

# 特集 I

## TWInsプロジェクト紹介

### 医療分野研究成果展開事業・研究成果最適支援プログラム(A-STEP)

# 積層化細胞シートを用いた 創薬試験用立体組織モデル

日本光電工業株式会社 荻野記念研究所

久保 寛嗣

Hirotsugu Kubo

#### はじめに

2014年度に採択された研究成果最適展開支援プログラム(以下A-Step: Adaptable and Seamless Technology transfer Program through target driven R&D)は国立研究開発法人科学技術振興機構(以下JST)により制度設計され、大学や公的研究機関等で生まれた研究成果を基にした実用化を目指す技術移転支援プログラムである。特徴として、大学等の研究成果を企業のビジネスとして実用化させるシーズとして掘り起こし、実用化に向けた研究開発の初期段階から、最終的には製品化に向けて実証試験を行うために企業主体で開発を行うというプログラムである。実用化の段階に応じて図1のようなそれぞれの研究開発フェーズの特性に応じた支援プログラムが用意されており、今回記載する本プロジェクトはプロジェクトの最終成果として、製品としての実用化を目指す実用化挑戦タイプとしての支援を受けて、2014年度より開発がスタートした。本A-Stepは2015年度より実用化挑戦ステージ分野については医療

分野研究成果展開事業として国立研究開発法人日本医療研究開発機構(以下AMED)に制度移管され開発が継続し、研究期間として5年間の開発期間で開発を行うこととなった。本稿ではこのA-Stepの実用化挑戦タイプとしての支援を受け実施する研究開発テーマについて概説する。

#### 細胞シート工学を核とする 様々な展開

細胞シート工学を用いた細胞シートの医療応用については、既報にても数多くの成果が報告され、現在の再生医療を支えるための欠かせない技術の一つとして確固たる地位を築いており、女子医大のみならず、国内外の大学、研究機関により心筋、角膜、食道、歯周組織等の細胞シートによる再生に関する研究が推進され、大きな成果を上げている。(図2)

さらに産業側も深く関与する将来の産業化を見据えた製造・加工技術の構築においても、2014年に終了した最先端研究開発支援プログラム(First)プログラムにて細胞シートの大量製造を

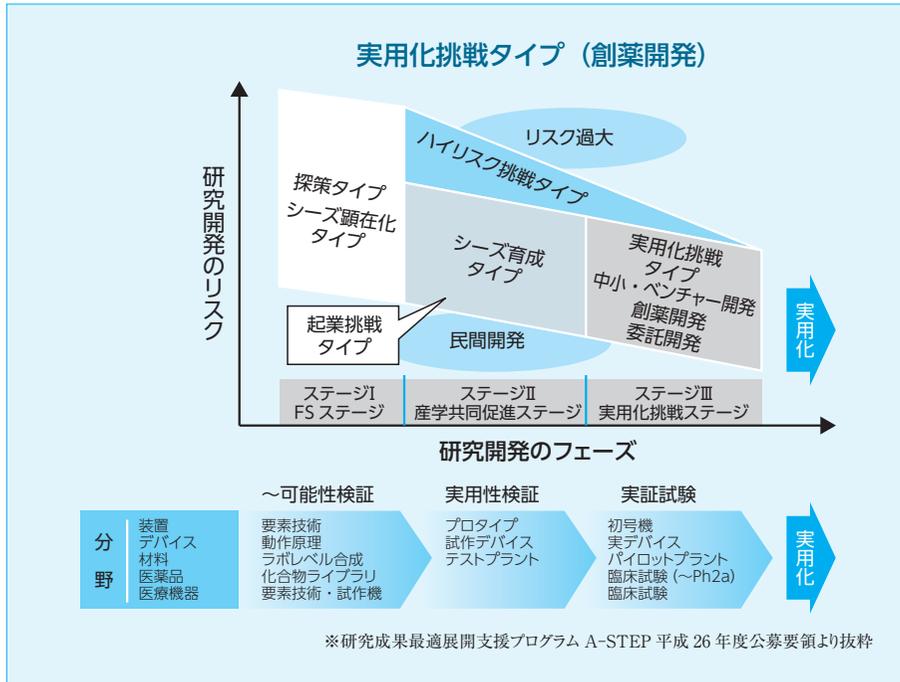


図1 A-Step制度概要

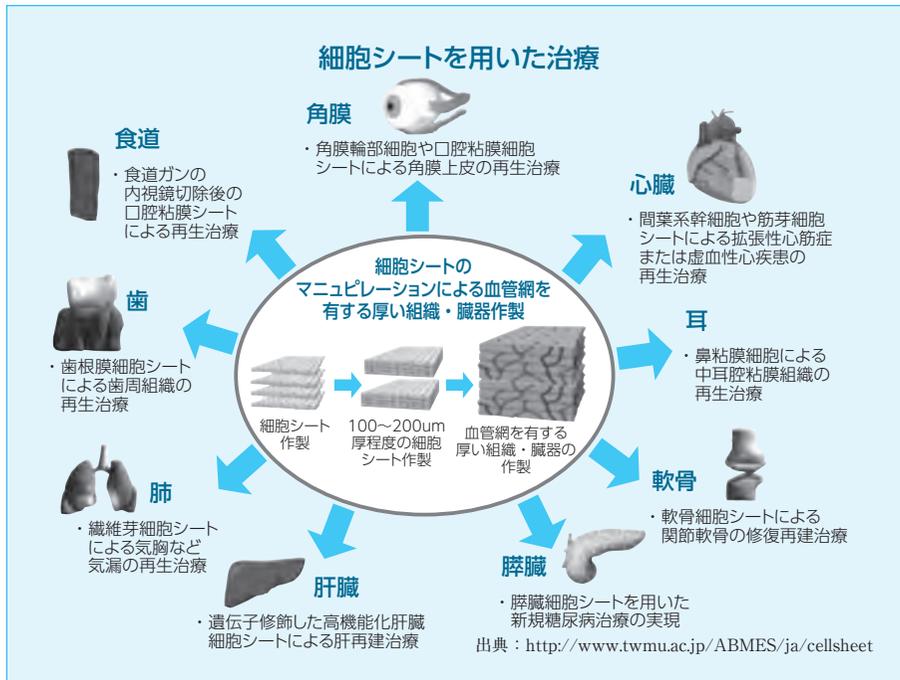


図2 細胞シートを用いた臨床治療

目的とした自動製造システムの開発も行われており、当該プロジェクトでは製造仕様に応じて柔軟に必要な機能を有したモジュール構成を自由に組み替えられる全自動の細胞シート製造システムである組織ファクトリー ([https://www.youtube.com/watch?v=VFzIeObs\\_aM](https://www.youtube.com/watch?v=VFzIeObs_aM)) を設計し、前臨床での細胞シートの自動製造プロセスの構築と検証を行い、プロジェクト終了後の現在は、複数のプロジェクトにその概念と要素技術が引き継がれ、臨床用途に応用するための展開が推進されている。

### 創薬開発分野での細胞シート工学の応用

今回の A-Step では、新たな細胞シート工学の展開を目指し、特にシート積層化技術を用い、今までの臨床用途での展開に加え、創薬用途での細

胞シート工学の応用展開を狙い、先に述べた A-Step の実用化挑戦タイプ の支援テーマとして、「創薬開発における安全性・薬効薬理試験、疾患メカニズム研究に有用な細胞シート積層立体組織モデルの作製及び組織培養・計測システムの構築」を目的とした研究開発プロジェクトを推進することとなった (図3)。本プロジェクトでは出口のゴールとして、商品化を目指すものであり、今回は、創薬支援に使用可能な細胞シートの積層化による立体心筋組織モデル、立体肝組織モデルとし、これら立体組織モデルを均一、安定的に製造するために必要な、細胞シート積層化装置、及び組織培養システム、活動電位、筋収縮や代謝能の計測システムの開発を目指す。以下に詳細を記載する。

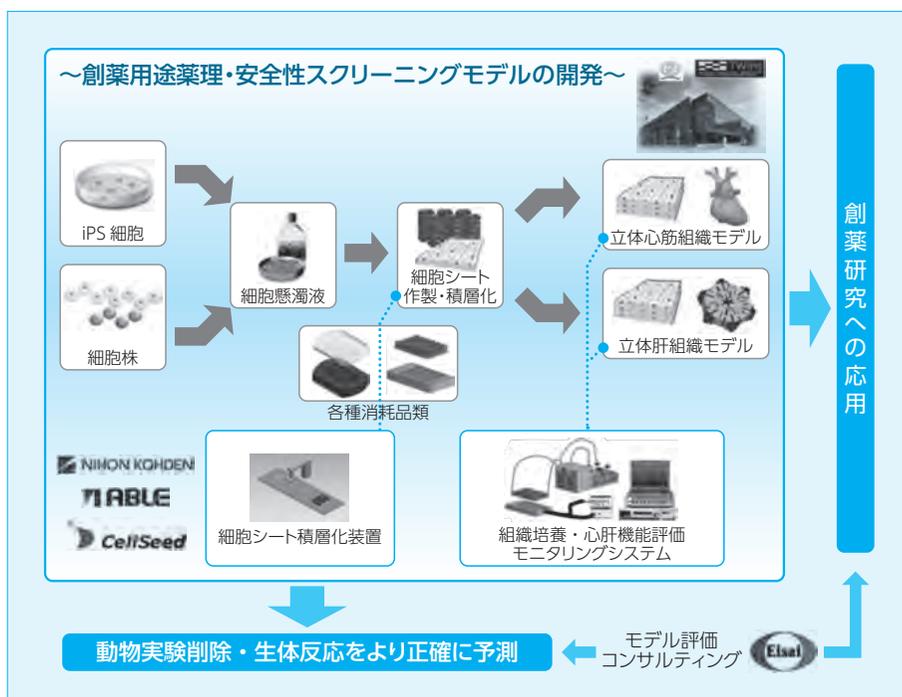


図3 積層化細胞シートを用いた創薬試験用立体組織モデル開発プロジェクト概要

## 創薬現場における背景

製薬会社等における創薬開発現場では、研究の遅延、後戻り、ドロップアウトなどの開発の失敗が生じることが多く、日本製薬工業協会によると創薬の成功率は「約30,000分の1」とされる(出典：製薬協DATABOOK 2012)。数多くの失敗の影響で、製薬会社等の研究開発コストは増大傾向にあり、1種類の新薬を開発するのに数百億円の投資が必要になっている。開発の失敗の主な要因は、①細胞単体での評価スクリーニング系と実際のヒト生体組織の差異、②動物実験とヒト臨床試験の差異等である。これらの差異を解消し、創薬の成功率を向上させ、研究開発コストを低減することが創薬開発現場で求められている。

通常、創薬開発は図4のような流れで行われ、複数の候補薬を並行して開発を進めているが、臨床試験フェーズで初めて副作用が判明することも

少なくなく、その場合は開発中断を余儀なくされる。そのことが開発費の高騰を招き、薬価の高額化の原因の一つとなっている。創薬開発の初期から薬の安全性、薬効が予測可能となれば、開発後期でドロップアウトする候補薬の数を減らすことができ、結果として開発コスト削減に貢献する。

一方、2006年のヒトiPS細胞の樹立以来、上記の問題を解決するための有力な手段として、ヒトiPS細胞由来体細胞を用いた安全性評価、薬効評価系技術が世界中で開発されているが、その多くは体細胞を平面培養した評価系に留まり、ヒトの生体内で起こる現象を正確に反映している系とは言い難い。生体は様々な細胞が三次元的に組織化された複雑なシステムからなっており、これを再現するヒト立体組織モデルの構築が解決策の一つと考えられている。

本プロジェクトにて開発する三次元組織モデルを作製することで、その中の①疾患メカニズム研究、及び③安全性・薬効薬理試験の各フェーズに

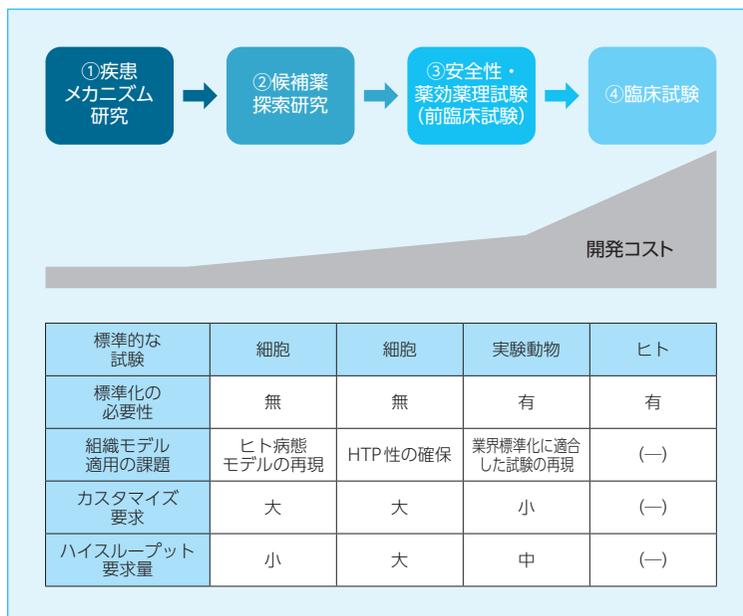


図4 創薬開発各フェーズにおける組織モデル適用の課題

て使用することを想定しているが、それぞれで要求される三次元組織モデルの仕様は異なる。①疾患メカニズム研究では、製薬企業・研究機関毎にカスタマイズできる立体組織モデルであることが要求される。一方、③安全性・薬効薬理試験で利用される三次元組織モデルは、製薬企業間で共通して利用できるよう標準規格化された立体組織モデルであることが求められる。供給数はある程度必要であるが、仕様は確定すればカスタマイズの必要性は低く、同一の製造工程で量産可能である。

本プロジェクトでは、まず第一に立体組織モデル製造システムを製薬企業等の創薬研究機関で使用することを想定したシステム開発を行う。さらに組織構築に必要な細胞シート積層化装置、培地灌流機能を有した組織灌流培養システムやそれに付随するスタンプ型積層デバイス、組織灌流ユニット(チャンバー、チューブ、培地調整槽等)等の周辺装置群、消耗品も開発する。装置群と消耗品類は製造システムとしてパッケージ化を図り、将来的なビジネスモデルの構築も検討する。

また、製造システムや立体組織モデルを販売するだけでなく、創薬における安全性、薬効薬理試験そのものを自ら受託するビジネスモデルも模索することも検討する。細胞シート工学の技術を用い創薬分野で生体と同等のヒト立体組織モデルが確立できれば、新薬開発における膨大な開発費が削減でき、安全性が高くより効果的な薬を安価で早期に世界に提供することが出来、これまでにない新薬の創出にもつながる。以下で具体的な開発モデルについて概略を述べる。

## 創薬用途細胞シート積層化 立体心筋組織モデルの作製

心臓は電氣的に同期して周期的な収縮・弛緩を繰り返すことにより全身に血液を送り出す臓器で

あるが、種々の薬剤が催不整脈作用や心筋障害作用を有することが知られている。従って、創薬開発においてそれぞれの薬剤の心臓に対する電気生理学的特性や力学的特性を詳細に解析することが求められている。これまでに単一心筋細胞や心筋細胞塊を用いたQT延長等の電気生理学的な評価モデルが報告されているが、組織としての電気伝搬速度評価や心筋収縮力に代表される力学的組織評価は達成されていない。すなわち通常の培養器材上に接着している心筋細胞を用いた評価モデルでは、生体のように組織全体としての電氣的興奮ならびにそれに引き続く収縮弛緩の再現は困難である。そこで本プロジェクトではヒト心筋細胞シートの積層化により、生体に近似した状態での電気伝搬速度や収縮力の測定が可能なこれまでにない立体組織モデルの構築を行う。まず、細胞シート積層化工程を機械化する自動細胞シート積層化装置を開発し、操作者間のばらつきを防ぎ、均一・高密度な立体心筋組織を安定・大量に作製する基本技術を獲得する。作製した組織は培地灌流機能を有する培養システムにて培養することにより、長期的に安定した薬剤評価系としてシステム構築を行う。さらに培養組織活動電位計測、心収縮機能計測機能を付加することにより、組織作製、維持培養、機能計測までを統合した薬剤評価システムを構築することを目指す。

作製した組織モデルは実際の顧客となる製薬会社に持ち込み、各種薬効・安全性試験に使用できるモデルとしての有用性を検証する。陽性対照物質としてすでに催不整脈作用を有することが知られているIkr阻害剤やIks阻害剤を用い、作製心筋組織のQT延長誘発の確認を行い、既存の動物細胞のhERGチャネル強制発現系やヒトiPS細胞由来心筋細胞単体での評価結果との相関を検証する。陽性対照物質とは抗不整脈薬として開発されていたが、強いIkr阻害、Iks阻害作用があるため、

開発が中止された。しかしながら、その阻害作用を利用したQT延長作用確認のAssay系における標準の陽性対照薬として製薬会社等では既に使用されているものである。

心収縮能に関しても同様に、心毒性を有する既知の抗がん剤などを用い、投与による収縮・弛緩能を、新規に開発する心収縮力測定システムにて解析し、心収縮機能を直接的に評価する系として確立する。さらに、既存の心収縮能に影響するCa<sup>2+</sup>チャネル(Cav1.2等)の活性度合いとの相関、組織の細胞密度、組織体積等を変数として変化させ、両パラメーターが薬剤応答に与える影響を評価することにより、直接的な心収縮能の検証モデルとしての有用性を示していく。

### 創薬用途細胞シート積層化 立体肝組織モデルの作製

肝臓は種々の物質の合成や分解など多くの機能を有している臓器であり、体液恒常性の維持に必須である。また、薬剤投与時には肝臓は薬剤を認識し、排除・分解を行うことでその代謝に大きく影響を与えている。したがって、創薬開発において肝臓に対する毒性ならびに薬剤代謝を詳細に解析することが求められている。これまでの静置平面培養では肝細胞の代謝酵素生成能力が著しく低下し、薬剤代謝に関わってくるCYP酵素活性の維持が困難であった。一方では(1)内皮細胞や線維芽細胞との共培養することや(2)細胞非接着培養皿により肝細胞凝集塊(スフェロイド)を作製し立体培養することでアルブミン産生能力が向上し、薬剤代謝に必要な酵素CYPを産出することが報告されている。そこで、細胞シート技術を使って生体内肝臓組織と同じ構造の内皮・肝・内皮細胞の三層構造立体組織を構築し肝細胞の機能を確認する。さらには、線維芽細胞シートとの共

培養も加えて検討し、多種多様な積層方法を試験して最もCYP酵素活性が向上したものを選択する。

具体的にラット初代培養器肝細胞、ヒト初代培養肝細胞やヒトiPS細胞由来肝細胞の細胞シートを積層した三次元構造を構築することによって薬剤代謝酵素の産出能の高い肝組織を構築する。さらに、肝組織由来の類洞内皮細胞などを含め様々な内皮細胞と線維芽細胞シートの共培養することにより、機能向上した立体肝組織を構築し機能の検討を行う。共培養する最適な細胞種、最適な培養液、最適な積層方法を検証し、生体に近い酵素活性の発現を目指す。また、女子医大にて既に開発されているPDMS製マイクロチップやコラーゲン灌流システムを使用し、酸素・栄養を持続的、安定的に供給することで肝組織機能を維持し、代謝酵素活性や肝毒性が確認できる長期安定する薬理試験システムを確立する。

また、細胞シート積層により構築した立体肝組織が安全性薬理試験モデルとして応用可能かどうかを評価するために、CYP誘導・阻害試験並びに肝毒性試験を行う。従来の静置平面培養、培養器材遊離型単層細胞シート(二次元培養)、スフェロイド培養(三次元培養)と比較してCYP酵素活性を測定し、細胞シート積層化により作製した立体肝組織の安全性薬理試験モデルとしての優位性を示す。

### 多連積層化立体組織 培養システムの開発

上記で作製した組織を用い、試験化合物の投入により変化する各種パラメーターを計測するシステムを開発する。組織モデルに依存しない共通なパラメーターとしてpHやDO、グルコース等を計測し、加えて心筋組織培養システムについては多チャンネルの培養組織活動電位計測、心収縮機

能計測を可能とするシステムとし、肝組織に関しては代謝化合物、酵素反応により生成される化合物を測定するための成分サンプリング機構を有したシステムとする。また、組織の適切な培養環境維持を目的として組織培養液を灌流させ、長期的に安定した薬剤評価系としてのシステム構築を行う。当初は単連の培養・計測システムであるが、最終的にはハイスループット評価に対応できる多連の組織灌流・計測機能付き培養システムとしてのシステムアップを行う。

## 開発経過

本研究開発がスタートして1年が経過しようとしているが、本年度では、まず、創薬用途に使用可能な心筋組織、肝組織の作製に集中した。心筋組織については、まず、積層化ラット心筋細胞シートの作製を通じ、シートの積層化技術の確立と組織培養、表面電位計測、心収縮能ができる測定系の開発を行った。また、作製した組織を用い、心筋細胞シートの表面電位計測を行い、簡易的に催不整脈作用のある陽性対照薬剤を作用させ、薬剤応答試験を実施し、不整脈誘発作用の確認を行った。

さらに心収縮能の計測系については、ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの拍動にともなう収縮力を数日間安定に連続計測することに成功し、本システムを用いて、心毒性を有することが知られている抗癌剤の添加がヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの収縮力と拍動数に及ぼす影響を、時系列的に計測した。

肝組織においては、まず、ラット由来の肝細胞を用いてシート状に回収可能かの検討を行い、回収した肝細胞シートの機能性を解析するため、アルブミン産生能の経時的測定を行った。さらに、

肝細胞シートをラット由来の類洞内皮細胞シートで挟み込み、三層構造立体組織を構築し、アルブミン産生能の経時的測定を行った。結果、通常培養においてはアルブミン産生能が著しく日々低下していくものに対して、肝細胞シートのアルブミン産生能は1週間程度上昇し続けた。さらに、三層構造立体組織は培養2週間以上経過してもアルブミン産生能は上昇し続けたのを観察した。

## おわりに

細胞シート工学の技術を用いることで、創薬分野で生体と同等のヒト立体組織モデルが確立できれば、新薬開発における膨大な開発費が削減でき、安全性が高くより効果的な薬を安価で早期に世界に提供することが出来、これまでにない新薬の創出にもつながると考えている。さらに臨床にて強力に推進されている再生医療への応用に対しても獲得した技術を水平展開していくことで、細胞シート工学の可能性を広げていきたいと考えている。

本プロジェクトの採択時にはメンバーが総力を尽くして研究計画を練り、厳しい審査を経て無事採択に至った。研究開始後も途中成果の進捗を測るマイルストーンが設定され、丁度、本稿が発行される頃に前後してそのマイルストーンにて設定した課題進捗に関する評価会議が行われる時期である。現在プロジェクトメンバー全員でマイルストーンにて設定した課題を達成すべく全力を尽くしている。もちろん単に課題達成に留まることなく、細胞シートを利用した新しい分野での開発プロジェクトを成功させ、新規の価値創造を行うべく、メンバー一丸となって日々研究開発に邁進していこうと考えている。