

創薬のための細胞アッセイデバイス

金森 敏幸*・杉浦 慎治

バイオの時代？！

19世紀は化学の時代、20世紀は物理の時代、そして21世紀はバイオの時代と言われている。確かに新聞の第1面をバイオ、特に生命科学に関する記事が飾ることが多くなっているし、これまでバイオにはあまり関係がなかった学会でも、バイオ関連のセッションや発表が激増している。これまでバイオには無関係だった企業も新しい事業展開先としてバイオに注目しているが、イメージしているのがブロックバスター、つまり大型新薬であることに驚かされることがある。つまり、バイオにあまり詳しくない企業にとって、バイオはまさに新天地であって、そこには巨万の利益があるはずだ、というわけである。

私たちは、所属機関のミッションの関係で、実用化や産業化の視点を常に求められている。その立場でこの分野を俯瞰すると、いま市井が注目している「バイオ」がどのように産業に結びついていくのかについては、明らかになっていないことが多いように思える。日本の大手製薬企業はもとより、メガファーマにとっても、いわゆる2011年問題を境にもはやブロックバスターは夢とさえ言われている中で、一研究室が創薬そのものを研究テーマにすることは無謀すぎる。しかしながら、製薬企業の研究投資は他の製造業に比して極端に高く、国内大手10社の総売上上に占める研究開発費の割合は平均18.9%（日本製薬工業協会調べ、2010年）であることから、創薬支援がバイオ関連研究の現実的な落とし所の一つであろうと考えている。

創薬支援技術としての細胞アッセイ

上市された新薬1剤当たりの開発費は887億円と報告されており¹⁾、「儲かる薬をいかに探すか」と同時に、研究開発の効率化、コストダウンの必要性が世界中で議論されている。その解決法の一つとして、動物細胞を用いた医薬品アッセイ（cell-based assay、以下、細胞アッセイ）に注目が集まっている。ES細胞やiPS細胞など幹細胞の研究が盛んになったことにより、培養細胞に関するさまざまな知見が得られたことが根底にあると思われる。

創薬・医薬品開発のプロセスの概要と細胞アッセイの位置づけを図1に示す。いわゆる候補化合物ライブラリから選び出されて非臨床試験に移行する確率は、1/2790とのことである²⁾。非臨床試験から臨床試験へ移行できる確率は1/2.43であり、承認申請に至るのはさらに1/2.37と絞り込まれる²⁾。次のステップに移行できず、開発打ち切りとなると、それまでに掛かった経費はまったく無駄になるし、非臨床までとそれ以降にかかる研究開発経費の比率は3:7ということであるので¹⁾、臨床試験で開発中止となった場合の研究資源（資金および人員、時間）の損失はきわめて大きい。

したがって、細胞アッセイに求められるのは、臨床試験の結果をどれだけ予測しうるか（外挿性の確保）、である。どのような原因で臨床試験が中止になっているかについては、図2のような報告がある³⁾。1991年に全体の40%を占めた生物学的利用能（bioavailability、投与された薬剤が対象となる臓器・組織にどれだけ到達するか）は、その後の薬物動態学の発展、普及によって解消され、むしろすでにスクリーニング方法が確立されていると考えられてきた毒性が問題となっている。これは、被験者の個体差の問題と、近年、患者の多くが複数の薬剤を投与されていることが主な原因である。また、「営業上」とは、開発期間が延びたために他社に類似薬剤を先行発売され、上市しても予定していた収益が得られない、という理由が中心であるそうだが、この点において

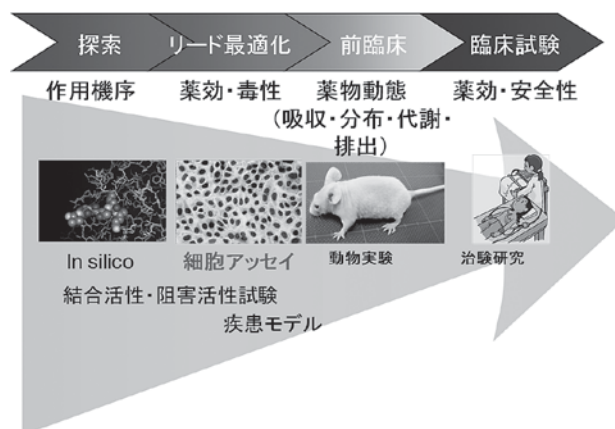


図1. 創薬・医薬品開発のプロセスの概要と細胞アッセイの位置付け

*著者紹介 独立行政法人産業技術総合研究所幹細胞工学研究センター医薬品アッセイデバイスチーム（研究チーム長）
E-mail: t.kanamori@aist.go.jp

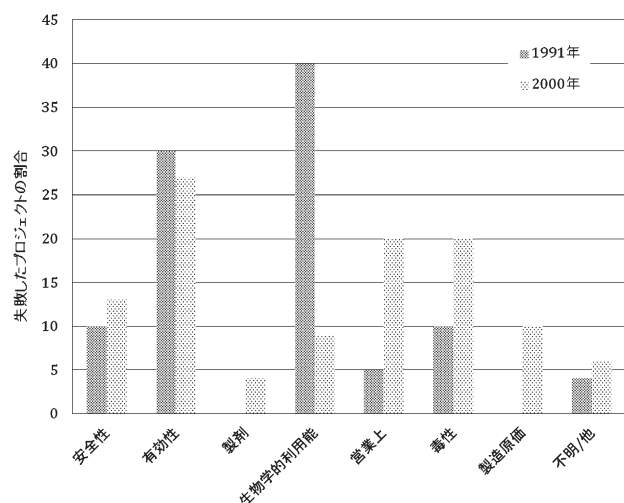


図2. 臨床試験中止の要因

も創薬プロセスの効率化が求められる。有効性、すなわち薬効を臨床試験前の段階でどのように評価しているかは製薬企業のトップシークレットで、外部の人間は（聞くところによると、同じ製薬企業でも他の部署の人間も）情報をほとんど得ることはできない。

マイクロプロセスの応用

細胞アッセイでは、1) 何をアッセイするのか？（評価対象）、2) どうやってアッセイするのか？（評価・測定技術）、3) どんな細胞を使うのか？、4) どうやって細胞に機能を発現させるのか？を考える必要がある。ヒトiPS細胞は3)の視点で注目されており、山中先生も実用化については創薬分野への応用がもっとも現実的であろうと述べられている。4)についてはあまり重要視されておらず、これはiPS細胞の研究にも通じるところであるが、遺伝子さえ発現させれば（広い意味で現在のエピゲノム研究も含めて）目的が達せられるという前提の研究が王道であろう。セントラルドグマ、あるいは、ジェノミクスにいまだに縛られているのかも知れない。

そんな中で、主に化学工学の（海外ではDepartment of Chemical Engineeringで教育を受けた）研究者が中心になって、細胞培養の環境を精密に制御することにより、細胞の機能を発現させられないか？という視点で研究が行われている。細胞を一つの反応装置（あるいは化学工場）と考えれば、その周囲（外部）との物質や熱、あるいは運動量の遣り取りが異なればその内部の化学反応も違ってくるであろうという考えは、化学工学の教育を受けた者にとっては当然のこととして受け止められる。生物工学的に言えば、ディッシュやフラスコ内と組

織内とでは、細胞が置かれている環境はまったく異なっているのではないか、ということになる。

細胞の大きさがたかだか数十 μm であることを勘案すると、細胞の培養環境を精密に制御するためにはマイクロプロセスが必要となる。20年近く前にMEMS (Micro-Electro Mechanical Systems) の研究が盛んになり、その応用先の一つとして微量・精密分析やLab on a Chipが注目され、この分野の世界的な学会としてInternational Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences（通称MicroTAS）が設立された。毎年1回開かれる学術集会ではバイオに関する発表の割合が年を追うごとに増加しており、今年度は2/3がバイオ関連、その半分が細胞を取り扱ったものであった。

マイクロプロセスは集積化に有利であり、創薬分野では必須なハイスループット化が容易であることに加え、高価な試薬や貴重なサンプル（細胞）の使用量を削減できるメリットも大きい。

以上の視点からマイクロプロセスを利用した新しい細胞アッセイ技術を開発している研究グループは国内外に多数あるが、我々の研究を例にあげて、この分野の現状と今後の展望について述べたい。

機能集積型灌流培養チップ

細胞の培養環境のうち、まず我々は培養液の「流れ」に着目した。従来のディッシュによる培養では、定期的に培地交換するにせよ、濃度境膜⁴⁾によって酸素や栄養素が不足しているのではないかと、また、それらの濃度が経時的に変化することが細胞に何らかの影響を与えているのではないかと、という仮説に基づいている。

通常のディッシュによる静置培養で酸素が足りているかどうかについては議論があるところであるが、そもそも一体ヒトの細胞がどの程度酸素を消費するのか、反応工学的に検討している研究は非常に少ない。我々が見積もったところでは、少なくとも初代肝細胞については一般的に考えられているよりも遙かに酸素消費量が多いと思われる⁵⁾。東京大学生産技術研究所の酒井らは、マイクロチップを用いた巧妙な実験により、ヒト膀胱癌由来株化細胞MIN6-m9について、通常のディッシュでの静置培養では決定的に酸素が不足していることを明らかにしている⁶⁾。

そこで我々は、培地を灌流しながら細胞を培養できるチャンバーを開発した⁷⁾。さらに、そのチャンバーに細胞を導入し、任意の関数に従った濃度の薬液を含む培地をチップ上で自動的に調製する機構を組み込んだ機能集

積型灌流培養チップを開発した。このチップでは、12種類の薬剤についてチップ上で自動的に8種類の濃度の培地を調製し、それぞれについて4つの培養チャンバーに灌流できるため、 $12 \times 8 \times 4$ で384点のアッセイが一つのチップ上で可能となる。これは、現在の細胞アッセイの主流が384ウェルプレートであることを意識した。同時に、このチップを半自動的に操作することができる装置も開発した。これを用いてHepG2（ヒト肝癌由来の株化細胞）により制がん剤paclitaxelのIC50を求めたところ、マルチウェルプレートを用いた場合と同等の結果を得た⁸⁾。

この技術をさまざまな学会や展示会などで紹介したが、残念ながら製薬企業にはほとんど興味を持たれなかった。これは考えてみれば当たり前のことで、製薬企業は巨額の設備投資を行い、マルチウェルプレートとロボティクスの組合せによるHTSのパイプラインテクノロジーを導入している。したがって、我々が提案した技術が既存の技術を圧倒的に凌駕しない限り、置き代わることは不可能であり、試験的にさえ使ってもらえない。既存の技術のimprovementでは駄目で、技術開発はまさにinnovativeでなければならないと思い知った。

スフェロイドチップ

北九州市立大学の中澤は、直径数百 μm の円筒を多数配列した平板をディッシュの底に沈め、細胞懸濁液を導入して培養すると円筒内で細胞が自発的に球状組織（スフェロイド）を形成し、さまざまな臓器特異的機能が高発現することを見いだした⁹⁾。この技術はベンチャー（STEMバイオメソッド）によって製品化されている。また、筑波大学の長崎によって同様な技術が開発され、トランスパレントによって商品化された（現在は親会社である東洋合成工業が販売している）。安全性評価研究会スフェロイド分科会では、これらの技術によりヒト初代肝細胞から形成させたスフェロイドについて肝特異的機能の評価および薬物代謝実験を行い、その結果を第38回日本トキシコロジー学会（2011年7月13日）にて報告している。

それによると、単層培養に比べ確かに機能は向上しているものの、機能の長期間維持、および、肝細胞のロット間差の解消という、もっとも期待された効果は得られなかった。それに加え、同じロットを用いた場合でも施設間での差が大きいため、フィーダー細胞が必要（トランスパレント）、スフェロイドごとの評価ができない（STEMバイオメソッド）などの問題点が指摘されている。

中澤らは得られるスフェロイド径がマイクロウェルの

形状によって決まることを見いだしているが¹⁰⁾、我々はこの現象がスフェロイド径の増加に伴ってスフェロイド中心部が酸素不足になることによると考察した¹¹⁾。そこで、閉鎖空間に中澤のマイクロキャビティを組み込んだ灌流培養チップを開発し、HepG2を用いて灌流培養実験を行ったところ、灌流速度に応じてスフェロイド径（細胞数）が増加する結果を得た¹²⁾。この結果に基づき、安全性評価研究会スフェロイド分科会で見いだされた問題点の解決を目指し、現在は同様のチップを用いてヒト初代肝細胞の灌流培養を行い、モデル基質の代謝実験を行っている¹³⁾。

共培養の効果

目的とする機能を発現する細胞と一緒に別の細胞を培養すると、当該細胞だけを培養した時には期待できなかった機能が発現することは多数報告されている。たとえば、前述の中澤は、ラット初代肝細胞から形成させたスフェロイドの周囲に3T3細胞（マウス由来繊維芽細胞）を培養すると、ラット初代肝細胞のみの単層培養、あるいはそのスフェロイド培養に比べ、肝特異的機能が非常に長く持続発現することを報告している¹⁴⁾。我々もHepG2細胞のスフェロイドの周囲に3T3細胞を培養することにより、HepG2細胞では期待できなかったcytochrome P450の活性が発現することを見いだしている¹⁵⁾。HepG2細胞と3T3細胞を同じ比率で混ぜて培養したランダム共培養では機能が発現しないことから、制御された空間的配置が必要であることが示唆されている。

共培養が機能発現を誘導するメカニズムについては、細胞同士の接着と、液性因子を介してのシグナル伝達が推測されるが、Bhatiaらはマイクロチップを用いた巧妙な実験により、それぞれが時系列的に働くことを見だしている¹⁶⁾。

以上のように、フィーダー細胞を用いた共培養は目的とする細胞の機能発現誘導に効果があることは判っているものの、薬剤に対するフィーダー細胞の反応を除外しきれないため、必ずしも歓迎されていない。

今後の方向性

細胞の半数致死濃度を求めたり、増殖曲線への影響を評価するといった、比較的雑ばくな薬剤の毒性試験は、既存のマルチウェルを用いた方法でさほど大きな問題点はないようである。現在注目されているのは、リプロセル¹⁷⁾や東京医科歯科大学の安田らが報告している、培養心筋細胞によるQT延長評価系である^{18,19)}。また、神

経毒性も医薬品開発において問題になることが多く、細胞による効果的なアッセイ/評価系の確立が望まれるため、多数の研究が報告されているが、使い勝手、スループット、および臨床実験との対応などの点において、まだまだ改善の余地がある。

薬物体内動態のADME (Absorption: 吸収, Distribution: 分布, Metabolism: 代謝, Excretion: 排泄) の各過程が細胞アッセイで評価できないか、という期待が大きい。たとえば、腸管の吸収についてはCaco-2を多孔性のメンブレンフィルター上に培養した系が確立されていて、製品にもなっている²⁰⁾。経口投与される薬剤は必ず肝臓で代謝を受けるので、肝細胞を用いた代謝試験は創薬において必須である。我が国ではヒト肝細胞を入手するルートが確立されておらず、医薬品代謝試験に用いるヒト肝細胞は、ほぼすべてが凍結されて輸入されたものであるため、「スフェロイドチップ」の項で述べたような問題がある。これを解決するために、スフェロイドや共培養など、さまざまな培養技術を駆使した研究が報告されているが、EMD Millipore Corporationが供給を開始したHepaRG細胞²¹⁾や、フェニックスバイオがキメラマウスを用いて作製するヒト肝細胞²²⁾では、それらの問題点が克服され、かつ、安定供給される可能性を秘めている。排泄系については、腎排泄系を確立するにはネフロンそのものをミミックせざるを得ず、tissue engineeringのさらなる発展を待つ必要がある。胆汁排泄については、ジェノメンブレンが販売しているB-CLEARという製品²³⁾が知られているが、これは肝細胞間に形成されるbile pocketといわれる極微小空間に蓄積される胆汁を採取するもので、操作性や測定条件が限られる点から、普及しているとはいいがたい。California大学のLeeらや東京大学生産技術研究所の藤井らは、マイクロ流体デバイスで肝実質細胞を巧妙に配置、培養することにより、胆管の形成と胆汁の生成が確認されたと報告しており^{24,25)}、排泄された胆汁を回収した例も報告している²⁶⁾。今後の進展が期待される。

以上述べたような状況において細胞アッセイが今後進むべき方向の一つは、薬理/薬効のアッセイへの応用であろう。ただし、前述の通りこの分野については情報の入手がきわめて困難であり、秘密保持契約や共同研究契約などが必要になるであろうが、そこに至るまでの技術開発をどうしたら良いのかという、言わば卵と鶏の問題がある。

そんな状況下で、我々が第一三共との共同研究により開発した剪断応力付加培養チップについて紹介したい。第一三共から我々に求められたのは、「HUVEC (Normal

Human Umbilical Vein Endothelial Cells: 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞) を通常のウェルで静置培養しても血管内皮特異的機能が出ないので、ヒト大動脈と同程度の剪断応力を掛けながら培養してみたい」ということであった。そこで、彼らが必要とする数の細胞を、任意の剪断応力を付加しながら培養するチップを開発した。その結果、付加する剪断応力が10 dyne/cm²を越えると細胞が流れ方向に伸びた紡錘形になり、eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase: 内皮型一酸化窒素合成酵素) の高発現など、血管内皮特有の反応が認められた²⁷⁾。さらに、使い勝手を改良し、プラスチック成形メーカーと共同研究により数百個単位のチップを試作し、第一三共でテストを行う予定である。我々は、彼らが何の目的でどの様に用いるかはまったく聞かされていないが、用いている細胞 (HUVEC) から類推すると、毒性試験でも代謝試験でもないと思われる。さらに言えば、この細胞チップの開発に当たって、使用目的を知る必要はなかった。

我々は、今後こういった形のアライアンスの組み方に期待している。しかしながら、そのためにはユーザー側から技術の提供側に、技術の提供側が判る形でrequirementsを提供して貰う必要があり、相互理解のためのプラットフォームが必要となる。この目的で、化学工学会バイオ部会の下に細胞アッセイ研究会を設け、活動している。

もう1点、世界的に見て今後重要となると思われる技術に、body on chip,あるいは、human on chipがある。恐らくこの概念を最初に提唱したのはCornell UniversityのShulerであろうが²⁸⁾、SFのように思われたこの技術に米国のNIH (National Institutes of Health) およびDARPA (Defense Advanced Research Projects Agency) が1億3200万ドルの研究費を拠出しており、Harvard大学のWyss Institute, Vanderbilt University, Massachusetts Institute of Technologyなどが精力的に研究を進めている²⁹⁾。この技術が完成すればwhole bodyでのADMEの*in vitro*評価が可能となるし、現在臨床治験で問題となっている多剤投与による有害事象を予想できるかも知れない。

いずれにせよ、body on chipのプロジェクトでも明らかのように、この分野では我が国は欧米に大きく水を掛けられており、産学の連携、そこに対する行政の支援が、強く望まれる。

文 献

- 1) 八木 崇, 大久保昌美: 医薬産業政策研究所 リサーチペーパー・シリーズ, No. 59, (2013).

- 2) 日本製薬工業協会, 「DATA BOOK 2003-2007」 (2007).
- 3) Frank, R. and Hargreaves, R.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 566 (2003).
- 4) 黒澤 尋: 生物学, **91**, 646 (2013).
- 5) Sumaru, K. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **20**, 127 (2004).
- 6) Shinohara, M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, DOI 10.1002/btpr.1837 (2013).
- 7) Sugiura, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 1156 (2008).
- 8) Sugiura, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **82**, 8278 (2010).
- 9) 中澤浩二: 動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス, P. 147, シーエムシー出版.
- 10) Sakai, Y. and Nakazawa, K.: *Acta Biomater.*, **3**, 1033 (2007).
- 11) Sumaru, K. and Kanamori, T.: *Biochem. Eng. J.*, **20**, 127 (2004).
- 12) 堺 裕輔ら: 化学工学会第77年会講演要旨集, C107 (2012).
- 13) 金森敏幸ら: 日本動物実験代替法学会第26回大会 S5-3 (2013).
- 14) Sakai, Y. and Nakazawa, K.: Abstracts of The TERMIS North America 2008 Annual Conference, P11 (2008).
- 15) Kikuchi, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 552 (2009).
- 16) Hui, E. E. and Bhatia, S. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5722 (2007).
- 17) <https://www.reprocell.com/>
- 18) <https://www.reprocell.com/ips/cardiomyocyte/qtempo/>
- 19) 安田賢二: 心電図, **30** (suppl. 4), 118 (2010).
- 20) [http://catalog2.corning.com/Lifesciences/ja-JP/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=354801\(Lifesciences\)&categoryname=ADMETox\(Lifesciences\)%7CPermeable+Supports\(Lifesciences\)%7CHTS+Systems\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/Lifesciences/ja-JP/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=354801(Lifesciences)&categoryname=ADMETox(Lifesciences)%7CPermeable+Supports(Lifesciences)%7CHTS+Systems(Lifesciences))
- 21) <http://www.millipore.com/catalogue/module/C103485&country=jp&lang=ja>
- 22) <http://www.phoenixbio.co.jp/activities/pxb/>
- 23) <http://www.genomembrane.com/B-CLEAR.html>
- 24) Lee, P. J. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 1340 (2007).
- 25) Nakao, Y. *et al.*: *Biomicrofluidics*, **5**, 022212 (2011).
- 26) Matsui, H. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 1857 (2012).
- 27) Hattori, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.* (in press)
- 28) Esch, M. B. *et al.*: *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **13**, 55 (2011).
- 29) <http://www.nbcnews.com/science/federal-agencies-kick-132-million-effort-create-human-chip-908660#federal-agencies-kick-132-million-effort-create-human-chip-908660>