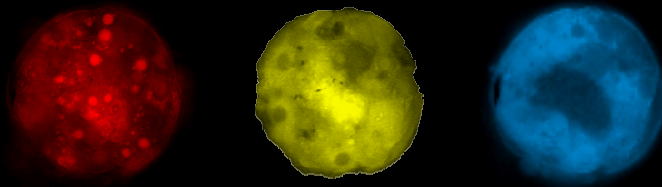


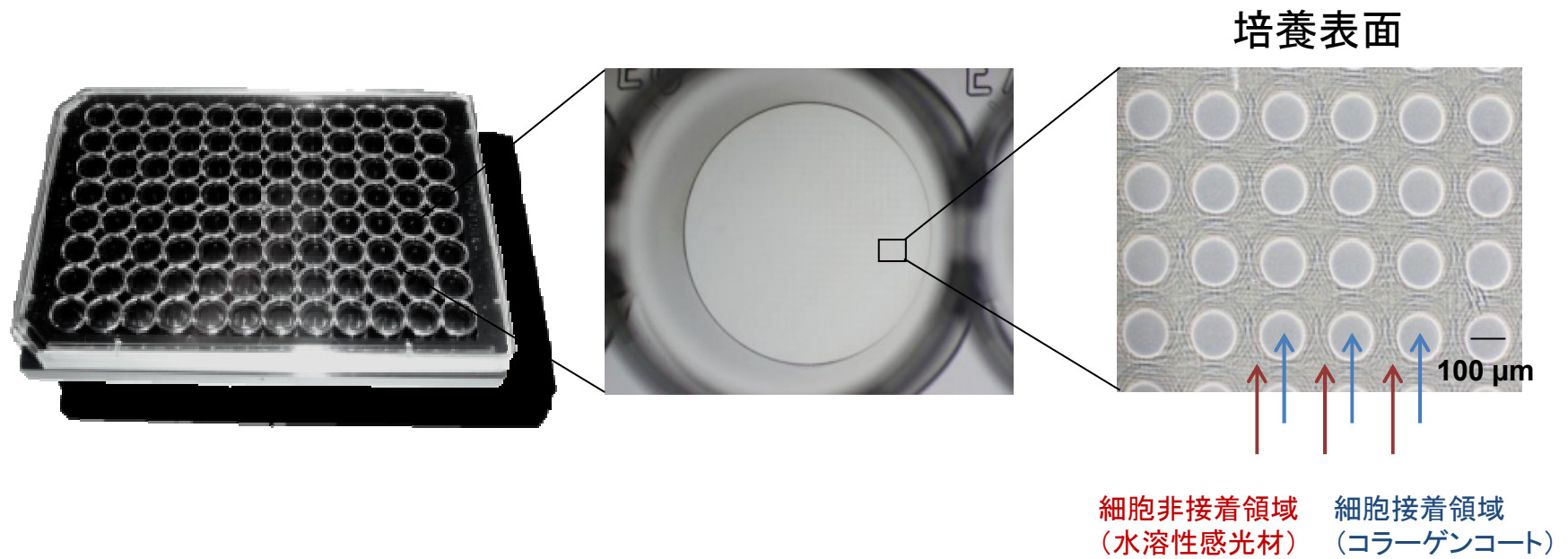
Cell-able上で形成したヒト肝細胞スフェロイドを用いた
肝毒性予測



東洋合成工業株式会社

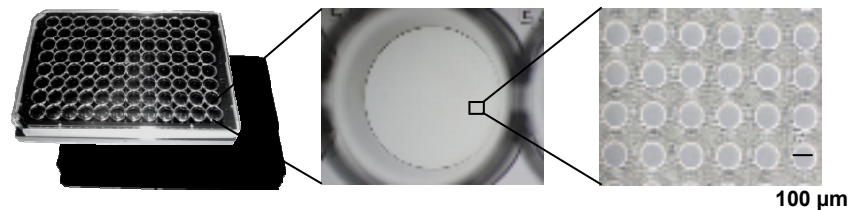
Cell-able[®] 外観と培養表面

1

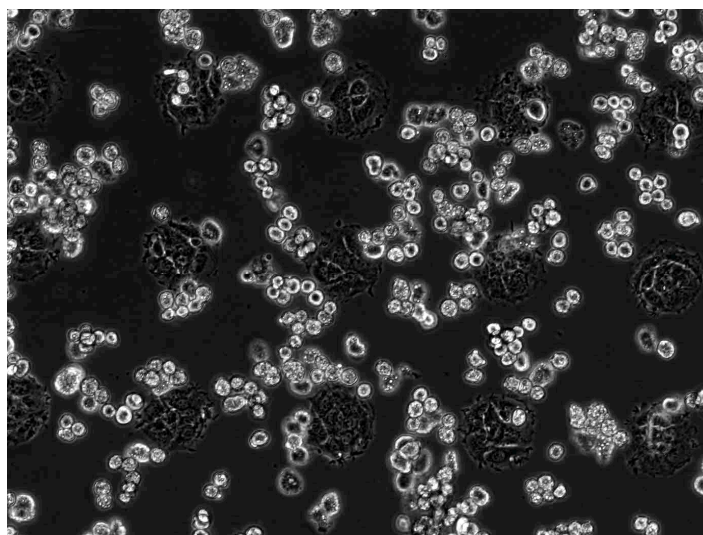


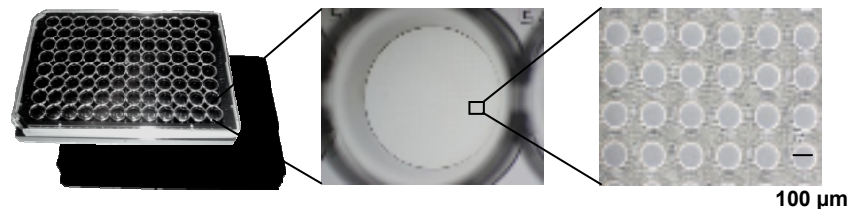
Cell-able® 外観と培養表面

1

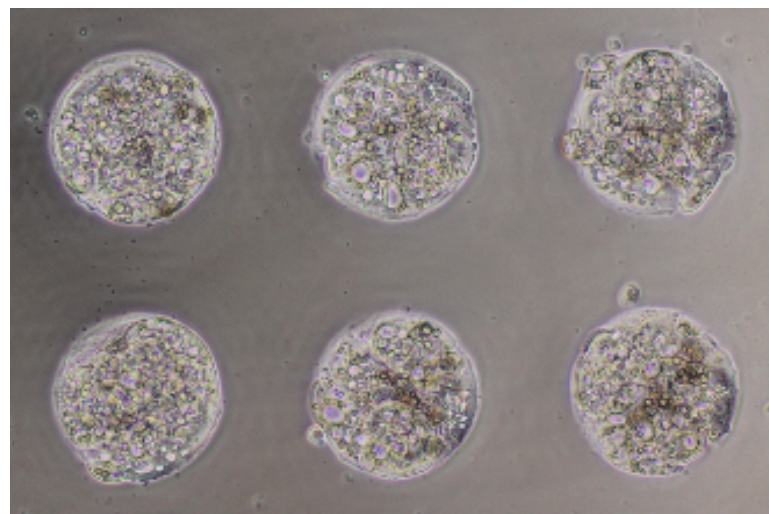


ラット初代肝細胞播種から48時間の動画





ヒト初代肝細胞播種5日目

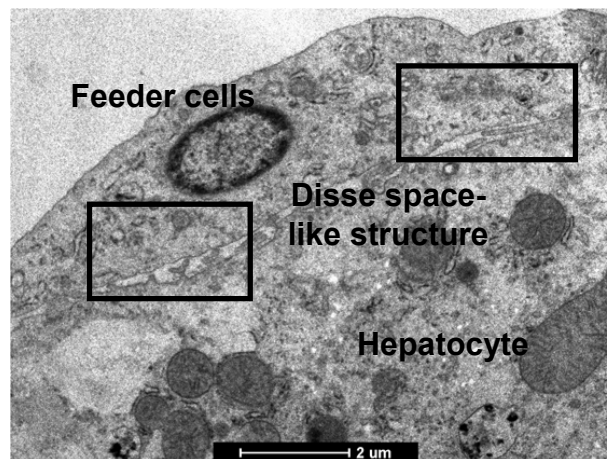


通常の培養操作で、直径約100 μ m, 厚み20~40 μ mの3Dスフェロイドを形成

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

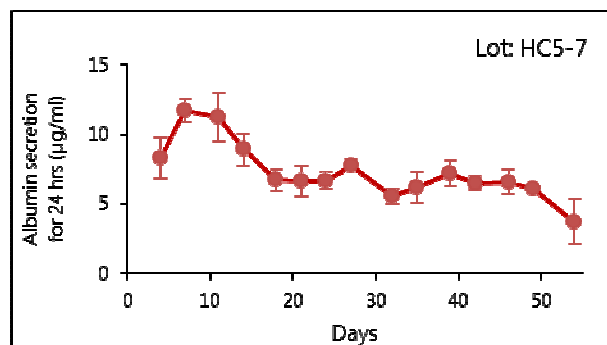


ラット初代肝細胞スフェロイド 断面TEM写真

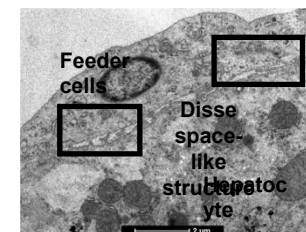
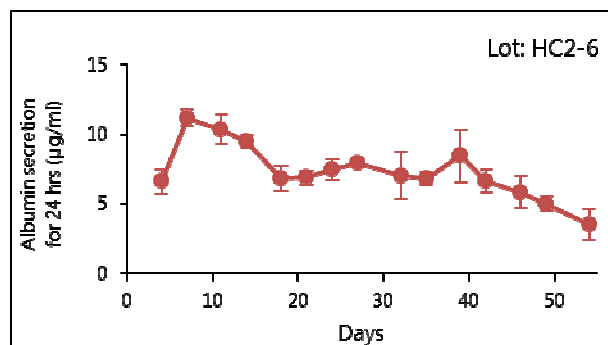
Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と 肝特異的機能維持

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

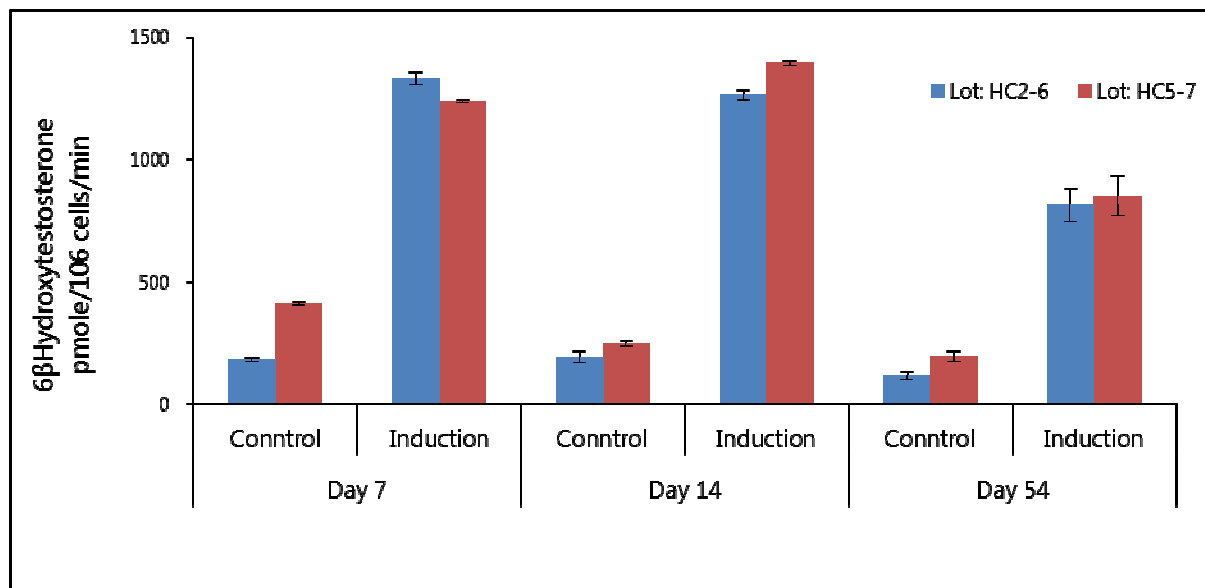


ラット初代肝細胞スフェロイド 断面
TEM写真

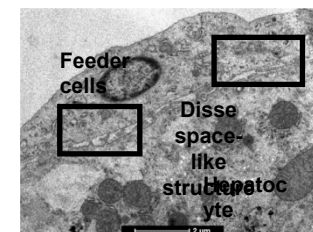
Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と

2

肝特異的機能維持

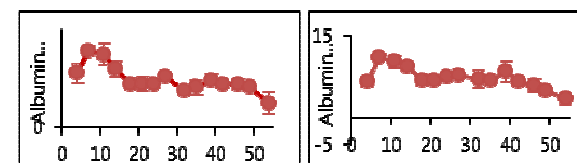


ヒト初代肝細胞CYP3A4 活性(基礎活性と誘導活性)
誘導:リファンピシン



ラット初代肝細胞スフェロイド 断面
TEM写真

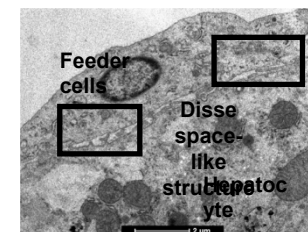
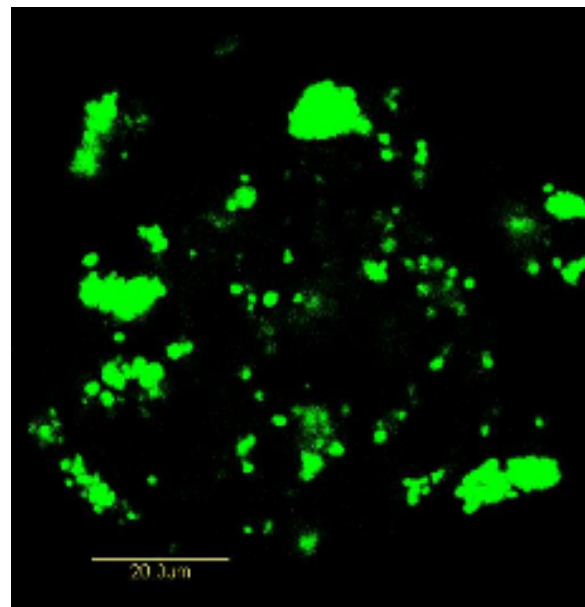
アルブミン産生能経時変化



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

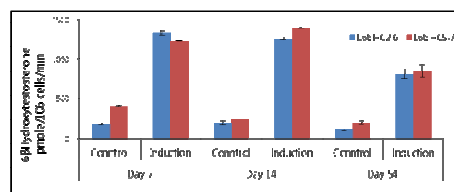
排泄トランスポーター機能
 CDFDAは肝細胞に取り込まれた後、蛍光物質であるCDFに加水分解され、ABCCTransporterによって胆汁管へ排泄されます。図は、Cell-able®で培養14日目のヒト初代肝細胞スフェロイドにCDFDA添加10分後の共焦点レーザー顕微鏡写真。

CDFDA; Carboxydichlorofluorescein diacetate
 CDF; Carboxydichlorofluorescein

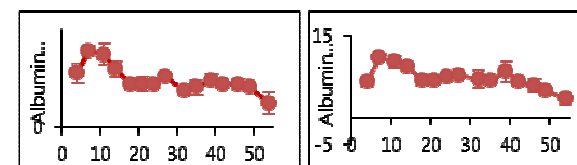


ラット初代肝細胞スフェロイド 断面
TEM写真

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

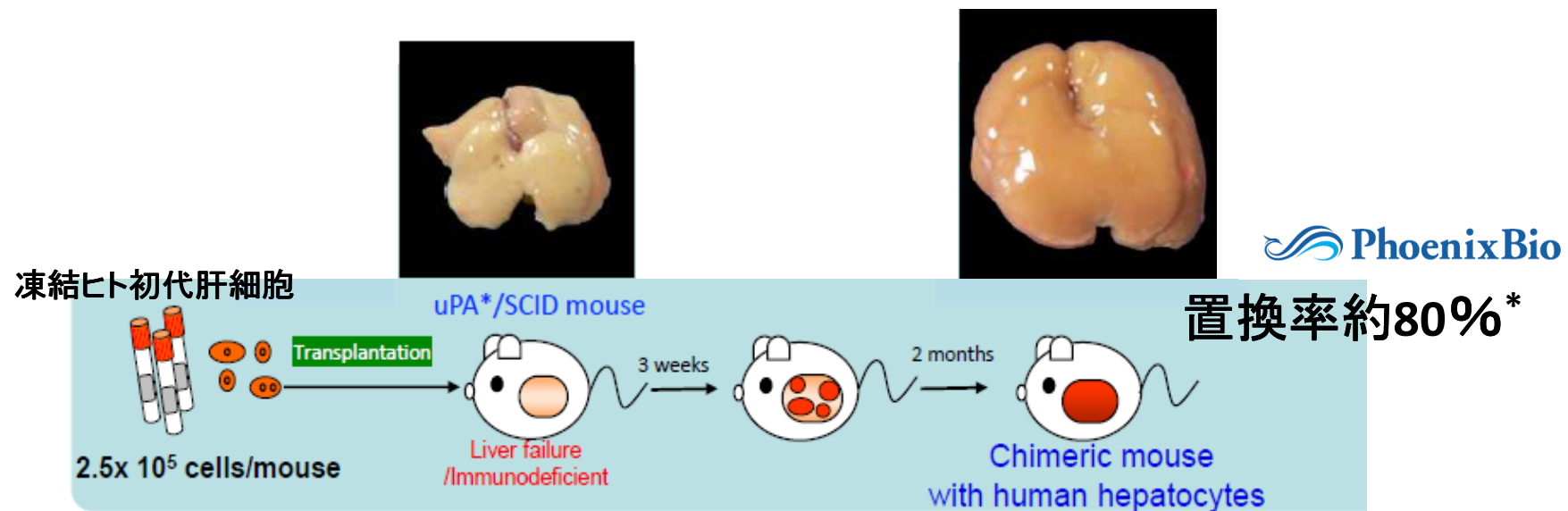
薬物性肝毒性 (Drug induced liver injury, DILI)
の予測

- 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



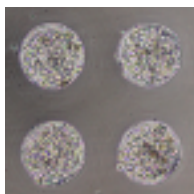
Cell-able® 上で培養したヒト肝細胞スフェロイドを用いた イメージングによるDILI試験

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

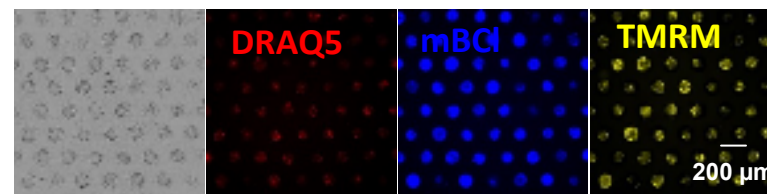
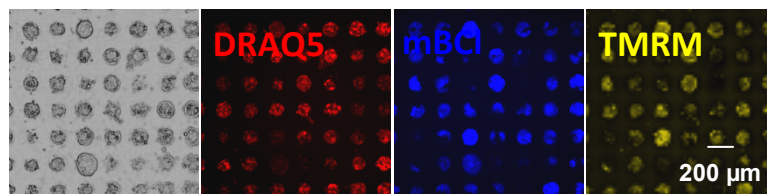
位相差

Nuclei

GSH

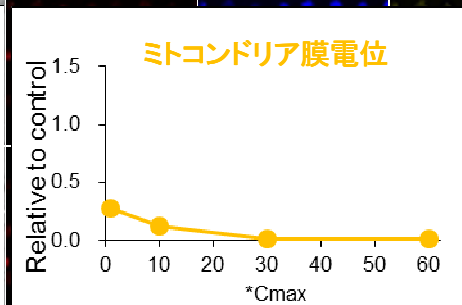
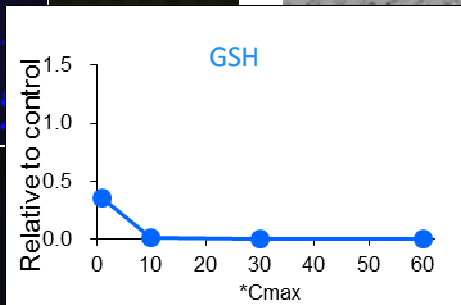
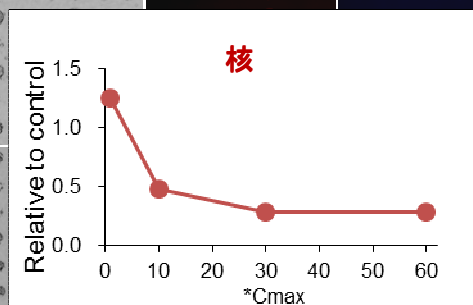
MMP

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

薬物のDILI 判定基準

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