

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15299

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いたオンチップ型肝小葉シミュレータの開発と創薬への応用

研究課題名(英文) Development of an On-chip Simulator of Hepatic Lobule

研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80193548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来の静置培養系と比較してより生体内の肝臓に近い環境を生体外で再現するため、マイクロ流体デバイス技術を用いて肝小葉特異的な酸素濃度勾配を形成可能な肝小葉環境模擬デバイスを開発した。

脱酸素剤の亜硫酸塩を培養液中に添加し、層流現象を利用してマイクロ流体デバイス内に酸素濃度勾配を形成する方法と、デバイス下層の一端に空気を送達し、細胞播種底面に用いたPDMSを介して酸素供給を行う方法の2種を比較検討したところ、いずれのデバイスにおいてもシミュレーション結果に一致した酸素濃度勾配が形成された。とりわけ後者においては、デバイス内肝細胞の生存率が高く、肝細胞の特異的機能を保持した高密度培養が可能となった。

研究成果の概要(英文)：During the drug development process, reproduction of the hepatic architecture and function in vitro is necessary and important to evaluate the efficacy and toxicity of the candidate drugs. In this study, we established two different types of oxygen gradient microfluidic device that mimics an in vitro hepatic lobular architecture.

After simulating the gradient of oxygen concentration, we evaluated the real oxygen concentration gradient in the devices using a sensing film coated with an oxygen-responsive dye. We also confirmed the survival and functions of hepatocytes that had been seeded inside the devices by using a live and dead cell staining kit and the indocyanine green uptake and excretion test, respectively.

研究分野：消化器肝臓病学

キーワード：マイクロ流体デバイス 肝細胞機能 肝小葉

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体の恒常性維持にとって重要な役割を果たす体内最大の臓器であり、肝細胞が有する多彩な機能を *in vitro* の系で簡便に再現できれば、生命現象の解明や毒性試験の効率化が期待できる。実際、培養肝細胞を用いたアッセイが創薬初期段階における薬効や毒性のスクリーニングに用いられている。しかしながら、生体内では門脈・肝動脈から中心静脈へ向かう類洞を介して栄養分や酸素の交換が行われることから、肝組織特異的な小葉構造が喪失した従来の静置培養では *in vivo* における肝細胞機能や薬物代謝動態を正確に把握することは困難である。

一方、工学分野ではマイクロ流体デバイスが開発され、細胞動態変化の計測によりバイオ研究や化学分析などに広く応用されつつある。その最大の特徴は微小灌流システムを備えた細胞培養環境にあり、セルエンジニアリングデバイスとして薬物動態の評価に大きな効果を発揮することが期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、マイクロ流体デバイス技術を用いることで、肝細胞の長期にわたる機能活性維持と肝小葉構造を模した物質濃度勾配を実現させ、医学・創薬における究極の *in vitro* モデルであるオンチップ型ヒト肝小葉シミュレータの開発に繋げることを目的とした。2年間の研究期間内に、以下の点を明らかにする研究計画を立案した。

- 1) 肝小葉における物質濃度勾配を再現したマイクロ流体デバイスの開発
- 2) 上記のデバイスを用いた初代培養肝細胞の機能評価系の確立

### 3. 研究の方法

#### (1) 酸素濃度勾配形成デバイスの構築

本研究では、脱酸素剤の亜硫酸塩を培養液中に添加し、層流現象を利用してマイクロ流体デバイス内に酸素濃度勾配を形成する方法と、デバイス下層の一端に空気を送達して、細胞播種底面に用いた PDMS を介して酸素供給を行う方法の2種を比較検討した。前者では、微細な構造を形成可能なシリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を、半導体技術を用いて作製した流路形状の型に流し込んで焼き固めることで T 字型の微細流路が転写されたチップを作製した (図 1 A)。一方、後者の方法では、デバイスの片側のみから PDMS を介して酸素が常時供給され、これが培養液中で自然拡散をすることで酸素濃度勾配が形成される (図 1 B)。

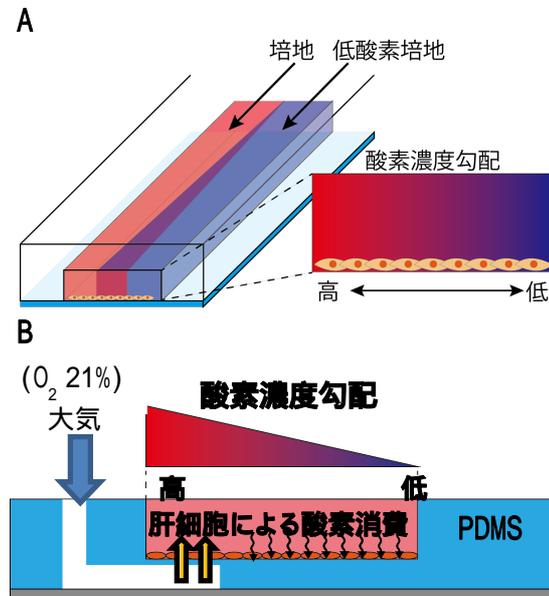


図 1. 2種類の酸素濃度勾配流体デバイスの設計

#### (2) 数値シミュレーションによる流体解析

作製したデバイス内で実際の肝小葉と同様の酸素濃度勾配を形成するため、設定した流量およびデバイス形状において流路内で適正な酸素濃度勾配の形成が可能かを、製図ソフト (Auto CAD 2014, Autodesk Inc.) によって疑似的にモデリングしたデバイスを有限要素解析ソフト (COMSOL Multiphysics, COMSOL Inc.) に読み込んで評価した。

#### (3) 酸素濃度勾配の可視化

上記シミュレーションの妥当性を証明するため、発光特性が酸素分圧によって変化する酸素応答性色素の白金オクタエチルポルフィリン (Sigma-Aldrich) を PDMS に混合し、スピンコートを用いて酸素センシングフィルムを作製した。次いで、蛍光顕微鏡観察像を image J ソフトウェアにて解析することで流路内の蛍光強度分布を測定した。

#### (4) 初代肝細胞の分離と培養

マウスからコラゲナーゼ灌流法を用いて肝細胞を分離し、コラーゲンコートを行ったデバイスならびに対照として通常のコラーゲンコート・ディッシュ上に  $3.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。播種 24 時間後に肝細胞の定着を確認した上で、ディッシュは培養液を交換、デバイス内にはシリンジポンプを用いて培養液を流量 2  $\mu$ l/min で送液し、さらに 24 時間の灌流培養を行った。播種 48 時間後に、Calcein AM (同仁化学) 15  $\mu$ l と、Propidium iodide solution (PI, 同仁化学) 12  $\mu$ l を混合した染色液を加え、37 °C のインキュベーター内に 15 分間静置することで生死細胞を判別した。

#### (5) 肝細胞の生存率および機能の評価

亜硫酸ナトリウム存在下で肝細胞が生存可能かを評価するため、96-well コラーゲンプレートに初代肝細胞を播種し、24 時間後に亜硫酸ナトリウムを 0~0.1 %の濃度で加えた上で、播種48時間後における細胞数を Cell counting kit-8 (同仁化学研究所) を用いて計測した。また、肝細胞機能を評価する指標として、単離した肝細胞をコラーゲンコートしたデバイスおよび 35 mm 培養ディッシュに  $3.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した後、24 時間後に ICG を 5 mg/ml の濃度で添加した。30 分後に ICG の取り込みを、ついで通常の培養液に置換して 6 時間に排泄能を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) デバイス内における酸素濃度勾配のシミュレーション

COSMOL によって得られたデバイス流路内の 2 次元空間における酸素濃度勾配のシミュレーション結果を図 2 に示す。脱酸素剤を用いた層流現象を利用して酸素濃度勾配を形成する方法では、デバイス流路端の 0  $\mu$ m から 2000  $\mu$ m にかけて線形的な酸素濃度勾配を形成する流量条件が 2  $\mu$ l/min であることを確認した(図 2 A)。また、デバイス一端の下層に空気を送達して PDMS を介して酸素の供給と自然拡散を行う方法を用いた場合にも、肝小葉内に近似的な酸素濃度の勾配を形成可能なことが示された(図 2 B)。

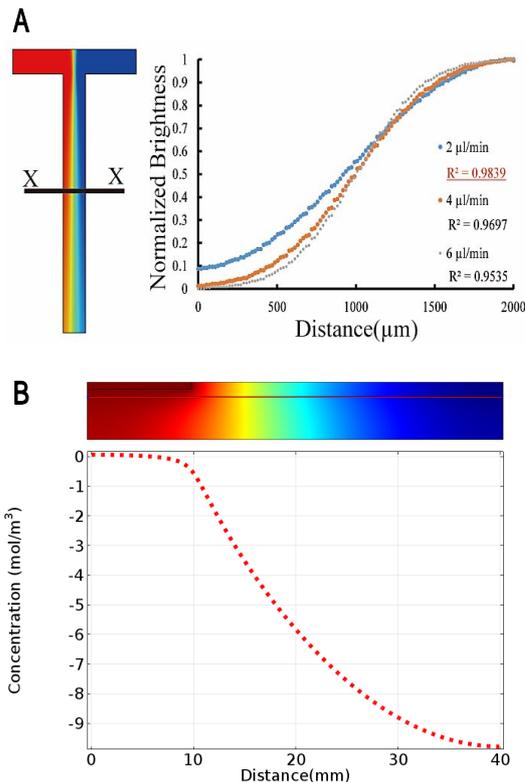


図 2 . 酸素濃度勾配のシミュレーション

#### (2) 酸素応答性色素膜による酸素濃度勾配の可視化

酸素応答性色素を含んだ酸素センシングフィルムを用いてデバイス内における酸素濃度勾配を可視化した際の蛍光顕微鏡像と解析グラフを、図 3 に示す。

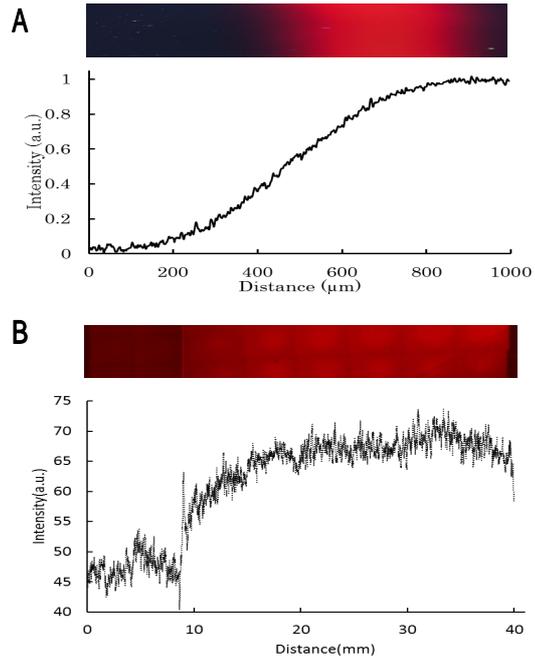


図 3 . 酸素濃度勾配の可視化

脱酸素剤を用いた層流形成(図 3 A)ならびに酸素の自然拡散を利用した方法(図 3 B)のいずれにおいても、シミュレーション結果に近似的な酸素濃度勾配が形成された。したがって、シミュレーション結果の妥当性が証明されるとともに、両デバイスを用いることで肝小葉における酸素濃度勾配形成が実現可能なことが示された。

#### (3) 初代肝細胞のデバイス内培養における生存率

初代肝細胞をコラーゲンコート・ディッシュもしくはデバイス内に播種し、24 時間後からデバイス内に培養液を送液して、播種 48 時間後における生死細胞を判別したところ、両者とも 80 %近い生存率が確認された(図 4)。

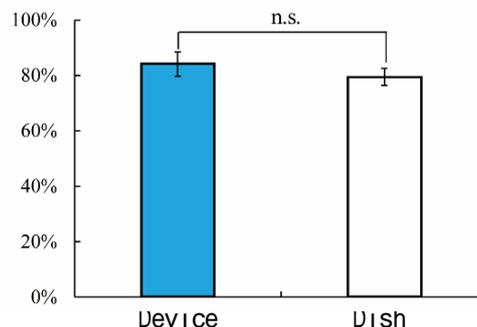
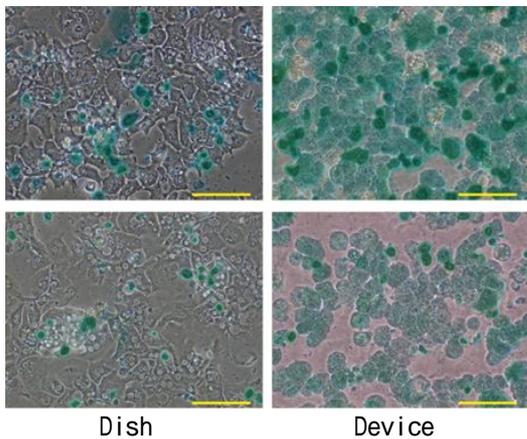


図 4 . 初代培養肝細胞の生存率

#### (4) 肝細胞の機能評価

マウスの初代肝細胞をコラーゲンコート・ディッシュもしくはデバイス内に播種し、24 時間後に ICG 染色を行った。コラーゲンコート・ディッシュ上で培養した肝細胞のほとんどが ICG を取り込んでいないのに対して、デバイス内で培養した大半の肝細胞に ICG の取り込みが認められた (図 5 上段)。また、通常の培養液に置換した 6 時間後には、一度 ICG を取り込んだデバイス内の肝細胞が ICG を排泄している像が確認できた (図 5 下段)。この結果より、デバイス内で実現可能な初代培養肝細胞の高密度培養と酸素の連続供給が、肝細胞の物質取り込み・排泄機能の維持を促進していることが明らかになった。



**図 5 .コラーゲンコート・ディッシュならびにデバイス内に播種した肝細胞による ICG の取り込み (上段) と排泄 (下段)**

#### (5) 亜硫酸ナトリウム存在下での肝細胞の生存率

一般に、肝小葉における酸素濃度は門脈域が 70 mmHg、中心静脈域が 40 mmHg と言われている。この肝小葉内の酸素濃度を形成可能な亜硫酸ナトリウム濃度は、それぞれ 0.06 % (門脈域) および 0.08 % (中心静脈域) と算出された。しかしながら、この条件下での播種後 48 時間後 (亜硫酸ナトリウム添加 24 時間後) における肝細胞の生存率は、約 60 % に低下した。一方、デバイス一端の下層に空気を送達して PDMS を介して酸素の供給と自然拡散を行った方法では、肝細胞の生存率は約 80% と良好であり、肝小葉に近似的な酸素濃度の勾配下で高密度培養を行う上でより優れたデバイスであることが示された

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1) Nakano Y, Nakao S, Sumiyoshi H, Mikami K, Tanno Y, Sueoka M, Kasahara D, Kimura

H, Moro T, Kamiya A, Hozumi K, Inagaki Y. Identification of a novel alpha-fetoprotein-expressing cell population induced by Jagged1/Notch2 signal in murine fibrotic liver. *Hepatol Commun* 2017 (in press)

DOI:10.1002/hep4.1026

2) Komachi T, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Takeoka S, Nagase Y, Okamura Y. Adhesive and robust multi-layered poly(lactic acid) nanosheets for hemostatic dressing in liver injury model. *J Biomed Mater Res Part B* 2017 (in press)

DOI:10.1002/jbm.b.33714

3) Anzai K, Chikada H, Tsuruya K, Ida K, Kagawa T, Inagaki Y, Mine T, Kamiya A. Foetal hepatic progenitor cells assume a cholangiocytic cell phenotype during two-dimensional pre-culture. *Sci Rep* 6: 28283, 2016.

DOI:10.1038/srep28283

4) 笠原大瑚、住吉秀明、稲垣 豊、木村啓志：微小環境制御による肝小葉モデルの構築．東海大学工学部紀要 56: 75-81, 2016 [http://www.u-tokai.ac.jp/academics/undergraduate/engineering/kiyou/wabun\\_2016.html](http://www.u-tokai.ac.jp/academics/undergraduate/engineering/kiyou/wabun_2016.html)

5) Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Sato T, Iida Y, Okada Y, Tanaka M, Hayashi H, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y. A combination of mitochondrial oxidative stress and excess fat/calorie intake accelerates steatohepatitis by enhancing hepatic CC chemokine production in mice. *PLoS ONE* 11: e0146592, 2016.

DOI:10.1371/journal.pone.0146592

6) Rieder F, Bettenworth D, Imai J, Inagaki Y. Intestinal fibrosis and liver fibrosis -consequences of chronic inflammation or independent pathophysiology? *Inflamm Intest Dis* 1: 41-49, 2016.

DOI:10.1159/000445135

7) Yokomori H, Inagaki Y, Ando W, Hara M, Komiyama T, Kojima S, Oda M, Kuroda H, Suzuki Y, Okazaki I. Spatiotemporal expression of matrix metalloproteinase -1 in progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Mod Human Pathol* 1: 11-20, 2016.

DOI:10.14312/2397-6845.2016-3

8) Tsuruya K, Chikada H, Ida K, Anzai K, Kagawa T, Inagaki Y, Mine T, Kamiya A. A paracrine mechanism accelerating expansion of human induced pluripotent

stem cell-derived hepatic progenitor-like cells. *Stem Cells Dev* 24: 1691-1702, 2015.

DOI:10.1089/scd.2014.0479

- 9) Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatol Res* 45: 29-37, 2015.

DOI:10.1111/hepr.12349

〔学会発表〕(計 37 件)

- 1) 笠原大瑚、住吉秀明、柳川享世、中野泰博、紙谷聡英、木村啓志、稲垣 豊：酸素濃度勾配制御による肝小葉モデルの構築。第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術大会、2016 年 11 月 25 日、富山県富山市
- 2) Inagaki Y. Pathophysiological interplay between fibrosis and regeneration of the liver. *Liver Symposium-5 "Update on Liver Fibrosis"*, Asian Pacific Digestive Week 2016, 2016.11. 4, Kobe, Japan
- 3) Inagaki Y. Biomarker of fibrosis. Session 9: Mechanism of Liver Fibrosis. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2016. 2. 23, Tokyo, Japan
- 4) 笠原大瑚、住吉秀明、柳川享世、中尾祥絵、茂呂 忠、木村啓志、稲垣 豊：微小環境制御による肝小葉構造の構築。第 29 回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2015 年 10 月 31 日、秋田県秋田市
- 5) 稲垣 豊、住吉秀明：肝線維化と再生の病態連繫。レビュー 1 「肝線維化研究のアップデートングエッジ」、第 22 回肝細胞研究会、

2015 年 6 月 4 日、鳥取県米子市

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 稲垣 豊. 肝線維化研究の進歩と治療の展望. 日本肝臓学会 50 年のあゆみ、日本肝臓学会編、大村印刷、東京、2015, pp.175-181.

〔産業財産権〕  
出願・取得なし

〔その他〕

ホームページ URL:

<http://matrix.med.u-tokai.ac.jp/>

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/matrix.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80193548

(2) 研究分担者

紙谷 聡英 (KAMIYA, Akihide)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30321904

(3) 連携研究者

木村 啓志 (KIMURA, Hiroshi)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：40533625

(4) 研究協力者

なし