

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19018

研究課題名（和文）圧力駆動Liver-on-a-chipの開発：三次元肝組織の生体外長期灌流培養

研究課題名（英文）Development of pressure driven liver-on-a-chip: In vitro long-term perfusion culture of three-dimensional liver tissue

研究代表者

杉浦 慎治（Sugiura, Shinji）

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

研究者番号：10399496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、Microphysiological systemsは、in vitroでヒト由来細胞を使用した生理学的応答を提供するための創薬の次世代研究ツールとして注目されている。本研究では、三次元組織を多孔性膜上に配置し、圧力勾配を負荷しつつ培養することのできるマイクロ流体デバイス、三次元組織循環培養デバイスを製作した。本培養デバイスを用いて、ヒト肝癌由来細胞HepG2培養したところ、通常の単層培養に比べて培養面積としては2桁程度狭い面積にも関わらず、培養20日目において7割程度のアルブミン生産量を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は薬物代謝の主要な臓器であり、三次元肝組織の灌流培養による臓器機能の長期維持が期待されている。また、我々は圧力駆動型の循環培養による多臓器連結培養について研究する中で、多臓器連結培養系においては培養面積の限られる中での細胞活性の維持が重要との認識を持っている。本研究の成果はこれらの課題の解決につながる一つのアプローチとなると考えられる。産業面では、現時点で創薬分野で利用可能な三次元組織はスフェロイドに限定されていると言ってよく、本研究で開発されたLiver-on-a-chipは、薬物代謝や薬物相互作用を解析するための創薬デバイスとして重要な物となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, Microphysiological systems have been attracting attention as a next-generation research tool for drug discovery to provide a physiological response using human-derived cells in vitro. In this study, we developed a three-dimensional tissue circulation culture device, which is a microfluidic device capable of culturing while placing a three-dimensional tissue on a porous membrane and applying a pressure gradient on the tissue. When human hepatoma-derived cells HepG2 were cultured using this culture device, the albumin production amount was about 70% of that cultured in the conventional culture dish on the 20th day of the culture, even though the culture area was about 2 orders of magnitude smaller than the monolayer culture in the conventional culture dish.

研究分野：生物化学工学

キーワード：組織工学 細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発における臨床試験の成功率低下が問題となっており、その主たる原因は動物実験とヒト臨床試験の相関の低さと考えられている。一方、従来の単層培養法では、生体の肝臓から取り出した初代肝細胞は数時間の培養のうちにその機能が低下してしまうことが知られている。このような状況の中、三次元組織培養技術やマイクロ流体デバイスを用いた培養技術が発展し、生体外で臓器機能を発現する Organ-on-a-chip という概念が注目されている。その中でも肝臓は生体の薬物代謝に関わる主要臓器であるため、Liver-on-a-chip への期待は特に大きい。Liver-on-a-chip を用いて薬物代謝を評価するためには、生体外で長期にわたって肝機能を維持しなければならない。そのためには血管網を配備した三次元組織の構築が必要であるが、血管網を配備した三次元組織を生体外で構築する手法が確立していない点が大きな課題となっており、Liver-on-a-chip は実現していない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに開発してきた圧力駆動型循環培養システムをベースとして、過去の研究の中で偶発的に見いだした異方性血管組織発達現象という現象を利用し、血管網を配備した三次元肝組織の構築・成熟から長期灌流培養までの一連のプロセスが実行可能な培養装置『圧力駆動 Liver-on-a-chip』を開発する。研究期間内に、三次元肝組織の構築・成熟プロセスの検討と、構築した三次元肝組織の長期培養と機能評価までを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 圧力駆動 Liver-on-a-chip の開発

三次元組織を圧力勾配場に配置して培養するために、多孔性膜インサートを組み込んだ形で培養できる圧力駆動循環培養型マイクロ流体デバイスを開発した。フォトリソグラフィとレプリカモールドリング法を用いてマイクロ流体デバイスを加工した。

(2) 圧力駆動 Liver-on-a-chip を用いたヒト肝癌由来細胞 HepG2 の培養

膜インサートには薄層マトリゲルコートを行った。ヒト肝癌由来細胞 HepG2 をインサートあたり 1.0×10^5 個の細胞を 50mL の培養液に懸濁させ、膜インサートに播種した。この細胞濃度は通常の単相静置培養と比較して 70 倍の面積あたりの細胞密度となっており、細胞が重層化し、三次元組織を形成する。5% CO₂ インキュベーターにて 37°C で 3 時間静置培養を行った後に流路を培地で満たし、合計 1.1ml の培養液を培養チャンバーに導入し、一晩静置培養を行った。翌日培地交換を行い、2 つのチャンバーに交互に加圧するシークエンスを繰り返すことで三次元組織の灌流培養を行った (3DP)。加圧は 3.6 ± 0.1 kPa で行い、加圧シークエンスは往路 600 秒、返送 300 秒で行った。比較対照として、同数の細胞を同様の膜インサート・培養チャンバーに導入しつつ、培養液の灌流を行わない静置培養系 (3DS) と 35mm ディッシュを用いた 2D 静置培養 (2D) で培養を行った。各条件の培養面積・培地量・播種細胞密度を表 1 に示す。

表 1. 本研究にて比較検討した培養条件の比較

	3D 灌流 (3DP)	3D 静置 (3DS)	2D 静置 (35 mm dish、2D)
培養面積 (cm ²)	0.143	0.143	11.8
培地量 (μL)	1,100	1,100	1,100
容器当たり細胞数 (x10 ⁴ cells)	10.0	10.0	10.0
細胞密度 (x10 ⁴ cells/cm ²)	約 70	約 70	0.8

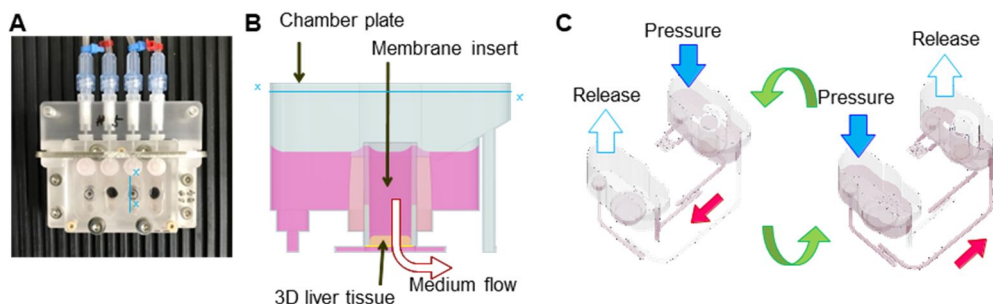


図 1. 圧力駆動 Liver-on-a-chip の構成。(a) 組み立てられた状態の培養装置。(b) 培養チャンバーの断面図。膜インサート上に配置された細胞に対し、膜を透過する方向に培養液が灌流される構成となっている。(c) シークエンス加圧による培養液循環のプロセス。赤い矢印は中流の方向を示す。

培地交換および観察は培養開始から 46-48 時間ごとに行った。培地交換の都度、3DP の主流路・副流路の流量測定 (30 分)、返送流路の流量測定 (60-90 秒) を行った。

培養 20 日目に 4% Paraformaldehyde solution を用いて組織の固定を行い、HE 染色を行った。また、アルブミン産生量および尿素濃度の定量のため、48 時間毎に培地のサンプリングを行い、HepG2 のアルブミン産生量・培地中尿素濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 圧力駆動 Liver-on-a-chip の開発

図 1 に開発した圧力駆動 Liver-on-a-chip の構成図を示す。1 組のデバイスの培養チャンバーが 4 個内蔵されており、培養チャンバー 2 個 1 組で三次元組織の灌流培養を行う (図 1A)。膜インサートの多孔質膜上に細胞集塊を培養する構成となっている (図 1B)。培養チャンバーを交互に加圧することで、培地を簡便に循環させることができる (図 1C)。

(2) 圧力駆動 Liver-on-a-chip を用いたヒト肝癌由来細胞 HepG2 の培養

作製した圧力駆動 Liver-on-a-chip を用いて、HepG2 細胞の灌流培養を 20 日間行った。この間、流量測定により、デバイスが当初の設計通りに動作していることを確認した (図 2)。

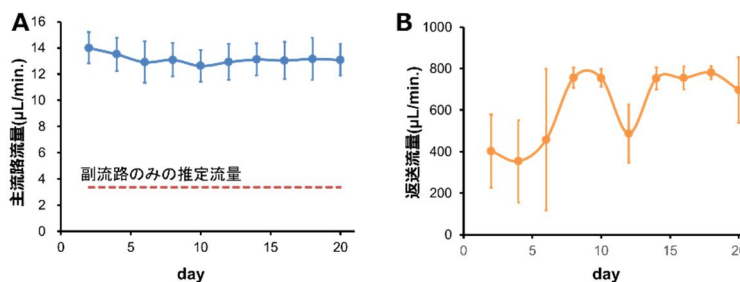


図 2 (A) 主流路流量 (副流路と膜インサート越しの流量の和)、20 日間の培養期間にわたり、膜インサートを介して副流路の推定流量の 3 倍以上の流量が主流路の流量として確認された。(B) 返送流路の流量。

各条件で培養を行った HepG2 の位相差像。培養 20 日目におけるインサート膜上組織の切片の HE 染色像を図 3 に示す。3 次元静置培養 (3DS) では HepG2 が一面に均一な厚みで増殖しているのに対し、3 次元灌流培養 (3DP) では切断面毎に組織の厚みが異なり、所々で凝集塊状に増殖している様子が観察された。また、3DP では膜インサートの裏側でも一部細胞が増殖している様子が見られた。

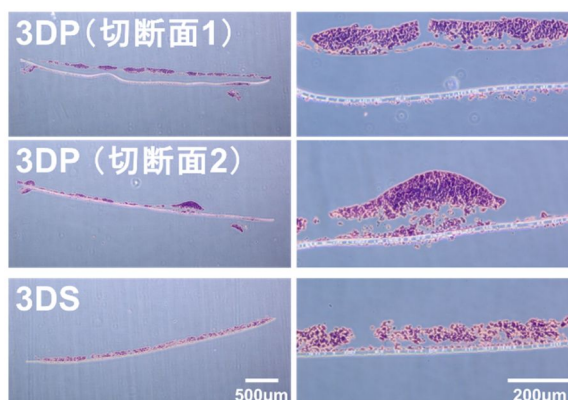


図 3. 培養 20 日目におけるインサート膜上組織の切片の HE 染色像。

各条件で培養を行った HepG2 の 48 時間ごとのアルブミン産生量および尿素産生量を図 4 に示す。3 次元灌流培養 (3DP) では、3 次元静置培養 (3DS) と比較してアルブミンの生産性が向上した。一方、同数の細胞を 35 mm ディッシュにて静置培養した場合 (2D) と比較すると、培養面積としては 2 桁程度狭い面積にもかかわらず培養 20 日目において 7 割程度のアルブミン生産量を実現した。尿素合成に関しては、培養後期では灌流培養 (3DP) および静置培養 (3DS) において、35mm ディッシュにおける静置培養と同等の尿素生産量を実現した。

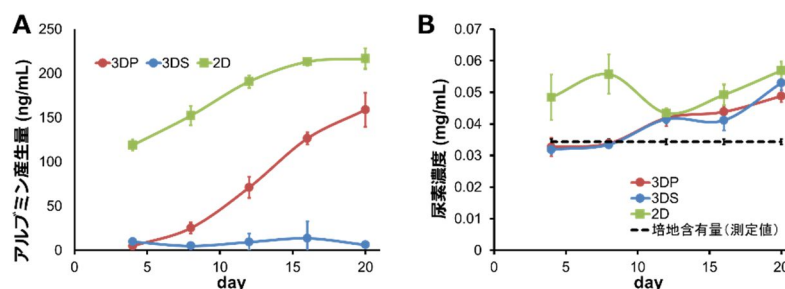


図 4. 細胞機能の経時変化。(A) 各条件で培養を行った HepG2 の 48 時間ごとのアルブミン産生量。(B) 各条件で培養を行った HepG2 の 48 時間ごとの尿素産生量。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 杉浦 慎治, 金森 敏幸	4. 巻 55
2. 論文標題 Body-on-a-chipに應用されるマイクロ流体デバイス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 404-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.14894/faruawpsj.55.5_404	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 T. Satoh, R. Nagasaki, S. Sugiura, A. Nagasaki and T. Kanamori	4. 巻 1
2. 論文標題 3D PERFUSABLE LIVER-ON-A-CHIP DEVELOPPED ON A PNEUMATIC PRESSURE-DRIVEN CIRCULATION CUTLURE PLATFORM	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS2018	6. 最初と最後の頁 1647-1649
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9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 杉浦 慎治
2. 発表標題 圧力駆動型Microphysiological systemsの開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Sugiura
2. 発表標題 A Pneumatic Pressure-Driven Microphysiological Systems for Multi-Throughput Microfluidic Circulation Culture
3. 学会等名 2019 KSBB fall meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦 慎治、佐藤 琢、進 和美、長崎 玲子、金森 敏幸
2. 発表標題 圧力駆動型3次元組織循環培養デバイスを用いたHepG2細胞の循環培養
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会 2019年度シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Satoh, R. Nagasaki, S. Sugiura, A. Nagasaki and T. Kanamori
2. 発表標題 3D PERFUSABLE LIVER-ON-A-CHIP DEVELOPPED ON A PNEUMATIC PRESSURE-DRIVEN CIRCULATION CUTLURE PLATFORM
3. 学会等名 The Twenty Second International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (?TAS 2018 (国際学会))
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 琢、長崎 玲子、杉浦 慎治、長崎 晃、金森 敏幸
2. 発表標題 3次元組織循環培養法で作製したLiver-on-a-Chipの開発と機能解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 琢、長崎 玲子、杉浦 慎治、長崎 晃、金森 敏幸
2. 発表標題 3次元組織循環培養法で作製したLiver-on-a-Chipの機能解析 Functional analysis of perfusable 3D liver-on-a-chip
3. 学会等名 第25回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Sugiura
2. 発表標題 Pneumatic Pressure-Driven Multi-Throughput Organs-On-A-Chip
3. 学会等名 IEEE-NEMS 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦 慎治
2. 発表標題 創薬におけるインピトロ試験の信頼性向上へ向けたOrgans-on-a-chipの開発
3. 学会等名 第55回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦 慎治、金森 敏幸
2. 発表標題 Organs-on-a-chipを用いたインピトロアッセイの産業化に向けた取り組み
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 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、特願2017-176137	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

生物学奨励賞（照井賞），圧力駆動型Microphysiological systemsの開発，公益社団法人日本生物工学会，杉浦 慎治、2019/09/16

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
--	---------------------------	-----------------------	----