

# ヒト iPS 細胞技術の実用化に向けた マイクロ流路デバイス

Marco Lindner, Georg Bauer

**要約：**ヒト iPS 細胞が樹立されて以来，再生医療や創薬への応用を目指した研究が世界中で行われている。これらの実現には，ヒト iPS 細胞を大量に培養し，分化させ，目的の細胞のみを選別する必要がある。培養から選別までには複雑な操作があり，コストもかかるためまだ実用化には至っていない。これらを簡便に行う手段の一つとしてマイクロ流路デバイスが注目されている。マイクロ流路デバイスは，時間やコストの低減，高い再現性，自動化の利点があり，細胞の培養や分離，濃度勾配の作製に使用されている。また，人工的に臓器を模倣することも可能であり，動物試験の代替法として薬剤のスクリーニングや安全性試験への応用も期待されている。本総説では，マイクロ流路デバイスにより可能となった最新のアプリケーションや，マイクロ流路デバイスに適した材料について解説する。

## 1. はじめに

今世紀になって，多能性幹細胞分野は著しく発展し，現在大きな期待が寄せられている。多種多様なヒト疾患の中で，特に特定の細胞機能が失われる疾患の治療

が可能になると考えられる。2001 年に，Donovan および Gearhart は多能性幹細胞の可能性を示し，「我々は胚から幹細胞を得る必要があるのか？」という倫理的な課題を提示した(1)。2006 年，山中伸弥教授らは，細胞を多能性状態にリプログラミングすることにより人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立しこの課題を解決した(2)。1 年後，さらに京都大学ではヒト成体細胞からヒト iPS 細胞の樹立に成功したことで(3)，世界中の研究者がヒト iPS 細胞の可能性を認識し，研究を開始した(4-7)。2006 年からの 10 年間で，タイトルに iPS 細胞が含まれている論文数は 1000 を超えており，この分野の進展がうかがえる (図 1)。

現在までに iPS 細胞に関して，特に神経細胞(8-10)，心筋細胞(11-13)，膵臓細胞(14, 15) の分化が詳細に研究されている。幹細胞研究の目標は創薬と臨床への応用であり，特に臨床応用については臨床への橋渡しの段階になってきている。2013 年，滲出型加齢黄斑変性症の患者にて iPS 細胞由来細胞シートの安全性について研究している高橋政代教授 (理化学研究所多細胞システム形成研究センター) により，ヒト iPS 細胞の移

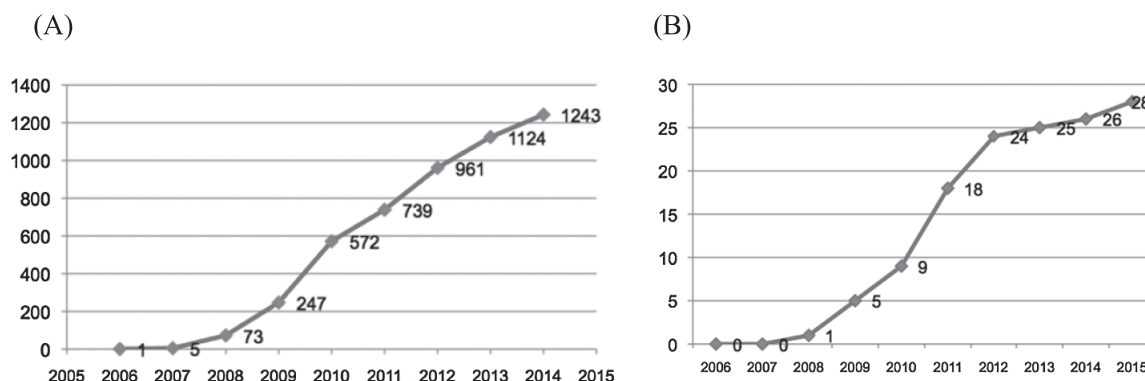


図 1 iPS 細胞に関する論文数と臨床試験の推移

(A) PubMed で「induced pluripotent stem cells」により検索した結果を示した。(B) clinicalTrials.gov において検索した結果を示した。

キーワード：マイクロ流路デバイス，ヒト iPS 細胞，organ-on-a-chip

STRATEC Consumables GmbH (Sonystasse 20, 5081 Anif/Salzburg, Austria)

E-mail: g.bauer@stratec.com 原稿受領日：2016 年 12 月 8 日，依頼原稿

Title: Accelerating practical applications of cutting edge human iPS cell technologies Author: Marco Lindner, Georg Bauer

植に関する臨床研究が世界で初めて開始された。さらに、2015年2月には京都大学病院にて、iPS細胞を使った臨床研究や臨床試験を推進するための「iPS等臨床試験センター」を2019年度に開設することが発表された。

分化細胞の機能を獲得し維持するためには幹細胞の微小環境が極めて重要である。2010年、van der Sandenらにより、ペトリディッシュやフラスコを使った細胞培養はすぐに時代遅れになるだろうと予想され(16)、近年の幹細胞用のマイクロ流路デバイスの開発により、これが真実であることが明らかになった(17-26)。マイクロ流路デバイスはヒトiPS細胞の応用を加速させ、夢を現実のものとするのが可能になりつつある。しかし我々は、研究室単位でのマイクロ流路デバイスをスケールアップし、実用化のためにiPS細胞由来分化細胞を大量に生産する必要がある。

本総説では、マイクロ流路デバイスにより可能となった最新のアプリケーションを示し、マイクロ流路チップに適した材料の概要を簡単に説明する。最初に、細胞培養をより有効にするための改善点について述べ、次に、細胞の代謝を直接モニターできる細胞培養の事例について述べる。3つ目の項目では、細胞の収集や精製に焦点を当て、微細構造が分化を促進し、より複雑な器官構造を形成する際にマイクロ流路デバイスが有用であるかを解説する。最後の項目では、複数のマイクロ流路デバイスを組み合わせ、人工的に臓器を模倣できるかについて説明する。

## 2. 幹細胞のためのマイクロ流路デバイス

マイクロ流路デバイスは、十から数百マイクロメーターのチャンネルを使い、少量( $10^{-9}$ から $10^{-18}$ リットル)の液体を処理あるいは操作するシステムである(27)。これらの主な利点は、少ないボリュームで、時間的に濃度を制御できることである。そのため、マイクロ流路を用いたアプリケーションがすでに幹細胞分野で多く作製されている。また、幹細胞の挙動が局所的な環境によって高度に制御されているため、マイクロ流路はあらゆる種類のアプリケーションに応用可能である(28)。ここでは、鍵となるアプリケーション(培養、分化、単離、スクリーニング)に焦点をあてる。

### 1) 培養と分化

驚くべきことに、ペトリディッシュは過去100年にわたって使用されてきたが、ほとんど進化が見られない。これは単に、ほとんどの人がペトリディッシュでの培養について疑問に思わなかった結果かもしれない。しかしながら、マイクロ流路デバイスシステムでの培

養では表面積対液量の基礎比率および培養液のpH、糖濃度、外気への露出、温度変化等を見直す必要があると考えられ、その主な利点は培養細胞にとってより自然な環境になること、ならびに実験のより高度な自動化と標準化につながると期待される。これにより、より高品質な結果につながり、細胞培養のコストを下げることになるだろう。

生物組織中の細胞のほとんどは均一ではなく、21 kPaの酸素分圧にもさらされていない。細胞はニッチな環境にあり、マイクロ流路のデザイン(構造、物質、化学物質の勾配、生体成分、ガス)によりこの微小環境を模倣することが可能である。

Shinらは、2次元や3次元での細胞培養を組み合わせたシンプルかつ頑丈なマイクロ流路アッセイを提示した(29)。マイクロ流路デバイスは、マイクロチャンネル間のハイドロゲル取込チャンバーから構成されており、生体内の多くの微小環境を再現している。濃度勾配は、層流(30-32)もしくは拡散の制御(33, 34)によって作られる。例えば、2005年にChungらは、神経幹細胞を増殖、分化させるための成長因子の混合物の勾配を作り出すマイクロ流路デバイスを開発した(35)。最近、Xiliang Tianらが、ラット骨髄由来シェワン様細胞を用いて、分化に必要な誘導因子の最適な濃度を報告した(36)。それには、上流に濃度勾配発生器があり、下流に細胞培養モジュールがある。2つの入口から培養液が流され、細胞の挙動に直接影響を与えるような設定された濃度変化が生じ、細胞培養モジュールに通じる枝分かれした蛇行チャンバーにより混合される。

もしマイクロ流路デバイスがペトリディッシュの代替となれば、細胞本来の代謝経路を探索するための一助を担うだろう。今日までの研究の大部分は、ディッシュでの培養により適切な細胞数を得ていたが、マイクロ流路デバイスを用いることで、単一細胞を個々に解析できる局所的な微小環境を作り出せるかもしれない。

### 2) 細胞の分離

現在、ほとんどのアプリケーションでは高品質の幹細胞を必要とし、それゆえ内在性の制御因子によるソーティングやiPS細胞由来分化心筋細胞で行われている乳酸選択培地などの環境要因を利用して高純度な細胞を分離する方法が必要となる(37, 38)。2013年、Qiushui Chenらは、フィーダー分離型共培養システムを用いたES細胞用のマイクロ流路単離システムを報告した(39)。細胞分離そのものは、すべて最適なパラメータ(サイズ(40)、電荷(41)、浮遊密度(42)、

免疫学的標識(43))によって行われる。2014年、KarabacakとSpuhlerらは、マイクロ流路デバイスを用いて全血サンプルから循環性腫瘍細胞(CTC)をマーカーフリーで単離することに成功し(44)、1 mLあたり1~10個のCTCが転移性疾患の患者の全血から見つけた(45)。最初に、決定性側方置換配列が全血(あらかじめCTC以外に結合する磁気ビーズでラベル)からわずかに大きいCTCを含む白血球を分離する。次に、慣性焦点により細胞を整列させ、磁気泳動によりCTCを分離することでマイクロ流路デバイスを用いた効果的な分離方法を可能にした。

細胞培養をディッシュから連続流通反応器に置き換えることで、再生医療用の細胞を大量に供給できるようになると考えられる。すでに、細胞工場として連続流通反応器が使用されているが、そのようなシステムを用いた細胞の分離に関する発表はほとんどなかった。連続流通反応器は、純粋なセルソーターのような細胞の分離機能とは構造が違い、むしろ閉ループ(細胞播種、培養液投入から細胞の排出、連続した代謝産物の除去)となっている。再生医療には治療をする上で必要な量を確実に供給しなければならないため、細胞分離機能のスループット性は、前例がないほど高レベルである必要がある。

### 3) スクリーニング

局所的な微小環境を再現することは、細胞の分化だけでなくスクリーニングへの応用にも重要である。例えば、ヒト肺細胞は、組成が化学的に明らかな培養液

や可変性のガス圧にさらされているが、呼吸による機械的なストレスも受けている。Wyssらは、細胞が吸着する伸縮性多孔質膜を使うことで、この挙動を模倣することに成功した(46)。この膜は柔軟な物質から作られ、定期的に伸ばすことが可能である。2つの異なる流路を形成する多孔質膜上で細胞を培養し、両側のチャンバーに対してガス圧を負荷することで膜が進展する。

また、C. Paoloらは、マイクロ流路で神経ネットワークにおけるヒトiPS細胞由来神経細胞の反応性について研究している(47)。細胞体を中心に置き、軸索と樹状突起は障壁を通過できるように連結する。このデバイスには、マイクロ流路および神経細胞を刺激するための電極を組み合わせており、一つのデバイスで反応性を記録することが可能となっている(図2)。このデバイスを用いて、神経細胞の伝達や回路形成に対する痛みの影響、炎症メディエーターの研究が進められている。

### 4) 組み立てと工業化

ヒトiPS細胞に使用するマイクロ流路チップのほとんどは、ポリジメチルシロキサン(PDMS、光学的に透明で柔らかいゴム状弾性物質)にUVリソグラフィ技術を用いてリソグラフィを刷り込むことにより開発されている。George Whitesidesらによって開発された技術を元に(48)、研究室レベルで取り扱いの簡便性、生体適合性、ガス透過性などの特徴を持つPDMSの開発が盛んに行われている。PDMSの代わりとなるものとしては、ガラスプラットフォームがあり、これはよ

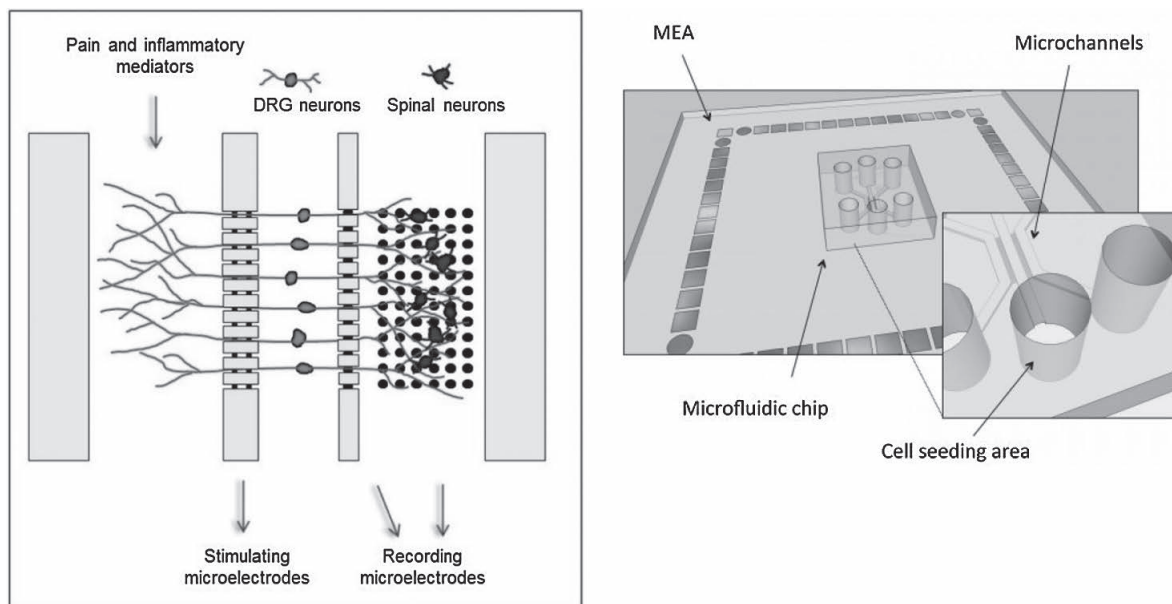


図2 MEAFLUIT システムの模式図

マイクロチャネルを介して、相互に連結した別のマイクロ流路チャンバーを含む MEAFLUIT システムの機能原理を示す。これらの機能に基づいて、神経細胞の区画化が可能になる。



り光学的で機械的な特性を与えるため、蛍光顕微鏡や長時間のモニタリングなどの実験に不可欠である(49)。残念ながら、これらの材料は大規模な製造にほとんど適していないため、ここ数十年にわたって、アクリル樹脂、ポリカーボネート、ポリスチレンがマイクロ流路チップの材料として使用されてきた(50, 51)。これらのポリマーは費用対効果が高くスケールアップ技術に利用できる。しかしながら、蛍光タンパク質の発見や新たな光学システムの開発が進んでもこれらポリマーが自家蛍光を発するため、現状で応用は難しいと考えられる。環状オレフィン・コポリマー (COC) の種類の増加は、ヒト iPS 細胞用マイクロ流路デバイスにとって理想的な材料になりうる性質を有している。その光学特性は、様々な点(優れた透明度、低複屈折、高アッペ数、高い耐熱性)でガラスに相当する。さらに、生体に適合しやすく滅菌可能であり、化学耐性を持ち、高アスペクト比特性を可能にしている(52)。COC はガス透過性ではないため、COC の利点が他のポリマーやシリコンのデメリットを大きく上回ると考えている。将来、COC を原料とする消耗品が自動的に生産され、並列化および再現性のある実験を可能にするとともに、複雑な生物学的パラメータを扱う問題点を最小限にするだろう。さらに、拡張可能かつ GMP 準拠においてヒト iPS 細胞由来分化細胞を作り出すことができるようになり、ヒト iPS 細胞の実用化の道を切り開くと考えられる。

### 3. 結論

以上述べてきたように、マイクロ流路技術はヒト iPS 細胞技術に大きな可能性を与えると考えられる。本総説においては、マイクロ流路によって可能となる4つの最先端のトピックと実際のアプリケーションを中心に記述した。さらにこれらのアプリケーションを工業化する努力を行うことにより、将来的にヒト iPS 細胞研究の実用化が飛躍的に加速することが期待される。

**謝辞:** 諫田泰成博士および久保祐亮博士(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部)のサポートに感謝申し上げます。

**著者の利益相反:** Marco Lindner, Georg Bauer (STRATEC Consumables GmbH)。

### 文 献

- 1) Donovan PJ, et al. *Nature*. 2001;414:92-97.
- 2) Takahashi K, et al. *Cell*. 2006;126:663-676.
- 3) Takahashi K, et al. *Cell*. 2007;131:861-872.

- 4) Park IH, et al. *Nature*. 2008;451:141-146.
- 5) Yu J, et al. *Science*. 2007;318:1917-1920.
- 6) Okita K, et al. *Science*. 2008;322:949-953.
- 7) Stadtfeld M, et al. *Science*. 2008;322:945-949.
- 8) Sonntag KC, et al. *Stem Cells*. 2007;25:411-418.
- 9) Kirkeby A, et al. *Cell Rep*. 2012;1:703-714.
- 10) Alper J. *Nat Biotech*. 2009;27:213-214.
- 11) Laflamme MA, et al. *Nat Biotech*. 2007;25:1015-1024.
- 12) Yang L, et al. *Nature*. 2008;453:524-528.
- 13) Nunes SS, et al. *Nat Methods*. 2013;10:781-787.
- 14) Kelly OG, et al. *Nat Biotech*. 2011;29:750-756.
- 15) Chen S, et al. *Nat Chem Biol*. 2009;5:258-265.
- 16) Van der Sanden, et al. *J Cell Biochem*. 2010;111:801-807.
- 17) Shin Y, et al. *Nat Protoc*. 2012;7:1247-1259.
- 18) Chen Q, et al. *Anal Chem*. 2012;84:1695-1701.
- 19) Chen Q, et al. *Lab Chip*. 2012;12:5180-5185.
- 20) Kim C, et al. *Lab Chip*. 2011;11:874-882.
- 21) Ertl P, et al. *Trends Biotechnol*. 2014;32:245-253.
- 22) Khademhosseini A, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2480-2487.
- 23) Huh D, et al. *Science*. 2010;328:1662-1668.
- 24) El-Ali J, et al. *Nature*. 2006;442:403-411.
- 25) Zhu Z, et al. *Lab Chip*. 2012;12:3907-3913.
- 26) Zhang H, et al. *Lab Chip*. 2007;7:1162-1170.
- 27) Whitesides GM. *Nature*. 2006;442:368-373.
- 28) Morrison S, et al. *Cell*. 2008;132:598-611.
- 29) Shin Y, et al. *Nat Protoc*. 2012;7:1247-1259.
- 30) Kenis P, et al. *Science*. 1999;285:83-85.
- 31) Takayama S, et al. *Nature*. 2001;411:1016.
- 32) Mark D, et al. *Chem Soc Rev*. 2010;39:1153-1182.
- 33) Opegard S, et al. *PLoS One*. 2009;4:e6891.
- 34) Toley B, et al. *Biotechnol Prog*. 2011;28:515-525.
- 35) Chung BG, et al. *Lab Chip*. 2005;5:401-406.
- 36) Tian X, et al. *PLoS One*. 2012;7:e42804.
- 37) Shi Y, et al. *Cell Stem Cell*. 2008;3:568-574.
- 38) Sato N, et al. *Nat Med*. 2004;10:55-63.
- 39) Chen Q, et al. *Sci Rep*. 2013;3:2433.
- 40) McGrath J, et al. *Lab Chip*. 2014;14:4139-4158.
- 41) Wachtel S, et al. *Hum Genet*. 1996;98:162-166.
- 42) Bøyum A. 1974;4:269-274.
- 43) Baumgarth N, et al. *J Immunol Methods*. 2000;243:77-97.
- 44) Ozkumur E, et al. *Sci Transl Med*. 2013;5:179ra47.
- 45) Miller MC, et al. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
- 46) Huh D, et al. *Nat Protoc*. 2013;8:2135-2157.
- 47) Lehmann H, et al. *Neuartiger Biochip für Wirkstoffsuche bei neuronalen Erkrankungen*. <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/aktuell/neuartiger-biochip-fuer-wirkstoffsuche-bei-neuronalen-erkrankungen/> (2016)
- 48) Xia Y, et al. *Annu Rev Mater Sci*. 1998;28:153-184.
- 49) Sneddon JB, et al. *Nature*. 2012;491:765-768.
- 50) Ni M, et al. *Int J Mol Sci*. 2009;10:5411-5441.
- 51) Ma LA, et al. *Biomed Microdevices*. 2010;12:753-760.
- 52) Hupert ML, et al. *Microsyst Technol*. 2014;20:1815-1825.

### 著者プロフィール

#### Georg Bauer

◇ウィーン大学(オーストリア)にて博士号(生化学)を取得後、デルフト工科大学(オランダ)でポストドクを行う。その後、Sony DADC BioSciences 社の R&D 責任者として、研究から製品開発までを担当し、医療機器や医薬品市場に携わってきた。現在、ドイツのラボオートメーション化グループの Stratec Biomedical 社の役員として、43 人の技術者からなる多様なチームを率いて年間 30 件以上のプロジェクトを運営し、米国のバイオイノベーションと欧州の精密製造技術を連携している。

