

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14102

研究課題名（和文）複数の三次元臓器モデルを接続・灌流するためのプラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of a platform for connecting and perfusing multiple 3D organ models

研究代表者

森 宣仁（Mori, Nobuhito）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：70806215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管付きの三次元臓器モデルを構築・接続可能な培養デバイスを作製した。この培養デバイスを用いて皮膚モデル及び肝臓モデルを構築し、灌流等の培養条件が各組織に与える影響や薬物の代謝試験への適用可能性などを探った。この結果、皮膚モデルについては灌流と機械的刺激を同時に加えることで従来と比べて表皮と真皮の状態を改善することに成功し、また肝臓モデルについては薬物の代謝試験に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚モデルに関する成果は薬剤試験に用いる皮膚モデルの改善や、メカノバイオロジーと呼ばれる分野の研究に用いるためのツールとして有用であると考えられる。また、肝臓モデルに関する成果は薬剤試験を体外で行えるようになる可能性を示している。また本研究の培養デバイスは肝組織のみならず、脳や腫瘍など他の臓器の構築にも利用可能である。さらに、血管を有することから、その応用先として薬剤試験のみならず、再生医療向け臓器や培養肉の構築・培養にも利用可能であることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we fabricated a culture device that can construct and connect three-dimensional organ models with blood vessels. Using this culture device, we constructed skin and liver models, and explored the effects of perfusion and other culture conditions on each tissue, as well as the applicability of the device to drug metabolism studies. As a result, we succeeded in improving the condition of epidermis and dermis in the skin model compared to the conventional model, and in the liver model, we succeeded in testing the metabolism of drugs.

研究分野：組織工学

キーワード：organ-on-chip 肝臓 血管 灌流 臓器チップ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、複数の三次元臓器モデルを接続した Organs-on-a-chip を構築する方法を確立することである。近年、創薬支援ツールとして、臓器モデルを流路チップに統合した Organs-on-a-chip が注目を集めている。Organs-on-a-chip においては、複数の臓器モデルを接続することで、薬物動態の模擬が可能となり始めている。しかし、複数臓器モデルの系は、細胞を平面上で培養する二次元培養系に留まっており、生体とは細胞の性質が異なる。一方、細胞と細胞外マトリックスを組み立てた三次元臓器モデルは生体との類似性が高いが、複数モデルの接続は未だ確立されていない状況である。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では複数の三次元臓器モデルを接続可能なデバイスを開発することを目的と定めた。さらに本デバイスの有用性実証のため、新規に血管付き肝臓モデルを開発し、薬物試験を実施することを目指した。なお、当初予定では心臓モデルを開発する予定だったが、創薬において重要な役割を果たす肝臓モデルの開発に切り替えて推進した。

### 3. 研究の方法

血管付きの三次元臓器モデルを構築・接続可能な培養デバイスを作製した。この培養デバイスは組織中に構築した血管を流路に固定可能な機構を有している。またチューブ接続を可能な外部ポートを有している。このような特長があるため、外部のポンプと接続して送液すること、及び異なる組織を保持した培養デバイス間で容易に接続することが可能である。このデバイス内で皮膚モデル及び肝臓モデルを構築し、灌流等の培養条件が各組織に与える影響や薬物の代謝試験への適用可能性などを探った。

### 4. 研究成果

#### (1) 伸展・灌流培養可能な皮膚モデル培養システム

皮膚モデルについては、近年、生体皮膚が常に機械的刺激を受けていることに注目し、伸展培養が実施されている。本研究で使用する血管付き皮膚モデルにおいても、伸展培養を行うことで、より生体皮膚に近い培養条件を実現し、真皮及び表皮の高機能化が可能になると期待できた。そこで、柔軟なシリコンゴム製の灌流デバイスを開発し、さらに新たに開発した伸展装置と統合することで、皮膚モデル灌流伸展システムを構築した(図1)。このシステムを用いて皮膚モデルを種々の周波数の伸展刺激を与えながら培養した結果、表皮・真皮が改善された。この成果は薬剤試験に用いる皮膚モデルの改善や、メカノバイオロジーの研究に用いるためのツールとして有用であると考えられる。

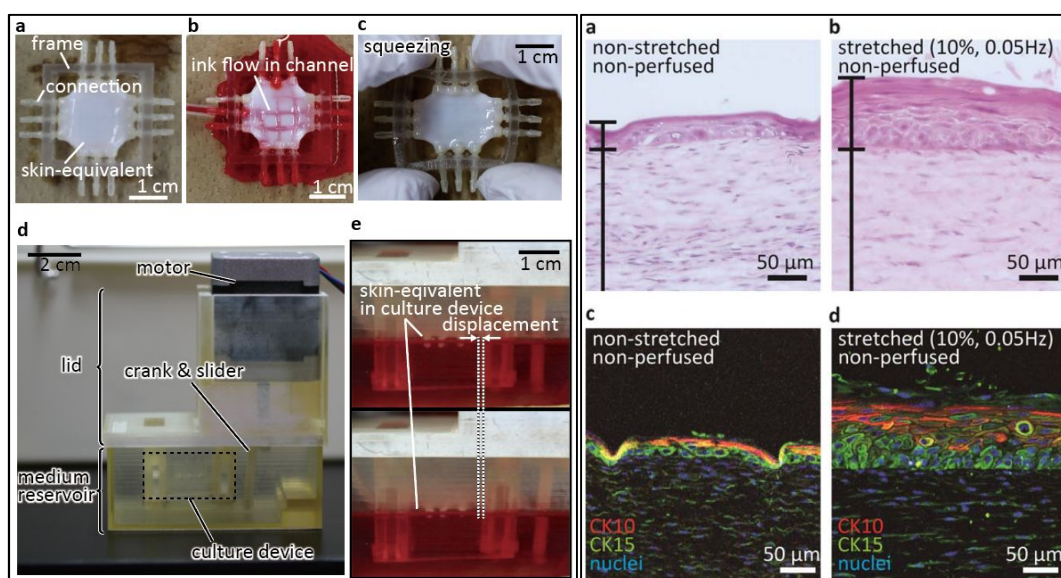


図1. 左パネル：進展・灌流培養可能な皮膚モデル培養システム、右パネル：伸展刺激による皮膚モデルの改善 (a,c) 刺激無し、(b,d) 刺激有り

## (2)肝臓モデルの構築と薬剤試験評価

肝臓モデルについては、ハイドロゲル包埋法やスフェロイド法などで構築された三次元肝組織でアルブミンやシトクロム P450 といった肝機能が強く発現することが報告されている。しかしながら、このように高い機能を有する三次元肝組織においても、in vivo と比べればその機能は依然低い。この一因として考えられるのは、これまでに考案された三次元肝組織に洞様毛細血管（類洞）が存在しないことである。そこで「研究の方法」に記載のとおり、本研究では培養デバイスを用いて三次元肝組織に送液ポンプを接続し、培養液を灌流することで、肝組織中の血管内皮細胞の自己組織化により毛細血管を形成する戦略をとった(図 2)。この結果、生体の類洞に類似した構造を形成することに成功した(図 3)。さらに、この類洞様構造を有した肝臓モデルについて、(1)血管の灌流性の評価、(2)次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現比較、(3)プロテオーム解析を用いたタンパク質発現解析、(3)細胞活性の評価及び薬剤代謝能の評価を実施した。(1)については、主血管に India ink を注入することによって類洞様構造への ink 流入が観察された(図 4)。これは類洞様構造が主血管と接続され、さらにネットワーク化されていることを示している。このように肝細胞が密に充填され、毛細血管の張り巡らされた組織の構築例は世界に類がない。(2)及び(3)については灌流培養を行った肝臓モデルにおいては血管新生に関する遺伝子発現が増大していることから、類洞様構造形成に灌流が重要な寄与をしていることが分かった。また、多くの薬剤代謝関連遺伝子・タンパク質 (Phase I~III、及び nuclear receptor) の発現が向上することが分かった(図 5)。(4)については、肝臓の活性の指標として用いられるアルブミン産生量や、代謝酵素(シトクロム P 4 5 0)による薬剤代謝活性が、非灌流条件と比べて、灌流条件において多く検出されることが分かった。以上の結果は、本研究で開発したデバイスが薬剤試験に利用可能であることを示している。また、本研究の成果は肝組織のみならず、脳や腫瘍など他の臓器の構築にも利用可能である。さらに、血管を有することから、その応用先として薬剤試験のみならず、再生医療向け臓器や培養肉の構築・培養にも利用可能であることが期待できる。また、プロテオーム解析についての成果は2次元培養との発現情報の比較という観点のみでなく、「構築した組織を使用していかにプロテオーム解析を行うか」というプロトコル確立の観点から、本技術の潜在的ユーザーに有用な結果である。なお、本研究で用いたデバイスは先述の通り容易にチューブ接続が可能であり、ポンプとの接続はもちろん、デバイス間(モデル間)の接続も可能である。

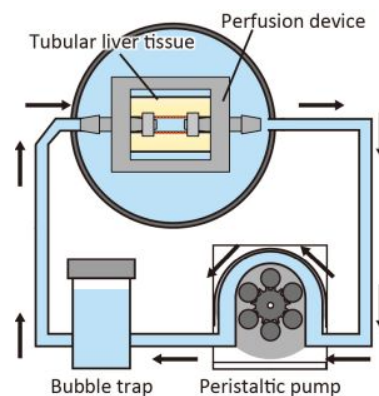
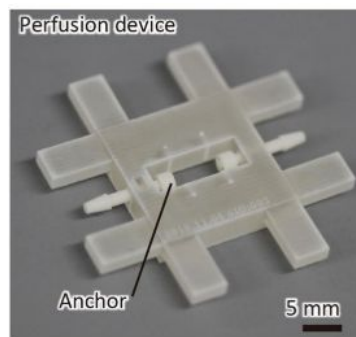


図 2. (上)肝臓モデル用の培養デバイス、(下)灌流システム

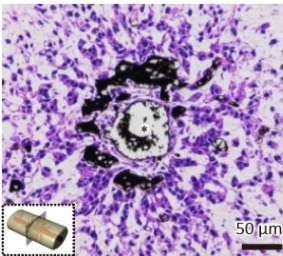
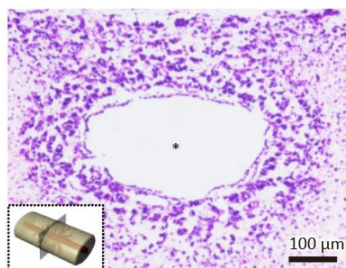
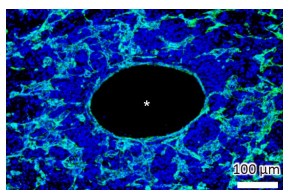
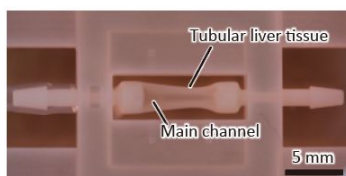


図 3. (上)肝臓モデル、(下)断面の HE 染色。中央のアスタリスクは主血管を示す。

図 4. (上) 主血管と毛細血管網の免疫染色像、(下)Ink による灌流性の観察

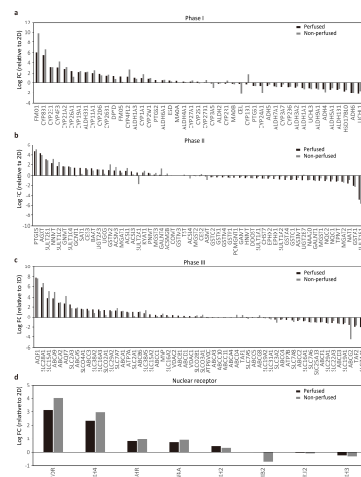


図 5. 薬剤代謝関連遺伝子の発現量。(a) Phase 1、(b) Phase 2、(c) Phase 3、(d) Nuclear receptor

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Nobuhito, Kida Yasuyuki S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression of genes involved in drug metabolism differs between perfusable 3D liver tissue and conventional 2D cultured hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1985 ~ 2002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12948	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 Mori Nobuhito, Akagi Yuka, Imai Yukiko, Takayama Yuzo, Kida Yasuyuki S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Fabrication of Perfusable Vascular Channels and Capillaries in 3D Liver-like Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62286-3	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 Mori Nobuhito, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji	4. 巻 11
2. 論文標題 Perfusable and stretchable 3D culture system for skin-equivalent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 011001 ~ 011001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/aaed12	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 Mori Nobuhito, Kida Yasuyuki S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Applicability of Artificial Vascularized Liver Tissue to Proteomic Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 418 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi12040418	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森宣仁、高山祐三、赤木祐香、木田泰之
2. 発表標題 灌流培養デバイスを用いた 血管付き肝組織の開発
3. 学会等名 再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuhito Mori, Yuzo Takayama, and Yasuyuki S. Kida
2. 発表標題 3D LIVER TISSUE ENHANCED WITH PERFUSABLE VASCULAR CHANNEL AND SINUSOID-LIKE STRUCTURES
3. 学会等名 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森宣仁、高山祐三、若林玲実、木田泰之
2. 発表標題 灌流可能な類洞様構造を有する三次元肝組織の構築
3. 学会等名 細胞アッセイ技術の現状と将来
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 3次元肝組織モデル	発明者 森宣仁、高山祐三、 赤木祐香、木田泰之	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-184027	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

人工組織に血管を作製する技術を開発  
[https://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2020/pr20200414/pr20200414.html](https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200414/pr20200414.html)

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

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