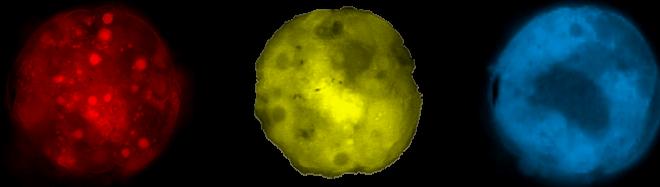
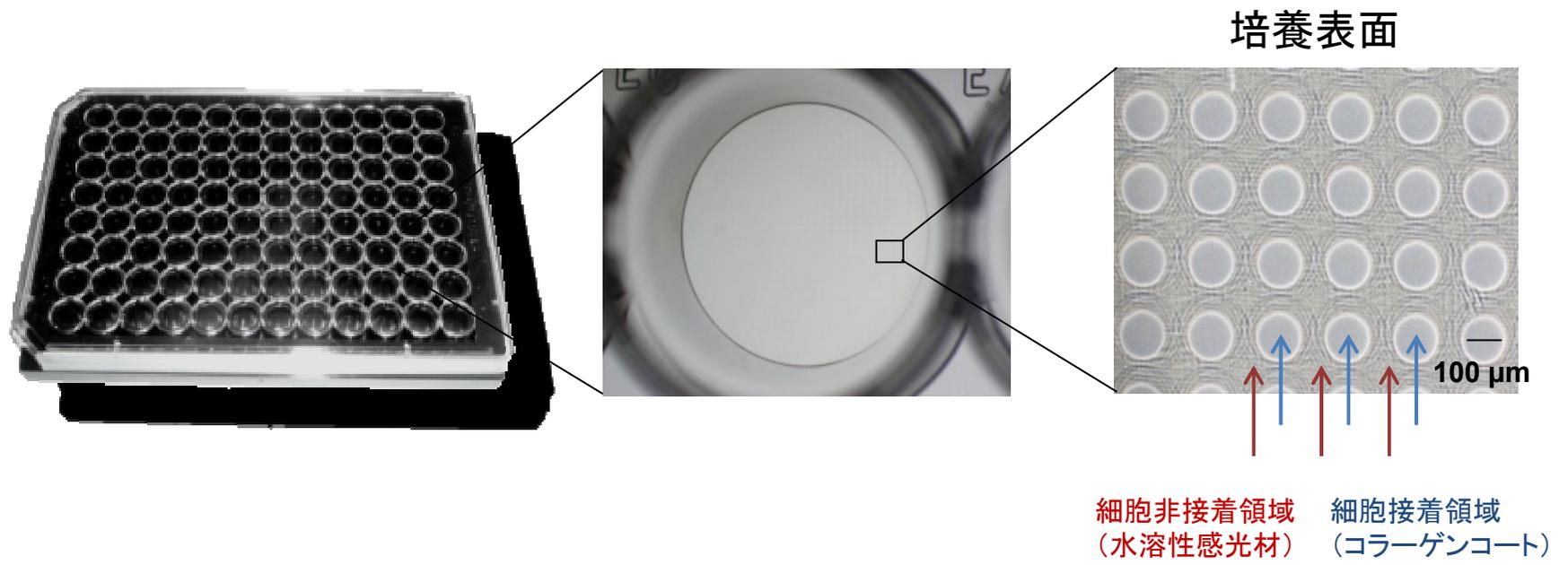


Cell-able上で形成したヒト肝細胞スフェロイドを用いた
肝毒性予測



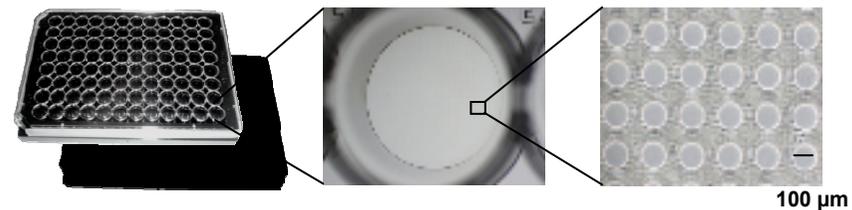
東洋合成工業株式会社

Cell-able® 外観と培養表面

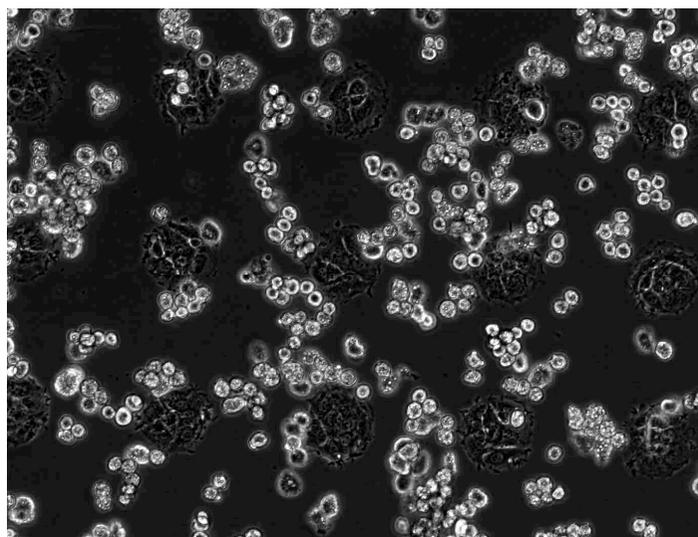


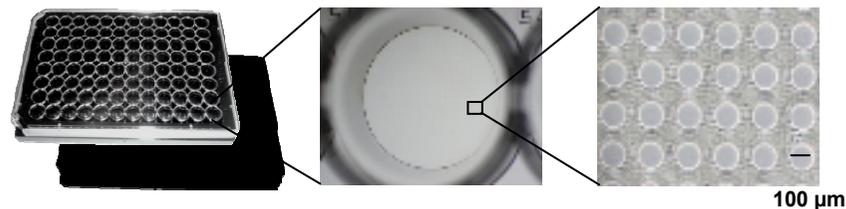
Cell-able® 外観と培養表面

1

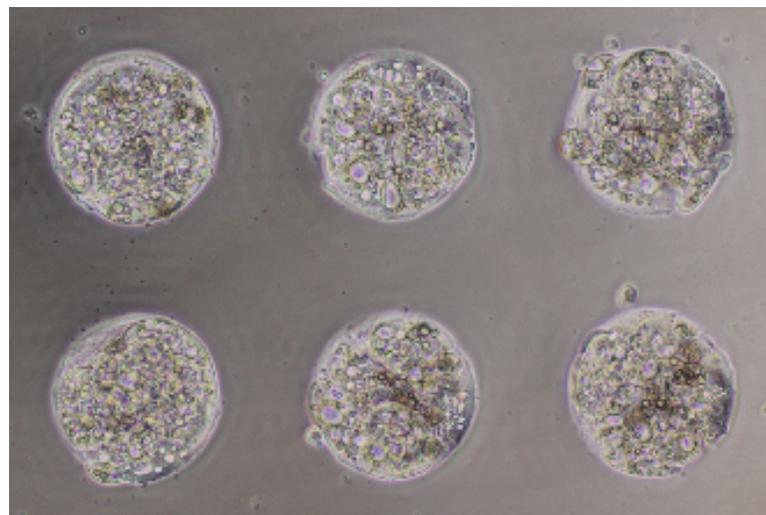


ラット初代肝細胞播種から48時間の動画





ヒト初代肝細胞播種5日目

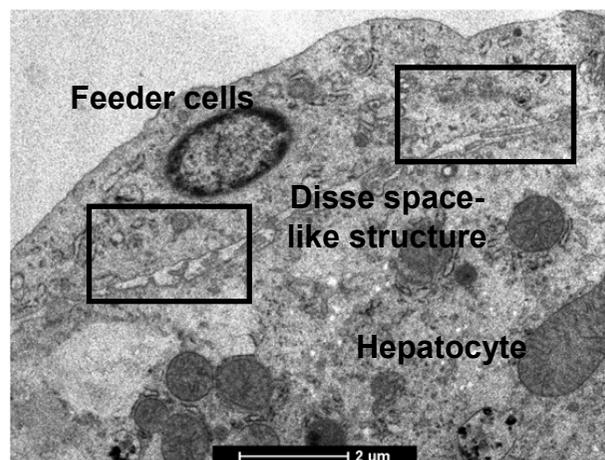


通常の培養操作で、直径約100 μ m, 厚み20~40 μ mの3Dスフェロイドを形成

Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と

2

肝特異的機能維持



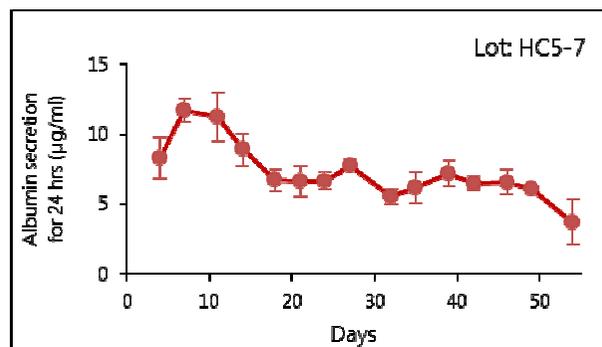
ラット初代肝細胞スフェロイド 断面TEM写真

Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と

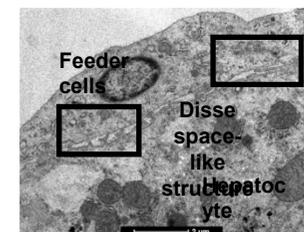
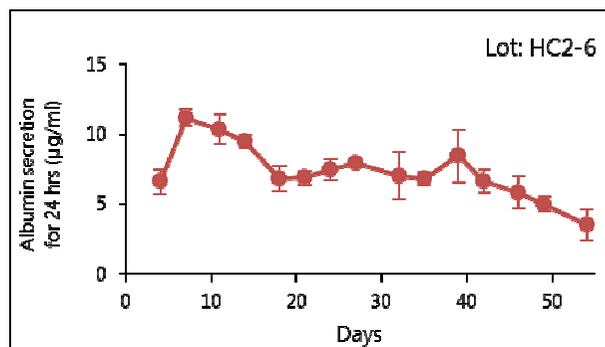
肝特異的機能維持

ヒト初代肝細胞アルブミン産生能経時変化

接着ロット



非接着ロット

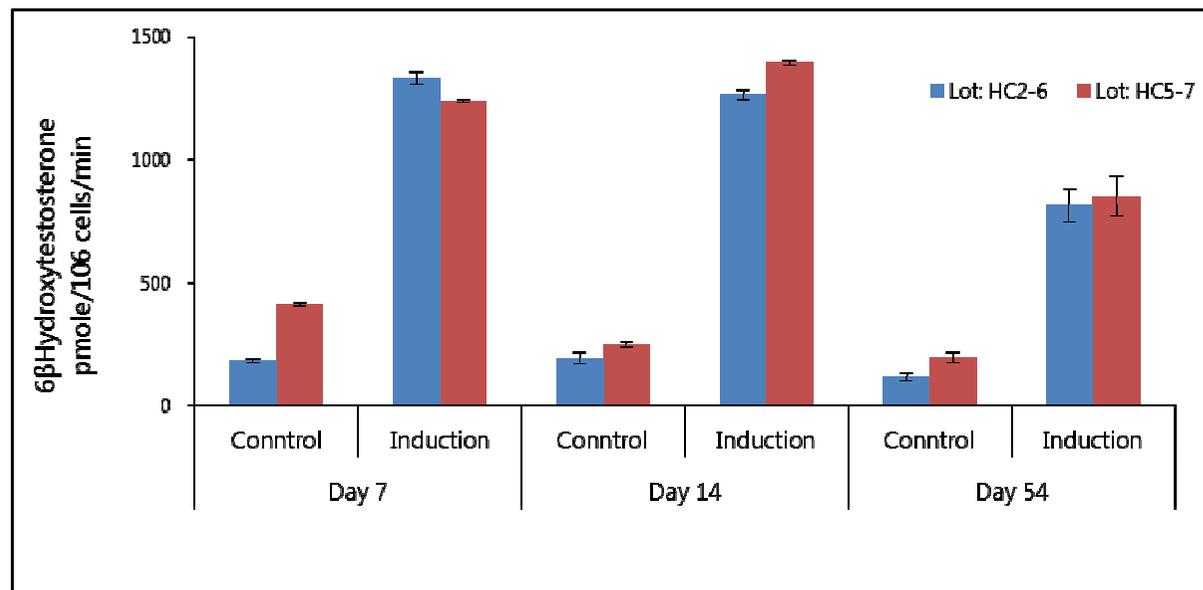


ラット初代肝細胞スフェロイド 断面 TEM写真

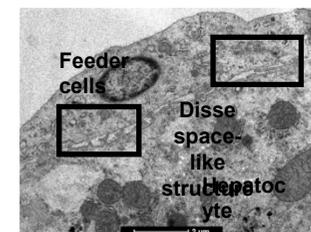
Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と

2

肝特異的機能維持

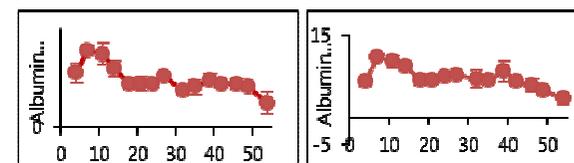


ヒト初代肝細胞CYP3A4 活性(基礎活性と誘導活性)
誘導:リファンピシン



ラット初代肝細胞スフェロイド 断面
TEM写真

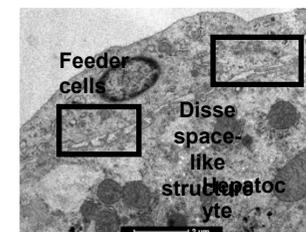
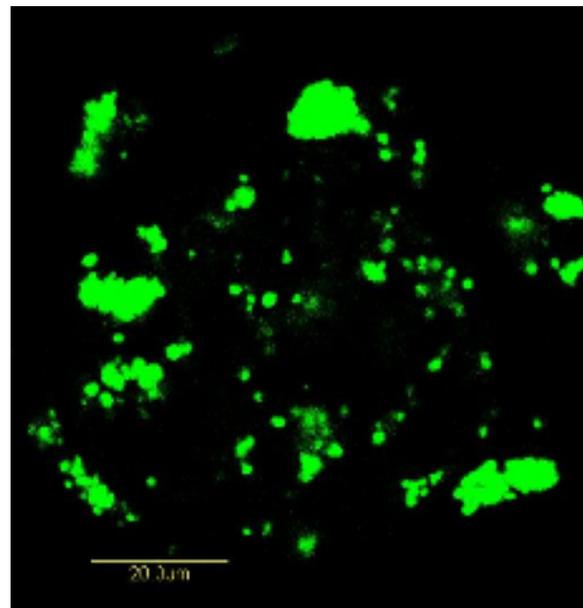
アルブミン産生能経時変化



Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と 肝特異的機能維持

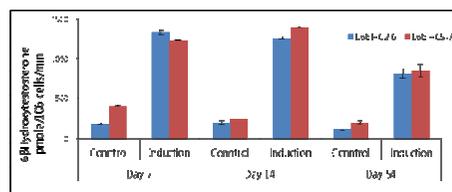
排泄トランスポーター機能
 CDFDAは肝細胞に取り込まれた後、蛍光物質であるCDFに加水分解され、ABCCTransporterによって胆汁管へ排泄されます。図は、Cell-able®で培養14日目のヒト初代肝細胞スフェロイドにCDFDA添加10分後の共焦点レーザー顕微鏡写真。

CDFDA; Carboxydichlorofluorescein diacetate
 CDF; Carboxydichlorofluorescein

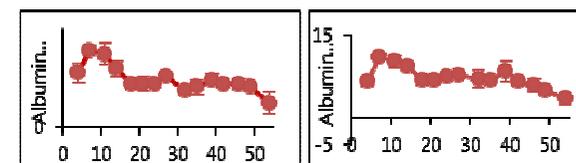


ラット初代肝細胞スフェロイド 断面
TEM写真

CYP3A4 活性 (基礎活性と誘導活性)



アルブミン産生能経時変化



- 簡単な操作で、スフェロイド培養が可能
⇒ 均一サイズ、同じ数のスフェロイドが形成
 - アッセイの再現性が良好
 - 肝特異的機能を保持した状態で長期間培養可能
 - 肝細胞以外の細胞でもスフェロイドを形成
例) ガン細胞株144例でスフェロイド形成を確認
【Data from EurofinsPanlabs, Inc. (米国)】
- がん細胞を使ってよりin vivoに近い薬剤感受性試験が可能

➤ Cell-able[®]3次元培養ヒト肝細胞を用いた応用例

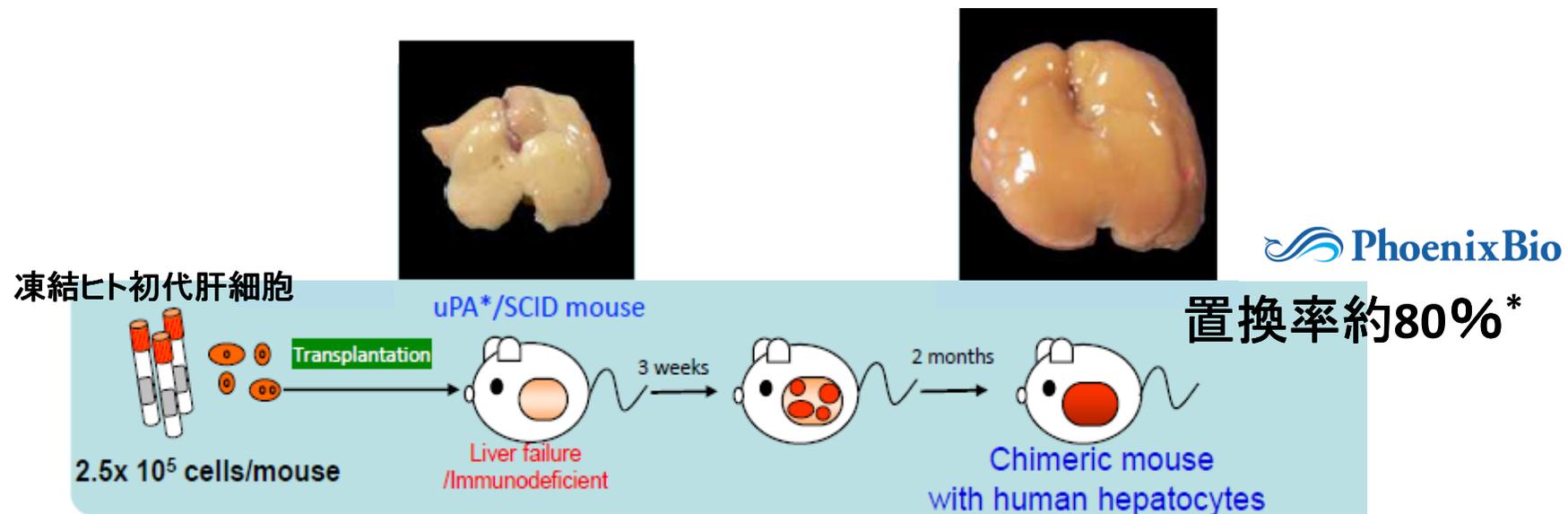
薬物性肝毒性 (Drug induced liver injury, DILI)
の予測

- In vitor試験に使用する場合の問題点
 - 量が限られている
 - 高価である
 - 凍結融解によるダメージ
 - 安定した培養が難しい



PXB-cells™に着目

- 移植したヒト初代肝細胞が、約1,000倍に増加*
- ヒト初代肝細胞に近い遺伝子発現、代謝活性を保持*
- 価格は凍結ヒト初代肝細胞の1/2～1/3程度
- 凍結していないため、長期間安定した培養が可能
- Cell-able®プレートに播種して輸送可能



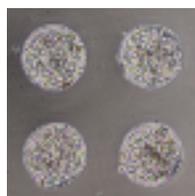
Cell-able® 上で培養したヒト肝細胞スフェロイドを用いた イメージングによるDILI試験

7

凍結ヒト初代肝細胞

キメラマウス由来
新鮮ヒト肝細胞
(PXB-cells™)

Cell-able® 3T3 swiss albino と共培養



18 薬物を2週間暴露後
蛍光染色; 核

GSH

ミトコンドリア膜電位



Molecular
Devices

ImageXpress Micro

High content screening assay system

TOYO GOSEI

Acetaminophen

8

The cells were exposed to acetaminophen for 14 days.

ヒト初代肝細胞

PXB-cells™

位相差

Nuclei

GSH

MMP

位相差

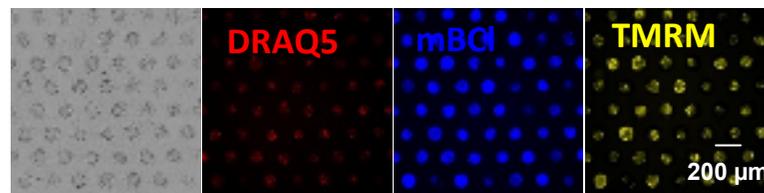
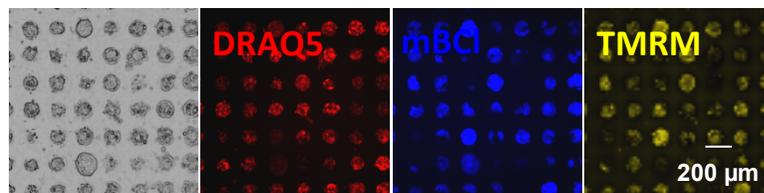
Nuclei

GSH

MMP

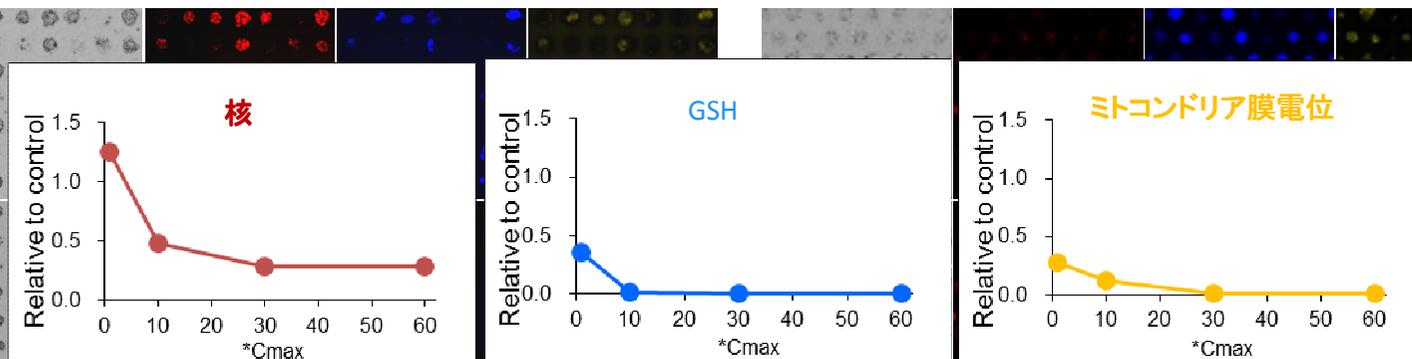
Vehicle

(0.1% DMSO)



AA
暴露濃度

低



画像解析により数値データを取得。3マーカーのうち1つでもCut off値*以下のシグナルを示した場合、その薬物をDILI陽性と判定した。

高

* Cut off; Vehicle値を基準に設定

LTKB*を参考に判定基準を決定

Status/ label	DILI Severity score		
	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>

各試験結果の比較

10

ID	判定 LTKB+ Clinical DILI	Xu, 2008, 1-d, Matrigel, 100x Cmax	Khetani, 2013, 16-d, co-culture, 1-100x Cmax	Human hepatocyte, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax		PXB-cells™, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax	
Aspirin	Negative	Negative	Negative	Negative		Negative	
Lidocaine	Negative	Negative	Positive	Negative		Negative	
Prednisone	Negative	Negative	Negative	Negative		Negative	
Bupropion HCl	+/-	Negative	NA	Negative		Negative	
Cyclophosphamide	+/-	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP
Imipramine HCl	+/-	Negative	Positive	Negative		Negative	
Propranolol HCl	+/-	Negative	Negative	Negative		Negative	
Nifedipine	+/-	Negative	Negative	Negative		Negative	
Acetaminophen	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP
Benzbromarone	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP
Ciprofloxacin HCl	Positive	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP
Clomiplamine HCl	Positive	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP	Negative	
Diclofenac Na	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP
Estrone	Positive	Negative	Negative	Negative		Negative	
Isoniazid	Positive	Negative	Positive	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH
Phenacetin	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP
Troglitazone	Positive	Positive	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP
Ketoconazol	Positive	NA	Positive	Positive	GSH, MMP, N	Positive	GSH, MMP

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

薬物によって引き起こされる肝毒性 (DILI) 予測系 特異性と感度

11

Cell-ble[®]で行った2つのDILI予測試験は、感度、特異性とも2008年Xuら¹⁾、2013年Khetaniら²⁾の報告と同等以上であった

	Cell-able [®]		Xu, 2008 ¹⁾	Khetani, 2013 ²⁾
	Human hepatocyte	PXB-cells [™]	Human hepatocyte	Human hepatocyte
特異性*	100%	100%	100%	67%
感度**	90%	80%	56%	90%

*特異性; DILI陰性薬物を陰性と判定した割合

**感度; DILI陽性薬物を陽性と判定した割合

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, 107-17

Cell-able[®] × PXB-cells[™] × ImageXpress for DILI

12

✓ 少ない細胞数（従来法の1/3）

Cell-able[®] 384 plateなら1/8の細胞数でOK

✓ 1well 多項目測定 (multiplex)

✓ 良好な特異性・感度

✓ PXB-cells[™]により初代肝細胞の希少性からくる問題点などを解決

謝辞

国立成育医療研究センター
絵野沢 伸 先生

モレキュラーデバイスジャパン株式会社
鈴木 真帆海 様

株式会社フェニックスバイオ
松見 達也 様
石田 雄二 様