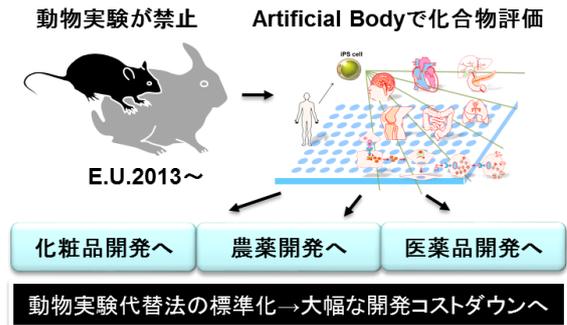


膵癌腫瘍の Organ-on-a-chip 作製

国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門
ステムセルバイオテクノロジー研究グループ
木田 泰之

1. はじめに

2013年にEUでは「化粧品開発における動物実験規則」により動物実験が全面的に禁止された。これは、OECD(Organization for Economic Co-operation and Development:経済協力開発機構)の2009年ガイドラインに基づくもので、動物実験により開発された化粧品はEUで販売することができないため、日本国内企業の世界市場戦略に大きな影響が出ている。このような社会的背景から、動物実験を再現できる人工の組織(Artificial Body)での化成品実験が望まれており、欧米ではOrgan-on chipの研究が盛んになってきている(右上イメージ図)。



生体外で生体内を再現することを目標とし、動脈を模した微小流路を巡らせたチップ(=デバイス)上に、組織細胞をパターン配置させる Organ-on-a-chip もしくは複数組織を繋げる Organs-on-a-chip(あるいは Body-on-a-chip)が、肺胞のガス交換や腎臓のイオン交換などを具体例として作製されている。D. E. Ingber 教授(Wyss Institute, Harvard University)は Organ-on-a-chip の先駆者として、USA や EU では2012年から大型のナショナルプロジェクトが始まっている。しかし国内では、東海大学工学部や東京大学生産技術研究所などで先駆的試みとして Organs-on-a-chip に向けた要素技術を開発している段階であり、抗癌・制癌の医薬品開発に関わる支援技術構築への試みはまだ見えない。このような背景から、本研究提案では、3次元の膵癌腫瘍作製技術を要素技術として、ミニ臓器への癌転移モデル系デバイス、すなわち Organs-on-a-chip を作製し、膵癌が増殖し進行することに用いる代謝経路や代謝産物を特定し、その代謝経路を拮抗・遮断する創薬標的を炙り出すことを研究の目的とした。

各種がんの5年生存率(図1)を見ると、膵臓癌の生存率の低さは顕著である。これは沈黙臓器と云われるように癌の進行度が進んだものでないと発見できないという「診断マーカー」の不足や、ゲムシタピンなどの効果的な抗癌剤が癌細胞や幹細胞に送達できないのが原因である。しかし何より、良い実験モデルが存在しないことで基礎医学研究が進んでいないことに帰する。

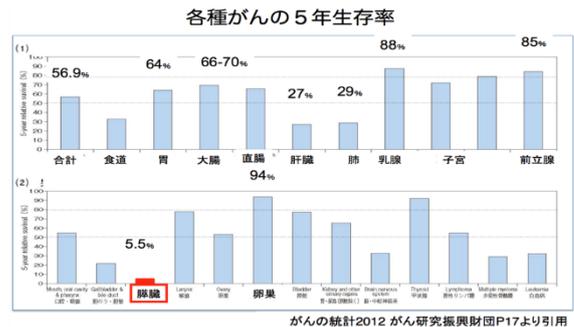


図1 膵癌の5年生存率は部位別がんのなかで最下位であり、治療がきわめて困難な癌の一つである。

そのような膵癌を初めとする難治性固形癌は間質組織を誘導して増生させ、間質の主要構成細胞である腫瘍関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)

と癌細胞/幹細胞がダイナミックに cross talk して統合的に癌の発生・進展が進む。すなわち癌組織とは、形態学的には癌細胞と間質細胞の両者が共存する集合体を指すが、今までの多くの研究は癌細胞のみを標的とする治療開発にエネルギーが注がれ、癌-間質相互作用に配慮した研究をデザインする意識が希薄であった。また既存の方法で膵癌細胞と線維芽細胞等を混合培養しても癌細胞は腺管を作らず、線維芽細胞は無秩序に散在するのみで、意味のある形態形成をもたらす成熟 CAF へは分化しない。この様に臨床膵癌の豊富な間質増生を再現する実験系が無かった事が癌間質研究の進展を阻む要因の一つであった。

申請者は間葉系幹細胞の専門的研究と細胞操作技術からiPS細胞由来の均一MSC(iMSC: induced MSC)を作製した。このiMSCは体内由来MSCよりも長く均一に増殖させることができる。そして、このiMSCをヒト膵癌細胞と混合してマウスへ移植したところ、強い間質組織の増生を認める固形癌を再現することができ、これによりiMSCはCAFとなることが証明された。また、作製した膵癌共培養モデルから、相互作用後に癌細胞とiMSCを分離回収し、mRNAの発現量解析としてRNA-seqとゲノムDNAのメチル化解析BS-seqを

行い、CAFであることの確認とCAFへの変貌過程におけるエピゲノムを解析している。以上の基礎データから、iPS細胞由来のiMSCをiCAF(induced Cancer associated fibroblast)と定義し、申請者のiCAFを用いる2D,3D共培養系と微小流体とポンプ灌流システムを梱包した培養デバイス、即ち膵癌腫瘍のOrgan-on-a-chipを作製し、膵癌が進行することに用いる代謝経路や代謝産物を特定し、その代謝経路を拮抗・遮断する創薬標的を炙り出すことを研究の目的とした。

2. 実験計画・方法

本提案では以下の計画から膵癌が進行することに用いる代謝経路や代謝産物を特定することを目的とした。

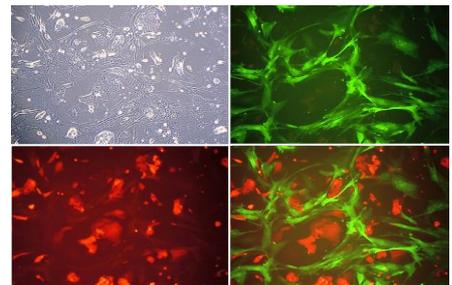
1. in vitro 共培養デバイスの代謝経路解析への最適化
2. Organs-on-a-chip に実装する人工器官（ミニ肝臓）の作製
3. Organs-on-a-chip デバイスの作製
4. 標的代謝産物の拮抗・阻害物質を用いた抗癌作用の検討

3. 結果 研究成果

上記1-4の研究計画について得られた結果を以下に記す。

1. 【in vitro共培養デバイスの代謝経路解析への最適化】

iPS細胞由来のiCAFは、マウスモデルで上手く間質を形成させた。次にChip上へモジュール化するため、*in vitro*で膵癌細胞とiCAFの共培養系を開発した。右図に示すように、GFPで標識してあるiCAFとDsRed2で標識してある膵癌細胞をシャーレで混合培養（＝共培養）することにより、臨床膵癌のような豊富な間質組織増生を再現できた（赤色の癌細胞を緑色の間質細胞が幾重にも取り囲む像）。このモデルは5日で完成することから、癌細胞と間質細胞の相互作用を研究するのに良いモデルである。申請者らは、このようにして作製した膵癌2D共培養モデルから、相互作用後に癌細胞とiCAFを分離回収し、RNA-seqとBS-seqを行っている。



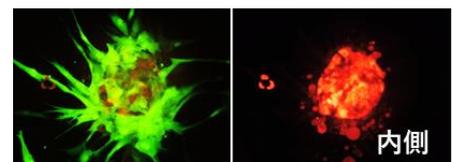
RNA-seqの解析から、iCAFについて非常にリーズナブルな結果を得ている。具体的には、CAFのマーカーである α -SMA (ACTA2)が相互作用後に顕著に発現上昇し、また共培養後の癌細胞や共培養後のiCAFで共に炎症マーカーであるIL6の顕著な上昇が確認できた。このように、臨床病理切片で確認されているCAFマーカーが確認されたことから、この実験系はMSCからCAFへの変化を再現していることが分かった。

このように構築した共培養系における代謝経路と代謝産物を特定するために、共培養前後のそれぞれの細胞を単離し、Human Metabolome Technologies社によるメタボローム解析を行った。その結果、CAFへ変化した群において非常に興味深い代謝産物の特徴的なピークが確認できた。現在これら代謝産物の役割を検討している（投稿準備中）。

2. 【Organs-on-a-chipに実装する人工器官（ミニ肝臓）の作製】

悪性度の高い癌は腫瘍から離脱し、他(多)臓器に転移・浸潤する。

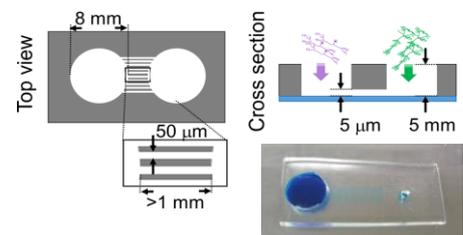
既に作製に成功している右図の3D共培養系にて癌細胞群をiCAFで覆うことにより、より臨床膵癌に近づけた3D共培養モデルをOrgans-on-a-chipのモジュールとする。細胞非接着シャーレで両細胞を2日間混合培養すると、興味深いことに、癌細胞が内側でiCAFが外殻となる球状を呈する。この細胞塊をマトリゲルで包む



ことで腫瘍を再現することができた。この3次元*in vitro*腫瘍の評価のため、抗癌剤を用いて2次元*in vitro*共培養系との比較実験を行ったが、予想されたように、2次元共培養系では癌細胞が間質に覆われていない部分があるために抗がん剤が効果をみせた。しかし、3次元腫瘍には抗癌剤が送達せず、癌の縮小が見られなかった。このことから、作製した3次元腫瘍は体内の抗がん剤耐性も再現していることが分かった。また転移先の他臓器として肝臓を想定している。本実験ではiPS細胞から肝臓細胞を分化誘導し、細胞塊を形成させた。さらにOrgans-on-a-chipデバイス（以下3で記載）に実装することで、がん細胞の転移・浸潤をモニタリングすることができた。

3. 【Organs-on-a-chipデバイスの作製】

申請者らの研究グループでは微細加工による培養デバイスの開発を進めている。右図に示すように、作製した培養デバイスは円筒形の2つの細胞配置部とそれらを繋ぐトンネルで構成されている。トンネル構造の幅は50 μ m、高さは5 μ m、距離は約1mmであり、高さ5 μ mでは通常の線維芽細胞等は入り込めず、小さい細胞のみが通過できる。従って、左右のチャンバ内で膵癌腫瘍と転移先の想定臓器細胞を分離培養すると、小さい癌細胞のみが移行できるように設計されている。右図には7日間移動した膵癌細胞を示した。



4. 【標的代謝産物の拮抗・阻害物質を用いた抗癌作用の検討】

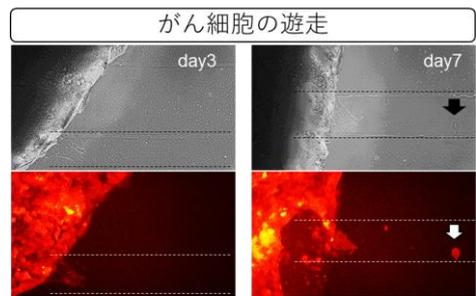
上記2および3による技術開発から、現在、転移中の培養液に放出される代謝産物等の同定を試みている。

4. 考察 まとめ

本研究では新規の癌間質細胞を誘導する技術を用いた生体外での膀胱腫瘍およびその解析デバイスを構築することが可能となった。したがって、難治性固形癌治療における障害であった癌間質を含めた生体外実験系の構築により、抗癌剤や制癌剤の薬剤スクリーニングにおける精度と確度の向上が期待できる。また転移や浸潤を可視化できるデバイスを用いることから、癌の進展をリアルタイムで捉え、任意の段階でのサンプル採取や解析が可能になる。

一方、本実験ではヒト患者由来の膀胱細胞株を用いたため、1検体での評価となっている。今後は多検体を用いた網羅的な解析によって統合的に解析することが必要である。さらに、膀胱に限らず他の難治性固形癌にも適用していくことも重要であるが、同時に生体内での解析との相同性を検討し、本デバイスの有効性を明確にしていくことが望まれる。

最後に、本研究にご支援賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝いたします。



5. 参考文献

- In vitro reconstruction of neuronal networks derived from human iPS cells using microfabricated devices. Takayama Y and Kida YS. PLOS ONE 2016. 11(2):e0148559
- ERR によるメタボリックスイッチと iPS 細胞誘導. 櫛笥博子, 川村晃久, 木田泰之 実験医学, Vol. 34-No. 15 2016
- ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. Kida YS, Kawamura T, Wei Z, Sogo T, Jacinto S, Shigeno A, Kushige H, Yoshihara E, Liddle C, Ecker JR, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM. Cell Stem Cell. 16(5):547-555. 2015
- Methylome, transcriptome, and PPAR γ cistrome analyses reveal two epigenetic transitions in fat cells. Takada H, Saito Y, Mituyama T, Wei Z, Jacinto S, Downes M, Evans RM, and Kida YS Epigenetics. 9. 1195-206. 2014