

細胞活性評価システムの事業化検討

Commercialization Study of Cell Activity Evaluation System

伊藤 典明*
Temmei ITO

松本 武蔵**
Musashi MATSUMOTO

要旨

ミトコンドリアによる細胞代謝や発達の動的変化を、非侵襲で好感度に検出するためにミトコンドリアの定量的酸素消費測定を試みた。東北大学とパナソニック（株）らが共同で開発したオンチップシステム（OECDシステム）は、Siチップ上に細胞導入ピットを有し、細胞の代謝機能変化として局所的な酸素消費量をPt電極で電気化学的に計測するシステムである。OECDシステムは、非侵襲的に細胞の代謝活性を示し、新たな診断価値を創出する基盤技術として期待されている。本稿では、このシステムの適用領域として、創薬支援領域、生殖医療領域（ヒト/動物）を検討したため、報告する。創薬支援領域では、1スフェロイドからの高感度測定が可能である特徴を生かし、ミトコンドリア機能解析のモデル化合物として知られる、アンチマイシンA（ミトコンドリア複合体III阻害剤）、ロテノン（ミトコンドリア複合体I阻害剤）などの微小薬剤応答性評価に適用が可能と考える。

生殖医療領域では、取り扱いが容易なシステムの特徴を生かし、胚の形態学評価に代わる客観的かつ定量的指標としてミトコンドリア活性評価の市場浸透を検討中である。今後受精卵のグレーディングにおける有用な指標としてのエビデンスを取得していく予定である。

Abstract

In order to detect dynamic change in cell metabolism and development due to mitochondria in a noninvasive manner and with a good sensitivity, we attempted quantitative measurement of mitochondrial oxygen consumption. For the measurement, an on-chip system (OECD system) developed jointly by Tohoku University and Panasonic, Inc., was used. The OECD system comprises a Si chip with a pit into which a cell is introduced; and a Pt electrode for electrochemically measuring the amount of locally consumed oxygen as a change in cell metabolism. Since the OECD system noninvasively shows the cell metabolic activity, it is expected to serve as a core technology creating new diagnostic values. In this paper, we report our findings from the study of the drug development support area and the reproductive medicine area (humans and animals) as applicable areas of this system. In the drug development support area, we expect that, owing to the feature that high-sensitivity measurement is possible with one spheroid, the system is applicable to evaluating the responsiveness of microscopic drugs such as antimycin A (mitochondrial complex III inhibitor) and rotenone (mitochondrial complex I inhibitor), which are known as model complexes for functional analysis of mitochondria.

In the reproductive medicine area, utilizing the feature that the system is easy to handle, we are considering the possibility of commercializing the mitochondrial activity evaluation on the market as an objective and quantitative index for replacing assessment of embryo morphology. We next intend to obtain evidences as a useful index for grading fertilized eggs.

* 開発統括本部 バイオ要素技術開発室

** ヘルスケア事業本部 プレシジョンメディシン事業部 事業統括部商品企画部

1 はじめに

細胞の機能の維持は、さまざまな代謝活性に依存している。また近年、臓器幹細胞や、ES細胞あるいはiPS細胞といった多能性幹細胞では、分化した細胞とは異なる代謝プログラムを保持していることが見出された。代謝プログラムの中心を担うのがミトコンドリアであり、酸素の消費は、ミトコンドリアの機能を直接測定できる有用なパラメータの1つである¹⁾。細胞の代謝活性を評価する手法として、分光測定法²⁾や、蛍光検出法³⁾があり、受精卵の選別に一部用いられているが、侵襲的な評価手法である。東北大学とパナソニック(株)らが共同で開発したOn-chip ElectroChemical Device(以下OECDと略)は、細胞の代謝機能変化として局所的な酸素消費量を電気化学的に定量計測するシステムであり、非侵襲かつ高感度である⁴⁾。本稿では、OECD測定の原理とその特徴を紹介する。また、コニカミノルタ(株)で技術の展開先として細胞凝集塊を使用した創薬支援用途、胚のグレーディングなどの生殖医療用途を検討したため報告する。

2 OECDの構成の紹介

OECDとは、Pt電極上の微小な酸化還元反応を検出するシステムである。Fig. 1に示すように、本チップ型デバイスは、細胞のトラップのためにピットを有し、Pt電極がピットの周りに放射状に配備されている構造である。

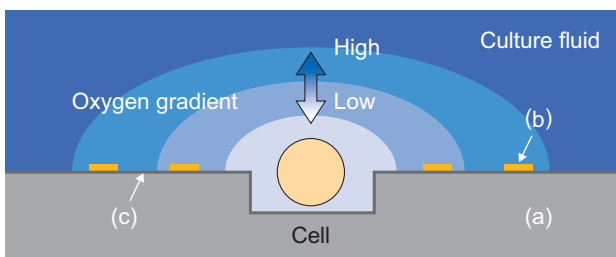


Fig. 1 Schematic principle image of measurement of cell activity on working electrode chip.

(a) Si substrate, (b) Pt electrode, (c) SiO₂ insulating layer
The device chip has a pit to trap a cell, Pt electrodes disposed circularly around the pit, and is a system that electrochemically detects the concentration of O₂ around the cell.

電極により細胞の周りのO₂濃度を電気化学的に検出し、酸素消費量を算出する。ピットサイズが200μmの場合は、ピット中心から120, 170, 220, 300μmにそれぞれ電極が形成されており、O₂濃度勾配を検出する。Ti/Ptスパッタリングで製造されたPt電極は、参照電極および対電極チップとして機能する。Fig. 2は、デバイスアセンブリを示しており、1つの参照チップと5つの測定用チップおよび、ポリスチレンの支持プレートからなる。

システムの構成は、チップ、チップを固定する測定プレート、ポテンシostat、ウォームプレート、PCからなる(Fig. 3)。ポテンシostatは、pA範囲の電流

を測定し、非常に小さな変化を検出するデバイスであり、ウォームプレートはチップ内の培地を37°Cに保つ。

コニカミノルタでは、用途検討により種々の細胞種に対応するため、50–1,000μmのピットサイズを有するチップ型デバイスを検討した。



Fig. 2 External appearance of the device.

The device is composed of a reference chip, five measurement chips, and a polystyrene support plate.

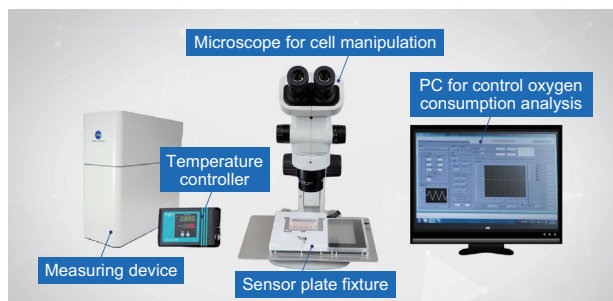


Fig. 3 Configuration diagram of OECD (On-chip ElectroChemical Device) system.

The system is configured with the device, a measurement plate, a jig including a built-in warm plate, a potentiostat, and a computer for analyzing data. The potentiostat is a device to measure a current in a pA range to detect a very small change. The warm plate maintains the medium on the chip at 37°C.

3 測定原理の紹介

細胞の酸素消費量の算出は球状拡散理論により行った。細胞の中心からの距離に沿ったO₂濃度プロファイルR(m)は以下のように表される。

$$C = -(C^* - C_s) r/R + C^* = -\Delta C_1/R + C^* \quad (1)$$

ここでr(m)は細胞半径、C(mol/m³)は距離RでのO₂濃度、C^{*}はO₂バルク濃度(0.209mM)、C_s(mol/m³)はサンプル表面のO₂濃度、ΔCはサンプル表面とバルク間のO₂濃度差をそれぞれ示す。

$$C/C^* = i/i^* \quad (2)$$

ここでi(A)は距離Rの還元電流であり、i^{*}(A)はバルクO₂還元電流である。つまり、下記のように表される。

$$i/i^* = -(\Delta C/C^*) r/R + 1 \quad (3)$$

ΔC は、 i/i 対 r/R の傾きから算出することができる。細胞の酸素消費量 f (mol/s)は、フィックの第一法則より、細胞表面での O_2 のフラックス密度 f_s (mol/s・m²)を以下のように決定した。

$$f_s = D\Delta C/r \quad (4)$$

ここで S は球面表面を示すが、細胞を平坦なデバイスに静置することで半球状拡散層が形成される。したがって、最終的な細胞の酸素消費量 f (mol/s)を以下のように定義した⁴⁾。

$$f = S \times f_s = 2\pi r D \Delta C \quad (5)$$

以上の理論式を用い、酸素消費量 f (mol/s)=50と固定し、酸素濃度シミュレーションをした結果をFig. 4に示す。Fig. 4より細胞近傍で細胞のミトコンドリア呼吸により酸素消費が生じており、 $r=120, 170, 220, 300\mu\text{m}$ の電極配置部分で酸素濃度勾配が生じていることを確認した。

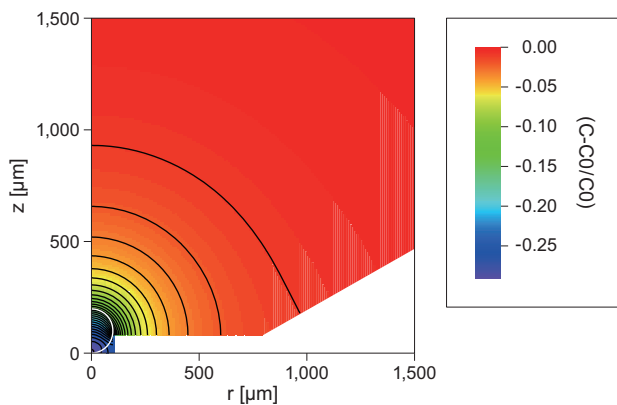


Fig. 4 Cross-sectional view of model case of oxygen concentration profile ($f=50\text{fmol/s}$).
Oxygen is consumed in the vicinity of the cell due to respiration of mitochondria, and an inclination of oxygen concentration is confirmed over the electrodes at $r=120, 170, 220,$ and $300\mu\text{m}$.

本システムは、測定培地を入れてから8分間電圧を印可することでセンサ安定化/キャリブレーションを行い、細胞を導入してから2分間酸素消費量を計測し、細胞を取り出してから2分間のキャリブレーションを行うシステムである。従来の染色方式と比べ、蛍光色素の取り込み時間や顕微鏡での観察が必要なく定量化が可能のため簡便かつ迅速で、さらには非侵襲な測定が可能であるという特徴がある。

4 創薬/再生医療での使用用途

1998年にヒト胚性幹 (ES) 細胞が樹立され、2007年にはヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞が樹立された。これらの細胞を用いて、創薬研究や再生医療への応用を指向した研究開発が国内外で進んでいる。創薬領域においては、

創薬プロセスにおける薬効評価、毒性評価、疾患研究において幹細胞の利用が進められており、その国内市場規模は、1,000–2,000億円と期待されている。また、製薬企業で取り組んでいる、Cell-Based Assayは従来の二次元培養法から、より生体内を反映すると考えられている三次元培養法にシフトする傾向にある。欧州実験動物代替学会 (ECVAM) においても、三次元培養、共培養が推奨されている。細胞治療においては、細胞を三次元培養することで得られる細胞塊 (スフェロイド、オルガノイド等) が、細胞の機能を最大限に引き出すことのできる投与形態として着目されている⁵⁾。

近年、ミトコンドリアバイオロジーを解き明かす試みが製薬企業でも行われている。一部のミトコンドリアが持っている遺伝的変異は、脳神経や心筋において細胞のエネルギー代謝が低下することから進行性の病態を示すミトコンドリアが治療標的として着目されている⁶⁾。現在、細胞の代謝機能の測定には、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Inc.製) が研究用途に使用されている。細胞外フラックスアナライザーはエネルギー代謝における酸素及び乳酸に着目し、酸素またはプロトンによる蛍光基質のクエンチング反応を、一時的に半閉鎖系を構築することで計測するシステムである。高いスループットがあり、プレート上での経時的代謝計測が可能であるという特徴がある。OECDシステムは、チップ上に細胞塊 (iPS胚様体やスフェロイド等) を静置し、開放系で電気化学計測をする点で、細胞外フラックスアナライザーとは計測方式が異なる。開放系であり短時間 (呼吸量測定は2分間) 測定を得意とすることにより、移植直前の細胞の品質判定等に適用が可能と考える。

以下に創薬/再生医療の使用用途のモデルケースとして、幹細胞を三次元培養し、その細胞数違いで酸素消費量を測定した結果を示す。スフェロイド作製時の細胞数を、5000 cells, 7500 cells, 10000 cellsで調製した場合に、細胞数の増加に伴い酸素消費量も上昇していることを確認した (Fig. 5)。

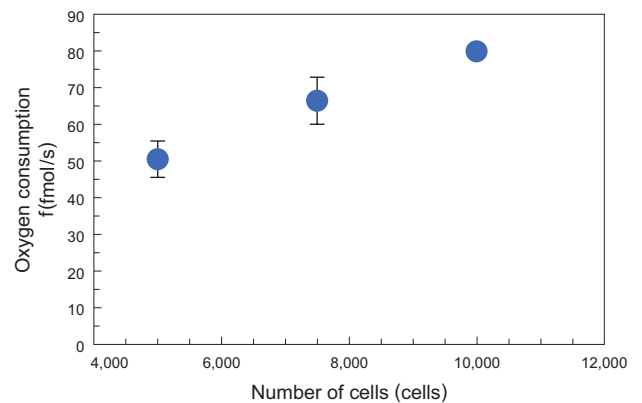


Fig. 5 Oxygen consumption amount produced stem cell spheroids using 5000, 7500, and 10000 of cells.
The total number of mitochondria increases according to the number of used cells, and the oxygen consumption amount rises accordingly.

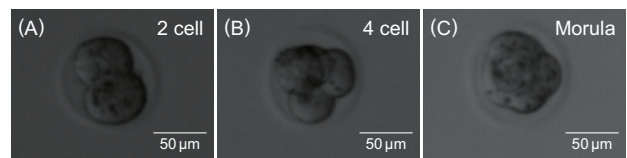
糖尿病, 肥満, がん, 循環器疾患, 神経変性疾患等に関する研究において, ミトコンドリア機能解析は創薬の領域において重要である。ミトコンドリア電子伝達系である Complex I の長期間に渡る阻害はパーキンソン病, ダウン症候群, リー症候群に関与しており, 神経学的異常の指標として有用である。今後, ミトコンドリア機能解析のモデル化合物として知られる, アンチマイシン A (ミトコンドリア複合体 III 阻害剤), ロテノン (ミトコンドリア複合体 I 阻害剤) などのモデル化合物を使用し, 幹細胞スフェロイドを利用した 1 スフェロイドからの微小薬剤応答性を検討していく予定である。

5 受精卵での使用用途 (ヒト/動物)

発生能のある胚の客観的かつ正確な評価は, 生殖補助医療 (ART) での妊娠, 出産の成功率向上において非常に重要なことである。ウシの例の場合, 経済的な価値の高い黒毛和種 (和牛) を, 体外受精により増産する試みが徐々に増えてきているが, 受胎率は 30-50% にとどまっている⁷⁾。畜産農家にとっては, 妊娠に至らなかった場合の移植や, 移植後の牛の維持管理に係る損失は, 大規模農家で年間数百万円であり, その負担は莫大である。又, 盲導犬や A 系統マウス等, 体外受精技術がまだまだ進展していない分野もある。

一方, ヒトの体外受精 (IVF) においては, 2015 年に国内で 42 万件以上の体外受精が行われ, 約 5 万 1,000 人の胎児の出生があった⁸⁾。IVF において, 何十年もの間, 胚の品質を評価するために熟練した胚培養士の主観的な形態学的評価が主に使用され, 着床率または妊娠率をある程度予測していた。近年になって, 胚の品質予測のため, 使用済み胚培養液細胞周期のタイミングおよび形態タイムラプスシステムが新技術として登場したが, 定量評価でないため, 臨床的価値のある初期胚の選別の一般手法となっていない。現在, 客観的かつ定量的な方法として, 代謝または酸素消費量に焦点を当てた胚の評価が試みられており, Rehman らの提唱した胚盤胞品質スコア (BQS) と酸素消費量の正の線形関係が報告されている⁹⁾。酸素消費量の測定は, 蛍光検出³⁾, 走査電気化学顕微鏡法 (SECM) が報告されているが, 蛍光検出は感度が低い侵襲的な測定法であり, SECM は, プローブの操作が困難であり, スループット性が低い測定法である⁴⁾。

以下に受精卵での使用用途のモデルケースとして, マウス胚での酸素消費量を測定した結果を示す。様々な発生段階 (2 細胞, 4 細胞, 桑実胚) での胚の酸素消費量を従来の SECM と比較検証した結果, OECD システムとの有意差は認められなかった (Fig. 6) (図は参考文献⁴⁾より抜粋)。SECM は細胞分析のための信頼できるツールであるが, 複雑な操作のために臨床適用が難しい。取り扱いが容易な OECD システムを使用して, 今後受精卵のグレーディングに対しての有用な指標としてのエビデンスを取得していく予定である。



(A) Two-cell, (B) four-cell, (C) morula for optical images.

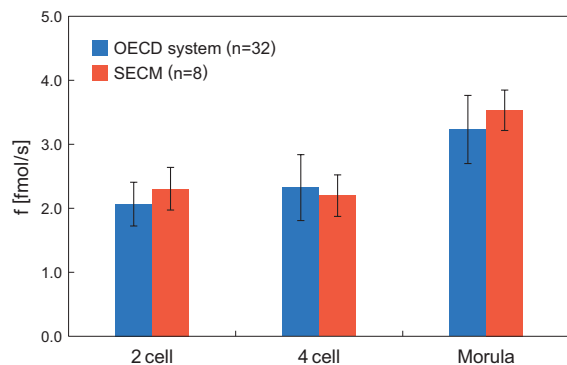


Fig. 6 Various stages of embryo developments (A: 2 cells, B: 4 cells, C: morula) and electrochemical detected respiratory activity of them. Comparison of SECM (Scanning ElectroChemical Microscopy) and OECD.

The oxygen consumption amount of embryo at various stages of development were compared between conventional SECM and OECD, and no significant difference was observed.

6 おわりに

本稿では, パナソニック (株) の MEMS 技術を応用したチップ型センサ技術を基盤とする OECD システムの原理およびその事業につながる評価内容を中心に紹介した。細胞活性の高感度かつ非侵襲解析の技術プラットフォームは, 今回紹介した事業範囲だけでなく, 再生医療等の細胞品質評価や薬剤開発における毒性評価でも重要となる技術である。

再生医療においては, 間葉系幹細胞 (MSC) は, 分化時に酸素消費量の低下が起こる報告がある。また ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞では, 未分化状態でアルカリフォスファターゼ (ALP) を高発現している報告がある。検出方式として使用している電気化学方式は, 印可電圧変更や電極修飾により, 今回紹介した酸素消費量だけでなく, ALP 活性の評価等使用用途の拡大が見込める¹⁰⁾。今後, 移植に使用する希少細胞 (iPS 細胞, 組織幹細胞など) の品質管理 (分化状態のモニタリング) や代謝産物の非侵襲網羅的解析としての展開も期待できる。

心毒性試験では, 従来より hERG チャンネル (カリウムチャンネル) に対する阻害試験などが行われてきたが, 擬陽性発生率が高いといった課題があり, 近年ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の利用が進んでいる。心筋の活動電位は微小電極アレイ (MEA) システムや, 電圧感受性色素により評価がなされているが, 心臓のエネルギー代謝の分析には, 心筋細胞の酸素消費量の定量化も重要である。収縮挙動を反映した運動パラメータを SECM データから抽出可能であることも明らかになっており¹¹⁾, 本システムの心毒性試験での展開も期待できる。

●参考文献

- 1) Goto, M et.al., Transplant. Proc,41, 311 (2009).
- 2) Territo, P. R et. al., Anal. Biochem. 286, 156-163 (2000).
- 3) Diepart, C et.al., Anal. Biochem. 396, 250-256 (2010).
- 4) Hiramoto, K et.al., Anal. Chem. 89, 19, 10303-10310 (2017)
- 5) Kusamori, K et. al., Drug Delivery System, 28-1 (2013)
- 6) Mami, J. Falk et. al., N Engl J Med. 374 (12) 1103-1106 (2016).
- 7) 農林水産省公表データ
- 8) 平成28年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告, 日本産婦人科学会
- 9) Kurosawa, H et. al., Hum. Reprod. 1-10 (2016)
- 10) Ino, K et.al., Anal. Sci. 35, 1, 39-43 (2019)
- 11) Hirano, Y et. al., Anal. Biochem. 447, 39-42 (2014)