

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656502

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞を用いた生体モデルBody on a chipの開発

研究課題名(英文) Body on a Chip: in vitro living model using human pluripotent stem cells

研究代表者

亀井 謙一郎 (Kamei, Kenichiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：00588262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ流体テクノロジーを駆使して3次元微小組織形成デバイスを開発し、ヒト多能性幹細胞を用いた3次元微小組織の作製、微小組織を連結することによるin vitro生体モデル「Body on a Chip」の作製とそれを用いた新規薬効評価を行うことを目的としている。具体的には、A. 多様な細胞外微小環境を作製・試験できるハイスループットマイクロ流体デバイス(HT-microFD)の開発、B. ヒトES/iPS細胞を用いた多種の機能的3次元組織への分化誘導法の確立、C. 作製した微小組織をマイクロ流体デバイス内で連結することによる生体モデルの作製と薬効評価を行う。

研究成果の概要(英文)：In this research, we will develop "Body on a Chip" by accomplishing three aims, 1) development of microfluidic platform for construction of 3D micro tissues, 2) construction of 3D micro tissues using human pluripotent stem cells (hPSCs) and 3) development of "Body on a Chip" by interconnecting multiple 3D micro tissue within a microfluidic device. Specifically, A. Development of high throughput microfluidic device (HT-microFD); B. Establishment of multiple 3D micro tissues within a HT-microFD using hPSCs; C. Construction of "Body on a Chip" by interconnecting multiple 3D micro tissue within a microfluidic device.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：マイクロ流体デバイス ヒト多能性幹細胞 組織工学

1. 研究開始当初の背景

ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は生体内における全ての細胞に分化できる性質を有している細胞である。現在、細胞を用いた薬剤スクリーニングや薬効評価法の開発が非常に重要視されている。

しかし、現在の組織工学における実験系では、細胞機能発現に必須な 3 次元細胞外微小環境を作製できないため、機能的な組織を作製することは困難である。申請者は微細加工技術により微小空間制御できるマイクロ流体デバイス (μ FD) を用いた組織工学を行うことにした。

μ FD は細胞生物学において、

- (1) nm \sim μ m スケールでの微小空間制御
- (2) 単一空間内に二 \sim 多液層・濃度勾配の作製
- (3) 実験の自動化・High-Throughput (HT) 化

などの利点がある。つまり μ FD を用いることによって、多様な微小環境を単一デバイス内に作製でき、それを網羅的に解析することができる。申請者は、現在までに μ FD を用いたヒト ES/iPS 細胞培養・実験系の開発を行ってきた (Kamei, et al., Lab Chip, 2009; Kamei et al., Lab Chip, 2010)。そこで本研究では、この μ FD をより発展させ、①HT- μ FD 内を用いた 3 次元分化誘導を行う 3 次元微小組織形成デバイスを開発、②ヒト多能性幹細胞を用いた 3 次元微小組織の作製、③微小組織を連結することによる *in vitro* 生体モデル「Body on a Chip」の作製とそれを用いた新規薬効評価を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

上記で記した研究背景と目的を基に、本研究では以下を達成する。

- (1) ハイスループットマイクロ流体デバイス (HT- μ FD) を基にした 3 次元微小組織環境スクリーニング法の開発
- (2) HT- μ FD を用いたヒト ES/iPS 細胞からの 3 次元微小組織形成条件の同定
- (3) 単一 μ FD 内で複数の微小組織を連結することによる生体モデル「Body on a Chip」の開発

3. 研究の方法

- (1) HT- μ FD を基にした 3 次元微小環境スクリーニング法の開発

本申請で作製する HT- μ FD には、現在よく用いられマイクロ流体デバイスの作製が簡便なソフトリソグラフィ法を用いる。これは、新規実験系の開発を行う必要があるときには、1 週間以内に新しいデザインのデバイスを得ることができる方法である。デバイス材料として、生体適合性、ガス透過性、光透過性などが非常に高い polydimethylsiloxane (PDMS) を使用する。

HT 化には、スタンフォード大学の Quake 教授が多層型 PDMS を用いて開発した HT- μ FD

(Thorsen et al., Science, 2002) を基に、これをヒト ES/iPS 細胞実験用に最適化したシステムを開発する。このデバイスには、コンピュータ制御可能なバルブとポンプがデバイス内に組み込まれ、流路の開閉、液滴の輸送を行うことができる。これを使用し、それぞれが独立した細胞試験チャンバーを大量に装備し、デバイスの HT 化を試みる。申請者は既にプロトタイプが多層型 PDMS μ FD を用いたヒト ES 細胞の培養に成功しており、本研究では HT- μ FD を開発し、更なる HT 化を目指す。

- (2) HT- μ FD を用いたヒト ES/iPS 細胞からの 3 次元微小組織形成条件の同定

本項では、項目 (1) で開発した μ FD を用いてヒト ES/iPS 細胞の 3 次元微小組織分化誘導法の確立を目的とする。多種の細胞外足場と可溶性因子からなる細胞外環境コンビナトリアルライブラリを作製し、その中から組織分化誘導に最適なものをスクリーニングにより見つけ出す。スクリーニングは以下の手順に基づく。

- ①ヒト ES/iPS 細胞からの目的前駆細胞の準備

①-1 ヒト ES/iPS 細胞から embryoid body (EB) を経て三胚葉系へ分化誘導

①-2 組織分化マーカーを用いて目的組織の前駆細胞の獲得

- ② 3 次元微小組織形成条件の同定 (2 段階スクリーニング)

②-1 第一段階：組織分化マーカー発現量を指標として行い、候補条件を同定

②-2 第二段階：組織機能性評価 (機能性タンパク質発現、細胞外電位測定、等)

以上の操作から、最も組織機能発現しているものを最適化条件として以降の試験に使用する。

本研究においては Proof-of-concept として肝臓、心筋、神経細胞、血管内皮細胞への分化誘導を行う。薬剤を生体内に投与する方法の 1 つとして、例えば静脈投与の場合、薬剤は生体内に投与された後、血管を介して肝臓、心臓へと到達する。また、肝臓は薬剤の代謝、排出、解毒等、多くの機能に関与しており、薬剤評価の上では非常に重要な組織である。つまり、本研究で proof-of-concept として挙げた組織細胞は薬剤が生体内において影響を最も及ぼす細胞であり、これらをまず確立することは、将来的に組織の種類を増やすにしても、基礎となる非常に重要なものである。

- (3) 単一 μ FD 内において多種の 3 次元微小組織を連結することによる生体モデル「Body on a Chip」の開発

本項においては、それまでに別々に作製した 3 次元微小組織アレイを一つに連結した *in vitro* 生体モデル「Body on a Chip」の開発を行う。マイクロ流体デバイスを応用するこ

とによって、循環器系も模倣することが可能になる。

個々の組織には溶液回収用の出口を備えており、そこから組織を刺激したあとの薬剤とその代謝物を含む溶液を回収し、さらなる代謝産物と組織応答の評価を行う。代謝産物回収後は、個々の組織を回収し、他の生化学的解析法と組み合わせることによって、より詳細な薬効評価が行えるようにする。

4. 研究成果

(1) ハイスループットマイクロ流体デバイスを用いたヒト多能性幹細胞3次元培養法の開発

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いてヒトES細胞およびヒトiPS細胞の新規微小3次元細胞培養デバイスを開発した。

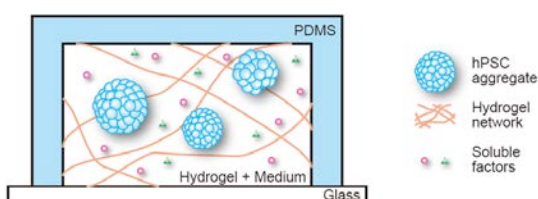


図1 本研究におけるヒト多能性幹細胞の3次元微小環境培養の概念図。マイクロ流体デバイス中にヒドロゲルとヒト多能性幹細胞の混合液を導入し、3次元培養を可能にする。培養に必要な成長因子などはヒドロゲルの中を拡散することで、細胞に与えることが可能。必要に応じて、分化に必要な因子も導入が可能である。

申請者はこれまでにマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養・アッセイ法の開発を行って来た。これまでの研究ではマイクロ流体デバイスを用いているものの、細胞は2次元状の培養基材上で培養しており、ヒトES/iPS細胞は2次元状に展開していた。つまり、本当に意味での3次元培養ではなかった。今回の発明では、マイクロ流体デバイスを用いて3次元的な微小環境を作製し、且つ生体適合性の高いハイドロゲルを細胞支持単体として使用することによって、3次元培養を可能にした。

使用したハイドロゲルは、温度に応じて相転移を起こす材料であり、15°C以下では液状であるが、細胞培養条件(37°C)ではゲル状になる。よって、細胞をマイクロ流体デバイスに導入するときは、低温下で細胞操作を行い、培養時には37°Cにする。また、培養後に細胞を取り出す際には、またデバイスを低温下に置くことによって、ゲルが液状になり、取り出すことが可能になる。

また、ゲルの濃度を増加することにより、ゲルを固くすることができるので、細胞環境の固さによる細胞挙動の検討も行うことが

できる。ゲル中における可用性因子の拡散は溶液中のそれとは異なり分子量の大きさによって劇的に変化する。この現象は生体内においても起きている現象であり、今回発明したマイクロ流体デバイスはこの生体内の条件を再現できるものである。また、培養後に細胞を取り出す際には、またデバイスを低温下に置くことによって、ゲルが液状になり、取り出すことが可能になる。

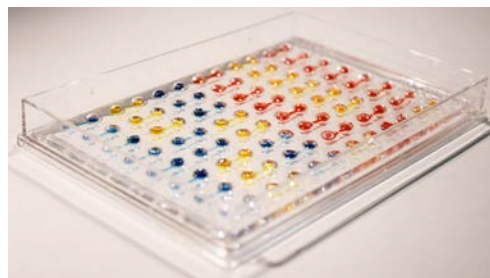


図2 ハイスループットスクリーニング (HTS) マイクロ流体デバイス (μFD)。写真に示すように3次元培養のスクリーニングも可能。

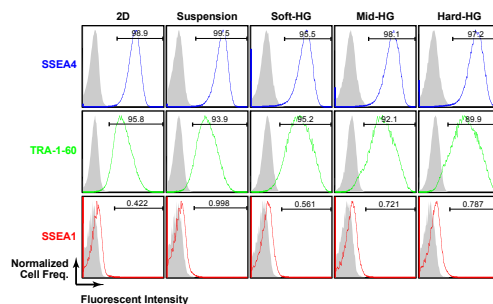


図3 フローサイトメトリーによるヒト多能性幹細胞マーカー (SSEA4 と TRA-1-60)、及び分化マーカー (SSEA1) の発現確認。三種類の固さの違うゲル (Soft-HG, Mid-HG, Hard-HG) を用いて3次元培養を行ったが、どの環境においても強く幹細胞マーカーが発現し、分化マーカーの発現は確認できなかった。

(2) マイクロ流体デバイス内での3次元組織培養法の開発

本研究では、まず肝臓細胞と心筋細胞のマイクロ流体デバイス内における3次元培養法の確立を行った。

心筋細胞においては、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した細胞をマイクロ流体デバイスに導入し、その経過を観察、その後、免疫染色法やカルシウムイメージングなどにより、機能的な心筋組織であることを確認した。細胞外マトリックスの成分によって、3次元組織化効率が異なることも見出している。

肝臓細胞においては、やはりヒト多能性幹細胞から分化誘導した細胞をマイクロ流体デバイスに導入し、その細胞マーカー発現の評価を行っている。

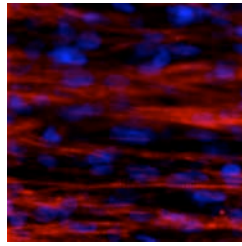


図 4 免疫染色法による心筋細胞マーカー (α SMA) 発現確認。ヒト多能性幹細胞から分化誘導した心筋細胞をマイクロ流体デバイスで3次元培養した。各細胞が強くマーカーを発現していることが確認できた。

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 4 件)

- ① L. Liu, M. Yoshioka, M. Nakajima, A. Ogasawara, J. Liu, K. Hasegawa, S. Li, J. Zou, N. Nakatsuji, K. Kamei* and Y. Chen,*
 “Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells”
 Biomaterials, **35**, 6259-6267 (2014)
 (査読有)
 DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.04.024
- ② K. Kamei,* Y. Hirai and O. Tabata
 “Body on a Chip: Re-creation of a living system in vitro” (Review)
 IEEE, Nanotechnology Magazine, 7(3), 6-14 (2013) (査読有)
 DOI: 10.1109/MNANO.2013.2275024
 (*Corresponding authors)
 (注: 雑誌の表紙に選出)
- ③ K. Kamei
 “Cutting-edge microfabricated biomedical tools for human pluripotent stem cell research”
 (Review) (査読有)
 Journal of Laboratory Automation, 18(6), 469-481 (2013)
 DOI: 10.1177/2211068213495394
- ④ K. Kamei, ‡*Y. Hirai, ‡ Y. Makino, M. Yoshioka, Q. Yuan, M. Nakajima, Y. Chen, and O. Tabata,*
 “Phenotypic and transcriptional modulation of human pluripotent stem cells induced by

nano/microfabrication materials”
 Advanced Healthcare Materials, 2(2), 287-291 (2013) (査読有)
 DOI: 10.1002/adhm.201200283

[学会発表] (計 4 件)

- ① K. Kamei, Y. Mashimo, Y. Koyama, M. Yoshioka, M. Nakajima, C. Fockenber, Y. Chen
 “Bio-inspired microfluidic platform to control cell functions”
 日本化学会第 94 春季年会 (2014)
 2014. 3. 27~30
- ② Y. Mashimo, K. Kamei, C. Fockenber, L. Liu, Y. Koyama and Y. Chen
 “High-throughput screening platform of engineered cellular microenvironments for human pluripotent stem cells”
 日本化学会第 94 春季年会 (2014)
 2014. 3. 27~30
- ③ 亀井 謙一郎、劉 莉、吉岡 桃子、長谷川 光一、中辻 憲夫、陳 勇
 「ナノファイバーを用いたヒト多能性幹細胞培養基材の開発」
 日本再生医療学会総会 (2014)
- ④ 眞下 泰正、C. Fockenber、小山 芳江、劉 莉、陳 勇、亀井 謙一郎、
 「ハイスループット・マイクロ流体デバイスを用いたヒト ES/iPS 細胞培養用ナノファイバー・スクリーニング」
 日本再生医療学会総会 (2014)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: マイクロ流体デバイスを用いたヒト多能性幹細胞の微小3次元培養法
 発明者: 亀井 謙一郎、陳 勇
 権利者: 京都大学
 種類: 特許
 番号: 特許願 2014-034166
 出願年月日: 2014年2月25日
 国内外の別: 国内

名称: 細胞培養足場基材、マイクロ流体デバイス及びそれを用いたハイスループットナノファイバースクリーニング方法
 発明者: 亀井 謙一郎、眞下 泰正、劉 莉、陳 勇
 権利者: 京都大学
 種類: 特許
 番号: 特許願 2013-263585
 出願年月日: 2013年12月20日
 国内外の別: 国内

○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

<http://www.chen.icems.kyoto-u.ac.jp/>

<http://kenlkamei.wordpress.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 謙一郎 (KAMEI, Kenichiro)

京都大学 物質-細胞統合システム拠点・
助教

研究者番号：00588262