

令和元年5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03823

研究課題名(和文)高機能マイクロ人体モデルの開発

研究課題名(英文)Development of high performance micro-human models

研究代表者

佐藤 記一 (Sato, Kiichi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：50321906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：新薬の開発や化学物質の毒性試験には、従来動物実験が多用されてきたが、それに代わる新たな解析手法としてヒトの培養細胞を用いたマイクロ臓器モデルを開発するための基礎的検討を行った。本研究では薬物動態や薬物送達に深く関わる臓器として、特に腎臓モデル、および脂肪やがん組織への血管新生モデルに着目して実験を行った。その結果、マイクロ腎臓モデルを開発して排泄試験を行うとともに、毛細血管網を有するマイクロ3次元組織の構築を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は新薬候補化合物のヒト体内での動態を解析するための新たな実験ツールとなることが大いに期待される。開発したモデルを他の臓器や組織モデルと組み合わせることで血管モデルによりつなぎ合わせることで、マイクロ人体モデルへと発展させることが可能であり、従来の動物実験に代わる新たな実験システムとして生命科学への幅広い応用が期待される。特に、創薬の初期における候補化合物の評価に用いることで、新薬開発の費用を大幅に低減することが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Animal experiments have been used for drug screening and toxicity test. In this research, I conducted a fundamental study to develop microchip-base organ models (Organ-on-a-Chip) using cultured human cells as novel analysis tools alternative to test animals. Especially, Kidney-on-a-Chip and angiogenesis models with adipose or tumor tissue were investigated. As a result, I developed a Kidney-on-a-Chip, which was applied to excretion test, and 3D microtissues having capillary network.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス バイオアッセイ 臓器モデル 創薬 薬物動態 マイクロ流体デバイス マイクログ生体モデル マイクロ臓器モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

培養細胞を用いたバイオアッセイは、創薬などにおける生理活性物質探索や化学物質の毒性試験などに頻用されるきわめて重要な分析法である。これまでに研究代表者は世界にさきがけて、このバイオアッセイ系をマイクロチップ化し、抗がん剤、抗ヒスタミン剤、免疫活性化合物などのバイオアッセイ系や腸管吸収モデルの開発に成功し、試料量や細胞消費量の削減や操作の簡便化を実現してきた。

これらはいずれも単一の生物活性のみを検定するものであるが、実際の体内には薬の標的組織以外に様々な臓器・組織が存在し、これらが薬剤に対して複雑に影響している。これは薬物動態における ADME(吸収・分布・代謝・排泄)として知られ、創薬における重要な検討課題である。そのため、これら様々な過程をバイオアッセイ可能な新たな実験法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では複合的マイクロバイオアッセイデバイスの開発を着想した。これは、人体の持つ、なるべく多くの臓器・組織を一つのデバイスに集積化することにより、実際に人体で起こる様々な生体反応を数多く組み込んだマイクロ人体モデルを開発することを目指したものである。これを実現することにより、培養細胞を用いた系ではあるものの、実際の生体内で起こる現象により近い環境を構築できると期待でき、バイオアッセイとしての信頼性が飛躍的に向上し、動物実験の一部を代替することが可能になると考えられる。

本研究では、特に生体内において化学物質の動態に関与する臓器や、薬剤の代表的な標的組織を周辺の血管網とともに組み込んだマイクロ人体モデルを世界ではじめて構築するために必要な各マイクロ臓器モデルの開発を目標とした。また、より正確な応答を得るため、活性の低い株化細胞ではなく、高い活性を有した初代細胞を用いたシステムの構築を目指すこととした。

開発する主な臓器等としては、これまでに研究に着手してきた腸管、腎臓に加えて、新たに脂肪細胞など薬剤の体内分布に関わる組織のマイクロチップ化に取り組むこととした。また、血中の薬剤が標的組織に到達できるかどうか創薬における重要な検討事項であり、これをアッセイするための毛細血管網モデル開発にも取り組んだ。具体的には血管内皮細胞を他の細胞と共培養することにより、血管新生モデルを構築し、各種バイオアッセイを実現することを目標とした。これを実現するため、血管内皮細胞と他の細胞を混合して、あるいはチップ内の空間的に隣接した場所で共培養し、血管内皮細胞による自発的な毛細血管網の発達を促すことにより、マイクロモデルの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬物動態に関わる主要臓器・組織のマイクロチップ化

バイオアッセイのための人体モデルの構築に必要な臓器・組織のチップ化を試みた。小腸から吸収された化学物質は、肝臓で代謝をされつつ、筋組織・脂肪組織に分布しながら流れていき、標的部位に作用し、そして腎臓において排泄されながら体内を循環する。そこで本研究では腸上皮および腎臓のマイクロモデルの構築とその最適化を試みた。また、脂肪組織についてはモデル細胞株の選定と培養試みた。マイクロ臓器モデル構築に用いる各種マイクロデバイスは PC ソフトウェアを用いて設計し、ソフトリソグラフィ法によりシリコンゴム PDMS とスライドガラス、各種メンブレンフィルターなどから自作した。

### (2) 血管新生モデルの開発

チップ内部に血管内皮細胞と、腫瘍細胞や線維芽細胞などの他の細胞を培養する領域を別々

に設けたデバイスを作製した。各培養領域を限定する手法としてマイクロ流路の壁で物理的に仕切る方法を検討した。2つの細胞培養部を仕切る壁に一定の間隔で開放部を設け、血管内皮細胞が自由に別の細胞側へと伸展できるように設計した。開放部の大きさや壁の厚みなどは複数種類設計し、最適化を試みた。作製したチップ内部のマイクロ培養槽で2種類の細胞の共培養を試み、各細胞が正しく増殖、分化するために必要な培養法について検討した。

### (3) ヒト正常初代細胞の培養

前述の各マイクロモデル開発の初期には扱いやすさとコストの面から各種モデル細胞株を用いたが、これらの細胞は増殖が速い反面、分化状態に問題があり、正しい生体応答を得ることができないことが多い。そこで、ある程度マイクロモデルができあがった段階で、分化能に優れたヒト由来の初代細胞を用いて各マイクロモデルの最適化を試みた。

### (4) モデル薬剤の体内動態解析

開発した各モデル部位において試験薬剤がどれだけ蓄積あるいは代謝されているかを正確に調べるため、マイクロ HPLC を用いて分析を行い、システムの最適化を試みた。同様に、腸上皮、血管内皮、腎の糸球体および尿細管の各マイクロモデルにおける薬剤の物質透過性試験を試みた。モデル物質としては、蛍光微粒子や蛍光標識高分子、低分子の蛍光物質、あるいは医薬品などを用いてその移行速度を調べ、各細胞層における物質透過性について検討した。

### (5) PDMS デバイスへの化合物の吸着抑制法の開発

前述の実験の結果、一部の試験化合物がデバイス素材である PDMS に吸着することが確認された。これを解決するため、PDMS チップの流路に各種高分子の溶液を導入することによりコーティングを施し、そのコーティングによる吸着抑制効果とその耐久性について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロ腎モデルの開発

腎排泄試験を行うために、チップ内部で溶液が循環する流路を作製し、その一部に糸球体、尿細管のモデル部位を配置したマイクロ腎モデルを構築した(図1)。空気圧駆動のマイクロポンプによって溶液を循環させ、糸球体部位の透析膜で高分子化合物と低分子化合物の分離を行うことで、限外濾過を模倣する。また、一部の薬剤は尿細管部位のメンブレンフィルター上に培養したモデル細胞によって、排出流路へ分泌されるよう設計した。

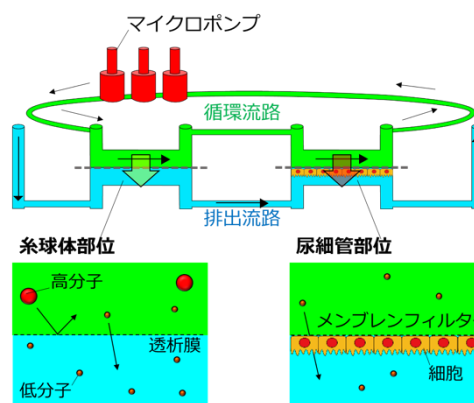


図1 マイクロ腎モデルの概略図

尿細管部位で Caco-2 細胞を 14 日間以上培養した後、蛍光物質を用いて腎排泄試験を行った。低分子化合物としてローダミンを、高分子化合物として蛍光標識デキストランを循環流路に導入し、マイクロポンプで循環させた。ローダミンの濃度は徐々に減少し、デキストランの濃度は一定の値を示した。したがって、細胞が密着結合を形成し、高分子化合物が循環流路に保持されることが分かった。また、尿細管部位でローダミンが細胞によって輸送されることも明らかにした。この結果より、糸球体の限外濾過と尿細管分泌の2つの過程を模倣した、マイクロ腎モデルが構築できたと結論した。

## (2) 腫瘍組織における血管新生マイクロモデルの開発

本研究では、柱で区切られた隣接する3本の流路構造を持つマイクロチップを作製して実験を行った(図2)。流路幅1000  $\mu\text{m}$ の中心の流路にゲルを導入し、次に血管内皮様細胞を上流(流路幅1500  $\mu\text{m}$ )に、乳がん由来細胞株を下流(流路幅1500  $\mu\text{m}$ )に播種した。柱構造の大きさ、形状、間隔などについて条件検討を行い、共培養できるように最適化を行った。流路形状の最適条件を図2に示す。

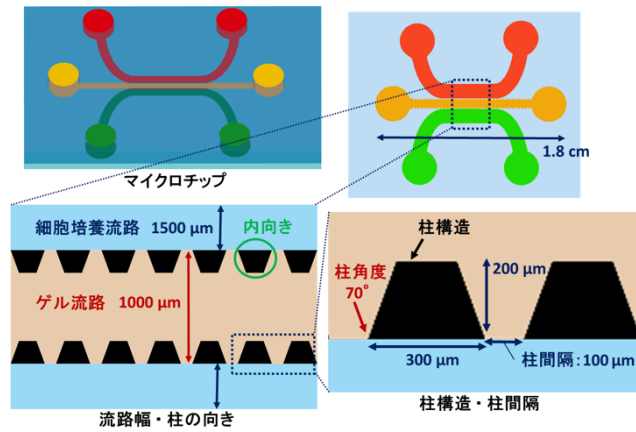


図2 マイクロチップの各部分の最適条件

血管と腫瘍組織で起こる相互作用を再現することを目指し、血管内皮細胞と乳がん細胞をマイクロチップ内でゲルを介して共培養することを試みた。各種条件検討の結果、マイクロチップ内で2種類の細胞を共培養することに成功した。さらに、両細胞の培養を継続し、細胞の様子を時間経過とともに観察した結果、血管内皮細胞は培養13時間後からゲル中に伸展し、乳がん細胞は培養46時間後からゲル中に伸展した。培養開始112時間後には2つの細胞がゲル中で接触し、最終的に2つの細胞が混合する様子が見られた。

## (3) 毛細血管網を有するマイクロ脂肪組織の構築

毛細血管から組織への薬剤の移行を再現できるデバイスの開発を目的とし、内部に血管網を有するマイクロ三次元脂肪組織の構築を試みた。PDMSを用いて図

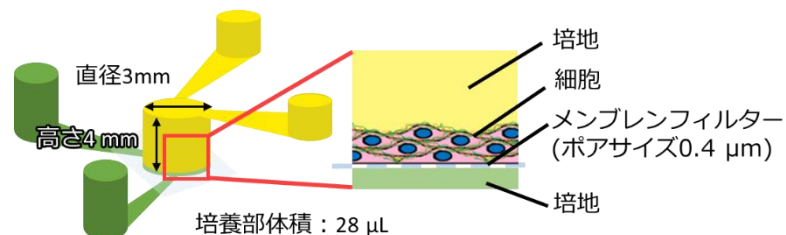


図3 三次元培養用マイクロチップ流路模式図

3に示すマイクロチップを作製した。メンブレンフィルターを介して細胞の下からも培地供給が可能であるようにチップを設計した。このチップに血管網をもつ三次元組織を構築するために、線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養を試みた。単離した各細胞のまわりに接着タンパク質であるフィブロネクチンとゼラチンによるナノ薄膜多層コーティングを調製し、これを高密度培養することで血管網を含む三次元組織を構築した。また、混合共培養法により脂肪前駆細胞との共培養にも成功し、脂肪細胞へと分化誘導させることにより血管網を有する三次元脂肪組織の構築に成功した。今後、脂肪組織への薬剤の移行性試験を行う予定である。

## (4) PDMS 流路への薬剤の吸着を抑制するコーティング法の検討

PDMS マイクロチップを作製し、タンパク質であるウシ胎児血清、親水性の高分子であるヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、疎水性のフッ素系高分子の各溶液を用いて、流路表面へコーティングを施した。その後、各流路に試料溶液を導入して、一定時間静置させた後に溶液を取り出し、各試料の回収率を求めた。

無修飾のPDMS流路の場合、疎水性低分子化合物の流路壁面への吸着が確認された。そこで、吸着を抑制するために、PDMS流路表面の親水的コーティングを行ったところ、一部その効果は確認できたものの、水に24 h浸漬することでコーティングの効果は大幅に低減した。一方、表面をフッ素系高分子でコーティングすることで、比較的長時間の吸着抑制を確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Yu Sakuta, Issey Takehara, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of a Microfluidic System Comprising Dialysis and Secretion Components for a Bioassay of Renal Clearance, *Anal. Sci.*, **2018**, 34(9), 1073-1078. 査読あり 10.2116/analsci.18P141
- ② Kae Sato, Kiichi Sato, Recent Progress in the Development of Microfluidic Vascular Models, *Anal. Sci.*, **2018**, 34(7), 755-764. 査読あり 10.2116/analsci.17R006
- ③ Yu Sakuta, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato: Development of a Multichannel Dialysis Microchip for Bioassay of Drug Efficacy and Retention, *Anal. Sci.*, **2017**, 33, 391-394. 査読あり 10.2116/analsci.33.391
- ④ Kiichi Sato, Sayaka Kikuchi, Eri Yoshida, Reina Ishii, Naoki Sasaki, Kin-ichi Tsunoda, and Kae Sato, Patterned Co-culture of Live Cells on a Microchip by Photocrosslinking with Benzophenone, *Anal. Sci.*, **2016**, 32(1), 113-116. 査読あり 10.2116/analsci.32.113
- ⑤ Miwa Sato, Naoki Sasaki, Manabu Ato, Satoshi Hirakawa, Kiichi Sato, and Kae Sato, Microcirculation-on-a-Chip: A Microfluidic Platform for Assaying Blood- and Lymphatic-Vessel Permeability, *PLOS ONE*, **2015**, 10(9), e0137301. 査読あり 10.1371/journal.pone.0137301

〔学会発表〕（計 20 件）

- ① Shota Amano, Wataru Obuchi, Kengo Watanabe, Takaaki Suzuki, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Surface coating on a PDMS microchannel for suppression of drug adsorption, RSC Tokyo International Conference, 2018 年.
- ② Risa Kozai, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of a three-dimensional vascularized tissue-on-a-chip by coculture of endothelial cells and fibroblasts, RSC Tokyo International Conference, 2018 年.
- ③ Sayaka Suzuki, Wataru Obuchi, Kengo Watanabe, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Measurement of drug absorption rate using a digestion and absorption micromodel, RSC Tokyo International Conference, 2018 年.
- ④ Seiya Kawaguchi, Yasuko Kobayashi and Kiichi Sato, Cell Culture in a Microfluidic Device for Development of a Microfluidic Glomerulus Model, 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI2017), 2017 年.
- ⑤ Yu Sakuta, Issey Takehara, Tomoki Imaoka, Kin-ichi Tsunoda, and Kiichi Sato, Development of a microkidney model mimicking glomerular filtration and tubular secretion, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), 2017 年.
- ⑥ 佐藤 記一, バイオアッセイのための生体模倣マイクロデバイスの開発, 日本分析化学会第 66 年会, 2017 年, 依頼講演.
- ⑦ Seiya Kawaguchi, Yu Sakuta, Yasuko Kobayashi, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Co-culture of glomerular endothelial cells and podocytes for development of micro glomerular model, RSC Tokyo International Conference 2017, 2017 年.
- ⑧ Anna Takahashi, Yu Sakuta, Issey Takehara<sup>2</sup>, Tomoki Imaoka<sup>2</sup>, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of a microkidney model integrating glomerulus and renal tubule functions, RSC Tokyo International Conference 2017, 2017 年.

- ⑨ Marina Hata, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Cell culture in a tubular collagen gel for development of a vascular model, RSC Tokyo International Conference 2017, 2017 年.
- ⑩ Yu Sakuta, Kin-ichi Tsunoda, and Kiichi Sato, Microchip-based Cardiovascular System for Renal Excretion Assay, *9th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2017)*, 2017 年.
- ⑪ 佐藤 記一, マイクロバイオ分析システムの開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 35 回研究会 (35th CHEMINAS), 2017 年, 受賞講演.
- ⑫ 佐藤記一, 薬物動態解析のためのマイクロ人体モデルの開発, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年, 依頼講演.
- ⑬ Kiichi Sato, Yasuko Kobayashi, Development of a Microfluidic Glomerulus Model for Diagnosis and Drug Development, 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI2016), 2016 年.
- ⑭ Yu Sakuta, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Integration of a Cardiovascular System for Renal Excretion Assay, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), 2016 年.
- ⑮ Satoshi Okazaki, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of co-culture and permeation assay method for microfluidic blood-brain barrier model, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016 年.
- ⑯ Yu Sakuta, Kin-ichi Tsunoda, and Kiichi Sato, A Microfluidic Cardiovascular System with a Microkidney: Bioassay, Parallel Dialysis and Reabsorption, MicroTAS 2015 (The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences), 2015 年.
- ⑰ Kyoka Onodera, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, 3D culture of fat and muscle cells in a microchip, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015 年.
- ⑱ Sayaka Kikuchi, Kin-ichi Tsunoda, Kae Sato, Kiichi Sato, Patterning of living cells in a microchannel by photocrosslinking reaction, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015 年.
- ⑲ Akira Hosoda, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of sampling and pretreatment methods of drugs in a microfluidic cardiovascular system, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015 年.
- ⑳ Shunya Fukuda, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Fabrication of a tubular hydrogel structure and cell culture in the tube for development of a vascular model, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015 年.

他, 国内学会発表 41 件

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 酒井康行ら, 臓器チップの技術と開発動向, シーエムシー出版, 2018, 293 ページ.
- ② 紀ノ岡正博ら, 再生医療・創薬のための 3 次元細胞培養技術, シーエムシー出版, 2018, 203 ページ.
- ③ 伊藤嘉浩ら, バイオチップの基礎と応用, シーエムシー出版, 2015, 274 ページ.

## 6. 研究組織

(1)研究分担者等 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。