

論文の内容の要旨

論文題目 オンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスに関する研究

氏 名 木村 啓志

本研究における課題は、細胞培養とその機能解析のためのマイクロデバイスの開発である。ヒト細胞そのものを対象とした機能解析は動物実験の代替法として広く利用されるようになり、特に薬剤スクリーニングにおいては、動物実験の前段階として有効なツールとなりつつある。近年では培養環境をより生体内に近づけるためにカルチャーディッシュなどの静地培養系からマイクロデバイスを応用した灌流培養系の研究が行われている。しかし、従来のマイクロデバイスを用いた灌流培養系は、送液システムを外部に持つため培養液の体積が大きくなる傾向があり、薬物や細胞が出す代謝物・シグナル伝達物質などが希釈されてしまう欠点があった。また、細胞の動態検出のために蛍光顕微鏡などの大がかりな装置を必要とすることから、マイクロデバイスに期待されている「並列化」が困難である。細胞機能解析のためのプラットフォームを考える場合、細胞の状態を良好に維持するための機能とその動態を測定するための機能が必要であり、これらのデバイスへの集積化が求められる。

そこで本研究では、細胞機能解析のためのプラットフォームとして、送液システムを内蔵することで培養液体積の極小化を図り、培養環境の恒常性と薬物やシグナル伝達物質の高濃度化の両者を実現する灌流型細胞培養マイクロデバイスの開発を目的とした。また、細胞動態をオンラインで測定可能な蛍光測定システムも構築し、これをデバイスに設置することで測定機能の集積化を実現する。本論文では特に、上記の要求を満たすオンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスの開発と、これを用いた細胞機能解析への応用について論じた。オンチップ灌流型培養マイクロデバイス内でヒト臓器のモデル組織を単・共培養しつつ、各々の臓器細胞の目的物質に合わせた測定機能をデバイス内に配置し、様々な物質の吸収や代謝などの細胞活性をオンライン測定することで、ヒトにおける薬物応答のモデル実験系や、履歴を考慮した長期の代謝応答評価といったマルチフェーズの薬物応答試験に対応できるプラットフォームが実現できると考えられる。

開発したオンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスは、膜型臓器細胞の極性輸送能測定や異種臓器細胞の共培養を実現するために半透膜によって仕切られた 2 つの独立したコンパートメントを有しており、それぞれのコンパートメントは細胞培養部位、培養液を灌流するための回転型マイクロポンプ、それらを繋げるマイクロ流路、光ファイバを取り付けるためのファイバ挿入部、内部溶液を操作するための溶液交換口から構成される (図 1)。

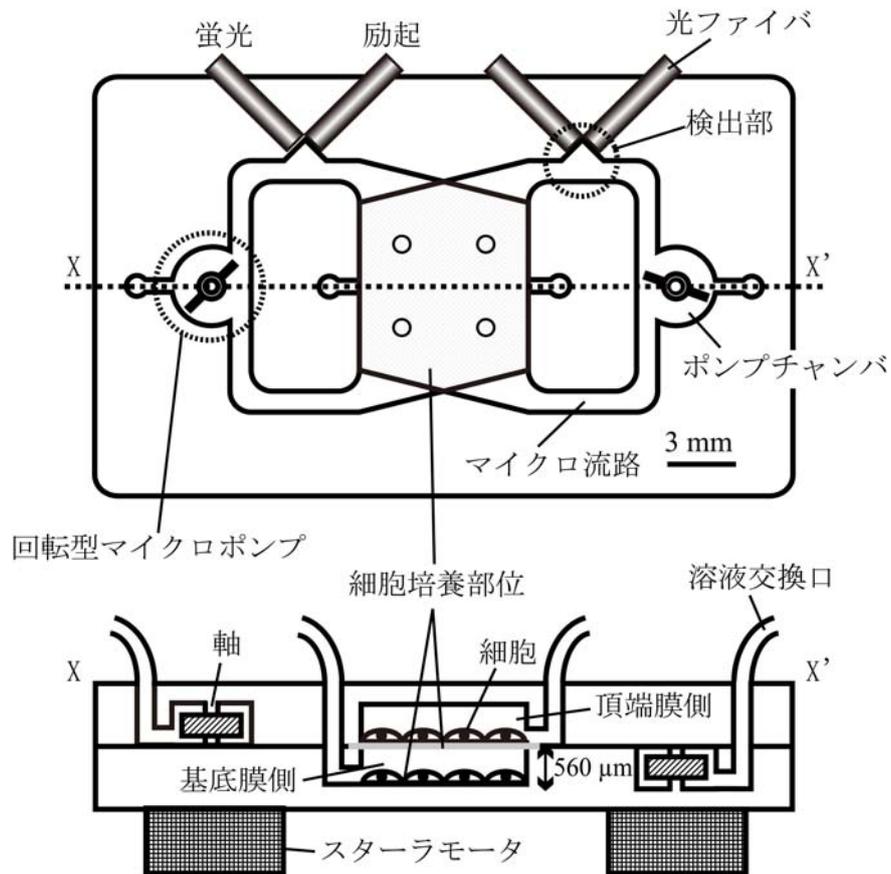


図 1 オンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイス模式図

デバイスの材料には酸素透過性の高いPDMS (polydimethylsiloxane) を用いた。上側のコンパートメント (以下, 頂端膜側) では半透膜上で細胞が培養され, 下側のコンパートメント (以下, 基底膜側) ではPDMS表面上で培養される。細胞の代謝物測定を想定し, デバイス内の培養液を細胞数に対して生理的な体積比, なおかつ最低限に押さえることで測定感度の向上を実現する。内蔵されている磁気駆動式回転型マイクロポンプは, ポンプチャンバと回転子によって構成され, ポンプチャンバの中央に設置されている軸を中心に回転子が回転することによって, ポンプチャンバの入り口側から出口側に向かって溶液が掻き出される灌流システムとなっている。この回転子は磁性体であり, デバイス下部に設置したスターラモータによって回転駆動される。また, 本デバイスはオンラインでの蛍光測定を実現するために, 光ファイバを用いた蛍光測定機能の集積化がなされている。これにより培養液中に分泌された様々な代謝物などの物質変化が測定可能である。製作したオンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスを図 2 に示す。

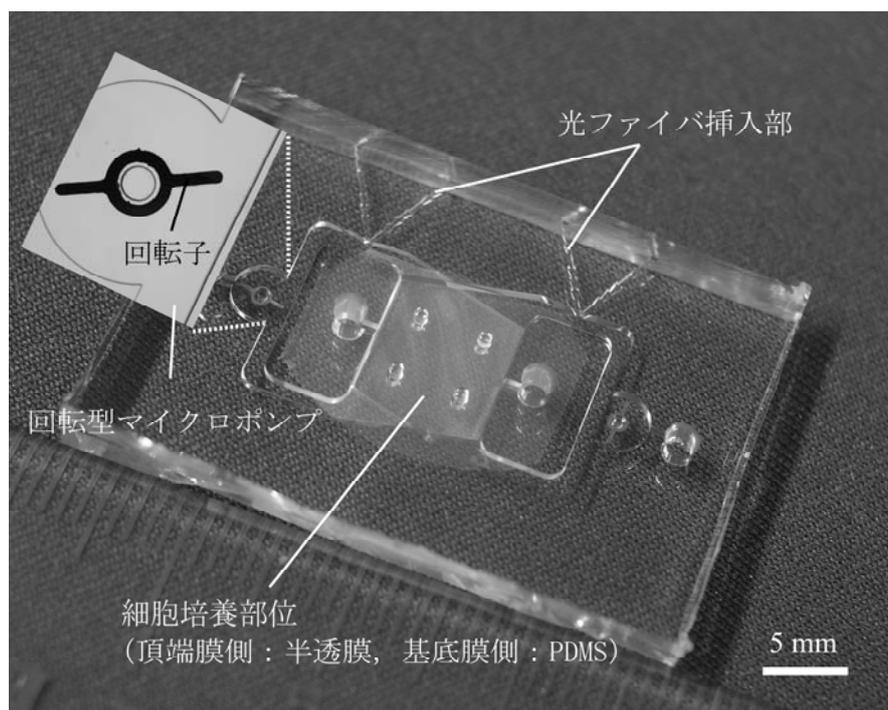


図 2 オンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイス

本論文では、開発したオンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスを用いて、まず、オンチップ灌流が細胞培養に与える影響の検討を行った。本デバイスは送液システムをデバイス内部に組み込むことで培養液体積の極小化が実現されており、培養環境の恒常性と薬物などの化学物質やシグナル伝達物質の高濃度化を実現しているため、外部ポンプを利用している既存の灌流系の欠点を解決するものと考えられる。本デバイスを用いてオンチップ灌流がヒト肝癌由来の Hep-G2 細胞に与える影響を調べるために灌流の無し・有りの各条件における細胞形態や活性の比較を行った。

本実験の低密度播種培養実験結果から、マイクロデバイス内でオンチップ灌流培養を行うことで、静置培養系や外部の送液システムを利用した灌流培養系では得ることが難しかった Hep-G2 細胞のスフェロイド形状を得ることができた (図 3 a))。また、アルブミン分泌などの一連の細胞活性測定の結果 (図 3 b)) から、オンチップ灌流培養を行った細胞群の方が有意に高活性であることが示された。一般的に、肝細胞は 3 次元的なスフェロイドを構築することにより 2 次元的に培養された場合に比べて代謝機能などが向上することが知られており、言い換えればスフェロイドが得られる培養環境は細胞からみればより生体内に近い環境であろうと推測できる。従来、Hep-G2 細胞のスフェロイドを得るためには、培養基板に設けた穴の中で培養しつつ基板を揺動するなどの外力を加えるなどの工夫が必要であった。これに対して本デバイスでは、なんら外力を加えることなく、かつ特殊な穴構造を作ることなく、低密度で播種しオンチップ灌流培養を行うことで平坦な基板上での Hep-G2 細胞のスフェロイド形成を実現している。これは本デバイスが特徴として掲げる、

様々な代謝物やシグナル伝達物質の高濃度化によってHep-G2細胞間の相互作用が強化にされ、スフェロイド化への何らかの機能発現が誘発された結果ではないか、と考えられる。本実験により生体内環境の模擬によって細胞組織に生体内の形態を再現させることが可能なことが示唆された。

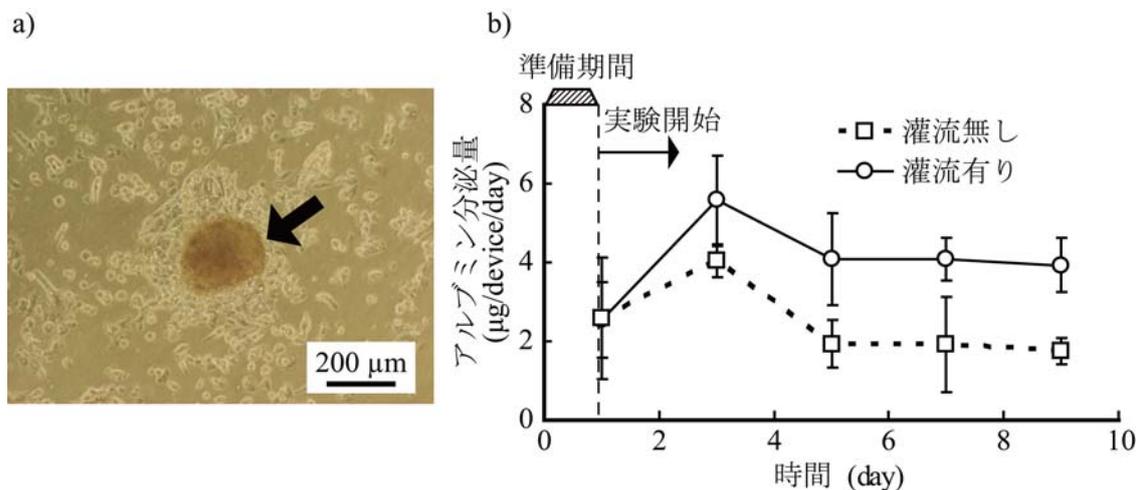


図 3 オンチップ灌流が細胞へ与える影響の考察; a) オンチップ灌流培養 9 日目におけるスフェロイドの様子, b) オンチップ灌流無し, 有りにおけるアルブミン分泌活性

つづいて、人体内膜型臓器の中でも薬物などの化学物質の吸収・代謝という非常に重要な役割を担い、薬物動態などに大きな影響を与える小腸に着目し、2-コンパートメントを有するオンチップ灌流型培養マイクロデバイスを用いたヒトの小腸モデル構築とその輸送能測定について論じた。

半透膜により仕切られることで2つの独立したコンパートメントを有する本デバイスは、それぞれのコンパートメントを頂端膜側と基底膜側として機能させることができる。小腸の上皮細胞にはP-glycoprotein (P-gp)と呼ばれる薬物トランスポーターが発現しており、このP-gpは吸収途中の薬物を細胞外にくみ出すポンプの働きがある。従って、薬品や食料品開発において、物質が小腸を通過する際の代謝と排出状況を網羅的に解析する必要がある。本研究ではデバイスの頂端膜側コンパートメントの半透膜上で小腸モデル細胞 (Caco-2) を培養することで小腸モデルを構築し、P-gpの基質として代表的なrhodamine 123を用いて小腸モデルの能動輸送能の評価を行った。両コンパートメントに10 μMのrhodamine 123を添加した後の濃度変化を内蔵の蛍光測定機能を用いて行った測定結果を図 4に示す。rhodamine 123が基底膜側から頂端膜側のコンパートメントへ輸送されている様子が見られる。この結果から、本研究で提案した光ファイバを用いた測定機能の信頼性を示唆すると共に、小腸モデルの輸送能評価からカルチャーインサートを用いた既存の実験系では困難であった高感度でかつ連続的なオンライン測定の実現を示唆した。

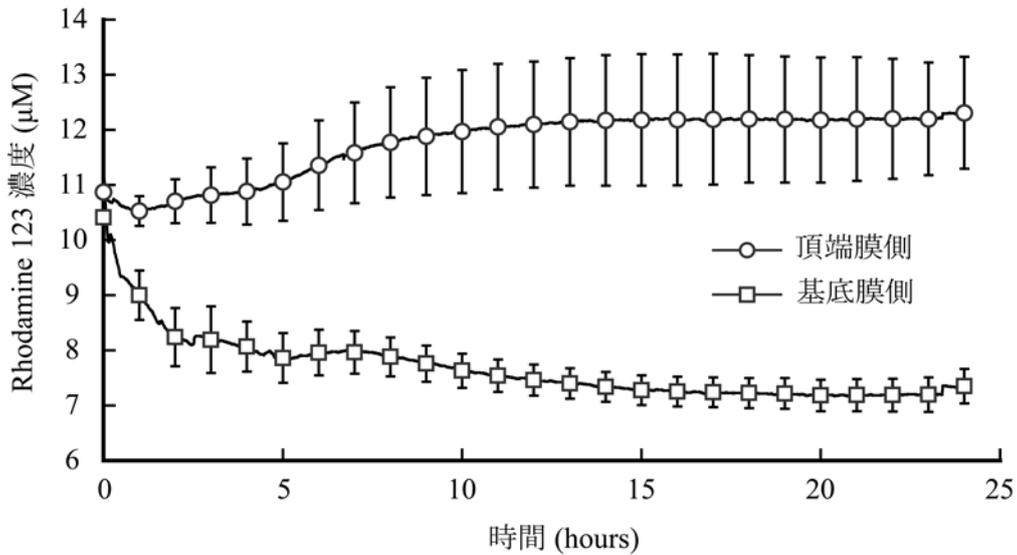


図 4 小腸モデルの輸送による各コンパートメントの rhodamine123 の濃度変化

本デバイスを細胞機能解析のプラットフォームとしての位置付けを考える場合、単種細胞の動態だけではなく、異種の臓器細胞間の相互作用を調べるために複数種の細胞を同時に培養する必要がある。そこで、本デバイスを用いて共培養の実現可能であるかを検討するために、上下のコンパートメントを利用して小腸・肝臓モデルを構築した。小腸モデル細胞を頂端膜側、肝臓モデル細胞を基底膜側で培養することで、生体内における吸収→代謝の経路を模擬することに成功した。また、同時に行ったいくつかの項目における単培養と共培養の比較から、共培養を行った肝細胞の活性が有意に向上することが示唆された(図5はアルブミン分泌活性の向上の結果)。

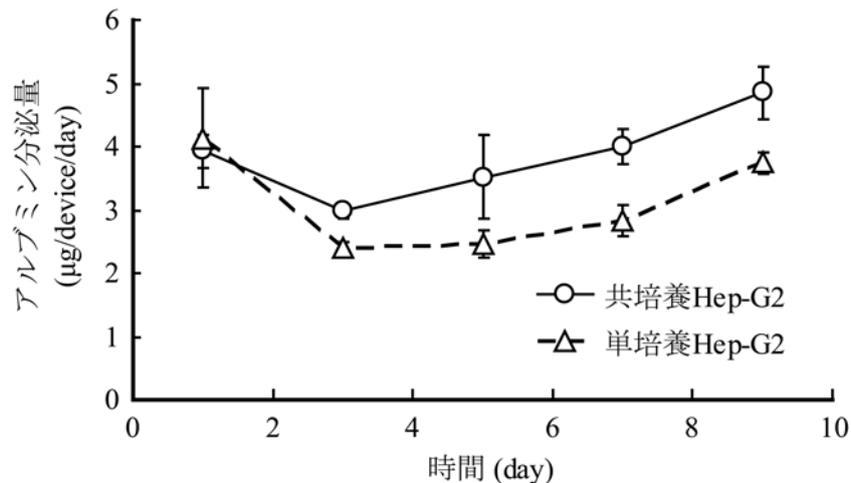


図 5 共培養実験におけるアルブミン分泌活性

以上の結果から、本研究において開発を行った 2-コンパートメントを有するオンチップ

灌流型細胞培養マイクロデバイスを用いることによって、生体内環境の模擬と様々な種類の細胞の動態評価の実現、並びに細胞間の相互作用の観測が可能であるという知見を得た。特に、回転型マイクロポンプを内蔵することで、細胞数と培養液体積の割合を生理的なものとし、細胞自身の機能の上昇を促したばかりか、細胞間の相互作用の影響測定や定量化を可能とした。現在のところ蛍光観察は細胞機能解析においてもっとも効果的で有用であると考えられており、本デバイスの応用性も示唆した。

動物実験を行わずに個体レベルでの薬物毒性を評価するためには、個別の細胞機能解析試験から得られる生物学的な情報を適切な生理学的毒物動力学(PBTK, Physiologically Based Toxicokinetics)モデルにて個体レベルに積み上げることが考えられる。このようなアプローチは、従来の動物試験では必ずしも明確でなかった毒性発現メカニズムに基づいた影響評価に必然的に結びつくであろうと考えられているが、各パラメータの調査・設定などが必要であり、このような事例にもオンチップ灌流型細胞培養マイクロデバイスを応用することができると考えられる。

以上のことから本デバイスは、細胞機能解析のプラットフォームとして広く医学、創薬、生命科学の分野に寄与していくものと考えられる。