

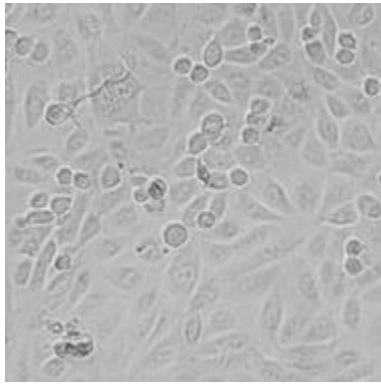
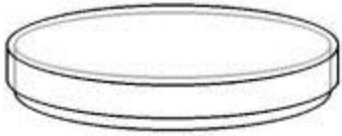
**三次元培養システムCell-able<sup>®</sup>で形成される  
ヒトがん細胞および肝細胞スフェロイドを利用した  
創薬研究の新しいアプローチ**

**東洋合成工業株式会社**

**HAB研究機構第21回学術年会  
2014年5月16－17日**

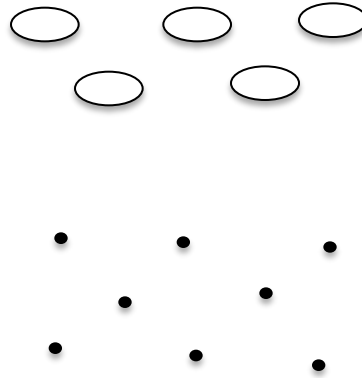
# 培養細胞の形態

二次元平面培養



細胞：DU145

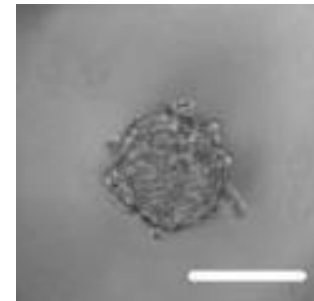
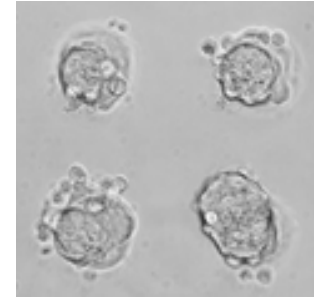
接着面の制限



無接着



三次元構造



細胞独自の構造

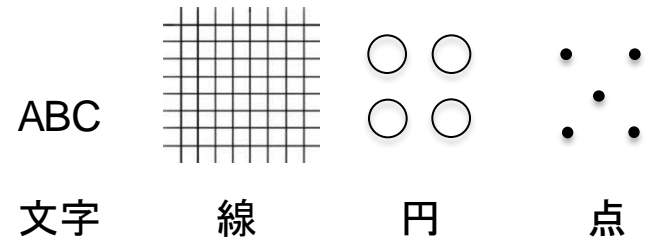
# Cell-able<sup>®</sup>技術

Cell-able<sup>®</sup>は感光材ポリマーを用いた化学的表面加工技術により作られ、細胞の接着領域のパターンを任意に変えることができる。

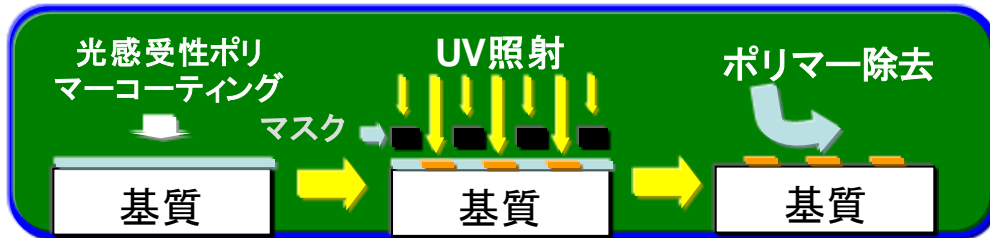
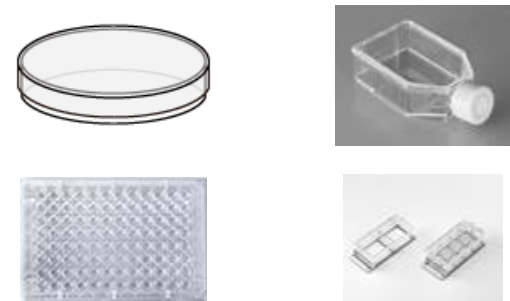
## 製造の概略

1. 培養器の基質(ガラス、PPなど)表面を光感受性ポリマーでコートする
2. マスク(任意な模様)でポリマーを覆う
3. 紫外線を照射する  
(ポリマーは紫外線を受けて重合し、固定化する)
4. 未重合のポリマーを洗い流す
5. 乾燥し、滅菌する

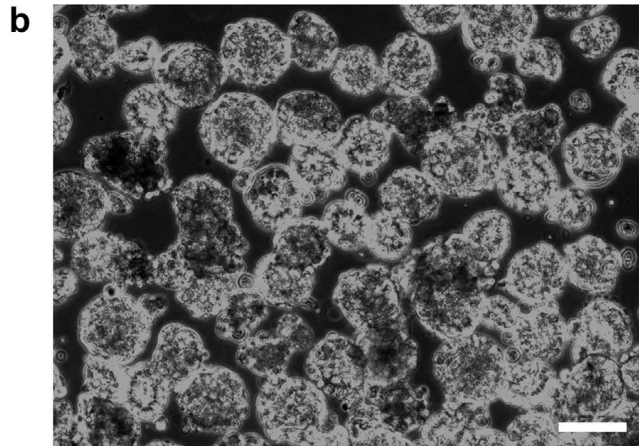
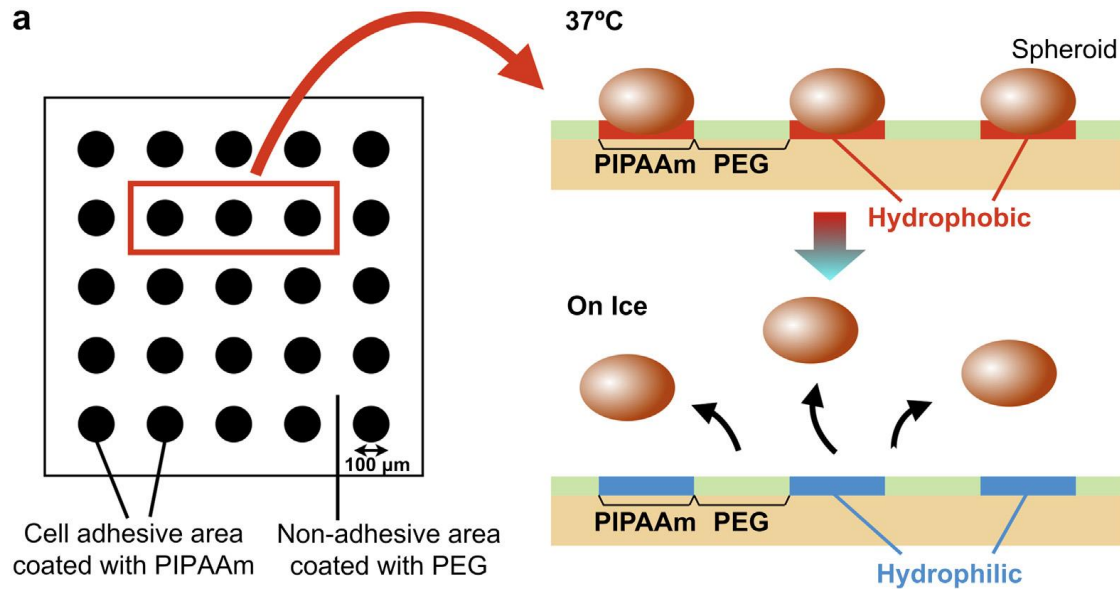
## パターン例



## 基質例



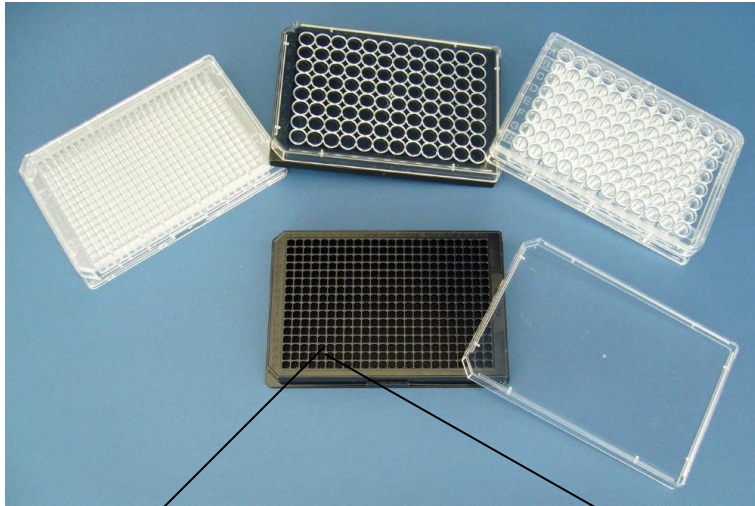
# 温度感受性ゲル上にCell-able®パターンニング



均一サイズの肝細胞スフェロイドを  
酵素処理なしで取り出し

S. Uchida et al., Biomaterials 35 (2014) 2499-2506

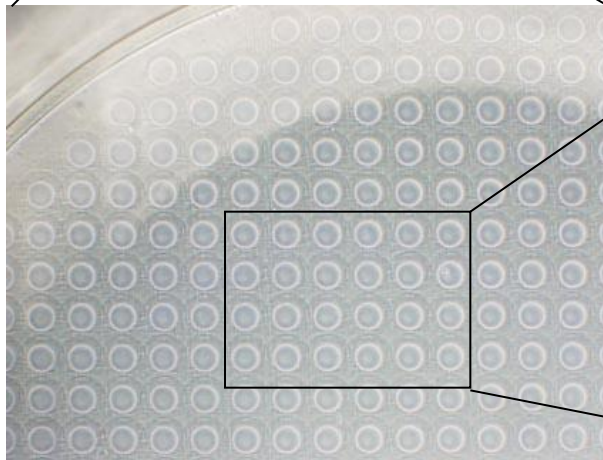
# Cell-able<sup>®</sup>プレート



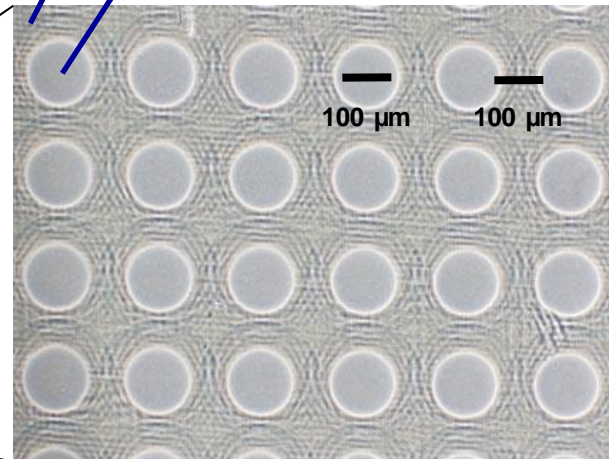
肝細胞の培養に最適化したパターン：  
細胞接着領域を直径100 $\mu$ mの円を  
100 $\mu$ m間隔で配置

ポリマーコート：細胞非接着領域

タイプコラーゲンコート：細胞接着  
領域 (直径100 $\mu$ m)

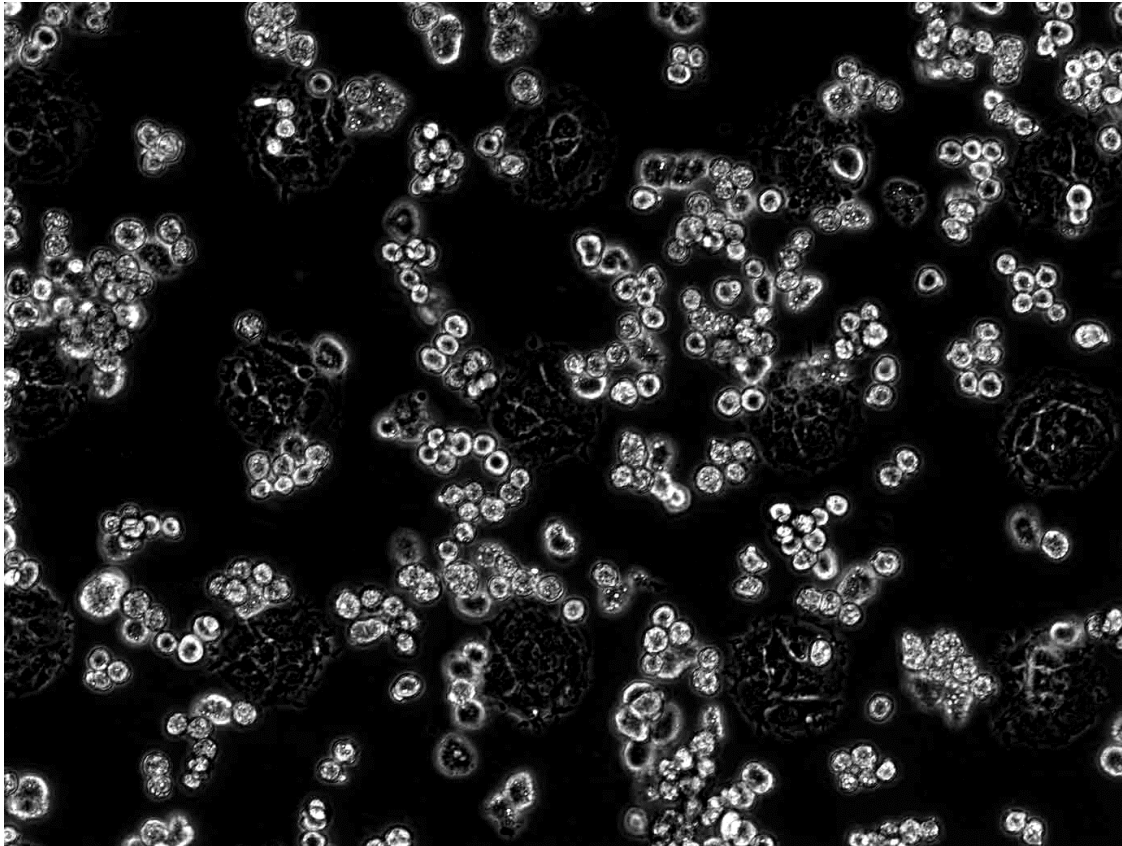


プレートのウェル底面





# Cell-able<sup>®</sup>プレートにおいてフィーダ細胞上に形成される ラット初代肝細胞スフェロイド



ウシ内皮細胞  
細胞播種



24時間



ラット初代肝細胞播種

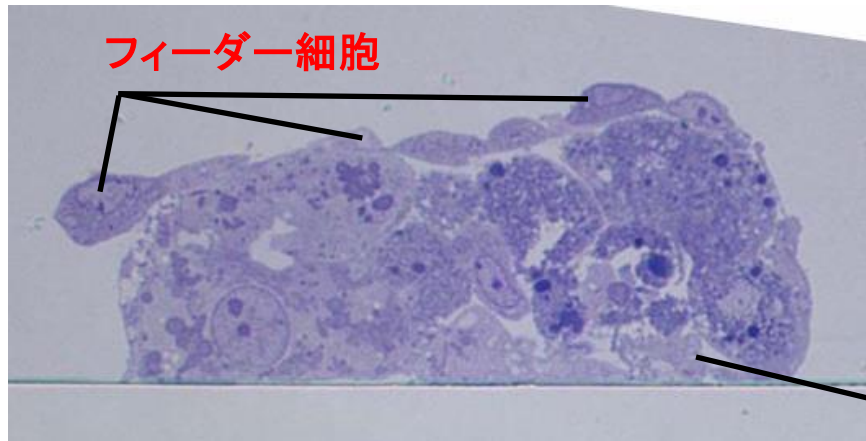


48時間



スフェロイド形成

# Cell-able<sup>®</sup>プレートにおいて血管内皮細胞と共培養した 肝細胞スフェロイドの断面図

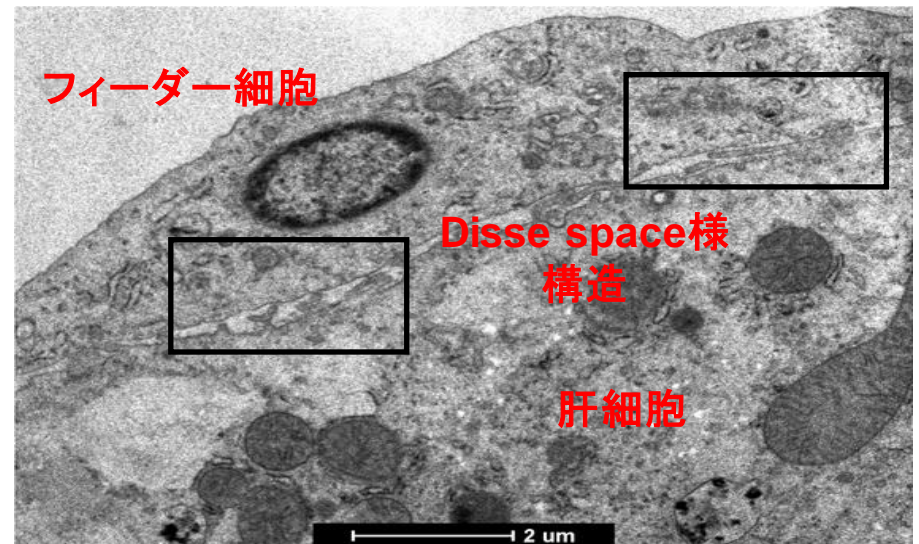


肝細胞はフィーダー細胞により囲まれた構造をとる

フィーダー細胞

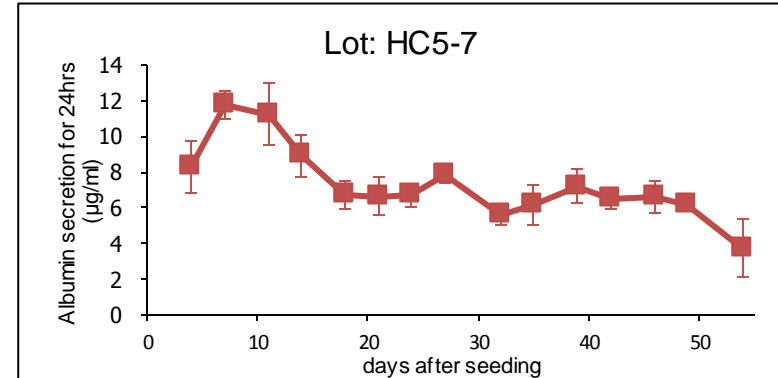
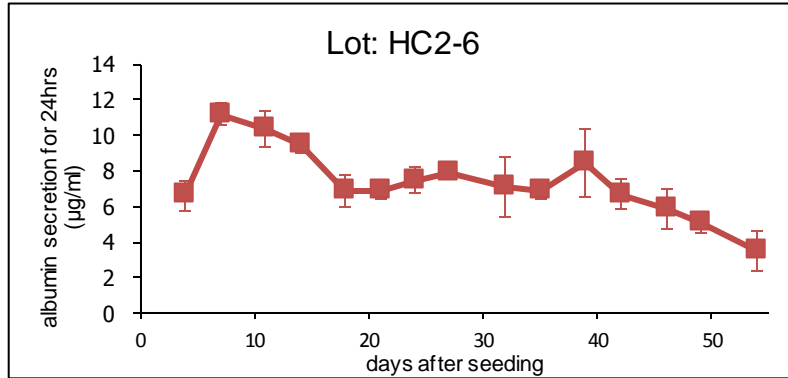
肝細胞とフィーダー細胞の間にはDisse-space様構造が見られる

ラット初代肝細胞  
/血管内皮細胞

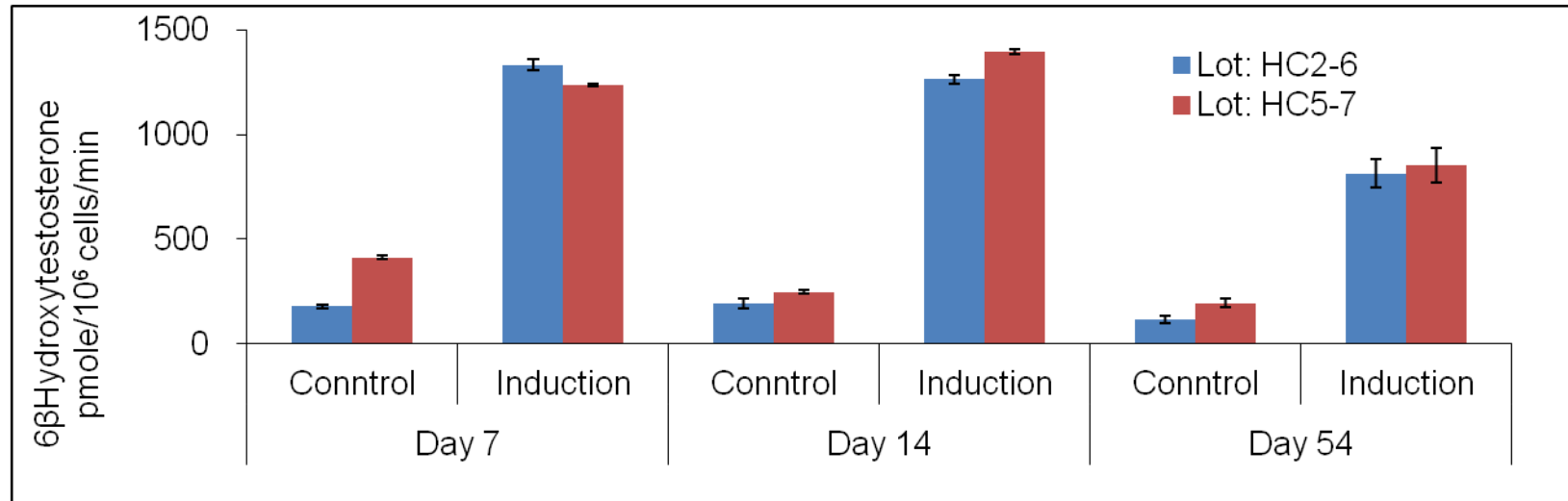


# Cell-able<sup>®</sup>で長期間機能維持されるヒト凍結肝細胞と フィーダー細胞との共培養

## アルブミン分泌



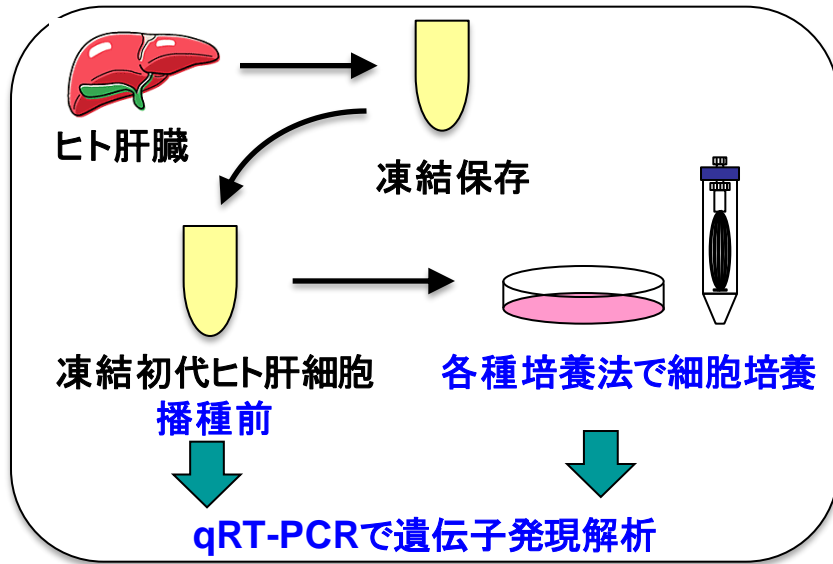
## CYP3A4



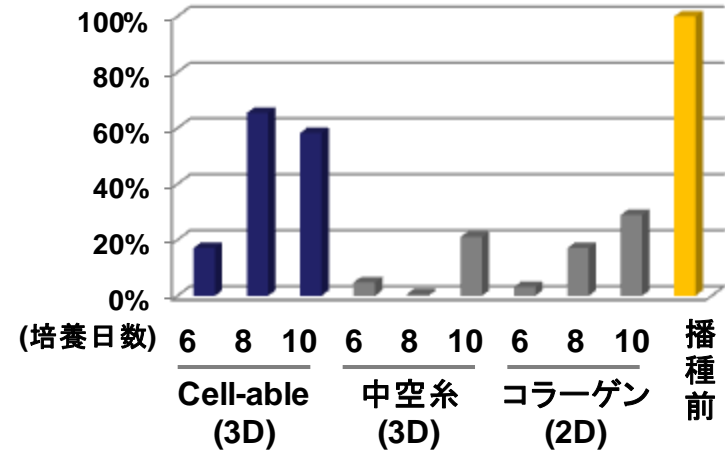
Feeder cells: 3T3 Swiss Albino



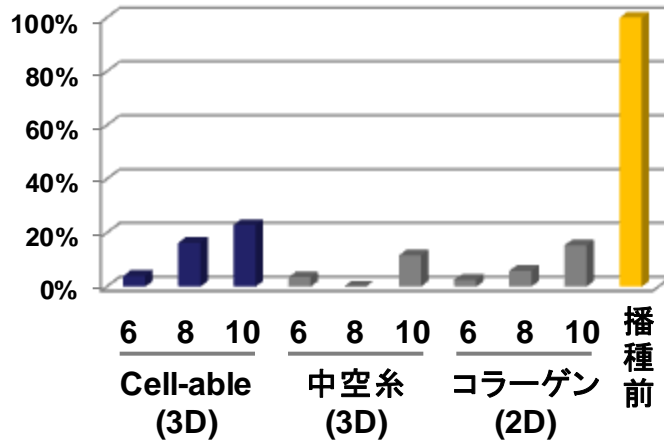
# 各培養法における凍結初代ヒト肝細胞の肝機能遺伝子の発現比較



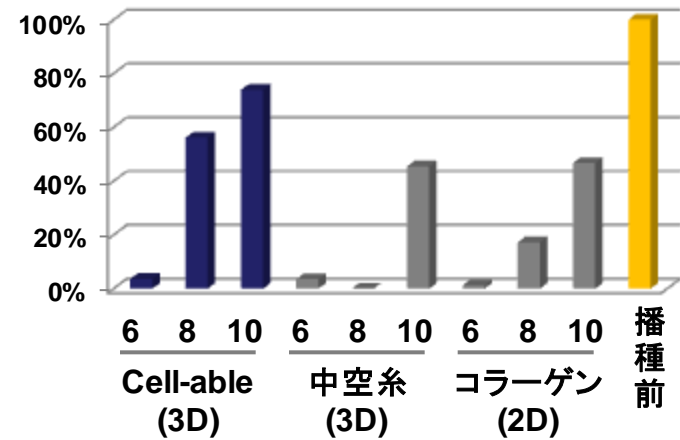
## Albumin



## HNF4A

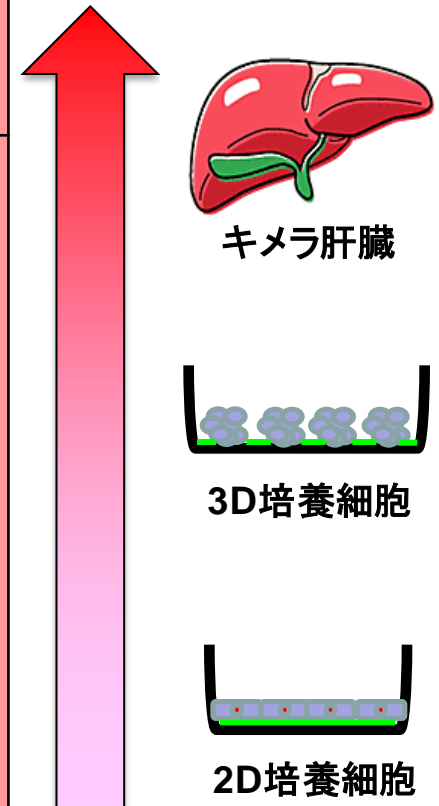


## CYP3A4



# 培養肝細胞の肝機能遺伝子発現 二次元培養とCell-able®三次元共培養の比較

順位	gProcessed Signal (肝臓)	gProcessed Signal (3D)	gProcessed Signal (2D)	機能
1	205748	81369	34361	脂肪酸代謝
2	105257	24897	7842	脂肪酸アシルCoA合成
3	23784	4996	1339	脂質代謝
4	17192	3060	1489	胆汁酸トランスポーター
5	11875	2348	1010	プロトン輸送
6	3907	2249	1047	ジメチルグリシン脱水素
7	1188	511	144	胆汁酸塩トランスポーター
8	596	238	106	グリコーゲン合成



- 培養肝細胞の肝機能関連遺伝子の発現シグナルはキメラ肝臓よりも低い。
- Cell-able®三次元共培養した肝細胞の肝機能関連遺伝子発現シグナルは、二次元培養細胞よりも肝臓に近い。

東京都医学総合研究所感染制御プロジェクト 小原先生より供与

# 薬物肝毒性 (Drug-Induced Liver Injury): 生細胞イメージングを用いた評価

1998年～2008年の間に欧米およびアジアの医薬品市場から使用中止になった主な原因

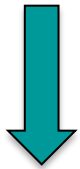
組織/器官系	薬剤数	パーセント
肝臓	15	29
心臓/循環器系	17	33
神経系/中毒	4	8
消化器系	1	2
筋組織	1	2
その他 <sup>a</sup>	11	22

<sup>a</sup> 腎機能不全、がん原性、死、変異原性、エタノールとの相互作用、過敏症、肺高血圧. *N* = 51

*Toxicol. Sci.* 2009, 110: 40-46.

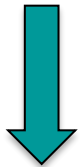
# 薬物のDILI予測の非臨床モデル

- 動物への投与で薬物のDILIを予測できる確率は約50%程度
  - ＞薬物の代謝とPKの違い(代謝物がDILIの原因)
  - ＞肝臓の再生能力の違い(肝臓摘出後7日で2/3が再生)
  - ＞動物への暴露がその他の毒性などにより十分でない



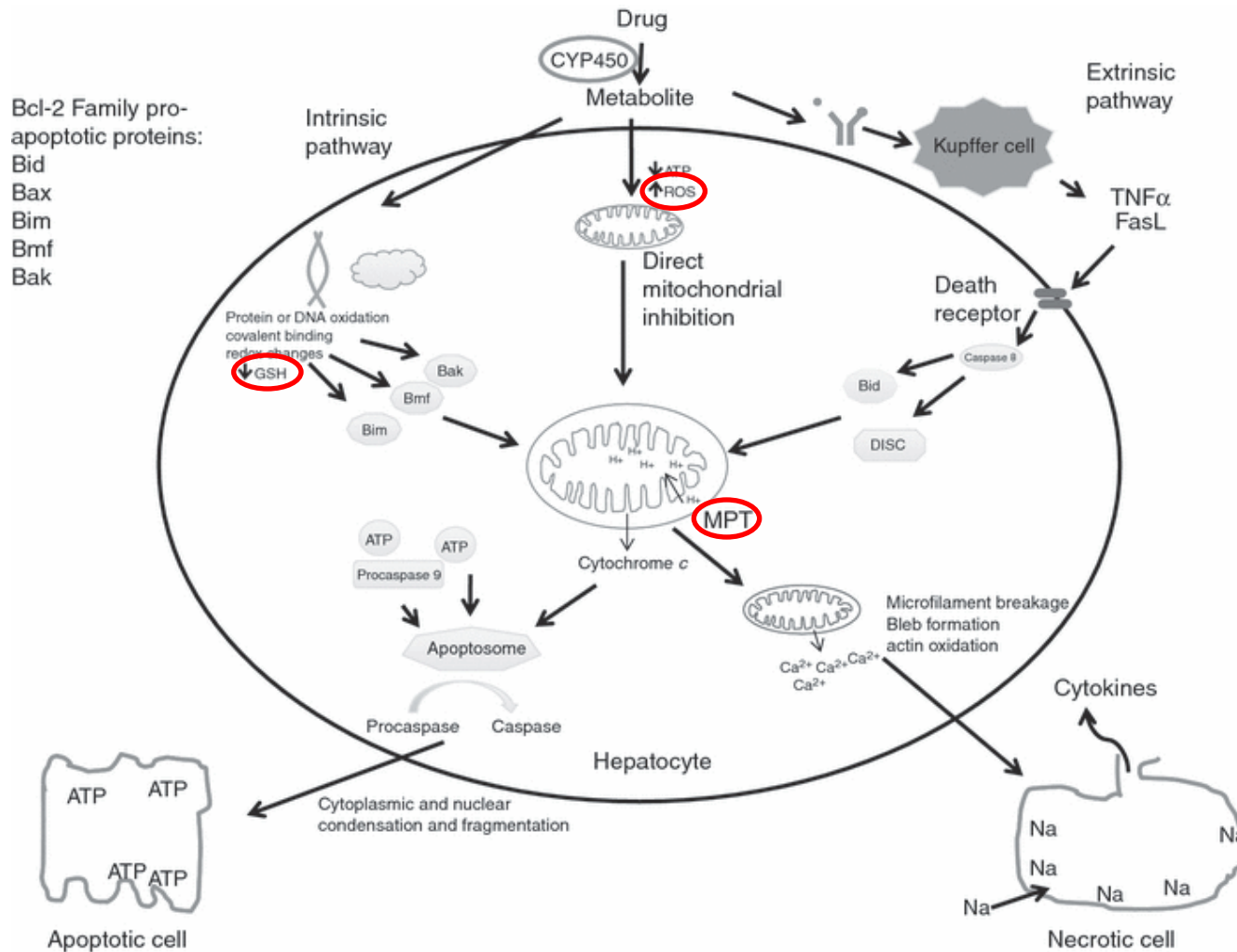
新しいDILIスクリーニングシステムが必要  
GLP試験に入る前に評価

- 新しい技術として注目: ヒト肝細胞のHigh Content Analysis (HCA)
  - ＞単細胞でも複数のパラメータを評価
  - ＞従来法よりも感度が良い
  - ＞HepG2細胞、ヒト凍結肝細胞(ロット間差がある)(文献: Xu, et al., Toxicological Sciences 105: 97–105, 2008)  
ヒト肝細胞二次元培養+24時間薬物暴露



- Cell-able<sup>®</sup>によるヒト肝細胞三次元共培養+長期間薬物暴露
  - ＞更なる予測精度向上を目指す

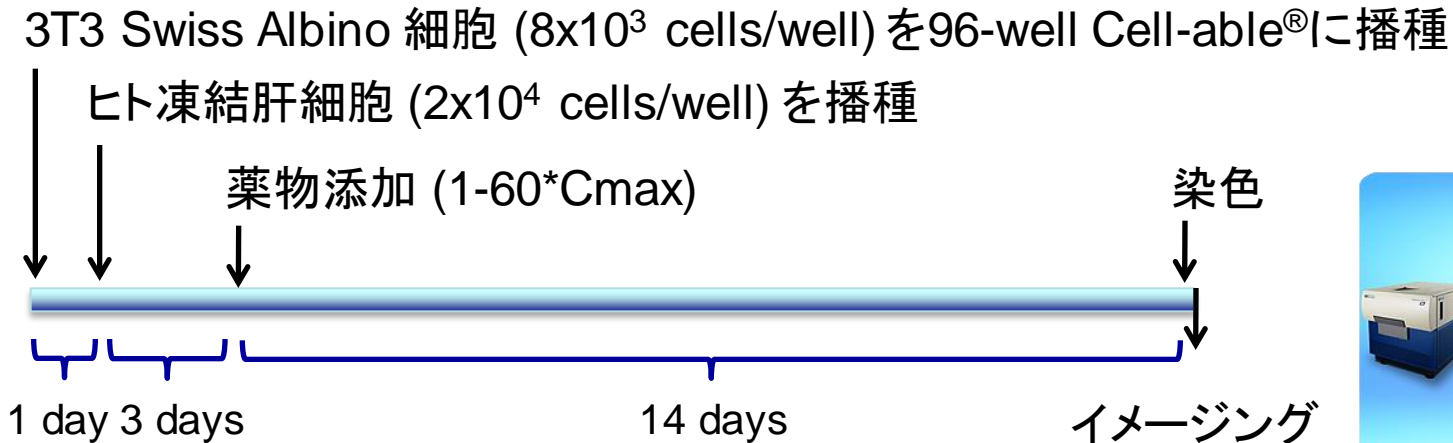
# 薬物肝毒性 (DILI) – その病態生理学とその診断マーカーの変化



Alimentary Pharmacology & Therapeutics  
Volume 34, Issue 1, pages 11-20, 3 MAY 2011



# ヒト肝細胞とフィーダー細胞の共培養： イメージングによるDILI評価

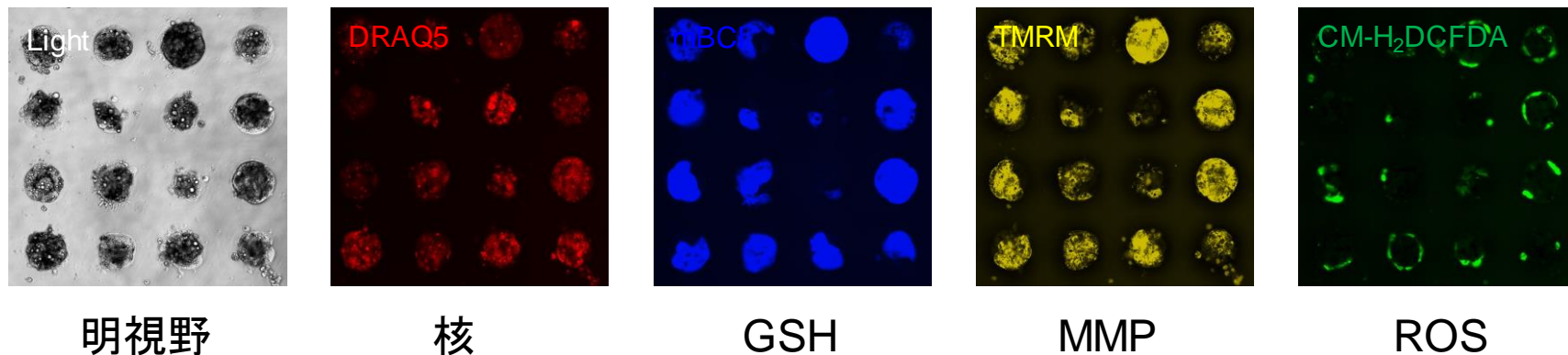


## イメージング

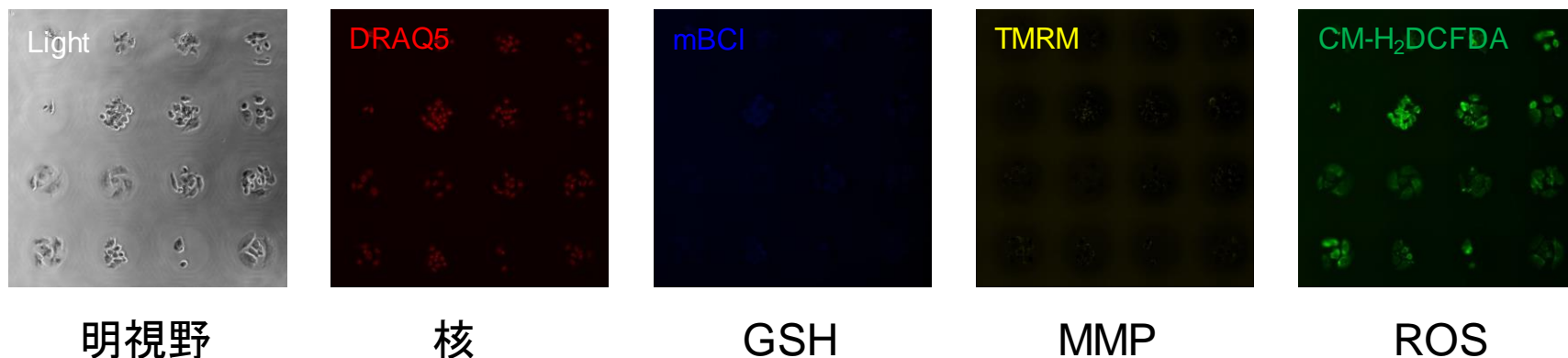
1. 核: DRAQ5<sup>®</sup>
2. GSH: monochlorobimane (mBCI)
3. ミトコンドリア膜電位 (MMP): tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)
4. ROS: CM-H<sub>2</sub>DCFDA
5. High Content Screening: ImageXpress MICRO (Molecular Devices).

# Cell-able<sup>®</sup>上で共培養した肝細胞の診断マーカーのイメージング

肝細胞 + フィーダー細胞 (14日後)



フィーダー細胞 (14日後)

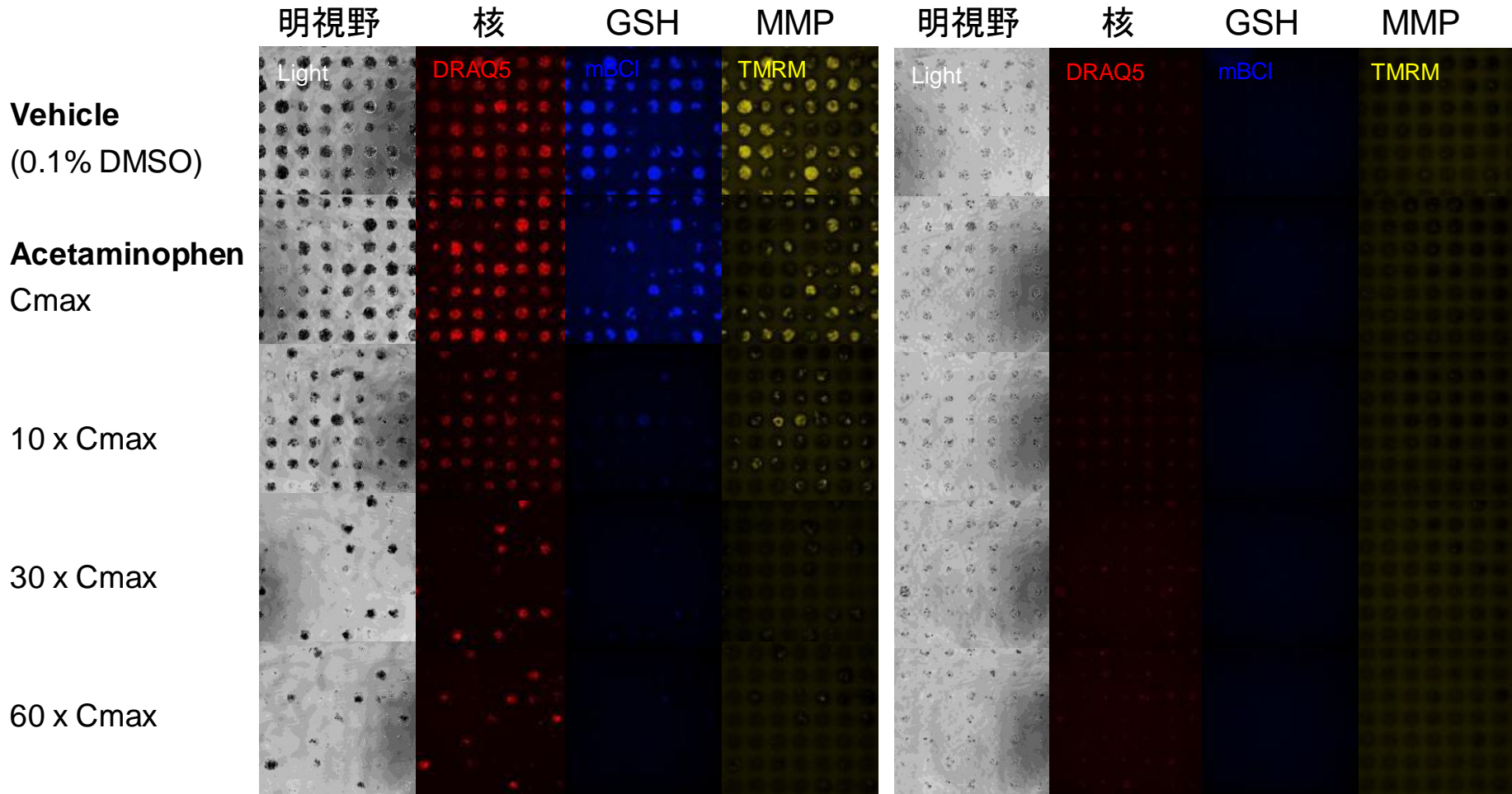


ROSはフィーダー細胞に蓄積→共培養では使えない

# アセトアミノフェンによるDILI診断マーカーの変化

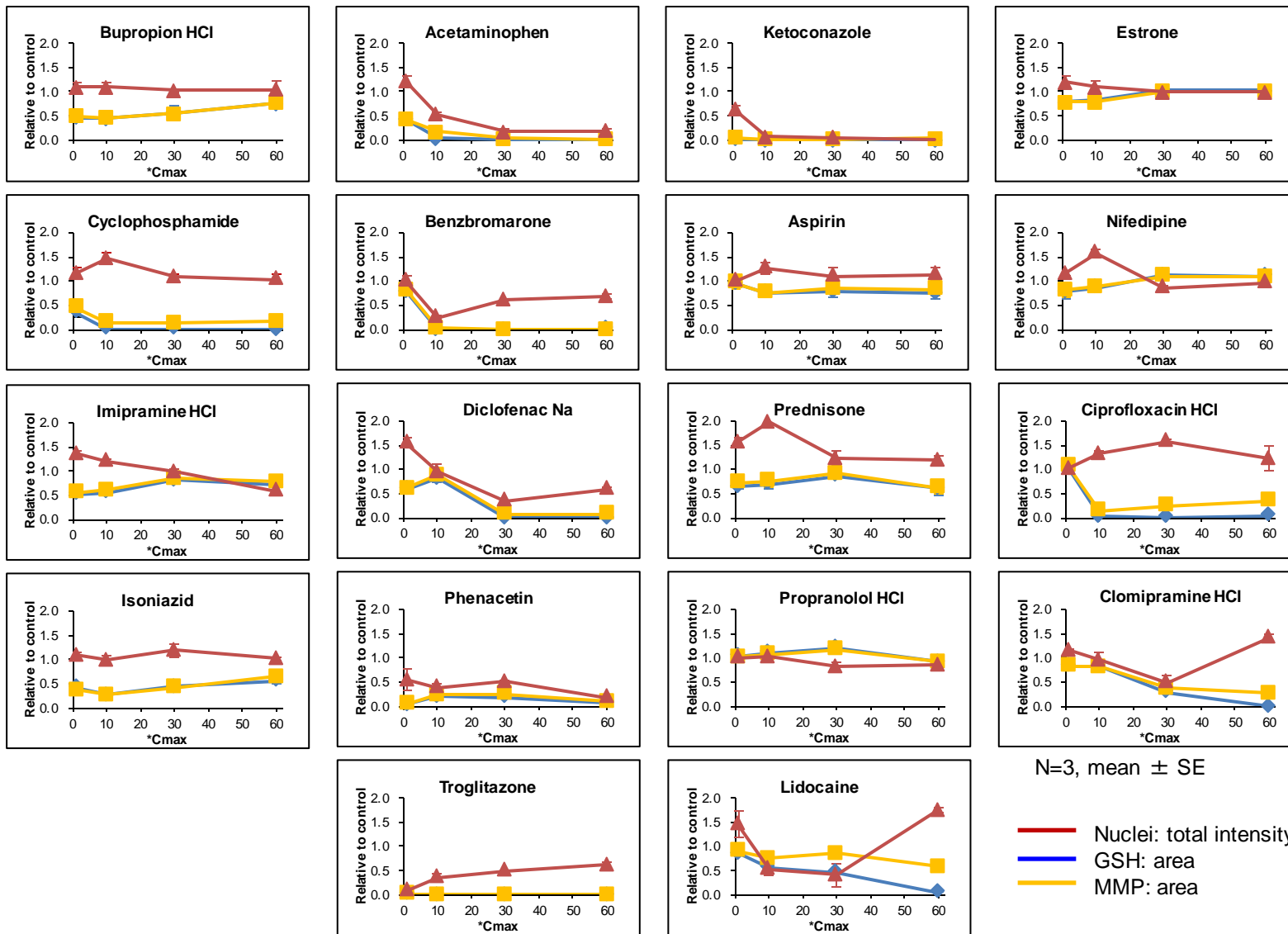
肝細胞・フィーダー細胞

フィーダー細胞のみ



- 細胞をacetaminophenで14日間暴露した。
- 核を評価する場合は、フィーダー細胞のシグナルを差し引く。

# 肝細胞の核、GSHおよびMMPシグナルに対する18薬物の作用



- 溶媒を1とした相対値、イメージをHCSアッセイ装置取り込み、MetaXpressソフトウェアで解析(3ウェルの平均値)

# DILI判定基準：他の論文との比較

試験	培養	DILI陽性判定基準
TGC (2013)	Cryo. human hepatocytes + mouse 3T3 Swiss albino 3次元共培養 Cell-able® plate	薬物処理: 14日間 <b>Imaging:</b> 核総輝度 ( $\Delta$ フィーダー細胞) <0.4; MMP面積 <0.4; GSH 面積 <0.4 陽性判定: 1-30xCmaxの濃度で少なくとも1項目陽性
Xu, et al. ( <i>Toxicological Sciences</i> 105: 97-105, 2008)	Cryo. human hepatocytes 2次元サンドイッチ	薬物処理: 24時間 <b>Imaging:</b> 核面積 <0.4; MMP総輝度 <0.4; GSH面積 <0.65; GSH 総輝度 <0.4; ROS 総輝度 >2.5 陽性判定: 100xCmaxの濃度で少なくとも1項目陽性
Khetani, et al. ( <i>Toxicological Sciences</i> 132: 107-117, 2013)	Cryo. human hepatocytes + stromal fibroblasts 2次元共培養 Micropatterned plate	薬物処理: 16日間 化学発光: ATP IC <sub>50</sub> ; GSH IC <sub>50</sub> 呈色反応: urea IC <sub>50</sub> (最も高感度) ELISA: albumin IC <sub>50</sub> 陽性判定: 1-100xCmaxで少なくとも1項目陽性 (IC <sub>50</sub> 値が100xCmax) 以下



# 18薬物のDILIのまとめ: 他の報告との比較

ID	Cmax (μM)	Clinical DILI	LTKB* Lebel/DILI Score	TGC, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax		Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax		Khetani, 2013 16-d, 1-100x Cmax
Aspirin	5.52	Negative		Negative		Negative		Negative
Lidocaine	36.27	Negative		Negative		Negative		Positive
Prednisone	0.07	Negative		Negative		Negative		Negative
Propranolol HCl	0.20	Negative	WP/3	Negative		Negative		Negative
Bupropion HCl	0.51	Negative	AR/5	Negative		Negative		Negative
Nifedipine	0.27	Positive	WP/3	Negative		Negative		Negative
Imipramine HCl	0.08	Positive	AR/3	Negative		Negative		Positive
Estrone	0.02	Positive		Negative		Negative		Negative
Cyclophosphamide	264.28	Positive	AR/5	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Acetaminophen	138.93	Positive		Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP	Positive
Benzbromarone	4.34	Positive	WD	Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP, ROS	Positive
Ciprofloxacin HCl	11.47	Positive	WP/7	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Clomiplamine HCl	0.19	Positive		Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Diclofenac Na	7.99	Positive	WP/7	Positive	GSH, MMP, N	Positive	ROS	Positive
Isoniazid	76.56	Positive	BW/8	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Phenacetin	13.39	Positive		Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP, N	Positive
Troglitazone	6.39	Positive	WD	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP	Positive
Ketoconazol	6.96	Positive	BW/8	Positive	GSH, MMP, N	NA		Positive

- DILI in Liver Toxicity Knowledge Base (Chen, 2011), NA not available
- The line represents a border between no or less and most DILI concern.

# Clinical DILI予測：他の報告との比較

	TGC, 2013	Xu, 2008	Khetani, 2013
<b>Clinical DILI</b>			
Sensitivity	77% (10/13)	42% (5/12)	85% (11/13)
Specificity	100% (5/5)	100% (5/5)	80% (4/5)
<b>Clinical DILI + LTKB</b>			
Sensitivity	100% (9/9)	63% (5/8)	100% (9/9)
Specificity	89% (8/9)	100% (9/9)	67% (6/9)

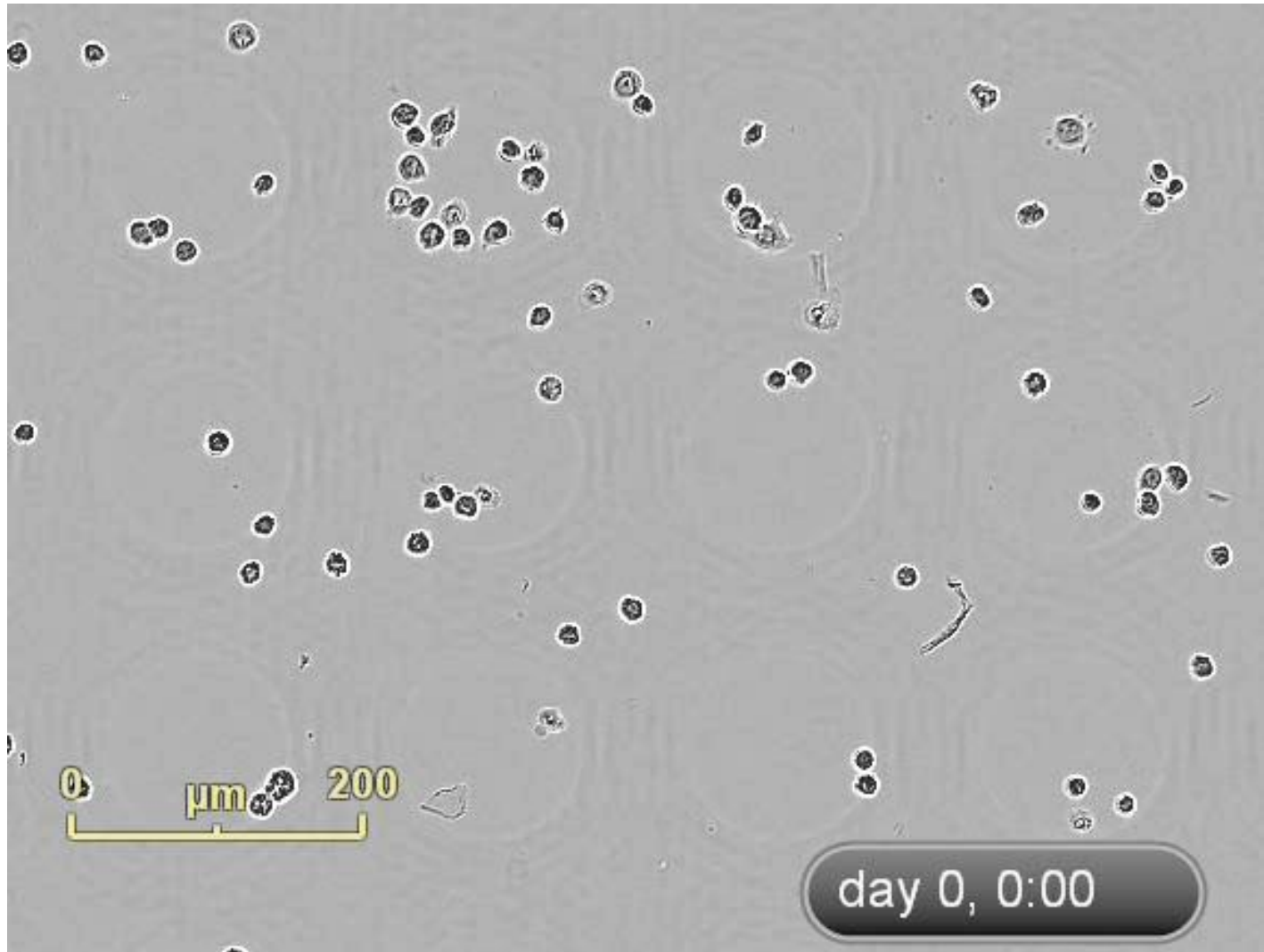
Sensitivity: predicted positive/positive in clinical DILI, specificity: predicted negative/negative in clinical DILI

- Xuらの論文では感受性が低いことが問題であったが、肝細胞とフィーダー細胞の共培養により薬物との処理期間を延長したことでDILI予測の感受性が著明に向上した。
- イメージングによるDILI評価は、肝機能を基にしたDILI評価と同等以上の精度で臨床DILI予測をすることができた。

# Cell-able<sup>®</sup>による肝細胞の三次元共培養を用いたDILI評価

- Cell-able<sup>®</sup>を用いたヒト肝細胞とマウスの間質細胞の共培養は、CYP活性やアルブミン分泌などの肝機能を54日間維持することができた。
- Cell-able<sup>®</sup>を用いた肝細胞の三次元共培養は、薬物の14日間暴露を可能にし、そのことにより臨床でのDILIを低い濃度で予測することができた。
- GSHとMMPのイメージングは、DILI評価の良いマーカーであり、肝機能測定によるDILI評価と同等以上の精度で臨床DILI予測をすることができた。
- Cell-able<sup>®</sup>を用いたヒト肝細胞の三次元共培養とイメージングの組み合わせは、創薬の初期段階の薬物のDILI評価を可能にすると思われる。

# Cell-able<sup>®</sup>プレート上で形成されるがん細胞スフェロイド



Cell: DLD-1 human colon cancer cell line

# Cell-able<sup>®</sup>プレートでスフェロイド形成が確認されたがん細胞株

**DLD-1**

Colon adenocarcinoma

**CCK-81**

Colon adenocarcinoma

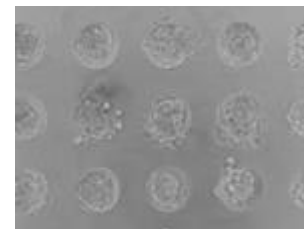
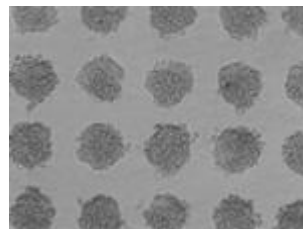
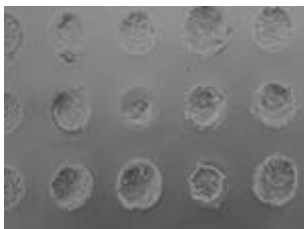
**HARA-B**

Lung squamous cell

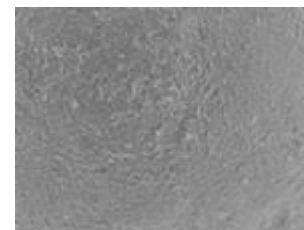
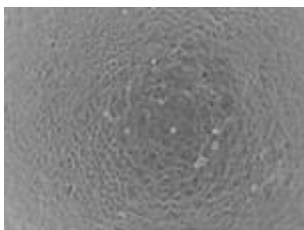
**A549**

Lung carcinoma

**Cell-able<sup>®</sup>**



**2D plate**



**DU145**

Prostate carcinoma

**G361**

Melanoma

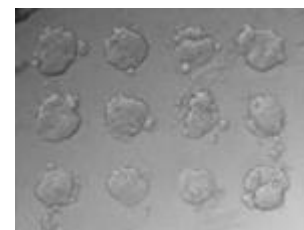
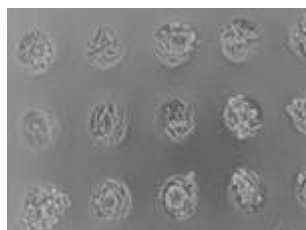
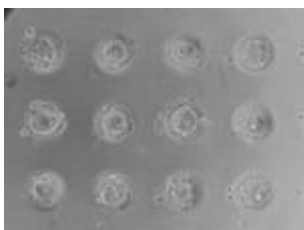
**ACHN**

Renal cell carcinoma

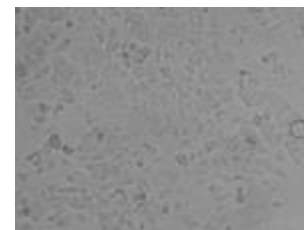
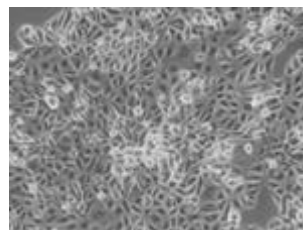
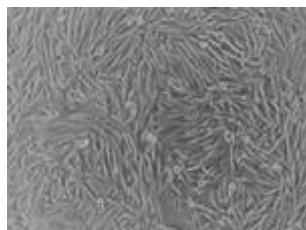
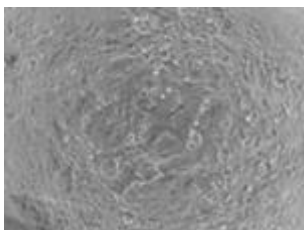
**MCF7**

Breast adenocarcinoma

**Cell-able<sup>®</sup>**



**2D plate**





# がん細胞の三次元培養フォーマットとテクノロジーの比較

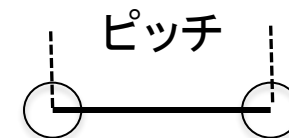
方法	特徴	欠点
Matrigel	ECMとの相互作用	ロット間差があり、再現性に問題、HTSに不向き、スフェロイドサイズコントロールができない
Hanging drop	スフェロイドサイズが均一、細胞は完全に非接着	操作が煩雑、HTSに不向き、ECMとの相互作用なし
Low bind plate	操作が簡単、HTSに適応	多くの細胞が接着、サイズコントロールができない、ECMとの相互作用なし
Scivax lithography plate	操作が簡単、HTSに適応	サイズコントロールが不十分、細胞とプレートが固有の結合
Elplasia plate	操作が簡単、HTSに適応、スフェロイドサイズが均一、200 $\mu$ m 四方以上には広がらない	ECMとの相互作用なし、コーティングしなければ、弱いプレートとの結合

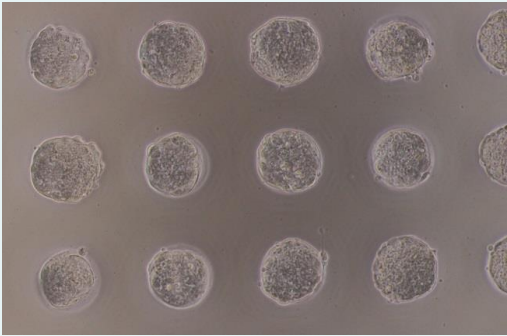

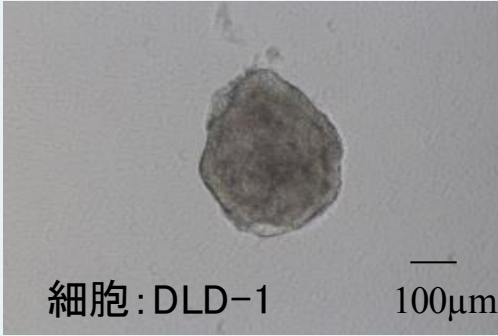
www.Numira.com

## Cell-ableの特徴

1. 操作が簡単(自動化が可能)
2. HTSに適応(384-well plateが使える)
3. スフェロイドサイズが均一(薬物感受性試験で信頼性の高いIC50値の決定)
4. 間質細胞との共培養
5. HSCに適応: 細胞が一部プレートのECMと接着しているため免疫染色が容易

# 均一なサイズコントロールが可能な三次元培養プレートCell-able®

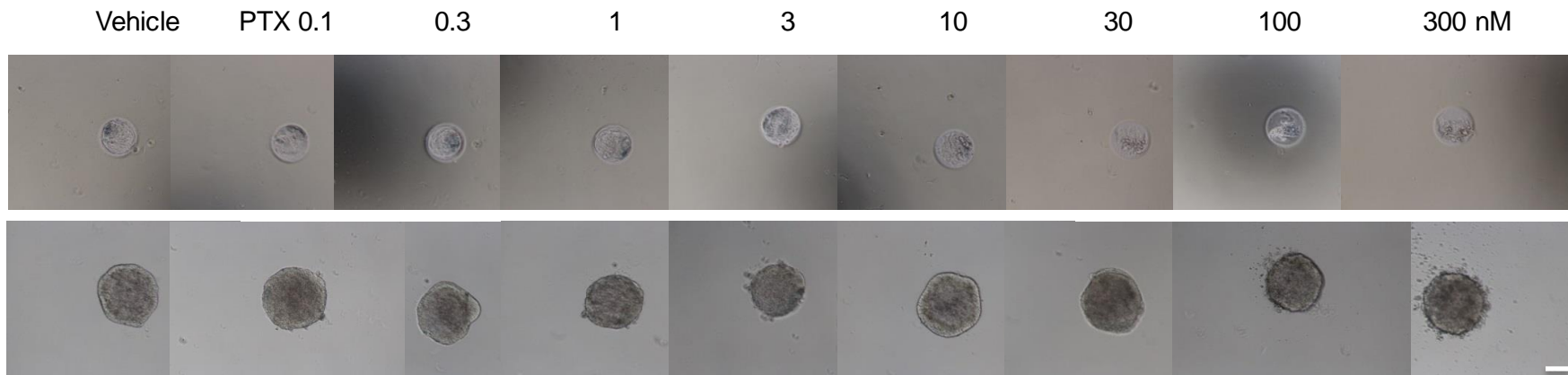


ピッチ (μm)	200	360	800
細胞 DLD-1			
スフェロイド数 384プレート	200	60	13 (/well)
スフェロイドサイズ (μm)	100	160	250

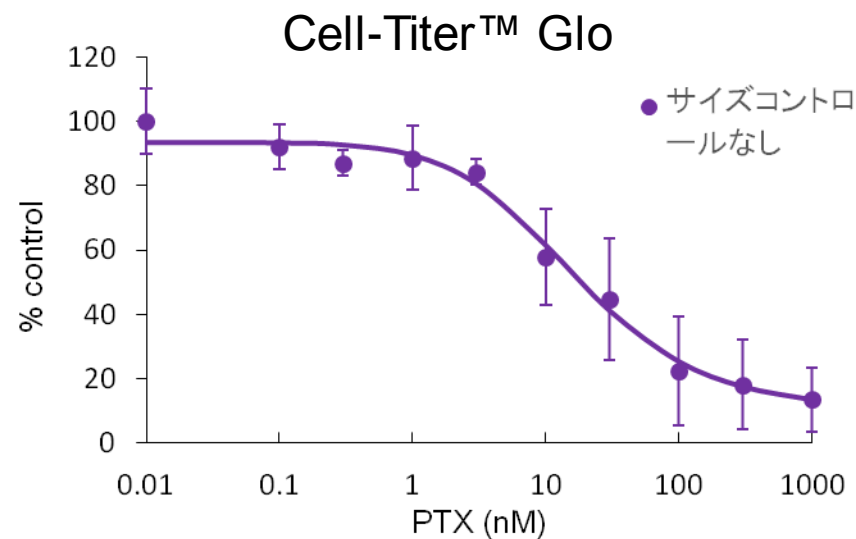
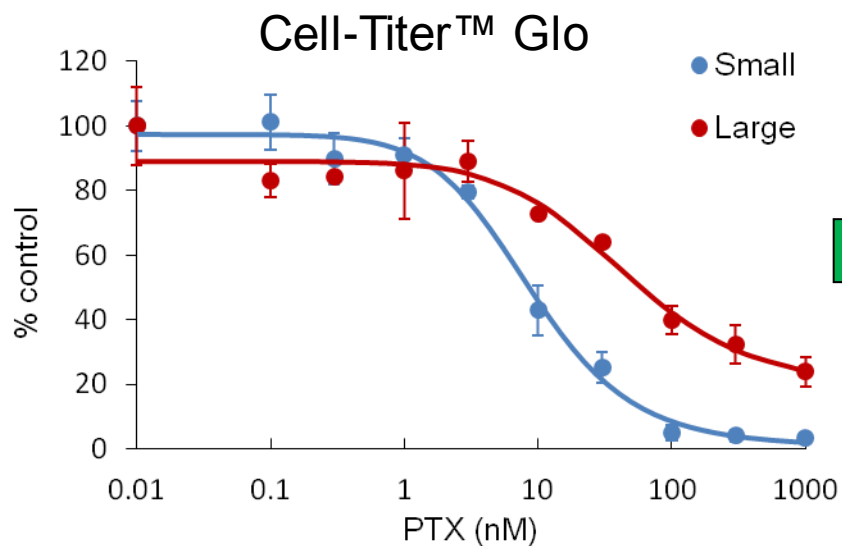
培養開始後5日のスフェロイドサイズ

ピッチサイズを大きくすれば、大きなスフェロイドも作製可能

# スフェロイドのサイズと薬物感受性



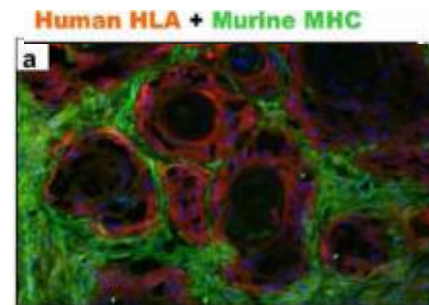
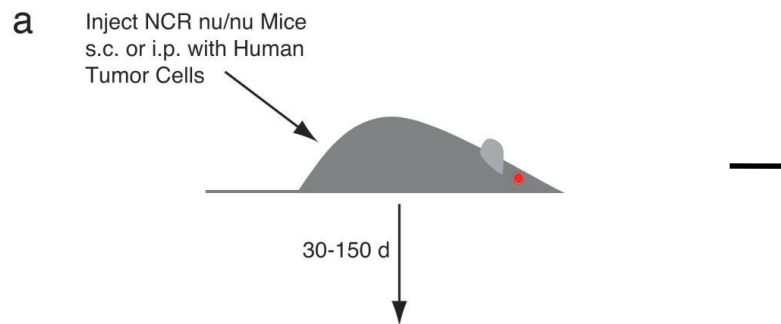
上段:小;下段:大スフェロイド



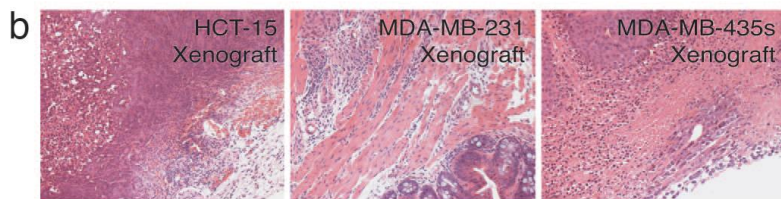
大きいスフェロイドはPTXに対してより抵抗性が高い

→スフェロイドサイズの均一化は感受性試験にとって重要な因子

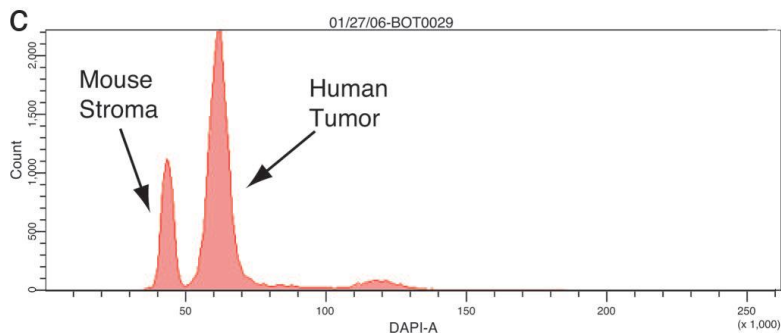
# がん組織はがん細胞と間質系細胞が共存する



Squamous cell carcinoma  
J Invest Dermatol. 2012 132:284-90

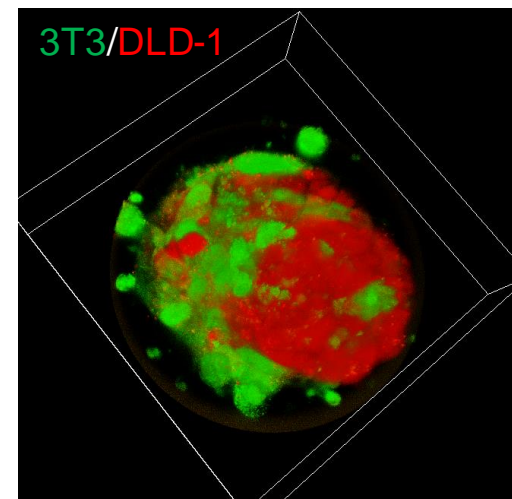


FACS of Nuclei from Xenograft Tumor

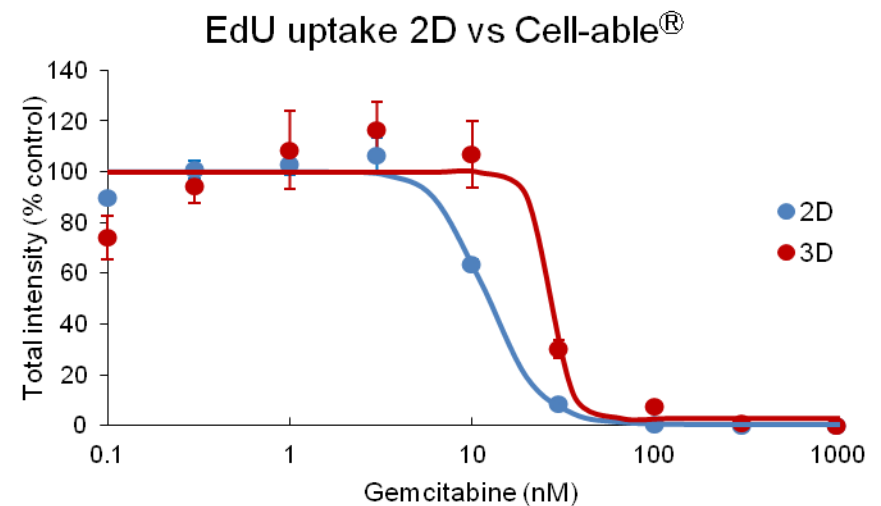
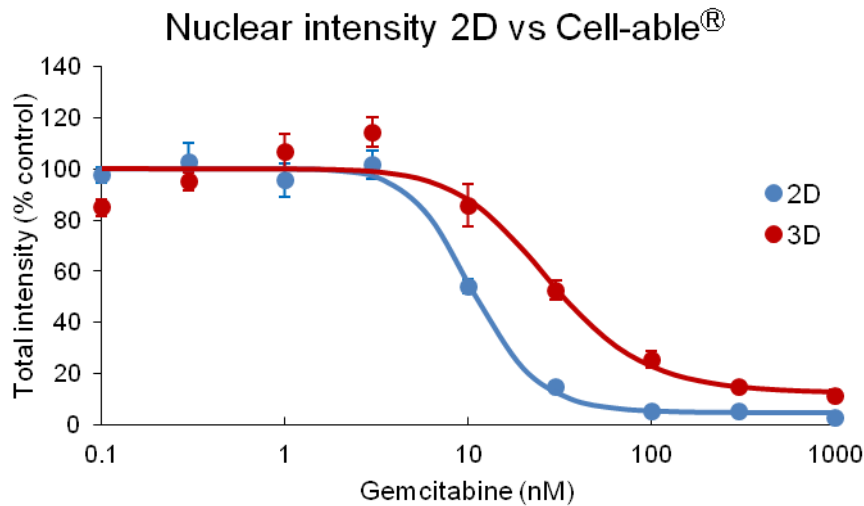
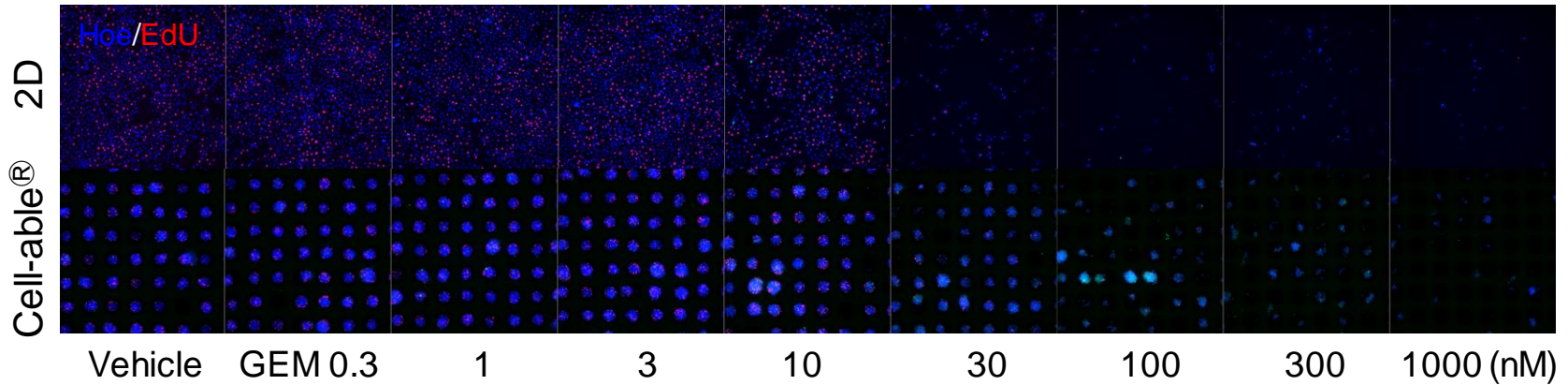


Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103:19848-53

DLD-1/3T3細胞をCell-able上で共培養

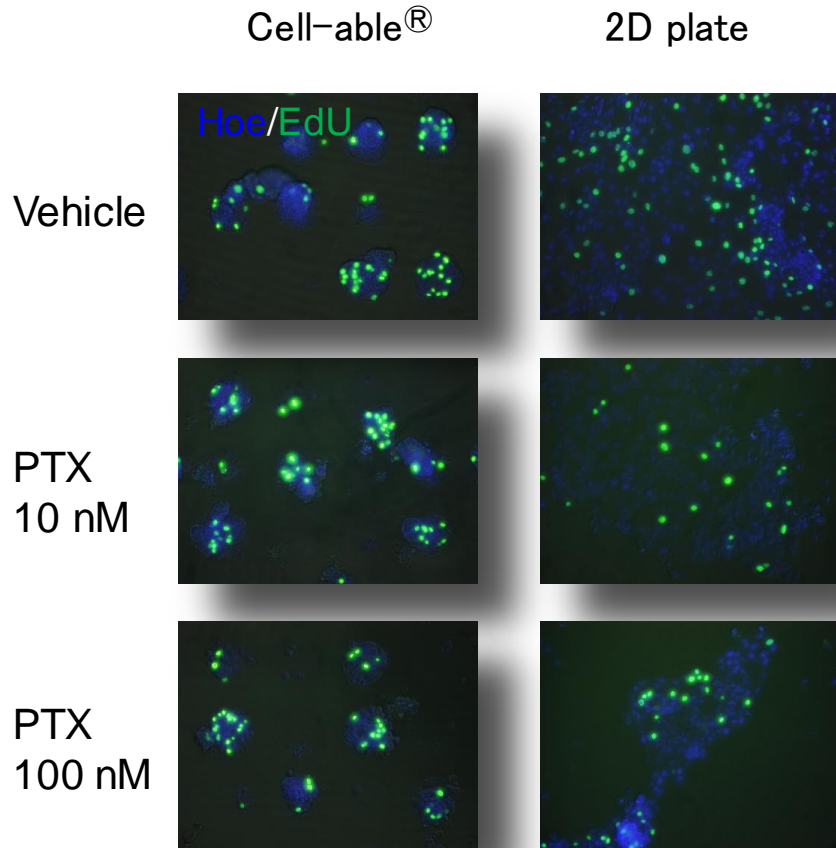


# 二次元培養との比較: がん細胞スフェロイドの化学療法剤 に対する抵抗性

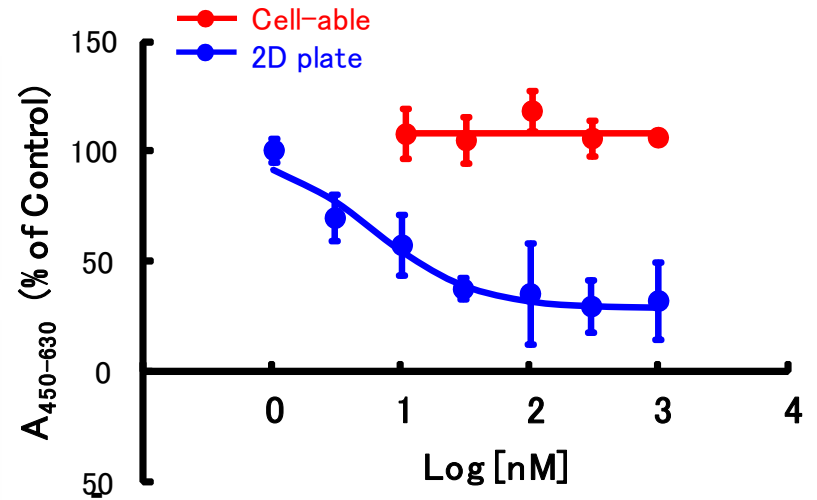




# 二次元培養と比較：患者由来子宮体がん細胞に対するPTXの抵抗性



患者由来子宮体がん細胞のEdU  
取り込みに対するPTXの作用

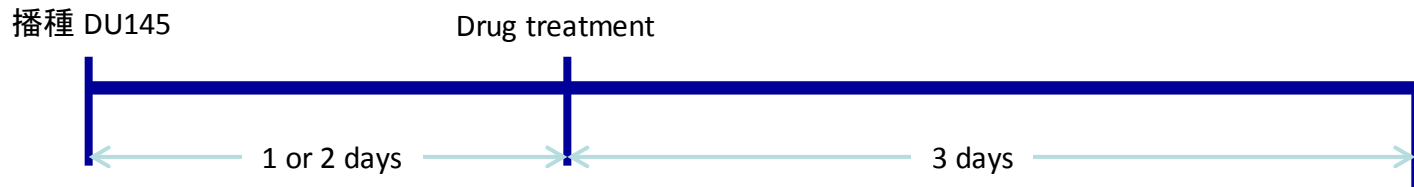
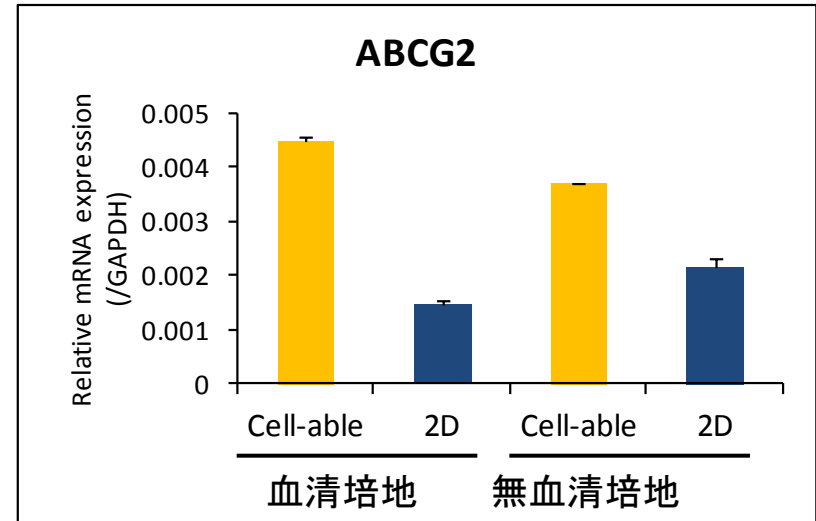
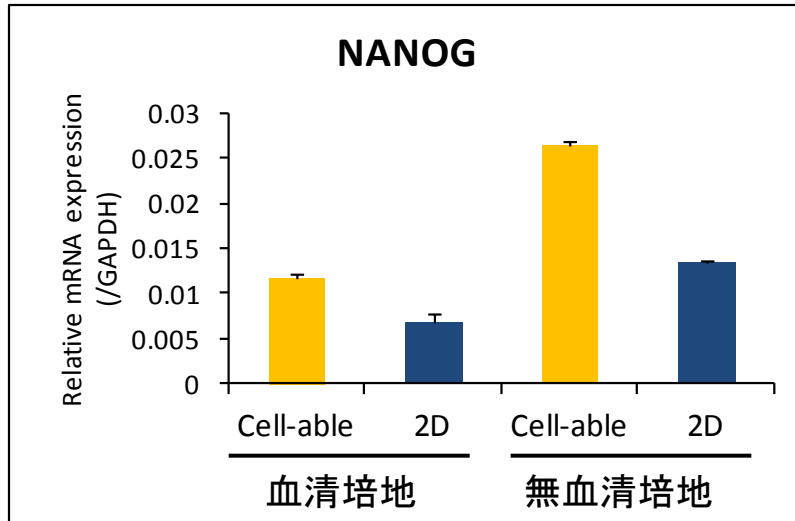


患者由来子宮体がん細胞の増殖に対するPTXの作用

2Dプレートの単層細胞はPTXによりEdUの取り込みや増殖が抑制されたが、重層化した細胞やスフェロイドは抵抗性を示した



# 二次元培養との比較: がん細胞スフェロイドの幹細胞マーカーmRNAの高発現



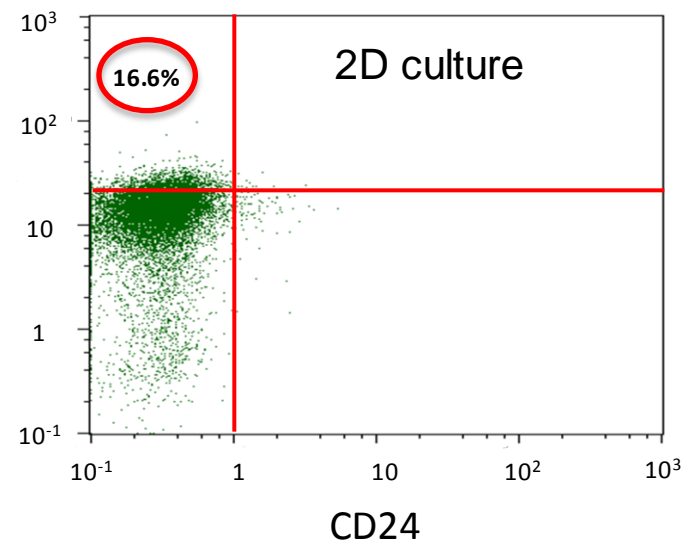
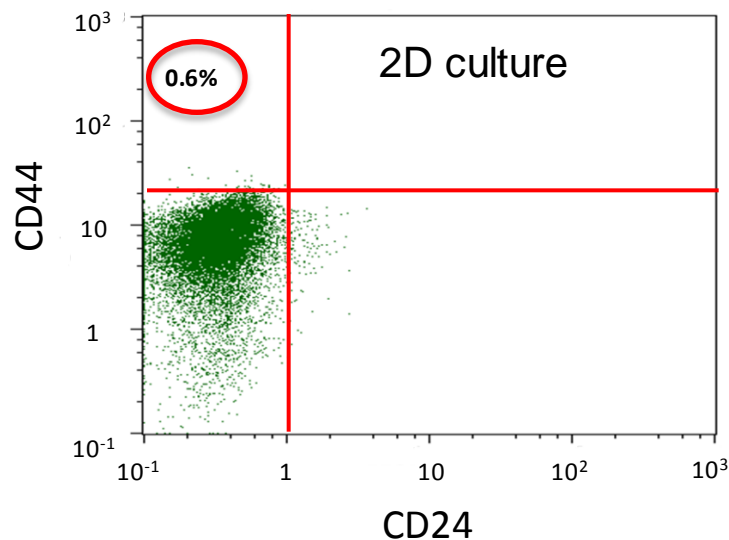
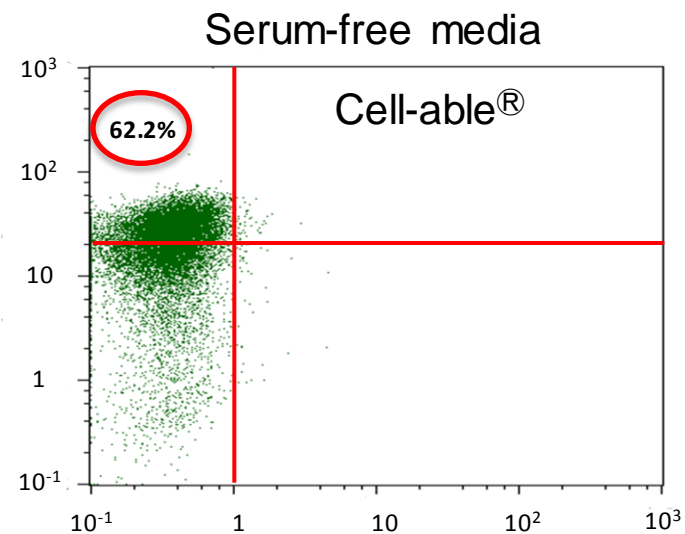
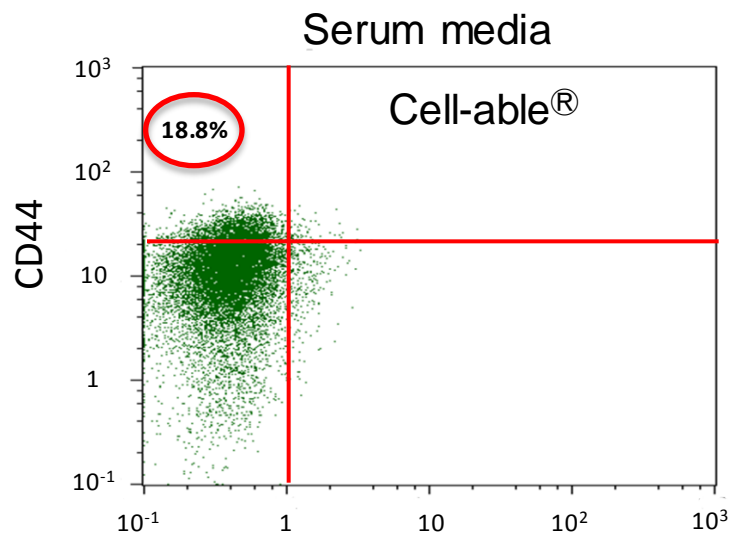
Groups;

1. 血清培地とCell-able
2. 血清培地とcollagen-coated plate (2D)
3. 無血清培地とCell-able
4. 無血清培地とcollagen-coated plate (2D)

Evaluation;

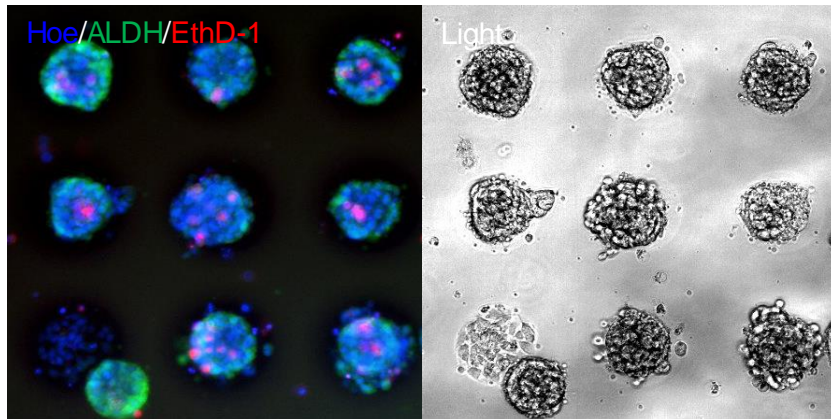
1. 生存率  
(HCS imaging, ATP luciferase)
2. 表面抗原 (FACS)
3. 遺伝子発現 (RT-qPCR)

# 二次元培養との比較：がん細胞スフェロイド中の幹細胞CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>の増加

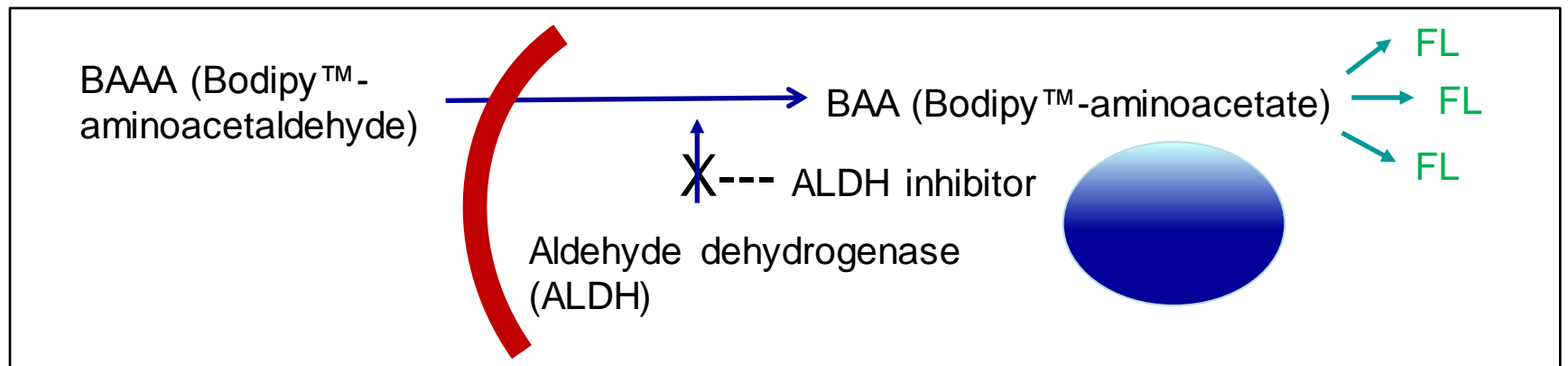
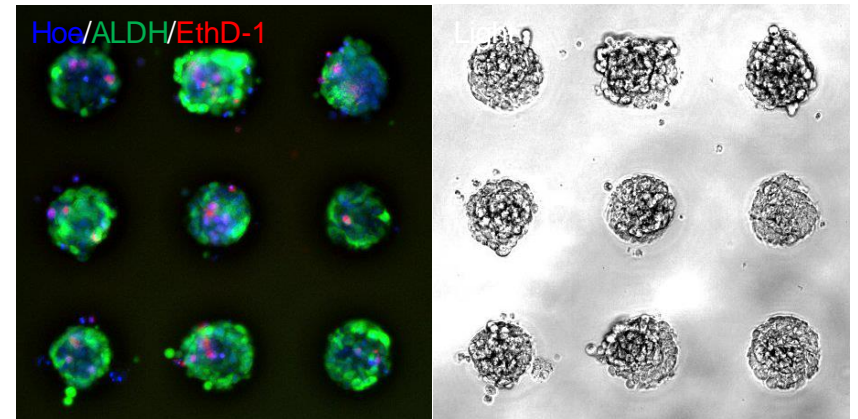


# 二次元培養との比較：がん細胞スフェロイドのALDH高発現幹細胞の可視可

ALDH inhibitor +

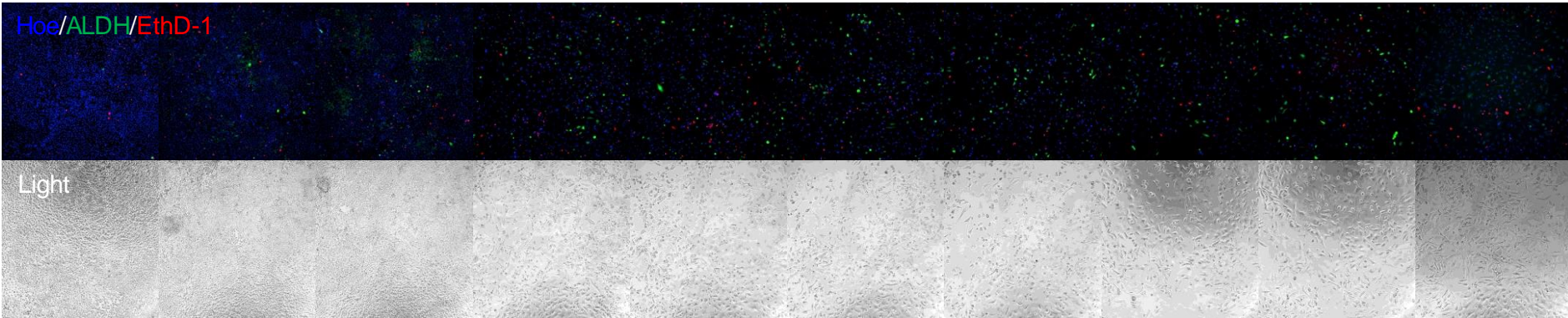


ALDH inhibitor -

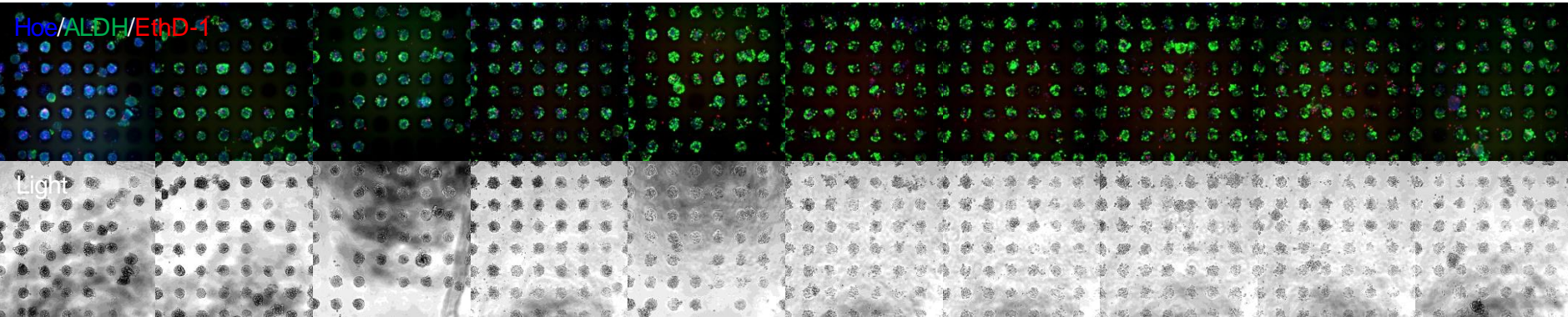


# 二次元培養との比較：がん細胞スフェロイド中の幹細胞のPTXに対する抵抗性

2D plate



Cell-able® plate



Vehicle	Vehicle	PTX								
		1	3	10	30	100	300	1000	3000 nM	
ALDH-I+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



# がん細胞株を用いた抗がん薬の創薬

新規抗がん薬探索



In vitro: molecular targets



Cell assays: cancer cell lines → バイオマーカー探索



In vivo xenografts



開発候補

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)

Nature 2012, 483:603 24化合物 vs 479細胞株



バイオマーカー探索



Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC)

Nature 2012, 483:570

138化合物 vs 700細胞株

→200化合物 vs >1,000細胞株(2-3年以内)

<http://www.cancerrxgene.org/>



薬物感受性試験: 二次元培養



三次元培養で新バイオマーカー？  
(がん幹細胞ターゲット)

## Cell-able<sup>®</sup>によるがん細胞の三次元培養

1. Cell-able<sup>®</sup>プレート上で約75%のがん細胞はスフェロイドを形成した。
2. Cell-able<sup>®</sup>プレートはスフェロイドサイズをコントロールすることができ、HTSによる薬剤感受性試験に適する。
3. Cell-able<sup>®</sup>プレート上のスフェロイドはECMを介してウェルの底に接着しているため免疫染色することが容易でイメージングに適している。
4. In vivoのがん組織で認められる繊維芽細胞との共培養にも適している。
5. 二次元培養と比較すると、スフェロイドはがん幹細胞マーカーの発現が高く、それらの細胞は化学療法薬に対して抵抗性を示した。
6. 創薬において、Cell-able<sup>®</sup>はがん幹細胞を標的にした抗がん薬のバイオマーカー探索に寄与できると考えられる。



# 謝 辞

国立成育医療研究センター  
絵野沢伸

東京都医学総合研究所  
小原道法

兵庫県立がんセンター  
須藤保

東洋合成工業株式会社  
城村友子  
小関恵美子  
池谷武志