

フォトポリマーでつくる三次元培養表面

～肝細胞付き培養器の供給まで～



第6回CSJ化学フェスタ

2016年11月15日

東洋合成工業株式会社

赤平 有希

アウトライン

1. 細胞の三次元培養とは

- 1) 会社概要
- 2) 細胞の三次元培養
- 3) 各種三次元培養用マルチウェルプレート
- 4) 三次元細胞培養システム Cell-able[®]

2. 三次元培養システム Cell-able[®]の特長

- 1) 多様な細胞培養実績
- 2) 均一な大きさのスフェロイドが得られる
- 3) 任意の形の細胞培養領域が形成できる
- 4) 接着型のスフェロイドが形成できる

3. 最近の取り組み - 肝細胞付きプレート PXB-able[™]の上市

会社概要

東洋合成工業株式会社  東洋合成工業

1954年 医薬品用化学製品の製造および精製を目的として創業

感光材事業



化成品事業



有機溶剤の精製
香料原料の製造

ロジスティック事業



化学品の保管・輸送

ライフサイエンス分野への応用

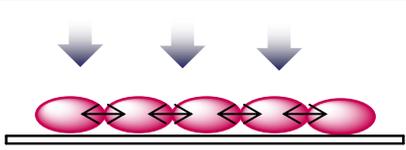
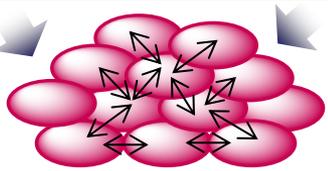
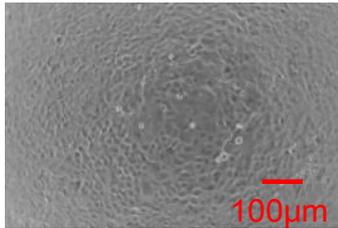
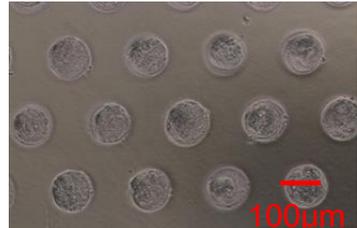
三次元細胞培養システム

Cell-able[®]

Cell-able[®]

三次元培養とは - 平面培養との比較

○通常の平面培養と三次元培養の違い

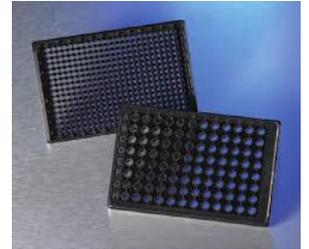
	平面培養	三次元培養
イメージ (培養面の断面)	 <p>培養面に対して平面</p>	 <p>立体的に培養</p>
写真 (がん細胞顕微鏡写真)	 <p>100µm</p>	 <p>100µm</p>
細胞間のシグナル伝達 (\leftrightarrow : シグナル伝達方向)	横方向のみ	立体的、全方向
培地・薬剤供給 (\rightarrow : 供給方向)	直接供給	内部は拡散により供給

三次元培養ではより生体内に近い状態を再現できるため、
医療・創薬等の分野で動物実験の代替手段となりえる

各種三次元培養用マルチウェルプレート

○三次元培養用マルチウェルプレート

培養底面に何らかの工夫を施し、
プレート底面への接着を抑制して細胞を凝集させる手法が一般的



	U底プレート	ハンギングドロップ	スキャホールド型	マイクロパターン型
細胞凝集塊形成様式				
	細胞の接着を抑制して細胞を凝集させる	液滴の中で凝集塊を形成	細胞の接着を適度に抑制し、底面に弱く接着しながら細胞凝集塊を形成	細胞接着領域と細胞非接着領域をつくり、細胞接着領域に細胞を集め凝集塊を形成
接着/非接着	非接着	非接着	接着	接着
凝集塊数/well	1個	1個	数百個	数百個

Cell-able®はマイクロパターン型の三次元培養プレート

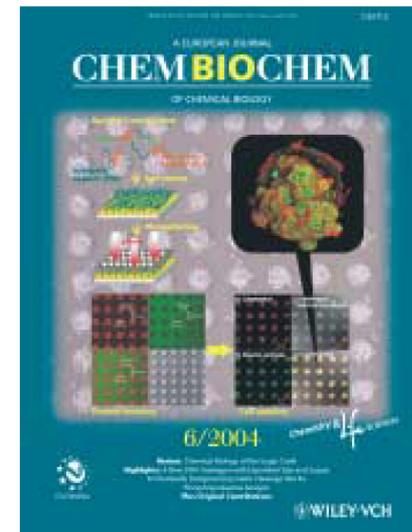


三次元細胞培養システムCell-able[®]

Cover Picture

Hidenori Otsuka, Akihiro Hirano, Yukio Nagasaki, Teruo Okano, Yasuhiro Horiike, and Kazunori Kataoka

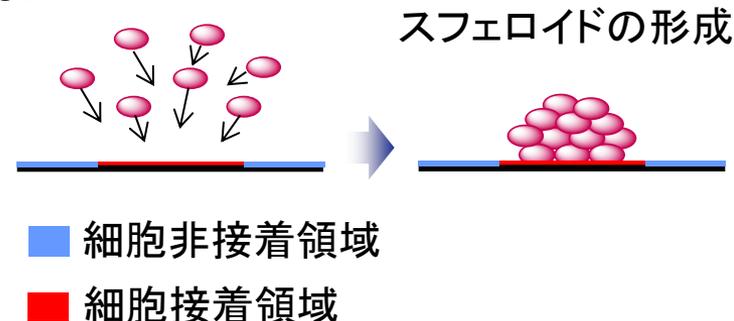
The cover picture shows a simple and effective way to construct a 2D microarray of 10 000 hepatocyte heterospheroids, underlaid with endothelial cells, through a combination of surface PEG treatment and subsequent microfabrication of plasma etching. The micro-patterned PEG-treated region works to repel proteins and consequently inhibits cell adhesion, while the glass circular domains ($\varnothing = 100 \mu\text{m}$), separated by PEG-treated regions ($l = 100 \mu\text{m}$), provide cell adhesive regions. This spheroid array is very useful as a platform for tissue and cell-based biosensors, which can be used as an alternative to animal experiments in a variety of situations. For more details, see the article by Kataoka et al. on p. 850 ff.



K. Kataoka et al. *Chem. Bio. Chem.*, **2004**, 5, 850-855.



マイクロパターンによる三次元細胞培養法
 東京大学 名誉教授
 (公財)川崎市産業振興財団
 ナノ医療イノベーションセンター所長
 片岡一則先生の技術

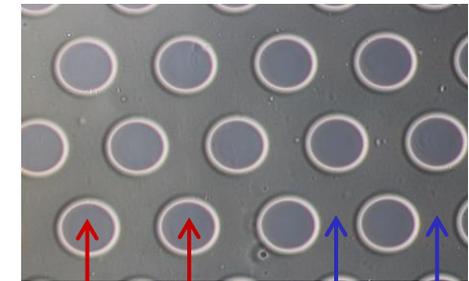
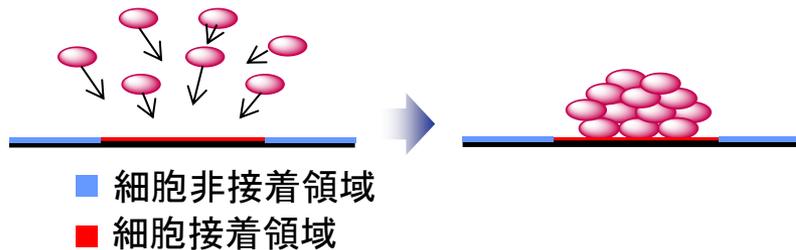


三次元細胞培養システムCell-able[®]



マイクロパターンによる三次元培養法
東京大学名誉教授 片岡一則先生の技術

+ 弊社独自の細胞非接着性
フォトポリマー



細胞接着領域

細胞非接着領域

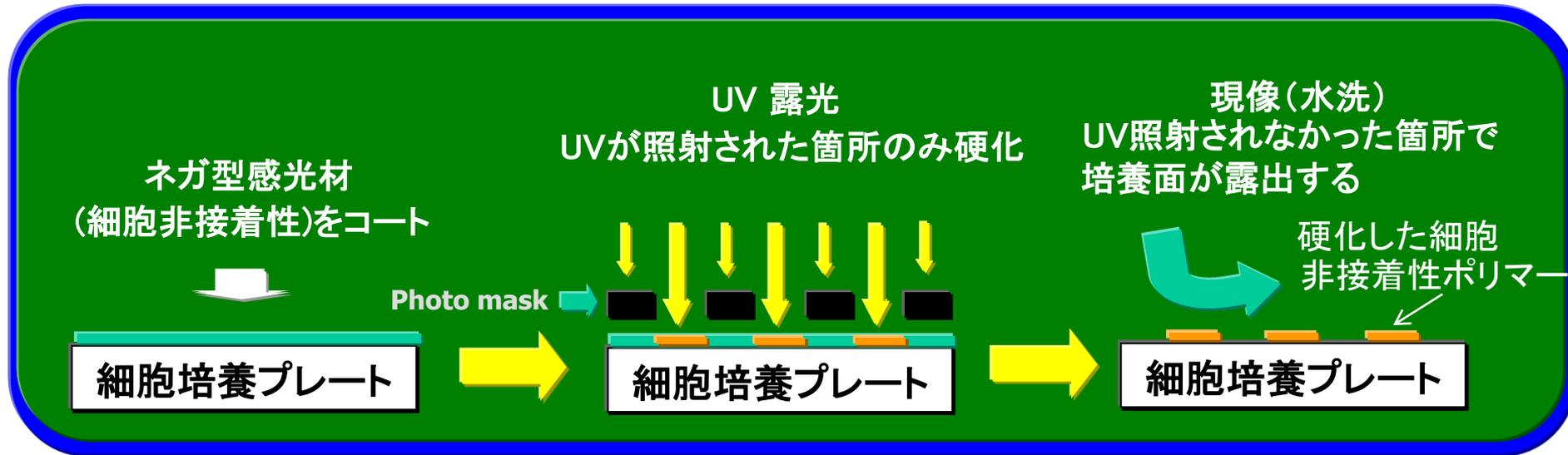


筑波大学 長崎幸夫先生のご尽力で事業化

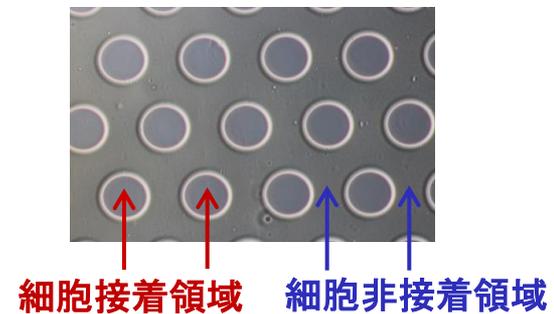
Cell-able[®]

三次元細胞培養システムCell-able[®]

Cell-able[®]の三次元培養表面は、細胞非接着性の感光性ポリマーによって作り出される



感光性ポリマーを使用することで、細胞接着領域と細胞非接着領域をUV照射のみで簡便に作り出すことができる



アウトライン

1. 細胞の三次元培養とは

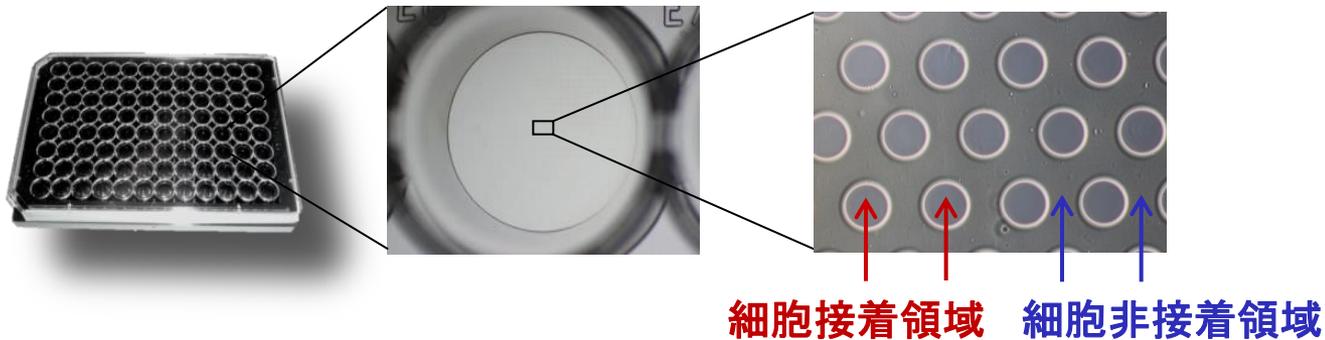
- 1) 会社概要
- 2) 細胞の三次元培養
- 3) 各種三次元培養用マルチウェルプレート
- 4) 三次元細胞培養システム Cell-able[®]

2. 三次元培養システム Cell-able[®]の特長

- 1) 多様な細胞培養実績
- 2) 均一な大きさのスフェロイドが得られる
- 3) 任意の形の細胞培養領域が形成できる
- 4) 接着型のスフェロイドが形成できる

3. 最近の取り組み - 肝細胞付きプレート PXB-able[™]の上市

三次元細胞培養システムCell-able[®]の特長

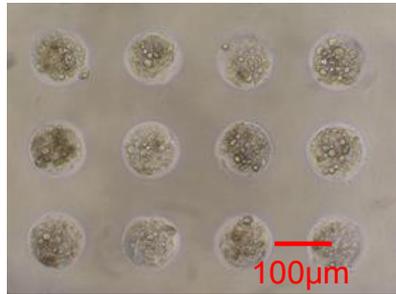


- ①多様な細胞の培養実績がある
- ②簡便に均一な大きさのスフェロイドが得られる
- ③任意の形の細胞接着領域が形成できる
- ④接着型スフェロイドが形成できる

Cell-able[®]の特長① - 多様な細胞培養実績

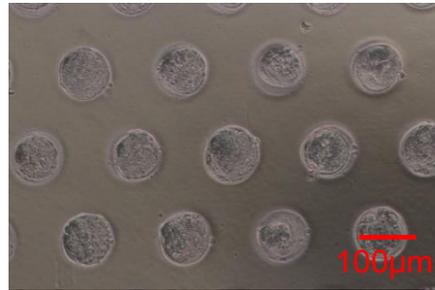
【Cell-able[®]での細胞培養実績例】

○初代肝細胞



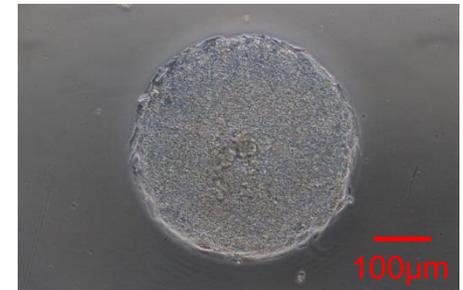
ヒト凍結初代肝細胞 培養28日目
長期培養が可能

○各種癌細胞



DLD-1(ヒト結腸癌細胞)培養5日目

○iPS細胞



Tic(ヒトiPS細胞)培養3日目

○間葉系幹細胞

【文献】S. Uchida and K. Kataoka et al.,
Biomaterials, 2014, 35, 5, 2449-2506.

○白血病細胞

日本医科大学 浅野健先生
第78回日本血液学会学術集会(2016) PS-2-102

Cell-able[®]では多様な細胞を培養することが可能

他多数

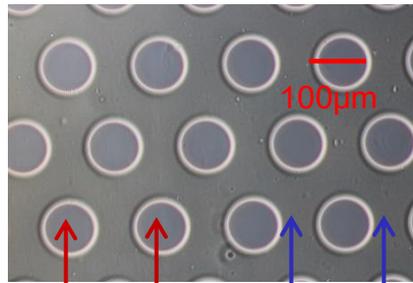


様々な分野の細胞培養ニーズに貢献

Cell-able[®]の特長② - 均一な大きさのスフェロイド

Cell-able[®]では細胞接着領域の大きさが規定されている

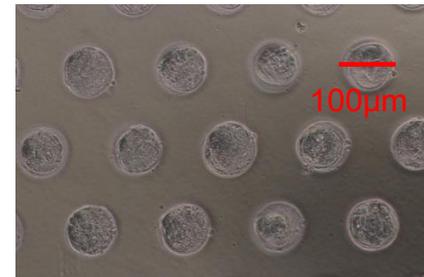
➡ 細胞が接着領域内に収まり、均一な大きさのスフェロイドを得ることが可能



細胞接着領域 細胞非接着領域
(直径約100µm、ホール間距離約100µm)



細胞播種



直径約100µmのスフェロイドが複数得られる

がん細胞DLD-1 培養写真			
スフェロイドサイズ [µm]	100	160	250

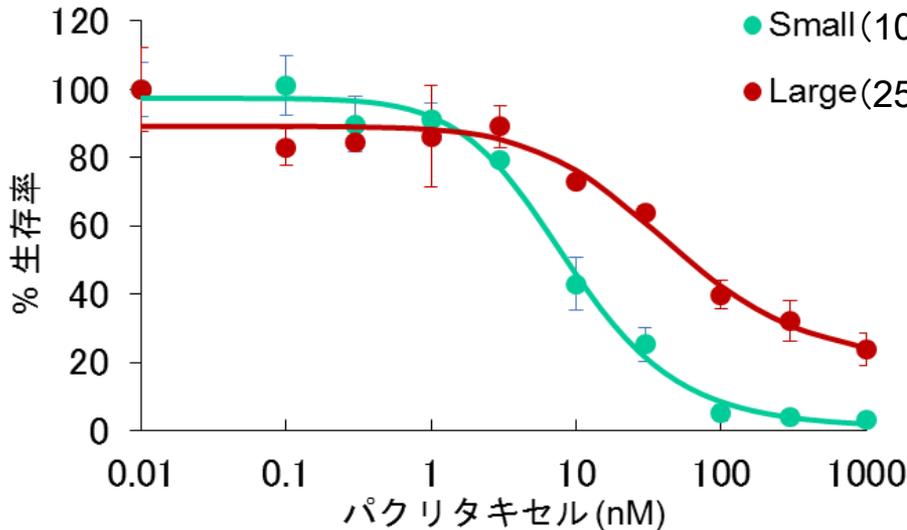
Cell-able[®]の特長② - 均一な大きさのスフェロイド

均一なスフェロイドが得られるメリット

➔ スフェロイドサイズの違いによるデータのばらつきを抑制できる

【事例】がん細胞DLD-1スフェロイドサイズによる、

抗がん剤パクリタキセル(PTX)曝露に対するがん細胞生存率の違い



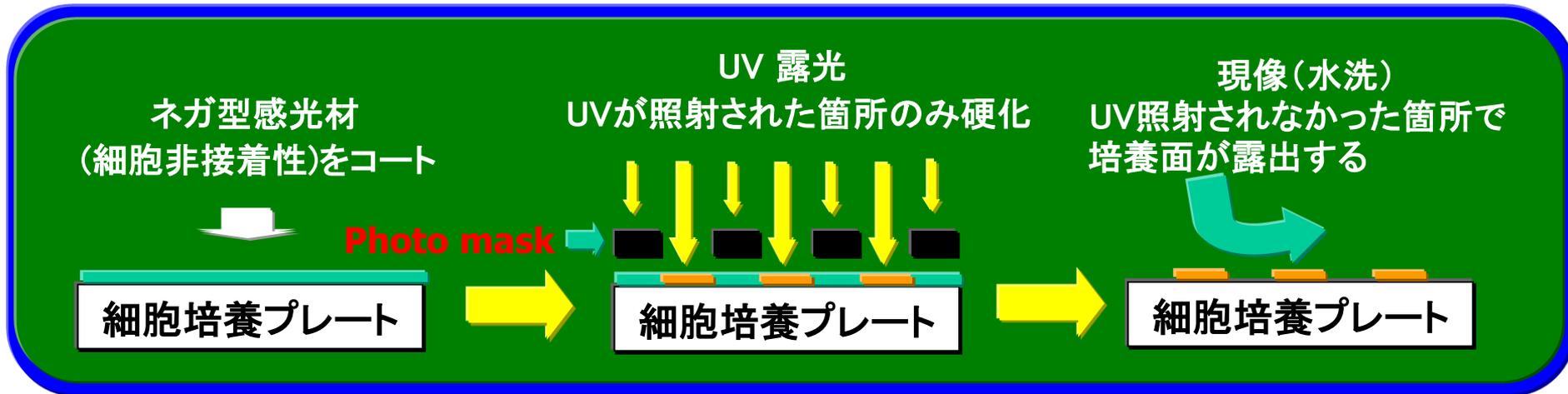
スフェロイドサイズにより、
パクリタキセルに対する感受性が変わる

異なるサイズのスフェロイドが混在すると、
データがばらつく可能性を示唆

均一なスフェロイドが得られることは、データの信頼性の面で重要

Cell-able[®]の特長③ - 任意の形の細胞接着領域

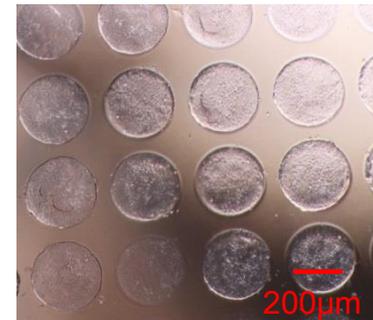
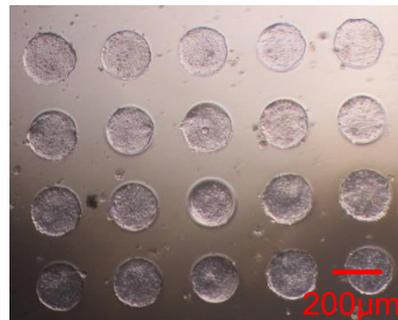
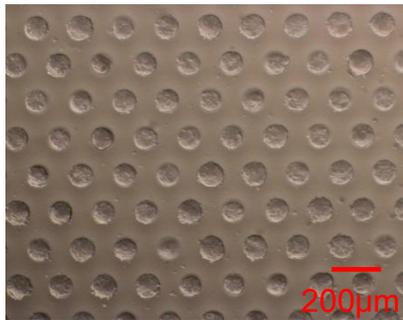
Cell-able[®]の三次元培養表面は、感光性ポリマーを用いてフォトマスクのマスクパターンを転写してつくられる



希望のパターンのフォトマスクがあれば、細胞接着領域を任意の形にすることができる
ライン状、複雑な形も可能

Cell-able[®]の特長③ - 任意の形の細胞接着領域

○ホールパターンのバリエーション例 細胞：DLD-1



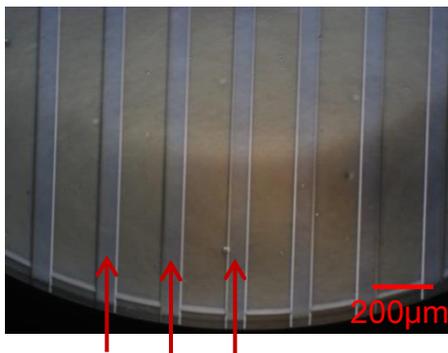
ホールサイズ： 約100µm

約180µm

約280µm

パターンによって異なる大きさのスフェロイドが形成可能

○ラインパターン例 細胞：DLD-1



DLD-1



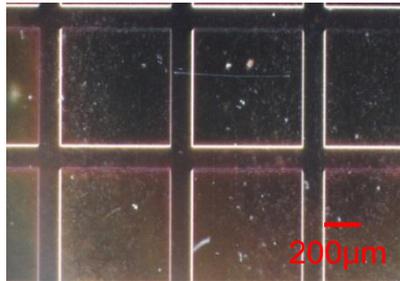
ライン状の細胞塊も
形成可能

細胞接着領域(ライン幅約60µm)

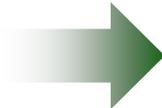
Cell-able[®]の特長③ - 任意の形の細胞接着領域

○複雑なパターンニング

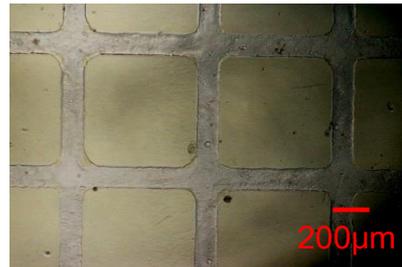
パターン写真



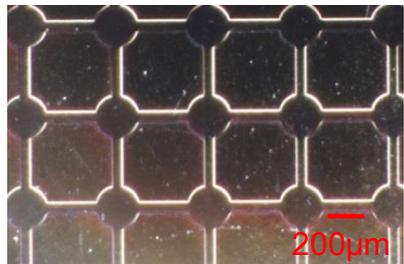
DLD-1



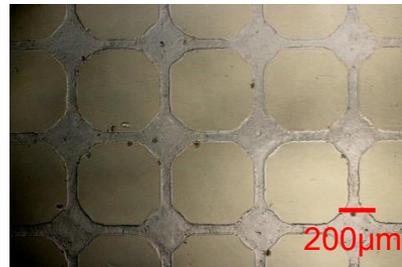
細胞培養写真



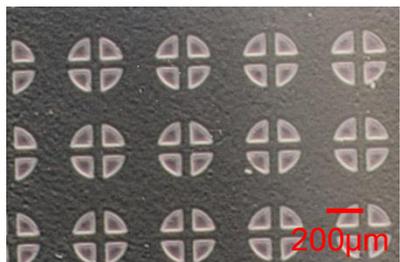
フォトマスクがあれば自在に
細胞接着領域をコントロールできる



DLD-1



Cell-able[®]の大きな特徴である
細胞の性質に合わせて
カスタマイズを承っております



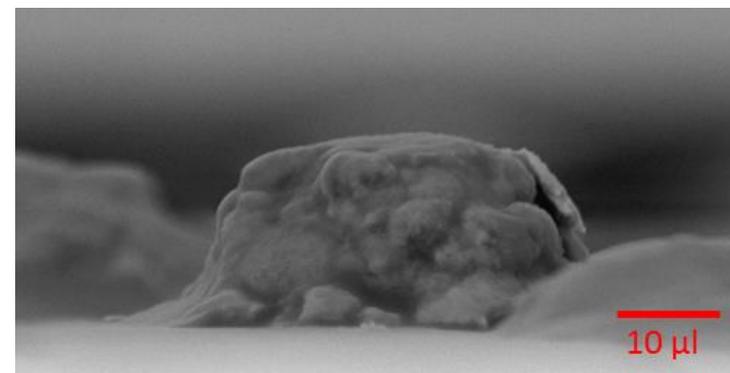
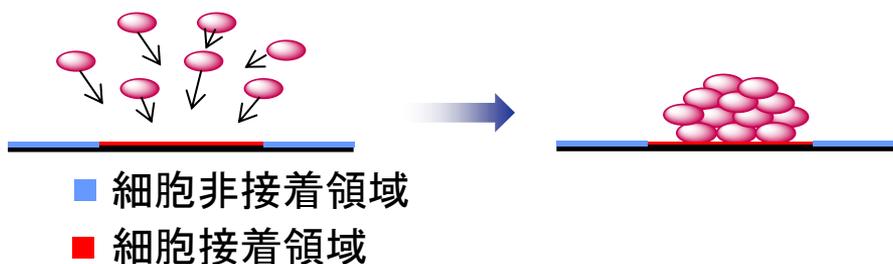
3T3



Cell-able[®]の特長④ - 接着型のスフェロイド

Cell-able[®]では、細胞接着領域に細胞を集めてスフェロイドを形成する

→ プレートに接着したスフェロイドが得られる



Cell-able[®]で作製した
キメラマウス由来ヒト肝細胞
スフェロイドSEM写真(側面)

Cell-able[®]の特長④ - 接着型のスフェロイド

接着型のスフェロイド {
 スフェロイドの洗浄が可能
 染色操作が可能

【染色例】

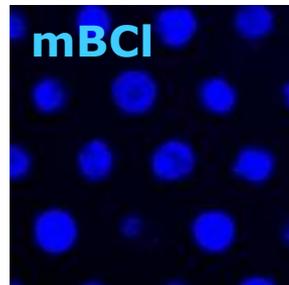
二次元培養と同様の細胞評価が可能

Cell-able[®]で作製したキメラマウス由来ヒト肝細胞スフェロイドに対して、各種バイオマーカーを蛍光染色

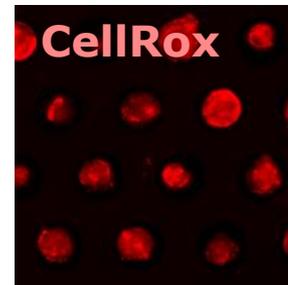
核



細胞内グルタチオン



活性酸素ストレス



新規薬物候補化合物を細胞に曝露した後、バイオマーカーの蛍光輝度を測定

候補化合物の肝毒性の評価が可能

アウトライン

1. 細胞の三次元培養とは

- 1) 会社概要
- 2) 細胞の三次元培養
- 3) 各種三次元培養用マルチウェルプレート
- 4) 三次元細胞培養システム Cell-able[®]

2. 三次元培養システム Cell-able[®]の特長

- 1) 多様な細胞培養実績
- 2) 均一な大きさのスフェロイドが得られる
- 3) 任意の形の細胞培養領域が形成できる
- 4) 接着型のスフェロイドが形成できる

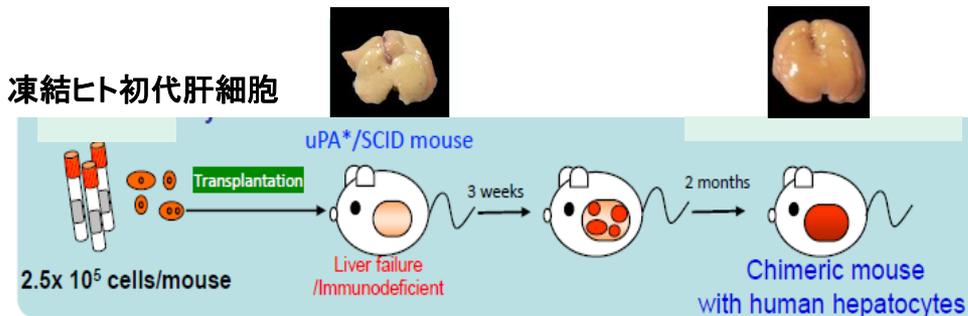
3. 最近の取り組み - 肝細胞付きプレート PXB-able[™]の上市

最近の取り組み - 肝細胞付きプレートPXB-able[™]

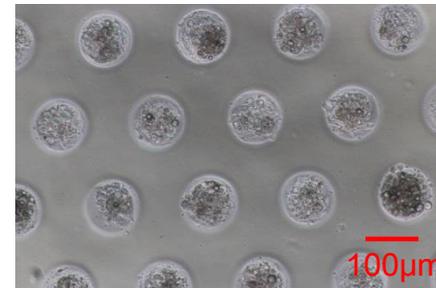
PXB-cells[®]



(株)フェニックスバイオで安定生産しているPXB-マウス[®]
(ヒト肝細胞キメラマウス)から分離した新鮮ヒト肝細胞



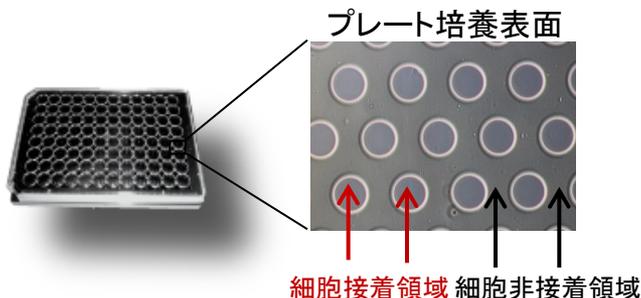
これら二つの技術を利用
PXB-able[™] 2016年上市



Cell-able[®]上で培養したPXB-cells[®]
スフェロイドを培養したままの状態ですべて輸送・納品

Cell-able[®]

東洋合成工業(株)で製造販売している三次元培養システム

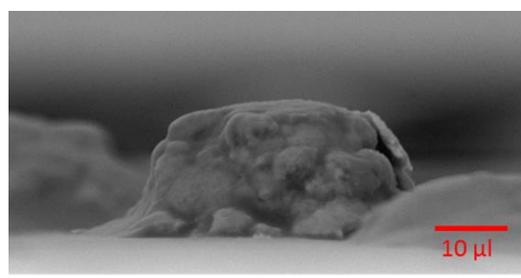


PXB-able[™]の特徴

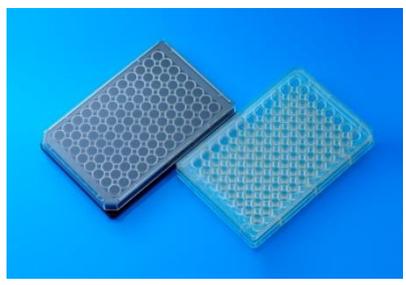
- ①輸送可能
- ②ready-to-useで使用可能
- ③肝特異的機能を長期間維持
- ④三次元化する事で微小器官を再構築

最近の取り組み - 肝細胞付きプレートPXB-able™

PXB-able™の特長①輸送可能、②ready-to-useで使用可能



PXB-able™は接着型のスフェロイド
 → プレートごと輸送が可能である



細胞播種済で
 梱包・輸送



納品

- ・納入後すぐに、細胞播種等の手間がなく実験を開始できる
- ・輸送可能であるため、培養と試験を別々の施設で行うことも可能

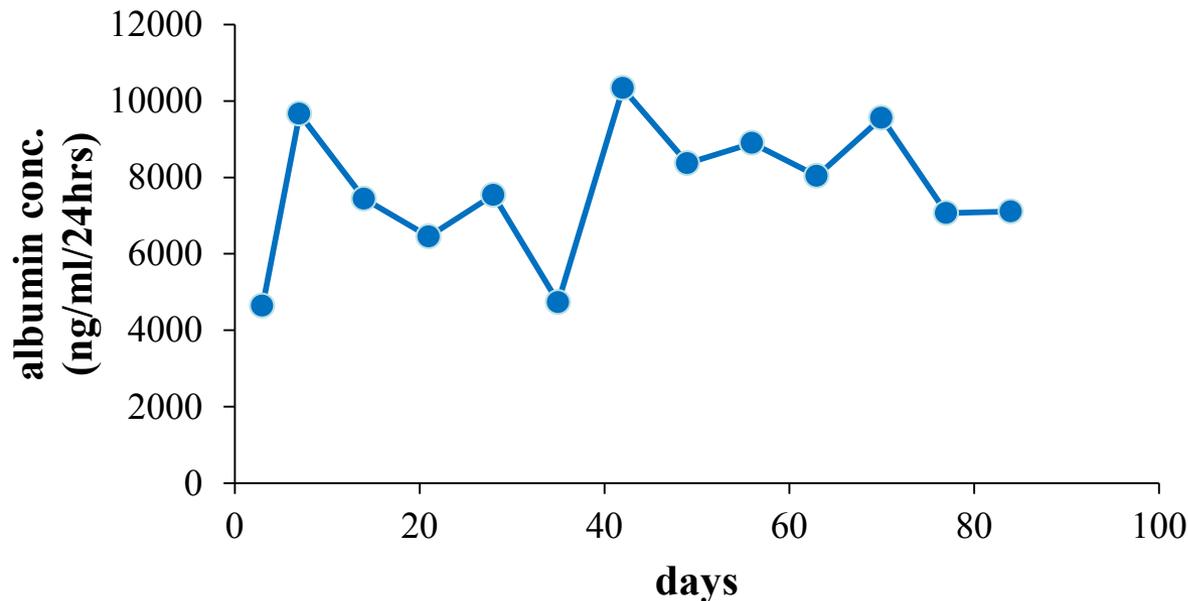
最近の取り組み - 肝細胞付きプレートPXB-able[™]

PXB-able[™]の特長③ 肝特異的機能の長期間維持 - アルブミン産生能の事例

アルブミン - 肝臓で産生される代表的なタンパク質

肝特異的機能評価に使用されるマーカーのひとつ

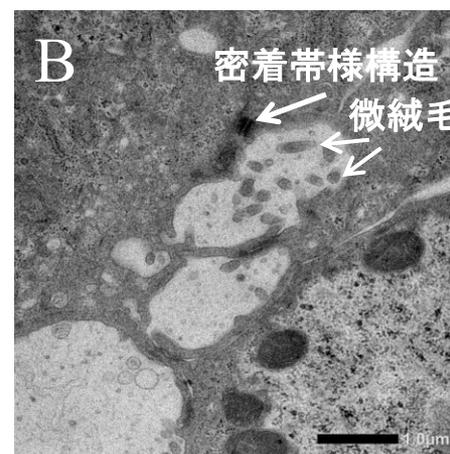
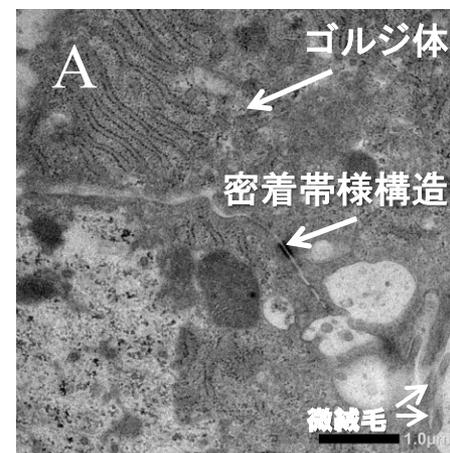
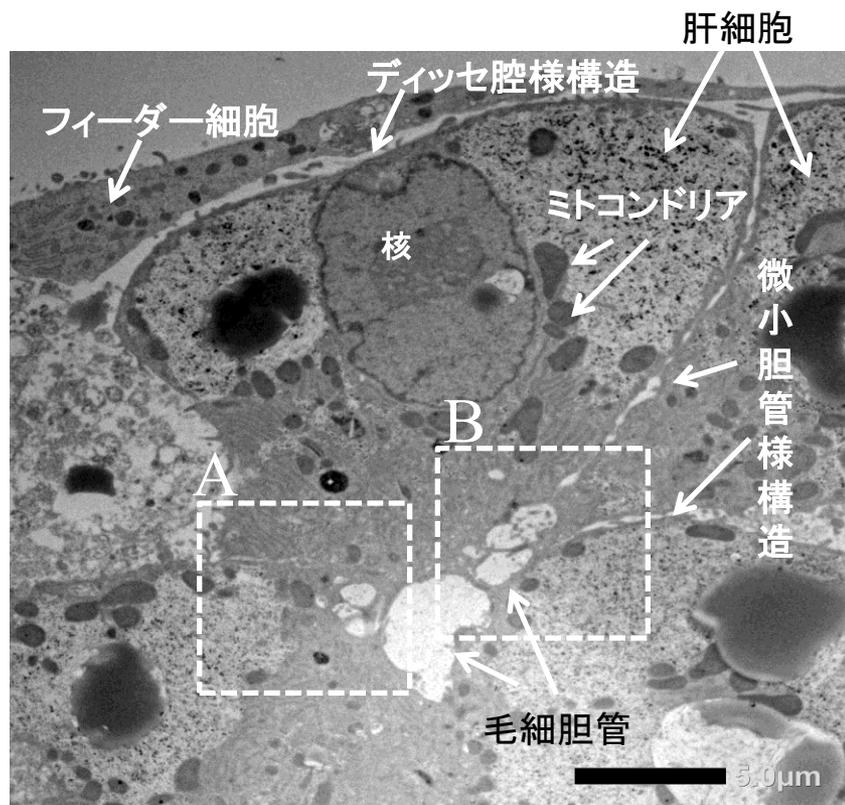
PXB-able[™] アルブミン産生能評価



PXB-able[™]のアルブミン産生能は、84日間も維持できることがわかった

最近の取り組み - 肝細胞付きプレートPXB-able™

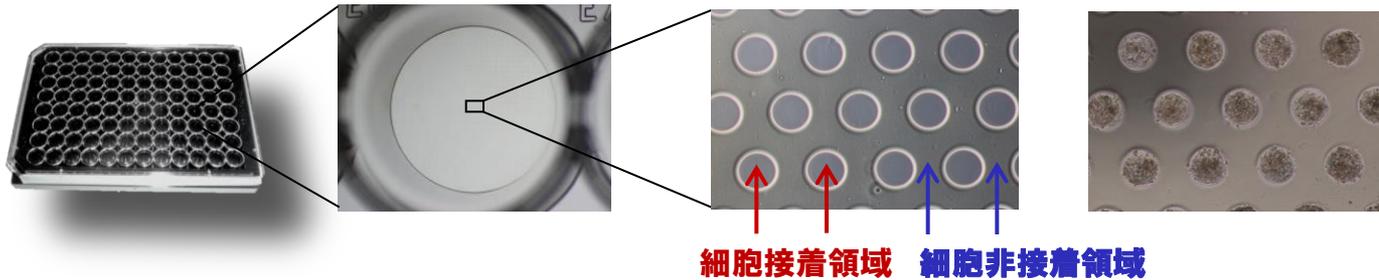
PXB-able™の特長④微小構造を再構築できる - PXB-able™断面のTEM写真



三次元培養により微小構造が再構築される
⇒生体内に近い状態を再現できている

監修: 旭川医科大学
西川祐司先生

まとめ



Cell-able[®]の特長

- ①多様な細胞の培養実績がある
- ②簡便に均一な大きさのスフェロイドが得られる
- ③任意の形の細胞接着領域が形成できる
- ④接着型スフェロイドが形成できる

Cell-able[®]ならではの
機能発現を追求

～肝細胞付きプレートPXB-able[™]～

謝辞



東京大学名誉教授
片岡 一則 先生



筑波大学教授
長崎 幸夫 先生

- ・キメラマウス由来ヒト肝細胞PXB-cells[®]ご提供およびPXB-able[™]上市、データ取得
株式会社フェニックスバイオ 松見 達也 様、石田 雄二 様、和田谷 朋子 様、山崎 ちひろ 様
- ・PXB-able[™] TEM写真ご監修
旭川医科大学 医学部 病理学講座 腫瘍病理分野 西川 祐司 先生
- ・SEM写真、TEM写真撮影ご協力
日本電子株式会社 高木 孝士 様、池谷 綾美 様
- ・スフェロイドの蛍光染色写真撮影ご協力
モレキュラーデバイスジャパン株式会社 鈴木 真帆海 様
- ・東洋合成工業(株) 池谷 武志、渡辺 政春、宮崎 香名、城村 友子