか。
- 生体から得られたものとの分子量の違いはプロセッシングではなくてタンパク分解酵素の作用によるものではないか。
- またその違いは糖鎖修飾によるものではないのか。リン酸化による可能性はないのか。
- 得られたフィブリノゲンを質量分析等で解析して違いが何によるものか確認

できるのではないか。

- 臨床で用いる量のフィブリノゲンを得るためには効率をもっと劇的に上げる必要があるのではないか。
- ラジアルバイオリアクターの細胞培養の条件については先行研究があるのか。
- FLC-4 と FLC7 の 2 つの細胞株の性質の違いは何か。
- 活性の評価は *in vitro* の評価だけで良いのか。生体内で確認する必要はないか。
- 新鮮凍結血漿からフィブリノゲンを分離する方法の検討は行ったか。
- バイオリアクター内のフィブリノゲンの量が長期培養の際に産生に影響を及ぼすことはないのか。
- 従来の肝細胞を用いた *in vitro* の作製法とどこが異なるのか。
- フィブリノゲンの SNPs が産生量に与える影響についての検討はどうか。
- フィブリノゲン遺伝子の強制発現による産生量の増加は見込めないのか、等々。

松本氏はこれらの質問に的確に回答した。その後、本間教授および横尾教授と慎重に審議した結果、本研究が生物製剤のフィブリノゲンを安全かつ効率的に作製するシステムの開発に貢献するものとしてその意義は大きいものと判定し、学位を授与するに十分値すると認定した次第である。