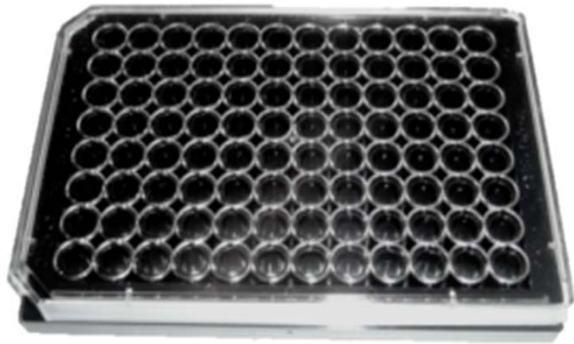


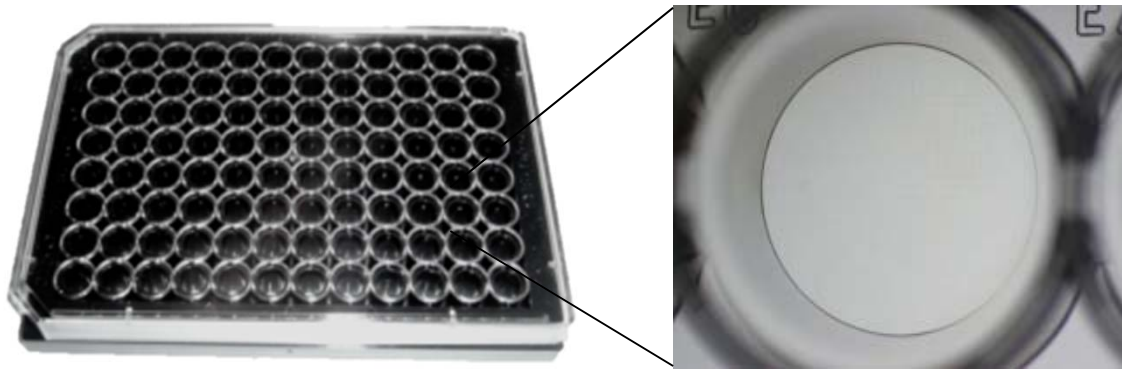
Cell-able[®] について

2014年11月14日
東洋合成工業株式会社

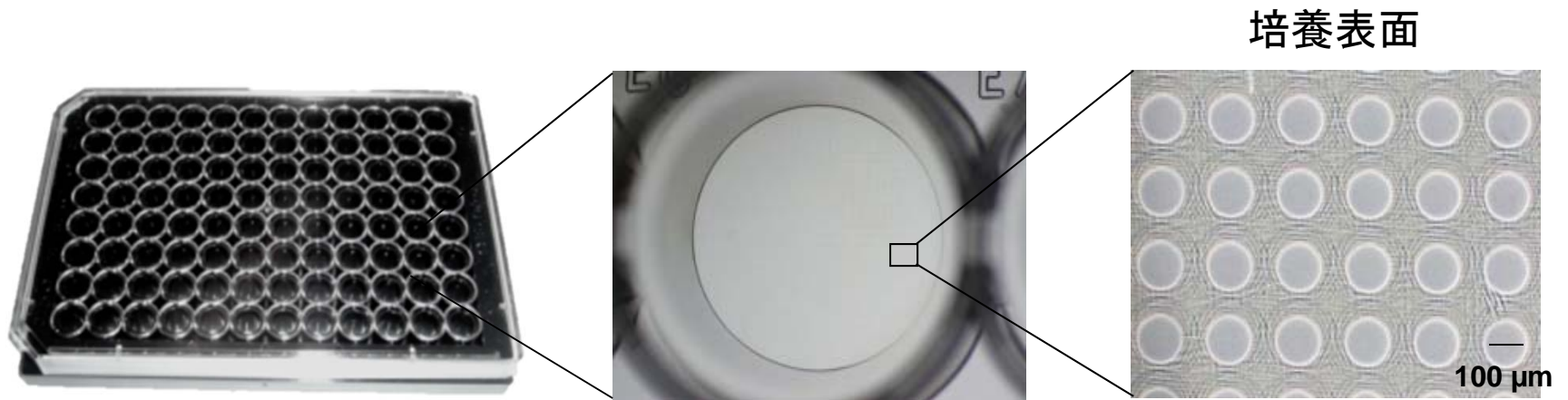


Cell-able® 外観と培養表面

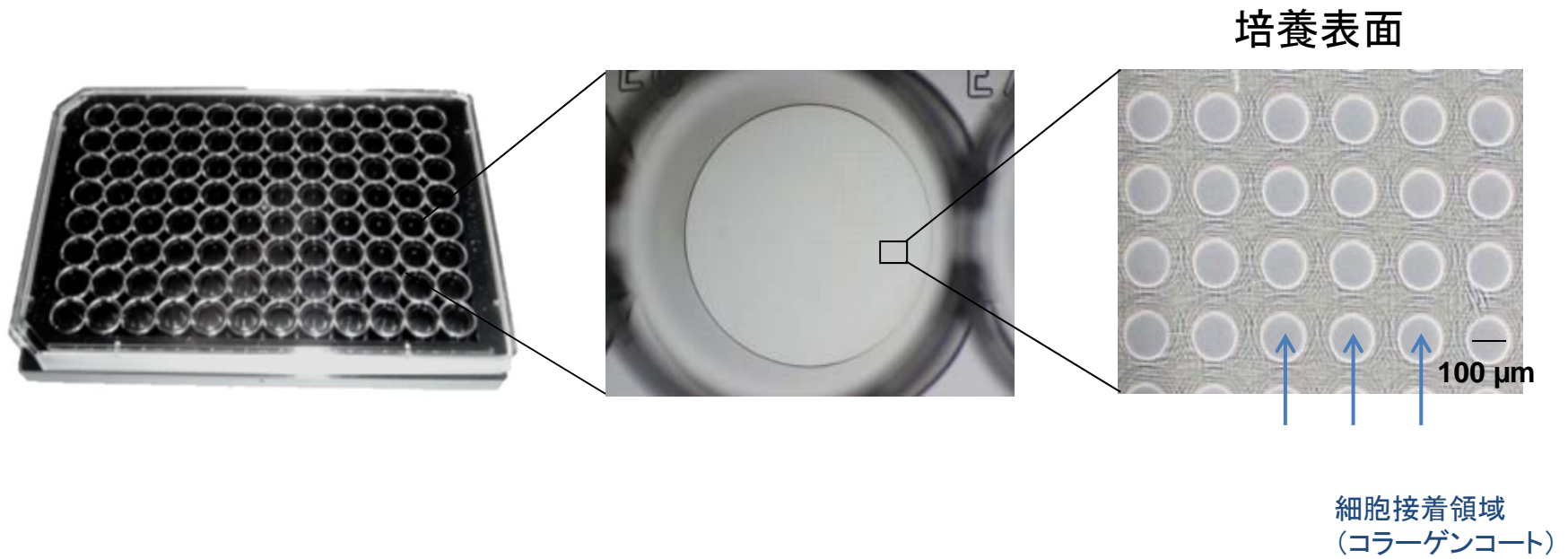
1



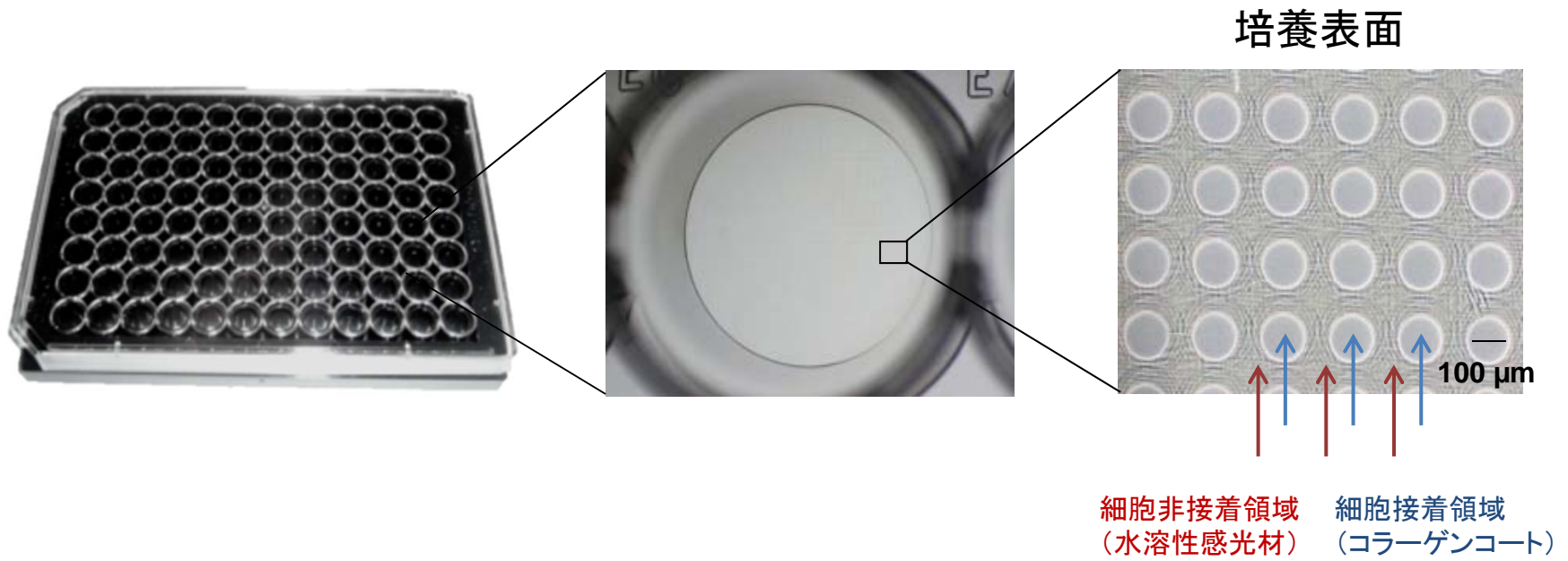
Cell-able[®] 外觀と培養表面

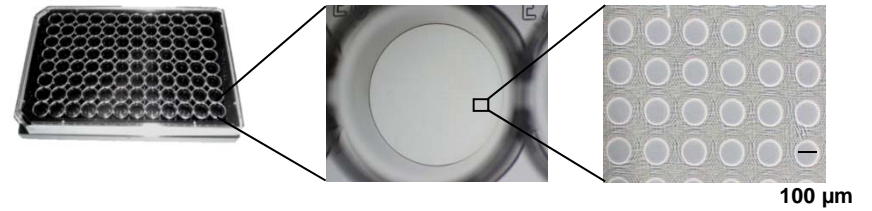


Cell-able® 外観と培養表面

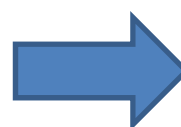
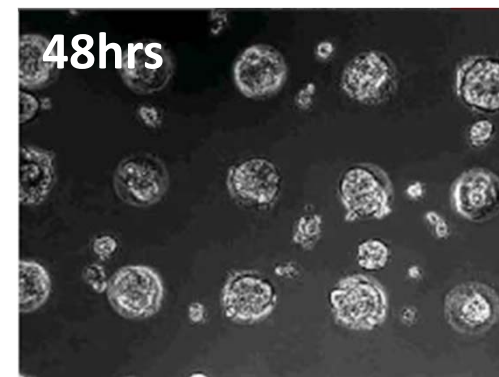
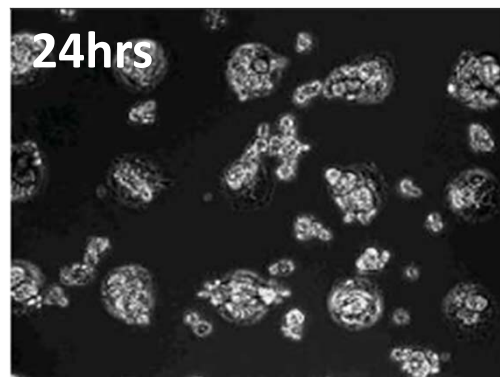
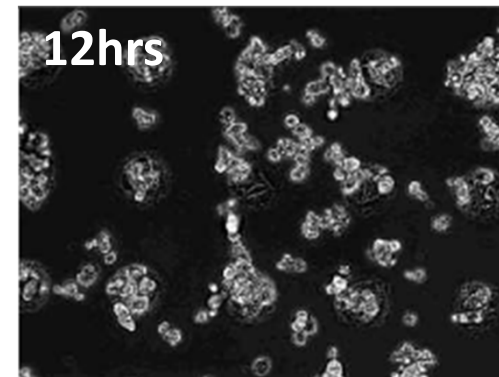
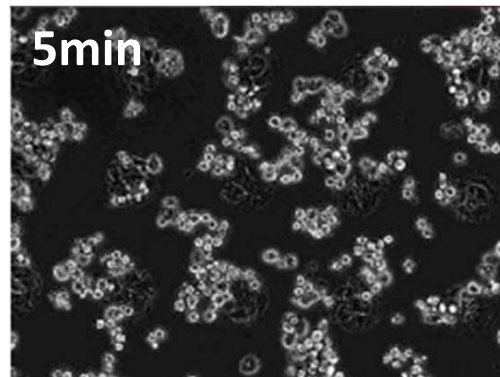


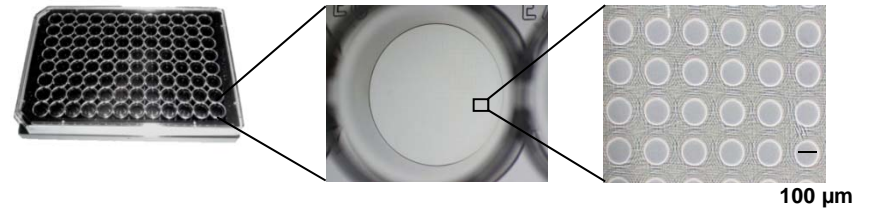
Cell-able® 外観と培養表面



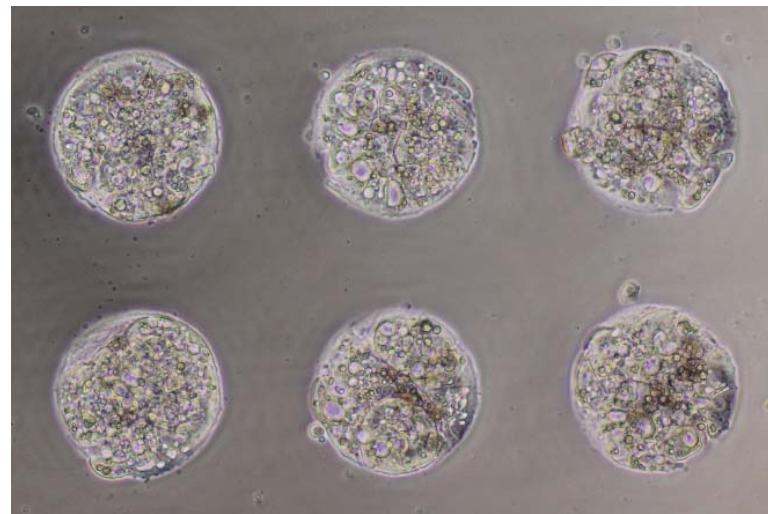


ラット初代肝細胞播種から48時間の動画





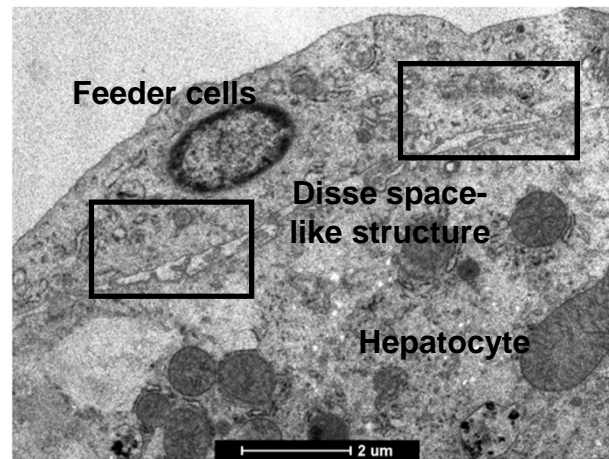
ヒト初代肝細胞播種5日目



一般的な培養操作で
直径約100μm, 厚み20~40μm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 肝特異的機能維持

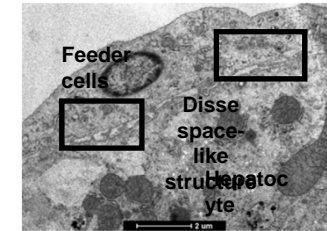
2



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

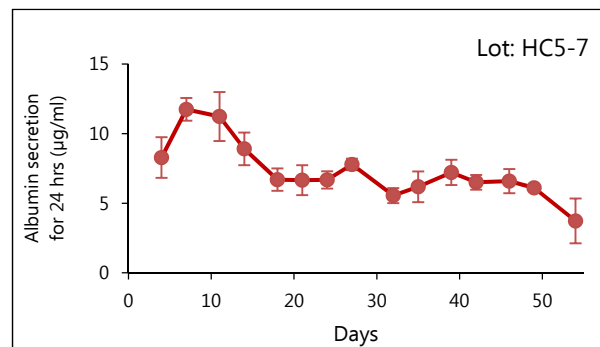
2



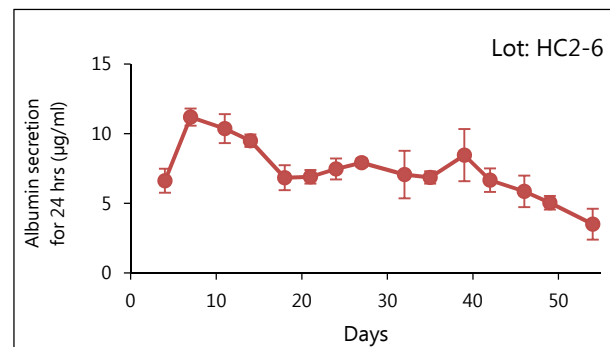
ラット初代肝細胞スフェロイド断面
TEM写真

ヒト初代肝細胞アルブミン産生能経時変化

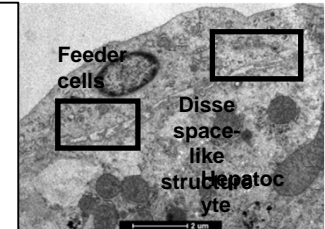
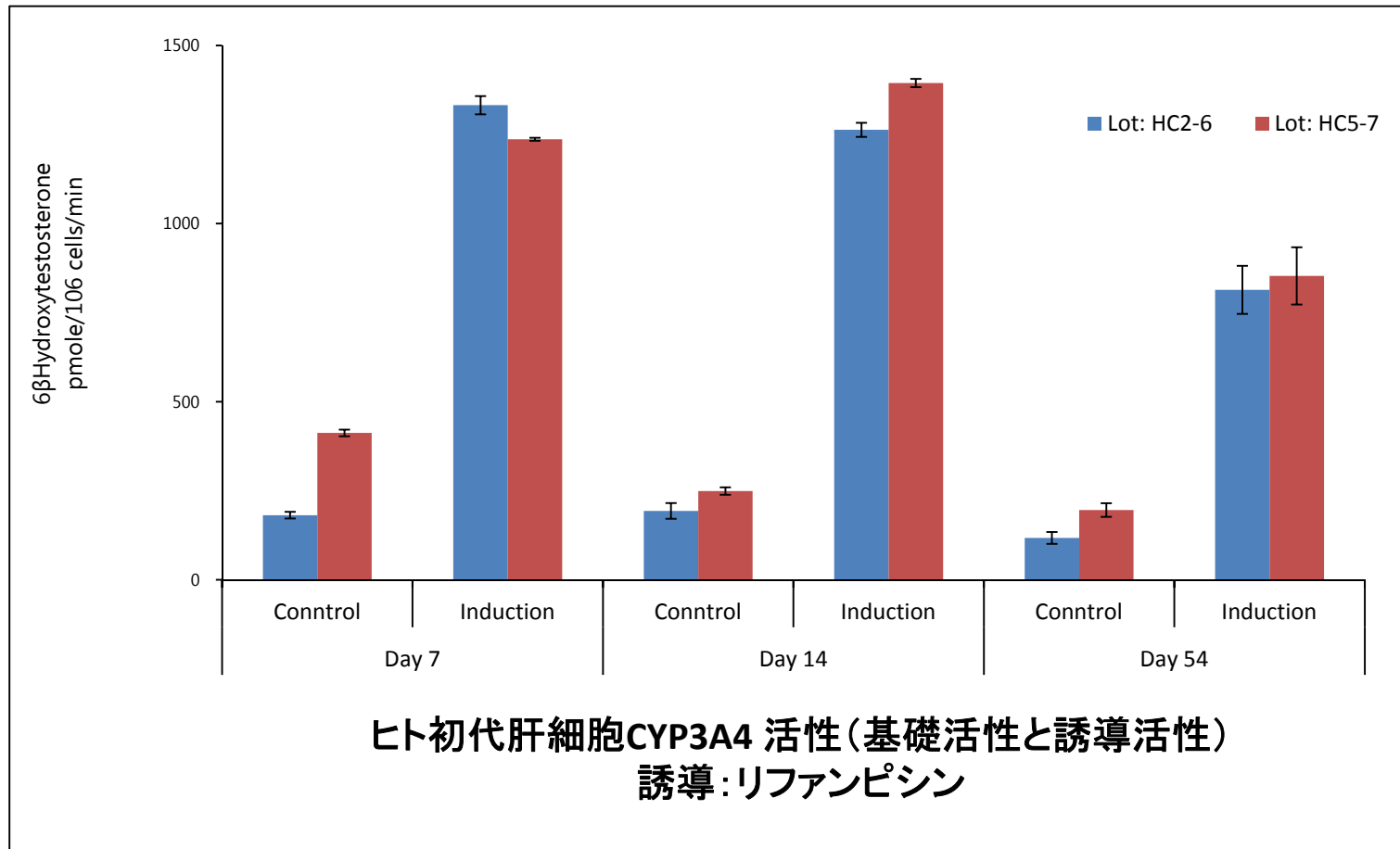
接着ロット



非接着ロット

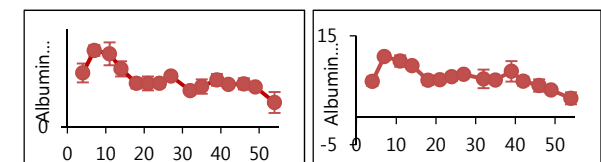


Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と 肝特異的機能維持



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

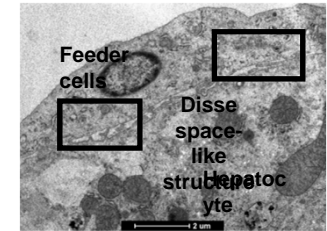
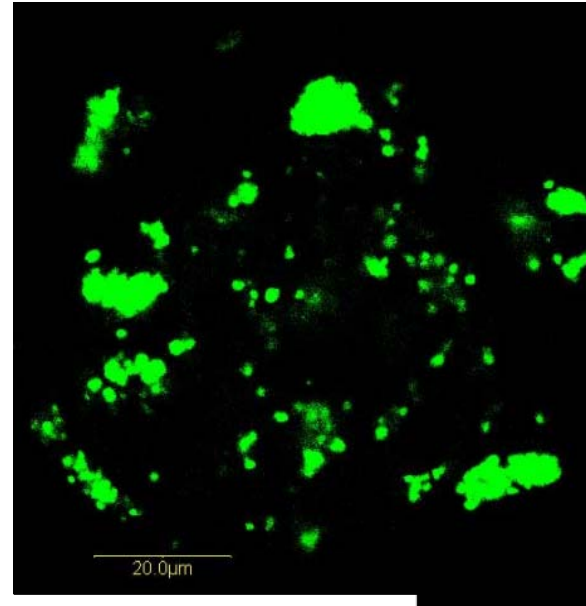


Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と 肝特異的機能維持

排泄トランスポーター機能

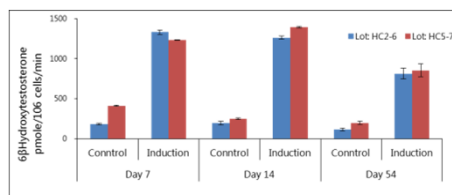
CDFDAは肝細胞に取り込まれた後、
蛍光物質であるCDFに加水分解され、
ABCCTランスポーターによって胆汁管
へ排泄される。図は、Cell-able®で培養
7日目のヒト初代肝細胞スフェロイドに
CDFDA添加10分後の共焦点レーザー
顕微鏡写真。

CDFDA; Carboxydichlorofluorescein diacetate
CDF; Carboxydichlorofluorescein

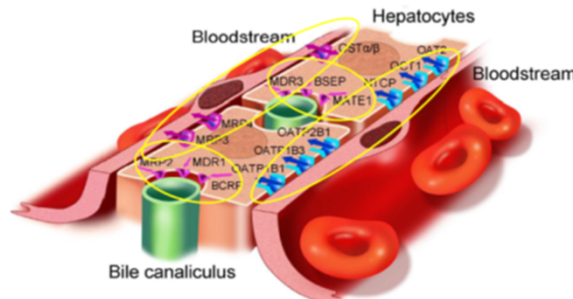


ラット初代肝細胞スフェロイド断面
TEM写真

CYP3A4 活性 (基礎活性と誘導活性)



Hepatic Physiology and Transport Systems

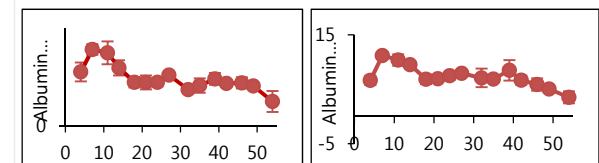


Klick and Browner (2012) CPT

Institute for Drug Safety Sciences

5

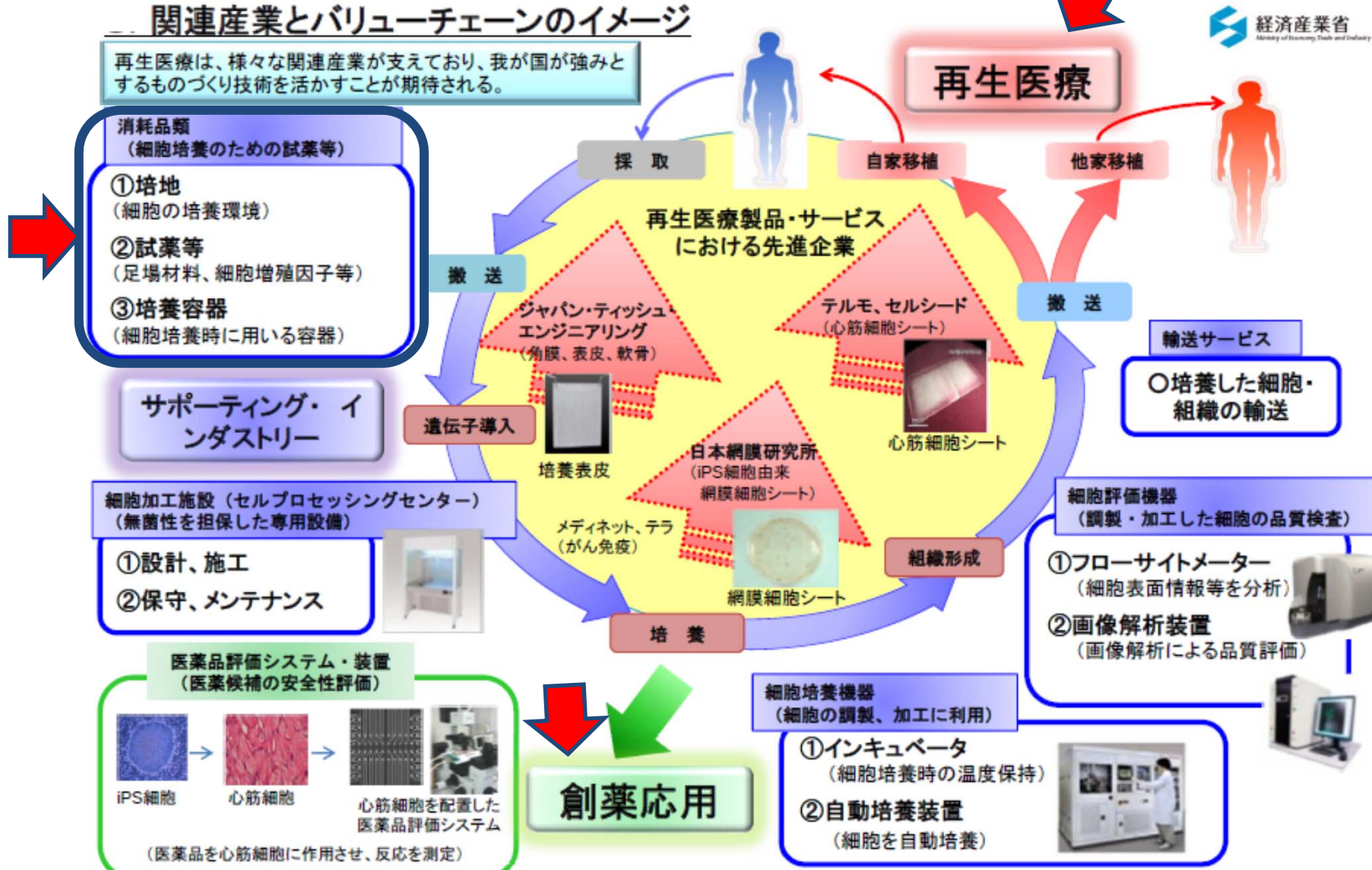
アルブミン産生能経時変化



Cell-able®の適用市場(創薬応用と再生医療) ベースは細胞培養技術

再生医療の

関連産業とバリューチェーンのイメージ

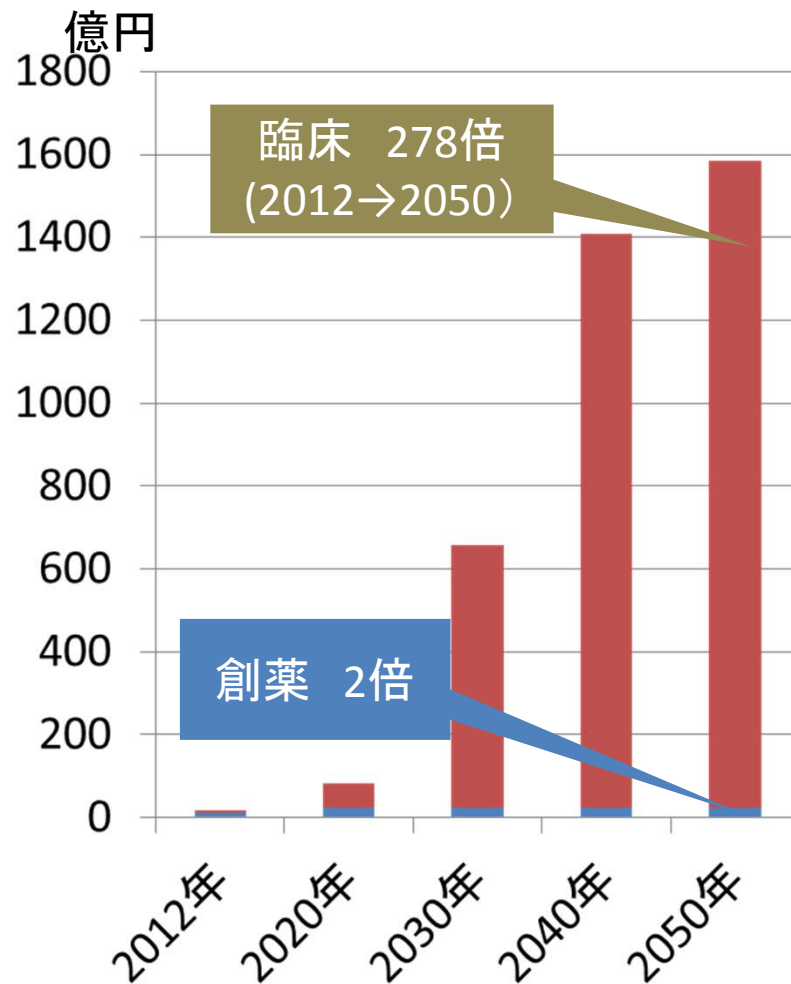


Cell-able®の適用市場(創薬応用と再生医療)

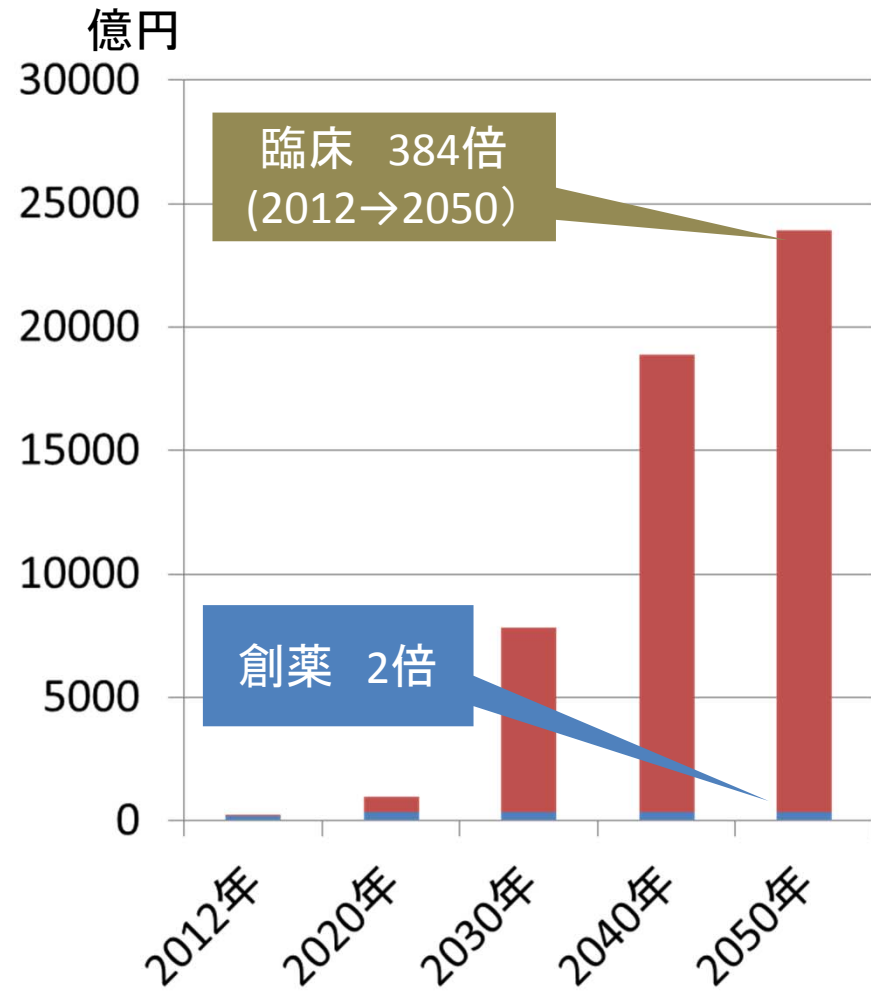
培養容器：再生医療の臨床用途で大きな伸びを予測

4

日本国内市場



世界市場



肝細胞の三次元培養

- 薬物動態、薬物代謝 (脂肪酸、脂質、胆汁酸、他)
- 肝毒性 (逸脱酵素、アルブミン産生能、トランスポーター阻害、核、ミトコンドリア、細胞内グルタチオン、活性酸素、油滴)
- 肝炎 (HBV)

がん細胞の三次元培養

- がん細胞株 (Eurofins Panlab 144種)
- 初代がん細胞 (Molecular Response 11種)
- 白血球細胞

幹細胞、iPS細胞の三次元培養

- iPS心筋細胞, iPS肝細胞
- 間葉系幹細胞

3次元培養細胞のon Plateでの輸送・運搬 (肝毒性試験で実施)

6

フィーダー細胞の播種
PXB-cellsの播種



フェニックスバイオ
広島県 



薬物暴露
培養



東洋合成工業
千葉県 



マーカー染色
画像取得
解析



モレキュラーデバイスジャパン
東京都 

1. モジュール充填培養(中空糸)
2. マイクロパターンニング培養(足場を用いた培養法)
3. 不織布培養
4. 浮遊三次元培養
5. 細胞積層培養
6. コラーゲン微小空洞培養
7. 灌流三次元培養
8. 酸素透過型培養
9. ガス透過性培養バッグを用いた三次元スフェア培養
(大量培養)

Cell-able[®]の特徴：マイクロパターン三次元培養(比較)

8

	Cell-able [®] Toyogosei	NanoCulturePlate Scivax	ナノピラープレート Hitachi	Elplasia Kurarey
Well数	6well-384well	24-384well	24,96well	24-384well
播種細胞数(96well) (経済性)	20,000~ (◎)	不明	不明	75,000
単培養	○	○	○	○
共培養	○	N/A	N/A	N/A
スフェロイド均一性	○	×	○	○
サイズコントロール	○	×	×	×
スフェロイド形成時間	48時間	不明	72時間	不明
長期培養	>54日間	>7日間	>20日間	不明
洗浄操作	易	難	可能と想定される	難
ボトムからの撮影	○	×	×	○
操作手技	簡単	N/A	N/A	前処理が必要

Cell-able®はがん細胞の三次元培養に適している(比較) 9

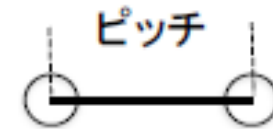
方法	特徴	欠点
Matrigel	ECMとの相互作用	ロット間差があり、再現性に問題、HTSに不向き、スフェロイドサイズコントロールができない
Hanging drop	スフェロイドサイズが均一、細胞は完全に非接着	操作が煩雑、HTSに不向き、ECMとの相互作用なし
Low bind plate	操作が簡単、HTSに適応	多くの細胞が接着、サイズコントロールができない、ECMとの相互作用なし
Scivax lithography plate	操作が簡単、HTSに適応	サイズコントロールが不十分、細胞とプレートが固有の結合
Elplasia plate	操作が簡単、HTSに適応、スフェロイドサイズが均一、200 μ m四方以上には広がらない	ECMとの相互作用なし、コーティングしなければ、弱いプレートとの結合

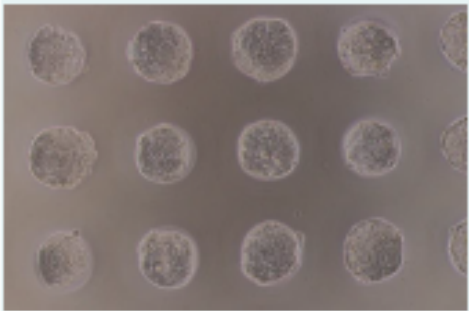
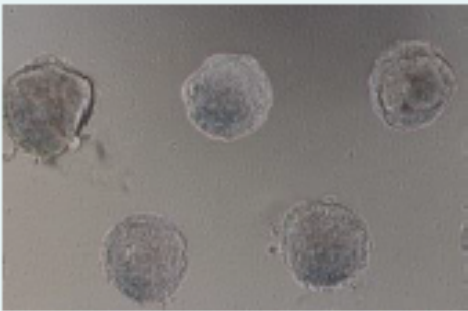
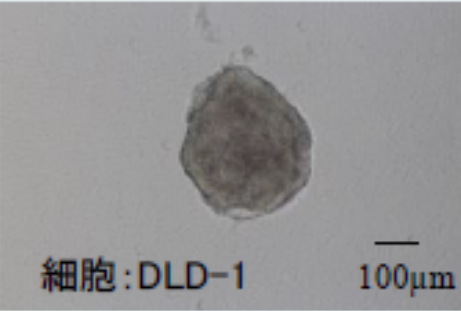
www.Numira.com

Cell-ableの特徴

1. 操作が簡単(自動化が可能)
2. HTSに適応(384-well plateが使える)
3. スフェロイドサイズが均一(薬物感受性試験で信頼性の高いIC50値の決定)
4. 間質細胞との共培養
5. HSCに適応:細胞が一部プレートのECMと接着しているため免疫染色が容易

がん細胞のスフェロイドサイズコントロールができる¹⁰



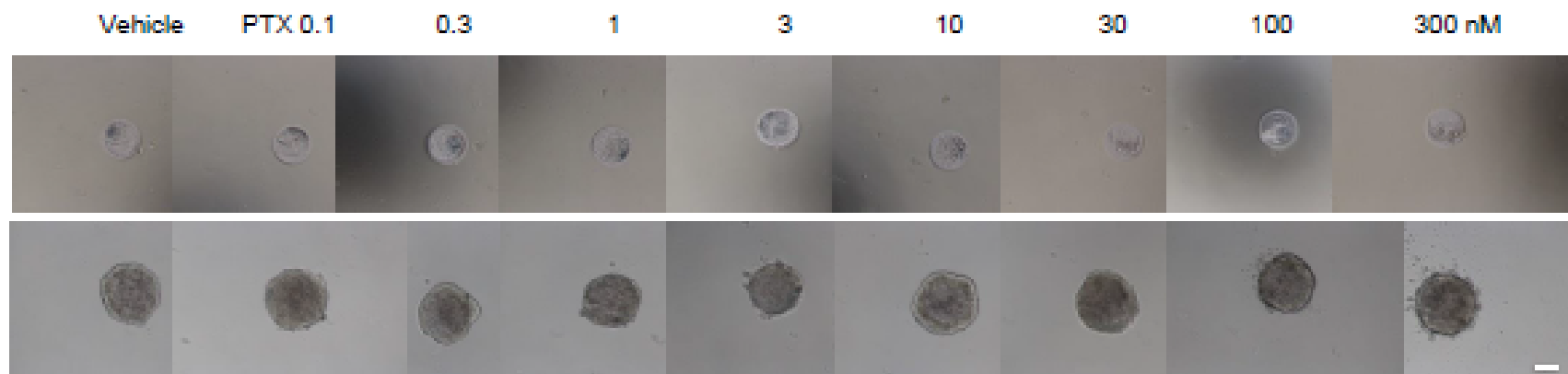
ピッチ (μm)	200	360	800
細胞 DLD-1			
スフェロイド*数 384プレート	200	60	13 (/well)
スフェロイド*サイ ス* (μm)	100	160	250

培養開始後5日のスフェロイドサイズ

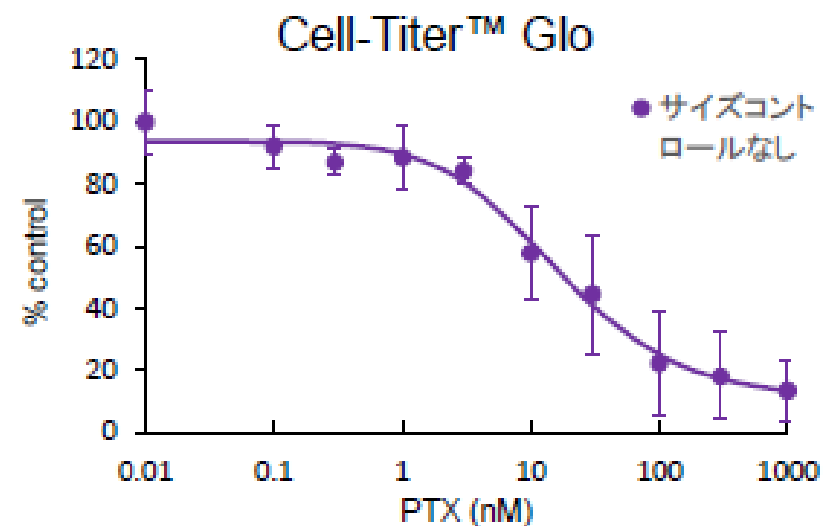
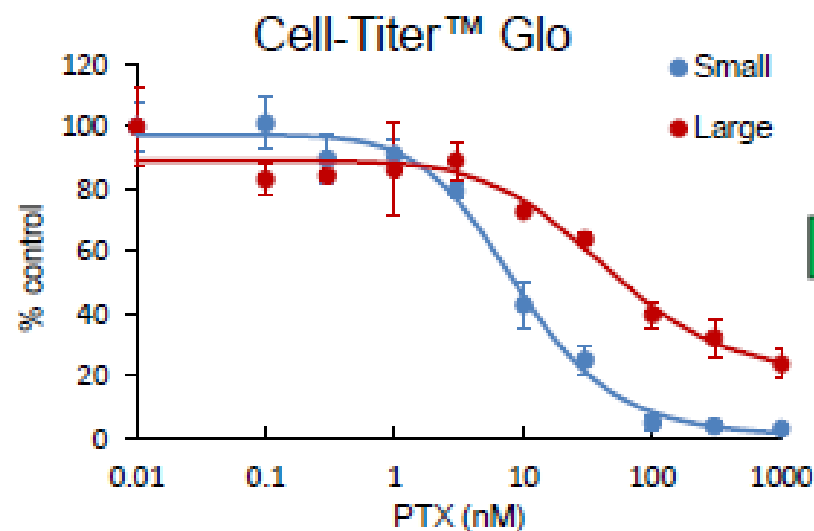
ピッチサイズを大きくすれば、大きなスフェロイドも作製可能

注)DLD-1 :ヒト結腸線がん(大腸がん)細胞

がん細胞スフェロイドをサイズコントロールする意義 11



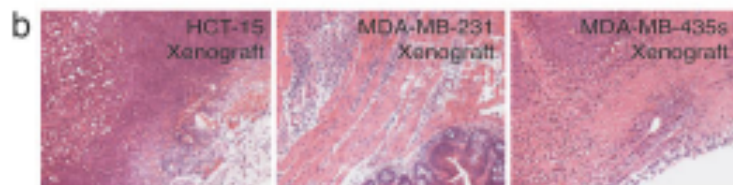
上段:小;下段:大スフェロイド



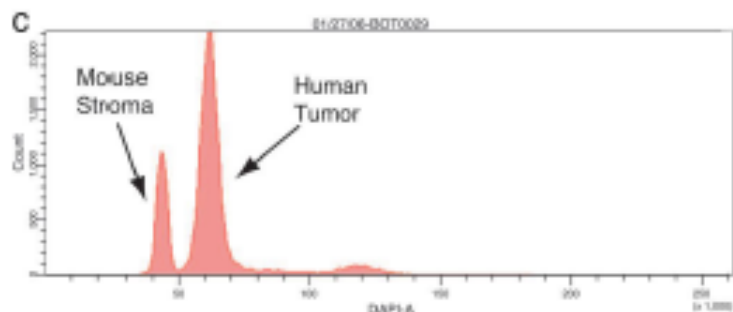
大きいスフェロイドはPTXに対してより抵抗性が高い
→スフェロイドサイズの均一化は感受性試験にとって重要な因子

注) PTX: 抗がん剤(パクリタキセル<タキソール>)

がん組織はがん細胞と間質系細胞が共存する

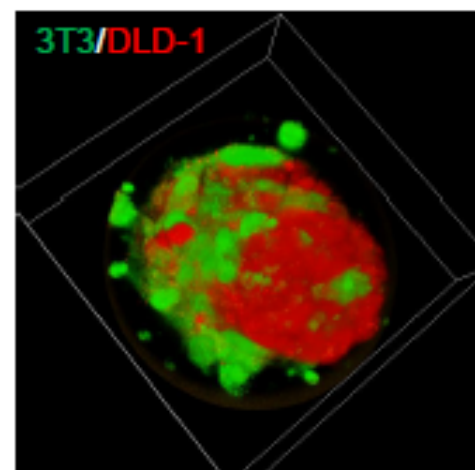


FACS of Nuclei from Xenograft Tumor



Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103:19848-53

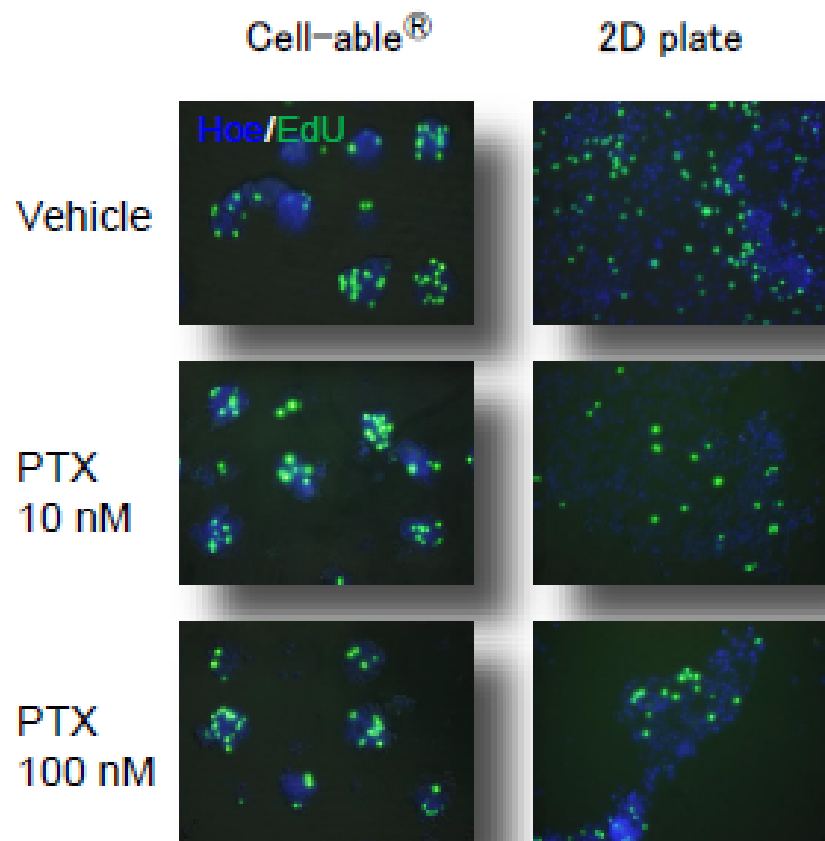
DLD-1/3T3細胞をCell-able上で共培養



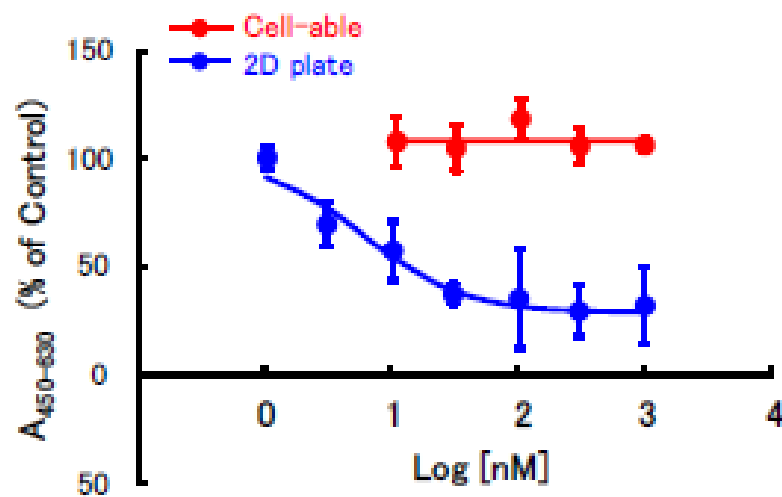
間質系細胞: 生体組織の支持構造を構成し、実質細胞を支える細胞

がん細胞を三次元培養する意義(薬剤の感受性) 13

二次元培養と比較: 患者由来子宮体がん細胞に対するPTXの抵抗性



患者由来子宮体がん細胞のEdU
取り込みに対するPTXの作用



患者由来子宮体がん細胞の増殖に対するPTXの作用

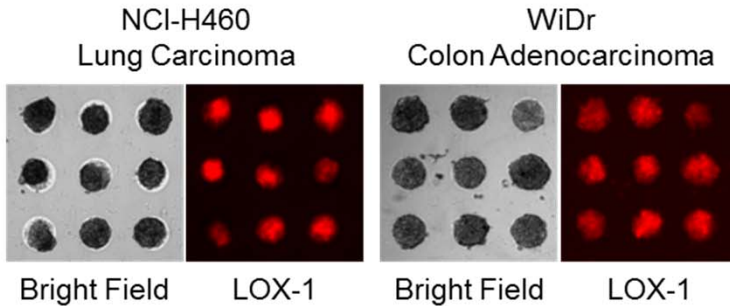
2Dプレートの単層細胞はPTXによりEdUの取り込みや増殖が抑制されたが、重層化した細胞やスフェロイドは抵抗性を示した

EdU:5-エチニル-2'-デオキシウリジン,DNA合成の際にDNAに取り込まれる

Cell-able®によるがん細胞の三次元培養

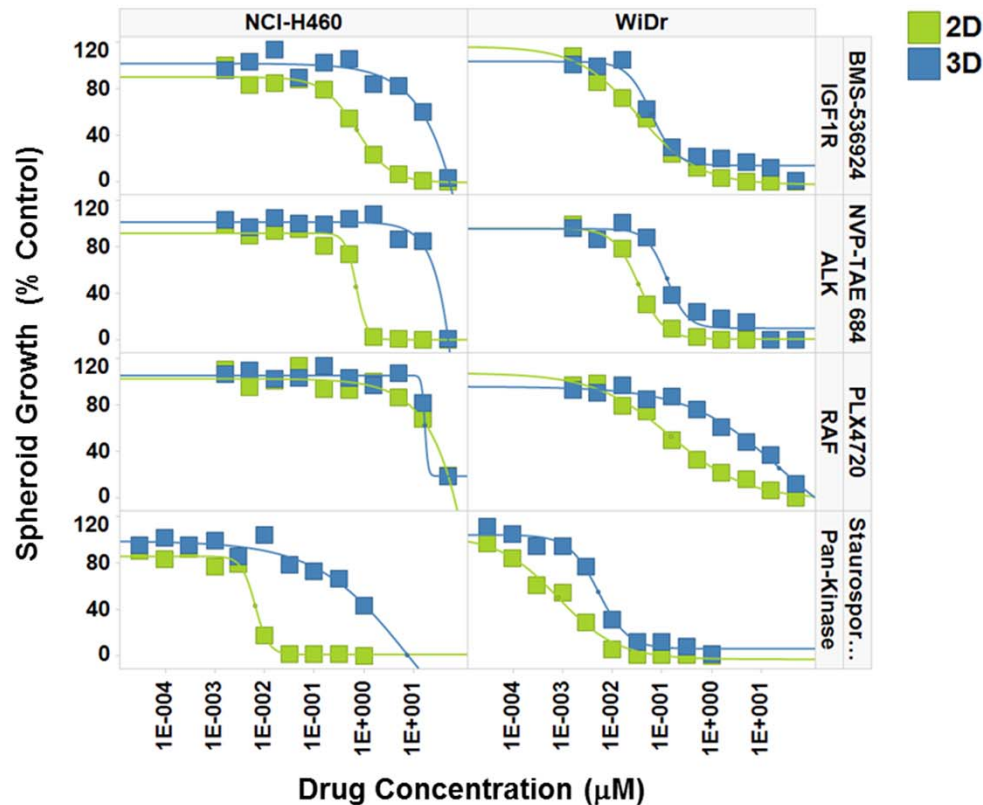
1. Cell-able®プレート上で約75%のがん細胞はスフェロイドを形成した。
2. Cell-able®プレートはスフェロイドサイズをコントロールすることができ、HTSによる薬剤感受性試験に適する。
3. Cell-able®プレート上のスフェロイドはECMを介してウェルの底に接着しているため免疫染色することが容易でイメージングに適している。
4. In vivoのがん組織で認められる繊維芽細胞との共培養にも適している。
5. 二次元培養と比較すると、スフェロイドはがん幹細胞マーカーの発現が高く、それらの細胞は化学療法薬に対して抵抗性を示した。
6. 創薬において、Cell-able®はがん幹細胞を標的にした抗がん薬のバイオマーカー探索に寄与できると考えられる。

Drug Response Comparisons: 2D vs. 3D



240種の2Dアッセイパネル
144種の3Dアッセイパネル

→ **2D,3Dともがん種を増加する計画**



(Top) Representative bright field and LOX-1 fluorescent images of WiDr and NCI-H460 demonstrating that the majority of cells exist in spheroids.

(Bottom) Dose response curves for four inhibitors with distinct mechanisms of action generated after 7 days of treatment either in 2D or 3D cell culture. Note, the difference between these two culture conditions is more pronounced, in general, for NCI-H460 than for WiDr with some, but not all, inhibitors.