

in vitro ? in vivo ? それともプロメガの発光 3D アッセイ?

in vitro と *in vivo* の中間を担うと目されている 3 次元培養を行うための機材・手法・プレートが続々と開発されています。昨今では 1536well での 3 次元培養サンプル (3D サンプル) のスクリーニングモデルも報告されるようになり、3D サンプルを扱う方法も身近なものになってきました。しかし、様々な 3D サンプルの作製法が確立される一方で、その評価方法に関しては十分に浸透していません。そこで、このセッションでは発光法で測定できる細胞アッセイの一例を紹介します。

3D での細胞生存試験の王道・ATP 測定アッセイ

3D サンプルでは細胞塊の中心まで試薬が浸透し、しっかりと検出できているか、という疑問が常につきまといます。そこでプロメガでは酸により 3D サンプルから直接抽出した ATP との比較を行い、どれくらいの抽出効率なのかを検討しました。図 1 にその結果を示しています。

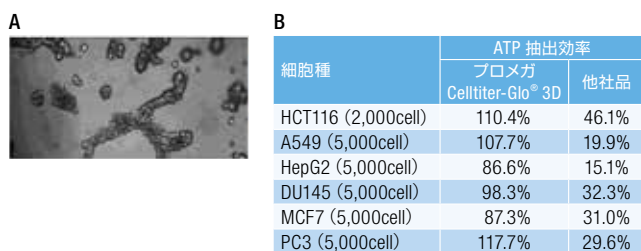


図 1. マトリゲル上で培養した 3D サンプルにおける ATP 抽出効率の比較
Matrigel® (Corning) をコートした well に種々の細胞種を播種し、4 日間培養した。
A. 4 日間培養後の A549 細胞の顕微鏡下写真。細胞が凝集し塊を形成している。
B. 種々の細胞種を表に記載の細胞数で播種した。トリクロロ酢酸を用いて 3D サンプルから ATP を抽出した場合の値を 100 とし、CellTiter-Glo® 3D および他社品の ATP 抽出効率を相対的に示した。

プロメガの 3 次元用 ATP 測定試薬はほぼ 100% の抽出効率であることから、3D サンプルにおける細胞の生存性の指標として十分に利用できることを示唆しています。

(この他に、DNA 染色による細胞膜透過性の確認実験も行っています。テクニカルのひとつコラム 2016 年 1 月号 ; www.promega.co.jp/pdf/tech1601.pdf をご覧ください)

一方で 3D サンプルでの生細胞の評価方法の 1 つに、サンプルのサイズや体積を評価する方法があります。実際のサンプルを観察した評価方法になりますが、スループットの問題や特殊な機器が必要になる事、3D サンプル内部の状態を反映していないという懸念があります。これに対して、ATP 量が 3D サンプルのサイズ・体積と良く相関するとの報告が複数あり、現在では ATP 測定アッセイが 3D サンプルでの生細胞の評価の王道となっています。

細胞内グルタチオン・アポトーシスの測定

生体内の還元物質であるグルタチオンは活性酸素種 (ROS) や異物の除去に関わる重要な分子です。一方で、酸化ストレスなどが起因となることで細胞はアポトーシスを引き起こす事が知られています。図 2 には 3D サンプルでの細胞内グルタチオンとカスパーゼ 3/7 の活性測定の例を示しました。3D サンプルにおいても、2D サンプルと同じように測定することが可能です。

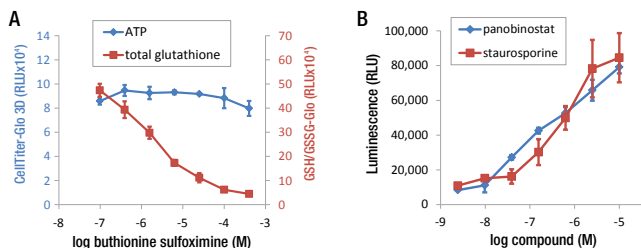


図 2. 細胞内トータルグルタチオンとカスパーゼ活性の測定

HCT116 細胞を GravityPLUS™ 96-well hanging-drop platform (InSphero) に播種し、4 日間培養し spheroid を形成させた。

A. GSH 合成阻害剤 BSO (buthionine-sulfoximine) を種々の濃度で添加し、48 時間処理した。GSH/GSSG-Glo™ アッセイで細胞内トータルグルタチオン量を測定し、CellTiter-Glo® 3D にて ATP 量を測定した。BSO 濃度に依存して細胞内トータルグルタチオンの減少が観察された。

B. 種々の濃度の panobinostat と staurosporine を添加し、24 時間処理後 Caspase-Glo® 3/7 アッセイを行った。化合物濃度に依存して、カスパーゼ 3/7 の活性が観察された。

シトクロム P450 3A4 の測定

2D サンプルと異なり、3D サンプルでは細胞が有する本来の機能や分化能をより良く評価できる点もメリットの 1 つです。その 1 例として肝

毒性の評価法が挙げられます。創薬において肝毒性 (薬物誘発性肝障害) は医薬品の開発中止理由の約 20% を占めています。株化細胞を用いた評価系では本来の機能・活性が低い、初代培養細胞では安定供給の面でデメリットがあります。肝毒性を早期に評価できる系が求められており、3 次元培養法が長期培養可能でかつ *in vivo* に近い評価モデルとして注目されています。

図 3 にはヒト liver microtissue を用いて主要な代謝酵素の 1 つである CYP3A4 の活性を評価したアプリケーションを示しました。また、ここでは培地をサンプルとして CYP3A4 の活性を評価し、ATP を指標として生細胞の測定を行っています。

(CYP3A4 の評価系に関しては ADME/Tox プロダクトガイドをご覧ください : promega.co.jp/pdf/adme_tox.pdf)

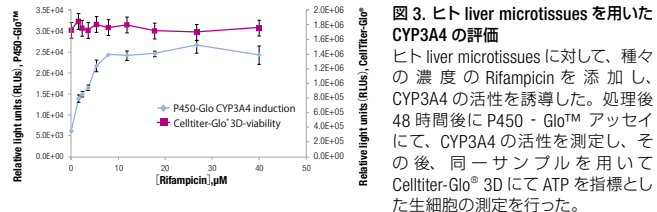


図 3. ヒト liver microtissues を用いた CYP3A4 の評価
ヒト liver microtissues に対して、種々の濃度の Rifampicin を添加し、CYP3A4 の活性を誘導した。処理後 48 時間後に P450-Glo™ アッセイにて、CYP3A4 の活性を測定し、その後、同一サンプルを用いて CellTiter-Glo® 3D にて ATP を指標とした生細胞の測定を行った。

最後に

今回紹介したマーカー以外にも、プロメガの発光技術は 3D サンプルの死細胞マーカー (LDH) や NAD(P)/NAD(P)H、ROS (H₂O₂)、もちろんレポーターアッセイにも対応しています。さらにオートファジーも。図 4 には現在カスタムとしてご提供している、発光法での漏出 LDH の活性測定例を示しました。

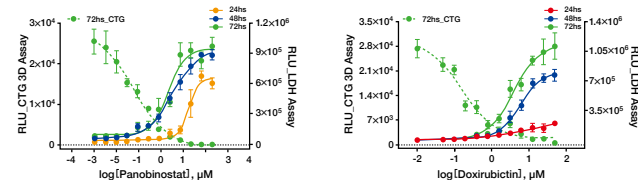


図 4. 3D サンプルにおける細胞毒性と細胞生存性のマルチアッセイ

HCT116 細胞を 2,500 cells/well にて 384 Ultra-Low Attachment plates (Corning) に播種した。種々の濃度の Panobinostat および Doxorubicin を添加し、化合物添加後 24, 48, 72 時間の培地サンプルを採取し、死細胞マーカーの漏出 LDH 量を発光法で測定した。72 時間の培地サンプルの採取後に残った細胞に対して、CellTiter-Glo® 3D アッセイを実施し、細胞内 ATP から生細胞を評価した。

発光 LDH アッセイや CYP3A4 アッセイの他、エネルギー代謝関連マーカー (Glucose, Lactate, Glutamine, Glutamate) アッセイ等、培地をサンプルとすることで、同一のサンプルにおいて複数のアッセイを実施できることもプロメガの技術の特長です。

今回紹介した以外のアプリケーションも公開していますので、上記のキーワードを是非検索してください!

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay	10 ml	G9681	16,500
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10 ml	V6611	92,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5 ml	G8090	22,000
P450-Glo CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001	24,000
Lactate-Glo™ Assay	5 ml	J5021	74,000
Glucose-Glo™ Assay	5 ml	J6021	67,000
Glutamate-Glo™ Assay	5 ml	J7021	74,000
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5 ml	J8021	80,000
Luminescent LDH Cytotoxicity Assay	-	カスタム品	37,000

*カタログ番号で " カスタム品 " となっている製品のご注文については promega.formstack.com/forms/casorder よりお申込みください (プロメガクラブへの入会が必要です)。