

[研究助成 (A)]

生体外ヒト疾患モデルの高い再現性を実現する
細胞バリア機能計測技術の開発Development of accurate cell barrier function measurement technology for *in vitro* human disease model

2221024



研究代表者	京都大学 大学院工学研究科	講 師	平 井 義 和
共同研究者	京都大学 高等研究院物質-細胞統合システム拠点	客員准教授	亀 井 謙一郎

[研究の目的]

手のひらサイズのマイクロ流体デバイスで複数の臓器細胞をマイクロ流路と循環ポンプで連結した「ボディ・オン・チップ (BoC: Body on a Chip)」は、ヒト体内と同様の臓器間相互作用を部分的に発現できることが実証されてきた。その相互作用の結果を可視化するためには、一般的に細胞工学的イメージング（蛍光標識）が用いられるが、近年は試験中に「非標識・リアルタイム計測可能な技術」へのニーズが増加している。そこで本研究は、未だ不明点が多い非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) の理解に向けた「小腸-肝臓モデル」の BoC を構築する。また細胞バリア機能（細胞間の密着結合）の評価指標である「経上皮電気抵抗値 (TEER: Trans Epithelial Electrical Resistance)」を BoC で正確に計測できるセンサ技術を開発することで、疾患機序の解明に向けたセンサ搭載型 BoC の構築を目指す。

[研究の内容, 成果]

1. 腸・肝連結臓器チップの開発

マイクロ流体デバイス技術によって細胞の微小環境を時空間的に制御し、ヒトの臓器機能や生体システムを生体外で模倣する「生体模倣シ

ステム (MPS: Microphysiological Systems)」が世界的に注目されている。なかでも、異なる臓器細胞を培養した細胞培養チャンバ間をマイクロ流路で接続して細胞培養液をポンプによって循環させることで、従来のマイクロウェルを使った細胞培養法では難しい血液循環による臓器間相互作用を再現した BoC は、新薬開発のプラットフォームのみならず、疾患メカニズムを解明するための革新的なツールとして期待されている。そこで我々の研究グループでは、世界的に患者数が増加傾向にある非 NAFLD の疾患メカニズムについて、BoC を駆使して解明することに挑戦している。NAFLD は、肝脂肪症、肝硬変、がんなどにつながる慢性肝疾患であり、重度の肝疾患患者の治療には肝移植が唯一の方法であるものの、患者に適したドナーを見つけることが非常に困難となっている。

本研究は、NAFLD の発症と進行に最も重要な要素の一つであると言われている腸と肝臓の相互作用「腸-肝臓軸 (GLA: Gut-Liver Axis)」に着目した (図 1)。NAFLD における GLA を研究するために、腸肝連結プラットフォームと呼ばれる小腸・肝臓連結臓器チップを開発した (図 2)。このマイクロ流体デバイスをベースとする腸肝連結プラットフォームは、ガス透過性、生体適合性、透明性の高いシリコン樹脂である PDMS (Polydimethylsiloxane) をソフトリソグラフィと呼ばれる成形加工技術で作製する。

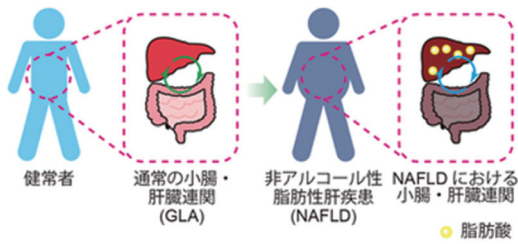


図1 腸肝軸と非アルコール性脂肪性肝疾患

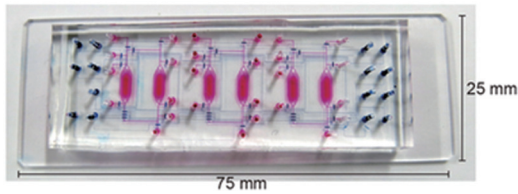


図2 ソフトリソグラフィで作製した小腸・肝臓連結臓器チップ (2層構造, 赤色: 灌流層, 青色: 制御層)

デバイスは、小腸・肝臓細胞を培養するための灌流層と、細胞培養液の流れを制御するための制御層などで主に構成される。マイクロバルブやポンプを搭載して、デバイス内の細胞培養液の流れや細胞培養チャンバへの個別のアクセスを制御する。

図2に示す小腸・肝臓連結臓器チップの灌流層には、マイクロ流路（幅：200 μm 、高さ：45 μm ）で接続された2つの細胞培養チャンバ（幅：2.1 mm、高さ：220 μm ）を設計した。制御層には、PDMS 薄膜（大きさ：200 μm × 200 μm 、厚さ：20 μm ）で形成された圧力駆動型マイクロバルブとポンプを設計した。圧力駆動型マイクロポンプは、制御層のマイクロ流路から PDMS 薄膜に圧縮空気による圧力を印加すると PDMS 薄膜がドーム状に変形し、灌流層のマイクロ流路を封鎖する「バルブ機能」を利用する。この PDMS 製マイクロバルブを3つ組み合わせ、駆動する順番と時間を制御することで、デバイス内の循環灌流を精密に制御できる。マイクロポンプをデバイス内に集積することで培養液のデッドボリュームが少なくなるため、微小空間での生体システムをより正確に再現できる。作製した小腸・肝臓連結臓器チップを用いて、細胞培養チャンバに小腸細胞

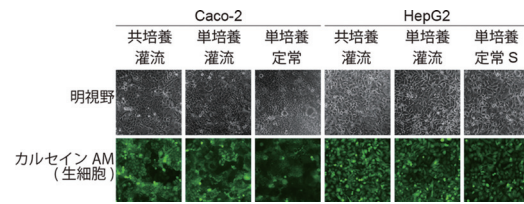


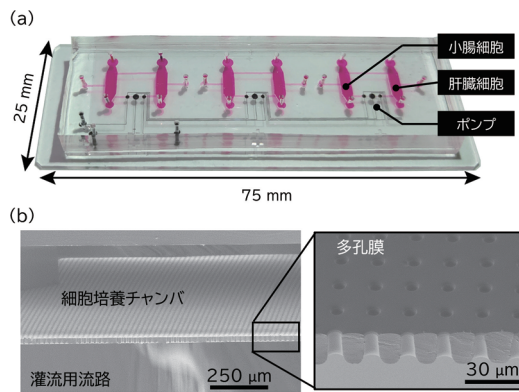
図3 小腸・肝臓連関の再現と生存率評価

(Caco-2 細胞) と肝実質細胞 (HepG2 細胞) をそれぞれ個別に導入し、続いて細胞培養液をマイクロポンプで循環して共培養した (図3)。

まず、従来法のウェルプレートで培養した Caco-2 細胞の機能化には、21 日間程度の培養が必要であったが、腸肝連結プラットフォームの循環灌流条件下では、7 日間で機能を発揮することが確認できた。また、培養液を循環することによって、HepG2 細胞の生存率は変わらなかったものの、Caco-2 細胞の生存率は向上することを確認した。さらに共培養下の HepG2 細胞は、単培養と比較してアルブミンの発現が増加したため、肝機能が向上していることが観察された。したがって、腸肝連結プラットフォームにおける循環灌流は、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の両方にとって従来の生体外細胞培養法よりも良い組織機能発現に適した環境を実現できることが示された。

さらに生体外における GLA の再現を試みた。NAFLD を誘引することで知られる遊離脂肪酸 (FFA: Free Fatty Acid) を投与することで、初期および進行性 NAFLD を表した細胞状態 (例: 細胞内脂質貯蔵) を誘導した。より具体的には、小腸細胞、肝臓細胞ともに遊離脂肪酸投与による脂肪酸の蓄積を確認し、流体デバイス内で共培養することで GLA による細胞死誘導への抵抗性が向上したことを確認した。さらに RNA シーケンス法による全 mRNA 発現を解析した結果、遊離脂肪酸がアルブミン発現などの肝臓細胞における肝機能へ影響するだけでなく、小腸細胞・肝臓細胞の共培養による遊離脂肪酸の細胞周期や代謝活性への効果を確認した。

本研究では、ヒト体内の GLA をさらに高度



(a) 全体、(b) 細胞培養チャンバと多孔質膜の電子顕微鏡で観察した断面写真

図4 多層ソフトリソグラフィで作製した小腸・肝臓連結臓器チップ（多層構造、赤色：細胞培養チャンバ、および灌流用流路、黒色：ポンプ制御流路）

に再現する BoC として、細胞培養チャンバと循環灌流チャンネルが PDMS 製の多孔膜で仕切られた多層構造の BoC も構築した（図 4）。当該デバイスでは、各細胞培養チャンバにおいて、機械的刺激（せん断力）による小腸細胞と肝臓細胞の機能発現を制御し、かつ多孔膜による細胞膜の物質透過を再現できる構造を設計した。この BoC で炎症性腸疾患を誘導するリポポリサッカライドを小腸細胞にのみ添加すると、小腸・肝臓細胞の誘導性一酸化窒素合成酵素の発現増加を確認でき、小腸炎症時における肝臓との相互作用と炎症発症機序の解明に BoC が有用であることを実証した。

2. トポロジー最適化を用いた TEER 電極設計法

BoC の細胞培養チャンバ内での細胞の状態をリアルタイムかつ非侵襲的に計測できるセンサがオンチップ化できると、試験結果の評価や解析の信頼性がさらに向上すると予想され、その技術開発が世界中で進んでいる。例えば、細胞間密着結合に由来するバリア機能を評価する経上皮電気抵抗（TEER）は、細胞培養チャンバに培養した細胞層の分化と完全性の指標として用いることができる。TEER は、多孔膜上に培養された細胞層に交流電圧を印加して得られるインピーダンススペクトルを等価回路で解

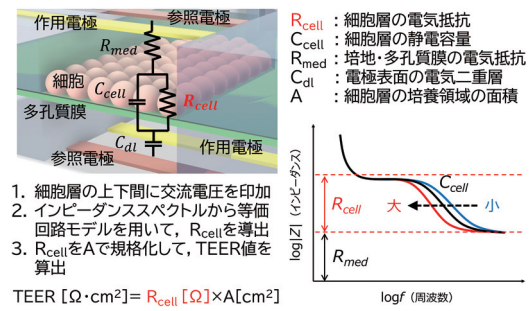


図5 マイクロ流体デバイスを使った4端子法による細胞層のTEER計測の原理

析し、得られた細胞層の抵抗値を細胞培養領域の面積で規格化して導出する（図 5）。

マイクロ流体デバイスを使用した MPS の TEER 計測では、作用電極と参照電極を使った4端子法で行うことが多いが、TEER 電極レイアウトに依存して計測値が大きく異なることが課題となっていた。これは TEER 電極から電圧を印加した際、細胞培養チャンバ内に形成される電流密度分布に TEER 値が依存することに起因する。したがって TEER 計測の高精度化を目的としたデバイス設計においては、電流密度分布を均一にするために、細胞培養チャンバの大部分を TEER 電極で覆う設計アプローチが有用である。しかし細胞培養中や染色後の細胞観察のための顕微鏡観察領域を確保するためには、細胞培養チャンバの上下面における開口部（ガラス領域）の割合が一定以上となることも求められる。そこで本研究では、高精度な TEER 計測と大面積の細胞観察を同時に可能とする TEER 電極レイアウトについて、構造最適化手法の1つであるトポロジー最適化を用いた新しい設計法を開発した。

トポロジー最適化は、制約条件を満たしながら目的関数と呼ばれる関数を最小、または最大とするような設計変数 θ （材料の分布）を求める問題として定義される。これを一般的に使われている機械構造物の設計ではなく TEER 計測に適用する場合、前述した4端子法における作用電極と参照電極を同時にトポロジー最適化するため、「マルチマテリアルトポロジー最適化」の問題に分類される。ただし一般的なマル

チマテリアルトポロジー最適化でのアプローチは、本研究の電極レイアウトの設計にはそのまま適用できない。そこで、図6に示す細胞培養チャンバの解析モデルに2層の電極層を設定することで、この課題を解決した。ここで、内側の電極層 θ_1 は電極レイアウトを決定、外側の電極層 θ_2 では、2種類の電極を区別する役割をする。

前述した BoC の細胞培養チャンバを設計対象として、トポロジー最適化による TEER 電極レイアウトの結果を図7に示す。本研究の電極レイアウトの最適化結果では、設計変数 θ が 0.5 以下となる部分を電極とみなす。つまり赤色で示された領域では θ が 0 付近の値をとるため、TEER 電極が存在するとみなす。また、細胞培養チャンバ中央付近の内外2層の重複部は作用電極、それ以外の内側の電極層における電極領域は参照電極とみなす。

図8と表1に本研究のトポロジー最適化で得られた TEER 電極レイアウトと他の電極レイアウトについて、電流密度分布の均一性と開口率を比較して示す。ここで、電流密度分布の均

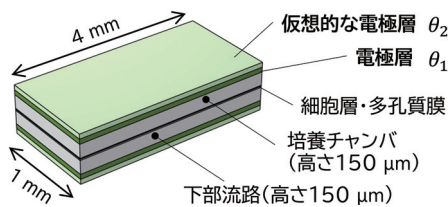
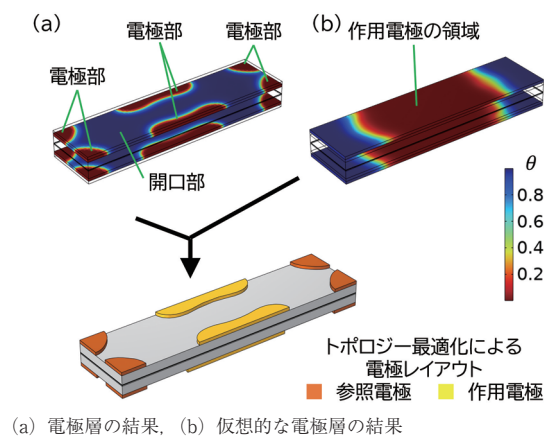
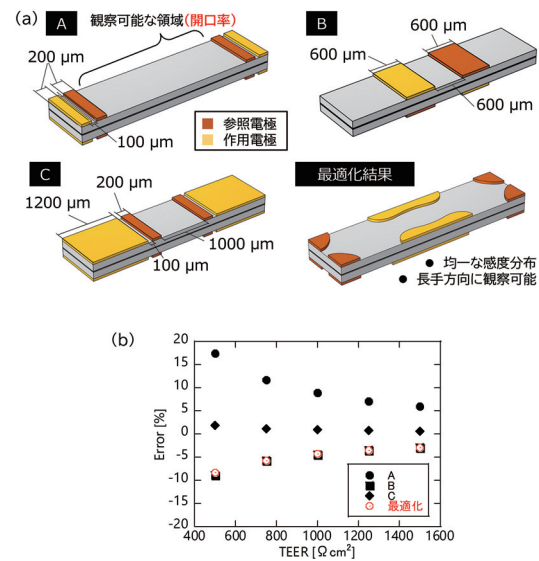


図6 細胞培養チャンバの解析モデル



(a) 電極層の結果、(b) 仮想的な電極層の結果

図7 トポロジー最適化で得られた電極レイアウト



(a) 電極レイアウトの比較、(b) TEER 計測における誤差の比較

図8 異なる TEER 電極レイアウト間での比較

表1 各電極レイアウトでの開口率と RSD の比較

電極レイアウト	RSD	開口率
最適化	4.7%	73%
A	29%	80%
B	15%	70%
C	2.2%	30%

一性は、電極レイアウト間の比較を容易にするため、細胞層における電流密度分布の標準偏差を平均値で割った変動係数 (RSD: Relative Standard Deviation) を指標とした。

まず、トポロジー最適化で得られた TEER 電極レイアウトは、良好な RSD を有し、電極レイアウト B と同程度の広い顕微鏡観察領域を実現している。さらに、顕微鏡観察領域を細胞培養チャンバの長手方向全体で確保しており、せん断応力を印加する細胞培養チャンバ（主に小腸細胞）の長手方向に沿った細胞観察が可能となる点も優位となる。次に電極レイアウト A と B は、RSD が悪く、電極レイアウト C は、良好な RSD で設計できている。電極レイアウト C は、細胞培養チャンバの大部分を電極で覆うことで電流密度分布を均一に設計したものの、細胞培養チャンバ全体を金属電極が覆っているため、細胞観察ができるガラス領域が中央付近に制限される。

次に小腸細胞 (Caco-2 細胞) の一般的な

TEER 値である $250\sim1500\ \Omega\text{cm}^2$ において計測誤差を比較すると、RSD が最も良い電極レイアウト C で計測誤差が小さくなるが、トポロジー最適化による電極レイアウトでも計測誤差は 10% 未満であり、十分な計測精度を有する。以上の結果から、トポロジー最適化した TEER 電極レイアウトは小さい RSD を保ちながら大きい開口率を持つため、BoC での TEER 計測に適した電極レイアウトと言える。

本研究のトポロジー最適化のアプローチは様々な MPS の TEER 計測デバイスに展開できるほか、4 端子法を用いたインピーダンス計測全般にも適用可能な汎用性の高い手法と考えられる。また、異なるデバイス間で TEER 値の比較を行うための電極レイアウトの設計手法としても有用である。今後は、最適化した電極レイアウトを実装した BoC によって、NAFLD の発症機序の理解につながるデバイスシステムであることの実証結果を積み重ねる。

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、マイクロ流体デバイス技術を駆使した腸肝連結プラットフォームを用いて NAFLD を再現すること、また細胞バリア機能をリアルタイムにセンシングする TEER 計測用電極のトポロジー最適化設計法を開発することに成功した。将来的に細胞機能をリアルタイムに解析するセンシング技術は、創薬スクリーニングや各種オミクステクノロジーと組み合わせることで、NAFLD 発症に関するより深い知見と、薬剤候補の発見への貢献が期待される。また、本研究の腸肝連結プラットフォームでは、腸肝軸に関連する様々な障害（例えば、炎症性

腸疾患など）に関する新しい知見も期待される。さらに、実験動物を使用しない疾患研究が可能になるため、新しい動物代替法としての応用も期待される。

[成果の発表、論文など]

- ・ Jiandong Yang, Yoshikazu Hirai, Kei Iida, Shinji Ito, Marika Trumm, Shiho Terada, Risako Sakai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Ken-ichiro Kamei, "Integrated Gut-Liver-on-a-Chip Platform as an in Vitro Human Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease", *Commun. Biol.*, Vol. 6, 310, 2023
- ・ Dongxiao Zhang, Jiandong Yang, Yoshikazu Hirai, Ken-ichiro Kamei, Osamu Tabata, Toshiyuki Tsuchiya, "Microfabrication of Polydimethylsiloxane-Parylene Hybrid Microelectrode Array Integrated Into a Multi-Organ-on-a-Chip", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 62, 017002, 2023
- ・ Jiandong Yang, Satoshi Imamura, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Ken-ichiro Kamei, "Gut-Liver-Axis Microphysiological System for Studying Cellular Fluidic Shear Stress and Inter-Tissue Interaction", *Biomicrofluidics*, Vol. 16, 044113, 2022
- ・ Jiandong Yang, Yoshikazu Hirai, Ken-ichiro Kamei, Osamu Tabata, Toshiyuki Tsuchiya, "Simulation Model to Characterize Volumetric Flow Rate Generated by Polydimethylsiloxane Peristaltic Micro-pump for Body-on-a-Chip", The 18th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2023), Jeju, KOREA (May 14-17, 2023), pp. 714-715
- ・ 合田晴紀, 石田尚之, 古田幸三, 泉井一浩, Van Keulen Fred, 亀井謙一郎, 土屋智由, 田畑 修, 平井義和, "高精度な経上皮電気抵抗計測のためのトポロジー最適化による電極設計", 第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム(電気学会 E 部門大会), 電気学会, 徳島, 2022 年 11 月 14 日-16 日, 16A2-M-1