

## ■ 考察

3D培養で、スキャナを用いて計測されたスフェロイド面積は、少なくとも培養初期においては、ATP量と良く相関をした。それに加えて、2次スクリーニングでの化合物によるスフェロイド面積の減少は、ATP量の減少と良い相関性を示した。これらの結果により、ATP定量アッセイの代替として、スフェロイド面積計測をスフェロイド増殖の指標として用いることが可能であることがわかった。

化合物最高濃度を終濃度1000 nMとした、比較的低濃度での

スクリーニングであったが、1次スクリーニングでは、HEK293T細胞の3D培養で、スフェロイド面積を減少させた39化合物を同定できた。これらの化合物の中で、mTOR 阻害剤、PDGFR 阻害剤、Hsp90 阻害剤などのがん分子標的薬が、HEK293T細胞選択的な阻害作用を示すことが明らかとなった。このように、3Dスフェロイド培養を利用したスクリーニングや活性評価により、生体内でがん細胞の増殖を阻害する化合物の効率的な同定が可能になると考えられる。

## ■ 結論

●高速細胞スキャナ(Cell<sup>3</sup>iMager)による、抗がん剤の迅速かつ簡便、検査試薬不使用の安価なハイスループットスクリーニング法を開発した。本方法は、がん細胞の3Dスフェロイドサイズの計測値を指標とするものである。

●本スクリーニング法の有用性、実践性を検証するために、文部科学省・化学療法基盤支援班提供の標準阻害剤キット1~4(360種の既存抗がん剤や各種阻害剤より構成)を用いて、HEK293T細胞選択的にスフェロイドの増殖を抑制する化合物をスクリーニングした。その結果、mTOR 阻害剤などのがん分子標的薬が選択的なスフェロイド増殖阻害作用を示すことが明らかとなった。

資料提供:長浜バイオ大学 水上研究室

株式会社 SCREENホールディングス  
事業開発室

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る4丁目天神北町1-1  
Tel:075-414-7073 Fax:075-414-7213  
東京 / 〒102-0074 東京都千代田区九段南2丁目3-14(靖国九段南ビル7階)  
Tel:03-3237-3950 Fax:03-3237-3938

www.screen.co.jp

[お問合せ先] Cell3iMager@emis.screen.co.jp

BSD-001 R2(J) 2014年10月発行 030BB

## SCREEN

## 高速3D細胞スキャナ アプリケーションノート

「高速細胞スキャナを用いたスフェロイド培養による  
抗がん剤スクリーニング法の開発」

**Cell<sup>3</sup>iMager**

試薬レスでの経過観察や形態観察が可能で、  
3D細胞培養でのラベルフリーアッセイに最適な  
明視野スフェロイドカウンター

長浜バイオ大学 水上研究室 Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

東郷 有希 Yuki Togo      王 偉祥 Weixiang Wang      松崎 大恭 Daisuke Matsuzaki      佐々木 隆造 Ryuzo Sasaki  
細井 美穂 Miho Hosoi      小林 宏彰 Hiroaki Kobayashi      長谷川 慎 Makoto Hasegawa      水上 民夫 Tamio Mizukami

〈協賛〉

株式会社SCREENホールディングス SCREEN HOLDINGS, CO., LTD.

資料作成:2014年3月



■ 研究の目的

近年、がんの創薬研究において、スフェロイド培養などの3次元(3D)細胞培養による研究がより重要視されるようになってきた。3D細胞培養は既存の2次元(2D)細胞培養に比べて実際の生体環境に近く、3D細胞培養系の利用により、迅速かつin vivoを反映した抗がん剤のスクリーニング・薬効評価が可能になると期待される。既存の薬剤感受性試験の多くは検査試薬を加えて培養を中断し生細胞数を定量するため、試験に手間を要する上、同一細胞での経過観察を行うことができないという課題を抱えている。これらの課題を解決し得る手段として、2013年、大日本スクリーン製造株式会社(現株式会社SCREENホールディングス)より高速3D細胞スキャナ「Cell*i*Mager」が発売された。本装置は画像処理技術を用いて、3D細胞培養プレートで培養されたがん細胞の増殖や形態の経時変化を検査試薬不使用で高速に計測・分析することができる。

本研究では、Cell*i*Magerによる、がん細胞の3Dスフェロイドサイズの計測値を指標として、抗がん剤の迅速かつ簡便、検査試薬不使用の安価なハイスループットスクリーニング法の開発を試みた。

■ 材料

●細胞株

HEK293 細胞と同細胞をSV40 Large T抗原の発現により形質転換したHEK293T 細胞を、細胞低吸着性プレート上で培養したところ、HEK293T 細胞がより大きなスフェロイドを形成した。本研究においては、HEK293 細胞を低悪性度のがん細胞、HEK293T 細胞を高悪性度のがん細胞として用いた。

●化合物ライブラリ

文部科学省科学研究費補助金・がんの特性等を踏まえた総合支援活動・化学療法基盤支援活動より提供された標準阻害剤キット1~4を使用した。本キットは360種の既存抗がん剤や各種阻害剤より構成されている。本支援活動に感謝する。

●高速3D細胞スキャナ「Cell*i*Mager」

ウェルプレートを検査試薬不使用、明視野でスキャン計測するシステム。ウェルプレート内のスフェロイドの個数、面積、およびスフェロイドの濃淡から疑似体積を計測する。1画素: 10 μm, 5 μm, 2.5 μmが選択可能。計測レシピができていない場合、1プレートを約1分でスキャン可能。その後約0.5分で自動計測が可能。

【製品情報】

[http://www.screen.co.jp/pd/products/3d/cell3\\_imager/](http://www.screen.co.jp/pd/products/3d/cell3_imager/)

■ 方法

●スフェロイドの培養、増殖の測定

HEK293、HEK293T 細胞を500 cells / wellになるように、ウェル底形状がU底型の96 well 細胞低吸着プレート PrimeSurface® 96U プレート(住友ベークライト株式会社;品番MS-9096U)に播種し、シングルスフェロイドの培養を行った。播種後2日目から11日目まで、スキャナによるスフェロイド面積計測と、生細胞数測定試薬(CellTiter-Glo®, Promega)によるATP定量アッセイにより、スフェロイド内の生細胞量を測定した。以下、すべての実験をN=3で行った。

●1次スクリーニング

播種後1日目にスキャナを用いてスフェロイド面積の測定を行い、この時の値を薬剤添加後0時間の値とした。標準阻害剤キットの化合物を、終濃度10 nM、100 nM、1000 nMとなるように添加した。DMSO はコントロールとして添加している。化合物添加後48時間でスフェロイドの面積計測を行い、各化合物の50%阻害濃度(IC50)を算出した。HEK293T に対して、選択的にスフェロイドの面積を減少させた化合物を選び、2次スクリーニングを行った。

●2次スクリーニング

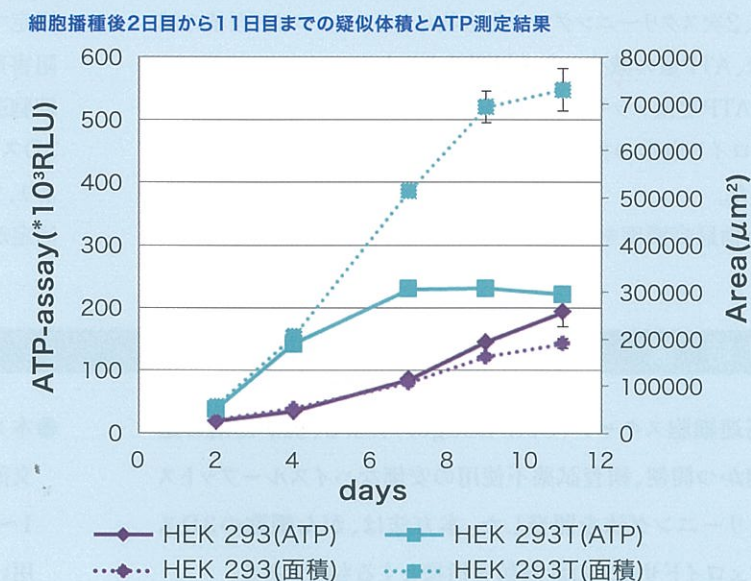
化合物を終濃度0.610 nM、2.44 nM、9.77 nM、39.1 nM、156 nM、625 nM、2500 nM、10000 nMで添加した。化合物添加48時間後に、Cell*i*Magerで面積測定を行い、またCellTiter-Glo®によるATP定量アッセイを行った。これらの測定結果から、各化合物のIC50を算出した。

■ 結果

●スキャナによるスフェロイドサイズ計測値とATPアッセイ値はよく相関する

図1に、細胞播種2日から11日目までのスフェロイド面積とATPアッセイの測定結果を示した。少なくとも細胞播種後4日目まではATPアッセイ結果と良い相関が得られることが確認された。この結果を受けて、後のスフェロイド増殖阻害作用を有する抗がん剤のスクリーニングでは、細胞播種の1日後に抗がん剤を添加、さらにその48時間後にスフェロイドの面積を計測した。図2には、図1の各計測時点でのスフェロイドのスキャナ画像を示した。

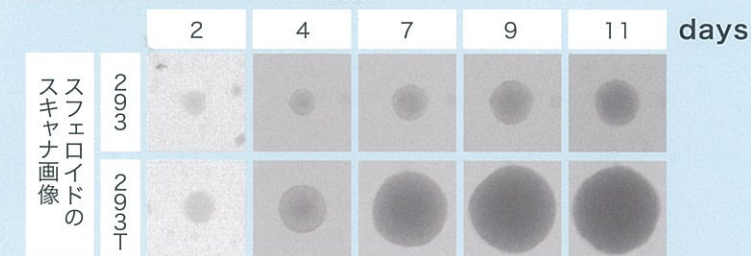
【図1】スキャナによるスフェロイド面積とATPアッセイの測定結果



●1次スクリーニング

3D培養したHEK293T 細胞のスフェロイド面積の減少を指標とする1次スクリーニングで、39化合物が1000 nM以下のIC50でスフェロイドの増殖阻害活性を示した。これらの化合物の中で、HEK293 細胞の増殖を阻害せず、HEK293T 細胞に対して選択的に阻害活性を示した化合物を2次スクリーニングの対象とした。

【図2】スフェロイドのスキャナ画像



●2次スクリーニング

2次スクリーニングにおいて、スフェロイド面積に基づくIC50とATP量に基づくIC50は概ね相関した。mTOR 阻害剤、PDGFR 阻害剤、Hsp90 阻害剤等がHEK293T 細胞選択的なスフェロイドの増殖阻害活性を示した。

【表1】HEK293T 細胞のスフェロイド増殖を選択的に阻害した化合物: IC50 (nM)

| 阻害剤名                                       | 標的           | 3D Spheroid area |      | 3D ATP assay |      |
|--|--------------|------------------|------|--------------|------|
|  |              | 293              | 293T | 293          | 293T |
| Temsirolimus                               | mTOR         | 1309             | 16   | 6667         | 149  |
| PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV | PDGFR        | 1792             | 57   | 3774         | 53   |
| 17-AAG                                     | HSP90        | 5020             | 778  | 7299         | 856  |
| Monensin                                   | Na ionophore | 847              | 54   | 440          | 103  |