

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710141

研究課題名(和文) オンチップ肝代謝モデルデバイスの構築

研究課題名(英文) An on-chip hepatic metabolism model for pharmacokinetic studies

研究代表者

木村 啓志 (Kimura, Hiroshi)

東海大学・工学部・講師

研究者番号：40533625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、医薬品開発における動物実験削減を目指した新たな生体代謝機能アッセイプラットフォームの実現に向けた基盤技術開発を実施した。マイクロ流体デバイス技術を活用することで、肝臓組織の最小構成単位である肝細胞索の微小構造を再現するための細胞三次元培養技術や、生体内臓器間相互作用を考慮した肝代謝機能評価系を確立し、オンチップ肝代謝モデルのプラットフォーム化の礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have established novel microfluidic technologies toward an in vitro metabolism assay platform as an alternative method of animal tests. 1) A fabrication method of an encapsulated three-dimensional cell structure in the microfluidics has been proposed to construct the metabolism model by a biomimetic approaches. 2) An microfluidic device to evaluate functions of the metabolism model has been developed, and the performance of the device was successfully tested using a prodrug.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ流体デバイス バイオMEMS 肝代謝モデル

1. 研究開始当初の背景

肝細胞を用いたアッセイは、化学物質の有効性や安全性を予測するための有効な手段となっているが、従来の培養実験系では培養環境が生体内と大きく異なるため、細胞機能を維持することができず、細胞動態の正確な予測が困難である。この問題を解決するために、生体外マトリックスによるサンドイッチ培養法や肝細胞と非実質細胞との共培養法、スフェロイド形成による三次元培養などが提案されている。これらの方法によって初代培養細胞の長期間培養や機能維持は実現されつつあるものの、毛細管形成などの構造的機能の維持は実現されていなかった。

一方、 μ TAS (Micro Total Analysis Systems) の研究分野では、マイクロ流体デバイスを細胞研究関連分野に応用する試みが世界的に進められていた。研究代表者も臓器由来細胞を培養・分析することのできるマイクロ流体デバイスの開発を進めており、肝臓の機能を果たす最小単位である肝細胞策モデルデバイスを開発していた (Y. Nakao, H. Kimura, et. al., Biomicrofluidics, 2011)。しかしながら、この肝細胞策モデルデバイスでは、肝細胞の長期機能維持が困難であることと、肝代謝機能評価が困難であるという課題を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では、医薬品開発における動物実験の削減を目指した新たな生体代謝機能の評価系として、*in vitro* 肝代謝モデルデバイスの実現を目的としている。これに向けて本研究課題では、マイクロ流体デバイス技術を活用したバイオミメティック的アプローチによって、*in vitro* での肝細胞の機能維持とその評価が可能な肝細胞アッセイプラットフォームの基盤技術を構築する。

3. 研究の方法

本研究では、肝細胞モデル構築のための基盤技術として、細胞包埋ゲルビーズ作製技術の確立と、肝細胞モデルの代謝機能評価を実現するためのマイクロ流体デバイスの開発を実施した。下記にそれぞれの詳細を記す。

3.1. 細胞包埋ゲルビーズの作製検討

本研究では、バイオミメティック的アプローチとして、3-4 個の細胞を包埋したマイクロビーズを肝細胞策構造に模倣した微小流路へ導入して三次元肝細胞策構造を実現することで、肝細胞の長期機能維持を目論んでいる。

これまでに、マイクロ流体デバイスを用いて細胞を包埋することのできるアルギン酸マイクロビーズを作製する方法は提案されていたものの、提案された手法で作製可能なアルギン酸マイクロビーズの直径は約 100 ~ 500 μm であった (E. Kang, et. al., Lab Chip, 2010)。細胞直径を約 20 μm とすると、細胞

3-4 個を包埋することのできるビーズサイズは、幾何学的な計算から約 65 μm と見積もられた。これを実現するために、マイクロ流体デバイスの流路デザイン、流量比や試薬量を最適化することにより、ビーズサイズを厳密に制御し、効率よく 100 μm 以下のアルギン酸マイクロビーズを作製できるデバイスの実現を目指した。

図 1 に、本研究で開発したマイクロ流体デバイスの概略図を示す。本デバイスは、アルギン酸ナトリウム水溶液用の流路とオイル用の流路、さらにアルギン酸の固化反応のための流路で構成されており、それぞれ溶液導入用ポートやビーズ回収用ポートが設けられている。アルギン酸ナトリウムは塩化カルシウムと反応して固化する性質がある。この性質を利用してアルギン酸ナトリウム水溶液を塩化カルシウム含オイル溶液と混液部でビーズを形成した後に反応させ、固化させることでアルギン酸マイクロビーズを作製する。混液部付近の流路幅と流路深さは、いずれも 100 μm とした。デバイスは既存のマイクロファブリケーション法によって作製した。

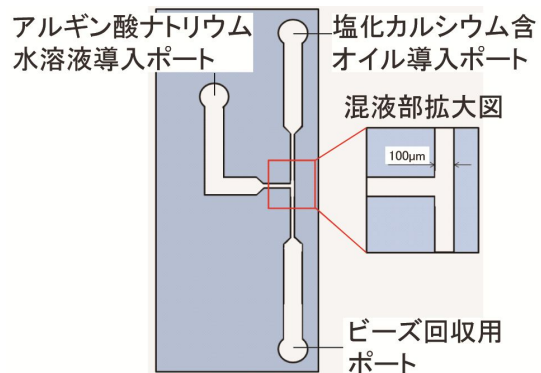


図 1 デバイスデザイン

マイクロビーズサイズ制御のための最適化検討として、アルギン酸ナトリウム水溶液と塩化カルシウム含オイルを用いたアルギン酸マイクロビーズ作製実験を実施した。本実験では、マイクロビーズサイズに影響を与えると予測されたオイルに含まれる界面活性剤の量と水溶液-オイルの流量比を最適化検討項目とした。

3.2. 肝代謝モデル機能評価系の構築

本研究では、肝細胞モデルの代謝機能評価系として、機能集積型のマイクロ流体デバイスも開発した。肝代謝モデルを評価するためには、薬剤が投与されてから効果を発揮するまでの薬物動態をデバイス上で再現する必要がある。本研究では、肝代謝モデルとその薬剤ターゲットとなる病態臓器モデルを単一のデバイス上に集積化し、代謝機能評価を簡便に実施することのできるデバイスの開発とその評価を実施した。本研究では、臓器の中でも全血液が流入し、生体内でも極めて

重要な臓器である肺を肝代謝モデル機能評価のための薬剤ターゲット病態臓器とした。血流を送り出す役割を果たす心臓モデルとしてスター型マイクロポンプを集積化することで、閉ループ系でのオンチップ灌流培養を可能とした。図2に開発したデバイスの写真を示す。

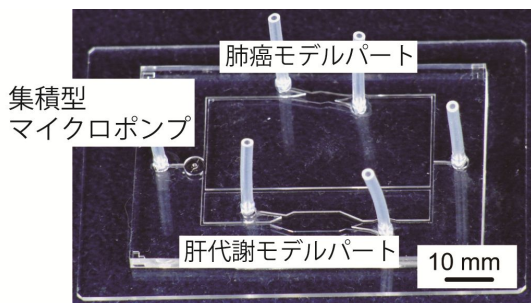


図2 肝代謝モデル機能評価デバイス

本研究では、肝代謝モデルとしてヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を、肺癌モデルとしてヒト肺癌由来細胞株 A549 を用いた薬物動態評価実験を実施した。本実験では、薬剤モデルとしてプロドラッグであるテガフルを用いた。テガフルは肝臓細胞の酵素で代謝されることによって抗癌作用を持つ 5-フルオロウラシルに変化する薬剤物質である。本実験では、肝代謝モデルの代謝機能評価として肝代謝モデルと肺癌モデルを導入したデバイスと、肺癌モデルのみを導入したデバイスにおける肺癌モデル細胞の生存率を計測することで、本肝代謝モデルの薬物代謝機能評価系としての評価を行った。

4. 研究成果

4.1. マイクロビーズ作製条件の最適化

開発したデバイスを用いて界面活性剤添加量と各溶液の流量比に関する詳細な条件検討を実施した。まず、オイルに界面活性剤を添加しない場合には流量比を変更しても水溶液とオイルが層流を形成してしまい、マイクロビーズが作製されないが、界面活性剤を添加することによって、流路内でマイクロビーズが作製可能であることがわかった。このことからマイクロビーズを作製するためには、オイルへの界面活性剤添加が必須であることが示唆された。図3に界面活性剤添加量 17 mg/ml と 33 mg/ml の時に、流量比を 1:1、1:5、1:10 と変更した場合に作製されたマイクロビーズの様子を示す。実験の結果から界面活性剤の添加量や溶液の流量比を最適化することにより、これまで実現されていなかった 100 μm 径以下のビーズサイズを制御可能であることが示唆された。また、本研究で目的とする細胞 3、4 個を包埋するためのマイクロビーズ (約 65 μm) を作製できる最適条件は、界面活性剤濃度 33 mg/ml、流量比 1:5 であることが明らかとなった。当該条件では、標準偏差が小さいことから安定したビーズ作製が可能である。さらに、このマイク

ロビーズに細胞を包埋することが可能であることも実験により確認済みである。細胞を包埋したビーズを申請者がすでに提案している肝細胞策形状流路に配列することで、三次元肝細胞策を実現できると考えられる。

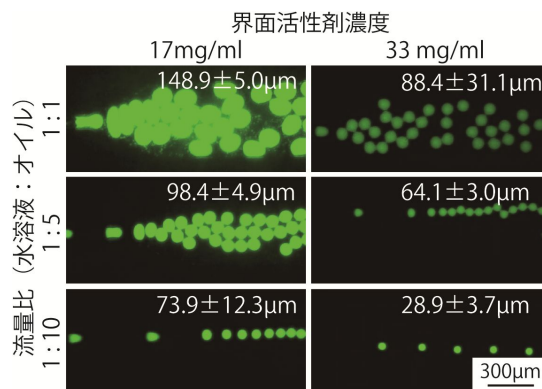


図3 流路内で形成されたマイクロビーズ

4.2. 肝代謝評価デバイスの機能評価

開発した肝代謝モデル評価デバイスを用いて実施した薬物暴露試験における肺癌モデルの生細胞率を図4に示す。実験結果から、肝代謝モデル(-)の場合と比して、肝代謝モデル(+)の場合では肺癌モデル細胞の生存率が有意に低くなることが示された。この現象は、テガフルが肝代謝モデルによって代謝されて5-フルオロウラシルに変化し、肺癌モデルの細胞に対する抗癌作用を示した結果であると考えられる。以上の結果から、本デバイスを用いて生体で実際に起こりうる肝代謝機能の再現が in vitro 実験系で実証可能であることを示すと同時に、肝代謝評価モデルとしての十分な機能を有することを確認した。また、本研究では、肝代謝モデルへの応用として、デバイス内における iPS 細胞の肝細胞分化に関する検討にも着手した。

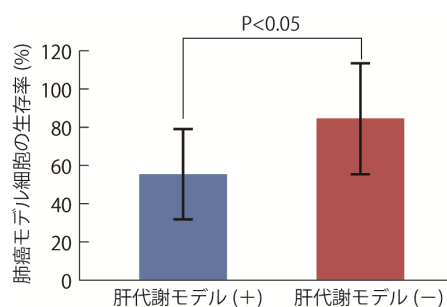


図4 薬物暴露試験結果

上記の通り本研究では、オンチップ肝代謝モデルの実現を目指して、肝細胞の三次元配列のためのマイクロビーズ作製技術と、肝代謝機能をオンチップで簡便に評価するための機能集積化技術の構築に努め、目標としていた技術基盤構築とこれらの最適化・評価実験を行い、一定の知見を得ることができた。さらに、本研究期間内に、本研究の応用を見込んで iPS 細胞のデバイス内肝細胞分化に関

する検討に着手するに至った点は、特筆すべき成果である。本研究で得られた技術や知見を統合することで、簡便でハイスループットな肝代謝機能アッセイの実現が期待される。動物実験の削減が叫ばれている昨今、本研究で提案するような代替法の確立は社会的貢献度の高い研究といえる。今後は本研究で確立した基盤技術を統合し、実用化に向けた統合アッセイプラットフォームの実現に向けた研究に取り組んでいく。

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 3件)

1. M. Shinohara, H. Kimura, K. Montagne, K. Komori, T. Fujii, Y. Sakai, "Combination of microwell structures and direct oxygenation enables efficient and size-regulated aggregate formation of an insulin-secreting pancreatic beta-cell line", *Biotechnol. Prog.*, DOI: 10.1002/btpr.1837, 2013, 査読有
2. H. Nakayama, H. Kimura, T. Fujii, Y. Sakai, "Image-based evaluations of distribution and cytotoxicity of Irinotecan (CPT-11) in a multi-compartment micro-cell coculture device", *J. Biosci. Bioeng.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.11.019>, 2013, 査読有
3. J. Kawada, H. Kimura, H. Akutsu, Y. Sakai, T. Fujii, "Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation", *Lab on a Chip*, vol.12, no.21, pp.4508-4515, 2012, 査読有

[学会発表](計 13件)

1. 木村啓志 "着床前胚を取り扱うマイクロ流体デバイス技術", ほぼ乳類着床前胚の定量生物学, pp. 9-16, 東京大学駒場第二リサーチキャンパス, 2014年3月10-11日(招待講演)
2. 木村啓志 "マイクロ流体デバイスを用いた細胞外環境操作", 電気化学会関東支部2013年関東支部セミナー, pp. 9-16, 東京農工大学小金井キャンパス, 2013年11月22日(招待講演)
3. 堀尾直史, 木村啓志, "代謝経路を再現するオンチップ生体モデルの構築", 第5回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, pp27-28, 仙台国際センター, 2013年11月5~7日
4. H. Kimura, T. Ikeda, Y. Sakai, T. Fujii, "On-chip absorption and metabolism model for pharmacokinetic studies", *µTAS2013*, pp.1746-1748, German, Oct

27-Nov 2, 2013

5. 堀尾直史, 木村啓志, "代謝経路を再現するオンチップ生体モデルの構築", 日本機械学会関東学生会第52回学生員卒業研究発表講演会, pp. 223-224, 首都大学東京南大沢キャンパス, 2013年3月15日
6. 小畑佑一, 岡村陽介, 木村啓志 "生分解性高分子材料の微細加工法に関する検討", 日本機械学会関東学生会第52回学生員卒業研究発表講演会, pp. 203-204, 首都大学東京南大沢キャンパス, 2013年3月15日
7. 木村啓志 "マイクロ流体デバイスのバイオ応用", 先端環境材料・デバイス創製スクール ナノバイオコース, かわさき新産業創造センター, 2013年1月21-22日(招待講演)
8. H. Kimura, T. Ikeda, Y. Sakai, T. Fujii, "On-Chip Absorption and Metabolism Model for Pharmacokinetic Studies", *IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference*, p.55, Hawaii, USA, December 3-7, 2012
9. 木村啓志 "定量生物学研究者のためのマイクロ流体デバイス技術", 定量生物学の会第五回年会, 東京大学駒場第二リサーチキャンパス, 2012年11月24-25日
10. 木村啓志 "マイクロ流体デバイスを用いた細胞外環境操作", 電気学会調査「新機能・高性能有機デバイス応用のためのナノ材料・構造制御調査専門委員会」, 東海大学湘南キャンパス, 2012年10月18日(招待講演)
11. J. Kawada, S. Kaneda, H. Kimura, H. Akutsu, Y. Sakai, T. Fujii, "Control of Culture Environment for Differentiation of Pluripotent Stem Cells", *Microfluidics for Tissue and Cell Applications (JST CREST/SICP/ERATO) Joint Symposium*, p.8, IIS University of Tokyo, October 5, 2012
12. 木村啓志 "マイクロ流体デバイスのバイオ・医療応用", 東海大学総合医学研究所第8回研修会, 山翠楼, 2012年10月12-13日(招待講演)
13. 木村啓志 "マイクロ流体デバイスを応用した細胞外環境操作", 第60回糖鎖科学研究所講演会, 東海大学湘南キャンパス糖鎖科学研究所, 2012年5月29日(招待講演)

[図書](計 1件)

1. 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫 "第4章: 医療計測用バイオマテリアル, 第13節: マイクロ流体デバイス技術を応用した in vitro 生体モデルの構築", 先端バイオマテリアルハンドブック, エヌティーエス出版, pp.474-477, 2012年6月15日発行, 書籍分担執筆

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.mech.u-tokai.ac.jp/laboratory/011.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 啓志 (KIMURA HIROSHI)
東海大学・工学部・講師
研究者番号：40533625

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：30251474
酒井 康行 (SAKAI YASUYUKI)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：00235128