

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05745

研究課題名（和文）複数臓器チップによる臓器間相互作用の観測と解明

研究課題名（英文）Crosstalks between different organs cultured in OrganS on-a-chip

研究代表者

酒井 康行（Sakai, Yasuyuki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：00235128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 37,900,000円

研究成果の概要（和文）：本計画研究では、汎用性の高い複数臓器チップを開発し、臓器間相互作用を生体外で観測、メカニズムを解明し、本領域が目指す「仮想生体」の構築に貢献することを目的とした。臓器チップを用いた腸管と肝の共培養で観測された薬物代謝活性亢進のメカニズム一端を明らかとした。またヒト薬物動態プロファイル再現のための肝組織の高密度・高機能化を行った。さらに、動物にて、肝での胆汁うっ滞時における腎臓への薬物蓄積には、腎臓における薬物排出トランスポーターの発現低下が関わることを見出し、培養系での再現も一部達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数臓器を灌流培養するチップを用いて臓器間相互作用を報告した例は、世界的にも未だ少ない。腸管と肝の薬物代謝は初回通過効果として一括りにされることが多いが、臓器チップを用いて個別臓器の寄与と両者の相互作用をも定量化できることが利点である。さらに、本研究で観測された共培養時の薬物代謝酵素の亢進について、メカニズムの一端を明らかにできたことは、今後の培養系を基礎としたヒト影響予測にとって高い価値のあるものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to develop a universal multi-organ chip, observe the interactions between organs in vitro, elucidate the mechanisms, and contribute to the construction of a "virtual physiological human" that is the goal of this research area. The mechanism of the enhancement of drug metabolic activity observed in the coculture of intestine and liver cells using the organ chips was clarified. In addition, we developed high-density and highly functional liver tissues to reproduce human pharmacokinetic profiles. Furthermore, we found that the accumulation of drugs in the kidneys during hepatic bile stasis in animals is associated with decreased expression of drug efflux transporters in the kidneys, which was partially reproduced in the in vitro culture system.

研究分野：生物化学工学

キーワード：マイクロフィジオロジカルシステム 小腸 肝臓 腎臓 臓器間相互作用 三次元培養 数理モデル化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多様で非線形な人体応答をメカニズム基盤で理解することを目指す場合、医学・薬学での動物実験や臨床試験等のインビボからのアプローチでは、因子の相関関係は分かるが因果関係の解明が難しい。これに対して計画研究 A03 として本研究が参加する学術変革領域 B「仮想人体構築学」(杉本昌弘代表)が目指す理工学的な人体理解のアプローチでは、システム生物学に代表されるように、生体をシステムとして捉え、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどの多階層の網羅的分子計測結果を基に、その挙動を数理モデルで記述しようとする。

このアプローチの究極のゴールは、人体応答を数理的に記述する「仮想人体」であろう。この構築のためには、従来のインビボからのアプローチでは全く不十分であり、培養実験系と数理モデルという二つの理工学的なアプローチを統合し、モデルの開発 培養系での評価と検証 モデル上での仮想実験による新たな仮説の設立 検証実験、というように両アプローチ間での仮説検証を繰り返す必要がある。特に、培養細胞系では臓器の組合せが任意であり、目的の臓器の組合せのみの相互作用を純粋に観測可能な点が大きな利点となる。

複数臓器を灌流培養するチップを用いて臓器間相互作用を報告した例は、世界的にも未だ少ない。我々は、膜型培養器()や従来のガラス製灌流型バイオリアクター()を用いて、腸管と肝臓の共培養による代謝酵素の非線形的更新を報告してきているが、メカニズムの解明には至っていない。最近、オンチップ培養技術を用いて腸管と肝臓に免疫系の細胞をも入れることで、ヒトに近い炎症刺激時の遺伝子発現やサイトカインの分泌が見られたことが報告されている()。メカニズム解明には至っていないが、複数臓器チップの人体システム理解における有効性を示す例である。

2. 研究の目的

本計画研究では、A02 班が開発する個別臓器チップをモジュール化して自由に組み合わせられる汎用性の高い複数臓器チップを開発し、臓器間相互作用を生体外で観測、メカニズムを解明することを目的とする。さらに、解明した臓器間相互作用を考慮した異物解毒解析を行い、A01 班が構築するマルチスケール数理モデルと相互に仮説検証を繰り返すことで、本領域が目指す「仮想生体」の構築に貢献する。

3. 研究の方法

本計画研究は、領域の3つの計画班(A01-03)の分担と密な協体制のもと、汎用性の高い複数臓器チップを開発し、まずはヒト生体において既知の臓器間相互作用を生体外で観測する。次に、単純化と仮説検証が可能であるという培養系の強みを最大限活用し、メカニズムを解明する。研究領域への貢献と内部連携としては、まずは A02 班が開発する個別臓器チップをモジュール化し、本計画研究で開発する複数臓器チップ上で任意の組み合わせが検討できるようにする。次に、臓器間相互作用を取り込んだ時系列データを取得して A01 班が構築するマルチスケール数理モデルにフィードバックする。最終的には培養系データと数理モデルでのシミュレーションとの相互仮説検証を繰り返すことで、本領域が目指す「仮想生体」の構築に貢献する。

具体的には、杉浦が複数臓器チップの開発を、酒井が臓器間相互作用の観測を、荒川がメカニズムの解明を分担する。すでに申請者らは、ヒト消化管細胞と肝細胞を組み合わせた複数臓器チップにおいて、多様な薬物代謝関連酵素活性が上昇するという結果を得ている。そのため、初年度はこれらのメカニズム解明を中心に取り組み基盤とノウハウを拡充する。さらに次年度以降、酒井らが見出した相互作用について異物解毒データを解析し、そのメカニズムを明らかにすることで、より一般化を図る。これらの実験を通して複数臓器の応答を時系列データとして観測できるよう A01 班にフィードバックし、シミュレーション結果との比較、仮説検証とシステムの改善を繰り返し、生体のシステムの応答が再現可能なデバイスを構築する。

4. 研究成果

(1) 複数臓器チップを用いる腸管・肝の相互作用解析(酒井, 荒川)

代表者の酒井は、協力研究者の木村の開発したオンチップ送液型の MPS デバイスを用い、腸管と肝細胞の共培養を実施した。薬物代謝の計測および解析は分担者の荒川と行った。その結果、灌流に加えて酸素透過膜を用いるオンサイト酸素供給にて、両細胞の相互作用により薬物代謝亢進を観測した。また、共培養による肝の薬物代謝活性の向上は、灌流に加え酸素直接供給時により顕著となることを確かめた。両細胞の高機能発現を可能とする培養液の設定は難題であるため、今回は肝機能維持に焦点を当てた培養液を用い、機能解析も専ら肝について行った。網羅的な発現解析を行い(図1)、単独培養時と比較して、ステロイド代謝、薬物代謝、細胞付着、マトリクス産生等の Terms が上位 10 位以内にリストされた。このうち、解毒第 1 相のチトクローム(CYP) P450 活性の向上にアラキドン酸カスケードが関与していることが推察された。そこで、単独培養の肝細胞へアラキドン酸を添加したところ、CYP 活性の亢進が見られたことから、両細胞間の相互作用の一端を説明することができたと考えている。

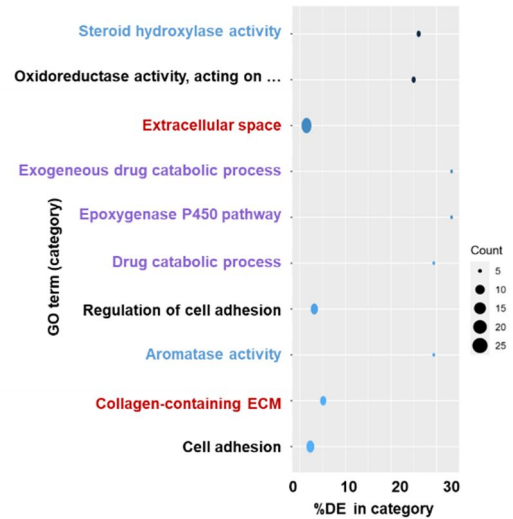
(2) 臓器スケーリングの最適化
(杉浦・荒川)

分担者の杉浦は、ヒトの薬物動態プロファイルの達成のために必要な OrganS-on-a-chip の設計を、彼らが開発してきている圧力駆動型デバイスを用いて行った。すなわち、肝臓の三次元灌流デバイスを開発し、分担者の荒川らと共に、Hep G2 細胞の灌流培養による肝機能を評価した。

まず、シミュレーションによって、腸肝連結培養系の肝細胞の細胞当たりの代謝活性の向上と、細胞数/培養液体積比の向上が重要であることを確認した。様々な三次元培養手法を比較検討し、最終的にメンブレンインサート上に肝細胞を層状に培養して培養液を灌流

する方法を開発し、静置培養と比較して優位な肝機能の発現を確認した。また、この組織内に微小血管を自発形成させて培養液を灌流する方法を開発し、2週間にわたって三次元組織を培養維持できることを確認した。

図1. 腸管と肝の灌流共培養時に亢進が見られた Gene Ontology Terms . このうち、薬物代謝酵素の非線形的亢進に化によるものとして、アラキド酸カスケードによる CYP のエポキシ化プロセスがリストされた。



(3) 腎・肝相互作用の解析 (荒川)

荒川は腎肝相互作用のメカニズムを探索するため、A01 班の杉本と共同し、胆管結紮 (BDL) マウス及び対照 (sham) マウスから腎臓を抽出し、オミクス解析を行った。その結果、胆汁うっ滞時における腎臓への薬物蓄積には肝臓における薬物クリアランスの変化に加え、腎臓における薬物排出トランスポーターMRP6 の発現低下が関わることを見出した。また、本モデルにおいて MRP6 基質 cisplatin の腎毒性が増強されることを見出し、肝障害時における薬物の腎蓄積上昇が薬物誘発性腎障害のリスク増大につながることを示した (図2)。

本結果を in vitro 試験系で再現するため、胆汁側と血液側を区別して培養可能な新規肝細胞培養系の構築を試みた。肝細胞の胆管腔形成に関わる密着結合タンパク質を複数見出し、これらタンパク質を合成・精製後に培養器材に配置することで、胆管が培養器材側へ開口する肝細胞の培養手法の構築に成功した。

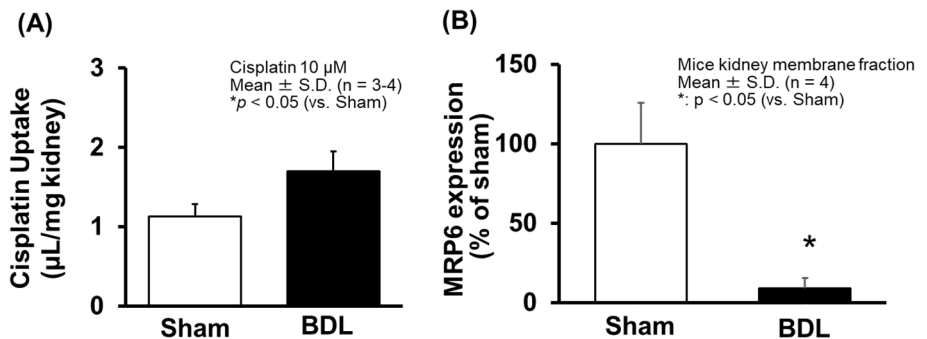


図2. 胆汁うっ滞 (BDL) マウスにおける抗がん薬 cisplatin の腎集積の増大。胆管結紮により BDL マウスを作成し、抗がん薬 cisplatin の腎臓動態及び毒性を評価した。(A) BDL マウスは対照 (sham) マウスと比較し、高い cisplatin の腎集積を示した。(B) BDL に伴い、cisplatin の薬物排出トランスポーターMRP6 の発現低下が観察された

< 引用文献 >

- Choi, SH et al, Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: Application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity, Toxicol in Vitro, 18(3), 393-402 (2004).
- Sakai, Y et al, Development of a biohybrid simulator for absorption and biotransformation processes in humans based on in vitro models of the small intestine and the liver tissues, J Artif Organs, 6, 273-281 (2003).
- Chen WLK et al, Integrated gut/liver microphysiological systems elucidates inflammatory inter-tissue crosstalk Biotechnol Bioeng, 114, 2648 (2017) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Jianyu He, Chang Zhou, Xiaolei Xu, Zhou zhenzhen, Mathieu Danoy, Marie Shinohara, Wenjin Xiao, Xiaobin Feng, Yilei Mao, Wei Sun, Yasuyuki Sakai, Huayu Yang, Yuan Pang	4. 巻 11
2. 論文標題 Scarable Formation of HepG2 Spheroids in an Oxygen-Permeable Microwell Device to Mimic Early-Stage Hepatocellular Carcinomas for Anti-Tumor Drug Evaluation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 2200863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202200863	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 該当する
1. 著者名 Maeda, K.; Hagimori, S.; Sugimoto, M.; Sakai, Y.; Nishikawa, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Simulation of the crosstalk between glucose- and acetaminophen metabolism in a liver zonation model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 995597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.995597	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 酒井康行, 木村啓志	4. 巻 157
2. 論文標題 MPS 開発研究の最新動向と実用化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 330-334
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 無
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 M Shinohara, H Arakawa, Y Oda, N Shiraki, S Sugiura, T Nishiuchi, T Satoh, K Iino, S Leo, Y Kato, K Araya, T Kawanishi, T Nakatsuji, M Mitsuta, K Inamura, T Goto, K Shinha, W Nihei, K Komori, M Nishikawa, S Kume, Y Kato, T Kanamori, Y Sakai, H Kimura	4. 巻 11
2. 論文標題 Coculture with hiPS-derived intestinal cells enhanced human hepatocyte functions in a pneumatic-pressure-driven two-organ microphysiological system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84861-y	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 Wen S, Arakawa H, Tamai I	4. 巻 581
2. 論文標題 CD38 activation by monosodium urate crystals contributes to inflammatory responses in human and murine macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.010	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 S. Yamahira, T. Satoh, F. Yanagawa, M. Tamura, T. Takagi, E. Nakatani, Y. Kusama, K. Sumaru, S. Sugiura and T. Kanamori	4. 巻 7
2. 論文標題 Stepwise construction of dynamic microscale concentration gradients around hydrogel-encapsulated cells in a microfluidic perfusion culture device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 200027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.200027	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 Sugiura, S., Satoh, T., Shin, K., Onuki-Nagasaki, R. & Kanamori, T.	4. 巻 134
2. 論文標題 Perfusion culture of multi-layered HepG2 hepatocellular carcinoma cells in a pressure-driven microphysiological system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 348-355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.07.001	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 U. Watanabe, S. Sugiura, M. Kakehata, F. Yanagawa, T. Takagi, K. Sumaru, T. Satoh, M. Tamura, Y. Hosokawa and K. Torizuka	4. 巻 11
2. 論文標題 Fabrication of hollow structures in photodegradable hydrogels using a multi-photon excitation process for blood vessel tissue engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11070679	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 Danoy M, Tauran Y, Poulain S, Jellali R, Bruce J, Leduc M, Gall M, Kouï Y, Arakawa H, Gilard F, Kato Y, Kido T, Miyajima A, Sakai Y, Leclerc E	4. 巻 118
2. 論文標題 Multi-omics analysis of hiPSCs-derived HLCs matured on-chip revealed patterns typical of liver regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology & Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3716-3732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.27667	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 該当する

1. 著者名 酒井康行	4. 巻 39
2. 論文標題 概論 = 真に生理学的なOrgan on-a-chip実現のために	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2563-2566
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 無
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 Shinha K, Nihei W, Nakamura H, Goto T, Kawanishi T, Ishida N, Yamazaki N, Imakura N, Mima S, Inamura K, Arakawa H, Nishikawa M, Kato Y, Sakai Y, Kimura H	4. 巻 12
2. 論文標題 A Kinetic-Pump Integrated Microfluidic Plate (KIM-Plate) with High Usability for Cell Culture-based Multi-Organ Microphysiological Systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 1007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi12091007	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 Morishita H, Okawa K, Ishii M, Mizoi K, Arakawa H, Yano K, Ogihara T	4. 巻 15
2. 論文標題 Gastrointestinal absorption of pimozide is enhanced by inhibition of P-glycoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0232438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232438	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shinji Sugiura
2. 発表標題 Physiologically relevant cell culture system and drug development
3. 学会等名 AIST-INDIA DAILAB PIKNIKH SERIES 46-National Science Day (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuyuki Sakai, Dhimas A. Kurniawan, Mathieu Danoy, Hiroshi Kimura, Masaki Nishikawa
2. 発表標題 Japanese MPS project I/II and a developed new MPS device with micro-stirrer-based on-chip perfusion and direct oxygenation
3. 学会等名 5th Symposium on Organoids and Organs-on-Chips, South-East Univ., China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒川大、樋口大智、根立志帆、玉井郁巳
2. 発表標題 トランスポーターが関わる薬物腎毒性を見逃さない
3. 学会等名 第 49 回日本毒性学会学術年 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakai Y, Danoy M, Nishikawa M, Kimura H, Arakawa H, Kato Y,
2. 発表標題 Importance of oxygen supply in engineering physiological tissues both in static microplates and perfused microphysiological systems
3. 学会等名 3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experiments (ACAAE2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井康行
2. 発表標題 マイクロフィジオロジカルシステム(MPS)を用いた人体応答評価のため
3. 学会等名 第34回日本動物細胞工学会2021年度大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川大、河西巧、加藤将夫
2. 発表標題 肝小腸連結型MPSで見えてきた薬物代謝における臓器間相互作用
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川大、河西巧、加藤将夫
2. 発表標題 腸肝連結型MPSを用いた薬物代謝と臓器間相互作用の解析
3. 学会等名 CBI学会2020プログラム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川大、河西巧、加藤将夫
2. 発表標題 腸肝連結型microphysiological systemを用いた薬物動態の臓器連関研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井康行
2. 発表標題 マイクロフィジオロジカルシステム(MPS)を用いた人体応答評価のために
3. 学会等名 第34回日本動物細胞工学会2021年度大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞培養装置および細胞培養方法	発明者 杉浦 慎治、佐藤 琢、長崎 玲子、金森 敏幸	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-075445号	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 デバイス、システム、方法、および薬剤評価方法	発明者 酒井康行、西川昌 輝、時任文弥	権利者 国立大学法人東 京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願第2021-164421号	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養装置および細胞培養方法	発明者 杉浦 慎治、佐藤 琢、長崎 玲子、金森 敏幸	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7150341号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>東京大学 大学院工学系研究科 化学システム工学専攻 酒井・西川研究室ホームページ(酒井康行) https://orgbiosys.t.u-tokyo.ac.jp/index.php?lang=ja&page=top 産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 AIST-INDIA 機能性資源連携研究室ホームページ(杉浦慎治) https://unit.aist.go.jp/cmb5/group/9-9Group.html 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 臨床薬学研究室ホームページ(荒川大) https://rinyaku.w3.kanazawa-u.ac.jp/</p>

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	杉浦 慎治 (Sugiura Shinji) (10399496)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級 主任研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	荒川 大 (Arakawa Hiroshi) (40709028)	金沢大学・薬学系・准教授 (13301)	

	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 協力者	木村 啓志 (Kimura Hiroshi) (40533625)	東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センター・教授 (32644)	

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			
フランス	CNRS	コンピエーニュ工科大学		
中国	清華大学			