

平成30年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14660

研究課題名(和文) 絶滅危惧種の生体外モデル「Body on a Chip」の開発

研究課題名(英文) Body on a Chip as an in-vitro model of endangered animals

研究代表者

亀井 謙一郎 (Kamei, Ken-ichiro)

京都大学・高等研究院・准教授

研究者番号：00588262

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)：本研究の目的は、iPS細胞作製技術とマイクロ流体テクノロジーを駆使し、絶滅危惧種の生理的・病理的機能を模倣した生体モデル「Body on a Chip(BoC)」を開発である。具体的には、A. 絶滅危惧種iPS細胞の作製、B. 作製したiPS細胞から目的組織への分化誘導法の確立、C. 絶滅危惧種iPS細胞由来分化細胞を導入したBoCの開発、である。  
本研究が達成できれば、これまで困難であった絶滅危惧種たちに特異的な疾患メカニズムの解明と、その有効な治療法の開発が可能になり、保全活動への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The objective in this study is to develop "Body on a Chip" as an in-vitro model of endangered animals by utilizing technologies to develop induced pluripotent stem (iPS) cells and microfluidics, to elucidate their physiology and pathology. To accomplish this goal, we proposed three specific aims; A. to generate iPS cells from endangered animals, B. to establish the protocols to induce the differentiation to specific tissues from established iPS cells from endangered animals, C. to develop a "Body on a Chip" platform with the tissue cells derived from from endangered animals.  
The achievements of this study will lead us to understand the unique and unclear mechanisms of animal diseases and find to cure those diseases. It would be a great step towards animal life conservation.

研究分野：幹細胞工学、ナノ・マイクロ工学

キーワード：Body on a Chip iPS細胞 マイクロ流体デバイス 絶滅危惧種 動物保全

1. 研究開始当初の背景

我々が住む地球上には、多くの動物が絶滅の危機に瀕しており、国際自然保護連合の2014年の報告書によると約12,000種に上ると報告されている。現在、動物園では絶滅危惧種などの保全に向け非常に重要な働きをしているが、その一方で、動物たちが病気やケガなどを患ってしまった場合、動物園では適切な処置ができないことも多く、問題となっている。これは、絶滅危惧種があまりにも希少なため、病理的な研究や治療法の開発が不十分なためである。

そこで本研究では、動物個体を使用せず効果的な薬剤を開発できる新しい技術「Body on a Chip (BoC)」を提案する (Fig. 1)。このBoCは、従来の細胞実験系では困難であった生理学的・病理学的状態を生体外で模倣し、個体を使用しない薬物動態試験が可能な新しい基盤技術である。近年まで、このBoC開発は主に、ヒトの健康や創薬を目的として行われてきた。しかし本研究では、世界で初めて絶滅危惧種を救うことを目的とするBoC開発を提唱する。この目的を達成するために、本研究の2つのキーワード、絶滅危惧種 iPS (induced pluripotent stem) 細胞とマイクロ流体デバイス (μFD) を最後にBoCについて説明する。

絶滅危惧種 iPS 細胞：2007年に京都大学山中教授が開発したヒト iPS 細胞は再生医療への応用が期待されている。しかし、この iPS 細胞作製技術は、もともとマウスを基に開発されたものであり、他の動物にも使用すれば、ヒトだけでなく多くの動物でも iPS 細胞の作製が可能となる。この iPS 細胞は「種の保存」として期待されているだけでなく、目的となる組織細胞を生体外で作製することで絶滅危惧種の代替実験材料としても使用することができる。

μFD：μFDは、微細加工技術に基づき、nm~μmスケールでの微小空間制御や組み込み型バルブ・ポンプを導入することができる。この技術を用いることで、従来の細胞培養実験系では困難であった「3次元組織形成」と「循環器系による組織間の影響評価」が可能になる。これまで

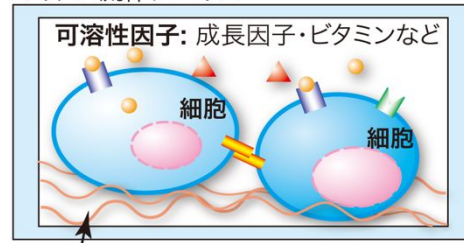
**Body on a Chip**

絶滅危惧種の生理学的・病理学的状態を「生体外で再現」する。

1. 絶滅危惧種 iPS 細胞：
  - 1-1. 組織細胞を人工的に創出
  - 1-2. 絶滅危惧種の保全に有用
2. マイクロ流体デバイス：
  - 2-1. 機能的な3次元組織の構築
  - 2-2. 循環器系の再現

Fig. 1 絶滅危惧種の生体外モデル「Body on a Chip」開発へのへのストラテジー

マイクロ流体デバイス



可溶性因子: 成長因子・ビタミンなど  
不溶性因子: 細胞外マトリックス・ゲル素材・環境の硬さ・構造など

Fig. 2 μFD を用いた細胞外環境の創出と、細胞機能の厳密制御。従来のマクロ実験系では困難であった細胞外環境因子 (可溶性因子・不溶性因子) の厳密な制御が可能になる。

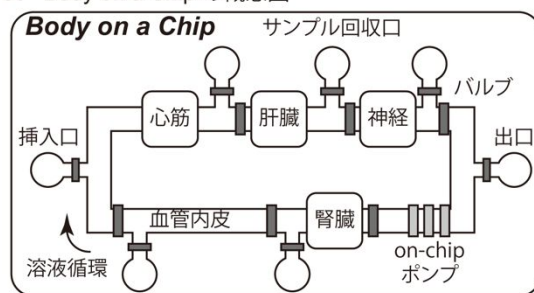
にも申請者は μFD を用いた細胞外微小環境スクリーニングデバイスや、抗がん剤の副作用を再現することができるデバイスの開発に成功しており、本研究ではそれらの知見を応用した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞作製技術とマイクロ流体テクノロジーを駆使し、絶滅危惧種の生理的・病理的機能を模倣した生体モデル「Body on a Chip (BoC)」を開発である。具体的には、

- A. 絶滅危惧種 iPS 細胞の作製
- B. 作製した iPS 細胞から目的組織への分化誘導法の確立 (Fig. 2)
- C. 絶滅危惧種 iPS 細胞由来分化細胞を導入した BoC の開発 (Fig. 3)

A Body on a Chip の概念図



B プロトタイプ・ヒト Body on a Chip

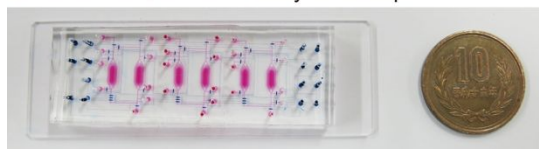


Fig. 3 A. 絶滅危惧種 iPS 細胞を用いた BoC の概念図。B. 申請者らが開発したプロトタイプ BoC。ヒト細胞を使用し、薬物動態を評価することが可能。

である。申請者はこれまでにヒト iPS 細胞作製と、マイクロ流体デバイスを用いたヒト用「Body on a Chip」の開発に成功した実績がある。本研究が達成できれば、これまで困難であった絶滅危惧種たちに特異的な疾患メカニズムの解明と、その有効な治療法の開発が可能になり、保全活動への貢献が期待できる。また、作製した iPS 細胞は種の保全への貢献が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、絶滅危惧種に効果的な薬剤や治療法を開発するために、絶滅危惧種 iPS 細胞の作製と、それを用いた生体モデル「Body on a Chip」の開発が目的である。本研究を達成するために以下の実験項目を掲げる。

- A. 絶滅危惧種 iPS 細胞の作製
- B.  $\mu$ FD を用いた絶滅危惧種 iPS 細胞から組織細胞への分化誘導法の開発
- C. 絶滅危惧種 iPS 細胞由来分化細胞を導入した「Body on a Chip」の開発

申請者のこれまでの研究実績と経験を基に、上記した実験項目を速やかに遂行する。また、絶滅危惧種 iPS 細胞が作製できれば、種の保存にも応用が可能となる。

### 4. 研究成果

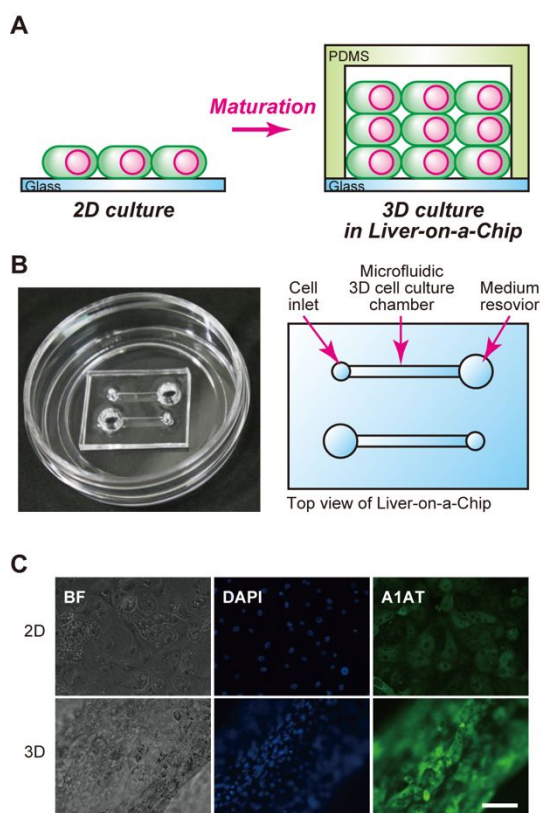
- A. 絶滅危惧種 iPS 細胞の作製  
現在、グレブシマウマなどの絶滅危惧種由来 iPS 細胞の作成に取り組んでいる。ヒト iPS 細胞を作成する際に用いられるエピソーマルベクターを用いて、ヒトリプログラミング因子 { *OCT3/4* (also known as *POU5F1*), *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, 及び *TP53* shRNA } を導入しリプログラミングに成功している。また、この iPS 細胞の増殖に適した培養液を作成している。他にも、イルカなどの海棲哺乳類やゴリラ、チンパンジーなどの iPS 細胞作成にも取り組んでいる。
- B.  $\mu$ FD を用いた分化誘導法の開発  
 $\mu$ FD を用いて肝臓細胞への分化誘導の確率を行った。その結果、従来法と比較し、より機能的な肝臓細胞を獲得することに成功した (Fig. 4)。

### 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 6件)

1. K. Kamei,\* Y. Kato, Y. Hirai,\* S. Ito, J. Satoh, A. Oka, T. Tsuchiya, Y. Chen and O. Tabata, “Integrated Heart/Cancer on a chip to reproduce the side effects of anti-cancer drug *in vitro*” *RSC Advances*, 査読有、**7**, 36777-36786 (2017); DOI: 10.1039/C7RA07716E
2. K. Kamei,\* M. Yoshioka, S. Terada, Y. Tokunaga, Y. Chen, “Three-dimensional cultured Liver-on-a-Chip with mature



**Fig. 4** マイクロ流体デバイス ( $\mu$ FD) を用いた肝臓細胞分化誘導法の確立。A. 3次元培養することで肝臓細胞はより成熟した状態となる。B. 本研究で開発した  $\mu$ FD。C. 3次元培養した肝臓細胞は成熟マーカーである 1-anti trypsin (A1AT) を強く発現している。

hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells” *bioRxiv*, 査読無、<https://doi.org/10.1101/232215>

3. Y. Endo, K. Kamei,\* M. Inoue-Murayama, “Genetic Signatures of Lipid Metabolism Evolution in Cetacea” *bioRxiv*, 査読無、<https://doi.org/10.1101/250597>
4. L. Liu, K. Kamei,\* M. Yoshioka, M. Nakajima, J.J. Li, N. Fujimoto, S. Terada, Y. Tokunaga, Y. Koyama, H. Sato, K. Hasegawa, N. Nakatsuji, Y. Chen, “Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells” *Biomaterials*, 査読有、**124**, 47-54 (2017); DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.039.
5. K. Kamei,\* Y. Koyama, Y. Mashimo, M. Yoshioka, C. Fockenber, M. Nakashima, R. Mosbergen, O. Korn, J. Li, C. Wells, Y. Chen, “Characterization of phenotypic and transcriptional differences in human pluripotent stem cells under two- and three-dimensional culture conditions” *Advanced Healthcare*

*Materials*, 査読有、5(22), 2951-2958 (2016); DOI: 10.1002/adhm.201600893

6. Y. Kato, Y. Hirai, K. Kamei, T. Tsuchiya and O. Tabata, "Development of a Body-on-a-Chip Using 3-D Microstructuring Technique" *IEEJ Trans. SM*, 136(6), 229-236 (2016) (in Japanese); DOI: 10.1541/ieejsmas.136.229

〔学会発表〕(計 9 件)

1. K. Kamei, 「マイクロ・ナノ微細加工技術による 3 次元組織工学」口頭発表、第 90 回日本組織培養学会大会 (2017)
2. K. Kamei, 「Body on a Chip: ヒト生体外モデルの開発と今後の展望」口頭発表、シンポジウム「希少がんの新しい治療法のための patient-derived cancer model」国立がん研究センター研究所 (2017)
3. K. Kamei, Y. Hirai, Y. Kato, T. Tsuchiya, O. Tabata, "Body on a chip towards understanding of the side effects of anti-cancer drug in vitro" 口頭発表、The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) 2016, Kobe, Japan (2016)
4. Kamei K: Body on a Chip: Towards new generation of drug screening. 口頭発表、The 10th International Conference of Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-Nanomed), Macau SAR, China 2016 年
5. Kamei K: Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions. 口頭発表、Wuhan University, Wuhan, China 2016 年
6. Kamei K: Towards in vitro recapitulation of the side effects of anti-cancer drugs. 口頭発表、CBI 学会 2016 年大会, 東京 2016 年
7. Kamei K: Nanoengineered extracellular matrix for scaled-up culture of human ES/iPS cells", 口頭発表、TERMIS-AP 2016, Tamsui, Taiwan 2016 年
8. Kamei K: Nanoengineered extracellular matrix for scaled-up culture of human ES/iPS cells, 口頭発表、Nature Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Ocean Hotel, Guangzhou, China 2016 年
9. 亀井謙一郎: Microchips as key weapons in the war against extinction. ( <https://www.youtube.com/watch?v=ZkZUKVyX07g> ) 口頭発表、TEDxKyoto 京都 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<https://ken1kameigroup.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 謙一郎 (KAMEI, Ken-ichiro)  
京都大学・高等研究院物質-細胞統合システム拠点・准教授  
研究者番号 : 00588262

(2) 研究分担者

平井 義和 (HIRAI, Yoshikazu)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号 : 40452271

(3) 連携研究者

村山 美穂 (Murayama, Miho)  
京都大学・野生動物研究センター・教授  
研究者番号 : 60293352

(4) 研究協力者

( )