

THE CHEMICAL TIMES

2022 No.4 (通巻266号)
ISSN 0285-2446

特集 | 細胞アッセイ

02 ヒト皮膚三次元モデル作製の留意点と展望

近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授(PI) 森山 博由
近畿大学 薬学総合研究所 アンチエイジングセンター 客員准教授 森山 麻里子

09 コラーゲンビトリゲル®を用いた 新規肝細胞培養系における薬物動態研究

エーザイ株式会社 DHBL メディスン開発
バイオフィーマシューティカル・アセスメント機能ユニット
グローバル薬物動態研究部 マネージャー 渡 隆爾

15 ヒト肺モデル:肺特有の構造・機能をin vitroで再現する

HiLung株式会社 代表取締役 山本 佑樹

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

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 横川 隆司

26 新規in vitro細胞アッセイとしての Microphysiological Systems (生体模倣システム) - MPSの開発を色々な面から眺めてみる

崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学専攻 教授 石田 誠一



KANTO CHEMICAL CO., INC.

ヒト皮膚三次元モデル作製の留意点と展望

Key notes and prospects for the methodology of preparing on three-dimensional models of human skin

森山 博由
Hiroyuki MORIYAMA

近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授 (PI)
Pharmaceutical Research and Technology Institute,
Laboratory of Advanced Biomedical Products, KINDAI UNIVERSITY (Associate Professor (Principal Investigator))

森山 麻里子
Mariko MORIYAMA

近畿大学 薬学総合研究所 アンチエイジングセンター 客員准教授
Pharmaceutical Research and Technology Institute,
Anti-aging center, KINDAI UNIVERSITY (Visiting Associate Professor)

KEYWORD ▶

評価モデル

皮膚構成細胞

間葉系幹細胞

皮膚組織

ヒト三次元構成皮膚組織

はじめに

01

本稿では、ヒト皮膚の構造とヒト皮膚科学研究の現状を概説し、それらの知見からヒト皮膚三次元モデルを構築する際に重要な3要素を提案する。筆者がどのようにしてそれら3要素を選択しヒト皮膚評価モデルを構築したか、科学的知見の礎となった論文を踏まえ解説する。また現在研究中である新規ヒト皮膚三次元モデルの内容を紹介しつつ、ヒト皮膚科学の基礎・応用研究の展望について述べる。

ヒト皮膚の構造と科学研究の現状

02

皮膚は基底層から角質層へと常にターンオーバーを繰り返す表皮組織層と、それを支持している真皮層からなる最大の臓器である。さらに、皮膚に隣接した下部組織である脂肪組織および感覚器、機能的細胞種とも連携している。さらに、ヒト皮膚は多様な細胞・器官と連携することで、ヒト外表として物理的・生理学的機能を保っている。例えば、細菌やウイルスなどの侵入を防ぐランゲルハンス細胞などの免疫系の細胞、または有害な紫外線への防御能を有するメラノサイトなど、これら機能的細胞との連携は生体防御のフロントラインとして日々、皮膚の恒常性維持に貢献している(図1)。ゆえに、皮膚の生理学的な機能や体内側からの水分蒸散を防ぐなどといった物理学的な機能などの安定的な維持・いわゆる恒常性の理解は、生命医科学分野において重要な課題のひとつとなっている。実際、多くの病原体に対抗する皮膚感染防御能に関する創薬・臨床開発分野(生命医科学的実用化)や、健全な皮膚から心身のQOL(Quality of Life;生活および人生の質)を高めるためのサプリメントや化粧品開発分

野(ヘルスケア産業製品化)、ナノ粒子等の先端分析評価のための材料工学としての人工皮膚、次世代型アンドロイドなどの人工皮膚、生体センサーとしてのセンシング皮膚の開発(先端工学科学応用化)など、皮膚の恒常性を解明する科学的成果が多分に寄与している派生分野をあげれば枚挙に暇がない。さらに近年では、内閣府より提唱されている我が国が目指す未来社会像たるSociety 5.0という社会モデル(https://www8.cao.go.jp/cstp/society5_0/)が唱道されている。それはサイバー空間(仮想空間)とフィジカル空間(現実空間)を高度に融合させたシステムにより、経済発展と社会的課題の解決を両立する、人間中心の理想空間社会である。このSociety 5.0の未来社会では、時間や空間の隔たりを埋めるために、高精度かつ評価・診断に必須なバイオモデルも重要なキーツールとして位置づけられている。つまり、ここでも先鋭的な人工的ヒト皮膚およびそれをを用いた評価モデルの存在が重要視されている。しかしながら、このような背景・期待に積極的に貢献すべきヒト皮膚科学研究の実状といえば、細胞レベルや遺伝子組換えマウス動物モデルに依る研究が主体であり、ヒト皮膚組織を用いる多様な研究との連携もしくは移行へと転じたいものの、進捗に乏しい状態が続いている。背景には、動物実験倫理等に準じる側面からも動物を用いた生体実験が規制され続けていることも大きい。これは肝要な生命科学研究倫理であり無論に否定の余地はないが、皮膚科学研究の推進には実質的な足かせとなっている側面もみせる。だがなにより、適切な研究素材(使えるヒト人工皮膚)の開発状態が律速となっていること、これが問題の中心に位置し続けていることに目を背けてはいけない。この潮流は、とりわけ産学の研究開発環境の閉塞を醸し出す傾向まで生じている現状からも、決して看過できない。つまりは「機能的な研究開発基材としてのヒト皮膚三次元評価モデルの不在」こそが、上述の諸問題の解決を阻む大きな壁なのである。そこでこの障壁を打破する一助たるべく、ヒト皮膚三次元評価モデル作製の在り方や作製における留意点を整理し、

科学的な観点をベースとした述懐的考察と提言を進めたい。

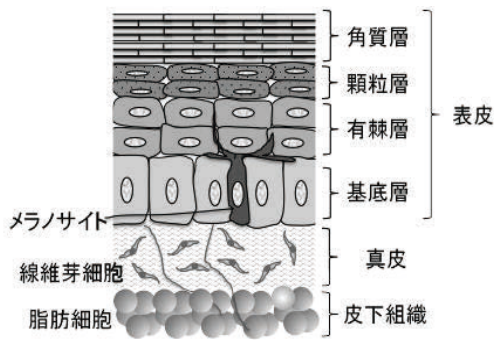


図1 簡素化したヒト皮膚の基本構造

評価系に適切な
ヒト皮膚評価モデルの構成要素

03

ヒト皮膚評価モデルを構築する際には、細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織(層)間の連絡という、少なくとも3点の要素が重要となる。これらの要素の選択を執り決める際には、必要十分にして最低限なことは何であるか、それらを意識しつつ、研究従事者や評価者が求める内容を正確に反映するような要素を峻別する必要がある。そのための一助として、ヒト皮膚組織を図1のように皮膚層・皮下組織層までの層組織連絡体としてのエッセンスを抽出し、必要最低限にシンプルな構造として捉えることが有用である。これには、ヒト皮膚評価モデルを構成する、表皮組

織層や真皮組織層の構成要素について、必要条件を満たす最低限の項目を精査・選別することが有効である。つまり、ヒト皮膚モデルを構築するうえで重要な3要素をどのように構成し、目的にあった評価系に資する研究素材としてヒト皮膚評価モデルに落とし込むかが鍵となる。

細胞の種類・ソースの選択

04

購入可能な初代細胞、および株化された細胞ソースとして、ヒト表皮細胞 [human primary epidermal keratinocytes (HPEK)]やヒト線維芽細胞 [human dermal fibroblasts (HNDF)],またはヒト間葉系幹細胞(一般的なヒト脂肪由来幹細胞) [adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells (hASCs)]などが存在する^{1, 2)}。これは使用する細胞の選択性を拡げるうえでもたいへん有用である。我々の研究室では、ヒト皮膚に近い条件を必要とするデータ取得および評価が必須なため、市販の初代細胞および、適切な倫理下において共同研究機関から供与いただいているヒト由来初代細胞の種々を目的に応じて選択または複合して用いている。実際、これらの細胞種の特性については、その科学的な理解を深める興味深い知見が得られている。

筆者らはヒト真皮から正確に分取したHNDFとヒト皮下組織から正確に分取したhASCsを用い、これら細胞のおもだった細胞表面マーカーを調べたところ、そのプロファイルに際立った差異は生じていないことが分かった(図2a)³⁾。また、両者の間葉系幹

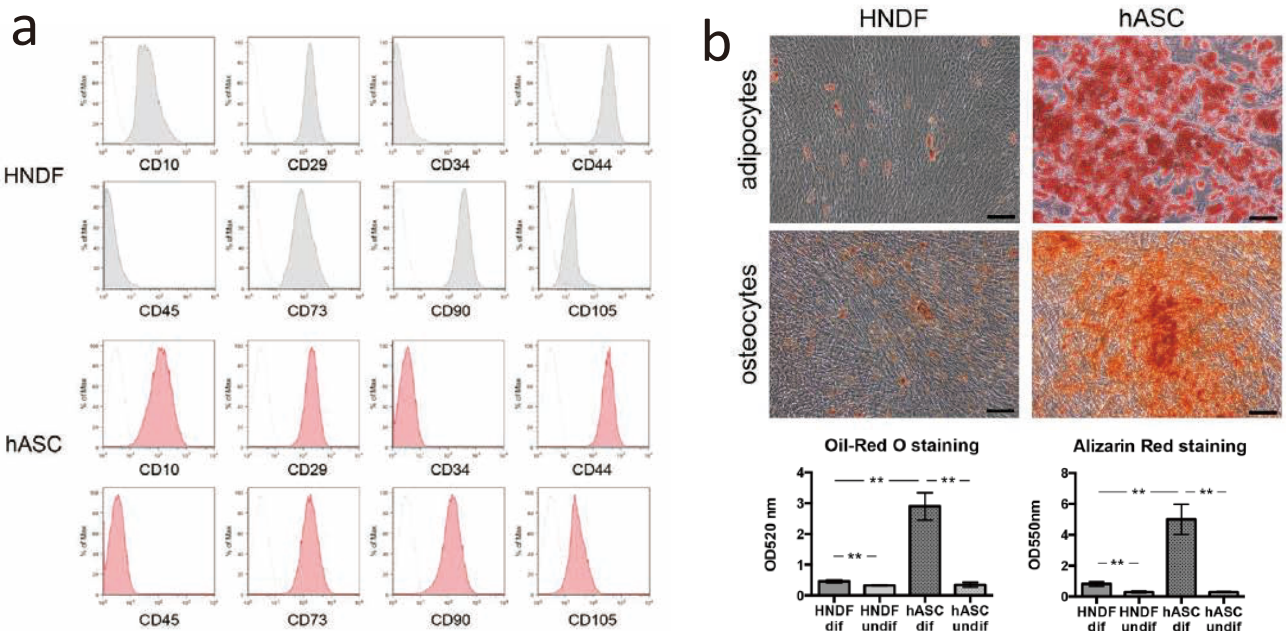


図2 ヒト線維芽細胞(HNDF)とヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)の性状細胞表面マーカーの比較 (a) フローサイトメトリー法による細胞表面マーカーの比較 (b) HNDFとhASCsの分化能特性の評価 adipocytes: 脂肪細胞, osteocytes:骨細胞。Oil-Red O染色:脂肪細胞の含有する油滴の染色(=分化した脂肪細胞)。Alizarin Red 染色:骨分化細胞に沈着したカルシウムの染色(=骨細胞)。写真は分化像を示している。グラフは全ての細胞から抽出した染色物の吸光度を示し(ただし、dif = 分化誘導処理あり、undif = 分化誘導処理なしの状態を表す)、複数回の独立した実験から得られた統計学的データであることを示す。** P<0.01。スケールバー:200 μm。

細胞への分化能については、分化能を携えた細胞集団の様相に著しい差異が生じるものの、両者には少なくとも分化能を示す集団の存在が確認された(図2b)³⁾。これらの結果は、従来のマーカー分類法のみによるHNDFとhASCsの分別は難しいことに加え、興味深いことに、一般的にHNDFは分化能を有さないと考えられているが、実際にはHNDFにも多分化能を示す細胞が一定数含まれていることを示す。つまり、真皮層のHNDFには、真皮層と密に隣接する脂肪組織にあるhASCsに極めて類似した性状をもつ集団が存在しうることを想起させる。これらの結果は、未同定の真皮線維幹細胞の存在や、未同定のヒト脂肪由来幹細胞の垂集団が線維芽細胞様細胞へ遷移する可能性なども示唆しており、皮膚組織(皮膚・皮下組織)の新規細胞や機能の発見につながることを期待される。これらの考察を背景に、筆者らは、現状までに理解できうる皮膚・皮下組織を構成する細胞の性状を精査し、ヒト皮膚三次元モデル作製の主要細胞ソースとしてHNDFおよびhASCsに注視し、それらの皮膚組織層における局在や性状が皮膚バリアのフロントラインである表皮層にどのような影響を及ぼすかについて検証した。

(層)間の連絡を考慮することは必須の要件である。これらの利用を熟考するうえで、HNDFまたはhASCsにおける上皮層への影響を探索する必要がある。そこで、HNDFまたはhASCsを評価対象細胞とした種々の共培養系を試行し、これら細胞の位置・配置が表皮の発達に及ぼす影響を評価する系を構築した(図3)。このとき、評価対象細胞の特性を評価する共培養系はおもに2つの系に分かれる。ひとつはオプションリング(関東化学株式会社製)をキーツールとした両面培養系(Double sided co-culture)であり、もうひとつは培養インサートをツールとした共培養系(Separate culture)である。前者のオプションリングを活用した両面培養系では、インサート外の底面に評価対象細胞を、インサート内の底面にヒト表皮細胞(HPEK)を播種し、膜を境に細胞(層)間を可能な限り密接させた共培養系である点がポイントである(図3a)。後者の共培養系では、培養プレート底面に評価対象細胞を、セルカルチャーインサート内にHPEKを播種した共培養系であり、それぞれの層間の距離を保った培養系である点がポイントである(図3b,c)。本評価系は、これらの空間的に解釈を分けられる基礎的な2つの評価系に加え、両面培養時におけるセルカルチャーインサート底面の基材(以下、セパレータ基材)として、コラーゲンのみで膜が形成された関東化学株式会社製のad-MED ビトリゲル[®]2(以下、コラーゲンビトリゲル[®]膜)⁴⁾と、ポリカーボネート(PC)膜の2種類のセパレータ基材を用いること、共培養時はポリエチレンテレフタレート(PET)膜を加えた3種類のセパレータ基材を用いることにより、細胞(層)の足場や接着性などの性状をも考慮できるパラメータを加えた多角的な培養

細胞の位置・配置と組織(層)間の連絡 05

ヒト皮膚三次元モデル作製においては、これを形作る細胞の位置や配置、またそれらを考慮して構成される組織と、他の組織

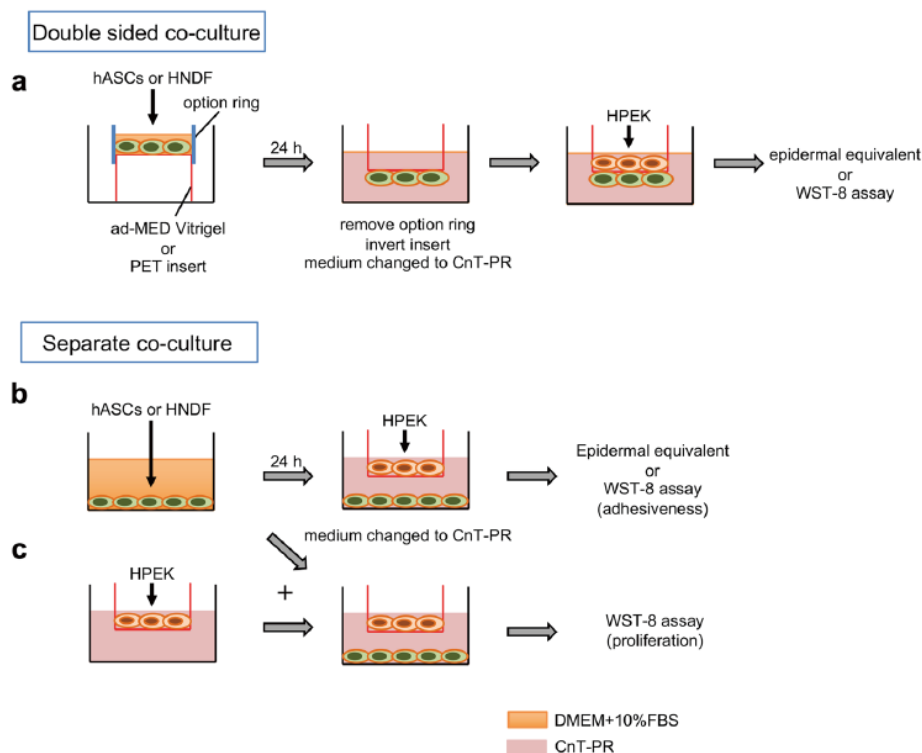


図3 共培養系の概略図 (a)両面培養系(Double sided co-culture)では、オプションリング(関東化学株式会社製)を使用してヒト線維芽細胞(HNDF)またはヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)をad-MED ビトリゲル[®]2(関東化学株式会社製)の裏面に播種し、ヒト表皮細胞(HPEK)をインサートの内側に播種した。(b、c)共培養系(Separate culture)では、hASCまたはHNDFのいずれかを12ウェル培養プレートに播種した。(b)接着性アッセイでは、hASC/HNDFを播種してから24時間後にHPEKを培養インサートに播種した。(c)ヒト人工表皮の再構成、増殖アッセイでは、HPEKを培養インサートに播種し、24時間インキュベートした。次に、インサートをhASC/HNDFが播種された12ウェル培養プレートに配置した。

実験系となっている。以上の特色を有した共培養系(両面培養と共培養)およびセパレータ基材の違い(コラーゲンビトリゲル®膜とPET膜、PC膜)を組み合わせた培養系において、HNDFおよびhASCsの有する皮膚組織層における局在や性状の評価を行った。このとき、それらの作用を評価する対象細胞としてHPEKを選択した。当然ながら、表皮構成細胞であるHPEKは、皮膚の中で最もターンオーバーに富み、分化成熟を繰り返す皮膚の最外表組織体として恒常性のゲートキーパーを担っているため、ヒト皮膚生体内で起こる様々な要因の影響を最もセンシティブに感受する細胞集団である。そのため、本実験系の評価対象細胞としてHPEKは最も至適かつ、その影響の度合いを測るセンシング細胞として適切な素材なのである。実験系では、コンディションを整えて正確に維持したHPEKを、セパレータ基材上に正確な密度を計算して播種し、そこに評価対象細胞とともに培養する環境に暴露させ、各条件が均等となるよう精緻な培養実験を行った(図3)。その後、それぞれの実験系に暴露され得られた評価対象細胞であるHPEK(層)は、さらに気相-液相培養法にてヒト人工表皮の再構成物(以下、再構成表皮)に分化成熟させ、それを詳細に解析することも加え、HNDFおよびhASCsの有する皮膚組織層に与える影響について、生体皮膚組織の構築作用に近似した系にて総合的に評価した。

その結果、コントロール群となる、HPEKのみを各種セルカルチャーインサートへ播種しそこから作製された再構成表皮について、HE(Hematoxylin Eosin)染色にて表皮組織の構成を比較解析したところ、各種のセパレータ基材(コラーゲンビトリゲル®膜、PET膜およびPC膜)の違いに顕著な差はなく、全て健全な再構成表皮の組織層の構造が観察された(図4:ControlのHE染色パネル群)。ただし、コラーゲンビトリゲル®膜を用いた再構成表皮については、他のものと比べ、やや整然とした表皮組織層(図1)の構造が観察される傾向にあった(図4)。この点は、ヒト皮膚三次元モデル作製における生体の摸倣膜の選択性の観点に興味深い考察を与える。さらに、両面培養系(図4:Double-Sided実験データの各カラム)または共培養系(図4:Separate実験データの各カラム)で示した、HNDFまたはhASCsとの共培養実験において、コラーゲンビトリゲル®膜上で培養されたHPEKからなる再構成表皮にのみ、controlに比べ、より厚く豊潤に、さらに表皮組織も整然と形成されていることが観察された(図4:各HE染色像のカラム)。そのうえ、コラーゲンビトリゲル®膜を用いて両面培養を行った再構成表皮の基底層において、増殖マーカーであるp63の免疫蛍光染色を実施したところ、コントロールと比較してp63陽性細胞の数はHNDFまたはhASCsのいずれにおいても増加していた(図4: Double-Sided実験データのp63

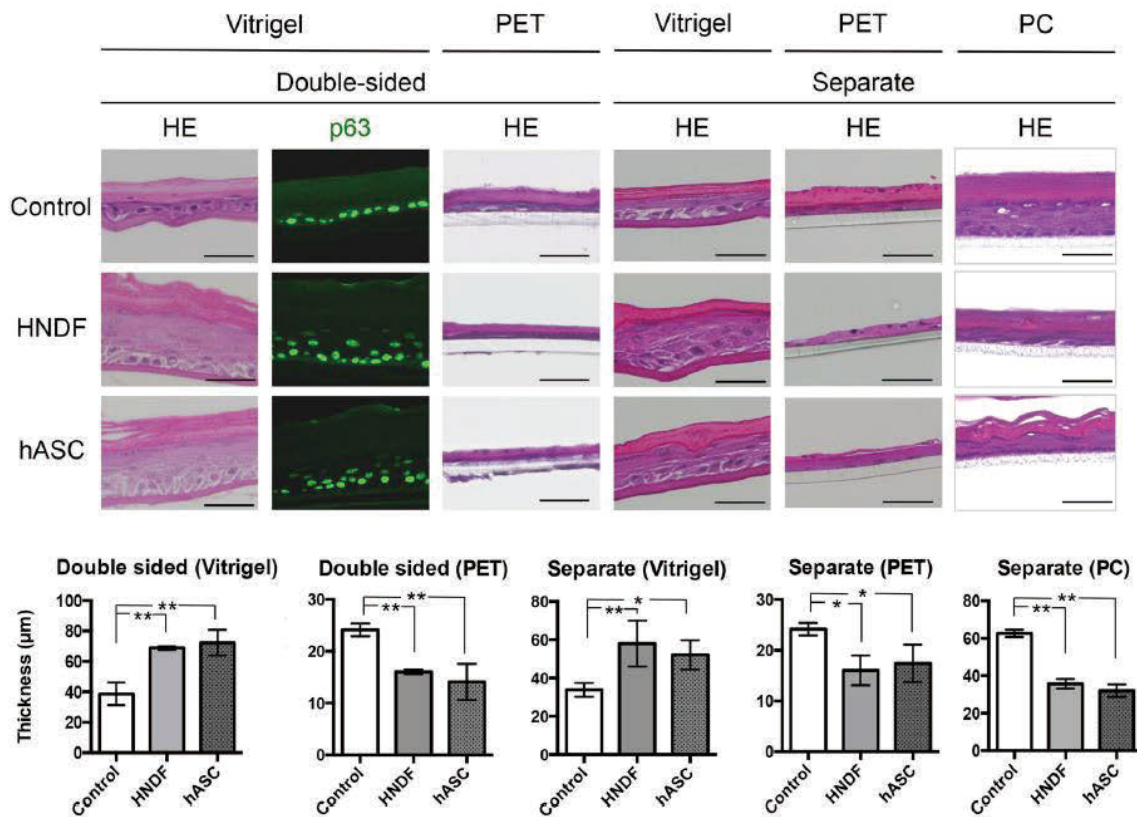


図4:コラーゲンビトリゲル®(関東化学株式会社製ad-MED Vitrigel® 2:Vitrigel®)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、およびポリカーボネート (PC)インサートを用いた共培養系で再構成されたヒト人工表皮の比較 インサート表面にヒト表皮細胞 (HPEK)を配置し、ヒト線維芽細胞 (HNDF)またはヒト脂肪由来幹細胞 (hASCs)をインサート裏面に配置した両面培養 (Double-sided)、もしくは培養プレート底面での共培養 (Separate)にて14日間培養した。HPEKのみ(共培養なし)から再構成されたヒト人工表皮を対照とした。これらヒト人工表皮について、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE)染色による組織評価、ならびにp63 (緑色)に対する免疫染色による組織評価を行った。グラフは、複数回の独立した実験から得られた統計学的データ、および皮膚の表皮全体の厚さの平均±SD値をマイクロメートル単位で表す。** P < 0.01、*P < 0.05。スケールバー:50 μm。

免疫染色カラム)。これらのデータは、HNDFもしくはhASCsを播種したコラーゲンビトリゲル®膜との両面培養組織と融合したHPEK、ならびにコラーゲンビトリゲル®膜に隣接したHPEKは、生体の作用に近似した正の影響が与えられ得る可能性があることを示している。つまりは、コラーゲンビトリゲル®膜とHPEKの隣接の条件は、コラーゲンビトリゲル®膜内の貫通孔の構造をも加味すると、近接する皮膚組織構成細胞(HNDFもしくはhASCs)・その細胞群を包含する組織間の作用に重要な働きを担うこと、ならびに、これらの細胞のいずれからでも放出されている因子の作用を受け入れるにも有用であることを示している。これに対し、PET膜またはPC膜インサートを用いた共培養ではHPEKに際だった影響が観察されなかったため、共培養や両面培養の影響が十分には活かされていないことが示唆される結果となった。

これらの知見は、ヒト皮膚評価モデルを構築するうえで、ヒト皮膚組織を構成する細胞の性状およびその配置や状態、ならびに組織(層)間連絡の理解を深めたいへん重要な知見である。今回、共培養系を構築する際に用いたセルカルチャーインサートは、細胞の接着性や浸潤性などを測る器材として活用出来ることは広く知られている。その一方で各種のセルカルチャーインサートを用いた共培養・両面培養システムは、種々の細胞を評価するのみならず細胞間での情報連絡を評価する系としても有効に活用できるものと考えられる。とりわけ今回取り扱ったコラーゲンビトリゲル®膜は、細胞が分泌する液性因子や細胞が産生するExtracellular matrix(ECM)に類する素材として考えられるため、これに隣接する細胞もしくは組織間の性質や性状を、おそらくより生体にミミック(生体に近い状態に組織科学的に近似均整化)するための至適な器材のひとつとして有効と考えられる。

しているため、さらなる改善と改良が求められる。その指針のひとつに、ヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)の活用がある。先述のとおり、一部のhASCs亜集団の性状はHNDFと類似しつつ、HNDF中にも終末分化が可能な間葉系幹細胞が混入していることから、HNDFの中にもhASCsが存在しているものと考えられる(図2)。実際、真皮にもhASCsが局在しているとの報告もある^{6,7)}。これらの事実は、真皮層ならびに皮下組織の相互作用を取り込むうえで、有効な論拠のひとつと考えられる。さらに、hASCsはさまざまな増殖因子を分泌しており、皮膚のハリや弾力に必須であるコラーゲンを、自発的に産生する能力も有する⁸⁾。事実、図3、4の実験結果からも、hASCsにはHNDFに劣らない、再構成表皮豊潤化の作用が備わっていることが伺える。実際、この性質を応用しTrottierらは、より分化誘導を行った脂肪細胞を真皮代替品として使用し、ヒト皮膚三次元組織の作製にも成功している⁹⁾。さらに筆者らがこれまでに開発した、低酸素培養法により生体内環境に近似した状況において作製したhASCsを用いることで¹⁰⁾、より実質的な真皮層および皮下組織の構築も可能となる。この方法は現在もアップデートを重ねており、現状ではよりコラーゲン産生能を亢進するhASCsの亜集団も分取・維持もしくは作製が可能である。このようなhASCsの亜集団、HNDF、およびそれぞれの細胞から産生されるコラーゲンをヒト皮膚三次元モデルの原料とした「細胞の組織内での自己再構成を誘発する疑似真皮層の作製」は、より実質的なヒト皮膚モデルの作成のためにたいへん有用な概念のひとつと考えられる。さらに、密性結合組織である真皮の環境のうち、コラーゲンやエラスチンおよび基質等の結合性や配座も、できる限り生体に近い状態で付設することが望ましい。この観点については、後述するプリンティング技法などを用いた物理的な配座方法の検討や、組織包埋前の化学的架橋処理による部分的なECM体を形成することが有効と思われる。

人工真皮層の作製事例

06

現在までのヒト皮膚評価モデルを俯瞰すると、生体内の真皮層を大雑把に模倣したヒト皮膚三次元評価モデルは未成熟な状態であり、実用的なレベルでの表皮-真皮層の相互作用の探索や評価系構築のためにもより成熟したモデルの登場が待たれる状況にある。先例では、これまでにコラーゲンゲルで包埋したヒト線維芽細胞(HNDF)を疑似真皮層とし、その表面で気相-液相培養したヒト表皮細胞(HPEK)を疑似表皮層として構築した形態のヒト皮膚三次元組織が報告され、利用も始まっている⁵⁾。確かに、本法はシンプルな構造体としての疑似人工真皮層を有し、これまでより人工皮膚組織を長く維持できるなど画期的なものである。本稿でも述べてきたように、ヒト皮膚組織の構成要素をシンプルに分解・再構成して理解し、疑似真皮層を整然と作製することが評価系の組織構築ではとても重要な要因となる。その意味合いにおいて、この疑似真皮層の作製は一定のブレイクスルーを得たものと捉えられる。しかしながら、コラーゲンゲルで構成された環境内にHNDFをどのように配置すべきか、疑似真皮層内のHNDFの自由度や疑似真皮層下部からの影響などの要因を欠

ヒト初代皮膚構成細胞の特性を最大限に利用したヒト皮膚三次元モデル開発の試み

07

筆者らもこれまでにヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)を真皮代替品、hASCsより分化誘導した脂肪細胞を皮下組織代替品としたヒト皮膚三次元モデルのプロトタイプを作製している。このヒト皮膚三次元モデルに向かうまでの過程で、再構築した表皮層の厚みの制御や豊潤化などが誘導できるようになるなど、成果やノウハウも蓄積されてきている。基本的にhASCsは、多数の終末分化細胞(種)への分化能を有することに加え、様々な成長因子やサイトカイン、細胞外小胞(EVs: Extracellular Vesicles)をも分泌していることから、ヒト皮膚三次元モデルにおいて血管や免疫細胞などの導入を誘引するなど、広義のtrophic効果(組織修復、健全化、保護作用)も期待できる。我々の研究室でも検証を重ねているところではあるが、hASCsのパラクライン効果によってヒト皮膚三次元モデルプロトタイプを構成する細胞(層)への血管誘導作用も一部観察されている。しかしながらこれまでのプ

ロタイプは、本稿で述べてきた「細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織(層)間の連絡」を再現性良く満たす状態には届いておらず、技術的にいくつかのハードルが存在していた。とりわけ「細胞の位置・配置の制御」は際だった問題であった。この問題を解決するため、近年に活用の幅が広がっている3Dバイオプリンティング技術の活用を検討した。

開発段階であるため、作製工程の詳細説明は割愛させていただくが、筆者らがヒト皮膚三次元モデル開発の技術革新を図っているシステムの概略を示す(図5)。本稿で示してきたヒト初代皮膚細胞や、ヒト皮下組織に含まれるいわゆるhASCs、および、さらにhASCsより高解像度の幹細胞亜集団(ヒト脂肪由来間葉系間質細胞の純種により近似した細胞集団)、ならびにそれらの産生する生体因子を主たる素材(種類や量もバイオプリンティング用インク的配合成分としてもたいへん有用)を選択している。

さらに、前項で示したコラーゲンビトリゲル[®]膜ならびにオプションリング(いずれも関東化学株式会社製)を技術として活用した両面培養システム、ならびに生体由来ECMを適切に配合したバイオインク(含:模擬的な間充組織液としての用途)等の新規素材の開発、かつこれらを統合してアッセンブルできる3Dバイオプリンティング技術を統合して、「細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織(層)間の連絡」の概念を反映したヒト皮膚三次元モデルの作製・醸成段階に入っている。ここから作出されるヒト皮膚三次元モデルは、一部の細胞(群)は分化誘導を行う必要があるが、ほとんどは細胞の分化の有する分化方向性や能動的移動・

配座といった自己再構成を促せるように計算・配置された数理的なCADデザインモデルから創出された画期的なシステムとなっている(未発表データ、特許出願準備中)。この新タイプのヒト皮膚三次元モデルは、表皮層、真皮層、皮下組織を携えたモデルであることから、これまでのモデルよりヒト生体の皮膚に近似した組織体である点が長所である。また、このヒト皮膚三次元モデルのキーとなる構成細胞に予め時間空間的な自由度を与えることで、本来の細胞性状を拘束しない、いわゆるエンドジューナスな細胞の挙動を観察・評価することが可能な面でも非常に興味深い、全く稀有な新世代のヒト皮膚三次元モデルといえよう。一方で、精度の高い再現性等、いくつかの課題も抱えている。現在、それを解決する科学的なアイデアを試行錯誤し、徐々に開発の懸念や構築時間軸等の律速も解消され始めてきている。この概念を有した三次元モデルは二次元モデルでは図りし得ない有用性をもつことが期待できる。

例えば、皮膚のバリア機能や水分保持量などについて評価研究を行うためには、ケラチノサイトなどを用いた二次元培養系では、生体に近似したデータは得られにくい。二次元培養系から得たデータの有用性を確認するためにも、より生体に近似したヒト皮膚三次元モデルは非常に有用である。さらに、美白機能成分の評価系として、このヒト皮膚三次元モデルに機能性細胞体の一種であるメラノサイトを表皮層へ組み込むことにより、実際の皮膚のようにメラニン色素を持ったヒト皮膚三次元モデルを作製できる可能性がある。実際、我々の研究室において、hASCsを神経堤細胞へ分化させたのちメラノサイトへと比較的短時間にて分化

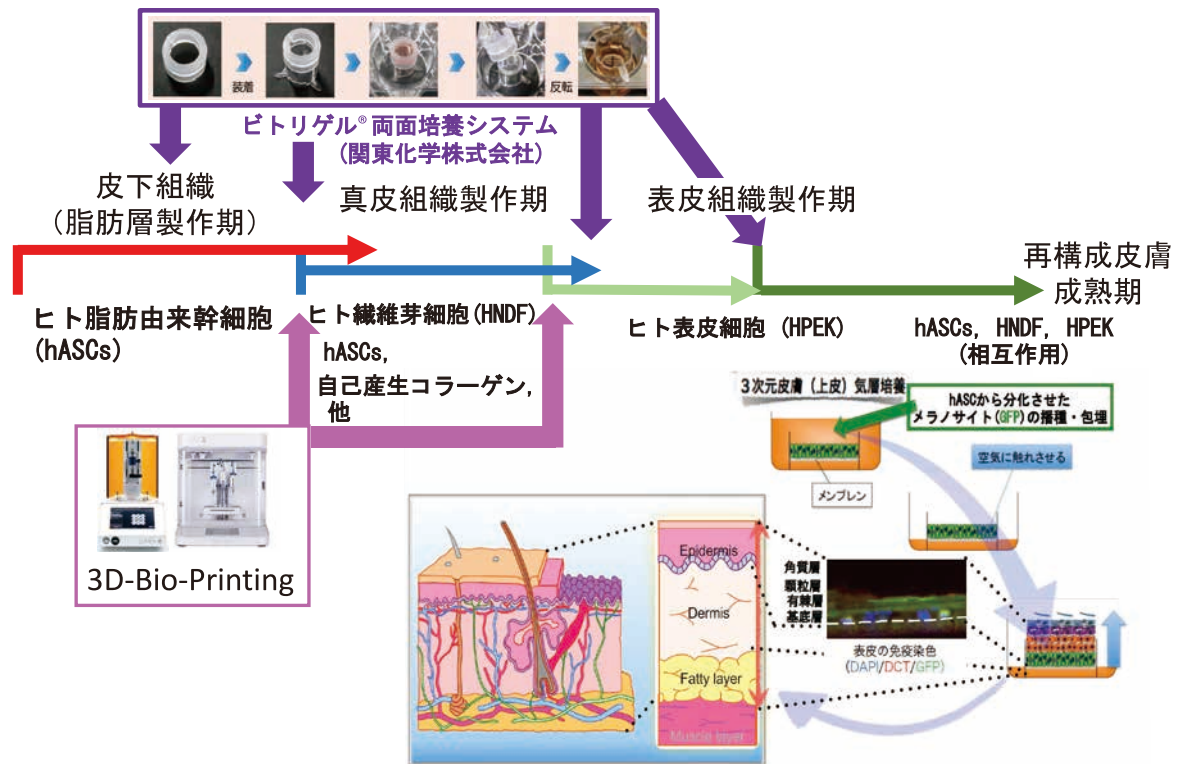


図5 ヒト初代皮膚構成細胞種を用いたヒト皮膚三次元モデルの開発スキーム

誘導を完了できる新しいメラノサイト作製プロトコルの開発にも成功している(特許出願準備中)。この方法によりヒト皮膚の組織学的種類および個人単位でのメラノサイトの作製も可能となる。このように、特異的なヒト皮膚三次元モデルを正確に活用することにより、動物実験の3Rs(Reduction:削減、Refinement:苦痛軽減、Replacement:代替法利用)遵守の全てに通底するReplacementに与する、まさに実験動物に頼らない、ヒト皮膚科学における新領域vivo研究の推進が為し得られるものと感じる。その先、または併行して可能な実用化研究の面からも、このヒト皮膚三次元モデルは、精度の高い解析に適する、より効果的な薬剤の創製やドラッグリポジショニング・スクリーニングは勿論のこと、機能性化粧品の開発や安全性・安定性評価にも革新を与えるものと思われる。

おわりに

08

本項の冒頭において機能的な皮膚評価のみならず、皮膚科学および皮膚科学関連分野の進展を阻害している、「機能的な研究開発基材としてのヒト皮膚三次元モデルの不在」という問題が生じていることを記した。この問題を根本的に解決すべく、筆者らがどのようにして、ヒト皮膚モデルを構築しているかを示した。ヒト皮膚評価モデルを構築する上で、皮膚構成細胞の種類やソースの理解と選択、選択した皮膚構成細胞の組織内における局在・位置・配置、細胞間または組織(層)間の連絡という3要素を、どのように理解し目的にあった評価系に資する「ヒト皮膚三次元評価モデルの作製につなげるか」について論じてきた。そのためには、シンプルな評価系から理解し、そこから得た知見を高次元のモデルへと連結させていくことの重要性を示した。さらに従来の方法に捉われず、その時々において利用可能な既存技術や製品を、積極的に評価モデルへと取り込んでいくことの有効性も実証した。そのうえヒト皮膚評価モデルの機能性をあげるために、機能性細胞等をヒト皮膚三次元モデルへ組み込むといった、評価目的にかなったヒト皮膚三次元評価モデルへアップデートする有用性も提案した。このような試みはすべて、皮膚科学・幹細胞生物学の基礎的な積み重ねから論理的に思考試作されるものであり、その結果のフィードバックこそが「ヒト皮膚三次元評価モデル作製の展望」となる。例えば、筆者らが探求をつづける「真のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の同定とそのオントロジー(存在論)」や「皮膚に存在する幹細胞の同定」など、未到の研究領域にアクセスする真摯な基礎研究から徐々に紡ぎ出される事実は、常にヒト皮膚三次元評価モデル作製に応用されている。この未同定な細胞を明らかにし、皮膚・皮下組織の構築にフィードバックすることは実に象徴的な例証に思える。日進月歩で進捗する皮膚科学や幹細胞に係る研究成果は枚挙に暇がない。これらをより統合的に理解すると同時に、それら独自の観点や切り口から「新次元のヒト皮膚評価モデルの創製」を期待する。しかしながらその時間を切り取った時点で、目的に対し有効に機能するので

あれば、本稿で示した内容物が一助となることを期待する。今後とも歩み続ければ近い将来、実用化のステージへとあがり序論で述べたような多分野において、裾野広く有効活用されることを期待している。

参考文献

1. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Haruki Isshi, Shin Ishihara, Hanayuki Okura, Akihiro Ichinose, Toshiyuki Ozawa, Akifumi Matsuyama, and Takao Hayakawa. Role of Notch Signaling in the Maintenance of Human Mesenchymal Stem Cells Under Hypoxic Conditions. *Stem Cells Dev.* 2014, 23, 18, 2211-2224.
2. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Taro Iguchi, Satoshi Tamada, Tatsuya Nakatani, Koichi Nakagawa, and Takao Hayakawa. Notch Signaling Enhances Stemness by Regulating Metabolic Pathways Through Modifying p53, NF- κ B, and HIF-1 α . *Stem Cells Dev.* 2018, 27, 13, 935-947.
3. Mariko Moriyama, Shunya Sahara, Kaori Zaiki, Ayumi Ueno, Koichi Nakaoji, Kazuhiko Hamada, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Takao Hayakawa, and Hiroyuki Moriyama. Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis. *Sci Rep.* 2019, 9, 18371.
4. Toshiaki Takezawa, Katsuyuki Ozaki, Aya Nitani, Chiyuki Takabayashi, and Tadashi Shimo-Oka. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional. Culture for Reconstructing Organoids. *Cell Transplant.* 2004, 13, 463-473.
5. Satoshi Kano, Hiroaki Todo, Kenichi Sugie, Hidenori Fujimoto, Keiichi Nakada, Yoshihiro Tokudome, Fumie Hashimoto, Kenji Sugibayashi. Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin Models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds. *AATEX.* 2010, 15, 2, 61-70.
6. Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Taeko Shigemoto, Dai Matsuse, Hideo Akashi, Yukihiko Tanimura, Kenichiro Tsuchiyama, Tomohiko Kikuchi, Makoto Goda, Tatsutoshi Nakahata, Yoshinori Fujiyoshi, and Mari Dezawa. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 24, 9875-9880.
7. Haruyo Yamanishi, Shigeyoshi Fujiwara, and Tsutomu Soma. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp. Dermatol.* 2011, 21, 70-80.
8. Mélanie Vermette, Valérie Trottier, Vincent Ménard, Lucie Saint-Pierre, Alphonse Roy and Julie Fradette. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials.* 2007, 28, 18, 2850-2860.
9. Valérie Trottier, Guillaume Marceau-Fortier, Lucie Germain, Caroline Vincent and Julie Fradette. IFATS Collection: Using Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells for the Production of New Skin Substitutes. *Stem Cells.* 2008, 26, 10, 2713-2723.
10. 森山 博由, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 松山 晃文, 脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法. 特許 第 6209377 号, 優先日 20120711.

コラーゲンビトリゲル®を用いた 新規肝細胞培養系における薬物動態研究

Drug metabolism and pharmacokinetics research
in novel hepatocyte culture system using collagen vitrigel® membrane

渡 隆爾
Ryuji WATARI

エーザイ株式会社 DHBL メディシン開発バイオフィーマシューティカル・
アセスメント機能ユニット グローバル薬物動態研究部 マネージャー
Global Drug Metabolism and Pharmacokinetics Biopharmaceutical Assessments (BA) Core Function Unit (CFU),
Medicine Development, DHBL, Eisai Co., Ltd. (Manager)

KEYWORD ▶

コラーゲンビトリゲル®

細胞培養法

薬物動態

はじめに

01

本稿では、創薬研究における薬物動態の役割を示し、動態研究における肝細胞培養技術と評価法の変遷を辿る。これらを踏まえて、関東化学株式会社より販売されているad-MED ビトリゲル®を用いた新規肝細胞培養法の構築、及び肝代謝に関わる代謝酵素であるシトクロムP450 (CYP)の活性評価について述べる。さらに、CYPの典型基質を用いたヒト肝クリアランス(CL)の予測を実施し、実際のヒト臨床値との比較にも言及する。

医薬品開発における薬物動態の役割

02

医薬品開発は、低分子化合物の場合、成功確率が約4%であり、一つの医薬品を開発する期間として約13年、研究開発費用として約2,000億円がかかるといわれている¹⁾。従って、医薬品開発の成功確率を向上させ、開発期間の短縮並びに開発費を低減することは、製薬企業として極めて重要な課題である。また、医薬品の開発中止や市場撤退も、製薬会社として回避すべき事象であり、薬を望む患者様の期待に応えるためにもできる限りの対策を講じることが必要である。

過去の医薬品開発の歴史を振り返ると、1990年代は薬物動態(DMPK: Drug Metabolism and Pharmacokinetics)が原因で開発中止となる医薬品候補化合物が、全体の約40%を占めていた²⁾が、2000年代以降は約10%以下に減少した³⁾。これは、肝細胞や肝ミクロソームなどのヒト生体試料が使用できるようになり、薬物動態研究の進展とともにヒトにおける動態予測を主としたトランスレーショナル/リバーstransレーショナル研究の推進が寄与したと考えられる。一方で、安全性および薬理効果については依然として開発中止の原因として多くを占めており、その比率は過去と比較しても大きく変動していない^{2, 3)}。つまり、現在の医薬品開発で特に大きな障害となっているのは、薬理活性

の不足や予期せぬ毒性発現である。しかし、従来の評価方法ではヒトにおける薬理効果や毒性発現に対する予測精度は低い。従って、非臨床段階(探索研究)でヒトにおける薬理効果や安全性を正確に予測できる新たな評価法を構築し、可能な限りリスクの少ない開発候補品を選出できれば、成功確率の向上とともに、臨床研究の効率的な進行に貢献できる。

医薬品開発において、薬物動態研究は、探索研究から、臨床研究、承認申請まで幅広いステージに関わっている。同時に、薬理効果や安全性研究をサポートする大切な役割も担っている。薬理効果や毒性の発現は、投与された薬物の全身暴露や薬効・毒性発現組織への移行が大きく関わっている。そのため、薬物動態研究において重要なことは、探索研究の段階において、最終候補医薬品のヒトでの安全性領域を保ち、かつ、有効薬効用量を正確に予測・提案することにある。さらに、最終開発候補品を決定する段階では、ヒトPK予測に加え、薬理効果や安全性を予測するPK/PD (Pharmacokinetics/Pharmacodynamics)及びTK/TD (Toxicokinetics/Toxicodynamics)の実施が重要である。PK/PD及びTK/TDは、ヒト投与量を基に規定される。ゆえに、薬理効果や毒性の発現の予測には、ヒトPK予測の精度が肝となる。このヒトPK予測の精度を向上させるための取り組みの一つが、薬物代謝の中心臓器である肝臓を扱う肝代謝研究である。

筆者らは、肝代謝研究に必要な肝細胞培養法の検討を行い、薬物動態評価に適した培養法の研究を推進した。

肝細胞培養技術の変遷

03

薬物動態研究では、医薬品候補化合物の生体内における肝CLの予測や、代謝酵素誘導性及び細胞毒性を評価するin vitro評価モデルとして肝細胞が利用されている。しかしながら、従来の単純なin vitro評価法においては、薬物代謝酵素として最も重要なCYP活性が培養中に低下してしまう上、細胞は播種後数日しか培養できない。そのため単純な培養法では、生体における肝臓の

生理学的機能を再現することは困難であった。医薬品候補化合物のヒト肝CLや肝毒性をより正確に予測するには、生体内の肝臓に匹敵する肝機能を維持した新しい肝細胞培養法を構築する必要がある。そこで筆者らは、従来法よりも優れた培養法の開発を目指した。

細胞培養法の開発を考える上で重要な項目は3つある。それは、①培養基材(培養システム)、②細胞、そして③培地である。本項においては、特に、培養基材に焦点を当て、肝細胞培養法の変遷を辿る。

3.1 従来の培養基材(システム)

従来の培養法では、市販のコラーゲンコーティング済みプレート(培養基材)を用いるのが一般的であるが、そうした簡便な方法では代謝活性が数日間までしか維持ができない⁴⁾。そのため、代謝活性を長期に渡り維持する培養基材(システム)の開発が進められている。以下に、肝代謝評価で開発されてきた手法に関して簡単に述べる。

3.2 Relay法

肝細胞を用いた代謝活性評価法では、凍結肝細胞を使用するのが一般的であり、凍結融解直後の浮遊細胞(Suspension)を用いて、各化合物のCLを算出する。しかし、足場のない、細胞間接着の少ない浮遊状態では、4時間程度しか代謝活性が維持されないことが知られている⁴⁾。そのため、肝細胞を4時間毎に交換して化合物のCLを算出するRelay法がPfizer社により開発された⁵⁾。本手法により、代謝活性を長時間維持しないと評価できない代謝安定性の高い低CL型化合物の評価が可能となった。一方で、高価な凍結肝細胞あるいは新鮮肝細胞を大量に投入し、4時間毎に細胞を交換しなければならないため、人的及び物的コストが大きいという欠点がある。

3.3 共培養システム

3.1から3.2項で見てきた培養法は、肝臓組織における実質細胞としての肝細胞に焦点を当てている。本来、肝臓組織は、実質細胞である肝細胞と非実質細胞である星細胞・クッパー細胞・血管内皮系細胞によって構成された臓器である。生体肝臓組織を模倣するには、実質細胞だけではなく、非実質細胞の存在も忘れてはならない要素である。近年、実質細胞以外の細胞とともに培養を行う共培養法が多く研究されており、線維芽細胞との共培養法として、Hepato-pac法^{6,7)}やHμREL法⁸⁾が開発され、長期培養及び肝機能向上が認められるとともに、肝CL評価法として注目されている。Hepato-pac法に関しては、培養プレートにマイクロパターンング手法を施すことで、細胞接着の場を制御するという培養基材側の工夫もなされている⁶⁾。

ただし、これら共培養法は肝細胞以外の細胞による影響を加味する必要があり、得られた結果に対する非実質細胞や線維芽細胞の寄与に注意を要する。また、Hepato-pac法のようなマイクロパターンング手法を取り入れた培養基材は、現在日本での入手が困難である。更に、共培養法は評価コストが高く、操作が複

雑であることから、Relay法と同様に探索研究段階で多くの医薬品候補化合物を評価するスクリーニング手法としては不向きであるといえる。使用場面としては、数種類の医薬品候補化合物の中から1品に絞る後期の段階において、活用することが想定される。

3.4 スフェロイド培養

コラーゲンコーティングしたプレートに単純に細胞を播種する2次元平面培養では、複雑な立体構造を有する生体組織を模倣することはできない。そのため、細胞同士を集合させることによって、3次元細胞塊を形成するスフェロイド培養が提案された⁹⁾。スフェロイド培養では、細胞同士が自発的に凝集することで、細胞間相互作用が高まり、細胞機能の向上が期待されるとともに、立体的な組織を構築することで生体環境に近づけることができると考えられた。ただし、細胞凝集塊は自律的なものではなく、単純な集合体であるため、細胞塊の大きさが一定以上を超えると、細胞塊内部の細胞まで、酸素や栄養素の供給ができず、壊死してしまうという問題がある。こうした課題を解決するため、Cell-able[®](東洋合成工業株式会社)のような、細胞塊の大きさを一定以内に制御するプレートを開発して、細胞塊の品質を安定させることで代謝活性を維持する手法もある¹⁰⁾。また、代謝活性評価に限らず、スフェロイド培養を毒性評価に適用した事例も報告されている¹¹⁾。なお、スフェロイド培養には、線維芽細胞のような足場を作るフィーダー細胞の存在を必要とする。フィーダー細胞は、細胞の接着に必要な、細胞外マトリックスの供給など、細胞機能に必要な足場を提供する。一方で、フィーダー細胞による代謝活性や毒性評価への影響を考慮する必要があり、フィーダー細胞を必要としないスフェロイド培養法も提案されてきた¹²⁾。

このように、2次元培養法や3次元培養法の取り組みも活発化しているが、薬物動態研究の観点として、3次元培養法の代謝活性のレベルはsuspensionを使った従来法と比べて低く、ヒト肝CL予測評価モデルとしては課題も多い。

3.4 オルガノイド

スフェロイドのような、自発的な細胞凝集を用いた3次元培養法をさらに発展させた形として、より自律的に、複数の細胞種を伴って小器官(ミニ臓器)を形成する手法をとっているのが、オルガノイドである。オルガノイド形成の際に使用する細胞種に関しては、Embryonic Stem cell (ES細胞:胚性幹細胞)、induced Pluripotent Stem cell (iPS細胞:人工多能性幹細胞)のように幹細胞を主な細胞源としているものが多い。肝臓に関しては、iPS細胞から分化させた肝細胞と、endothelial cell(内皮細胞)としてヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVEC)、mesenchymal cells(間葉系幹細胞)の3種類を組み合わせた肝オルガノイドが報告されている¹³⁾。幹細胞による自律的な組織構築が可能となり、創薬利用にも期待されている¹⁴⁾。一方で、肝オルガノイドは薬理評価や毒性評価に利用することが多く、薬物動態評価に適応している例は少ないのが現状である。

3.5 Microphysiological system (MPS)

従来のin vitroモデルは単一細胞かつ静置培養を基本とする閉鎖系であり、生体における血流要素や多種多様な細胞・組織・臓器が存在する生体の複雑な環境を模倣していない。生体の模倣を狙う上では、各臓器を個別に考えるだけでは不十分であり、臓器同士の連結による応答、さらには全身への連関を考慮する必要があり、そうした中で、Microphysiological system (MPS:生体模倣システム)と呼ばれる新しい培養システムが考案され、生体に近い環境を再現しようとする試みがなされている。中でも肝臓MPSに関しては、肝機能の再現を目指すおおよその指標も提示されている¹⁵⁾。しかし、MPSは主に安全性・薬理効果での研究が主流であり、オルガノイド研究と同様に薬物動態評価としての研究報告は少ない。

このように、様々な培養システム(培養基材)が提案、研究されてきているが、薬物動態評価での活用には多くの課題が存在し、探索研究において真に創薬活用できる簡便な培養システム(培養基材)の開発が必要である。

コラーゲンビトリゲル[®]による 新規培養法の開発

04

前項では主に、培養基材に焦点を当てて、培養法の変遷を辿ったが、培養基材以外の細胞・培地も重要な要素である。これら3つの要素を適切に選択し、条件を設定していくことがより良い培養法構築の要である。我々は、培養基材:コラーゲンビトリゲル[®]、細胞:PXB-cells[®]、培地:dHCGM¹⁶⁾を基礎とする新規肝細胞培養法の開発を行った。以下に、決定した3つの要素に関して、紹介を行う。

4.1 培養基材:コラーゲンビトリゲル[®]

コラーゲンビトリゲル[®]は、竹澤 俊明グループ長(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門)が開発された新規培養基材である¹⁷⁾。コラーゲンビトリゲル[®]を選んだ理由として、本培養基材は、生体内の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維網で構成されており、生体内を擬似的に模倣した環境を提供できると期待したからである。また、共培養法や3次元培養も捨てがたい方法であったが、まずは簡便

な2次元培養で肝機能の向上及び長期培養を実現することが、創薬研究の観点から活用しやすいと判断した。本素材は、関東化学株式会社より「ad-MED ビトリゲル[®]」として、Transwell[®](Corning社)のような細胞培養用インサートとして販売されている(図1)。本研究では、12ウェルプレート用のビトリゲル[®]を使用して評価を実施した。

4.2 細胞:PXB-cells[®]

コラーゲンビトリゲル[®]の先行研究として、株化細胞であるHepG2細胞を用いて、代謝活性や肝機能の指標であるアルブミン分泌及び尿素合成能が向上した例がある¹⁸⁾。しかし初代肝細胞を用いた実績はなかったため、本研究ではヒト初代肝細胞を用いて検討することにした。肝細胞は、凍結ヒト肝細胞が一般的に利用されているが、高コスト、ロット間差の大きさ、使用回数・期間の制限といった障壁がある。評価系構築の際には、再現性の観点から、ロット間差の大きい細胞源を扱うことはデータ解釈の上で問題となる可能性が高い。そこで我々は、ヒト肝細胞を移植したヒト肝置換キメラマウス(PXB-mouse[®])より単離した新鮮ヒト肝細胞であるPXB-cells[®]に注目した。PXB-mouse[®]は、ヒトの薬物動態の予測において高い予測性を示す有望なモデル動物^{19,20)}として近年認知度が上がっている。キメラマウスより単離した肝細胞は、一つのロットを安定的に数年に渡って使用することができ、低コストかつ、新鮮肝細胞の持つ良好な接着性・再現性・代謝能を実現したヒト肝細胞の代替品として使用が期待される。

4.3 培地:dHCGM

本来培地は、購入する細胞ごとに最適化された推奨培地が存在し、各メーカーにより多種の製品が販売されている。ところが、各メーカー独自に開発された培地は、培地組成が開示されていないため、培地成分の何が良いのか、改善する部分はどこにあるのかを把握しにくい点が、ユーザー側として悩ましい部分である。新たな培養法の開発を行う際には、培地組成が明らかなものを使用したいという意図があったため、培地の検討を行う上では、培地組成の開示にこだわり、研究を進めた。その結果、最終的に、PXB-cells[®]を販売している株式会社フェニックスバイオから入手できるdHCGM培地に決定した。本培地は、DMEMを基本培地として組成成分が公開されており^{16, 21)}、PXB-cells[®]の培養に用いる標準的な培地として販売されている。

4.4 ビトリゲル[®]培養法による肝機能評価

上記の細胞培養法構築のための3要素を基に、コラーゲンビトリゲル[®]膜、並びにコラーゲンを塗布した従来のプレートにPXB-cells[®]を播種し、3週間の長期培養を行い、CYP代謝活性及び肝特異的機能を比較した。その結果、肝臓で主要な5つのCYP分子種(CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A)の代謝活性が、従来法では培養開始後10日以降に減少するのに対し、ビトリゲル[®]培養法では、培養14日~17日目まで代謝活性の向上が認められ、高い活性を維持することを見出した(図2)²²⁾。

また、ビトリゲル[®]培養法では培養14日目において、肝機能の

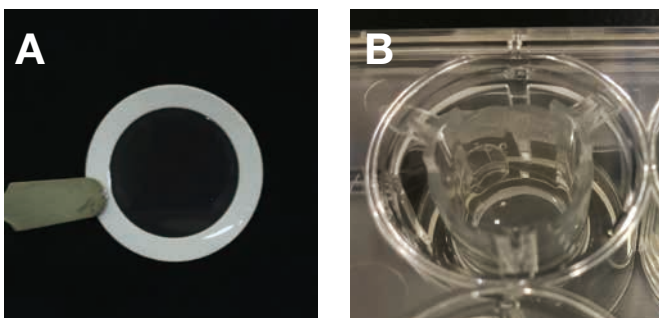


図1 A環状ナイロン膜の支持体付きコラーゲンビトリゲル[®]薄膜(提供:関東化学株式会社)、B ad-MED ビトリゲル[®]膜チャンバーの製品

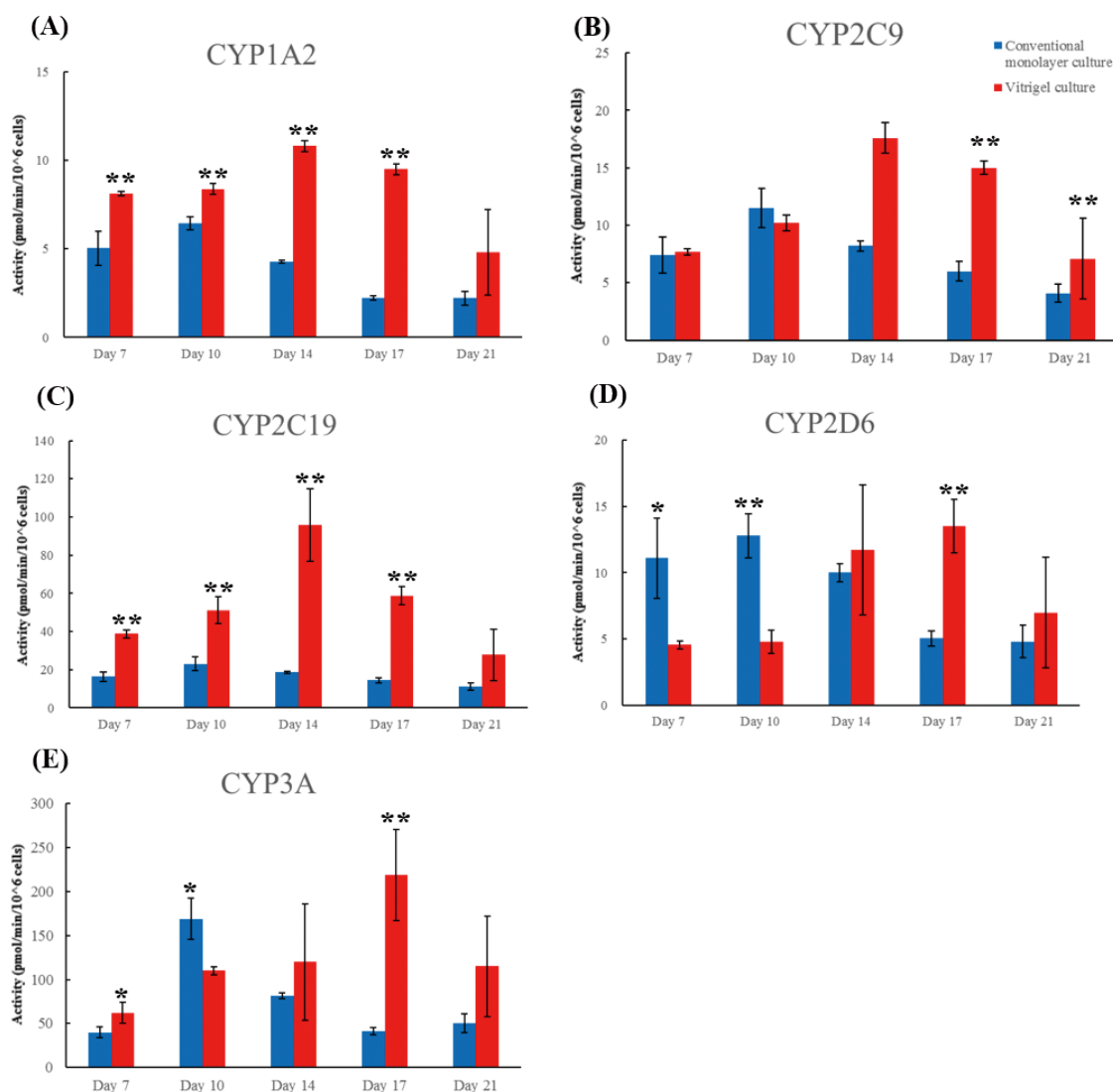


図2 ビトリゲル®培養法及び従来法におけるCYP典型基質化合物での代謝活性評価²²⁾

指標であるアルブミン分泌能や尿素合成能が従来法と比較して増加することが確認された。

上記の結果から、コラーゲンビトリゲル®とPXB-cells®, dHCGMを組み合わせたビトリゲル®培養法を構築し、従来法と比べてCYP代謝能を含む肝機能を長期に賦活化することが可能となった。

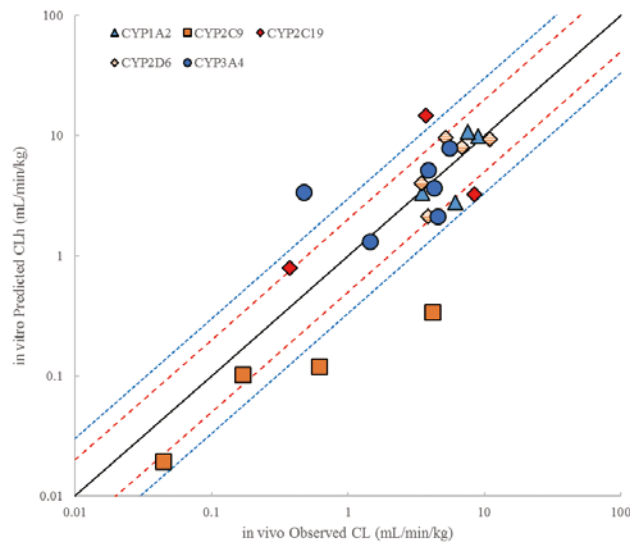
²³⁾。さらに、ビトリゲル®培養法によりCYP代謝活性の向上と維持を実現したことから、従来法ではCLを求めることが困難であった warfarin や tolbutamide といった低CL化合物のCL値の予測も可能であった。

一方、5倍以上の過大評価又は過小評価となった化合物は、alprazolam, diclofenac及びglimepirideの3化合物であった(表1)。DiclofenacとglimepirideはPXB-cells®への結合やコラーゲンビトリゲル®膜への非特異的吸着も疑われ、かつ両化合物ともに血漿タンパク結合率が非常に高く ($f_u, p=0.005$ 以下)、非結合型化合物濃度が低くなるため、ビトリゲル®培養法では過小評価になったと推察される。なお、本研究ではコラーゲンビトリゲル®膜への非特異的吸着やPXB-cells®への結合は評価していないが、Hepato-pac法でも同様の現象が確認されている⁷⁾。こうしたタンパク結合率が高い化合物は、過小評価となる危険がある。そのため、代謝評価を実施する際に、アッセイ培地中に分泌されるアルブミンを考慮して、アルブミンへの結合率を補正することにより予測精度が向上した例も報告されている²⁴⁾。ビトリ

ビトリゲル®培養法におけるヒト肝クリアランス予測への応用

05

PXB-cells®を使用したビトリゲル®培養法では、播種後2週間付近で代謝活性のピークがあることがわかったため、播種後2週間目にCYP典型基質22化合物の代謝評価を実施した。さらに、ビトリゲル®培養法で算出したCL値と、ヒト臨床で得られたCL値を比較し、本培養法の予測精度を検証した。その結果、評価化合物の約80%が3倍以内の予測精度と高い予測性を示した(図3)

図3 ビトリゲル®培養法によるCYP典型基質化合物の肝CL予測²³⁾表1 ビトリゲル®培養法による各CYP典型基質化合物の肝CL及びヒト臨床値²³⁾

Compound name	Responsible metabolic enzymes	$f_{u,p}$	R_b	Human CL (mL/min/kg)	F_{renal}	In vivo observed CL (mL/min/kg)	In vitro CL_{int} (μ L/min/million cells)	In vitro predicted CL_h (mL/min/kg)	Ratio*
Clozapine	CYP1A2	0.044 ^{b)}	0.70 ^{b)}	6.1 ^{b)}	0.005 ^{c,d)}	6.07	23.2	2.77	0.46
Lidocaine	CYP1A2	0.3 ^{d)}	0.84 ^{d)}	9.2 ^{d)}	0.02 ^{d)}	9.02	17.4	9.86	1.1
Mexiletine	CYP1A2	0.36 ^{d)}	1 ^{f)}	8.3 ^{d)}	0.095 ^{c,d)}	7.51	14.8	10.7	1.4
Riluzole	CYP1A2	0.02 ^{d)}	1.7 ^{d)}	3.52 ^{d)}	<0.01 ^{d)}	3.48	56.2	3.32	0.95
Diclofenac	CYP2C9	0.005 ^{d)}	0.55 ^{d)}	4.22 ^{d)}	<0.01 ^{d)}	4.18	22.6	0.339	0.081
Glimepiride	CYP2C9	0.005 ^{d)}	0.55 ^{d)}	0.62 ^{d)}	<0.005 ^{d)}	0.617	7.88	0.120	0.19
Tolbutamide	CYP2C9	0.058 ^{d)}	0.55 ^{d)}	0.17 ^{d)}	<0.01 ^{d)}	0.168	0.580	0.103	0.61
(S)-(-)-Warfarin	CYP2C9	0.01 ^{d)}	0.55 ^{d)}	0.045 ^{d)}	<0.02 ^{d)}	0.0441	0.638	0.0195	0.44
Diazepam	CYP2C19	0.015 ^{d)}	0.71 ^{d)}	0.38 ^{d)}	<0.01 ^{d)}	0.376	17.8	0.791	2.1
Omeprazole	CYP2C19	0.05 ^{d)}	0.59 ^{d)}	8.4 ^{d)}	0 ^{c,d)}	8.40	25.5	3.26	0.39
Voriconazole	CYP2C19	0.42 ^{d)}	1 ^{f)}	3.80 ^{d)}	<0.02 ^{d)}	3.72	22.4	14.6	3.9
Atomoxetine	CYP2D6	0.013 ^{d)}	0.55 ^{d)}	3.92 ^{d)}	0.01 ^{d)}	3.88	59.1	2.12	0.55
Desipramine	CYP2D6	0.184 ^{b)}	0.89 ^{b)}	7.0 ^{b)}	0.02 ^{d)}	6.86	19.8	8.00	1.2
Flecainide	CYP2D6	0.39 ^{d)}	0.89 ^{d)}	9.1 ^{d)}	0.43 ^{d)}	5.19	12.5	9.67	1.9
Metoprolol	CYP2D6	0.88 ^{b)}	1.2 ^{b)}	12.1 ^{b)}	0.10 ^{c,d)}	10.9	4.62	9.40	0.86
Risperidone	CYP2D6	0.11 ^{d)}	0.67 ^{d)}	3.56 ^{d)}	0.03 ^{d)}	3.45	14.7	4.03	1.2
Alprazolam	CYP3A4	0.29 ^{d)}	0.78 ^{d)}	0.59 ^{d)}	0.20 ^{d)}	0.472	4.38	3.39	7.2
Midazolam	CYP3A4	0.02 ^{d)}	0.69 ^{d)}	4.6 ^{d)}	0.01 ^{d)}	4.55	38.3	2.14	0.47
Prednisolone	CYP3A4	0.28 ^{d)}	1 ^{f)}	1.73 ^{d)}	0.17 ^{d)}	1.44	1.58	1.31	0.91
Quinidine	CYP3A4	0.25 ^{b)}	0.92 ^{b)}	4.7 ^{b)}	0.18 ^{c,d)}	3.85	8.15	5.18	1.3
Sildenafil	CYP3A4	0.0941 ^{b)}	1 ^{f)}	6.0 ^{b)}	0.075 ^{c,d)}	5.55	36.7	7.94	1.4
Zolpidem	CYP3A4	0.13 ^{b)}	0.76 ^{b)}	4.3 ^{b)}	0.005 ^{c,d)}	4.28	10.8	3.68	0.86

$f_{u,p}$: fraction unbound in plasma. R_b : blood to plasma ratio. CL : clearance. CL_{int} : intrinsic clearance. CL_h : hepatic clearance. F_{renal} : the fraction of drug excreted by renal elimination. a) Chan *et al.*⁴⁾ b) Stringer *et al.*¹⁵⁾ c) Dave *et al.*¹⁶⁾ d) Obach *et al.*¹⁷⁾ e) Uchimura *et al.*¹⁸⁾ f) R_b was assumed as 1. g) These values were obtained by dividing the reference value (% Urinary Excretion) by one hundred. * Ratio = in vitro Predicted CL_h / in vivo Observed CL .

ゲル®培養法では、培養後2週間でアルブミン分泌量も増加しているため、アルブミンへの結合率の補正処理を行う必要性が高いと考える。

以上、コラーゲンビトリゲル®膜チャンバーとPXB-cells®を用いたビトリゲル®培養法は、CYP基質、特に低CL型化合物のヒト肝CLを精度良く予測できる培養システムであることが明らかになった。ただし、タンパク結合率が高い化合物への適応には課題があり、そうした課題を踏まえた上で評価系を活用することが重要である。今回、新たに構築したビトリゲル®培養法は、探索研究段階の創薬活動において精力的に活用していく。

おわりに

06

本稿では、薬物動態におけるヒト予測の意義を説明し、薬物動態評価のための肝細胞培養法に関する変遷を、培養基材(培養システム)を中心に辿った。そして、培養基材としてコラーゲンビトリゲル®、細胞としてPXB-cells®、培地としてdHCGMを組み合わせた新規肝細胞培養法を提案し、ヒト肝CL予測精度の高い評価モデルを構築した(図4)。

今後は、培養基材の改良として、MPSとの組み合わせや、長期間に渡って高い代謝活性の維持ができる利点を活かし、安全性

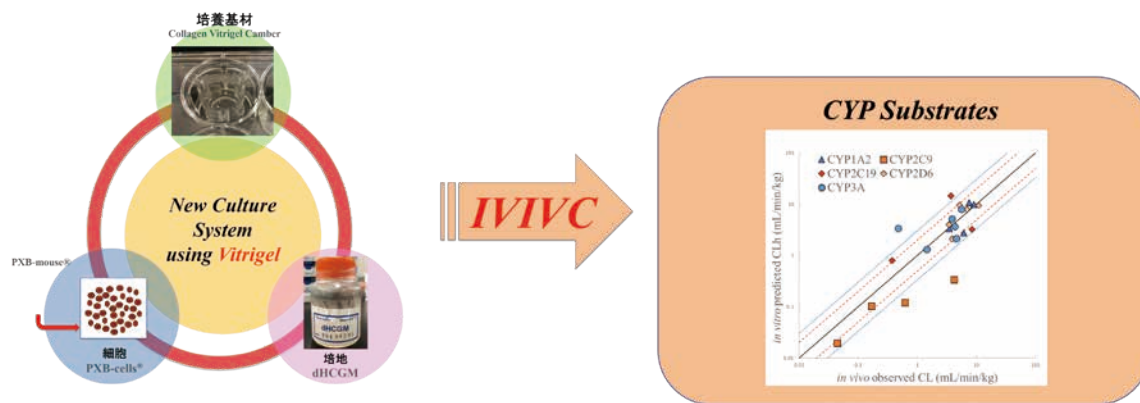


図4 ヒト肝CL予測精度の高いビトリゲル®評価モデル²³⁾

評価への応用も検討している。

以上、探索研究から臨床へと繋ぐ創薬研究を支援する評価系の一つとして、今後もビトリゲル®を用いた薬物動態研究を進めていきたい。

参考文献

1. S.M. Paul, D.S. Mytelka, A.L. Schacht, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 203-214.
2. I. Kola, J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 711-715.
3. J. Arrowsmith, P. Miller. Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013, 12, 569.
4. C. Rodriguez-Antona, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechón, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* 2002, 32, 6, 505-520.
5. L. Di, P. Trapa, L. M. Tremaine, et al. A Novel Relay Method for Determining Low-Clearance Values. *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40, 9, 1860-1865.
6. S.R. Khetani, S.N. Bhatia. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 2008, 26, 1, 120-126.
7. T.S. Chan, H. Yu, D. Tweedie, et al. Meeting the Challenge of Predicting Hepatic Clearance of Compounds Slowly Metabolized by Cytochrome P450 Using a Novel Hepatocyte Model, HepatoPac. *Drug Metab. Dispos.* 2019, 47, 1, 58-66.
8. I. Hultman, C. Vedin, M. Darnell, et al. Use of HμREL® human co-culture system for prediction of intrinsic clearance and metabolite formation for slowly metabolized compounds. *Mol. Pharmaceutics.* 2016, 13, 8, 2796-2807.
9. T. Ohkura, K. Ohta, T. Ogihara, et al. Evaluation of Human Hepatocytes Cultured by Three-dimensional Spheroid Systems for Drug Metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2014, 29, 5, 373-378.
10. C.C. Bell, D.F.G. Hendriks, M. Ingelman-Sundberg, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci. Rep.* 2016, 6, 25187.
11. S.U. Vorrink, Y. Zhou, V.M. Lauschke, et al. Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity Using Long-Term Stable Primary Hepatic 3D Spheroid Cultures in Chemically Defined Conditions. *Toxicol. Sci.* 2018, 163, 2, 655-665.
12. T. Ogihara, H. Arakawa, H. Kojima, et al. Utility of human hepatocyte spheroids without feeder cells for evaluation of hepatotoxicity. *J. Toxicol. Sci.* 2017, 42, 4, 499-507.
13. T. Takebe, K. Sekine, T. Ogaeri, et al. Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, and Hideki Taniguchi. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013, 499, 481-484.
14. T. Shinozawa, H. Yoshikawa, T. Takebe. Reverse Engineering Liver Buds Through Self-Driven Condensation and Organization Towards Medical Application. *Developmental Biology.* 2016, 420, 221-229.
15. A.R. Baudy, M.A. Otieno, W.R. Proctor, et al. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry. *Lab Chip.* 2020, 20, 215-225.
16. C. Yamasaki, C. Tateno, K. Yoshizato, et al. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *J. Hepatol.* 2006, 44, 749-757.
17. T. Takezawa, K. Ozaki, T. Shimo-Oka, et al. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids. *Cell Transplant.* 2004, 13, 463-473.
18. A. Oshikata-Miyazaki, T. Takezawa. Development of an oxygenation culture method for activating the liver-specific functions of HepG2 cells utilizing a collagen vitrigel membrane chamber. *Cytotechnology.* 2016, 68, 5, 1801-1811.
19. S. Sanoh, Y. Naritomi, S. Ohta, et al. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica.* 2015, 45, 7, 605-614.
20. M. Miyamoto, S. Iwasaki, H. Hirabayashi, et al. Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica.* 2017, 47, 12, 1052-1063.
21. C. Tateno, K. Yoshizato. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 1996;148:383-392.
22. R. Watari, M. Kakiki, K. Kusano, et al. A long-term culture system based on a collagen vitrigel membrane chamber that supports liver-specific functions of hepatocytes isolated from mice with humanized livers. *J. Toxicol. Sci.* 2018, 43, 8, 521-529.
23. R. Watari, M. Kakiki, K. Kusano, et al. Prediction of Human Hepatic Clearance for Cytochrome P450 Substrates via a New Culture Method Using the Collagen Vitrigel Membrane Chamber and Fresh Hepatocytes Isolated from Liver Humanized Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2019, 42, 3, 348-353.
24. F. Da-Silva, X. Boulenc, P. Poulin, et al. Improving Prediction of Metabolic Clearance Using Quantitative Extrapolation of Results Obtained From Human Hepatic Micropatterned Cocultures Model and by Considering the Impact of Albumin Binding. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 1957-1972.

ヒト肺モデル:肺特有の構造・機能を in vitroで再現する

Human lung models: reconstructing structures and functions in vitro

山本 佑樹
Yamamoto Yuki

HiLung株式会社 代表取締役
HiLung Inc. (CEO)

KEYWORD ▶

呼吸器

iPS細胞

ヒト肺モデル

はじめに

01

近年、パンデミックを来し世界の仕組みを変えてしまった、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)をはじめとする病原体は勿論、たばこ煙や排ガス・PM2.5などの環境公害物質、花粉・黄砂などのアレルゲンとなりうる物質は、呼吸器疾患の原因あるいは悪化要因となり得る。複雑で高度な機能を有する肺を高精度に模倣したヒト肺モデルは乏しかったが、近年の発生学及び幹細胞生物学の急速な進展により、臓器形成や組織再生におけるメカニズム解明やその制御に関する理解が進んだ。その結果、組織幹細胞や前駆細胞などを適切な条件下で培養することにより、呼吸器細胞の特異的な性質を維持しつつ培養したり、複雑な細胞構成や三次元組織構造を再現したりすることが可能になってきた。またこれらのヒト肺モデルは生体工学などの異分野技術との融合によって、さらに精緻化することも可能になっており、Microphysiological System (MPS)や生体模倣システムと総称され、高いヒト外挿性の実現が期待されている。本稿では肺の概略を踏まえた上で呼吸器疾患モデルの問題点を紹介し、こうしたヒト肺モデルの進展について最近の知見を含めて紹介したい。

肺の構造と機能

02

肺は生命維持に必須の機能であるガス交換の場として極めて複雑精緻な構造と機能を有する臓器であり、空気の通り道である気道とガス交換の場である肺泡に大別することができる。構造としては気管から始まり枝分かれを繰り返して末梢気管支へ至り、その先端に嚢胞状の構造物である肺泡が存在する。ヒトの肺では肺泡が約3億個存在し、延べ表面積は70m²に達するとされており、この広大な表面積は効率的なガス交換を可能にしている。このような複雑な構造・機能を維持する上で最も重要な役割

を果たしているのは、肺を構成する特徴的な機能を有した細胞群である。シングルセル解析などのオミックス技術が進歩した現在、ヒト肺には最低でも58種類もの細胞種が存在するという報告¹⁾もあり、これらの細胞群が複雑な相互関係を構築することで恒常性を維持していると考えられる。

このように肺は“精密機械”のようであり、一般に再生能力の低い臓器にも関わらず、常に外気に晒され体外の多種多様な刺激に曝露されていることが大きな特徴である。このため肺においては多種多様な難治性疾患が発生し一部は致死的である。

呼吸器疾患モデルの現状と問題点

03

前述のような背景をもとに、呼吸器疾患における医薬品ニーズは極めて大きいにも関わらず、医薬品の開発成功率は他の疾患領域に比べて低いとされている。中でも、医薬品開発において初めてヒトでの薬効が確認される、第二相試験での成功率の低さが目立つ。すなわち前臨床で行われた培養細胞や動物モデルを用いて取得されたデータが、“ヒト”の臨床試験結果を正確に予測できていないことを示唆する。特に、動物モデルとヒト呼吸器疾患病態との乖離は、近年の研究進展によって数多く指摘されている。例えば、嚢胞性線維症という遺伝性疾患はCaucasianを中心に多くの保因者がみられ、呼吸器病変が致死的となる難病が存在する。この難病は細胞膜を介した塩素イオン輸送に関わるCFTR遺伝子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の変異によって引き起こされるが、CFTR遺伝子を欠失させたマウスにおいては特に大きな変化は見られない²⁾。また遺伝性疾患以外でも同様であり直近の例を挙げると、新型コロナウイルスは通常マウス肺においては効率的な感染が成立しない³⁾。このような乖離の要因として重要と考えられるのは、ヒト肺と動物肺との差異である。まず前提として、魚類などは一部を除いて肺が存在しておらず、心臓や肝臓などの主要臓器を比べても、そもそも進化レベルで決定的な違いがある。

さらに哺乳類という枠組みに限っても、動物モデルとして最も汎用されるマウス肺では、ヒト肺と比較して構成する細胞種が異なることや、呼吸細気管支のような解剖学的に疾患発生母地として重要な構造が存在しない⁴⁾、など大きな種差が存在する。

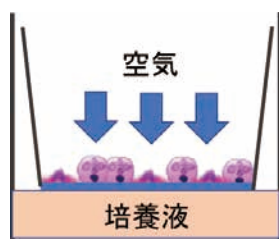
このように動物モデルの限界が指摘される中で、疾患研究や創薬においてヒト外挿性の高い“ヒト肺モデル”に対する関心が高まっている。従来は、ヒト肺細胞モデルとしてA549などの腫瘍細胞株が用いられてきたが、このような細胞では呼吸器上皮細胞としての特徴的なマーカー発現や機能が消失しているなど、外挿性を考えるうえで問題点が多かった。またヒト肺から単離した初代培養細胞も重要な細胞ソースではあるが、通常の平面的な培養方法では短期間のうちに呼吸器細胞特異的な性質を失ってしまうといった問題が指摘されてきた⁵⁾。

気面-液面境界培養 (air-liquid interface, ALI)

04

気面-液面境界培養は、培養ウェル内にセルカルチャーインサート(以下、インサート)と呼ばれる宙づり状の物質透過性培養器材を配置することにより、上層に細胞を播種して空気に曝露させるとともに、下層に加えた培地がインサート膜の穴を通して上層の細胞に供給される仕組みとなっている(図1)。空気に細胞が曝露される状態が生理的である呼吸器領域においては、特に気管・気管支上皮細胞の培養において最も標準的な方法として使用されている。ヒト気管・気管支から採取された細胞を本培養系に播種して数週間培養することにより、基底細胞や繊毛上皮細胞、杯細胞などの粘液産生細胞などが、いわゆる偽重層構造(pseudostratified layer)を呈する生体の気道上皮を近似した構造体を再現することが可能になる。また呼吸器疾患患者から採取した気道上皮細胞を用いることにより、疾患病態研究や創薬にも応用されている。本培養系が創薬においてヒト外挿性の高いモデルとして重要な役割を果たした代表的事例の1つに、嚢胞性線維症におけるCFTR modulator(嚢胞性線維症治療剤)と呼ばれるクラスの薬剤開発が挙げられる。本症において病因となっているCFTR機能異常を標的とする最初の上市薬はivacaftor(VX-770)であるが、患者由来気道上皮細胞を用いてALI培養を行った薬効評価試験結果は、本剤が臨床試験に進むうえで重要

図1 気面-液面境界培養



培養液はインサートのメンブレンを通じて細胞に供給され、細胞のapical面は空気に曝露される。

な非臨床薬効データになったことが知られている。CFTRは塩素イオンチャンネルの機能を有するため、イオンチャンネル機能が評価可能なUssing chamber法を用いて評価を行ったところ、VX-770は良好な機能改善作用を示した⁶⁾。その後ivacaftorの成功を皮切りにVertex社はCFTR modulatorを連続的に上市させているが、このin vitro機能評価系と臨床試験のアウトカム(1秒量の改善)が良く相関することが知られており、in vitroヒト呼吸器疾患モデルの成功事例と言える。こうした遺伝性疾患以外にも、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの罹患率が高い疾患においても、ALI培養を用いた疾患モデル作成の有用性は知られている。例えばGrasらは、重症および中等症喘息患者から得た気管支上皮細胞をALI培養で分化させたのち、それらのフェノタイプを比較したところ、重症患者由来ALI培養においてムチンやIL-8の産生増加といった臨床に合致する所見を得ることが出来た⁷⁾。またGohyらはCOPD患者とコントロールの肺検体サンプルを解析比較するとともに、そのサンプルに由来する細胞を用いてALI培養を行ったところ、繊毛上皮細胞が減少し粘液産生細胞が増加するといったCOPD患者における特徴的な細胞分化傾向を再現することが出来たとしている⁸⁾。

細胞の管腔側が空気に曝露されるという、生理学的に整合性の高いALI培養の特徴が最大限に生きる実験は、たばこ煙や病原体など外気を通じて肺に取り込まれる物質の影響評価や疾患病態研究である。ALI培養におけるたばこ煙曝露実験は、たばこ煙の毒性評価や喫煙と極めて関連が深い疾患であるCOPDの疾患モデル作成など多数の報告があり、その有用性が広く知られている⁹⁾。GindeleらはALI培養した気管支上皮細胞にたばこ煙を間欠的に曝露させると、上皮バリア機能障害や繊毛運動低下が起きたことに加え、トランスクリプトーム解析を行うと気道上皮細胞の分化傾向に異常が惹起されることを示した¹⁰⁾。また呼吸器ウイルス感染症研究においても本培養系は有用なツールのため多数の報告事例があり、新型コロナウイルス感染症のパンデミックを契機に改めて注目が集まっている。本稿でも触れる通り、in vitroのヒト肺モデルについては、近年の幹細胞生物学の急速な発展に伴ってオルガノイド培養が脚光を浴びようになっていたが、パンデミックに伴う新型コロナウイルス研究の際にその弱点もクローズアップされた。すなわち一般的な呼吸器オルガノイドの作製手法では、多くの場合細胞管腔側が三次元培養体の閉鎖された内腔側に位置するため、管腔側から感染する新型コロナウイルスにおいては生理的なモデルを作製することが難しいのである^{11, 12)}。その結果、ウイルス感染実験を容易かつヒト病態との整合性をもって行えるALI培養が創薬・病態研究モデルとして頻用されることとなった¹³⁾。中でもALI培養が大きな役割を果たしたのは、最初の緊急使用許可に至ったレムデシビルの非臨床薬効試験である。本剤は従来コロナウイルス感染症に汎用されていたVeroE6細胞感染モデルでは、新型コロナウイルスに対する薬効は弱かったが、ALI培養を用いた気道上皮細胞の感染モデルにおいてより高い薬効を確認することが出来¹⁴⁾、臨床開発に進む後押しになったと推察される。

今までに述べてきた通り、ALI培養は呼吸器の生理学的特徴に

合致する部分の多い手法であり比較的古くから行われているが、COVID-19パンデミック対応を含めて現在もヒト肺モデルとして最も汎用されている。また本系は上皮細胞を中心に行われているが、近年では線維芽細胞との共培養を行う手法¹⁵⁾など、ヒト肺モデルの複雑化に向けた試みによって更なる発展が期待される。

オルガノイド

05

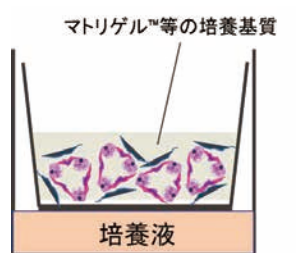
オルガノイドとは、一般に臓器特有の三次元構造や複雑な構成細胞をin vitroで再現した培養体であり(図2)、癌細胞などの疾患組織再現も含めた比較的広い範囲で用いられる用語となっている。オルガノイドの起源をどこに置かは諸説あるが、本系を構築する上で細胞ソースとして欠かせない幹細胞に関する研究進展が、現在の“オルガノイド”の急速な普及に寄与したと考えると、日本人を筆頭著者とする二つの研究が極めて重要であったことは明らかである。一つは、2008年にEirakuらが報告したES細胞を用いた大脳組織の構築に関わる論文で、幹細胞がもつ“自己組織化”という能力を実証した¹⁶⁾。もう一つは、2009年にSatoらが報告したLgr5陽性小腸幹細胞を用いた腸管オルガノイド形成に関わる論文で、ニッチ環境の再現による幹細胞制御で生体に類似した三次元培養体を作製できることを明らかにした¹⁷⁾。さらに、2007年にTakahashiらが樹立したヒトiPS細胞¹⁸⁾が広く利用できるようになると、オルガノイド技術と組み合わせるとヒトの臓器形成を再現可能なツールとして様々な領域で応用されるようになった。またTakebeらが血管構造を持つオルガノイド形成に成功したように¹⁹⁾、より生体模倣性を高めるために多系統の細胞種を共培養する試みも進んでいる。

呼吸器のオルガノイドも他臓器と同じく、発生学や幹細胞生物学の知見の上に発展してきた。2009年にRockらは、気道上皮細胞において基底細胞が組織幹細胞の役割を持つことをマウスの実験などを通して証明し、表面抗原を用いて分離した基底細胞を三次元培養することにより、繊毛上皮細胞や粘液分泌細胞など実際の気管・気管支構成細胞への分化や構造を模倣することができることを示した²⁰⁾。この論文を発表したHoganらの研究グループは、2013年に従来in vitroでの培養維持が困難とされて

いたマウス由来II型肺上皮細胞をマウス由来肺線維芽細胞との共培養オルガノイドとして形成することにより、初めて長期に培養するとともにI型上皮細胞への分化能などを確認した²¹⁾。同研究は、これまで重要視されながらも困難であったヒト肺領域および関連する疾患研究の端緒となった、重要なマイルストーンと位置付けられる。その翌年、京都大学のGotohらの研究グループが、ヒトiPS細胞から分化誘導した肺前駆細胞と線維芽細胞との共培養オルガノイドを形成することにより、困難であったII型肺上皮細胞の分化誘導に成功した²²⁾。呼吸器領域では腸管などと異なり、初代培養細胞採取に高い侵襲性を伴うこともあり、特にヒトiPS細胞を用いたオルガノイド形成研究や創薬研究応用が盛んに行われるようになった。例えば、ChenらはヒトiPS細胞から肺の三次元枝分かれ構造を再現したオルガノイドを作製し、ウイルス感染実験や疾患特異的iPS細胞を用いた肺線維症モデル作製が可能であることを報告した²³⁾。またKorogiらは疾患iPS細胞から作成した肺上皮オルガノイドを用いて、遺伝性肺線維症の病態形成に肺サーファクタントの分泌異常が関与している可能性を示した²⁴⁾。本研究ではライブセルイメージングを用いてサーファクタント分泌に関わる細胞小器官の動態を可視化したり、遺伝性肺線維症の原因遺伝子をCRISPR/CAS9を用いて修復しフェノタイプが正常化することを示したりするなど、iPS細胞由来オルガノイド技術やイメージング技術、遺伝子改変技術の組み合わせが病態研究に大変有用であることを示した。またオルガノイド培養を用いて、iPS細胞由来肺上皮細胞を長期間にわたり増殖させることなども可能になった^{25, 26)}。気道上皮細胞においても、オルガノイド培養を行うことによってより成熟した機能的な繊毛上皮細胞を分化することができるようになるなど²⁷⁾、iPS細胞から成熟した呼吸器細胞を分化・維持する方法として、オルガノイドの有用性に関する多くの報告がなされている。一方、患者検体等から分離した初代培養細胞を用いたオルガノイド作製については、前述の通り細胞採取自体に伴う侵襲性の問題や安定した細胞増殖が難しかったこともあり、汎用的な手法は限られていた。しかしマウスなどの実験動物を用いた幹細胞ニッチの研究などから、呼吸器細胞系譜の制御に関わる因子などが同定された結果、分離した組織幹細胞を用いて効率的にオルガノイドを作製することが可能になってきた。Katsuraらはヒト肺から分離したII型肺上皮細胞を、線維芽細胞との共培養系を用いずに複数の成長因子や化合物を添加した培養液だけで肺胞様の三次元構造を形成させ、増殖・分化させることに成功した²⁸⁾。またこのモデルを用いて新型コロナウイルス感染モデルを作製することにも成功した。さらに初代培養気道上皮細胞からオルガノイドを作製し、より長期間にわたって拡大培養したり、嚢胞性線維症や呼吸器ウイルス感染モデルへ応用したりすることも可能となった²⁹⁾。

このように呼吸器オルガノイドは、iPS細胞あるいは初代培養組織幹細胞などを用いた臓器形成、組織再生メカニズム等の研究から呼吸器疾患の病態研究まで、幅広い応用展開が行われている。こうした取り組みの中から、今までの培養系では困難であった新規メカニズムや創薬ターゲットの同定など、実際の患者治療につながる知見が得られることが期待されている。

図2 オルガノイド培養



幹細胞などを三次元基質内で培養することで、組織様構造が形成される。

Organ-on-a-chip

06

幹細胞が持つ自己組織化能を活用したオルガノイドと異なり、マイクロ流路系などの工学的な技術に応用した生体環境を模倣する試みの一つとして、Organ-on-a-chipと呼ばれるデバイス技術がある。本系の最大の特徴は、収縮伸展やフローなどの生体臓器におけるメカニカルな刺激(以下、メカニカルストレス)を、in vitroで再現可能にしたところにある。常に呼吸に合わせた収縮伸展を繰り返し、気流や血流などのフローも含めた多様なメカニカルストレスがかかる臓器である肺は、本系において格好の研究ターゲットとなってきた。実際、organ-on-a-chipの概念が初めて世に示されたHuhらの論文は、lung-on-a-chipとしてメカニカルストレスに対する生体の反応を再現するものであった³⁰⁾。その後、本論文の責任著者であるIngberの研究グループからは、肺を含む様々な臓器に関するchipが作製され、病態モデル作製などに応用されている。さらにこれらの知見をもとに設立されたEmulate社が、本系の実用化に成功し、現在創薬研究などに広く用いられている。また最初の論文から10年が経ちより肺の生体模倣性を高めるために、chipを構成するメンブレンなどをより生体に近いものにした第二世代とも言うべきlung-on-a-chipも登場してきた。Zamprognoらは、従来organ-on-a-chipに多用されていたPDMS膜ではなく、エラスチンとコラーゲンの合成膜で構成されたlung-on-a-chipを開発し、メカニカルストレッチなどを再現することに成功した³¹⁾。これらの系は呼吸器疾患の病態研究や創薬応用だけでなく、気流の再現を活用したPM2.5の吸入物質毒性研究にも応用されている³²⁾。

Organ-on-a-chipの問題点は、chipに搭載する細胞ソースや搭載された細胞の性質・機能維持が不十分であったと考えられるが、前項でも述べた幹細胞生物学的知見の蓄積とiPS細胞などを含めた細胞ソースの多様化により、より安定かつ複雑な生体環境を模倣することができるようになると思う。またこれらのchipは、例えばliver-on-a-chipやkidney-on-a-chipと連結することで、多臓器間の相互作用などを再現することが可能になると考えられており、いわゆるbody-on-a-chipの概念実現が期待される。

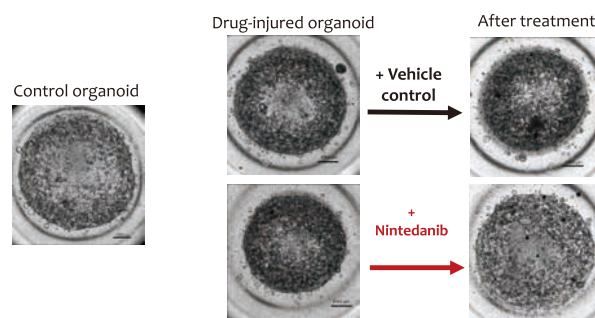
iPS細胞由来ヒト肺モデル

07

オルガノイドに関する項でも述べたように、ヒトiPS細胞は元来採取にハードルがあった初代呼吸器細胞に代わる、ヒト肺モデルの細胞ソースとして有望視されている。特に気道や肺胞上皮細胞の分化誘導方法確立に伴い、これらの細胞を種々の呼吸器疾患モデルに応用する研究が盛んになっている。またiPS細胞は血液などの検体から樹立が可能のため、臨床検体の入手が比較的困難な遺伝性希少疾患の研究において大きな威力を発揮している。例えばMcCauleyらは、嚢胞性線維症患者から樹立したiPS

細胞を気道オルガノイドに分化させ、嚢胞性線維症の病態再現や治療薬評価が可能であったと報告している³³⁾。また遺伝性肺線維症を来す、Hermansky-Pudlak症候群患者から樹立したiPS細胞を用いた疾患モデリングも報告されている^{24, 34)}。さらに、先述のorgan-on-a-chipの技術と組み合わせて気道繊毛上皮細胞の分化や原発性線毛機能不全症の疾患モデル形成を行った報告もある³⁵⁾。こうした遺伝性疾患に加えて、肺胞オルガノイドに薬剤障害を加えることにより肺線維症モデルを作成したり³⁶⁾(図3)、iPS細胞由来気道上皮細胞を用いて新型コロナウイルス感染モデルを作製し薬効を評価したり³⁷⁾することが可能になっている。

図3 iPS細胞由来肺胞オルガノイドを用いた線維症モデル



肺胞オルガノイドに薬剤障害を加えることで、肺線維症を再現した組織がダイナミックに収縮するフェノタイプを再現できた。ニンテダニブ(肺線維症に対する上市薬)によって、同フェノタイプは改善された。(HiLung社データ)

またiPS細胞を用いたヒト肺モデルの展開として、スループットの高い創薬アッセイへの応用や将来的な再生医療への応用が期待される。双方を実現するためには、細胞量産系の開発が必要であるが、IkeoらはiPS細胞由来肺前駆細胞をファイバー状に培養する方法により、安定的に拡大培養できることを報告した³⁸⁾。さらに、iPS細胞由来肺前駆細胞をマウスに移植することにより、初めて肺胞領域への生着に成功した。呼吸器領域でのiPS細胞の応用は他臓器に比べ遅れてきたが、将来の創薬あるいは再生医療への応用へ向けた研究が着実に進んでいる。

まとめ

08

肺は機能的にも構造的にもin vitroモデルを形成することは困難と考えられていた。しかしiPS細胞や組織幹細胞などを中心とした幹細胞生物学の進展と、組織・生体工学を加えた様々な解析技術を組み合わせることにより、生体模倣性の高いヒト肺モデルを作製することが可能になってきた。新型コロナウイルスのパンデミックに伴い世界中で行われているメカニズム研究や創薬の現場において、これらヒト肺モデルが当たり前のように使用されており、病態理解や薬剤開発を行う上で欠かせないツールとなった。今回のパンデミックを契機に、ヒト肺モデルの生体模倣性向

上や実用化がさらに加速していくと考えられる。例えば将来的には”clinical trial in a dish”のような、臨床試験機能を置き換えることや個別化医療を実現するツールとして、あるいは再生医療など細胞治療への応用などが期待される。

参考文献

1. K. J. Travaglini, A. N. Nabhan, M. A. Krasnow, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020, 587, 619-625.
2. A. McCarron, D. Parsons, and M. Donnelly. Animal and Cell Culture Models for Cystic Fibrosis Which Model Is Right for Your Application? *Am. J. Pathol.* 2021, 191, 2, 228-242.
3. C. Muñoz-Fontela, W. E. Dowling, D. H. Barouch, et al. Animal models for COVID-19. *Nature*. 2020, 586, 509-515.
4. H. S. Bal, and N. G. Ghoshal. Morphology of the terminal bronchiolar region of common laboratory mammals. *Lab Anim.* 1988, 22, 1, 76-82.
5. L. G. Dobbs, M. C. Williams, and R. Gonzalez. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim Biophys Acta.* 1988, 970, 2, 146-56.
6. F. V. Goor, S. Hadida, P. Negulescu, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106, 44, 18825-30.
7. D. Gras, A. Bourdin, P. Chanez, et al. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129, 1259-1266.
8. S. Gohy, F. M. Carlier, C. Pilette, et al. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep.* 2019, 9, 17963.
9. X. Li. In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicol In Vitro.* 2016, 36, 105-113.
10. J. A. Gindele, T. Kiechle, J. Schymeinsky, et al. Intermittent exposure to whole cigarette smoke alters the differentiation of primary small airway epithelial cells in the air-liquid interface culture. *Sci Rep.* 2020, 10, 6257.
11. J. Huang, A. J. Hume, D. N. Kotton, et al. SARSCoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell.* 2020, 27, 6, 962-973.
12. E. Sano, T. Suzuki, K. Takayama, et al. Cell response analysis in SARSCoV-2 infected bronchial organoids. *Commun Biol.* 2022, 5, 516.
13. Y. J. Hou, K. Okuda, R. S. Baric, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 2020, 182, 2, 429-446.
14. A. J. Pruijssers, A. S. George, T. P. Sheahan, et al. Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARSCoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Rep.* 2020, 32, 3, 107940.
15. S. Ishikawa and S. Ito. Repeated whole cigarette smoke exposure alters cell differentiation and augments secretion of inflammatory mediators in air-liquid interface three-dimensional co-culture model of human bronchial tissue. *Toxicol In Vitro.* 2017, 38, 170-178.
16. M. Eiraku, K. Watanabe, Y. Sasai, et al. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell.* 2008, 3, 5, 519-532.
17. T. Sato, R. G. Vries, H. Clevers, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009, 459, 262-265.
18. K. Takahashi, K. Tanabe, Mari, S. Yamanaka, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007, 131, 5, 861-872.
19. T. Takebe, K. Sekine, H. Taniguchi, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013, 499, 481-484.
20. J. R. Rock, M. W. Onaitis, B. L. M. Hogan, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106, 31, 12771-5.
21. C. E. Barkauskas, M. J. Cronce, B. L. M. Hogan, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* 2013, 123, 7, 3025-36.
22. S. Gotoh, I. Ito, M. Mishima, et al. Generation of Alveolar Epithelial Spheroids via Isolated Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2014, 3, 3, 394-403.
23. Y. Chen, S. X. Huang, H. Snoeck, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol.* 2017, 19, 542-549.
24. Y. Korogi, S. Gotoh, T. Hirai, et al. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. *Stem Cell Reports.* 2019, 13, 1, 431-440.
25. Y. Yamamoto, S. Gotoh, M. Mishima, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPSCs in organoids. *Nat Methods.* 2017, 14, 1097-1106.
26. A. Jacob, M. Morley, D. N. Kotton, et al. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell.* 2017, 21, 4, 472-488.
27. S. Konishi, S. Gotoh, M. Mishima, et al. Directed Induction of Functional Multiciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2016, 6, 1, 18-25.
28. H. Katsura, V. Sontake, P. R. Tata, et al. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell.* 2020, 27, 6, 890-904.
29. N. Sachs, A. Papaspyropoulos, H. Clevers, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* 2019, 38, e100300.
30. D. Huh, B. D. Matthews, D. E. Ingber, et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010, 328, 1662-8.
31. P. Zamprogno, S. Wüthrich, O. T. Guenat, et al. Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol.* 2021, 4, 168.
32. C. Xu, M. Zhang, J. Qin, et al. Assessment of Air Pollutant PM2.5 Pulmonary Exposure Using a 3D Lung-on-Chip Model. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020, 6, 3081-3090.
33. K. B. McCauley, F. Hawkins, D. N. Kotton, et al. Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell.* 2017, 20, 6, 844-857.
34. T. Suezawa, S. Kanagaki, S. Gotoh, et al. Modeling of lung phenotype of Hermansky-Pudlak syndrome type I using patient-specific iPSCs. *Respir Res.* 2021, 22, 284.
35. N. Sone, S. Konishi, S. Gotoh, et al. Multicellular modeling of ciliopathy by combining iPSCs and microfluidic airway-on-a-chip technology. *Sci Transl Med.* 2021, 13, 601.
36. T. Suezawa, S. Kanagaki, S. Gotoh, et al. Disease modeling of pulmonary fibrosis using human pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Stem Cell Reports.* 2021, 16, 12, 2973-2987.
37. X. Yin, L. Riva, S. K. Chanda, et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2021, 34, 2, 108628.
38. S. Ikeo, Y. Yamamoto, S. Gotoh, et al. Core-shell hydrogel microfiber-expanded pluripotent stem cell-derived lung progenitors applicable to lung reconstruction in vivo. *Biomaterials.* 2021, 276, 121031.

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。

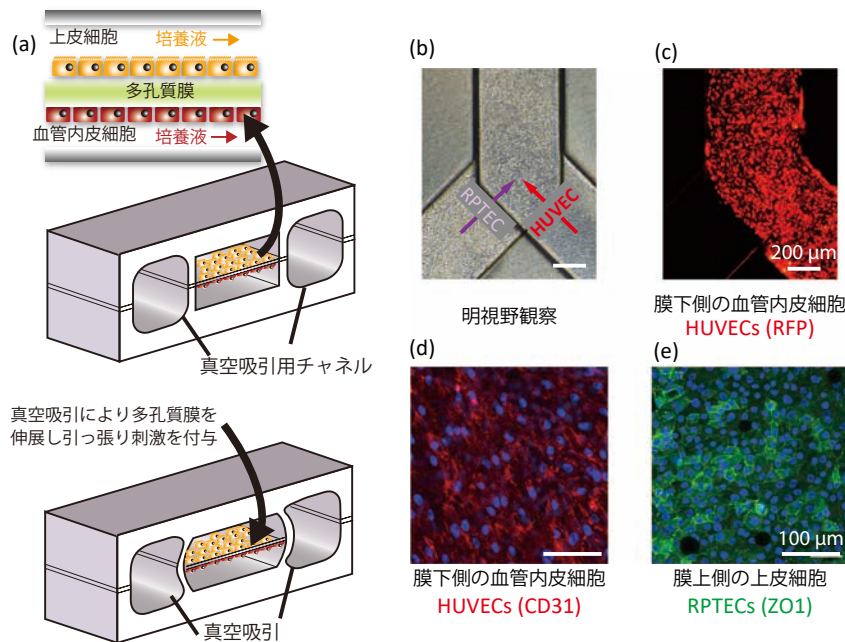


図1 二次元MPSの構成 a) 多孔質膜の上側に上皮細胞、下側に血管内皮細胞を培養する。左右のチャンネルは真空吸引することにより、多孔質膜を伸展し引っ張り刺激を付与する。b) 流路内培養した近位尿管上皮細胞 (RPTEC) と血管内皮細胞 (RFP-labeled HUVEC) の明視野像。c) RFP-labeled HUVECの蛍光像。d) HUVECのCD31免疫染色像。e) RPTECのZO-1免疫染色像。

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を

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し評価ができる。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

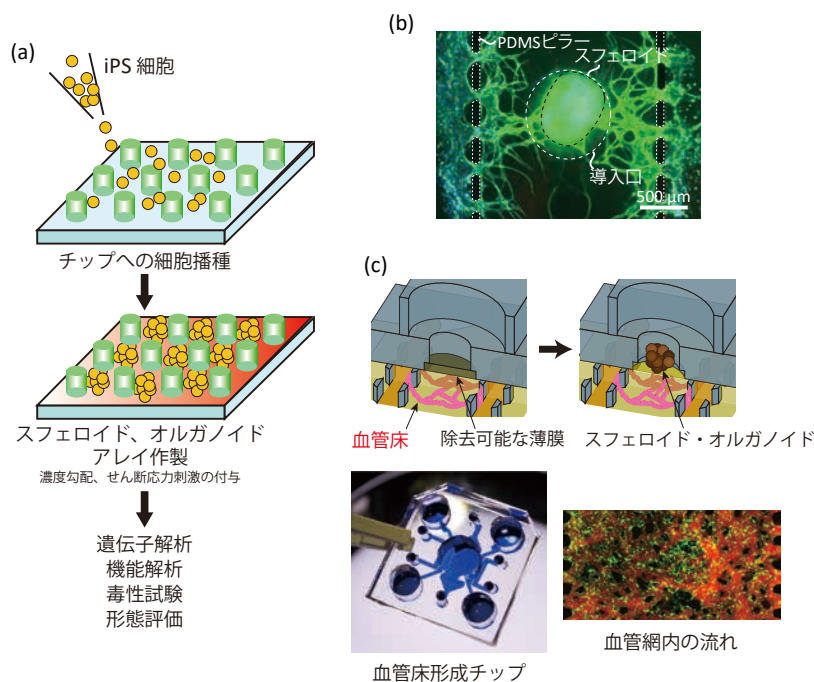


図2 三次元MPSの構成 a) スフェロイド、オルガノイドアレイの製作と、濃度勾配やせん断応力刺激の付与。b) 血管新生による三次元組織と血管網の接続。c) 血管床を用いたスフェロイド、オルガノイドの共培養チップ。

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。

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加しており、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



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. マイクロフルイディクスの 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 microenvironments*. 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, Tiama 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 Southeimer-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.

新規in vitro細胞アッセイとしての Microphysiological Systems (生体模倣システム) - MPSの開発を色々な面から眺めてみる

Microphysiological Systems as a Novel In Vitro Cell Assay -
Looking at the Development of MPS from Various Perspectives

石田 誠一
Seiichi Ishida

崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学専攻 教授
Division of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University (Professor)

KEYWORD ▶ Microphysiological systems (MPS)

序

01

本稿では、新規in vitro細胞アッセイとして近年学会や専門誌で目にする機会が増えているMPS (Microphysiological Systems:生体模倣システム)について論じる。MPSの定義や、使用目的から求められる機能、模倣の対象とする臓器/組織によるMPSの構成要件、規制側から見たMPSの位置づけなどについて、それぞれにまつわる異なる視点からの議論を対比させて扱うことで、MPS開発の将来展開を考えてみたい。MPSについては、近年多くの総説が出ており、筆者が参加したAMED-MPSプロジェクトの概要も含め、そちらも参考にされたい^{1, 2, 3, 4, 5}。

MPSとは

02

ヒトの組織/臓器から細胞を単離し実験室で培養すること、つまり試験管内 (in vitro)においてヒト組織/臓器を模倣しようという試みは古くから行われており、HeLa細胞が樹立された1950年代から現在まで連続として試みられている。人工臓器やバイオリアクターのような大がかりな培養装置は別として、長らくは培養ディッシュの中で細胞を平面的に培養するだけにとどまっていた。しかし培養器への微細加工技術が進化したことや、初代培養細胞の維持培養法やES細胞、iPS細胞に代表される幹細胞分化誘導法の開発が進むにつれて、さまざまな培養器と細胞資源が利用できるようになり、近年多様な細胞培養手法が提供されるようになってきた。それらをスループット性と生体機能の反映度か

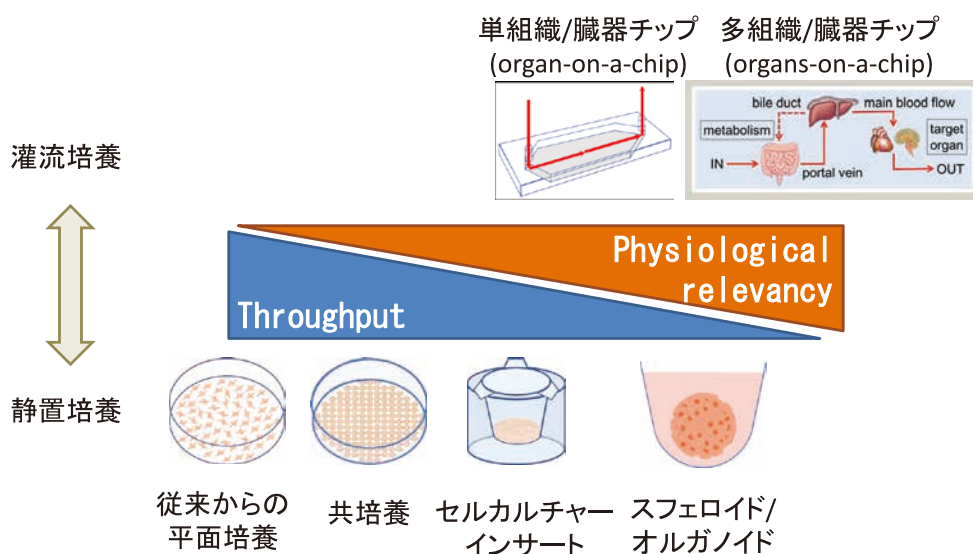


図1 in vitro培養系の分類

ら分類すると図1のようになる。スループット性は従来からの平面培養がやはり優れているが、生体機能を模倣するという点では限界がある。それらを両立させるために、生体を構成する複数の細胞を共培養する系や膜透過性を再現するセルカルチャーインサートの系などが開発されてきた。また、幹細胞からの分化誘導技術が開発されたことにより、組織分化の系譜をなぞることで三次元的なミニ組織をin vitroで構築する、オルガノイドの形成も可能になってきている。このような培養を行うことで、生体機能を高度に模倣することが可能になってきた⁶⁾。以上は、生物学的な側面からのin vitro細胞培養の生体模倣を目指す技術である。一方で、生体の中で見られる血流のような力学的効果を培養に取り入れて生体模倣を目指す、灌流培養も考えられている(灌流培養に対し、従来の培地が循環しない培養を静置培養と呼ぶ)。元々、灌流培養はバイオリアクターによる細胞の大量培養や人工臓器で検討されてきた技術であった。ところが微細加工技術を用いることにより、灌流培養はチップサイズでも可能になったため、ごく普通のインキュベーターがあれば灌流培養を行えるようになってきた。細胞の培養面で培地を灌流することで流れの効果を取り込むための培養器が構成の基本である。その一方でこれらの培養器を複数連結させることにより、複数の組織もしくは臓器間の連携を模倣することも可能である。従来これらは、それぞれ単組織/臓器チップ(organ-on-a-chip)、多組織/臓器チップ(organs-on-a-chip)と呼ばれているものである(図1)。

そもそもMPSとは何であろうか。近年、MPSの開発が進む中、米国食品医薬品局(FDA)から「生体模倣システム(MPS)は、ヒトや動物由来の特定の組織や器官の機能的特徴をin vitroでモデル化するために、その機能や病態に重要な生理学的側面を模倣した微小環境に細胞を曝露することによって、マイクロスケールの細胞培養プラットフォームを提供するもの。」⁷⁾という定義が提唱され、MPSの守備範囲が広範囲に広がったように感じる。一方で、Pfizer社のグループからは、「Complex in vitro Models (CVM)」⁶⁾という概念で従来からある培養ディッシュを用いた平面培養を除く培養系すべてがMPSである、という主張がされており、欧米の製薬企業が中心となり活動するIQコンソーシアムのMPS分科会ではこの理解が一般的になっているようである。しかし、このような細胞培養技術を広範囲に包含する定義では、論点がぼやけるため、本稿ではMPSを「組織臓器内の血液の流れをin vitroで模倣し、血流が細胞に及ぼす力学的影響と共に、細胞の栄養素や代謝老廃物、または薬剤などの物質移動の影響をin vitroで解明できる新規の灌流培養装置」という観点で扱ってみたい。

MPSに期待されているもの

03

では、MPSにより何を解明することが期待されているのだろうか。「新規」の培養装置という点において、従来の培養法では難しかった細胞アッセイ系としての用途(Context of Use:CoU)

が期待値であろう。一方で、MPSを利用する業界によって、当然ながらCoUが異なる点は注意を要する。筆者が今まで関わってきた分野を例に挙げると、化学物質の分野と医薬品分野では、CoUが異なっている印象である。

まず化学物質の分野では、ヒト健康影響評価の代替法の開発が大きな課題となっている。そのため従来の実験動物で行っていた評価項目に対して、いかにMPSというin vitro細胞アッセイが当てはまるかが、注目される点であろう。化学物質の分野における動物実験の代替においては、MPSは従来から用いられている試験法の延長線上に位置づけられると考える。すなわち、化学物質による有害事象をAOP(Adverse Outcome Pathway:有害性発現経路)に沿って解析した際、そこに含まれるkey event(遺伝子やタンパク、免疫系に生じる事象)の評価に有効な試験系がMPS開発に期待されるころではなからうか。もともとAOPが一連の有害事象をkey eventという細胞内の応答に還元していく考え方であるため、MPSに求められる性能も細胞全体より、注目する遺伝子やタンパク、免疫系など、細胞内で起こる個々の反応をいかに的確に評価できるかが、考慮する点になると考える。一種、組織や臓器、それを構成する細胞、というブラックボックスから、有害事象を惹起する分子生物学の反応を理解していくリバースエンジニアリングに似た視点からの開発が求められているともいえる。ただし、AOPによる有害事象の理解が進むことで、次のステップはkey event同士を繋いでいくこと、さらには、複数のAOPの連関を見る方向がみえてくる。Key event一つを再現するのが単組織/臓器チップであるとすれば、今後、それらをいかに連結していくか、言い換えれば、多組織/臓器チップに組み上げていくかが論点になってくるとと思われる。現在、IATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment:さまざまな情報(in vitro, in silicoなど)を統合して有害事象の評価をする手法)構築の一環として、化学物質の体内動態をdry simulatorの一種であるin silicoで予測するために各機関において議論されているが、MPSがwet simulatorとして用いられるようになる日が来るかもしれない⁸⁾。

次に医薬品分野におけるMPSへの期待は、開発品の体内動態を考慮した毒性評価や安全性評価、薬効評価である。これらの中でも特に、従来の手法では評価が難しかった項目(アンメットニーズ)を解決するための、新規細胞アッセイとしてMPSが期待されているであろう。医薬品の開発においては、化合物(開発品)を投与後、血流により体内に分布して組織/臓器に取り込まれ、どこどのような効果を示すかを細胞全体で評価することが望まれる。特に、今まで細胞アッセイでは難しかった薬効や毒性の判別、分子機構解析ができる細胞アッセイ系は“アンメットニーズ”に答えるものとして期待が高い。この場合、化合物が標的とする細胞応答だけでなく、化合物の細胞内への取り込みや細胞内での代謝、標的以外の細胞応答を含めた評価系である必要がある。そのため医薬品開発の場におけるMPS開発においては、組織/臓器らしい応答(我々はこれを「臓器らしさ」と呼んでいる)を評価できる、in vitro評価系が期待されているようである。

MPSに求められる性能と特徴

04

MPSに求められる性能と特長を説明するためには、まず物質がどのように体内へ取り込まれてどのように代謝され排泄されるかを知る必要がある。そこで体外から取り込まれた物質が体内を巡り、体外へと排泄される主な経路をまとめた様子を図2に示す。物質が体外から体内に取り込まれるためには、肺や小腸などの細胞膜を透過する必要があり、細胞膜を透過した物質は血流に乗って全身へ行き渡る。小腸から吸収された物質は門脈に乗り肝臓に入る。肝臓は、小腸門脈や肝動脈血内の物質を処理し、体内で利用できる分子に変換するか、不要なものは体外に排泄されやすい分子に変換したのち、全身の血流に戻す。一部の物質は胆汁とともに小腸へ戻り、糞便中に排泄される。また全身を巡る物質のうち、不要な物質は腎臓から尿中に排泄される。末梢に運ばれた物質は組織/臓器に分布する。この物質の体内の動きと組織/臓器の関係を物質の視点からまとめると、表1ようになる。すなわち、物質の取り込みや排泄の際に通過する小腸や血管のような組織(バリア組織)と、組織/臓器に取り込まれた物質を利用する実質細胞からなる組織(実質組織・臓器)の2種類に分けられる。それぞれの組織における機能の特徴を見てみよう。まずバリア組織では、物質透過の方向性が重要である。例えば、小腸粘膜上皮では腸管の管腔から血管へ、血管では血管内から組織/臓器へ、という物質の流れを保つために物質の取り込みと排泄が極性を持って行われることが必須である。このような極性を持つためには、それに関わる分子機構(例えばトランスポーター)が配向性をもつことや、細胞間隙からの漏れを防ぐために細胞—細胞

の接着(タイトジャンクション)が維持されていることは重要である。一方、実質組織・臓器では、化学物質への応答を惹起するさまざまな分子機構が細胞に備わっていることは重要である。また上記に加えて、化学物質を細胞内に取り込む機構が必要になる場合もある(例えば肝実質細胞における物質の取り込み機構)。

MPSはこれらの組織が有する機能を、in vitroで再構成しやすいようにさまざまな工夫がなされており、従来の培養器とは区別される利点である。代表的な例を、図3にまとめた。バリア組織MPSは、従来からあるセルカルチャーインサート培養器を発展させたものが基本である。例えば、A)では培地の流れが培養下面に限られるが、B)では細胞培養面の上下で培地の流れを持たせることにより、細胞を透過する前と後で物質(培地)のやり取りが容易になっている。以上の二つのバリア組織MPSは、細胞を透過性のある孔の空いた膜(トラックエッチング膜)の上に播種しているため、細胞が形成する膜における上下の透過率は膜自身の開孔率によって制限を受ける。その一方で、C)のバリア組織MPSはトラックエッチング膜よりも開口率の高いECM(Extracellular Matrix:細胞外基質)の界面に沿って細胞が膜を形成するため、物質交換の効率が低いのが特徴である。またD)の実質組織MPSは培地を灌流させることにより、流れによる刺激を細胞に与えることが可能となっている(後述)。

培地灌流の効果

05

冒頭でMPSの定義を議論した際、本稿でのMPSに付与されている機能として、「血流が細胞に及ぼす力学的影響」と「細胞の栄養素や代謝老廃物、または薬剤などの物質移動の影響」を挙げた。ここでは、培地を灌流する効果について触れてみたい。

培地を灌流することができるのはMPSの特徴であるが、培地(液体)に流れを持たせることで引き起こされる現象として、剪断応力と層流が挙げられる。MPSの培養器内における細胞の上面に培地が流れる際、培地は粘性のある液体であるため、培地と接する面にある細胞へ力を及ぼす(剪断応力)。このような剪断応力の影響は、生体内では血流と血管内皮の間でよく知られており、血流による剪断応力によって内皮細胞が流れ方向に配向し、物質の透過性や生理活性物質の生産能に対して影響を及ぼすことが報告されている。このような灌流がもたらす剪断応力の効果は従来の静置培養では期待できず、MPSがin vitroで再現できる特有の効果と言える⁹⁾。もう一つ、培地の灌流を行えることにより再現することが期待される生体環境の模倣として、肝臓の構造に見られるゾネーションがある。肝臓の類洞は、門脈から中心静脈に向かって肝実質細胞が並び、その間を門脈からの血液が流れている。門脈側からは肝動脈も流れ込んでおり、酸素や栄養に富んだ環境にある。一方で、中心静脈側へ向かうにつれて酸素は肝実質細胞に消費され、肝実質細胞からの老廃物や代謝産物が増えてくる。その結果、門脈側に位置する肝実質細胞と中心静脈側の肝実質細胞では環境が異なっており、実際、糖代

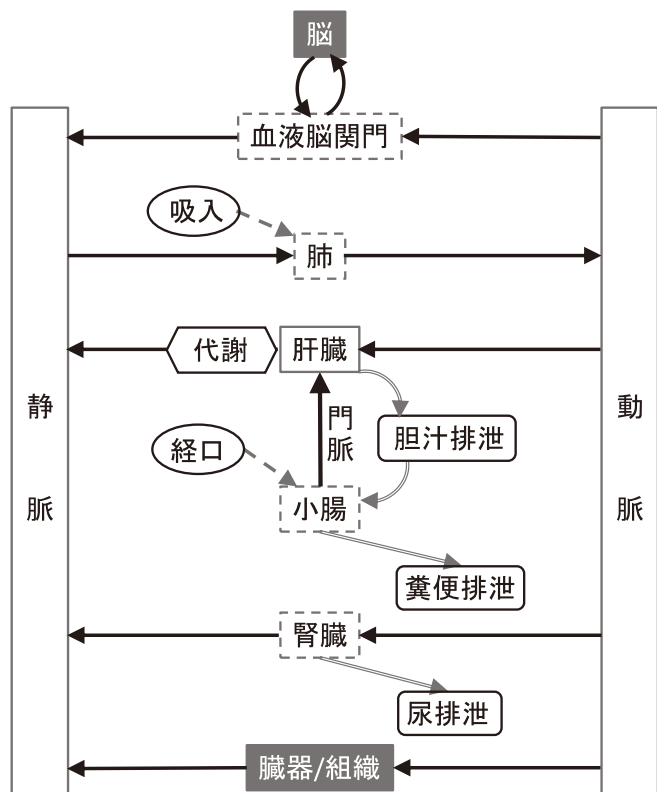


図2 体内における化合物の流れ

謝(糖新生、解糖)をはじめとする細胞機能に差異が生じている。また肝実質細胞に対する化合物の応答も類洞の位置により異なり、例えば四塩化炭素の毒性は中心静脈周辺に認められるということが知られている。そこで実質組織MPSのように閉じられた空間で液体をゆっくり流すと、乱流を生じず流れに沿って規則正しく流れる状態(この状態を「層流」という)を作ることができる。これを応用すると、上述した肝ゾネーションをin vitroで再現でき、肝障害の詳細な解析が可能になると期待される¹⁰⁾。

単組織/臓器チップ(organ-on-a-chip)から
多組織/臓器チップ(organs-on-a-chip)へ 06

冒頭でMPSの定義を議論した際に気づいた読者もいるかもしれないが、FDAの定義やPfizer社の提唱するCVMIは、どちらも単一の組織/臓器を想定して議論しているように思われる。元々、MPSは人体を模倣する培養系としてコンセプトが提案され、多組織/臓器を同時に培養する培養系の構築が目標であったが、構成する単組織/臓器の機能再現に注力する時代がしばらく続

き、MPSの解釈が冒頭のように広げられたように感じる。しかし、最近になり、単組織/臓器の培養系が技術的に成熟し始めると、また、多組織/臓器を連結させるMPSの開発が活発化する兆しが見えてきた。多組織/臓器を連結させる方法は色々と試行されているが、基本は図4に示すような、単組織/臓器チップを複数流路で連結したものである。先に行われたMPS World Summit (<https://mpsworldsummit.com/>)でも、複数の組織/臓器を連結させたorgans-on-a-chipの報告が多く見られた¹¹⁾。ただ、ここで注意しなければならないのは、「高機能の単組織/臓器チップを単純に連結させれば多組織/臓器チップが作れる」というほど、ことは単純でない。それぞれの単組織/臓器チップでは培養の至適条件が異なっているため、単純に単組織/臓器チップを連結し培地を循環させると、ほかのチップから流入してくる培地に含まれる因子が培養を阻害するといった事象が懸念される。実際、筆者の経験でも、2つの組織/臓器チップを連結することで、それぞれの機能が落ちてしまう、ということは経験している。この点は、培養条件や培養器の工夫だけでは解決が難しく、多組織/臓器チップに適した培地の開発が待たれるところである。

表1 臓器/組織のタイプ

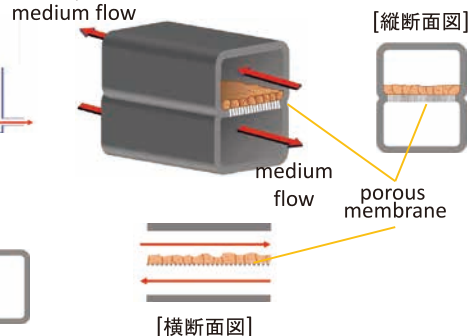
臓器/組織のタイプ(対応するMPS)	臓器/組織
バリア組織(バリア組織MPS)	小腸 肺 腎臓 血管 血液脳関門
実質組織・臓器(実質組織・臓器MPS)	肝臓 心臓 筋肉

バリア組織MPS

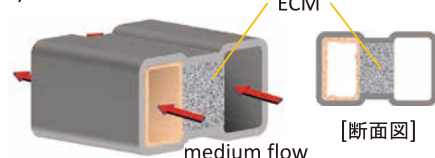
A) 平面灌流MPS



B) 膜上下灌流MPS



C) チューブ形成MPS



実質組織・臓器MPS

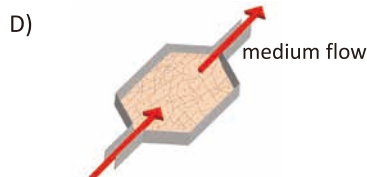


図3 バリア組織MPSと実質組織MPS

培養器か細胞か

07

今までの議論では、MPSという新規培養法について論じてきたが、実際のところMPSは培養器と細胞からなる細胞培養プラットフォームである。MPSの特徴である、培地の灌流を行うためには培養器の道具立てが重要なのは言うまでもないが、培養器のみで期待される「臓器らしさ」が構築できるわけではない。例えば、iPS細胞を分化誘導して得られる臓器細胞は幼若な細胞までの分化にとどまっているのが現状である。肝実質細胞でも、化合物の代謝活性が「肝臓らしさ」にとって重要な項目となっているが、iPS細胞由来肝実質細胞をMPSに搭載しても、期待する活性値は得られておらず、やはり細胞自体が高機能であることも重要である。その反面で、培地の灌流が可能でも、細胞培養面が通常の細胞培養ディッシュやセルカルチャーインサートと同じ、という培養器も散見される。このような培養器では、細胞の培養環境を構築するために、複数細胞の共培養により培養ニッチの再構築を試みている例も多いが、培養手技が複雑化する点を考慮すると必ずしも好ましくないように見受けられる。一方で、今日ではさまざまな三次元細胞培養基材が広く手に入る。特に日本はこの分野において多くの強みを持っている⁵⁾。今後、日本が得意とする三次元培養基材を搭載したMPSが開発されてくることを期待したい。

A) 単組織/臓器 MPS



B) 組織/臓器結合型 MPS



[上面図]

図4 単組織/臓器 MPSと組織/臓器結合型 MPS

が異なっても、系統を指定することで実験結果にかなりの再現性が担保されている。MPSで同様の試験を行う際は、細胞株として維持が可能な細胞を用いることが望まれる。医薬品分野でも、薬物動態や毒性試験においては、同様の状況が期待されると思われる。その点において細胞の規格化と維持が重要である一方で、薬物動態では人種差があることは広く知られている。このような場合、人種差を反映するMPSを揃えることができれば、薬物動態の評価に有用と考えられる。さらに個別化医療に至っては、患者ごとの特性を反映したMPSの構築が求められるようになってくる。またMPSを疾患の解析に応用することも当然ながら行われている。このような評価系においては、培養器は再現性のある培養環境を提供することが重要であり、細胞は患者個人の細胞や疾患モデルとなる細胞を用いることが必要になる。このような場合、患者個人や特定の疾患から樹立されたiPS細胞を目的とする臓器に分化誘導することが重要な技術要素となると考えられる。

MPS開発の流れ

09

最後に、今後の期待が大きいMPSの開発について、日米欧の公的な開発の状況を簡単にまとめておきたい。

MPSがin vitroで生体を模倣する技術ということで、バイオの技術としては珍しく、当初は表2と表3で示すように、アメリカよりも欧州での開発が先行していた。現在は、それぞれで独自のコンソーシアムが活発に活動している。それぞれの活動については、表4に挙げるURLを参照していただきたい。日本では、2017年より、経済産業省がバックアップしてAMED-MPSプロジェクトが行われた。現在、同プロジェクトの二期目がスタートしたところである。また、厚生労働省のバックアップによるAMED事業もこの4月からスタートしている(表4)。

おわりに

10

本稿では、MPSの新規in vitro細胞アッセイとしての開発を俯瞰的に論じてきた。個別の開発例は総説^{1, 2, 3, 4, 5)}を当たっていただきたいが、まだまだ開発途上の技術であり、多くの論文はProof of Conceptの域を出ていないものが多い。その一方で、最近の話題としては、Sanofi社がHEPEROS社のHuman-on-a-Chip[®]を用いて得られたデータを、FDAが臨床試験の承認資料として認めたという事例¹²⁾もある。この事例のようにMPSが実用化の域に入ってきている例も報告され始めている。MPSの捉え方に統一された見解がなくとも、新規in vitro細胞アッセイとしての技術開発は日々進歩している。本邦でも、厚生労働省や経済産業省がバックアップするAMEDプロジェクトがスタートしており、MPSの実用化に日本が立ち後れないように進むことを期待している。

個別化医療、疾患モデルとMPS

08

CoUを議論した際、MPSを適用する分野によっては、CoUが大きく異なることを論じた。ここでは、CoUによりMPSの使い方が異なってくることを搭載する細胞の背景から論じてみたい。

化学物質の分野では、ヒト健康影響評価のlegacy dataは実験動物を用いた病理試料である。ここでは、遺伝的バックグラウンドがコントロールされた実験動物が使われており、たとえ実験施設

表2 米国における公的機関の活動

年	組織	活動
2010	IQコンソーシアム	IQコンソーシアム設立
2012	DARPA	MPSプログラム開始→2019年終了
2012	NCATS	Tissue Chip Programを設立
2017	FDA	"FDA's Predictive Toxicology Roadmap"を公表(毒性予測の新技术としてMPSが筆頭)
2018	IQコンソーシアム	Affiliated GroupとしてIQ MPS設立
2020	IQコンソーシアム	Lab on a Chip誌でMPS特集を発刊
2020	FDA	Alternative Methods Working Group (WG)を組織
2021	FDA	Alternative Methods WGが"Advancing New Alternative Methodologies at FDA"を公表

表3 欧州における公的機関の活動

年	組織	活動
2011	KNAW	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW, オランダ王立芸術科学アカデミー)が資金提供してCrossing BordersのプログラムでOoCの開発に着手
2015	hDMT	オランダで欧州の産学官連携コンソーシアムである Human Organ and Disease Model Technologies (hDMT)設立 (欧州初のOoCコンソーシアム)
2017	ORCHID	2014年から開始されたHorizon 2020の中で Organ-on-Chip In Development (ORCHID)のプロジェクトが開始→2019年終了
2018	EUROoCS	ORCHIDの活動の一環として、European Organ-on-Chip Society (EUROoCS)が設立
2020	Moore4Medical	電子医療機器のイノベーション促進のため、企業を中心としたコンソーシアムが設立

表4 公的活動組織の資料入手先

地域	組織	URL
米国	DARPA	https://www.darpa.mil/attachments/MPS_Layout_Final.pdf
	NCATS	https://ncats.nih.gov/tissuechip/projects
	FDA	https://www.fda.gov/media/109634/download
	FDA	https://www.fda.gov/media/144891/download
	IQ コンソーシアム	https://iqconsortium.org/
	IQ MPS Affiliate	https://www.iqmps.org/
欧州	hDMT	https://www.hdmt.technology/
	hDMT	https://digitaalpubliceren.com/hdmt/18283/
	EUROoCS	https://euroocs.eu/about-us/
	Moore4Medical	https://moore4medical.eu/
	Moore4Medical	https://www.dos4ever.com/M4M/WP2.pdf
日本	AMED-MPS Project	http://www.scetra.or.jp/business/
	AMED「再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業」	https://www.amed.go.jp/koubo/13/01/1301C_00018.html
	AMED「医薬品等規制調和・評価研究事業」	https://www.amed.go.jp/koubo/11/03/1103C_00013.html

参考文献

- S. W. Baran, P. C. Brown, J. E. Ekert, et al. Perspectives on the Evaluation and Adoption of Complex In Vitro Models in Drug Development: Workshop with the FDA and the Pharmaceutical Industry (IQ MPS Affiliate). ALTEX. 2022, 39, 2.
- U. Marx, T. Akabane, A. Roth, et al. Biology-inspired microphysiological systems to advance patient benefit and animal welfare in drug development. ALTEX. 2020, 37, 3, 365-394.
- D. E. Ingber. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. Nat. Rev. Genet. 2022, 23, 467-491.
- K. P. Van Ness, F. Cesar, E. J. Kelly, et al. Microphysiological systems in absorption, distribution, metabolism, and elimination sciences. Clin. Transl. Sci. 2022, 15, 9-42.
- S. Ishida. Research and Development of Microphysiological Systems in Japan Supported by the AMED-MPS Project. Front. Toxicol. 2021, 29, 3.
- A. K. Kopec, R. Yokokawa, J. E. Burkhardt, et al. Microphysiological systems in early stage drug development: Perspectives on current applications and future impact. J. Toxicol. Sci. 2021, 46, 99-114.
- The U.S. Food and Drug Administration. Advancing Alternative Methods at FDA. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2021, Jan.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidance document on the characterisation, validation and reporting of Physiologically Based Kinetic (PBK) models for regulatory purposes. OECD Series on Testing and Assessment. 331.
- K. Hattori, Y. Munehira, T. Kanamori, et al. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. J. Biosci. Bioeng. 2014, 118, 3, 327-332.
- X. Li, S. M. George, D. L. Taylor, et al. A glass-based, continuously zoned and vascularized human liver acinus microphysiological system (vLAMPs) designed for experimental modeling of diseases and ADME/TOX. Lab Chip. 2018, 18, 17, 2614-2631.
- K. Ronaldson-Bouchard, D. Teles, G. Vunjak-Novakovic, et al. A multiorgan chip with matured tissue niches linked by vascular flow. Nat. Biomed. Eng. 2022, 6, 351-371.
- National Institutes of Health. Researchers create 3-D model for rare neuromuscular disorders, setting

キーワード解説

in vitro

試験管などの培養器内において生体組織を用いて人工的に生体を模倣した環境のこと。生体内での環境であるin vivoと比較して使用されることが多い。

MPS(Microphysiological Systems): 生体模倣システム

in vivoに近い環境をマイクロスケールで再現するin vitro培養系のこと。しかし近年ではMPSの解釈や定義が拡大、変更されており、マイクロスケールでないin vitro培養系もMPSとして説明されている場合がある。詳細は本誌の横川教授と石田教授が解説されているのでそちらを参照頂きたい。

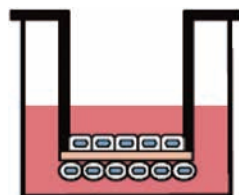
ビトリゲル*

農業生物資源研究所(現:農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門)の竹澤グループ長らが開発した、ハイドロゲルをガラス化および再水和することで作製した素材。このうち、コラーゲンゲルから作製したものをコラーゲンビトリゲル®と言い、再生医療用材料、薬物送達システムの担体、および、三次元培養に適した細胞培養担体としての応用研究が進展している。

ad-MED ビトリゲル® シリーズ

特徴

- 1 コラーゲン素材 → インサート底面がコラーゲンビトリゲル®膜
- 2 良好な視認性 → 低自家蛍光かつ高透明性
- 3 両面培養が可能 → コラーゲンビトリゲル®膜を境に共培養が可能



両面培養

※両面培養を行う際は、別売のオプションリングが必要になります



製品の詳細はこちらです

※「ビトリゲル」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構による登録商標です。
ad-MEDビトリゲル®は、農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト(ビトリゲル®)」の支援を受けて、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構と共同で開発されました。

当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL
<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL
<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail: chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者: 湯浅 隆秀

2022年10月発行