

血管網との共培養に着目した Microphysiological systems (MPS)の開発

Development of microphysiological systems (MPS)
focusing on co-culturing blood vessels

横川 隆司

Ryuji Yokokawa

京都大学大学院 工学系研究科マイクロエンジニアリング専攻 教授
Department of Micro Engineering, Kyoto University (Professor)

KEYWORD ▶ Microphysiological systems (MPS)

マイクロ流体デバイス

マイクロ・ナノ加工技術

はじめに

01

マイクロ流体デバイス内に臓器細胞を培養した生体模倣システム、すなわちMicrophysiological systems (MPS)によりヒト臓器の機能を再現するという概念が広く知られるようになった。以前は、臓器細胞を培養することに力点を置いて、より直接的にOrgan-on-a-Chipと呼ばれていた。これらの細胞培養技術は、従来の培養皿を用いた場合よりも生体内の臓器機能を適切に表現することができる。そのため創薬支援ツールとしての利用が期待されるようになり、生理学的な機能計測に着目してMPSという呼称が一般的に使われるようになった。近年、創薬におけるMPSの位置付けについて論じた総説は多く発表されており、創薬応用に関する議論はそちらに譲る^{1, 2)}。

本稿では、MPSを工学的なシステム創成と捉えて、そのマイクロ加工技術に立脚したアプローチを概説する。まず、Organ-on-a-Chip以前のマイクロ流体デバイスと細胞アッセイの融合研究からMPSへの展開、およびMPS研究を支えてきた研究プロジェクトについて述べる。次に、ヒト臓器の構造において特徴的な血管構造と実組織の界面を設計するという着想に基づいて、具体的なMPSの例を紹介する。セルカルチャーインサートのように界面を平面的に再構成する二次元MPS、スフェロイドやオルガノイドなど三次元組織の培養のための血管網を有する三次元MPSについて近年の研究例を紹介する。最後に、MPS研究においてアカデミアが有する課題と今後の期待について述べる。

Organ-on-a-Chipから Microphysiological systems (MPS)へ

02

マイクロ流体デバイスあるいはマイクロ加工技術と細胞培養技術の融合は、1990年代前半から報告され始めた。これには、A. ManzらによるMicro Total Analysis Systems (μ TAS、マイクロタス)の概念の提唱が大きな貢献を果たしており、後に

Lab-on-a-Chipとも呼ばれるようになった³⁾。 μ TASは、有機・無機化学においてベンチトップで実施される溶液輸送、混合、反応、ろ過、検出などの複数の操作をワンチップ上に統合しようという考え方であり、マイクロ流体デバイス(チップ)はフォトリソグラフィを中心とした半導体プロセスによって作製される。半導体プロセスを用いて電気・機械的な機構を作製するMicro Electro Mechanical Systems (MEMS)の隆盛に続き μ TASの研究分野が広がった。初期の μ TASでは、アミノ酸⁴⁾や核酸⁵⁾の分離検出チップが多く報告されており、これを細胞生物学に応用しようという流れはごく自然に進んできた。例えば、マイクロパターンを用いて細胞を配置する技術は1994年に報告されており⁶⁾、マイクロチャンネル(流路)の中での細胞培養は2001年に報告されている⁷⁾。その後も、マイクロスケールにおける細胞培養では、細胞間相互作用や細胞への物理化学的な刺激を制御しやすいことから、様々な細胞アッセイが報告された。2010年頃までのオンチップ細胞アッセイについては、総説が多く発表されている⁸⁾。

最初のOrgan-on-a-Chipとして、Lung-on-a-Chipが2010年に報告された⁹⁾。上記のオンチップ細胞アッセイとの違いは、Lung-on-a-Chipが肺胞上皮細胞と血管内皮細胞の共培養により上皮・内皮組織の界面を再現しただけでなく、その細胞極性を規定しそれに依存したアッセイを実証した点である(図1a)。MEMSや μ TASに比べるとマイクロ加工技術に求められる技術レベルは高くないものの、複数の生細胞を扱うための技術課題は広範にわたる。つまり、チップの材料選定、細胞外基質(ECM)コーティング、培地最適化により細胞培養系を設計しなければならないこと、培養皿に比べはるかに少数の細胞から分子生物学的な評価をしなければならないことから、求められる技術分野が格段に広がった。この点が、学術的に多くの分野の研究者の興味を引き、Lung-on-a-Chipが高く評価されることとなった所以である。この成果を皮切りに、腸、腎、血液脳関門(BBB)など様々な臓器モデルが次々に開発された。ここで述べるまでもなく、創薬における有効性と安全性の向上という喫緊の課題や、Organ-on-a-Chipによる候補医薬品評価のコスト削減や開発期間短縮などのニーズの高まりが背景にある。

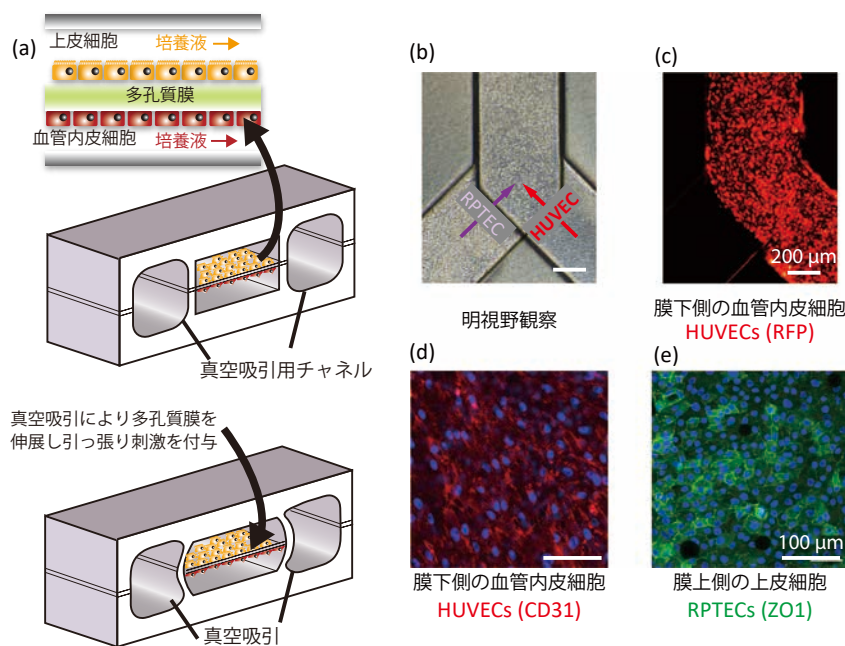


図1 二次元MPSの構成 a) 多孔質膜の上側に上皮細胞、下側に血管内皮細胞を培養する。左右のチャンネルは真空吸引することにより、多孔質膜を伸展し引っ張り刺激を付与する。b) 流路内培養した近位尿管上皮細胞 (RPTEC) と血管内皮細胞 (RFP-labeled HUVEC) の明視野観察。c) RFP-labeled HUVECの蛍光像。d) HUVECのCD31免疫染色像。e) RPTECのZO-1免疫染色像。

Lung-on-a-Chipモデルを基盤に、米国では即座にheart-lung tissue chipを用いた薬剤の安全性と有効性を評価するNational Institute of Health (NIH)のプロジェクトが開始された(<https://ncats.nih.gov/tissuechip/about>)。これは、あくまでレギュラトリーサイエンスプログラムの一環として開始されたが、それ以降も関連の研究プロジェクトが広がり、2016年の世界経済フォーラムにおいてOrgan-on-a-ChipがTop 10 Emerging Technologiesとして取り上げられるに至った。この頃になると、各論文誌における特集号やメディアへの露出により、特に創薬支援技術としての位置づけが注目され、広く認知されるようになった。さらに、単一臓器の微小環境の再現に留まらず、三次元アッセイとの融合や複数臓器との連関を評価することで、ヒト臓器に対する外挿性を高める取り組みが広がっている。

アカデミアにおける研究として、米国では2012年からNIH、Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA)、Food and Drug Administration (FDA)の共同プロジェクトを17名の主たる研究者が牽引する形で、ヒト臓器を網羅的にオンチップ化する取り組みが始まった。2014年からは第2フェーズとして複数のOrgan-on-a-Chipを接続することによる多臓器モデルが開発された。2017年までの5年間で約160億円の大型プロジェクトとなり、新たな学術研究分野の形成に貢献した。また、このプロジェクト推進の過程において、FDAが微小環境における組織や臓器の生理機能を再現する技術をMicrophysiological systems (MPS)と定義したことが重要である(<https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancing-alternative-methods-fda>)。MPSは、Organ-on-a-ChipやTissue Chipも含むものと

広く定義されており、半導体プロセスに限らず射出成型や3Dプリンタを用いたチップも含まれる。この定義は、創薬において従来の培養皿を用いた細胞培養実験や動物実験に代わる医薬品の評価方法が非常に強く求められていることを反映しており、この目的に合致するあらゆるアプローチを取るという研究者の強いメッセージである。このような経緯から、本稿においてもこれ以降はMPSと呼ぶこととする。

アカデミアにおける研究分野の形成を受けて、MPSの実用化に向けた企業の動きも活発になった。その一つとして、多くの製薬企業が参画するThe International Consortium for Innovation and Quality in Pharmaceutical Development (IQ Consortium)が、2018年にIQ MPS Affiliateを設立した(<https://www.iqmeps.org/>)。MPSの社会実装に向けた課題、特にcontext of use (COU)に沿ったチップ作製から細胞アッセイまでのパッケージを規制当局に受け入れてもらうことが重要な課題であると位置付けて活動している。IQ MPS Affiliateでは、MPSが「薬物の有効性と安全性に関する独自の洞察をもたらし、現在創薬や薬剤開発に用いられているin vitroモデルに比べ、in vivoにおけるヒト臓器や組織の生理的機能を予測できる可能性のある革新的なモデルである」と期待を寄せている。IQ Consortiumでは、実用化に向けた議論を企業間の議論として留めるのではなく、学術論文誌に掲載することでアカデミアに新たなMPS開発の期待を寄せたり、規制当局にMPSを用いた標準化や基準化を促したりする情報発信により、産官学の連携を促している。一方、参画企業は、それぞれがMPSを活用した研究成果を独自に発表している。つまり、コンソーシアムとして規制当局に働きかけたり情報共有したりする活動と、各企業内での活動

が両輪となってMPSの実用化が進められている。これらの活動は年次報告書に纏められているのでご参照頂きたい(<https://www.iqmps.org/annual-report>)。

2010年代後半のMPS開発について、米国の動きを例に紹介してきた。この間、学術的な成果として多くの論文が発表されたこと、初期から複数の学術分野の融合とレギュラトリーサイエンスからのアプローチを盛り込んだこと、NIHのNational Center for Advancing Translational Sciences (NCATS)が産学連携によりMPSコミュニティの拡張を図ったことなどが特筆すべき点である。一般的には、学術研究分野の形成後、実用化の道筋が見え始めるとアカデミアにおける研究は下火になることが多い。しかし、NCATSを中心に新規MPS開発のための3D tissue chip、Tissue chip in space、Immune Chipなど新たなプログラムによりMPSを活用した学術研究が広がっており、創薬応用に限らず基礎生物学分野との連携により、学術的な深みも追及する取り組みがアカデミアの研究者を引きつけている¹⁰⁾。欧州では、Horizon 2020 Future and Emerging Technologies Open projectとして、Organ-on-Chip In Development (ORCHID)が2017年から実施されEuropean Organ-on-Chip Society (EUROoCS)が設立された¹¹⁾。我が国においても2017年からAMED-MPS事業が開始され、肝臓、小腸、腎臓、BBBのMPS開発が進んでおり、2022年からは第2フェーズに入った。産官学の連携により国産のMPSが活用されるよう、筆者らも微力ながら貢献したい。また、近年の日米欧のMPSコミュニティを繋ぐ役割として、2022年に第1回のMPS World Summitが開催され、2023年はベルリン、2024年はシアトルでの開催が決まっている(<https://mpsworldsummit.com/>)。MPSに関する国際会議としての位置づけであり、今後はアジア各国からの貢献も必要である。

二次元MPS: セルカルチャーインサートからの発展

03

ヒトの臓器は三次元であるから、in vitroアッセイも三次元のスフェロイドが優れている、と言う見方がある。一方で、臓器を微視的に見れば、各要素単位は二次元と見なすことができ、その要素単位の集まりが三次元の臓器を形成していると考えられることもできる。MPSによりヒト臓器機能をまるごと再現するのではなく、その一部を抽出して再現性良くかつ定量的に評価することがMPS開発の主眼であるとするれば、二次元MPSという考え方は非常に理に適ったものである。

上皮組織とそれを支える基底膜は、従来のセルカルチャーインサートを用いることにより良く再現されてきた。チャンバー上下を仕切る多孔質膜のポアサイズを選択することで、薬物輸送、血管新生、腫瘍の転移や浸潤などを評価できるが、これをマイクロ流体デバイス内に構成することでどのような利点があるだろうか。極微量の培地や試薬を用いた生化学的な刺激、細胞培養時のせん断応力刺激、基底膜に対する引っ張り刺激などの入力

定量的に加えながら、出力としての細胞の動態もリアルタイムで観察・評価ができる。それを実証したのが前述のLung-on-a-Chipであり、上側の流路に上皮細胞、下側の流路に血管内皮細胞を培養している(図1a)⁹⁾。本稿では、Lung-on-a-Chipの詳細な解説は拙稿に譲り¹²⁾、その後の二次元MPSの展開について述べる。

例えば、血液脳関門モデル(BBB)では、下側の流路にヒト脳微小血管内皮細胞、上側の流路にペリサイト、ニューロン、アストロサイトなどを共培養した系が用いられ、血管網との共培養を可能にしている。BBBにおける最重要課題は、新規候補化合物の脳内移行性の適切な評価であり、MPSを用いることで細胞のアピカル側とベーサル側のそれぞれに独立してアクセスを行い、一方から他方への分子輸送を評価することが必須である。分子量依存的なバリア機能、P-gp等による適切な薬剤排出機能を再現することが重要である。市販のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、マウス脳微小血管内皮細胞(bEnd.3)、さらにラット神経膠腫細胞(C6)等を用いたデバイス開発の例は非常に多く報告されており、経上皮電気抵抗(TEER)計測システムを搭載したバリア機能のモニタリング技術も重要である。近年の例では、患者由来のiPS細胞から内皮細胞、ニューロン、アストロサイトを誘導してBBBを作製し、トランスポーターの欠損やバリア機能の低下を再現したり、薬剤の透過性予測を精度良く実施したりした例がある¹³⁾。また、せん断応力刺激によるバリア機能の向上を評価し、擬似的な三次元環境においてアストロサイトを培養することで炎症マーカーの上昇を抑えたモデルになること、high density lipoprotein (HDL)を模倣したナノ粒子の透過や蓄積の評価が報告されている¹⁴⁾。いずれも、MPSを用いて構成したBBBが遺伝子やタンパク質のレベルからin vivoの発現パターンを反映しているかの評価、得られたBBBのバリア機能や物質の脳内移行性の評価まで網羅的に実施されている。つまり、2015年頃まではBBBの細胞構成や構造に着目したMPS開発が主眼であったが、近年ではマイクロ流体デバイスの最適化から始めて、動物実験も活用した臓器らしさの評価や機能の再現までを実証することが求められている。

二次元MPSでは、BBBに限らず、腸、肝、腎などにおいても上記のような研究開発の流れが示されている。筆者らも、上側の流路に近位尿細管上皮細胞、下側の流路に血管内皮細胞を培養した血管網との共培養系を用いて、腎近位尿細管モデルを開発してきた(図1b-e)。マイクロ流体デバイスの開発をベースに初代培養細胞や株化細胞を用いて、小腸であれば吸収、肝臓であれば代謝・排泄、腎臓であれば再吸収を実証することが第一歩であった。これらのMPSについても、近年はヒトiPS細胞を用いて高機能化すること、疾患特異的ヒトiPS細胞を用いて個別化医療を目指したMPSをゲノミクスやプロテオミクスと融合して実証することが主流となっている。また、腸肝循環に留まらず、多臓器連結モデルを用いることや、PK/PDの数値モデルとの融合によりヒトへの外挿性を目指す方向が重要である¹⁵⁾。Lung-on-a-Chipから始まったMPSは、アカデミアにおいて求められる研究の分野が広がり、求められるデータの質も高まることで、新たなMPS開発の方

向性が示されている。

以上の経緯から、近年のMPS研究は、システム設計からプロトコル開発と細胞アッセイまで実証するために、非常に広範な知識と長い時間を要する。このため、マイクロ流体デバイスやそれを支える流体システムの開発、およびそれを用いた基本的な細胞アッセイについては大学発ベンチャーに依存している研究が多い。例えば、Lung-on-a-Chipを開発したハーバード大学発のEmulate (<https://www.emulatebio.com/>)はその代表であり¹⁶⁾、ドイツのTissUse (<https://www.tissuse.com/en/>)、オランダのMimetas (<https://www.mimetas.com/en/>)なども基盤技術をアカデミアに提供して、連携先の研究者がMPSを用いた学術的に重要な成果を発表している。これらのベンチャー企業は、複数の製薬企業と包括的な研究契約によりMPSの創薬応用を進める一方、アカデミアにも基盤技術を提供して新たなMPSを開発する二方向にビジネスを展開している。近年は、次項の三次元MPSについてもベンチャー企業が同様の取り組みを進めることで、産学間の知識や人材の良い循環が広がっている。

三次元MPS:生体の発生に倣う

04

二次元MPSでは、実質細胞と血管内皮細胞の界面を微視的に再現するに留まり、複数種類の細胞の共培養や細胞密度の高い環境までは再現できない。これを実現するため、細胞凝集塊であるスフェロイドを用いた毒性試験や薬物動態試験が広く行われており、長年にわたる細胞選定やアッセイ技術の蓄積がある。スフェロイドの大量並列作製に用いるプレートと細胞をキットにし

た製品が販売されており、平面培養の場合よりも薬物代謝酵素やトランスポーターの発現が高いことが知られている。しかし、その多くは初代培養細胞や株化細胞を用いることで品質管理を行っており、短期的な細胞機能の評価に留まっている。そこで、長期的なスフェロイド評価を実施するために、マイクロ流体デバイスを用いた灌流技術、酸素供給、局所刺激応答アッセイなどが統合されてきた。つまり、スフェロイド技術は、学術研究におけるニーズから様々なオンチップ技術と融合されることにより、MPSのひとつとして捉えられるようになってきた。

近年では、オルガノイド研究の発展が目覚ましく、マイクロ流体デバイスと融合する取り組みが広がっている。これは、オルガノイドを構成する複数の細胞やECMによる細胞ニッチ、液性因子の濃度勾配、血流や間質流による細胞へのせん断応力などをマイクロ流体デバイスにより定量的に規定できることが理由である。例えば、オルガノイドアレイをチップ内で大量かつ並列に作製し成長因子の濃度勾配を与えれば、オルガノイドの分化誘導条件を大量かつ一括に評価できる¹⁷⁾。また、各種モルフォゲンの濃度勾配を規定すると、ヒト臓器の発生におけるパターン形成を模倣できることから基礎生物学におけるマイクロ流体デバイスの利用が広がっている(図2a)。オルガノイド技術についても、発生生物学的なニーズからオンチップ技術との融合に至った研究例が多く、今後も臓器発生における細胞ニッチを規定するための技術としての位置づけが重要である。既にオルガノイド創薬は多くの製薬企業が着手しているところであり、Organ-on-a-ChipがMPSの1つとして活用されるようになることを期待したい。

スフェロイドやオルガノイド技術に加え、細胞や高分子材料の3Dプリンティング技術、細胞シートを積層するバイオエンジニアリング的な三次元化技術などを含め、三次元の細胞培養モデル

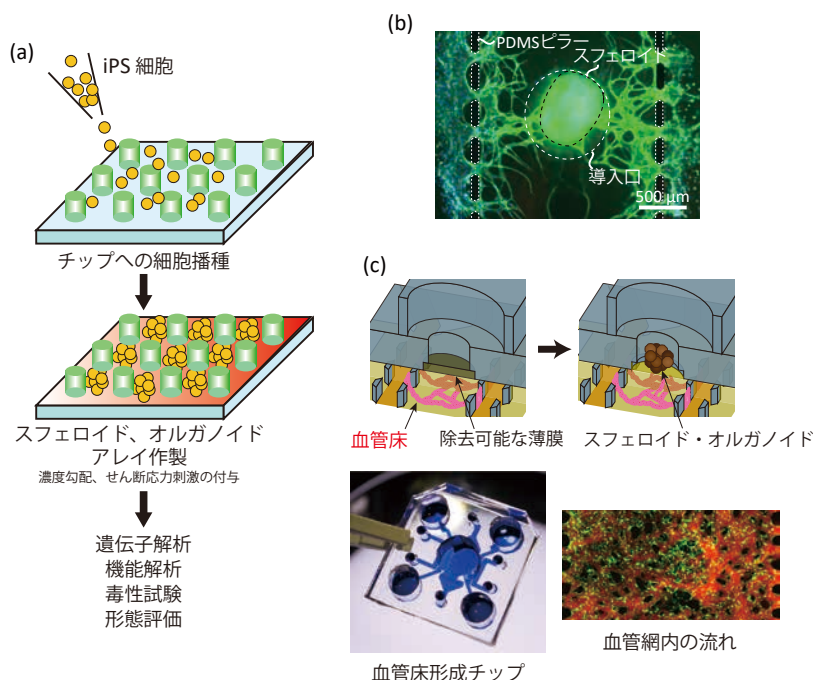


図2 三次元MPSの構成 a) スフェロイド、オルガノイドアレイの製作と、濃度勾配やせん断応力刺激の付与。b) 血管新生による三次元組織と血管網の接続。c) 血管床を用いたスフェロイド、オルガノイドの共培養チップ。

が確立してきた。これらをそのまま細胞アッセイに用いることもできるが、細胞塊内部は酸素や養分不足により壊死してしまい、長期アッセイには向かない。そこで、三次元モデル内部の細胞に酸素や養分を供給し、経血管的な薬剤投与実験をするために血管網を融合する試みが広がっている。チップ内に血管網を作製する技術は、ヒト肺線維芽細胞(hLF)からの液性因子とHUVECの自己組織化能を活用して作製され、我々は血管新生能を活用してスフェロイド内に血管網を構築した(図2b)。近年では、スフェロイドが十分な血管新生因子を有しない場合にも、血管網構造と共培養できるような血管床デバイスを開発した。この技術を用いると、灌流可能な血管床の上にスフェロイドやオルガノイドを培養し、その内部まで血管網を導入して灌流することもできる(図2c)¹⁸⁾。通常のシャーレを用いた培養ではhLFの液性因子は拡散してしまうが、チップ上で濃度勾配を維持することによって血管新生や脈管形成を誘導している。つまり、チップがあるからこそ実現可能な血管網を有する三次元MPSが実現できたのである。

三次元の血管網を用いた共培養の例として、骨や筋組織に対するがん細胞の転移モデル、骨組織モデル、血液脳関門モデルなどが報告されている。筆者らは、乳ガン細胞MCF-7を用いたスフェロイドに対する薬剤投与実験¹⁹⁾、胞巣状軟部肉腫モデルにおける血管壁透過性の変化などを実証している¹⁸⁾。

今後は、二次元MPSと同様に、疾患特異的ヒトiPS細胞を用いた病態モデルを展開することで、三次元化技術を利用したMPSの活用が広がるものと期待される¹⁶⁾。培養皿における培養から始まり、二次元MPS、三次元MPS、多臓器連結モデルへと展開してヒト臓器との相関を求める方向と、細胞アッセイのスループットを上げる方向は相反するものがある(図3)。本稿で紹介した例はMPSのごく一部であるが、このトレードオフを考慮しながらCOUに応じたMPSが今後多く開発され、創業の現場において活用されることを期待したい。

おわりに

05

MPSに必要なMEMSや μ TASといった要素技術の研究・開発は我が国がトップランナーでありながら、なぜMPSについては欧米諸国に先を越されてしまったのかを工学的視点から考察して結びとしたい。我が国においては、日の丸半導体がトップを走った1980年代を受けてMEMSが広がり、その後MEMSを活用した μ TASが広まったため、これらの分野における日本の基礎から応用研究の層は厚い。一方、Organ-on-a-ChipやMPSは、MEMSや μ TAS以上に複数の学術分野が連携した融合分野の研究であり、この分野における我が国のプレゼンス向上が今後さらに望まれる状況である。この要因のひとつは、複数の研究費配分機関が研究目的や対象ごとに分かれており、MPSが必要とする基礎から応用かつ複数分野を幅広くかつシームレスに繋いでサポートする体制がなかったことである。また、我が国特有の研究者育成制度がMPS研究に適応していないことも挙げられる。つまり、大学学部教育では学科のカリキュラムにより特定の学問分野を深めることが重視されており、大学院においてもバイオエンジニアリング専攻など分野横断型の専攻、あるいは分野横断型の履修が認められている専攻に所属していなければ、MPSに必要な学問領域を履修することは難しい。1990年代からDepartment of Biomedical Engineering(BME)が設立されて学部レベルでも医工融合教育が進んだ欧米諸国や、それに追従して2000年代にBMEが設立されたアジア諸国と比べると、我が国のMPSに必要な融合領域の人材育成は遅れている。このような現状に対し、AMED-MPS事業が開始されたことにより、国家プロジェクト主導で大学院生の視野が融合領域に広がってきたことは歓迎したい。例えば、AMED-MPS事業には機械系の研究者が多く参画しており、学生がMPSを機械工学における研究テーマの1つとして捉え始めたことは重要である。さらに、国内の大学にも医工融合教育を目指した大学院が増えたことにより、大学院を目指す学部生にもMPSが将来の研究テーマとして視野に入り始めていることを実感している。今後、各分野の垣根を越えた学部・大学

ヒト臓器との相関



アッセイのスループット

図3 従来の細胞アッセイ法とMPSの位置づけ

院教育を通して研究者の裾野が広がることで、我が国がマイクロ・ナノ加工技術やヒトiPS細胞技術の強みを活かしたMPSを開発し、当該分野における主導的な役割を果たすことを期待したい。

謝辞

本研究の推進にあたり、AMED-MPS事業(課題番号JA17be0304205)、次世代がん医療加速化研究事業(P-PROMOTE、課題番号JP22ama221206)、文部科学省「ナノテクノロジープラットフォーム」事業(課題番号:JPMXP09F19KT0107)、立石科学技術振興財団の支援を受けました。

参考文献

- 赤羽 隆文. マイクロフレイディクスの DDS 研究への応用 ライフサイエンス業界の救世主となりうるか: 高度培養技術を活用した Microphysiological System 開発の世界競走. *Drug Delivery System*. 2019, 34, 4, 236-242.
- 石田 誠一. 新規 in vitro アッセイ系の開発と医薬品評価への応用 Microphysiological Systems (MPS) の医薬品安全性・毒性評価への応用と課題. 2021, レギュラトリーサイエンス学会誌, 2021, 11, 1, 043-051.
- A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sensors and Actuators, B1*. 1990, 1, 244-248.
- D. Jed Harrison, Karl Fluri, Kurt Seiler, Zhonghui Fan, Carlo S. Effenhauser, and Andreas Manz. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip. *Science*. 1993, 261, 895-897.
- Adam T. Woolley, and Richard A. Mathies. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91, 11348-11352.
- Rahul Singhvi, Amit Kumar, Gabriel P. Lopez, Gregory N. Stephanopoulos, Daniel I. C. Wang, George M. Whitesides, and Donald E. Ingber. Engineering Cell Shape and Function. *Science*. 1994, 264, 696-698.
- Shuichi Takayama, J. Cooper Mcdonald, Emanuele Ostuni, Michael N. Liang, Paul J. A. Kenis, Rustem F. Ismagilov, and George M. Whitesides. Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999, 96, 10, 5545-5548.
- Edmond W. K. Young and David J. Beebe. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironmentsw. *Chem. Soc. Rev*. 2010, 39, 1036-1048.
- Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martin Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, and Donald E. Ingber. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*. 2010, 328, 1662-1668.
- Passley Hargrove-Grimes, Lucie A. Low, and Danilo A. Tagle. Microphysiological Systems: Stakeholder Challenges to Adoption in Drug Development. *Cells Tissues Organs*. 2022, 211, 269-281.
- Uwe Marx, Takafumi Akabane, Tommy B. Andersson, Elizabeth Baker, Mario Beilmann, Sonja Beken, Susanne Brendler-Schwaab, Murat Cirit, Rhiannon David, Eva-Maria Dehne, Isabell Durieux, Lorna Ewart, Suzanne C. Fitzpatrick, Olivier Frey, Florian Fuchs, Linda G. Griffith, Geraldine A. Hamilton, Thomas Hartung, Julia Hoeng, Helena Hogberg, David J. Hughes, Donald E. Ingber, Anita Iskandar, Toshiyuki Kanamori, Hajime Kojima, Jochen Kuehn, Marcel Leist, Bo Li, Peter Loskill, Donna L. Mendrick, Thomas Neumann, Giorgia Pallocca, Ivan Rusyn, Lena Smirnova, Thomas Steger-Hartmann, Danilo A. Tagle, Alexander Tonevitsky, Sergej Tsyb, Martin Trapecar, Bob van de Water, Janny van den Eijnden-van Raaij, Paul Vulto, Kengo Watanabe, Armin Wolf, Xiaobing Zhou, and Adrian Roth. Biology-Inspired Microphysiological Systems to Advance Patient Benefit and Animal Welfare in Drug Development. *ALTEX*. 2020, 37, 3, 365-394.
- 横川隆司. マイクロ生体機能模倣システム (MPS) を用いた創薬研究の現状と展望. *医学のあゆみ*, 医歯薬出版株式会社. 2020, 273, 13, 1243-1250.
- Gad D. Vatine, Riccardo Barrile, Michael J. Workman, Samuel Sances, Bianca K. Barriga, Matthew Rahnema, Sonalee Barthakur, Magdalena Kasendra, Carolina Lucchesi, Jordan Kerns, Norman Wen, Weston R. Spivia, Zhaohui Chen, Jennifer Van Eyk, and Clive N. Svendsen. Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Chips Enable Disease Modeling and Personalized Medicine Applications. *Cell Stem Cell*. 2019, 24, 995-1005.
- Song Ih Ahn, Yoshitaka J. Sei, Hyun-Ji Park, Jinhwan Kim, Yujung Ryu, Jeongmoon J. Choi, Hak-Joon Sung, Tobey J. MacDonald, Allan I. Levey, and YongTae Kim. Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms. *Nat. Commun*. 2020, 11, 175.
- Richard Novak, Miles Ingram, Susan Marquez, Debarun Das, Aaron Delahanty, Anna Herland, Ben Maoz, Sauveur Jeanty, Mahadevabharath R. Somayaji, Morgan Burt, Elizabeth Calamari, Angeliki Chalkiadaki, Alexander Cho, Youngjae Choe, David Chou, Michael Cronce, Stephanie Dauth, Toni Divic, Jose Fernandez-Alcon, Thomas Ferrante, John Ferrier, Edward FitzGerald, Rachel Fleming, Sasan Jalili Firoozinezhad, Thomas Grevesse, Josue Goss, Tiana Hamkins-Indik, Olivier Henry, Chris Hinojosa, Tessa Huffstater, Kyung-Jin Jang, Ville Kujala, Lian Leng, Robert Mannix, Yuka Milton, Janna Nawroth, Bret Nestor, Carlos Ng Pitti, Blakely O'Connor, Tae-Eun Park, Henry Sanchez, Josiah Sliz, Alexandra Sontheimer-Phelps, Ben Swenor, Guy Thompson, George J. Touloumes, Zachary Tranchemontagne, Norman Wen, Moran Yedid, Anthony Bahinski, Geraldine Hamilton, Daniel Levner, Oren Levy, Andrzej Przekwas, Rachele Prantil-Baun, Kevin Parker, and Donald Ingber. Robotic Fluidic Coupling and Interrogation of Multiple Vascularized Organ Chips. *Nat. Biomed. Eng*. 2020, 4, 407-420.
- Donald E. Ingber. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet*. 2022, 23, 467-491.
- Nick R. Glass, Minoru Takasako, Pei Xuan Er, Drew M. Titmarsh, Alejandro Hidalgo, Ernst J. Wolvetang, Melissa H. Little, and Justin J. Cooper-White. Multivariate patterning of human pluripotent cells under perfusion reveals critical roles of induced paracrine factors in kidney organoid development. *Sci. Adv*. 2020, 6, eaaw2746.
- Yoshikazu Kameda, Surachada Chuaychob, Miwa Tanaka, Yang Liu, Ryu Okada, Kazuya Fujimoto, Takuro Nakamura, and Ryuji Yokokawa. Three-dimensional tissue model in direct contact with an on-chip vascular bed enabled by removable membranes. *Lab Chip*. 2022, 22, 641-651.
- Yuji Nashimoto, Ryu Okada, Sanshiro Hanada, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Takashi Miurae, and Ryuji Yokokawa. Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials*. 2020, 229, 119547.