3次元培養を用いたHCSイメージングによるマルチプレックス肝毒性評価予測とそのスフェロイド構造

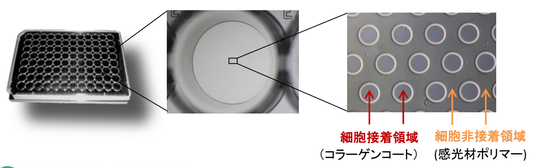
〇赤平有希[1)], 城村友子[1)], 石田雄二[2)], 山崎ちひろ[2)]
1) 東洋合成工業株式会社　2) 株式会社フェニックスバイオ

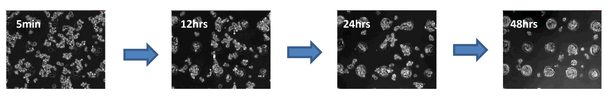
Introduction

初代培養肝細胞は薬物性肝毒性(DILI)の評価予測に有用な系であるが、従来の二次元培養法では、肝臓の有する代謝機能などの長期維持が困難であり、必ずしも生体の反応を反映できていない問題点がある。そこで、近年は二次元培養法から、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り、様々な三次元培養器材・方法の報告が増えてきている。

本発表では、三次元マルチスフェロイドアレイCell-able®で作製した、ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス®)由来のヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®)のスフェロイドを用いて、ハイコンテントスクリーニング(HCS)による肝毒性(DILI)評価の有用性および肝臓構造の再構築についての検討を実施したので報告する。

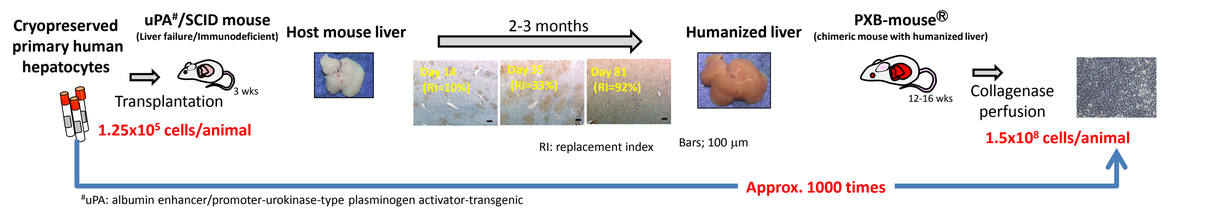
【Cell-able®とは】





一般的な培養操作で
直径 約100μm, 高さ 20～40μmの均一な3Dスフェロイドを形成
96well plate ：800circles/well
384well plate: 250circles/well

【PXB-cells®とは】ヒト凍結肝細胞の希少性の問題を解決

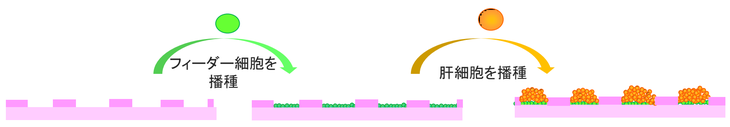


Methods

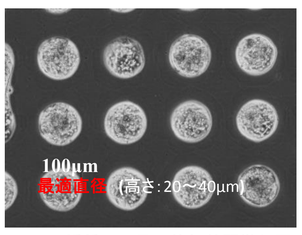
【培養条件】

培養条件	
培養器材	Cell-able® 384 plate
フィーダー細胞	3T3 swiss albino
肝細胞	ヒト肝キメラマウス(PXBマウス®)由来 ヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®)
培地	RM-101

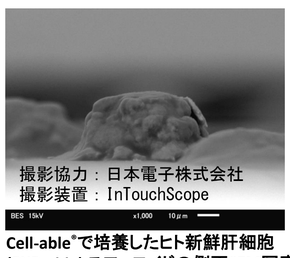
【Cell-able®での肝細胞/繊維芽細胞の共培養】



フィーダー細胞 ： 8x 10^3 cells/well
肝細胞 ： 2-4 x 10^4 cells/well（96ウェルプレートの場合）



PXB-cells®播種14日目の位相差顕微鏡写真
(フィーダー細胞：3T3線維芽細胞)



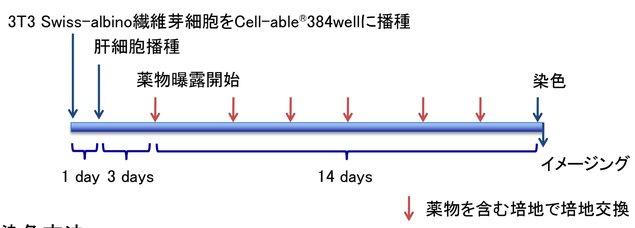
Cell-able®で培養したヒト新鮮肝細胞
(PXB-able) スフェロイドの側面SEM写真

【HCSによるDILI予測試験概要】

Cell-able®で培養したPXB-cells®スフェロイドに薬物を14日間曝露し，**薬物によって引き起こされる肝障害（DILI)をImageXpress Micro (Molecular Devices) によるイメージング解析により予測**した。

この結果を，マトリゲルサンドイッチ培養24時間薬物曝露(Xu et al.,2008) [1)], 2次元共培養16日間薬物曝露(Khetani, et al., 2013)[2)]による結果と比較した。薬物のDILI判定は，FDAのLTKB (Liver Toxicity Knowledge Base)[3)]を基に行った。

●実験スケジュール



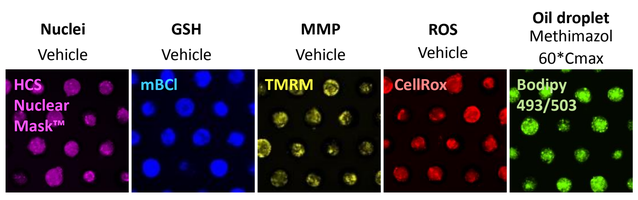
●染色方法

Step-1　培養上清を除去し，全てのプローブを含む染色液を添加して45分間インキュベート
Step-2　染色液を除去して1回洗浄後，TMRM, mBClを含む染色液を添加

測定
解析

HCS: ImageXpress MICRO (Molecular Devices)，5プローブ　約1 時間／384 well

●各バイオマーカーの蛍光染色イメージングと解析　Molecular Devices



【各試験方法の概要比較】

	Xu, 2008[1)]	Khetani, 2013 [2)]	TOYOGOSEI Cell-able®
Cell	Cryo-human hepatocyte	Cryo-human hepatocyte + 3T3 J-2	Fresh-human hepatocyte from chimeric mouse(PXB-cells) +3T3 Swiss albino
Culture	2D /Matrigel Overlay	HepatoPac™ co-culture	Cell-able® 3D Co-culture
播種細胞数	60,000 Cells/well (96well plate)	65,000 Cells/well (96well plate)	8,000 Cells/well (384well plate)
薬物暴露濃度	100×Cmax	1, 30, 60, 100 ×Cmax	1,10,30,60 ×Cmax
薬物曝露時間	24時間	16日間	14日間
検出マーカー	核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素，油滴	ATP 細胞内グルタチオン アルブミン産生 尿素産生	核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素，油滴
検出方法	蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出	CellTiter-Glo assay GSH-Glo assay ELISA 呈色反応	蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出

Results

【各試験でのDILI判定基準】

試験	検出法	DILI陽性判定基準	陽性判定
TOYO GOSEI Cell-able® 1-60×Cmax 14日間曝露	イメージング	コントロールに対する比が 核：総輝度値(Δフィーダー細胞)<0.4 ミトコンドリア膜電位：面積値<0.4 GSH：面積値<0.4	1-30×Cmaxの濃度で少なくとも1項目が陽性
Xu, 2008 100×Cmax 24時間曝露	イメージング	コントロールに対する比が 核：面積値<0.4 ミトコンドリア膜電位：輝度値<0.4 GSH：面積値<0.65, 輝度値<0.4 ROS：総輝度値<2.5	少なくとも1項目が陽性
Khetani, 2013 1-100×Cmax 16日間曝露	化学発光、呈色反応、ELISA	化学発光：ATP IC_{50}; GSH IC_{50} 呈色反応：urea IC_{50} ELISA：albumin IC_{50}	1-100×Cmaxの濃度で少なくとも1項目が陽性 (IC_{50}が100×Cmax以下)

LTKB*を参考に判定基準を決定

	DILI Severity score		
Status/ label	2,3	4,5	6-8
NM		N	
AR		+/-	
WP	+/-	P	P
D		P	
BW		P	
WD		P	

Drugs of no concern for DILI ; N
Drugs of less concern for DILI ; +/-
Drugs of most concern for DILI; P

LTKBに記載が無い薬物については、2008年Xuらの論文[2)]のClinical DILIの判定に従った

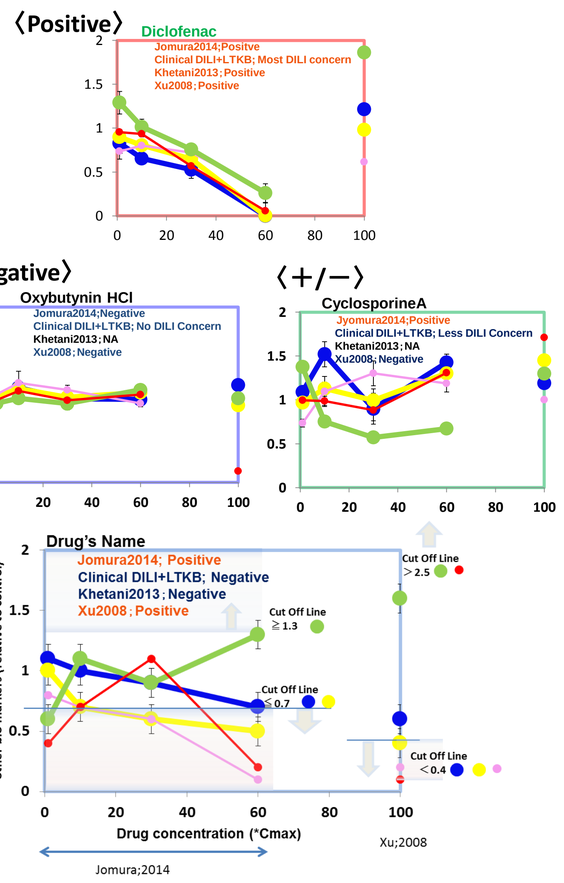
* Liver Toxicity Knowledge Base

FDA で承認されている、薬物がDILIを引き起こす度合いを示す指標の知識基盤
http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/LiverToxicityKnowledgeBase/ucm226811.htm

【試験結果および各試験結果の比較】

ID	判定 LTKB+ Clinical DILI	Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax	Khetani, 2013, 16-d, co-culture, 1-100x Cmax	PXB-cells™, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax	
Aspirin	Negative	Negative	Negative	Negative	
Lidocaine	Negative	Negative	Positive	Negative	
Oxybutynin HCl	Negative	Negative	N/A	Negative	
Prednisone	Negative	Negative	Negative	Negative	
Bupropion HCl	+/-	Negative	N/A	Negative	
Cyclophosphamide	+/-	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP
CyclosporineA	+/-	Negative	N/A	Positive	Oil
Imipramine HCl	+/-	Negative	Positive	Negative	
Propranolol HCl	+/-	Negative	Negative	Negative	
Nifedipine	+/-	Negative	Negative	Negative	
Acetaminophen	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP
Benzbromarone	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP
CIprofloxacin HCl	Positive	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP
Clomiplamine HCl	Positive	Negative	Positive	Negative	
Diclofenac Na	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP
Estrone	Positive	Negative	Negative	Negative	
Isoniazid	Positive	Negative	Positive	Positive	GSH
Phenacetin	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP
Troglitazone	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP
Ketoconazol	Positive	N/A	Positive	Positive	GSH, MMP

N/A : Not available

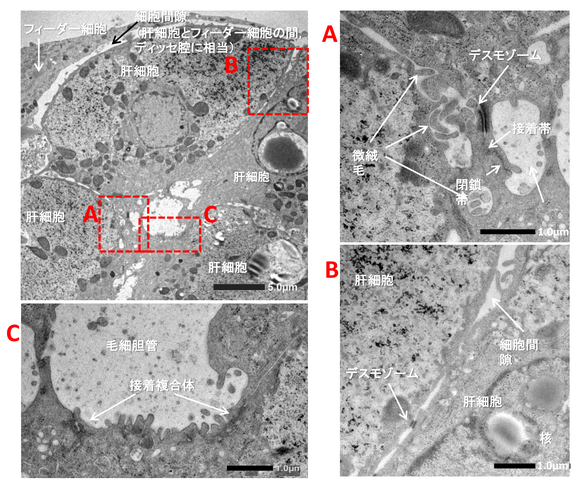


	Cell-able®	Xu, 2008	Khetani, 2013
	PXB-cells®	Cryo-Human hepatocytes	Cryo-Human hepatocytes
特異性	75% (6/8)	100% (8/8)	67% (2/3)
感度	79% (11/14)	42% (5/12)	77% (10/13)

単層培養24時間曝露(Xu, 2008)では、Negativeな薬物はすべて評価できたが、ポジティブな薬物は13分の5で、その検出感受性は低いことが報告されていた。
今回、**共培養で14日間薬物処理した場合には、10化合物が検出でき、その感受性が飛躍的に上昇した。**

【Cell-able®での肝微小器官の再構築】

Cell-able®上で作製した、PXB-cells®スフェロイドのTEM写真



データ監修：旭川医科大学　医学部　病理学講座　腫傷病理分野　西川祐司　教授

培養条件	
培養器材	Cell-able® 12 plate
フィーダー細胞	3T3 swiss albino
肝細胞	ヒト肝キメラマウス(PXBマウス®)由来 ヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®)
培地	RM-101

PXB-cells®と3T3 swiss albinoをCell-able®上で共培養することにより、**スフェロイド中にディッセ腔様構造、毛細胆管様構造、胆管腔様構造、タイトジャンクション様構造などの微小器官が再構築される**ことが、TEM写真により確認できた。

Conclusions

1) HCSによる我々の三次元培養の評価では、従来法と同等の感度の肝毒性予測結果が得られた。

・イメージングによる検出の観点では、二次元培養24時間曝露と比較して、Cell-able®を用いた三次元共培養で作製したスフェロイドを用いると、良好な感度・特異性を示した
・PXB-cells®の使用により、初代肝細胞の希少性からくる問題点などを解決
・イメージングによる検出を用いたことで、1wellで多項目の測定が可能となった。

2) PXB-cells®をCell-able®上で培養すると、スフェロイド上に微小器官が再構築されることが、TEM写真により確認できた。

Acknowledgements

本発表にあたり、ご助言・ご指導を頂いた下記各位に心より感謝申し上げます。

・旭川医科大学　医学部　病理学講座　腫傷病理分野　西川　祐司　教授
・モレキュラーデバイス株式会社　鈴木　真帆海　様
・日本電子株式会社　高木　孝士　様、池谷　綾美　様

References

1) Xu et al. (2008). Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury. Toxicological Sciences 105, 97-105.
2) Khetani et al. (2013). The Use of Micropatterned Co-cultures to Detect Compounds that Cause Drug induced Liver Injury in Humans. Toxicological Sciences 132, 107-117.