

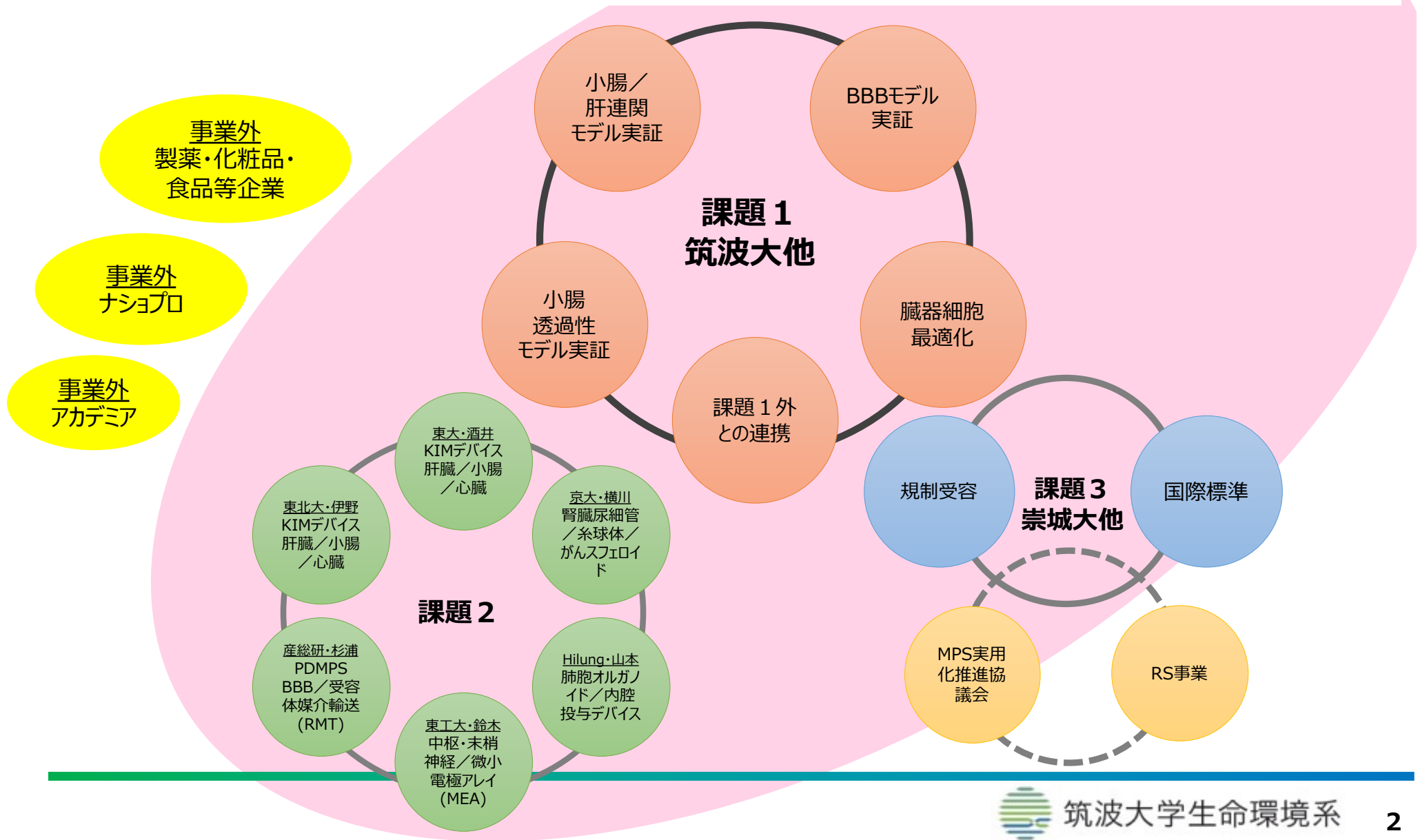
MPS2の紹介と関連性について

筑波大学 生命環境系
伊藤 弓弦



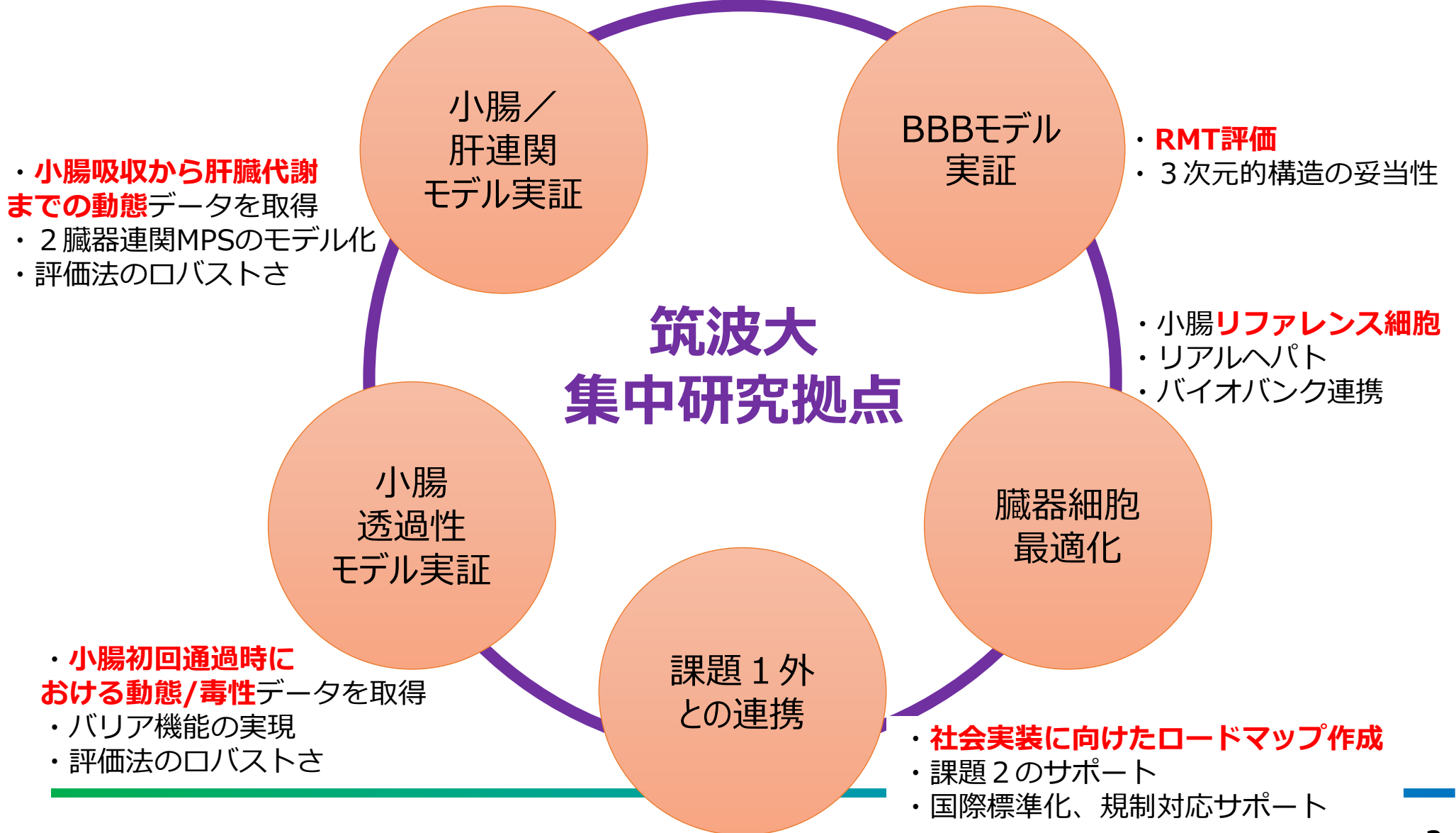
『AMED-MPS2』事業の全体像

iPS細胞等からの分化誘導やオルガノイド等の再生医療技術を活用して作製したヒト臓器細胞等を用いて、生体模倣システム（MPS）による創薬支援ツールを開発する。



課題 1 内容

「ユーザーからの採用」「社会実装とレギュラトリーアクセプタンス」という観点を基に、明確化された課題を集中研及び分担研究者で解決。



筑波大学 集中研究拠点 (Joint Center for MPS Research)

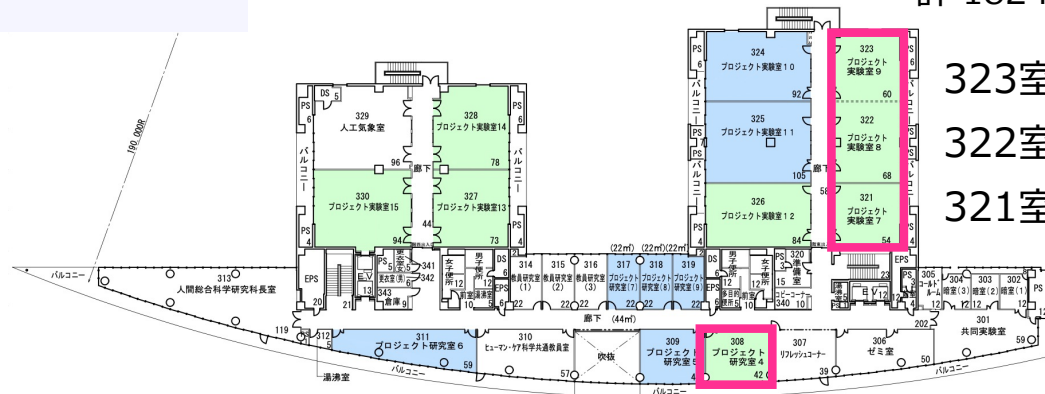
所在

筑波大学 筑波キャンパス 総合研究棟D 3階



実験室

P2対応予定
計 182 m²



323室

322室

321室

解析室 42 m² 308室

人員

拠点長	1名
事務局長	1名
知財PD	1名 (R5着任予定)
研究員	7名
事務員	2名

主要機器

細胞培養用機器一式
リアルタイムPCRシステム
プレートリーダー
蛍光顕微鏡
位相差顕微鏡



*LC-MS/MS測定は東大/北里大で実施。

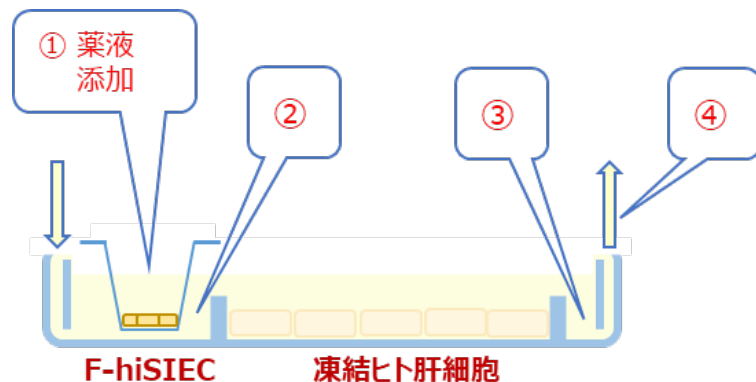
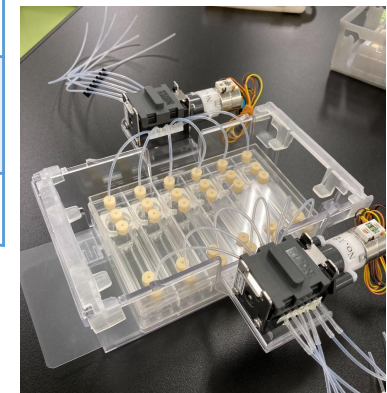
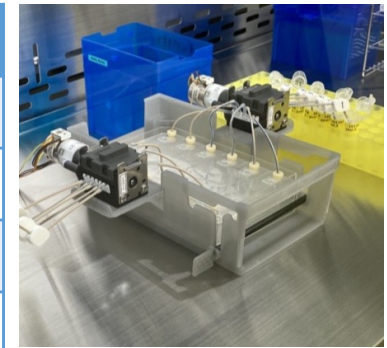
2023/1~ 実験開始

小腸／肝連関モデル実証

目的：MS-plate を用いた腸-肝連結培養試験における作業者間差を検出することで試験系の変動要因抽出を行う。

方法：薬物動態関連データ (薬剤の透過/代謝能)、細胞機能指標データ (TEER値、遺伝子発現) の試験間差を検出する。

項目	内容	備考
細胞①	小腸 (F-hiSIEC)	FUJIFILM
細胞②	肝臓 (Primary Human Hepatocyte; PHH)	Xenotech
デバイス①	MS-プレート (松永デバイス)	腸-肝連結培養
デバイス②	外部培養デバイス (コンパニオンプレート)	F-hiSIEC_前培養で使用 松永研-伸晃化学開発品
配管	PEEK + シリコン配管 または FEP + シリコン配管 (開発中)	高砂電気組立品 一部自作品
評価薬剤	Midazolam, Valaciclovir等	



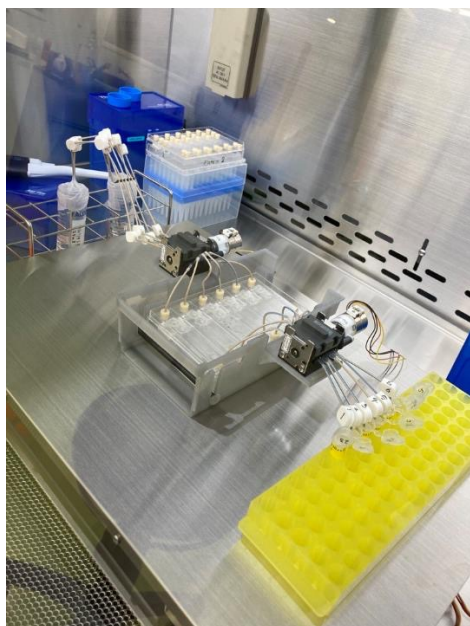
- Position① 薬液添加
- Position② 小腸直下
- Position③ 肝臓部通過直後
- Position④ Flow out (シリコン部通過後・流量計測)

MS-プレート/腸-肝連結試験の概要

	(水)	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水
Day	(-1)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F-hiSIEC	マトリゲルコート	播種	MC			MC		MC		MC			MC		MC/TEER測定
PHH										コラーゲンコート			播種	マトリゲルOL	MC/連結

[事前準備]

- ・培地調製
- ・添加薬剤調製
- ・MS-プレート蓋加工・滅菌
- ・送液用配管加工・滅菌
- ・サンプルチューブ準備



アッセイ当日の操作内容（2～3人で実施）

[F-hiSIEC]

- ↓ MC
- ↓ 馴化
- ↓ TEER測定 (試験前)
- ↓ インサートカップをMS-プレートへ移動
- ↓ 事前灌流(10分)
- ↓ インサートカップへ薬液添加 (t=0)
- ↓ カップ内上清採取 (t=0)
- (t=30~180min)
- ↓ インサート下から培地採取、凍結
- ↓ 灌流吐出液の回収、重量測定、採取、凍結
- ↓ インサートを24wellプレートへ移動
- ↓ TEER測定 (試験後)
- ↓ 細胞溶解～回収 (RNA/タンパク用)

[PHH]

- ↓ 撮影 (試験前)
- ↓ MC
- (t=30~180min)
- ↓ 肝臓部下流より上清採取、凍結
- ↓ 細胞溶解～回収 (RNA/タンパク用)

[MS-プレート]

- ↓ プレート+ポンプへ配管取付け
- ↓ 培地充填
- ↓ 培地充填済配管付き蓋の下に細胞播種済プレートをセット
- ↓ 灌流開始、薬液添加 (t=0)
- (t=30~180min)
- ↓ 灌流吐出液の回収、重量測定、凍結
- ↓ 灌流停止
- ↓ 試験用蓋洗浄/乾燥/滅菌

MS-プレート/腸-肝連結試験（作業者間差が生じやすい操作）

	(水)	木	金	土	日	月	火	水	木	金	土	日	月	火	水
Day	(-1)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F-hiSIEC	マトリゲルコート	播種	MC			MC		MC		MC			MC		MC/TEER測定
PHH									コラーゲンコート				播種	マトリゲルOL	MC/連結

[事前準備]

- ・培地調製
- ・添加薬剤調製
- ・MS-プレート蓋加工・滅菌
- ・送液用配管加工・滅菌
- ・サンプルチューブ準備

アッセイ当日の操作内容（2～3人で実施）

[F-hiSIEC]

- ↓ MC
- ↓ 馴化
- ↓ TEER測定（試験前）
- ↓ **インサートカップをMS-プレートへ移動**
- ↓ 事前灌流(10分)
- ↓ **インサートカップへ薬液添加 (t=0)**
- ↓ **カップ内上清採取 (t=0)**
- (t=30～180min)
- ↓ インサート下から培地採取、凍結
- ↓ 灌流吐出液の回収、重量測定、採取、凍結
- ↓ **インサートを24wellプレートへ移動**
- ↓ TEER測定（試験後）
- ↓ 細胞溶解～回収 (RNA/タンパク用)

[PHH]

- ↓ 撮影（試験前）
- ↓ MC
- (t=30～180min)
- ↓ 肝臓部下流より上清採取、凍結
- ↓ 細胞溶解～回収 (RNA/タンパク用)

[MS-プレート]

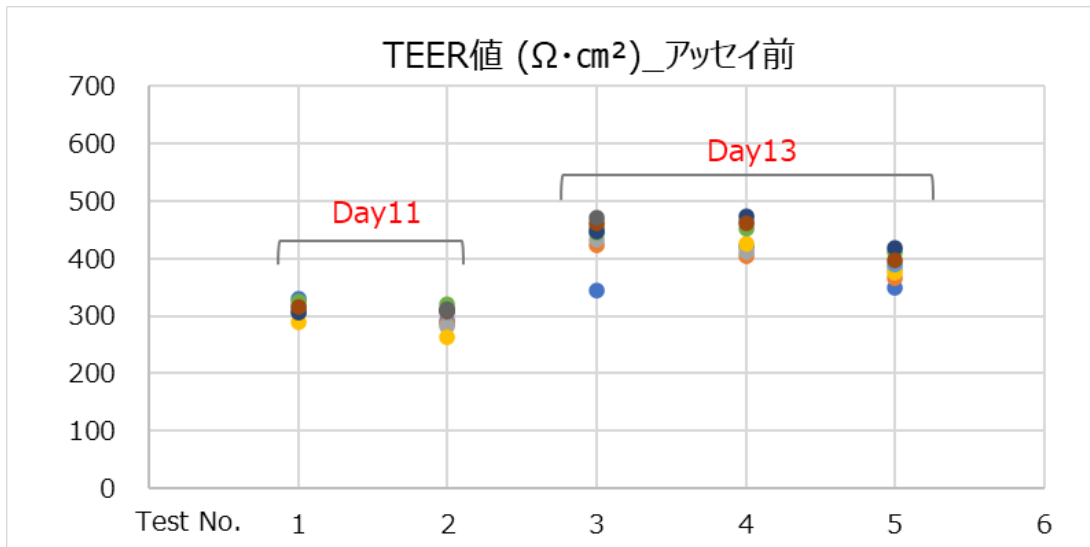
- ↓ プレート+ **ポンプへ配管取付け**
- ↓ 培地充填
- ↓ 培地充填済配管付き蓋の下に細胞播種済プレートをセット
- ↓ 灌流開始、**薬液添加 (t=0)**
- (t=30～180min)
- ↓ 灌流吐出液の回収、重量測定、凍結
- ↓ 灌流停止
- ↓ 試験用蓋洗浄/乾燥/滅菌

個人の手技の差が出やすい操作：

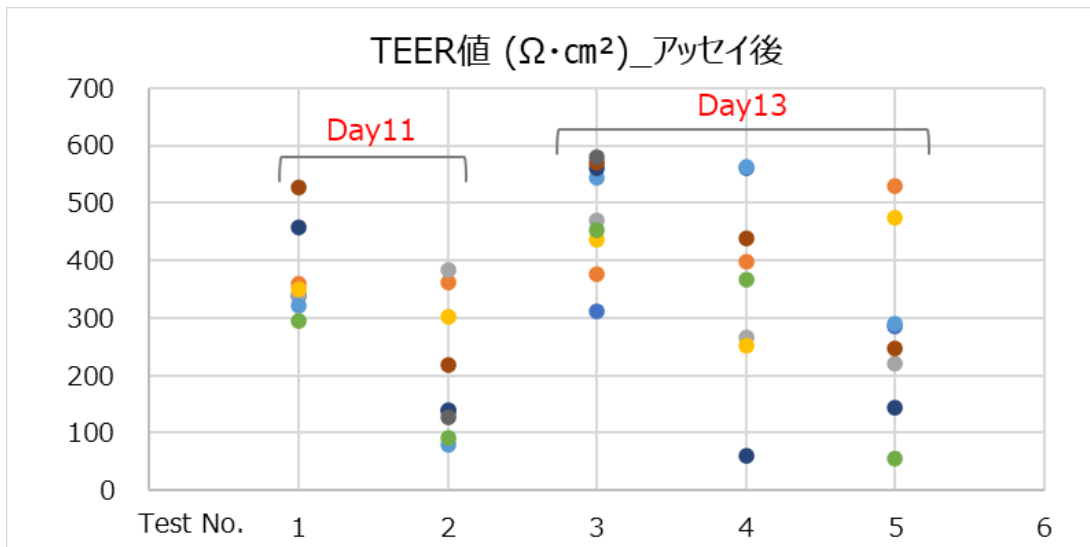
- ・細胞の生存/接着性/機能に影響する可能性の高い操作
- ・流速/液量などの試験条件



MS-プレート/安定な試験系構築を目指して（TEERばらつき）



← Test-1~5 の結果（灌流培養試験前）。前培養したF-hiSIECはTEER値が安定しており、試験内/間のばらつきが小さかった。前培養期間が11日より13日の方がTEER値は若干高めめの傾向がみられる。



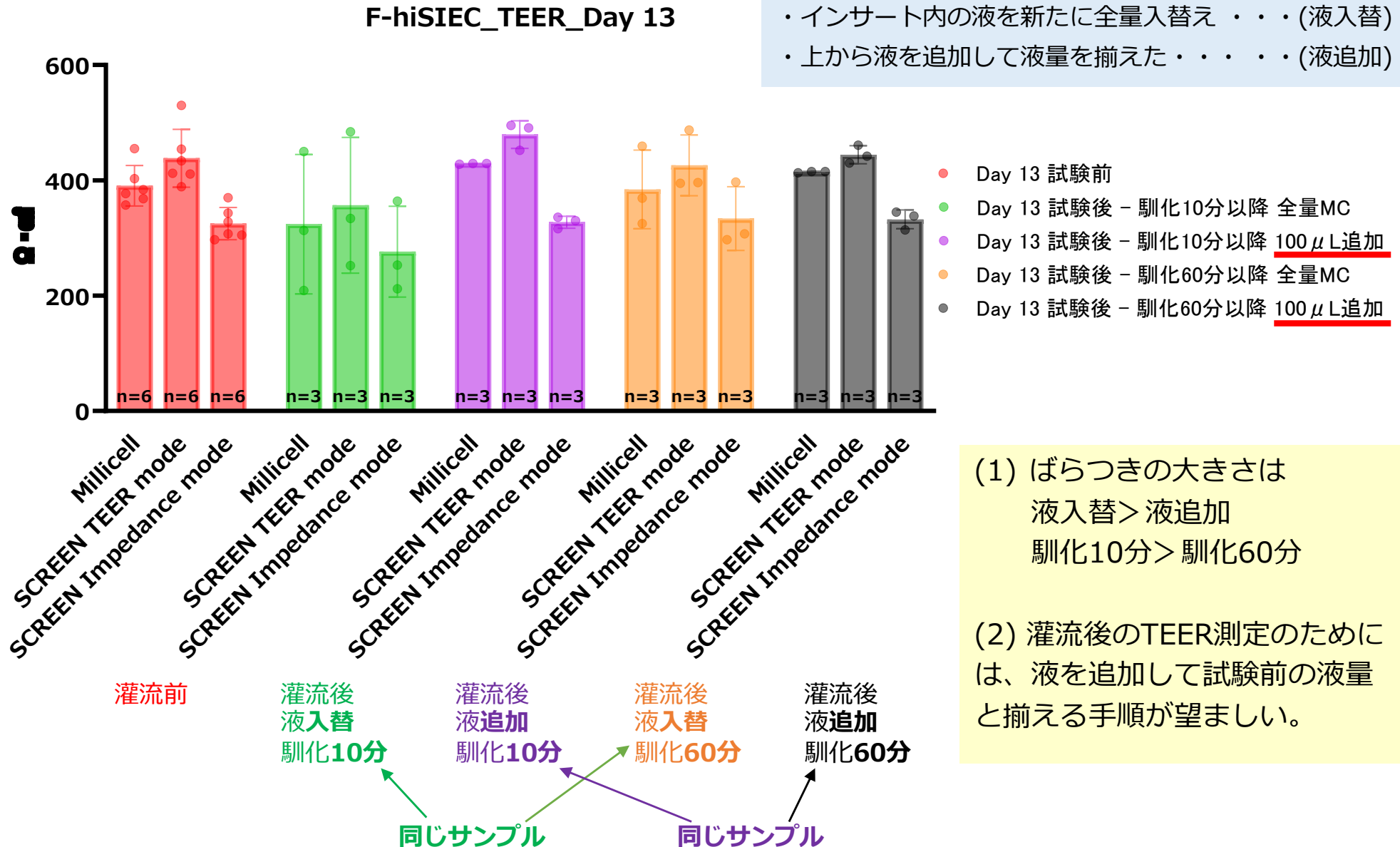
← 灌流培養試験後の結果。試験後にTEER値ばらつきが大きくなる傾向にある。灌流試験中のTEER値変化のみを検出したいため、試験後・TEER測定前の操作手順に問題がないか確認する検討を行った。⇒ 次頁

溶液をできるだけ除去しないようにするなど手順見直しを行っている。

MS-プレート/安定な試験系構築を目指して (TEERばらつき)

3時間灌流後の手順を2通り設定。

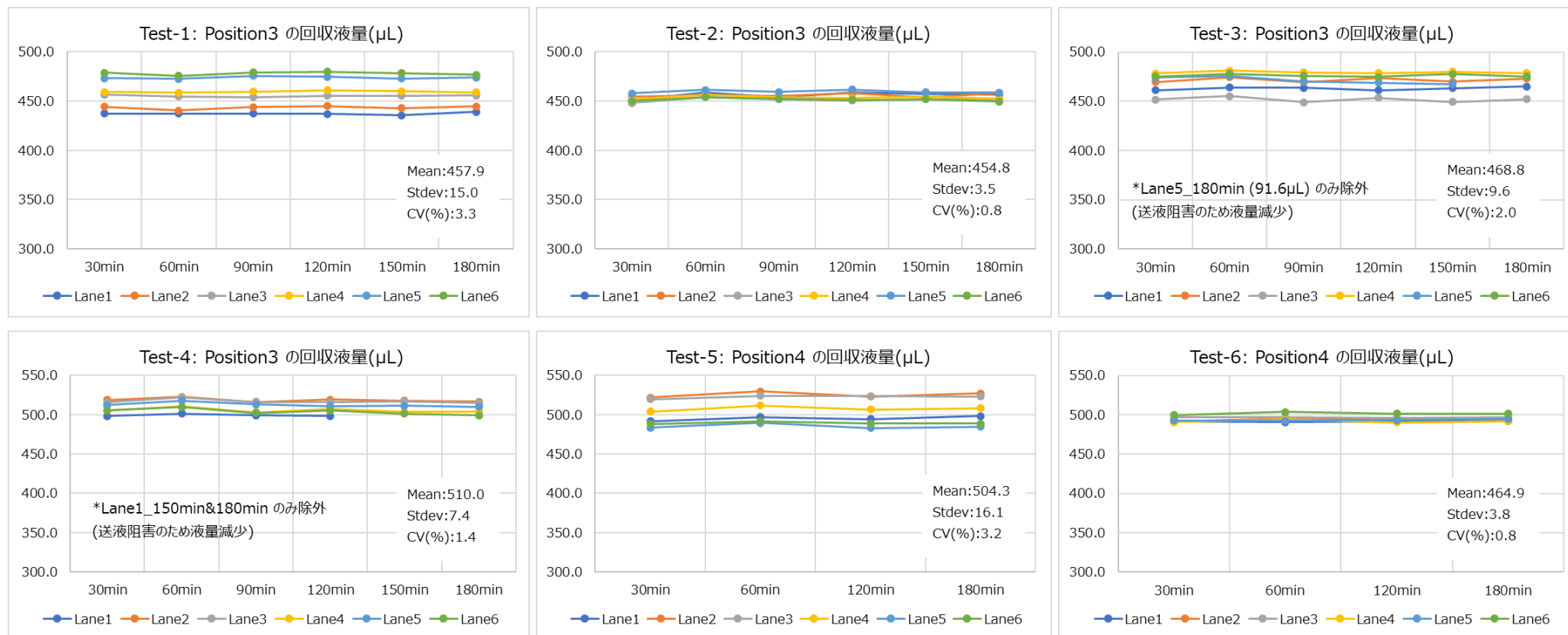
- ・インサート内の液を新たに全量入替え・・・(液入替)
- ・上から液を追加して液量を揃えた・・・(液追加)



(1) ばらつきの大きさは
液入替 > 液追加
馴化10分 > 馴化60分

(2) 灌流後のTEER測定のためには、液を追加して試験前の液量と揃える手順が望ましい。

MS-プレート/安定な試験系構築を目指して（流量ばらつき）



↑ Flow out の液量を測定した結果（Test-1～6）。

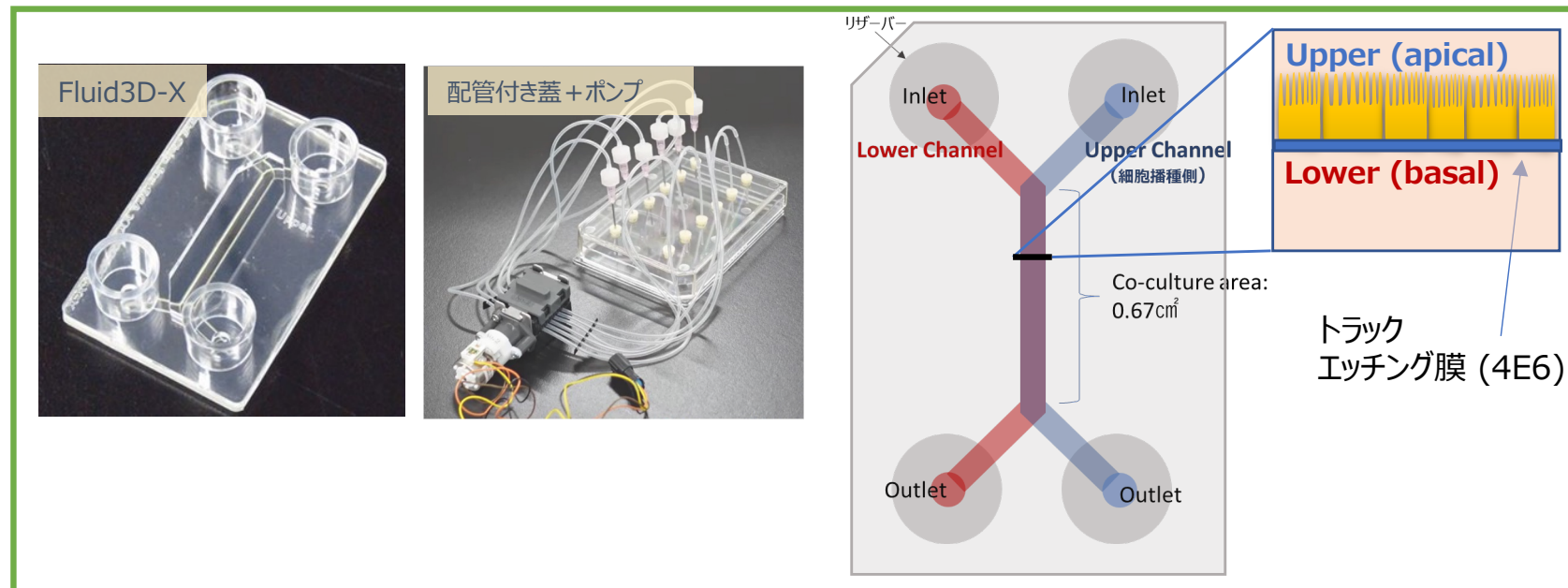
ポンプにシリコンチューブをセットする際の張り方でも液量が変わることを別途確認済。
試験内の液量ばらつきは非常に小さいことがわかる（CV(%) は 0.8～3.3）。

↑ 高頻度で送液障害が起こった（6試験_延べ72本の配管のうち 4本）。PEEK管の内径が非常に小さいことが原因の一つと考えられる。

小腸透過性モデル実証

目的：薬物動態パラメーターの取得を通して、作業者間の変動要因を抽出する

実験条件案	
使用デバイス	Fluid3D-X (F3DX)
使用細胞	F-hiSIEC (富士フィルム社製)
評価予定化合物	「Midazolam, Sulfasalazine」など
使用予定阻害剤	「ketoconazole, Ko143」など

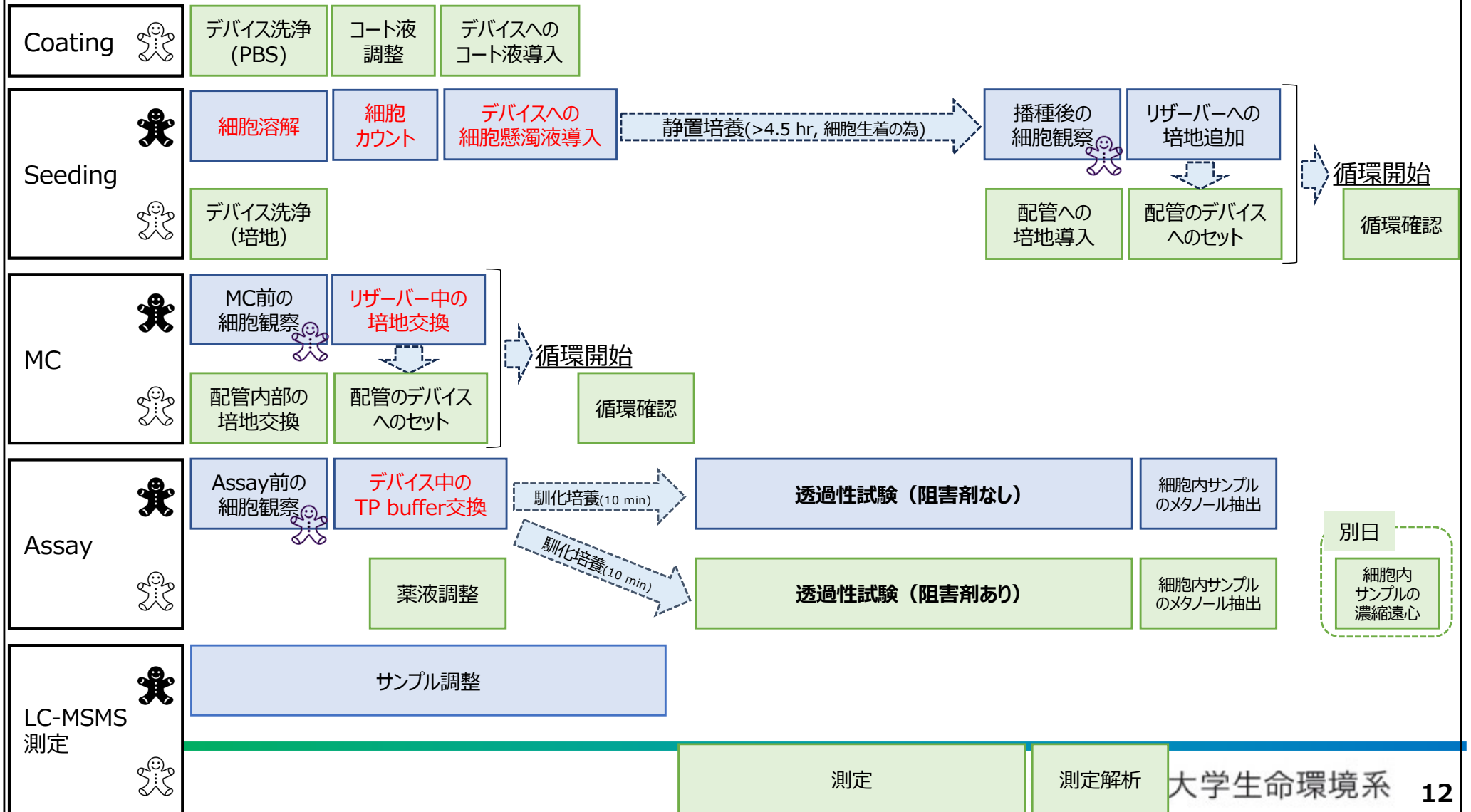


Fluid3D-X/小腸透過性試験の概要

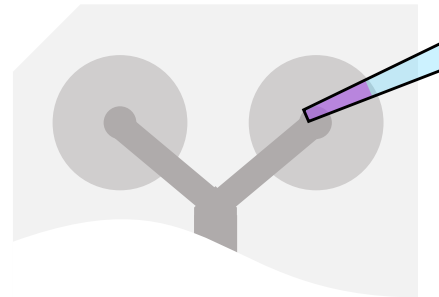
スケジュール (Day)

Day	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	...	
Coating	Coating	Seeding	MC			MC※		MC		MC			Assay		LC-MSMS測定

操作内容 → 作業人数は2名以上が望ましい (赤字: 作業者間差が生じやすい操作)



作業者間差が生じやすい操作（デバイスへの細胞懸濁液導入）

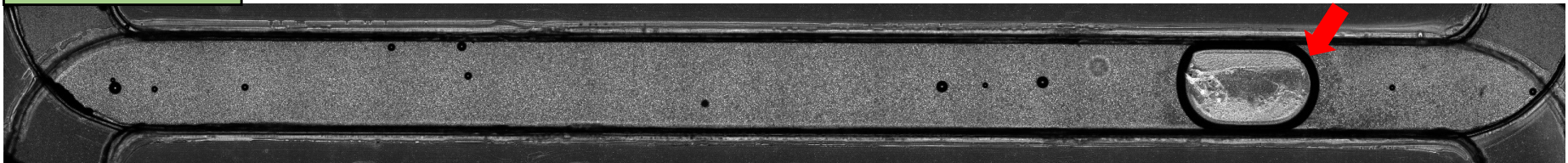


チップの先を
inletの左上につけ導入

培地が両流路壁へ先に伝って導入されてしまう
ことにより、泡の混入が生じやすい。
⇒設計変更検討中。

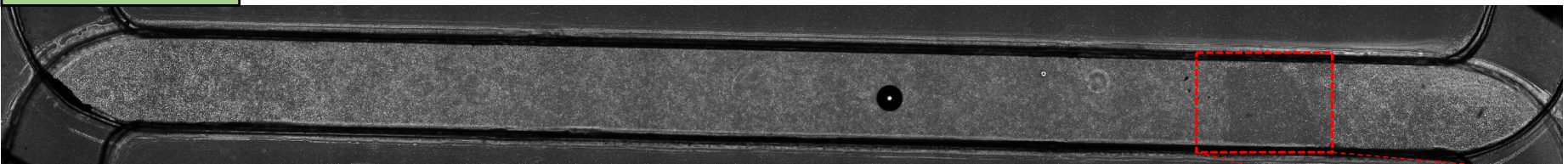
〈上記が原因と考えられる導入失敗例〉

播種4.5時間後



流路下流に大きな気泡が混入してしまった。

培養6日後



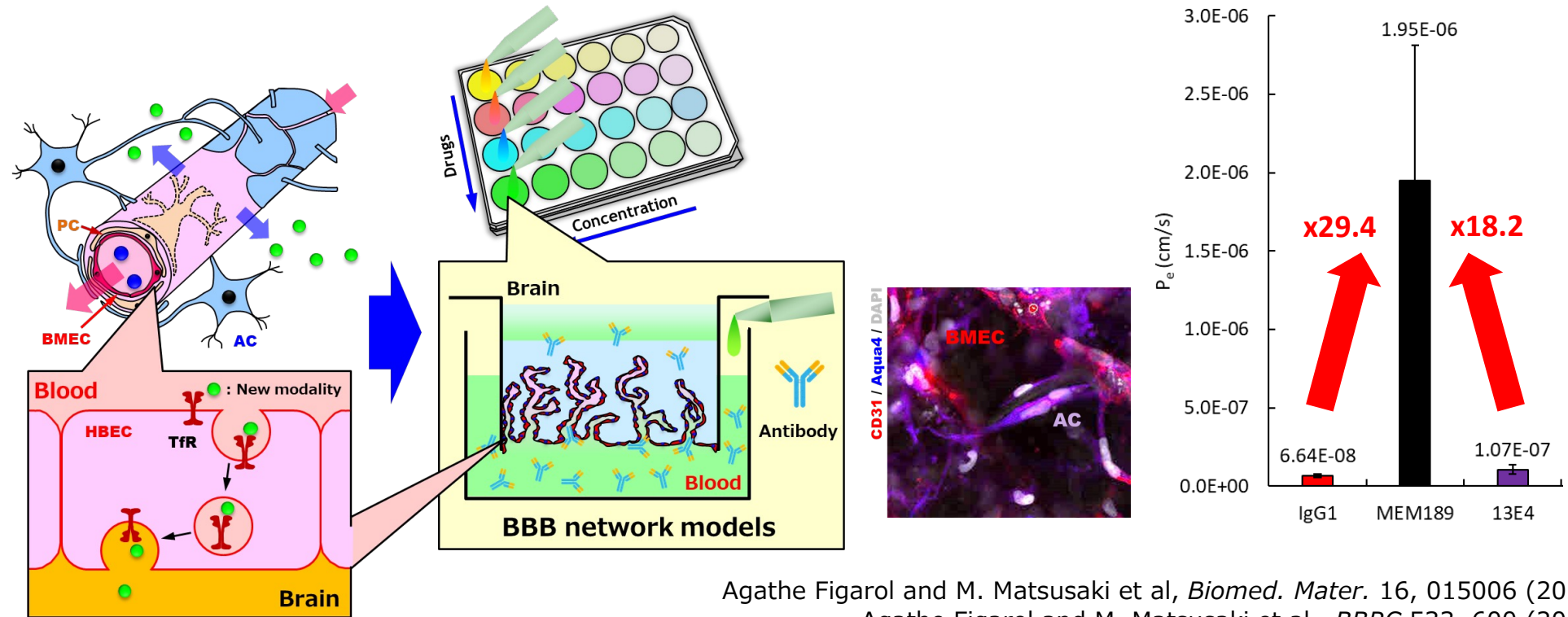
気泡は消滅したが、当該領域は黒抜けし細胞が接着していなかった。



血液脳関門 (BBB) モデル実証

中枢神経疾患に対する受容体介在性トランスサイトosis (RMT) による薬物分子の透過性データを取得する。

1. 抗体などニューモダリティにおけるRMTの検証
2. BBBバリア破壊のリアルタイム検証



Agathe Figarol and M. Matsusaki et al, *Biomed. Mater.* 16, 015006 (2021).

Agathe Figarol and M. Matsusaki et al., *BBRC* 533, 600 (2020).

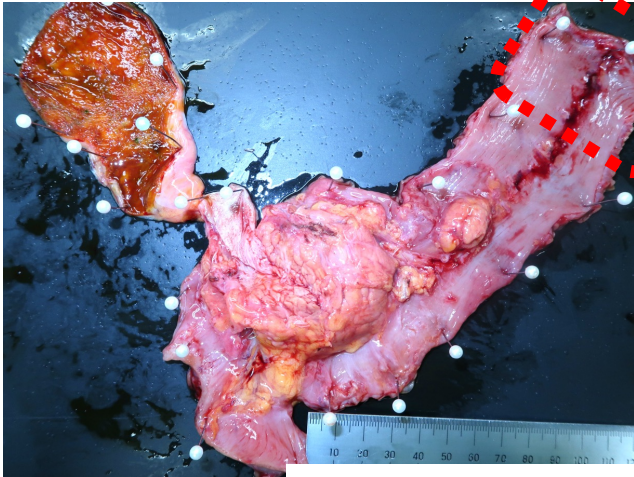
M. Piantino and M. Matsusaki et al., *Mater. Today Bio* 14, 100225 (2022).

M. Piantino and M. Matsusaki et al., *Mater. Today Bio* 15, 100324 (2022).

リファレンス細胞による外挿性検証

近位空腸検体

膵腸部腫瘍：
膵頭十二指腸切除術

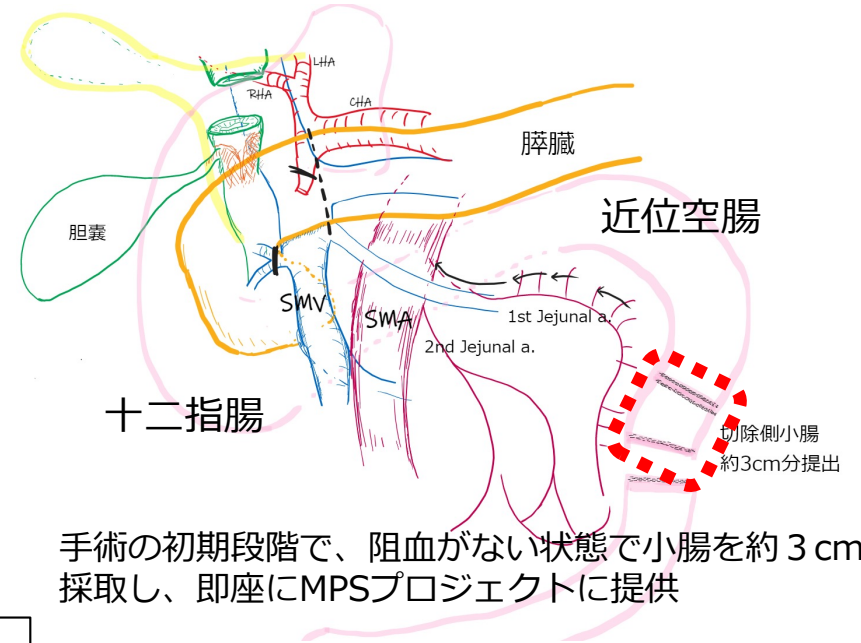


今までの検体

小腸が摘出されるまでの約3-4時間の間、小腸組織は血液が流れない虚血状態。
+冷蔵庫に2-6時間保存後に組織採取。

本研究での検体

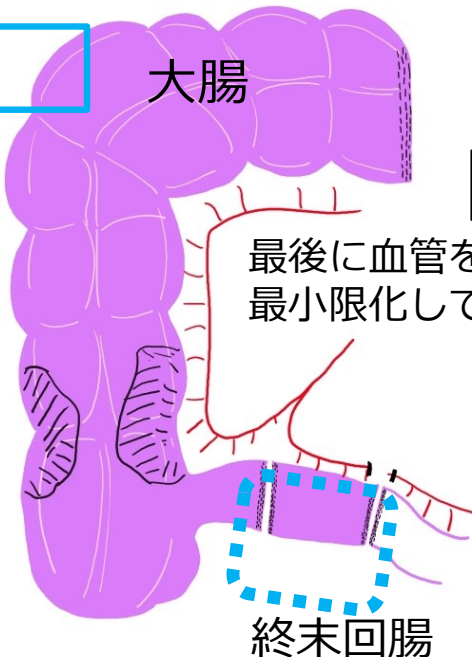
倫理委員会申請、各患者へ説明同意取得、手術術式の工夫、検体採取の人員確保などの体制を整備し、**血管の結紮切離開始後30分以内の虚血がほとんどない非常に状態の良い小腸**



手術の初期段階で、阻血がない状態で小腸を約3cm採取し、即座にMPSプロジェクトに提供

回腸末端検体

上行結腸癌：
結腸右半切除術



本研究での検体

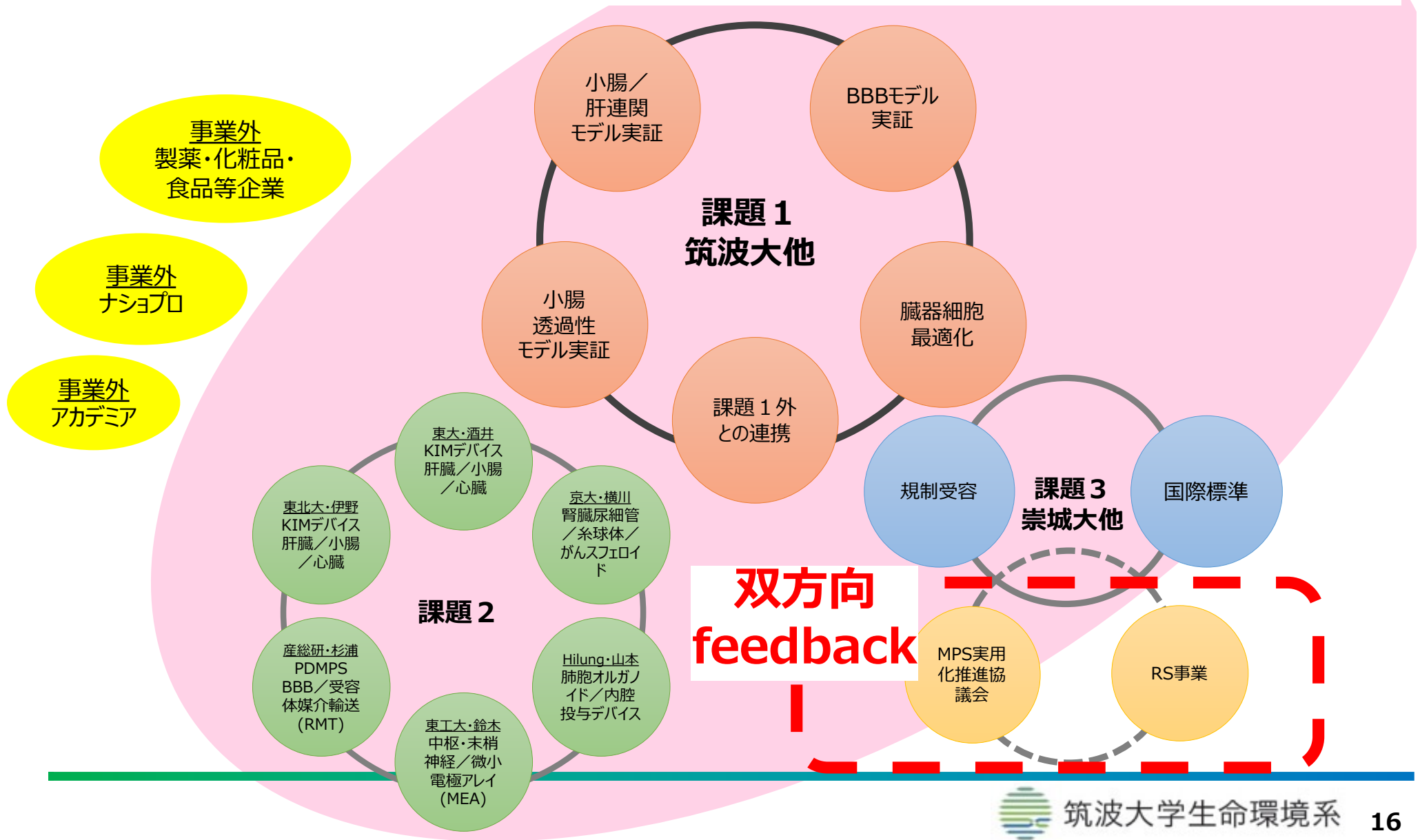
最後に血管を切離することで、組織への障害を最小限化して、検体採取

2022年実績

阻血の無い近位空腸：9件
阻血の無い末端回腸：4件

『AMED-MPS2』事業との関連性

iPS細胞等からの分化誘導やオルガノイド等の再生医療技術を活用して作製したヒト臓器細胞等を用いて、生体模倣システム（MPS）による創薬支援ツールを開発する。



規制受容による可能性（あくまで）

（1）mandatoryな試験法として、「従来法に追加」「代替だがコスト高」

- ・製薬企業等には重荷
- ・MPS産業はHappy（一定数の出荷が予想できる）

（2）mandatoryな試験法として、**従来法に対して代替されかつ早い／安い**

- ・製薬企業等はHappyかもだけど、従来の積み上げてきた知見はどうなるんだ？
- ・MPS産業はHappy（一定数の出荷が予想できる）

（3）IVDで使っても良さそうってなったら

- ・製薬企業等は、**自分のCOUに刺さるアッセイ法があれば、使ってみようと思う。**その時に使いにくければ悲しい。ライバルが上手に使って、開発スピードup／確度up／スムーズな規制当局とのやり取りをするとくやしい。
- ・MPS産業はHappy（箔がつくから）

（4）ガイドラインに収載されたら

- ・製薬企業等は「MPSって、それなりに規制も認識した手法なのね。何処の馬の骨では無いのね」とある程度信用。「でも、『絶対このアッセイやれ』ってなったら、最悪。。」と心配。
- ・MPS産業はHappy（箔がつくから）



国際標準化による可能性（ちなみに、あくまで）

（1）国際標準化が進む

- ・製薬企業等（グローバル企業なら）は、自身の要求仕様に合致したMPSを、安定して手に入れられるようになる。
国際標準化に乗り遅れた国のみで活動する場合、コスト高／不安定な供給となる恐れあり。（自己責任で標準化されていないMPSを購入するのは自由）
- ・MPS産業は**自身の製品が国際標準に合致すれば、それをてこに国際競争力を確保**。合致しないと、製薬企業等／MPS業界からスポイルされる場合も。

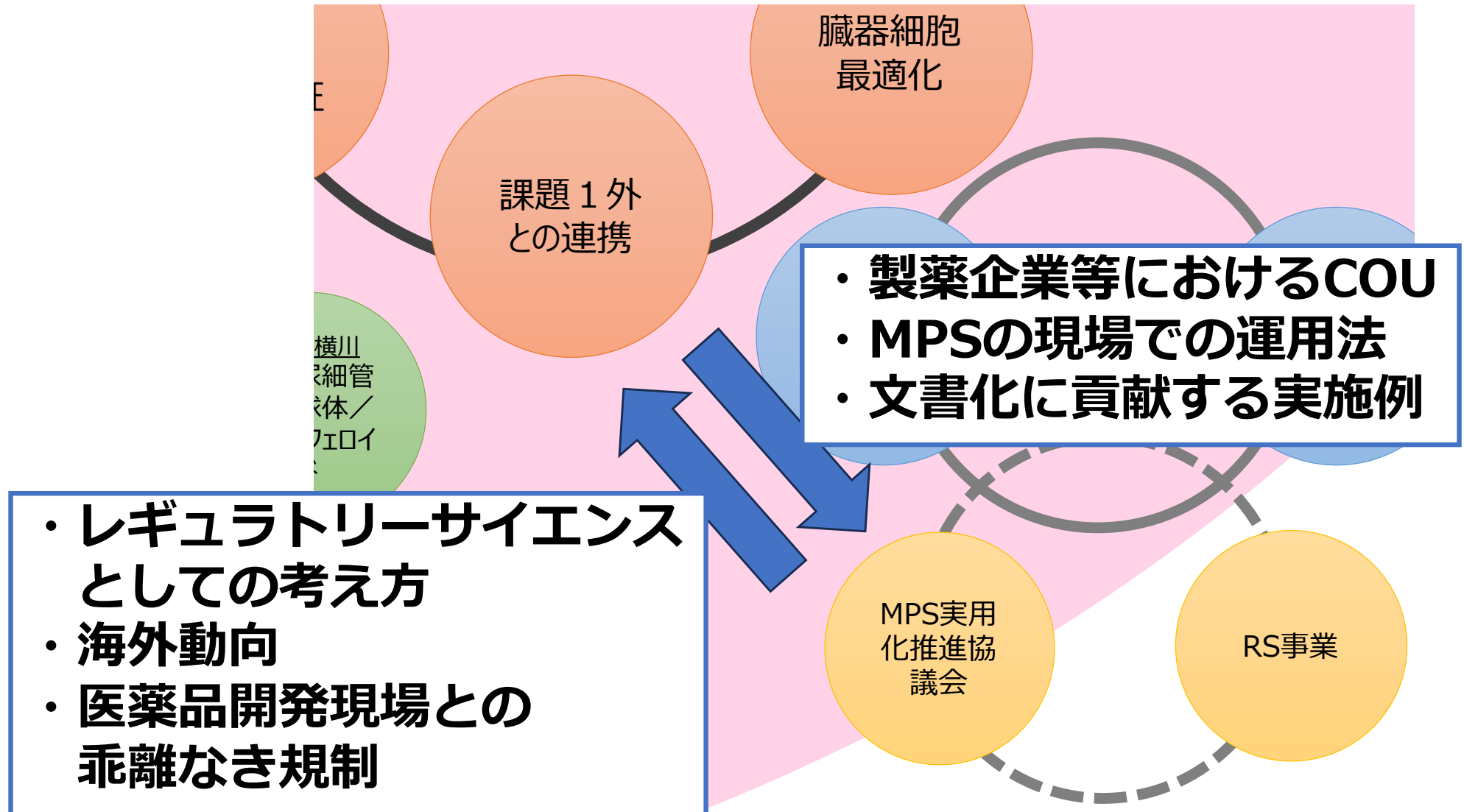
（2）何某かの認証が発生した場合、標準が規制受容された場合

- ・製薬企業等には重荷になる可能性。
- ・MPS産業（国際標準に合致すれば）はHappy（一定数の出荷が予想できる、箔もつく）



『AMED-MPS2』事業との関連性

「製薬企業等」「MPS産業」それぞれの立場をまとめて、「レギュラトリーサイエンス」「規制受容」と双方向Feedbackの関連性を構築



ご静聴ありがとうございました

