

Cell-able®3次元培養システムとImageXpress Micro  
ハイコンテンツスクリーニングシステムを用いた  
がん細胞および肝細胞の解析

平成25年12月

東洋合成工業(株)

モレキュラーデバイスジャパン(株)

# 概要

## 1. イントロダクション

- ◎Cell-able®3次元培養システムの紹介
- ◎ImageXpress systemの紹介
- ◎ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験
- ◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出
- ◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析
- ◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

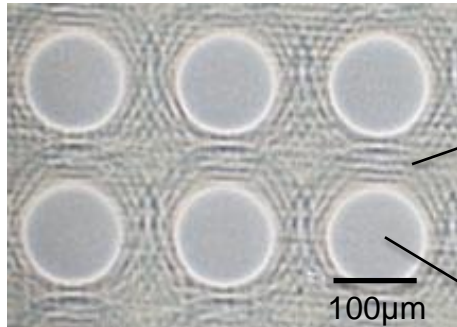
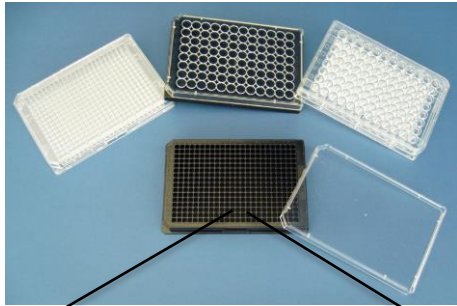
## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ

# Cell-able<sup>®</sup> 3次元培養システムとは？



細胞非接着領域  
(ポリマーコート)

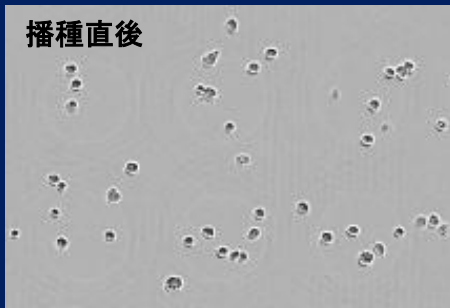
細胞接着領域  
(コラーゲンタイプ I コート)

Photo of the well bottom

## Cell-able systemの特徴

- ・操作が簡単  
⇒特別な操作・機器は不要
- ・均一サイズのスフェロイド  
⇒良好な試験再現性
- ・ハイスループットにも対応可能  
⇒6, 12, 24, 96, 384 well plate

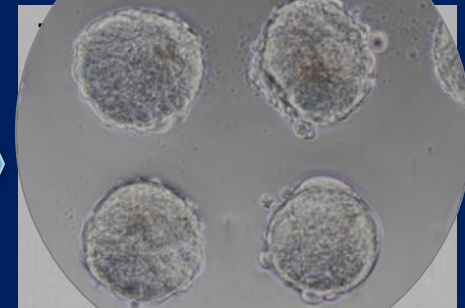
播種直後



24 hrs.



day5



結腸癌細胞株DLD-1 播種後の経時変化

# 概要

## 1. イントロダクション

◎Cell-able®3次元培養システムの紹介

◎ImageXpress systemの紹介

◎ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出

◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析

◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

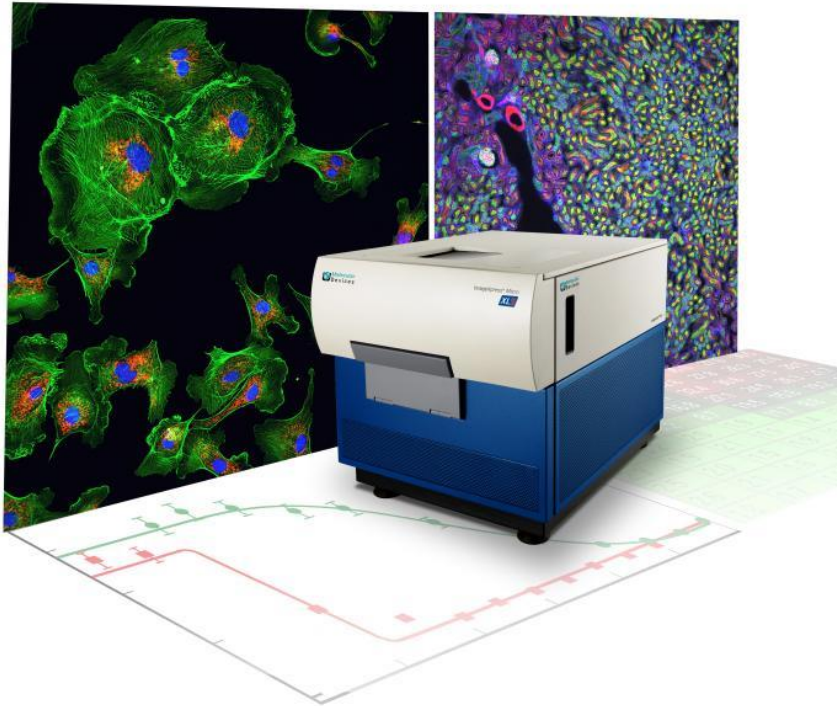
◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ

# ImageXpress Micro XL HCS system

## ImageXpress Micro XL: 広視野・高画質のイメージクリーニングシステム



- 光源: 新型白色光源  
⇒ >10,000hrの長寿命。メンテナンスフリーで長期に及ぶアッセイにも安心
- カメラ: sCMOSラージカメラ  
⇒ 従来の3倍の細胞数を1視野で撮影  
16bitのワイドレンジで詳細な解析を実現
- デジタルコンフォーカル  
⇒ リアルタイムでより鮮明な画像を撮影
- X,Y及びZフォーカスに高精度リニアモーターを採用  
⇒ 優れた耐久性  
高倍率でも正確にフォーカス  
Z-stackも高速撮影
- 対物レンズ: 1x-100xに対応
- 6-1536 well plate (ガラス、プラスチックボトム)、スライドガラス対応

# 概要

## 1. イントロダクション

◎Cell-able®3次元培養システムの紹介

◎ImageXpress systemの紹介

◎ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出

◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析

◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

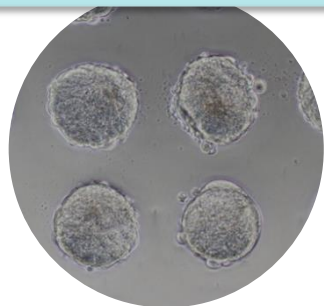
◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

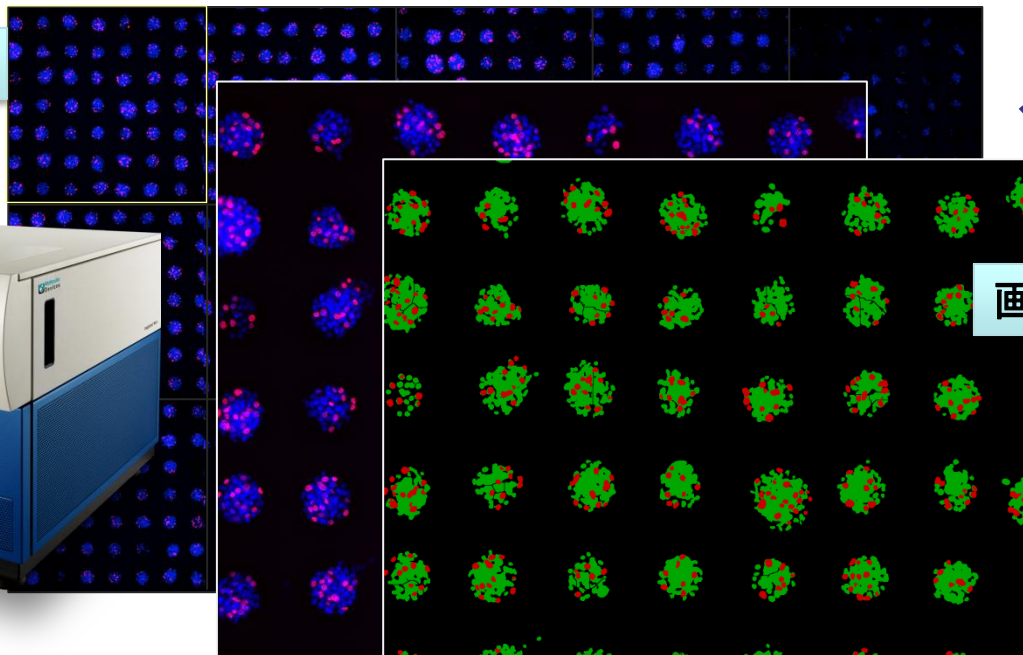
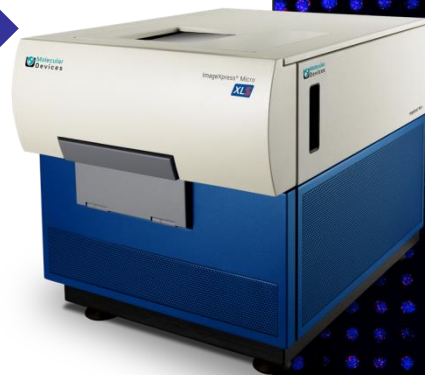
## 4. まとめ

# アッセイのワークフロー

細胞播種・薬剤処理

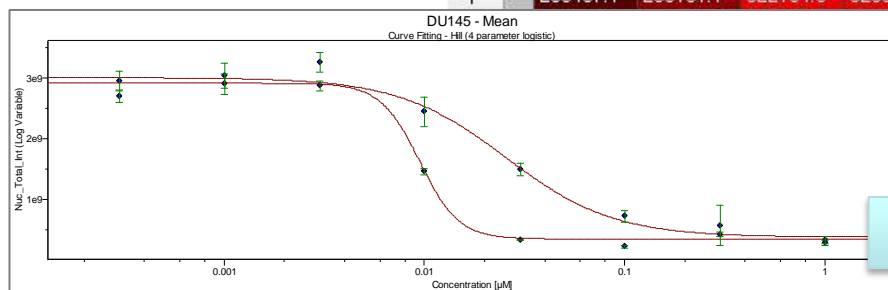


画像撮影



画像解析

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A												
B		256849.6	260379.9	275762.3	292473.1	178000.9	57137.2	39870.5	36500.6	43206.5		
C		259261.2	283237.3	305791.9	293779.4	190567.8	51839.1	31243.0	111580.6	49604.9		
D		296115.1	316491.4	310432.7	298119.3	187794.5	52511.7	33228.8	42670.8	30082.0		
E		274554.1	293034.1	314510.7	334209.4	289801.2	204853.3	121009.1	72886.3	36657.8		
F		233497.1	268191.1	322164.6	320817.8	266531.6	210830.9	118369.3	68230.4	69183.5		
					6.1	228464.2	167953.8	101604.5	81380.3	73217.6		



グラフ作成

# 概要

## 1. イントロダクション

- ◎ Cell-able®3次元培養システムの紹介
- ◎ ImageXpress systemの紹介
- ◎ ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験
- ◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出
- ◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析
- ◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ



# EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

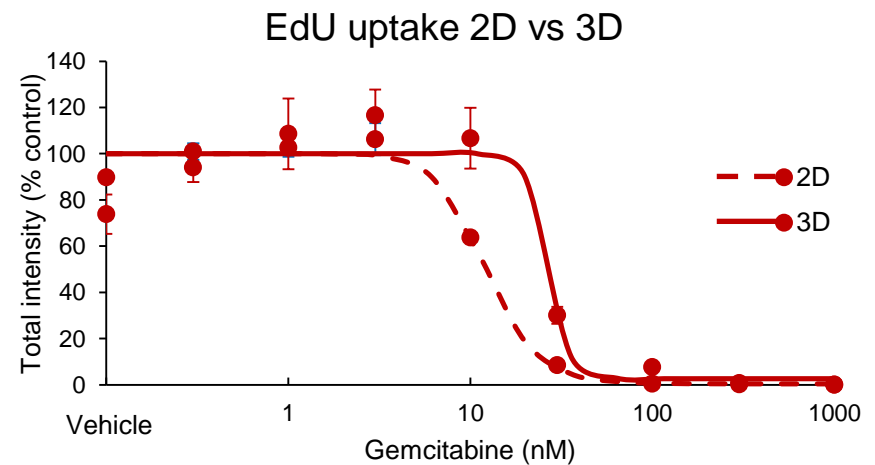
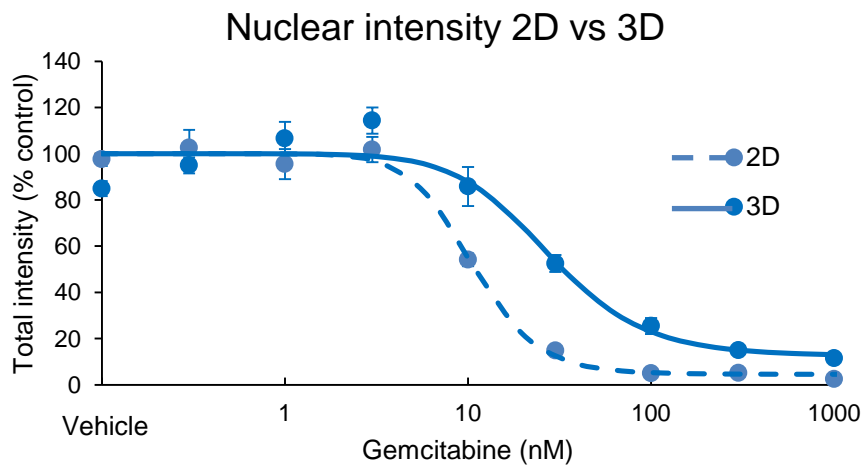
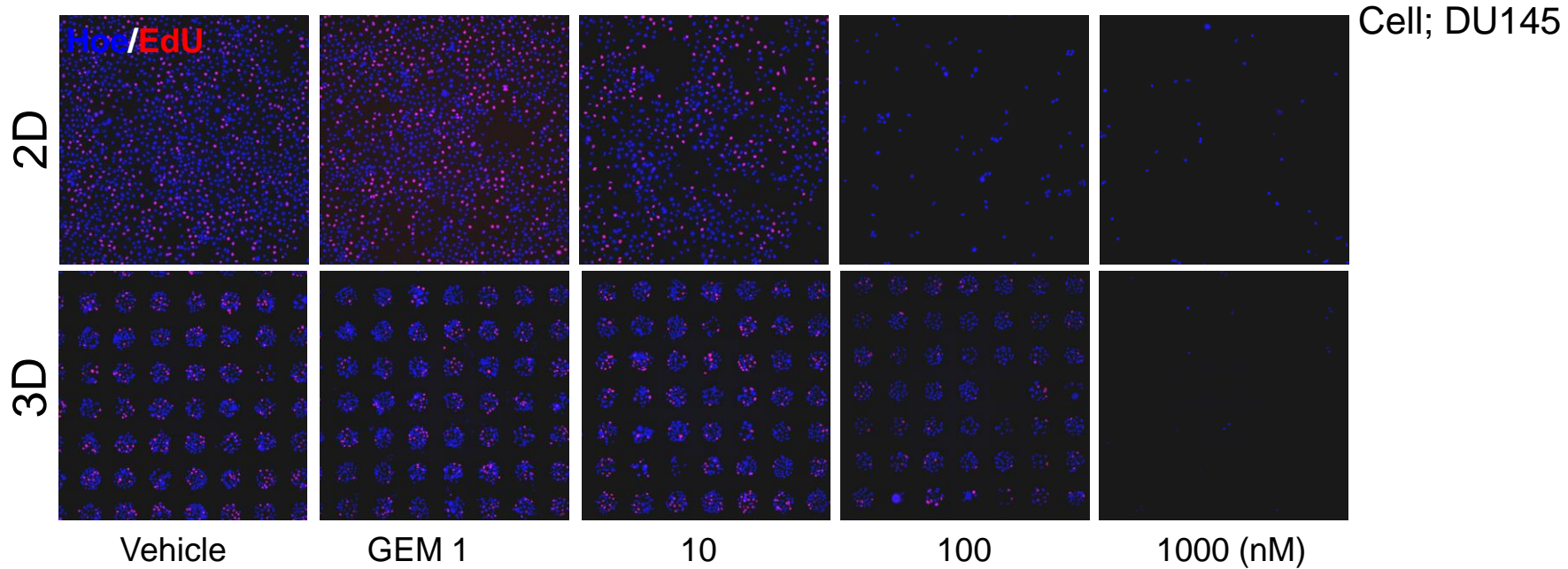
**目的**;チミジンのヌクレオシド類似体であるEduの取り込みを指標にした抗がん薬による細胞増殖抑制の検出

## 方法



# EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

2次元培養と3次元スフェロイド培養の感受性の比較



# 初代がん細胞のEdU取り込み試験

**目的; PTXによる初代がん細胞スフェロイドのEdUの取り込み阻害を確認**

## 方法

### がん細胞の調製

がん組織をゴラゲナーゼ処理し、100 $\mu$ mメッシュを通し、細胞を回収する。この細胞を低接着プレートで2日間培養する。

### がん細胞播種

がん細胞をCell-able®96well plateに播種

↓ 2日間培養

### 抗がん薬曝露

パクリタキセル (PTX)を含む培地と培地交換、72時間曝露

↓ 72時間曝露

### EdU取り込み

Click-iT®EdU Cell Proliferation assay:EdU取り込み(3時間)。

↓ 3時間EdU取り込み

### 細胞の固定化 EdU検出反応・EpCAM/核染色

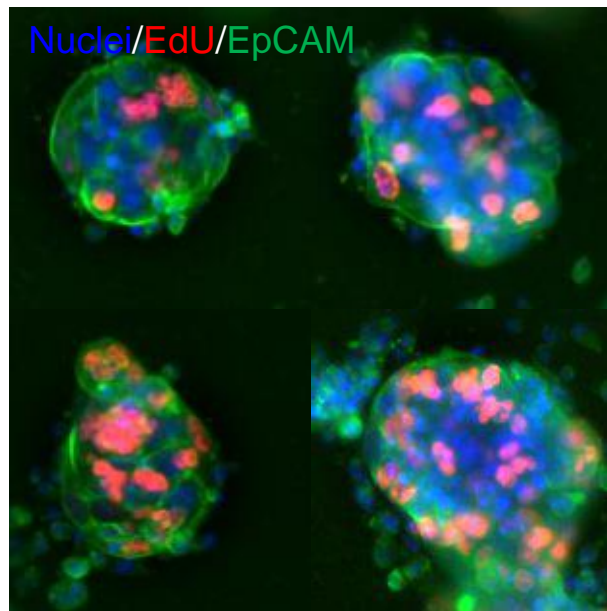
ホルムアルデヒド溶液により細胞を固定化  
Click-iT®EdU Cell Proliferation assay: EdU検出反応(赤)抗EpCAM 抗体(緑)、DAPI(青)による染色

### 画像取得・解析

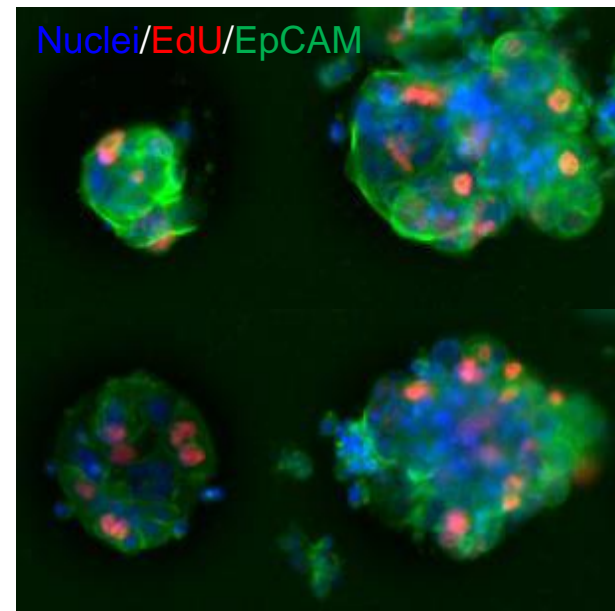
ImageXpress Micro system

# PTXによる初代がん細胞スフェロイドの EdU取り込み阻害

## Primary ovarian cancer cell spheroid (high grade serous)



Vehicle



PTX 1000 nM

# 概要

## 1. イントロダクション

- ◎ Cell-able® 3次元培養システムの紹介
- ◎ ImageXpress systemの紹介
- ◎ ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験
- ◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出
- ◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析
- ◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ

# ALDH活性を指標にしたStem like細胞の検出

目的; Stem like細胞を、ALDH活性を指標にして検出する

## 方法

Cell-able®96well plateに  
がん細胞を播種

肺がん細胞A549をCell-able®96well plateに播種.

↓ 5日間培養

ALDH<sup>high</sup>細胞の検出

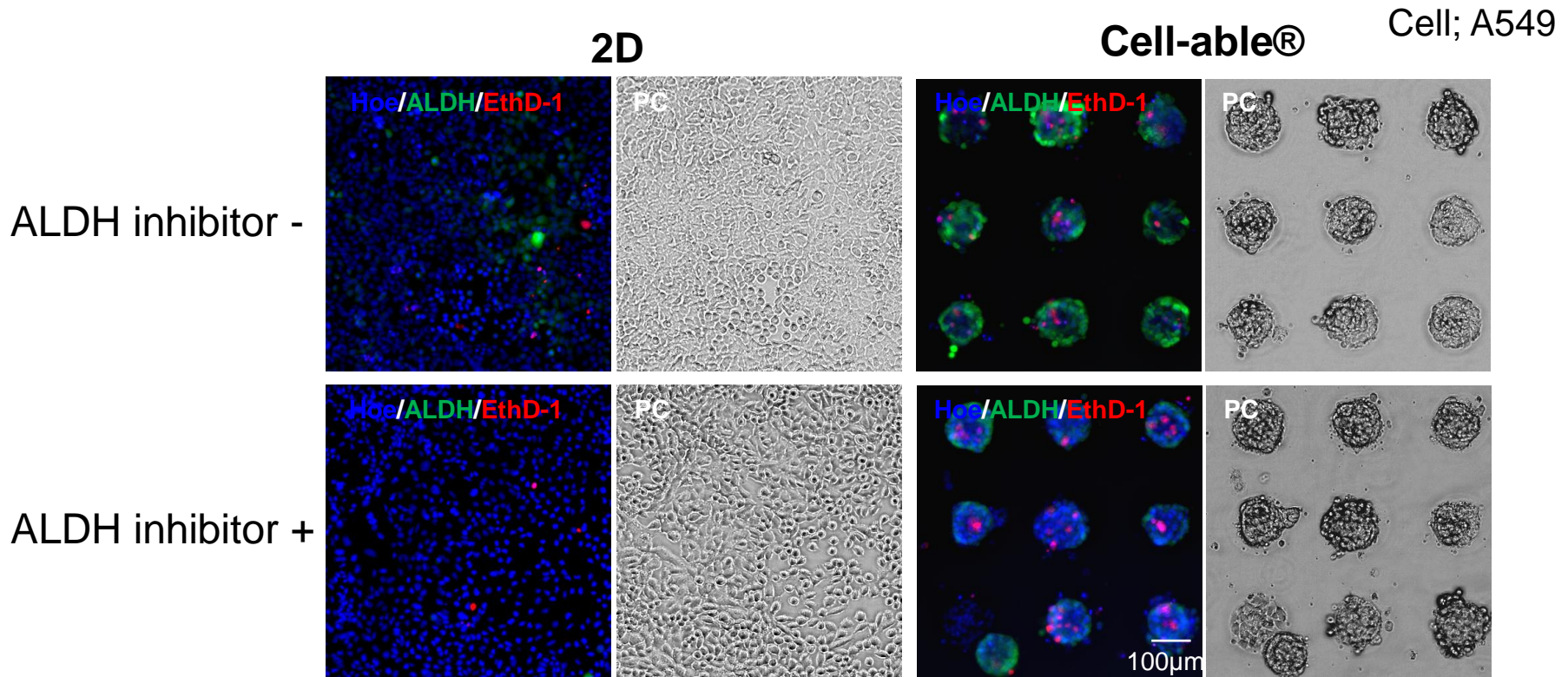
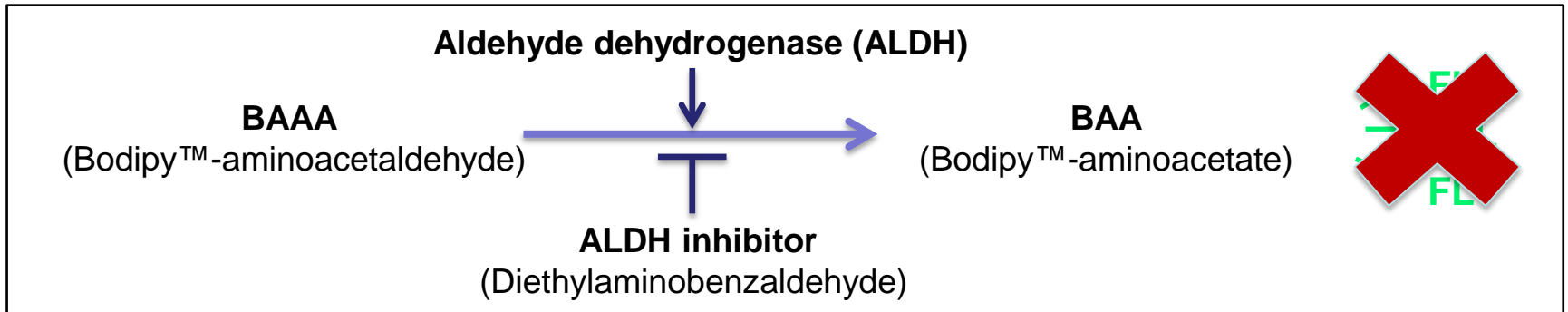
培地を除去し、Aldefluor®試薬とethidium homodimer-1を含む反応液を加え、30分反応. Hoechst33342で核を染色.

画像取得・解析

ImageXpress Micro system

# ALDH活性を指標にしたStem like細胞の検出

検出の原理と、2次元培養とスフェロイド培養の比較



# 概要

## 1. イントロダクション

◎Cell-able®3次元培養システムの紹介

◎ImageXpress systemの紹介

◎ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出

◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析

◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ



# アポトシスとネクロシスの 継時的画像解析

目的: 抗がん薬によって誘導されるアポトシスとネクロシスを経時的に観察

## 方法

### がん細胞播種

前立腺がん細胞DU145をCell-able®96well plateに播種し、培養してスフェロイドを形成

### 抗がん薬, アポトシス(緑)及びネクロシス(赤) 検出試薬添加

抗がん薬(パクリタキセル /PTX)、CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent (cas)、ethidium homodimer-1(EthD1)を含む培地と培地交換

### 画像取得開始

薬物添加と同時にImageXpress MicroでTime laps画像を取得(30分毎 68時間).

### 解析・動画作成

MetaXpress softwareでデータ解析・動画作成

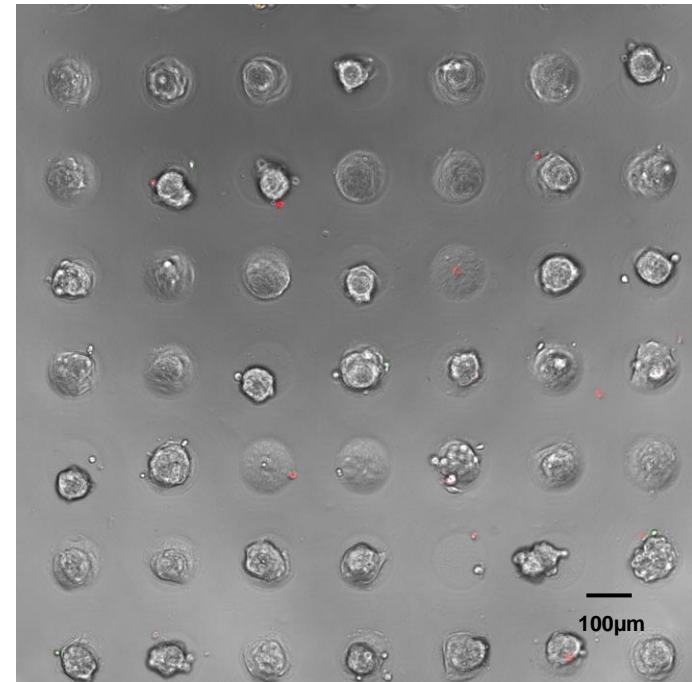
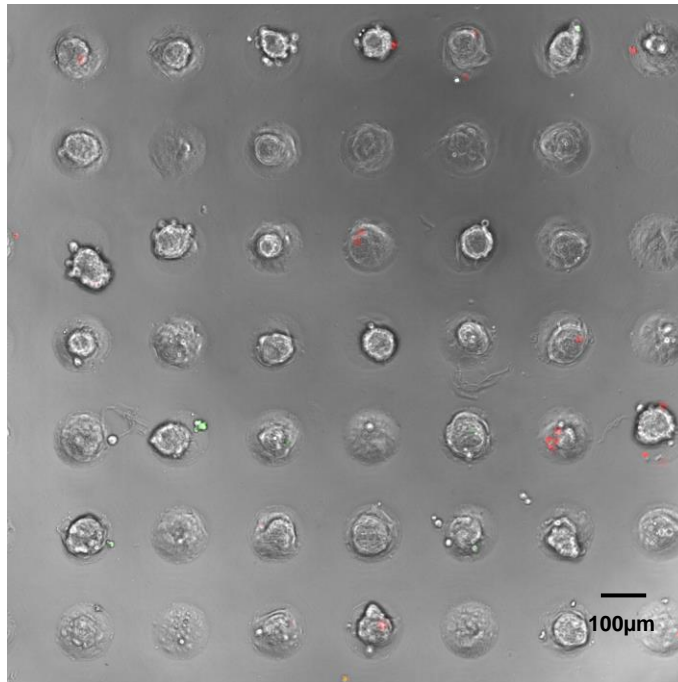
# PTX曝露により誘導される アポトシスとネクロシスの継時的画像解析

Cell; DU145

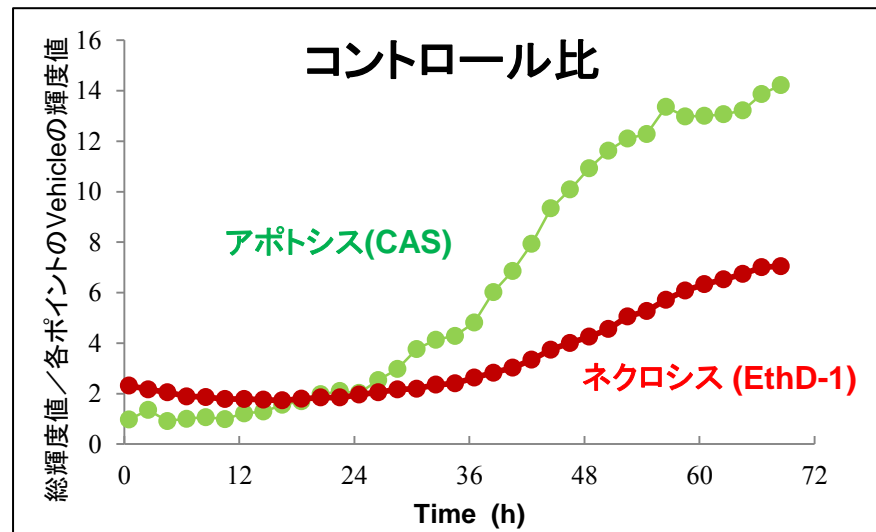
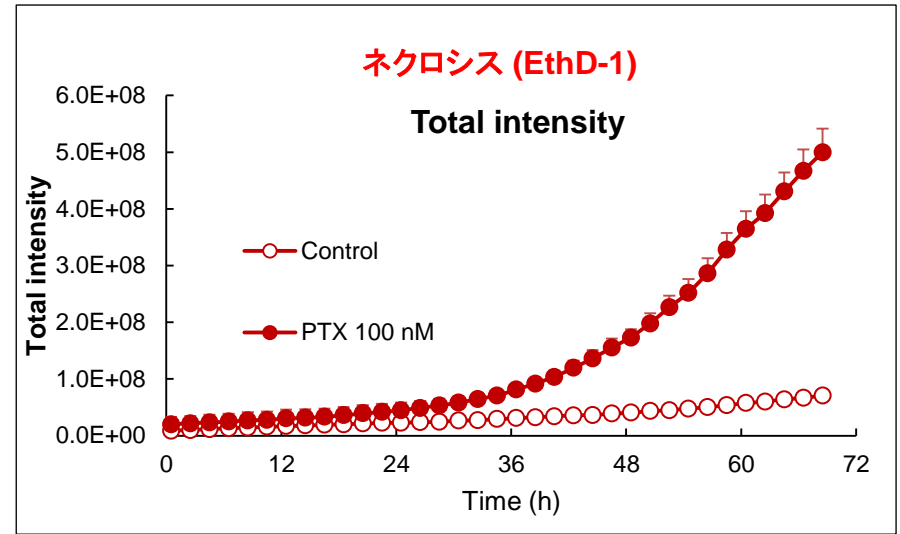
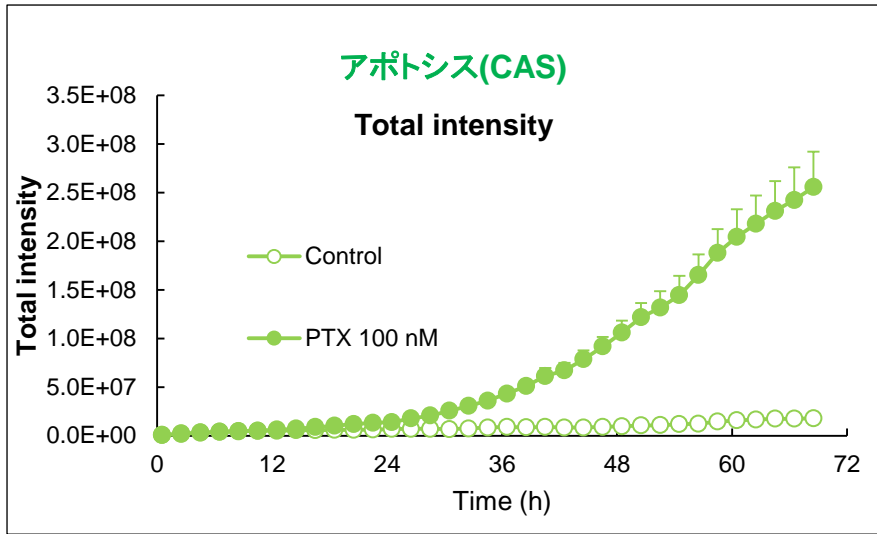
Vehicle

PTX 100 nM

アポトシス(CAS) ネクロシス (EthD-1)



# PTX曝露により誘導される アポトシスとネクロシスの継時的画像解析



# 概要

## 1. イントロダクション

- ◎ Cell-able®3次元培養システムの紹介
- ◎ ImageXpress systemの紹介
- ◎ ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験
- ◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出
- ◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析
- ◎ がん細胞株とマウス繊維芽細胞の共培養スフェロイド

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

- ◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

## 4. まとめ

# がん細胞とマウス繊維芽細胞との共培養スフェロイド

異なる種類の細胞で共培養スフェロイドを形成

目的;異なる種類の細胞で共培養スフェロイドを形成させる

## 方法

### がん細胞染色

結腸がんDLD-1又は前立腺がん細胞DU145をCell Tracker™ Orangeで染色

### マウス繊維芽細胞細胞染色

マウス繊維芽細胞3T3をCell Tracker™ Greenで染色

がん細胞とマウス繊維芽細胞を1:1で混合しCell-able®に播種

染色したがん細胞とマウス繊維芽細胞を1:1で混合し、Cell-able®96well plateに播種

### 抗がん薬曝露

抗がん薬(パクリタキセル /PTX) を含む培地と培地交換。抗がん薬を72時間曝露。

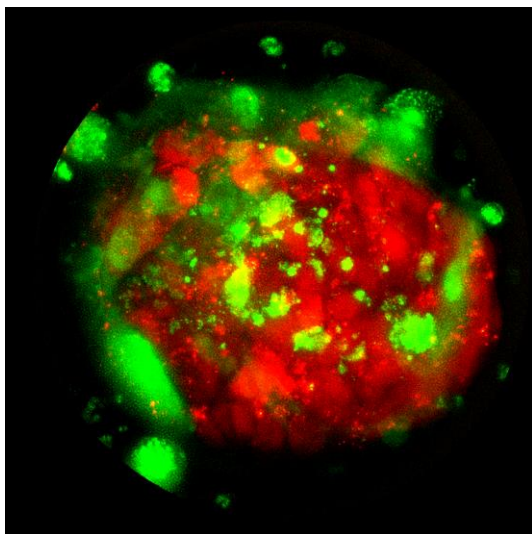
### 画像取得・解析

ImageXpress Micro system

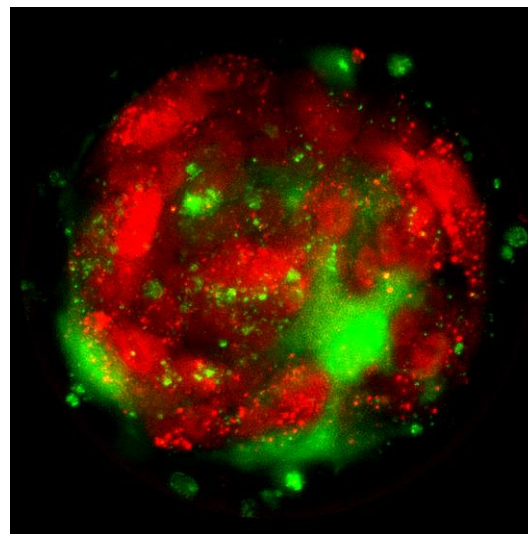
# DLD-1又はDU145とマウス繊維芽細胞(3T3-swiss albino)との 共培養スフェロイド

共培養スフェロイドは組み合わせによって成立する場合としない場合がある

DLD-1/ 3T3



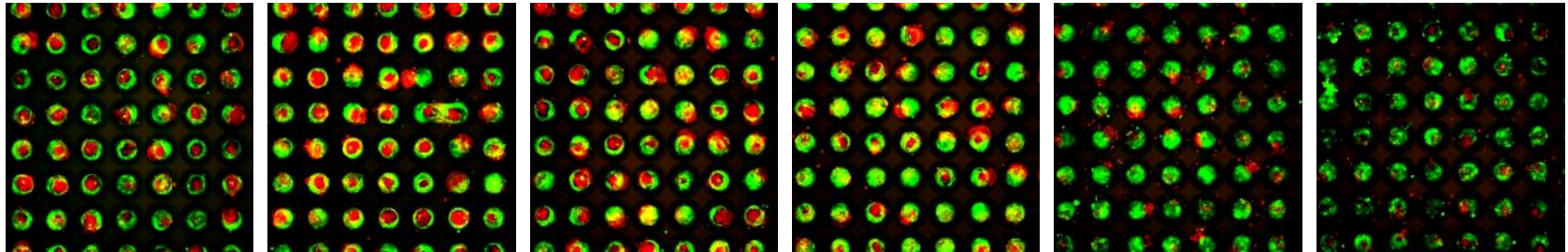
A549/ 3T3



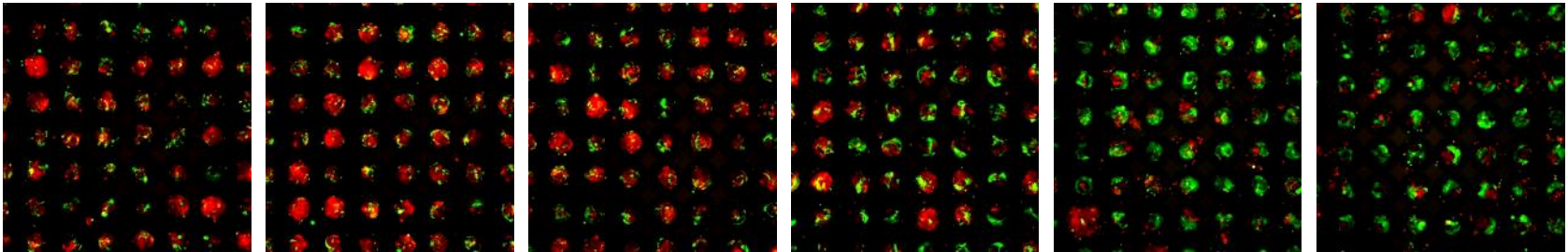
# 共培養スフェロイドに対するPTX曝露の影響

共培養が成立した場合、がん細胞と繊維芽細胞は抗がん薬の濃度依存的に影響を受けた

DLD-1



A549



Vehicle

PTX 0.1

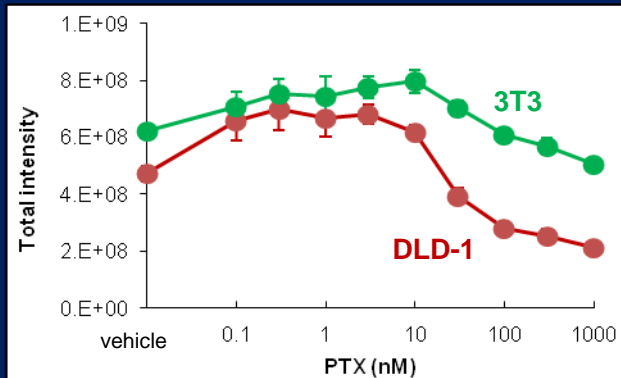
1

10

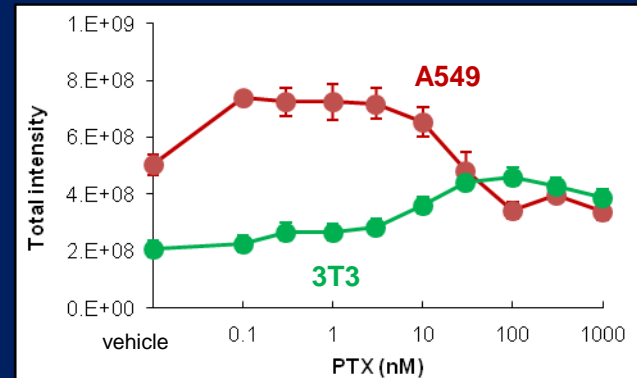
100

1000 (nM)

DLD-1



A549



# Summary

## がん細胞スフェロイド

- **がん細胞の薬物耐性:**  
**Cell-able®スフェロイド > 2次元単層培養**
- **ALDH活性 (stem likeな細胞の特徴):**  
**Cell-able®スフェロイド > 2次元単層培養**
- **初代がん細胞を用いてスフェロイドを形成し、感受性試験を行うことが可能**
- **ImageXpressを用いることにより、長時間のタイムラプスイメージングが可能**
- **がん細胞と繊維芽細胞との共培養が可能**



# 概要

## 1. イントロダクション

◎Cell-able®3次元培養システムの紹介

◎ImageXpress systemの紹介

◎ワークフロー

## 2. がん細胞スフェロイドのイメージング解析

◎ EdUの取り込みを指標にした抗がん薬感受性試験

◎ アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性を指標としたがん幹細胞の検出

◎ 抗がん薬により誘導されるアポトシス・ネクロシスのタイムラプス解析

## 3. ヒト初代肝細胞スフェロイドのイメージング解析

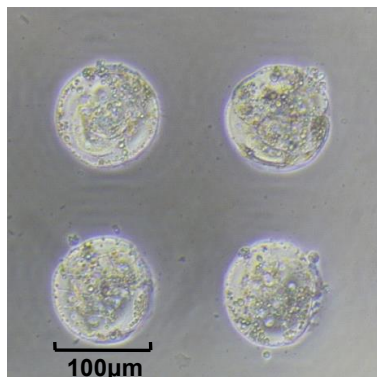
◎ 臨床における薬物による肝障害(DILI\*)予測

\* Drug induced liver injury

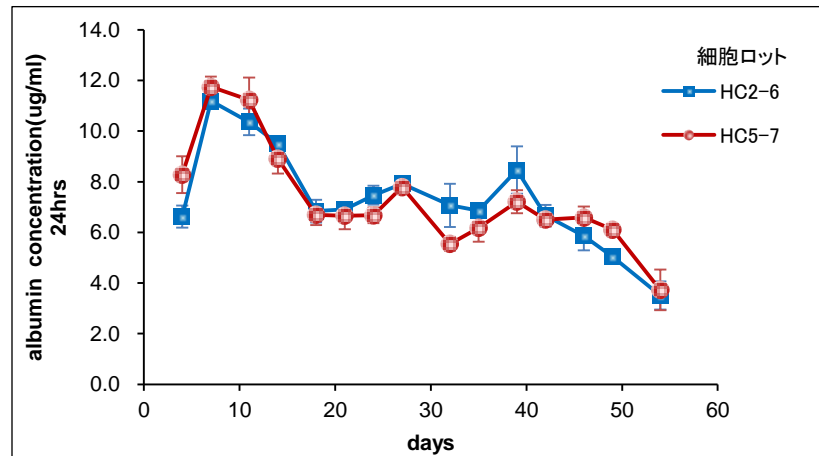
## 4. まとめ

# Cell-able®上で培養したヒト初代肝細胞の 形態と肝特異的機能維持

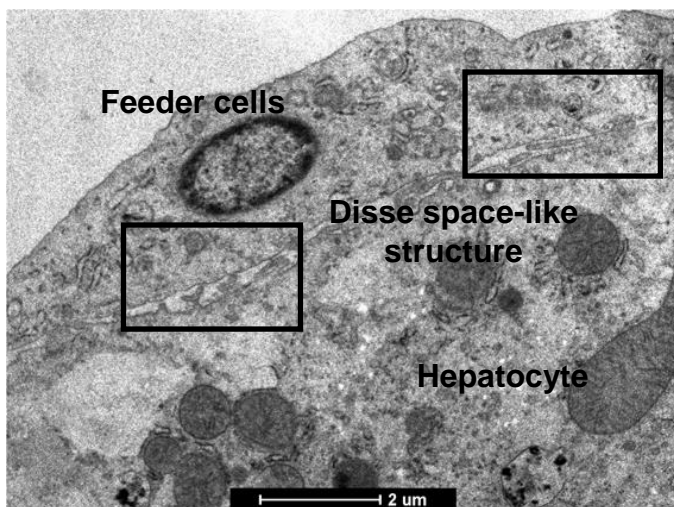
Cell-able®ヒト初代肝細胞スフェロイド



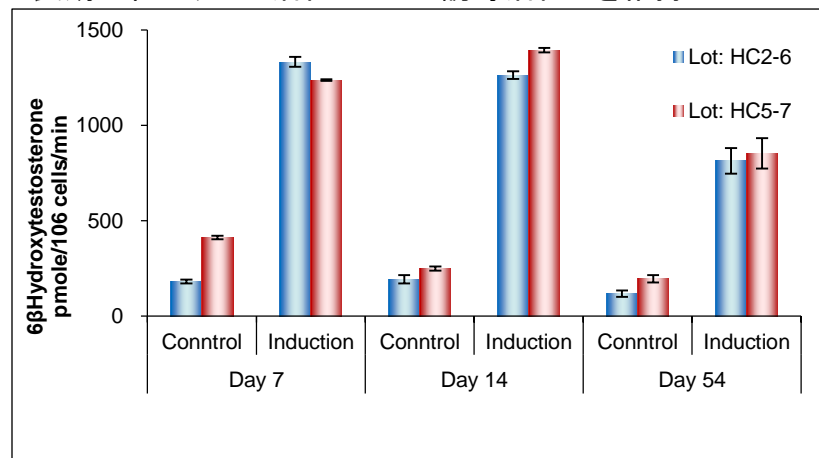
長期にわたりアルブミン産生能を維持



微小構造の再構築



長期にわたりCYP活性<sup>1)</sup>とCYP誘導活性<sup>2)</sup>を維持



1) CYP3A4

2) リファンピシンによるCYP3A4酵素誘導活性

# ヒト初代肝細胞スフェロイドを用いた

## 薬物による肝障害の予測

### 目的

Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞スフェロイドに18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を、ImageXpress Microによるイメージング解析により予測した。

この結果をサンドイッチ培養24時間薬物曝露(Xu et al.,2008)、3次元共培養16日間薬物曝露(Khetani, et al.,2013)による結果と比較した。

# DILI imaging of hepatocytes cultured on Cell-able®

## 方法

### フィーダー細胞播種

マウス繊維芽細胞3T3 Swiss-albinoをCell-able® 96well plateに播種.

### ヒト初代肝細胞播種 (3日間培養)

翌日フィーダー細胞の培養上清を除去し、ヒト初代肝細胞を  $2 \times 10^4$  cells/wellで播種. 培地; RM-101(東洋合成工業)

### 薬物曝露(14日間) 濃度: 1, 10, 30, 60 $\times$ Cmax

培養上清を除去後、薬物\*を含む培地を添加し、曝露を開始. 培地交換は週3回とし、薬物を含む培地を使用.

### 核・GSH・ ミトコンドリア膜電位の染色

培地を除去し、DRAQ5(核 Nuclei 染色: 赤)、monochlorobimane(mBCl, GSH染色: 青)、tetramethylrhodamine methyl ester(TMRM, ミトコンドリア膜電位 MMP 染色: 黄色)を含む培地を添加し、染色.

### 画像取得・解析

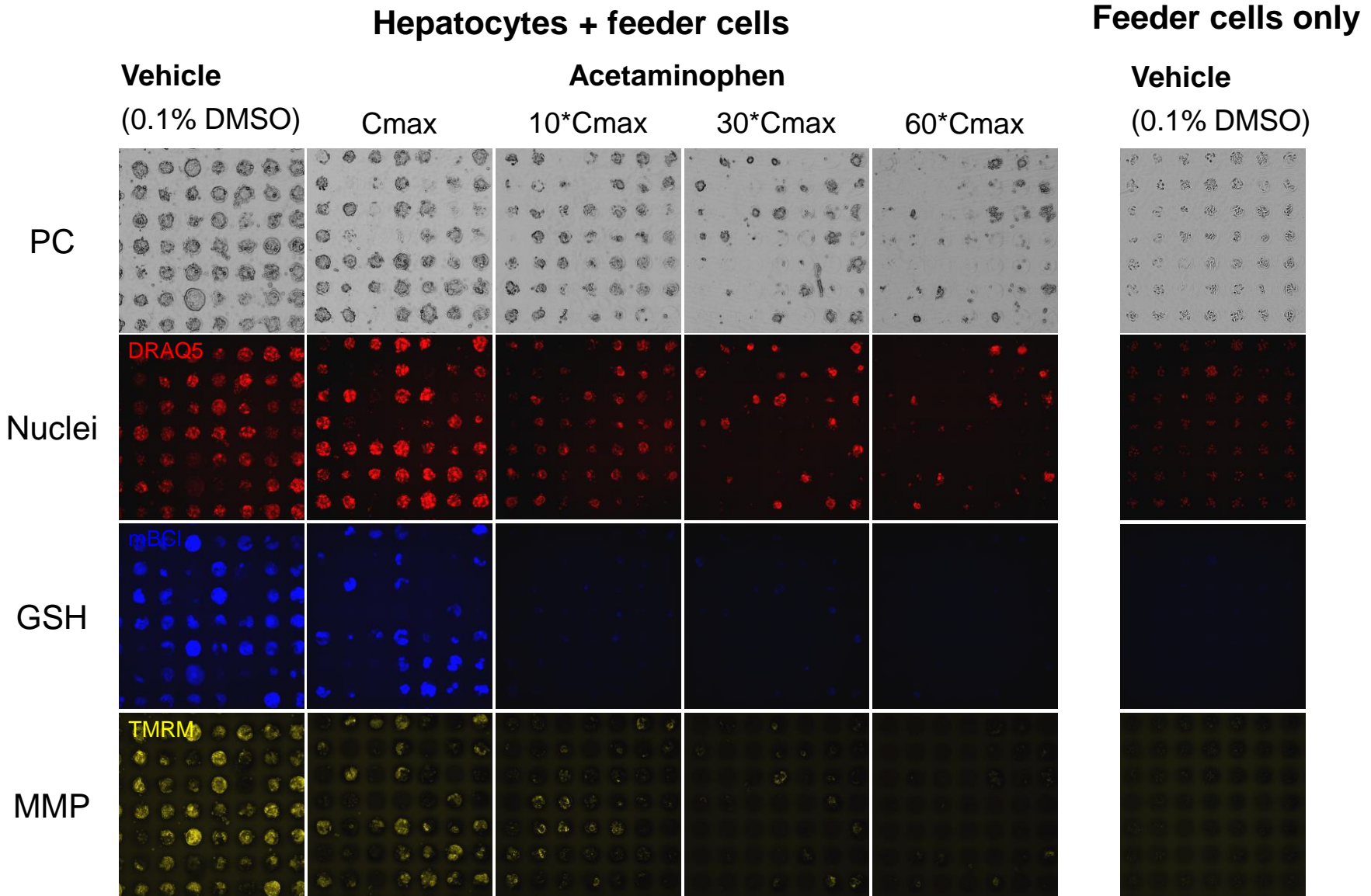
ImageXpress Micro system

#### \*使用薬物

Aspirin, Lidocaine, Prednisone, Propranolol HCl, Imipramine HCl, Nifedipine, Bupropion HCl, Cyclophosphamide H<sub>2</sub>O, Acetaminophen, Benzbromarone, Ciprofloxacin HCl, Clomiplamine HCl, Diclofenac Na, Estrone, Isoniazid, Phenacetin, Troglitazone, Ketoconazol

# 取得画像

## 例) Acetaminophen



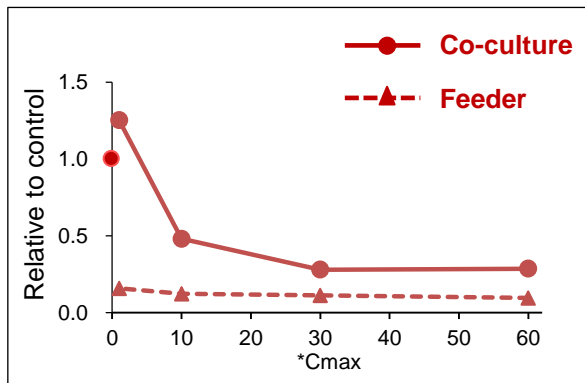
The cells were exposed to acetaminophen for 14 days.

# 数値データ解析

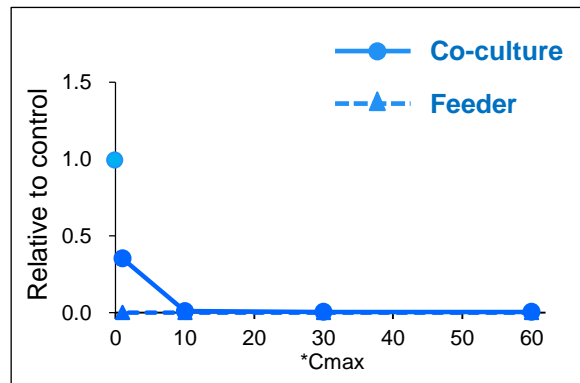
Vehicleの数値データを1とした場合の  
各数値データの比率を基に解析

例) Acetaminophen

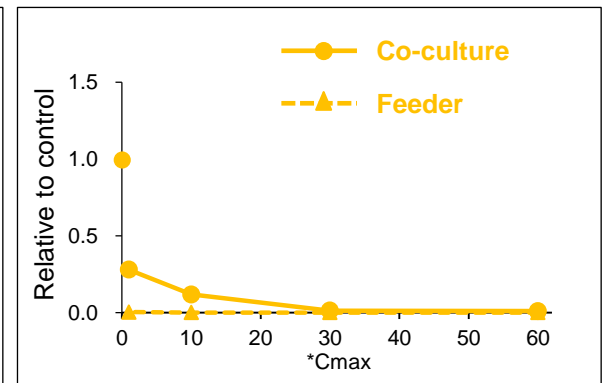
核



GSH



ミトコンドリア膜電位



n=3 (3well). 1ウェルにつき2画像を取得し、解析を行った。

# Criteria for evaluation of DILI on Cell-able®

Experiments	Criteria for positive
TOYO GOSEI Cell-able®	Imaging: nuclear total intensity (minus feeder) <0.4; MMP area <0.4; GSH area <0.4 Positive at least one in the assay at 1-30*Cmax, 14days exposure.
Xu, 2008	Imaging: nuclear area <0.4; MMP intensity <0.4; GSH area <0.65; GSH intensity <0.4; ROS intensity >2.5 At least one positive in the assay at 100*Cmax, 24hrs exposure.
Khetani, 2013	Luminescence: ATP IC <sub>50</sub> ; GSH IC <sub>50</sub> Colorimetry: urea IC <sub>50</sub> ELISA: albumin IC <sub>50</sub> At least one positive (IC <sub>50</sub> of less than 100*Cmax) in the assay at 1-100*Cmax, 16days exposure.

# Comparative table with other DILI results

ID	LTKB* Label/DILI score	Clinical DILI	TOYOGOSEI, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax		Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax		Khetani, 2013, 16-d, co-culture, 1-100x Cmax
Aspirin		Negative	Negative		Negative		Negative
Lidocaine		Negative	Negative		Negative		Positive
Prednisone		Negative	Negative		Negative		Negative
Propranolol HCl	WP/3	Negative	Negative		Negative		Negative
Imipramine HCl	AR/3	Positive	Negative		Negative		Positive
Nifedipine	WP/3	Positive	Negative		Negative		Negative
Bupropion HCl	AR/5	Negative	Negative		Negative		NA
Cyclophosphamide H <sub>2</sub> O	AR/5	Positive	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Acetaminophen		Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP	NA
Benzbromarone		Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP, ROS	Positive
Ciprofloxacin HCl	WP/7	Positive	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Clomiplamine HCl		Positive	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Diclofenac Na	WP/7	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	ROS	Positive
Estrone		Positive	Negative		Negative		Negative
Isoniazid	BW/8	Positive	Positive	GSH, MMP	Negative		Positive
Phenacetin		Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	MMP, N	Positive
Troglitazone	WD/NA	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP	NA
Ketoconazol	BW/8	Positive	Positive	GSH, MMP, N	NA		NA

\* LTKB: Liver Toxicity Knowledge Base. FDA で承認されている、DILIを引き起こす度合いを示す指標の知識基盤



		Cell-able®	
		negative	positive
Clinical+LTKB	negative	6	0
	+/-	1	1
	positive	1	9

		Xu, 2008	
		negative	positive
Clinical+LTKB	negative	6	0
	+/-	2	0
	positive	5	5

		Khetani, 2013	
		negative	positive
Clinical+LTKB	negative	4	2
	+/-	0	1
	positive	1	6

	Cell-able®	Xu, 2008	Khetani, 2013
特異性	100%	100%	67%
感度	90%	50%	86%

#### 薬物のPositive/ Negative 判定の基準

FDAのLTKB\*プロジェクトの一環である文献、FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury (Minjun Chen, et al., Drug Discovery Today, **16**, 697-703, (2011))に於いて、Status/Label が NM (No Match)又は WP (Warnings and Precautions) 又はAR (Adverse Reactions)で、Severity levelが3以下をnegative, 4又は5を +/- , 6以上をpositiveとした。Status/Label が WD (Withdrawn), BW (Boxed warning ), D (Dis continued )は全てpositiveとした。薬物がLTKBのリストに無い場合は、2008年 Xuらの論文のClinical dataを基に判定した。

\*LTKB: [Liver Toxicity Knowledge Base](#)

# Summary

## 初代肝細胞スフェロイド

- Cell-able®でヒト初代肝細胞をスフェロイド共培養することにより、CYP酵素活性やアルブミン産生能などの肝特異的機能が54日間維持された。
- Cell-able®を使った肝細胞スフェロイドの共培養が長期間安定しているため、14日間の長期薬物曝露が可能であった。これにより、感度と特異性が良好なDILI予測の系が得られた。
- 今回行ったHigh content screening assayによる検討では、GSHとMMPがDILI予測のための良好な指標となった。

# Cell-able® x ImageXpressの利点

## Cell-able® × ImageXpress

- 良好な試験再現性
- スフェロイドで起こる反応の可視化
- 画像解析による定量化
- シンプルなワークフロー

御清聴ありがとうございました

是非お立ち寄りください

ポスター; No P1-0882 (東洋合成工業(株))

ブース; No 3095 (モレキュラーデバイスジャパン(株))

モレキュラーデバイスジャパン株式会社  
鈴木真帆海

東洋合成工業株式会社  
城村友子