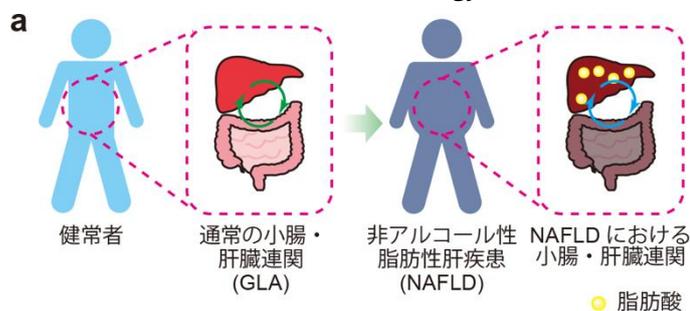


非アルコール性脂肪性肝疾患を再現した 腸・肝連結臓器チップの開発

- 世界的に患者数が増加傾向にある非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD; Non-alcoholic fatty liver disease）を生体外において研究するために、小腸と肝臓を連結した臓器チップの開発に成功しました。

京都大学アイセムスの亀井謙一郎客員准教授（ニューヨーク大学アブダビ校准教授兼任）、大学院工学研究科工学基盤教育研究センター平井義和講師（同機械理工学専攻講師兼任）、同マイクロエンジニアリング専攻楊建東博士らの研究グループは、マイクロメートルレベルの微細加工技術を駆使して、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を生体外にて再現する「腸・肝連結臓器チップ」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、現在に至るまで有効な治療薬・診断薬が開発されていない NAFLD の作用機序を明らかにするために、NAFLD にて重要な役割を果たすとされている小腸と肝臓の相互作用を再現しました。このチップを用いることによって、NAFLD に関する新しい知見が得られるだけでなく、新治療薬の開発への貢献が期待されます。

本成果は、2023年3月23日に *Communications Biology* 誌に掲載されました。



b iGLC プラットフォーム (Integrated Gut-Liver on a Chip)

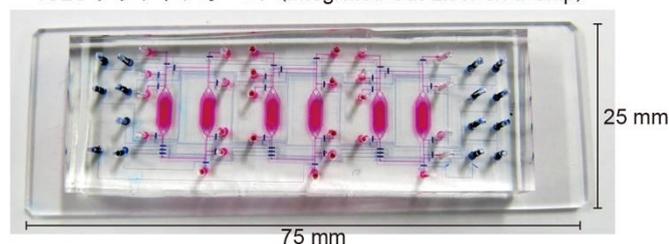


図1 (a) 非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD; Non-alcoholic fatty liver disease）における小腸・肝臓連関（GLA）。(b) GLAを再現するiGLCプラットフォーム（Integrated Gut-Liver on a Chip）

1. 背景

世界的に患者数が増加傾向にある非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD; Non-alcoholic fatty liver disease）は、肝脂肪症、肝硬変、がん、心血管疾患につながる慢性肝疾患です。現在、重度の肝疾患患者の治癒には肝移植が唯一の方法ですが、患者に適したドナーを見つけることは非常に困難であることが問題となっています。NAFLD の段階で治療できれば肝移植は回避できますが、NAFLD は非常に複雑なプロセスで起きるため、その疾患メカニズムはほとんど解明されていません。NAFLD に対する新しい治療薬を開発するためには、これらの各プロセスを深く理解する必要があります。

そこで私たちは、NAFLD の発症と進行に最も重要な要素の一つである腸と肝臓の相互作用「腸-肝臓軸（GLA; Gut-liver axis）」に着目しました（図 1 a）。腸と肝臓は複雑に関連しており、NAFLD に起因する腸内細菌異常症、粘膜透過性変化などによる GLA 機能障害は、治療のターゲット候補として挙げられていますが、現在までに実用化された治療法はありません。NAFLD における GLA を研究するために簡便な生体外モデルを確立することができれば、新薬、治療法、診断ツールの発見に貢献できるようになります。

GLA の生体外モデルを開発するために、私たちは臓器チップ技術を用いることにしました。臓器チップとは、マイクロ流体技術^{*1}を利用することで細胞の微小環境を時空間的に制御し、組織細胞の機能を模倣するデバイスシステムの総称です。従来の細胞培養法では難しい血液循環を再現した異なる組織細胞間で細胞培養液を循環させることで、多臓器間相互作用の生体外モデル化を可能にします。

本研究では、iGLC プラットフォーム（Integrated Gut-Liver on a Chip）と呼ばれる腸・肝連結臓器チップを開発し、NAFLD の病態メカニズムについての研究を行いました（図 1 b）。この iGLC プラットフォームには、細胞培養液の流れを高精度に制御するマイクロバルブやポンプがチップ内に搭載されており、細胞培養チャンバへの個別アクセスと、小腸・肝臓細胞を接続する培養液循環フローを実現しています。このプラットフォームを用いて、腸と肝細胞を共培養し、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）を誘導することに成功しました。さらに、mRNA シークエンシング（mRNA-seq）と顕微鏡イメージングによるシングルセル・プロファイリングを組み合わせて、NAFLD 状態における独自の細胞表現型変化と関連する遺伝子ネットワークを調査しました。

2. 研究内容と成果

本研究で開発した iGLC プラットフォーム（図 1b、図 2）は、ガス透過性、生体適合性、透明性の高いシリコン樹脂（PDMS; Polydimethylsiloxane）を成形加工（多層ソフトリソグラフィ技術）した小腸・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で構成されています。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ー（幅 2.1 mm、高さ 220 μm ）が 3 セットあります。制御層には、薄い PDMS 膜（200 \times 200 μm^2 、20 μm の厚さ）で形成された圧力駆動型マイクロバルブとポンプを

設置しています。2種類以上の組織細胞の相互作用を調べるには、細胞培養チャンバの接続・分離を自在に操作できる必要があります。

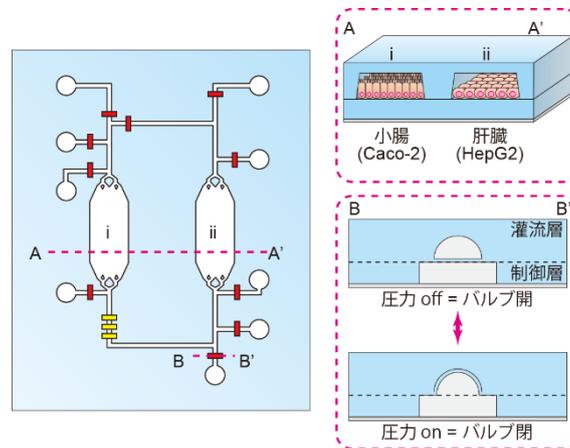


図2 iGLC プラットフォームのデザイン図とマイクロバルブの開閉機構

iGLC プラットフォーム内の個々の細胞培養チャンバに小腸細胞である Caco-2 細胞と肝実質細胞である HepG2 細胞をそれぞれ個別に導入し、続いて細胞培養液をポンプで循環して共培養することで、生体外における GLA を再現しました (図3)。従来法で培養した Caco-2 細胞の機能化には 21 日間程度培養する必要がありますが、iGLC プラットフォームの循環条件下では 7 日間で機能を発揮することが確認できました。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していました。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ました。よって、iGLC プラットフォームによる循環灌流は、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ました。

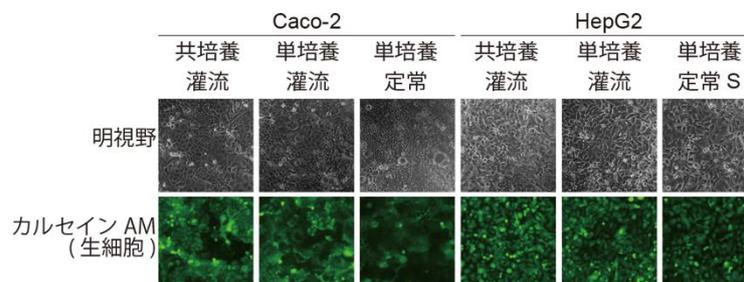


図3 iGLC プラットフォーム内での小腸・肝臓連関の再現と生存率評価

次に、iGLC プラットフォーム内で NAFLD を再現するために、遊離脂肪酸を添加した細胞培養液をプラットフォームに導入しました (図4)。プラットフォーム内では、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の共培養だけでなく単培養も行い、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の相互作用について

も検討しました。その結果、共培養下の Caco-2 細胞では、単一培養細胞よりも細胞内脂質貯蔵が少なく、一方で HepG2 細胞では細胞内脂質貯蔵が増加していることを確認しました。このように、iGLC プラットフォーム内での GLA 相互作用と NAFLD の再現に成功しました。

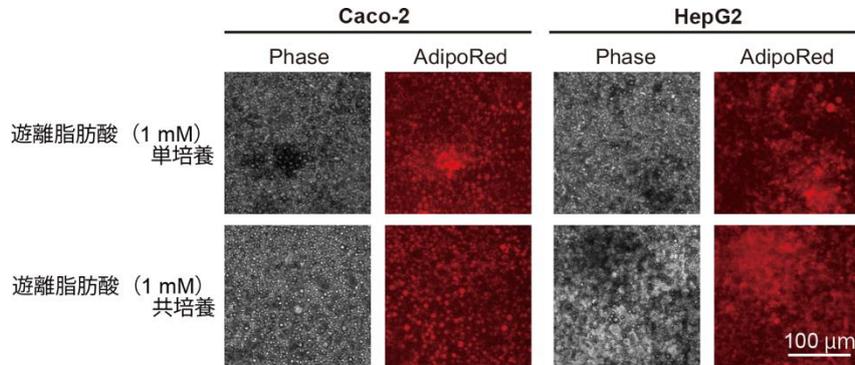


図 4 iGLC プラットフォーム内小腸・肝臓連関における遊離脂肪酸貯蔵評価

更に遊離脂肪酸による GLA の遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにするために、mRNA-seq^{*2} を実施しました (図 5)。その結果、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の双方において、①1mM の FFAs 処理の有無、②単培養と共培養、の合計 4 種類の条件下において遺伝子発現の差異が確認できた 654 遺伝子 (Caco-2 細胞) と 1330 遺伝子 (HepG2 細胞) を同定しました。Caco-2 細胞、HepG2 細胞ともに、共培養することによって遊離脂肪酸による遺伝子発現制御が軽減されていることが確認できました。このように、個別に培養している従来の細胞培養実験法と比較して、iGLC プラットフォームを用いることで、実は Caco-2 細胞と HepG2 細胞が遊離脂肪酸に対して互いに保護的に作用している新しい知見を確認できました。

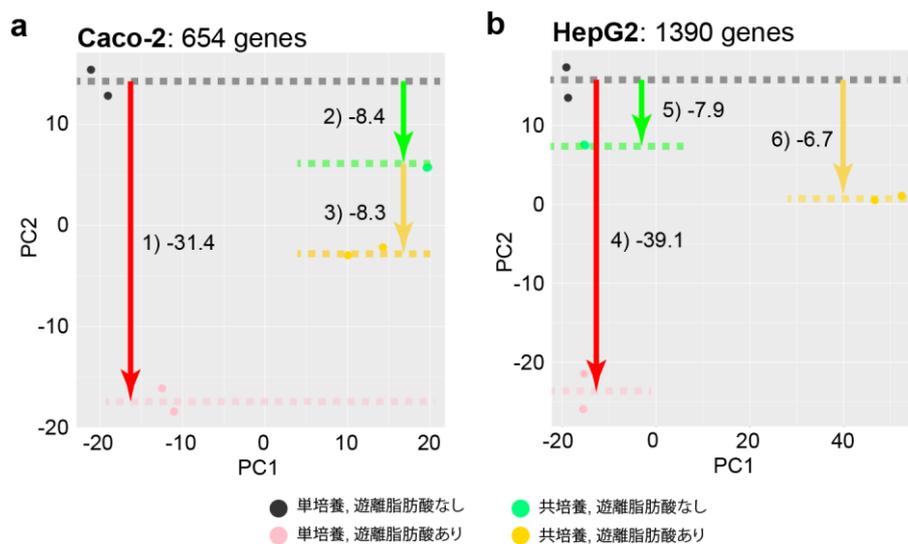


図 5 mRNA-seq による、iGLC プラットフォーム内にて再現した NAFLD 状況下における Caco-2 細胞(a)、HepG2 細胞(b)の遺伝子発現挙動解析

3. 今後の展開

本研究では、iGLC プラットフォームを用いて NAFLD を再現する新しい生体外ヒトモデルを開発することに成功しました。将来的に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ます。また、iGLC プラットフォームは、GLA 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や治療薬の開発への貢献も期待されます。さらに、実験動物を使用しない疾患研究が可能になるので、新しい動物代替法としての活躍も期待できます。

4. 用語解説

※1 マイクロ流体技術

マイクロ流体技術は、微小なスケールで液体を制御・操作するための技術です。微細なチャンネルや構造を持つデバイスを用いて、化学反応や生物学的処理を効率的かつ精密に行うことができ、組織チップの基礎技術となっています。

※2 mRNA-seq

mRNA-seq（メッセンジャーRNAシーケンシング）は、細胞内のメッセンジャーRNA（mRNA）の配列を読み取り、mRNAの種類や量を調べ、遺伝子の発現パターンを解析するために使われます。これにより、特定の病気や状態に関連する遺伝子を特定や、治療法の開発に役立てることができます。

5. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会(JSPS)科学研究費補助金（課題番号16K14660, 17H02083, 18KK0306, 19H02572, and 21H01728）、テルモ生命科学振興財団、荏原 畠山記念文化財団、日本医療研究開発機構（AMED）の支援を受けて行われました。

6. 論文タイトル・著者

“Integrated gut–liver-on-a-chip platform as an in vitro human model of non-alcoholic fatty liver disease”

（参考訳：非アルコール性脂肪性肝疾患を再現した腸・肝連結臓器チップ）

著者： Jiandong Yang, Yoshikazu Hirai, Kei Iida, Shinji Ito, Marika Trumm, Shiho Terada, Risako Sakai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, and Ken-ichiro Kamei
Communications Biology | DOI: 10.1038/s42003-023-04710-8