

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01728

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患を再現する小腸－肝臓・オン・チップ

研究課題名（英文）Gut-Liver-on-a-Chip to investigate the progression mechanisms of non-alcoholic fatty liver diseases

研究代表者

亀井 謙一郎 (Kamei, Ken-ichiro)

京都大学・高等研究院・研究員

研究者番号：00588262

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）：非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は、進行すると肝硬変などの重篤な状態に至り、最終的には肝移植が必要となる。現在、効果的な治療薬は存在せず、腸や肝臓の相互作用が複雑に作用しているため、メカニズムは未解明である。我々の研究チームは、肝臓と腸の相互作用に焦点を当て、ヒト多能性幹細胞から作製したオルガノイドを用いて多組織チップを開発し、NAFLDを再現した。このチップには各臓器の機能をリアルタイムで測定できるセンサーを搭載し、遺伝子解析や代謝物測定を通じてNAFLDの発症から重篤化までのプロセスを解明した。これにより、NAFLDの理解が深まり、将来的な予防や治療法の開発への貢献を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は進行すると肝硬変などの深刻な状態に至り、肝移植が必要となりますが、効果的な治療薬はまだありません。NAFLDは腸や肝臓など複数の臓器の相互作用に関連しているため、そのメカニズムは解明されていません。我々の研究チームは、ヒト多能性幹細胞から作製した肝臓と小腸のオルガノイドを用いた多組織チップを開発し、NAFLDを再現しました。各臓器の機能をリアルタイムで測定できるセンサーを備え、遺伝子解析や代謝物測定を通じてNAFLDの発症から重篤化までのプロセスを解明しました。これにより、NAFLDの理解が深まり、予防や治療法の開発に貢献することを目指しています。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a serious condition that can progress to liver cirrhosis, making liver transplantation the only ultimate treatment. Effective treatment could eliminate the need for transplants, but no such drugs exist yet. The complexity of NAFLD arises from its association with the interaction of multiple organs, including the gut and liver, and the full mechanisms remain unclear. Therefore, a simple in vitro NAFLD model is urgently needed.

Our research team has developed a multi-organ chip featuring liver and gut organoids from human pluripotent stem cells, successfully replicating NAFLD. The chip includes sensors for real-time measurement of organ functions, allowing us to analyze NAFLD progression over time. Using genetic analysis and metabolite measurement, we aim to elucidate the process from NAFLD onset to severity. These insights significantly enhance our understanding of NAFLD, aiming to develop preventive and therapeutic measures in the future.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 組織チップ 腸肝関連 ヒト多能性幹細胞 マイクロ流体デバイス オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

近年増加傾向にある NAFLD はメタボリックシンドロームの一種であり、本邦でも約 1,000 万人の患者がいると言われている。重篤化し肝硬変などになると生体肝移植しか治癒の道は残されていないため、NAFLD の時点での治癒が望ましい。一方で、NAFLD は多臓器不全を誘発する疾患であるため生体外でのモデル化が非常に困難であり、これまで有用な治療法・治療薬は開発されていない。よって、NAFLD の発症・重篤化機構を解明し、創薬へと繋げるためには生体外モデル系の研究・開発が急務となっている。

応募者はこの問題を解く鍵として、小腸—肝臓連関(GLA)に着目した(Fig. 2)。GLA は NAFLD において、①小腸における脂質吸収、②肝臓における脂質貯蔵・炎症反応と線維化、③肝臓から放出された炎症性サイトカインなどによる小腸の炎症反応、と互いに連関しながら重篤化に寄与することが示唆されているが、まだ分子作用機序については不明な点が多いことが、治療薬の開発に至っていない原因の一つである。

そこで本研究では、GLA における NAFLD 病態を生体外で再現した「Organs on a Chip (組織チップ)」を開発する。これは、ナノ・マイクロ工学を基に、従来のマイクロプレートを用いた細胞培養系では困難であった組織構造とその機能、組織間相互作用をより高度に微小空間で再現し、生理・病理作用機構を生体外で再構築することで新しい知見を得るために考案されたマイクロ流体チップである。これまでに応募者は研究分担者の平井と連携してこれまでに、がん細胞と心筋細胞を単一チップ上に搭載し連結する事で、従来法では困難だった抗がん剤の副作用を生体外における再現に成功しており(Kamei et al., *RSC Adv.*, 2017) 本研究の基礎技術となる。

GLA を再現する組織材料にはヒト多能性幹細胞(hPSC)を用いる。hPSC は無限回の自己複製能と多分化能を持つ特徴から、初代培養細胞や細胞株では困難であった単一細胞材料から複数組織を獲得でき、多臓器連関における生理・病理反応の再現が可能となる。さらに、患者由来の iPS 細胞や遺伝子編集技術を使うことで、疾患特異的組織チップの開発が可能となる。応募者はこれまでに、hPSC を分化誘導して作成した肝臓組織チップの開発に成功しており(Kamei et al., *Biomed. Microdev.*, 2019; Yoshimoto et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020) 本研究の目標達成に有効なツールとなる。また、hPSC から生体外において組織構造を人為的に作製することができるオルガノイド技術の発展により、より生体内に近い生体外モデルの創出が可能になってきた。一方で、このような hPSC 由来オルガノイドの有用性は認識されつつも、これを用いた疾患モデル開発に関する報告は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、応募者がこれまで培ってきた研究成果を発展させることによって、「hPSC 由来小腸・肝臓オルガノイドを搭載した組織チップを開発、NAFLD の発症と重篤化機構を解明」することを目的とする。これを達成するために、以下の項目を実施する。

実施項目 1 : NAFLD を再現する組織チップの開発

実施項目 2 : ヒト多能性幹細胞由来小腸・肝臓オルガノイドの組織チップへの搭載

実施項目 3 : *in vitro* NAFLD モデルの創出と発症・重篤化機構解明

これらを達成することで、NAFLD だけでなく生体の恒常性維持機構や異種臓器組織間の情報伝達機構と役割、また疾患の重篤化(例：糖尿病やがん悪液質)の作動機構を解明できる。これが我々の目指す学術的な「問い」とそれに対する戦略である。

3. 研究の方法

実施項目 1 : NAFLD を再現する組織チップの開発

本研究で開発する組織チップの要素技術となるマイクロ流体デバイス(μ FD)を開発する。これは従来のマイクロプレートを用いた細胞培養・アッセイでは困難であった、

① 3次元加工技術により組織構造を再現した組織培養チャンバの搭載

② パルプ・ポンプを搭載することによる組織間相互作用な制御

③ 半導体加工技術を駆使して組織挙動変化をリアルタイム計測するセンサの搭載

を可能とする。

本 μ FD の特徴的な点として、各組織に適した培養液の供給と循環によって組織間相互作用の再現の両方を同時に達成できる点である。本 μ FD ではこれを達成するために、臓器間を培養液が循環する流路層と各臓器に適した培養液を供給する流路層を別々に設け、それらは多孔質膜(孔径 0.4~8 μ m; 孔密度 2×10^6 mm² 程度)を各層間に導入して実現する。

μ FD 構成材料としては生体適合性・光透過性・ガス透過性の高い polydimethylsiloxane(PDMS)を使用する。PDMS は伸展性がありマイクロバルブ・ポンプを μ FD に内蔵できる。各オルガノ

イドの培養チャンバはマイクロ流路を介して接続し、バルブを用いて開閉を制御する。平井が開発した独自の高精度三次元微細加工技術である Gray-Scale Lithography を活用し (Ma et al., *J. Microelectromech. Syst.* 2015) 各臓器に適した組織構造を有する培養チャンバを設置する。

また、小腸チャンバには組織バリア機能を評価する TEER 測定電極を搭載する。従来の細胞培養インサートを用いた TEER 測定は再現性が乏しく、またインピーダンス測定による TEER 値算出は困難であった。本研究では μ FD に TEER 測定電極を内蔵してインピーダンス計測による TEER 値を算出し、小腸の組織バリアとしての機能を経時的に測定することで、発症・重篤化過程のメカニズムの解明につなげる。

実施項目 2 : ヒト多能性幹細胞由来小腸・肝臓オルガノイドの組織チップへの搭載

本研究の組織チップに搭載する hPSC 由来 3D オルガノイド作製法を開発する。従来の細胞培養プレートを用いたオルガノイド作製法では、再現性の低さや、組織チップがオルガノイドに最適化されていないことが問題であった。また、生体内における薬物動態や組織間相互作用は血管を介しているが、殆どのオルガノイドには血管網がない。本項目では、hPSC 由来各種組織細胞を用いて血管網を導入した小腸、肝臓オルガノイドを作製、実施項目 1 で開発する μ FD に導入する。応募者は、既に μ FD を用いたオルガノイド形成法の開発に成功しており (Kamei et al., *Biomed. Microdev.* 2019) これを本研究に応用する。各オルガノイドは、免疫染色や RNA-seq、代謝、各組織の機能に基づき評価する。

実施項目 3 : *in vitro* NAFLD モデルの創出と発症・重篤化機構解明

本実施項目においては、実施項目 1、2 で開発した、肝臓-小腸チップに NAFLD 誘導因子である遊離脂肪酸 (FFAs) を小腸培養チャンバから添加、肝臓での NAFLD 発症・重篤化を再現することで、そのメカニズム解明を行う。

4 . 研究成果

本研究では、NAFLD の開始と進行を 1 日および 7 日間それぞれ遊離脂肪酸 (FFA) で処理することにより、ヒトの腸肝軸 (GLA) の *in vitro* モデルとして、ヒト腸および肝臓細胞株をマイクロ流体デバイスによって相互接続し、閉鎖循環ループ内で共培養する集積腸肝チップ (iGLC) プラットフォームを開発した。共培養された Caco-2 小腸細胞と HepG2 肝細胞は、FFA 処理に対するアポトーシスからの保護効果を示すが、単独培養された細胞はアポトーシスを誘発した。表現型と遺伝子発現解析により、FFA 処理された腸および肝細胞が細胞内脂肪滴を蓄積し、銅イオンおよび小胞体ストレスへの細胞応答に関連する遺伝子発現が増加することが明らかにした。in vitro ヒト GLA モデルとして、iGLC プラットフォームは NAFLD のメカニズムを調査するための動物実験の代替として機能する可能性を示した (Yang et al., *Communications Biology*, 2023)。

さらに、新しい iGLC プラットフォームも確立した。現在の GLA-MPS では、腸および肝細胞の培養における生理学的に関連する流れの重要性が十分に考慮されていなかった。加えて、個々の臓器灌流、循環流、および臓器組織機能の統合が単一のデバイスで達成されていなかった。ここでは、2 つの細胞培養チャンバーと、それぞれに個別に適用される灌流流、細胞培養チャンバー下にある多孔性膜を介して相互接続するオンチップ空気圧マイクロポンプを備えた循環チャンネルを統合した GLA-MPS を開発した。計算流体力学シミュレーションを用いて流体せん断応力 (FSS) を分析し、腸 (Caco-2) および肝 (HepG2) 細胞に対して生理学的に関連する FSS を適用できることを確認した。生理学的に関連する流れの下で、GLA-MPS の Caco-2 および HepG2 細胞は、それぞれ 95% および 92% の細胞生存率を維持していることを確認した。さらに、機能タンパク質 (Caco-2 の Zonula Occludens 1、および HepG2 のアルブミン) の発現が増強されていた。GLA 相互作用を実証するために、Caco-2 細胞にのみポ多糖 (LPS) を適用して炎症性腸疾患を再現した。誘導型一酸化窒素合成酵素などの炎症性タンパク質が Caco-2 および HepG2 細胞で誘導された。本研究で提示された GLA-MPS は、炎症性疾患など、組織間相互作用に関連する疾患モデルの多様な応用において高度な *in vitro* モデルとして適応可能であることを示した (Yang et al., *Biomicrofluidics*, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yang Jiandong, Hirai Yoshikazu, Iida Kei, Ito Shinji, Trumm Marika, Terada Shiho, Sakai Risako, Tsuchiya Toshiyuki, Tabata Osamu, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Integrated-gut-liver-on-a-chip platform as an in vitro human model of non-alcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04710-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yang Jiandong, Imamura Satoshi, Hirai Yoshikazu, Tsuchiya Toshiyuki, Tabata Osamu, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Gut-liver-axis microphysiological system for studying cellular fluidic shear stress and inter-tissue interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 044113 ~ 044113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0088232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Dongxiao, Yang Jiandong, Hirai Yoshikazu, Kamei Ken-ichiro, Tabata Osamu, Tsuchiya Toshiyuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Microfabrication of polydimethylsiloxane-parylene hybrid microelectrode array integrated into a multi-organ-on-a-chip	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 017002 ~ 017002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/aca265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abdalkader Rodi, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 35
2. 論文標題 An efficient simplified method for the generation of corneal epithelial cells from human pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1016 ~ 1029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-022-00713-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Satoshi, Yoshimoto Koki, Terada Shiho, Takamuro Kaho, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 In vitro culture at 39 °C during hepatic maturation of human ES cells facilitates hepatocyte-like cell functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09119-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimoto Koki, Maki Koichiro, Adachi Taiji, Kamei Ken-ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Cyclic Stretching Enhances Angiocrine Signals at Liver Bud Stage from Human Pluripotent Stem Cells in Two-Dimensional Culture	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2023.0148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HIRAI Yoshikazu	4. 巻 89
2. 論文標題 ナノマイクロ加工を応用したボディ・オン・チップの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society for Precision Engineering	6. 最初と最後の頁 690 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2493/jjspe.89.690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平井義和, 田畑修	4. 巻 33
2. 論文標題 3次元リソグラフィ技術による生体模倣システムの構築	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 22-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kenichiro Kamei
2. 発表標題 Reverse Bioengineering to recreate multicellular animals in vitro
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Biomedical Engineering, International Workshop on Nanodevice Technologies 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 亀井 謙一郎
2. 発表標題 リバース・バイオエンジニアリングによる生物の理解とその展望
3. 学会等名 日本機械学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenichiro Kamei
2. 発表標題 Gut-Liver-Axis on a Chip for studying disease progression in vitro
3. 学会等名 MARSS 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiandong Yang, Yoshikazu Hirai, Ken-ichiro Kamei, Osamu Tabata, Toshiyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Simulation Model to Characterize Volumetric Flow Rate Generated by Polydimethylsiloxane Peristaltic Micropump for Body-on-a-Chip
3. 学会等名 The 18th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruki Goda, Naoyuki Ishida, Kozo Furuta, Kazuhiko Izui, Fred van Keulen, Ken-ichiro Kamei, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Yoshikazu Hirai
2. 発表標題 Electrode Design Using Multi-Material Topology Optimization for Accurate Measurement of Trans-Epithelial Electrical Resistance in Organ-on-a-Chip
3. 学会等名 The 49th International Conference on Micro- and Nano Engineering (MNE 2023), Berlin, Germany (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taichi Shikama, Takato Watanabe, Masaya Zetsu, Yoshikazu Hirai, Mazin Joude, Masahiro Hasuo
2. 発表標題 Accuracy Estimation of All-Optical Thermometry Between 283-373 K Using the NV--Center Zero-Phonon Line Spectrum of Diamond Microparticles
3. 学会等名 The 2023 MRS Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 舌雅也, 渡辺嵩都, 出原貴央, 四竈泰一, 平井義和, 蓮尾昌裕
2. 発表標題 NV-中心ゼロフォノン線ピーク波長によるナノダイヤモンド粒子選別マイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会, 応用物理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 培養液循環装置	発明者 亀井 謙一郎、今村 聡、吉川 あけみ	権利者 国立大学法人京 都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-171186	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	平井 義和 (Hirai Yoshikazu) (40452271)	京都大学・工学研究科・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関