

抗がん剤の副作用を生体外で再現するデバイス 「ボディ・オン・チップ」の開発に成功

京都大学 高等研究院 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の亀井謙一郎 (かめい・けんいちろう) 特定拠点准教授と工学研究科マイクロエンジニアリング専攻の田畑修 (たばた・おさむ) 教授、平井義和 (ひらい・よしかず) 助教らの研究グループは、微細加工技術を駆使した生体外ヒトモデル「ボディ・オン・チップ」の開発に成功しました。この大きさわずか数センチメートルのチップは、患者や健常者などに頼ることなく薬の効能・効果や毒性を評価できるデバイス技術であり、現在、前臨床試験で行われている動物実験の問題点を克服できる新しい試験法となることが期待されます。

現在、抗がん剤などをはじめとする新しい医薬品開発には多くの困難が伴い、巨額の費用と長い時間が必要です。その原因の中でも特に問題とされているのが、前臨床試験です。ヒトで臨床試験を行う前の前臨床試験では、実験動物を用いた薬効評価・毒性評価試験などが行われています。しかしヒトと異なる反応を示すことが多く、臨床試験における薬効や毒性の予測を難しくしています。また、実験動物を使うことは、動物愛護・倫理的な観点からも問題となっています。そこで、薬剤に対してよりヒトに近い反応を再現でき、しかも動物実験を行わずに済むような、新しい試験法の開発が重要となっています。

本研究グループは、マイクロメートル (ミリメートルの 1000 分の 1) ほどの非常に小さいものを高精度に加工することができる微細加工技術を応用した「マイクロ流体デバイス^{*1}」に着目しました。このデバイス技術を用いれば、ヒトの体の中における血管網や組織の模倣ができます。このデバイス上に、ヒト由来のがん細胞と正常な心筋細胞を搭載し、組織間を接続できるようにしました。直接心筋に与えても毒性のない抗がん剤を、このがん細胞に投与すると、がん細胞が死滅するとともに、その時にできる代謝物が心筋細胞に到達し、ダメージを与えていることが確認されました。

今回の研究で、これまでの細胞培養プレートなどでは再現が難しかった抗がん剤の心臓における副作用を、デバイス内で再現することに成功しました。これは、チップ上で複数の組織を接続し、相互作用の確認に成功した世界で初めての例です。これがヒトの体外における薬剤反応を模倣したモデル「ボディ・オン・チップ」であり、私たちはこのデバイスが新しい「ヒトモデル」として機能することを実証しました。

本成果は日本時間2017年7月25日未明に科学誌「RSC Advances (アール・エス・シー・アドバンス)」オンライン版で公開されました。

1. 背景

現在、私たちの周りには多くの「医薬品」があり、病気の治療や健康寿命の延伸など、生活や命に深く関わっていることは言うまでもありません。しかし、新しい医薬品の開発は重要な局面を迎えています。というのも、一つの新しい薬を開発するためには数百億円を必要とし、また10年以上の長い期間を必要とするからです。さらに全ての医薬品開発が成功するわけではもちろんなく、非常に低い成功率も問題となっています。

医薬品開発では、候補となる化合物が認可されて市場に出るまでに多くの段階を踏む必要があります。開発の最終段階である臨床試験では、実際にヒトに医薬品候補物を投与し薬効や副作用などを評価しますが、多くはこの段階で予期せぬ効果が現れ、試験が中止に追い込まれることが頻発しています。つまり医薬品開発の課題を解決するためには、その前段階である前臨床試験の改善が必要です。

薬効・毒性を詳細に検討する前臨床試験では、主にマウス・ラット・サルなどの実験動物を用いています。当然これらの動物はヒトとは異なる生体構造・生理反応機構を有しているため、医薬品がヒトとは異なる反応を示すことも少なくありません。すなわち、これまでの前臨床試験ではヒトに対する正確な情報を得ることが難しいため、後の臨床試験で失敗に至るのです。そのためヒトの生理学反応を生体外で再現する新しい試験法が開発が早急に求められています。

世界各国で研究・開発が盛んに進められている中、特に微細加工技術を基にしたマイクロ流体デバイスを用いた単一臓器モデル「Organ on a Chip（組織チップ）^{※2}」が注目されています（図1）。このOrgan on a Chipはわずか数センチメートルの大きさのチップ内に肺や肝臓などの組織の構造を模倣してモデル化するとともに斬新なアプローチであり、従来の細胞培養プレートなどでは再現できなかったような組織機能を発現することができます。既に、米国ハーバード大学ウイズ研究所のIngber教授は2010年に肺の構造と機能を模倣した「Lung on a Chip（肺チップ）」を開発し、生体外における肺気腫の再現に成功しています。このように、実験動物やヒトなどの生体を用いることなく、生体組織・機能を模倣し医薬品開発などへの応用が期待されることから、昨年（2016年）の世界経済フォーラム^{※3}においても、次世代バッテリーや自動運転車などと合わせて「Top 10 Emerging Technologies（10大新興技術）^{※4}」にも選ばれており、その重要性と期待はますます大きくなっています。

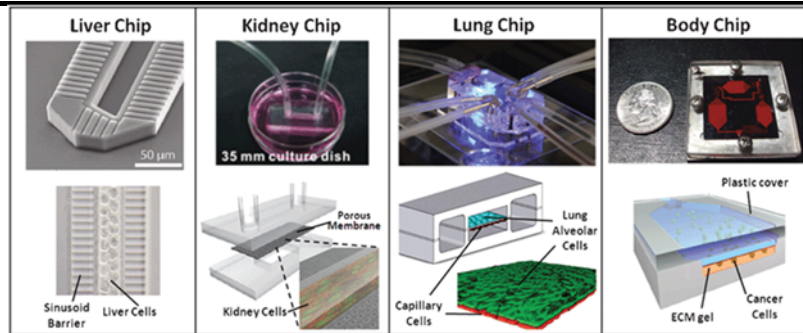


図 1 近年着目されている単一臓器モデル「Organ on a Chip(組織チップ)」(Huh et al., *Lab Chip*, 2012, 12, 2156-2164 から引用)

しかし、その Organ on a Chip では再現が困難な生体现象なども指摘されています。単一臓器モデルであるため、例えば、組織が放出する物質（代謝産物^{※5}や成長因子^{※6}など）が血管を通して他の臓器に与える影響（臓器間相互作用）を再現できません。近年では、数種類の単一組織チップを細いチューブで連結したモデルも報告されていますが、その連結法に課題があり正確な実験・測定が困難とされています。

2. 研究内容と成果

そこで本研究では、これらの問題点を解決するために、複数の組織を一つのデバイス内で連結する新しい技術「Body on a Chip (ボディ・オン・チップ)」の開発を目的としました(図2)。特に本研究での実証実験として、従来の細胞培養実験では困難であった、抗がん剤の心臓における副作用を生体外において再現する生体外ヒトモデルの開発に取り組みました(図3)。

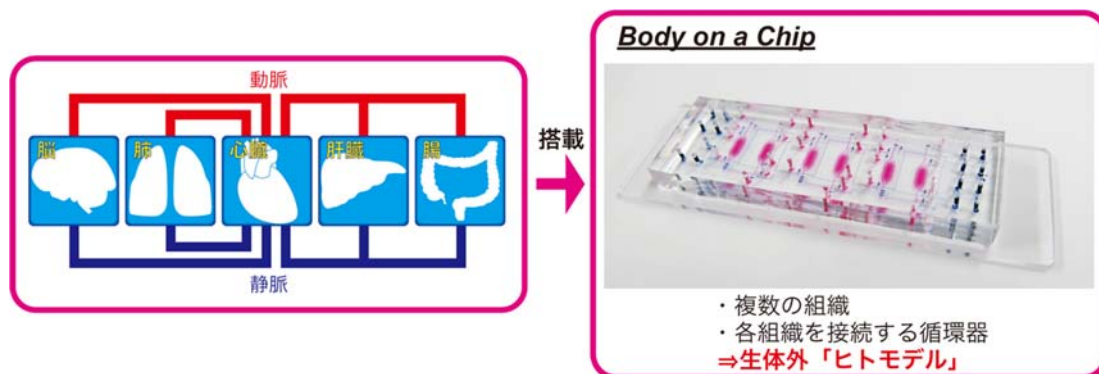


図 2 「Body on a Chip(ボディ・オン・チップ)」の概念図。ヒトの組織・循環器などをわずか数センチメートルの大きさのデバイス内に搭載し、ヒトにおける生理反応を模倣、生体外「ヒトモデル」となるデバイス。

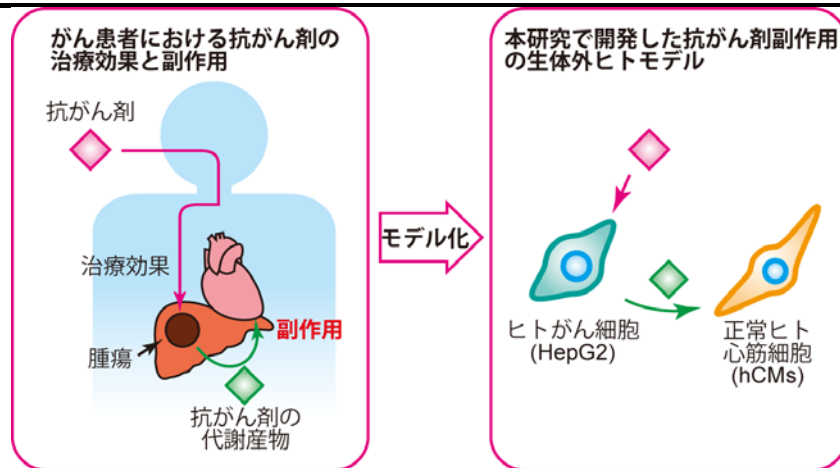


図 3 本研究で提唱する「Body on a Chip」の実証実験として、抗がん剤の心臓への副作用をモデル化した。

私たちがこのモデルを開発するための仮説として、抗がん剤の副作用は①がん細胞が抗がん剤を代謝、②その代謝産物が正常な心筋組織に循環器を通過して到達、③代謝産物による心筋細胞へのダメージ、という段階を経た反応に起因する、としました。その仮説のもと、Body on a Chip を構成する組織細胞として、正常細胞であるヒト心筋細胞 (hCMs)、がん細胞であるヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を使用しました。この様に、正常な心筋細胞とがん細胞を2種類の細胞を単一デバイスに搭載したので、本モデルを「Integrated Heart/Cancer on a Chip (iHCC: 心筋・ガン統合チップ)」と名付けました (図4)。また、抗がん剤としてドキソルビシン (DXR) を用いました。

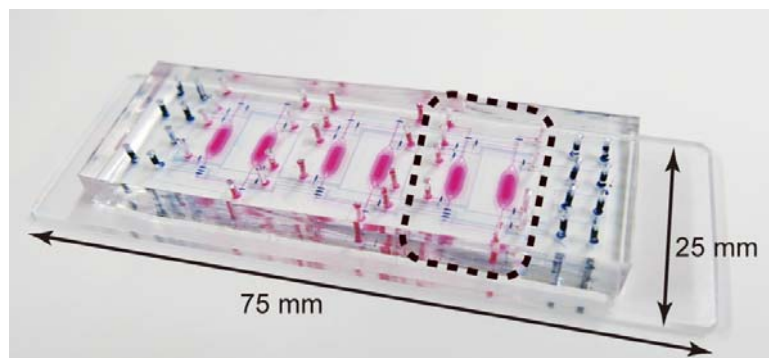


図 4 Integrated Heart/Cancer on a Chip (iHCC)の実物写真

この iHCC の構造材料として、生体適合性が高く、ガス・光透過性も高いポリジメチルシロキサン (PDMS)^{*7} を使用しました。さらに、iHCC 内に小さなバルブと循環用マイクロポンプを図5左図のように配置することによって、①各組織細胞を個別に導入、②必要に応じて各組織間を接続、③マイクロポンプにより薬剤を含んだ培養液を循環、することが可能となりました。また、私たちが独自に開発したフォトリソグラフィ^{*8} を応用した立体加工技術によって、高性能なバルブとマイクロポンプをチップ内に集積化することに成功しました (図5右図)。これによりデバイス内の薬剤や代謝物を含んだ培養液のサンプル損失量が少なくなるのと同時に、これまでより送液量を厳密に制御できるようになり、より正確に臓器間相互作用を評価することを可能にしました。

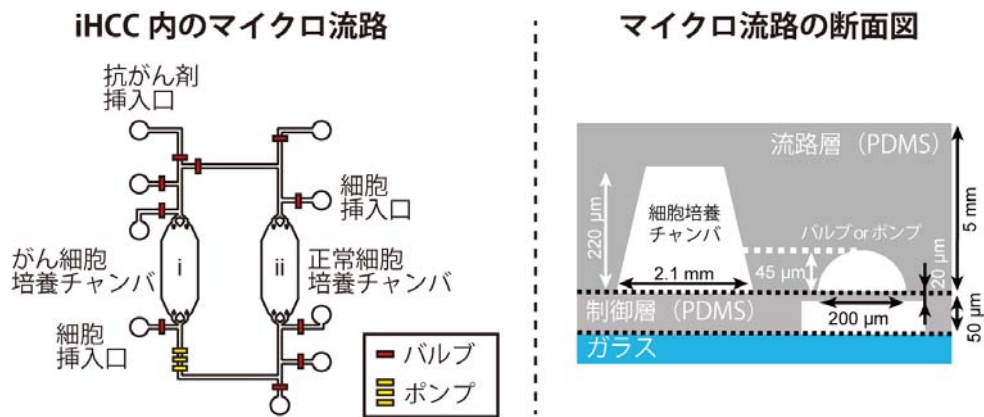
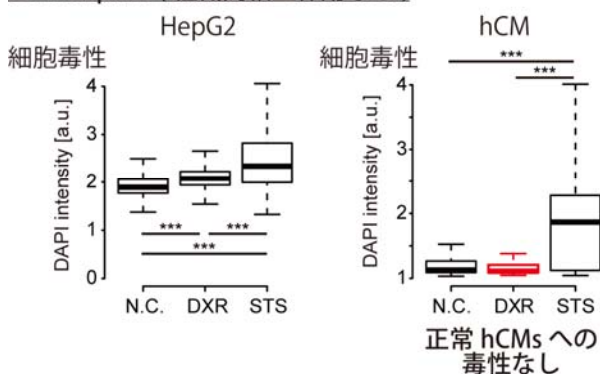


図 5 iHCC 内のマイクロ流路(左)とその断面図(右)。マイクロ流路には細胞培養チャンバ・バルブ・循環用ポンプを搭載している。また、右図に示すように iHCC は 2 層の PDMS から構成されており、複雑かつ厳密な実験操作を可能にしている。これらのバルブ・マイクロポンプは PC 接続によりプログラム制御されている。

iHCC の対照試験として、従来から細胞培養・薬剤試験などで使用されている 96 ウェルプレートを使った単一組織細胞への DXR 曝露試験を行いました。このプレートでは各組織細胞は個別に培養するため、細胞からの放出物質を介した組織間相互作用を評価することはできません。その結果、DXR の薬効を意味するがん細胞 HepG2 の死滅効果は確認できましたが、正常細胞 hCMs への毒性はありませんでした(図 6)。一方で iHCC を用いた DXR 曝露試験を行ったところ、HepG2 の死滅効果とともに hCMs への細胞ダメージも確認することができました。このように、個別で培養したときと、DXR を iHCC 内で循環したときでは、hCMs に対する細胞ダメージが異なることが実証されました。

96-well plate (組織間相互作用なし)



iHCC (組織間相互作用あり)

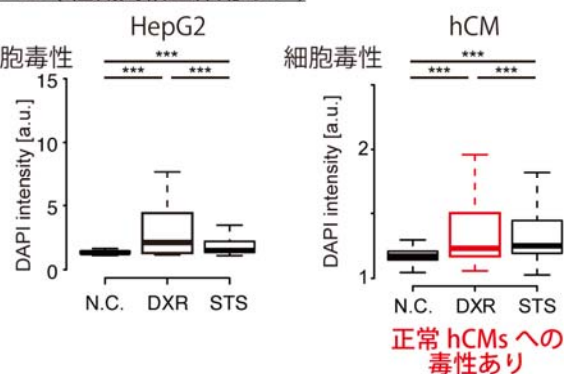


図 6 DXR による HepG2 がん細胞と正常心筋細胞 hCMs への細胞毒性。各細胞を個別に培養する 96 ウェルプレート(右図)では、HepG2 においてのみ DXR の毒性が確認できたが、組織間相互作用がある iHCC では HepG2 と hCMs 共に DXR の細胞毒性が確認できた。

この hCMs へのダメージは、HepG2 細胞における DXR の代謝産物ドキシソルビシノール (DXRoI) が、マイクロポンプを使った循環灌流により hCMs に到達したことに起因すると考えられます。そこで、各

細胞における DXRoI の産生量と、その毒性について評価しました (図7)。その結果、仮説どおり HepG2 において DXR を基質として DXRoI が産生され (図7左図)、その DXRoI が HepG2 ではなく hCMs にも毒性を示すことが確認できました (図7右図)。

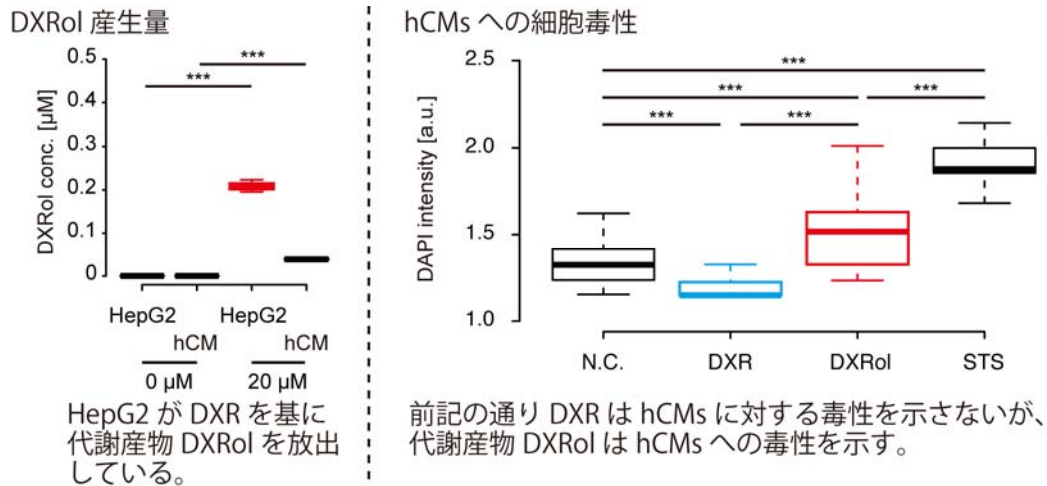


図7 HepG2 と hCMs の DXRoI 産生量と、それによる細胞毒性。DXR を 20 μM 曝露した HepG2 から DXRoI が産生されることが確認できた。また、DXR ではなく DXRoI のみが hCMs において毒性を示すことが確認できた。

これらの結果から、本研究で開発した iHCC は代謝物の循環により臓器間における相互作用を再現することができ、従来法では困難であった抗がん剤の副作用の生体外における再現を実証することができました。

3. 今後の展開

本研究では、複数の組織を単一チップに搭載した生体外ヒトモデル「Body on a Chip (ボディ・オン・チップ)」の開発に成功しました。更に、このモデルを用いることで、従来の細胞培養・実験法では困難であった、抗がん剤副作用の生体外における再現を可能としました。これは従来の単一組織モデル「Organ on a Chip (組織チップ)」とは違い、生体内における組織間相互作用を生体外で再現できるチップです。今後、薬剤開発や化学物質全般の有害性・毒性試験などへの応用が期待されます。

また、このような「生体外ヒトモデル」は、実験動物使用の抑制へ貢献できると期待されます。近年、世界中において動物愛護・倫理的な観点から実験動物の使用を抑制、場合によっては禁止、という動きになっています。例えば EU では、化粧品開発時における実験動物の使用は既に禁止されています。そこで、本研究のように、実験動物を使用せず、ヒトの生体外におけるモデル化を可能とする技術の開発が熱望されているのです。

さらにヒト ES/iPS 細胞^{※9}などを用いることによって同一の細胞を由来とする各種組織細胞を準備することによって、同一遺伝子を持った細胞から構成される「Body on a Chip」の開発も可能となります。将来的には、患者自身をモデル化し「個別化医療」の実現へと貢献できると期待されます。実現化には、数多くの研究・技術開発などが必要であり、また産官学の密接な連携も必要となります。本研究を通して、Body on a Chip 実現化へと向けた活動がより活性化されることを期待します。

4. 用語解説

- ※1 **マイクロ流体デバイス**：微細加工技術を応用して作製されたデバイス。化学物質の合成や分離などで利用されるだけでなく、微小空間における物理現象を研究するためにも使用される。近年では、極微量のサンプルなどから遺伝子増幅・解析が可能なデバイスなども開発されている。
- ※2 **Organ on a Chip (組織チップ)**：組織構造を模倣したマイクロ流体デバイス中で培養組織細胞を培養し、従来の細胞培養フラスコでは困難だった組織機能発現を可能にするデバイス。既に、肺、肝臓、腎臓、小腸、脳閥門などを模倣したOrgan on a Chipが報告されている。医薬品開発の新しい実験法として、世界中から注目されている。
- ※3 **世界経済フォーラム**：政治やビジネス、アカデミアなどの様々なリーダーが集まり、世界情勢を改善に取り組む国際機関。非営利団体。スイス ジュネーブに本部を置く。
- ※4 **Top 10 Emerging Technologies (10大新興技術)**：世界経済フォーラムにおいて提唱される、世界的に開発・実用化が強く望まれている技術。2016年は「Organs on Chips」以外にも次世代バッテリーや自動運転車、グラフィンなどの2次元材料などが挙げられている。
- ※5 **代謝産物**：細胞などがその維持や機能発現のために、無機物や有機化合物を用いて行う一連の反応（代謝）から生成された物質、及びその中間体。
- ※6 **成長因子**：生体内において、細胞の増殖や分化などの機能制御に関わるタンパク質群の総称。
- ※7 **Polydimethylsiloxane (PDMS)**：生体適合性が高く、ガス・光透過性も高いシリコンゴム。マイクロ流体デバイス作製に広く使用されている。
- ※8 **フォトリソグラフィ**：感光剤（フォトレジスト）を塗布したシリコンやガラス基板に、原板となるパターンを紫外線などの光放射で照射し、露光させ、マイクロ流路や細胞培養チャンバなどのパターンを生成する技術。半導体回路を形成するフォトリソグラフィは微細化を求めるのに対して、本研究では厚さ数十マイクロメートル以上（1マイクロメートルは1/1000ミリ）のフォトレジストを高精度に立体成形する加工技術に取り組んでいる。
- ※9 **ヒトES/iPS細胞**：ヒト由来の胚性幹細胞（embryonic stem cell）と人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）の略。生体外における無限回の自己複製能と、あらゆる組織細胞へと分化が可能な、特徴的な性質も持っている。そのため、再生医療や創薬への実用化が期待されている。ヒトiPS細胞は、本学山中教授、iPS細胞研究所所長によって開発され、その誘導機構の発見から、2012年にジョン・ガードン ケンブリッジ大学名誉教授と共にノーベル賞が授与された。

5. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金（挑戦的萌芽 研究代表 亀井謙一郎 課題番号 24656502；挑戦的萌芽研究代表 亀井謙一郎 課題番号16K14660）、公益財団法人テルモ生命科学芸術財団 特定研究助成、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム、文部科学省 WPIプログラムの支援を受けて行われました。

6. 論文タイトル・著者

“Integrated Heart/Cancer on a chip to reproduce the side effects of anti-cancer drugs *in vitro*”



Ken-ichiro Kamei^{a,*}, Yoshiki Kato^b, Yoshikazu Hirai^{a,b,*}, Shinji Ito^c, Junko Satoh^c, Atsuko Oka^c, Toshiyuki Tsuchiya^d, Yong Chen^{a,d} and Osamu Tabata^b

^a. Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

^b. Department of Micro Engineering, Kyoto University, Kyotodaigaku-Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 616-8540, Japan.

^c. Medical Research Support Center, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

^d. École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 8640 PASTEUR, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

RSC Advances | DOI: 10.1039/c7ra07716e

*は本研究全般に関する責任著者

7. iCeMS について

京都大学 高等研究院 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点 (WPI) プログラム」に平成 19 年度に採択され、平成 29 年にはその研究水準および運営が世界トップレベルであるとして、「WPI アカデミー拠点」に認定された研究拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動している日本で唯一の研究所です。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>