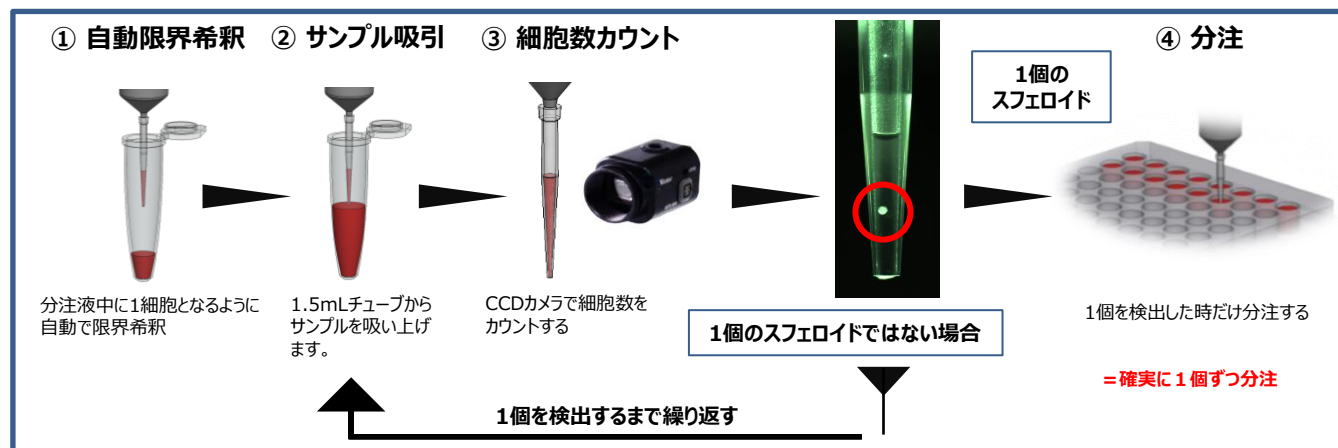


癌幹細胞(CSC)における3Dスフェロイドアッセイ

Collaborator: Mr. Steve McClellan, Mitchell Cancer Institute, University of South Alabama

Introduction

癌幹細胞 (CSC) を用いたハイスループット・スクリーニングの報告は少なく、CSCを用いたHTSを実証した文献のほとんどは、3Dではなく単層培養で行われています。CSCは培養で拡大することができ、非付着性のディッシュでスフェロイドとして成長します。これらCSCの腫瘍スフェロイドは、作製されるサイズが大きくばらつくため、3D HTSスクリーニングの材料としては不向きです。私たちは、薬剤スクリーニングのために均一なCSCスフィアを分注した96または384ウェルプレートを作製するためのワークフローを開発しました。オンチップ・バイオテクノロジー社のOn-chip® SPiS (Single Particle Isolation System) は、単一の細胞やスフェロイドをマルチウェルプレートに分注できる世界初の自動分注装置になります。これまでは、手動でピペティングしてプレートにスフェロイドを分注したり、各ウェルに単一のスフェロイドを形成するために高価な専用プレートを使用したりしなければならなかった作業を装置でおこなえます。



Methods

CSCスフェロイドは、細胞を弾くコーティングを施した組織培養皿で、単一の細胞から培養させます。CSCの成長をサポートするために、epidermal growth factorとbasic fibroblast growth factor (20mg/ml) を含む培地を毎日置換します。非幹細胞は、この最小培地では生存できず、ディッシュ表面に付着することなく急速に死滅する。単一のCSCは、数週間で球状に成長し、培養を維持・継代することができる。大量のCSCスフィアは、トリプシン処理を用いて細胞をバラバラにして、洗浄、セルカウントされ、AggreWell24ウェルプレートに1ウェルあたり 3×10^5 個細胞でプレーティングします。Stemcell Technologies社のこのシステムでは、直径150 μm の非常に均一な球体を生成することができます。SPiSは、単一の球体を96ウェルプレートに約1時間で分注することができます。単一球体のプレートを使用して薬剤化合物を試験をしました。球体の大きさは、Nexcelom Celigo S イメージングサイトメーターの明視野モードで測定しました。

Application Note

Results

単一スフェロイドを分注したプレートを使用して、薬剤化合物の希釈系列を作製して、成長阻害を測定しました。薬剤を入れてから3~5日間、Celigo Sを用いて毎日サイズを測定しました。スフェロイドはこの期間に成長を示し、薬剤による成長阻害を容易に測定することができます。図1は、Celigo Sによる代表的なデータを示しています。図2は、5日間の薬剤処理における効果量をスフェロイドサイズで示しています。

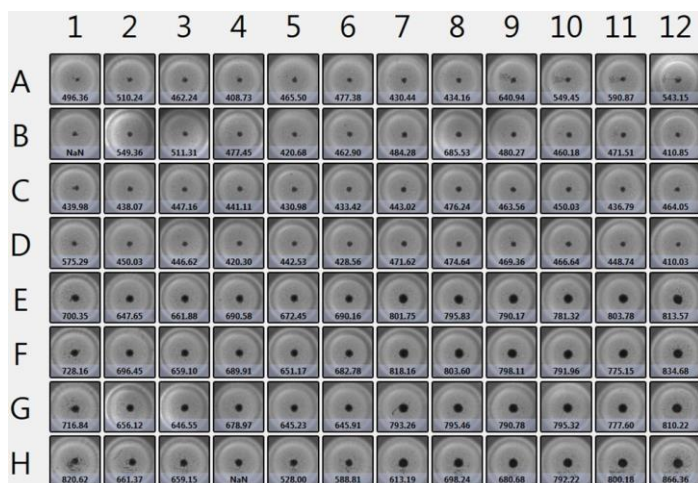


図1. Celigo Sを使用してCSCスフェロイドの観察

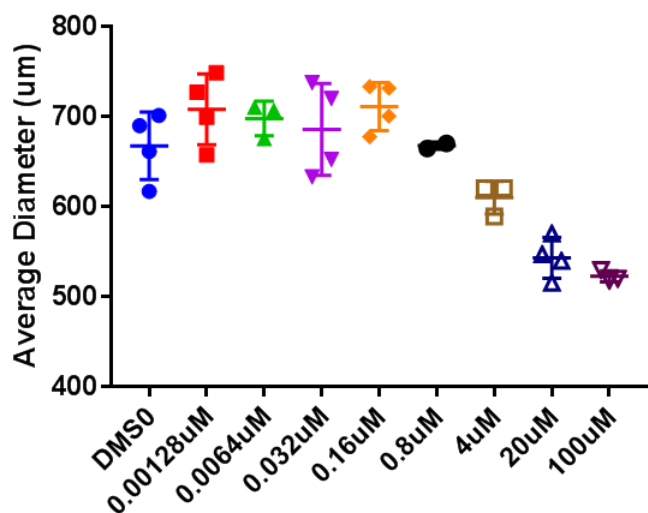


図2. 薬剤を入れてから5日後の薬剤評価。縦：スフェロイドサイズ、横：薬剤濃度

Conclusions

我々は、純粋なCSCスフェロイドを3Dドラッグスクリーニングに使用することができるワークフローを開発しました。通常CSCスフィアは均一に成長しませんが、AggreWellプレートを使用することでこの問題を解消しました。On-chip Biotechnologies社のOn-chip® SPiSは、マルチウェルプレートへのシングルスフィアのプレートティングという手間のかかる作業を自動化できるようになります。ヒトが手作業でスフェロイドを384ウェルプレートに分注するのは確実ではありません。このワークフローは、3D癌幹細胞モデルを用いたHTS創薬において、信頼性が高く、確実に安定した材料を提供することができます。