

シングルスフェロイドを使用した腫瘍モデルの開発

イントロダクション

これまでin vitroにおける腫瘍細胞評価系の主な手法は平面(2D)培養した細胞が単層状に増殖したものをを用いてきました。これらはin vivoにおける腫瘍関連プロファイルおよび形態とは異なっています。一方、スフェロイド(3D)培養はin vivoに近づくためには有用であり固形癌細胞モデルとの互換性も確認されています¹⁾。本内容はサイズを揃えたスフェロイドにおいて薬剤感受性を評価するための腫瘍モデルとしてOn-chip Sort、On-chip SPiSを使用して1wellに1スフェロイドの状態を作製しATP Assayで解析した結果を提示する。

(本内容はORGANOGENIX株式会社と共同でおこなったものである)

方法

準備: NanoCulture Plate MS pattern, low binding, 96 wells, NPC-LS96, ORGANOGENIX, Inc.)
 Infinite 200 PRO(Tecan), CellTiter-GloR Luminescent Cell Viability Assay (Promega)
 On-chip Sort(On-chip Biotechnologies), On-chip SPiS(On-chip Biotechnologies),
 SPiS用1000 μ lチップ ブルー(WATSON, Cat. 110-502B), SPiS用384分注ピペット(Biotec, Cat. BST5-384S)
 細胞 HT-29細胞株

方法:

- HT-29細胞株をNanoCulture Plateに撒いて3~4日培養した(~120 μ mのサイズでスフェロイドが形成される)。
- 顕微鏡でスフェロイドサイズと数の関係を把握する。
- スフェロイドを回収し、On-chip SortのFSCを使用して100 μ mと予測できる位置にゲートを設定し1800個程度ソーティングした。(FSCはスフェロイドの大きさに依存して値が大きくなる)
- 回収したスフェロイドを500 μ lに調整しOn-chip SPiSで1個分注設定で96穴プレートに撒いた。
- 薬剤MG132を0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ Mの濃度で加え、3日間培養した。
- Cell Titer GloRを使用しInfinite 200 PROでATP値を測定した。

結果

培養後バラつきのあるスフェロイドをOn-chip Sortを使用して約100 μ m前後で揃えた(図1)。30~190 μ mの範囲のバラつきをソーティングにより80~120 μ mの範囲にサイズを揃えた(図2)。On-chip SPiSを使用してサイズサイズを90~110 μ mに絞りシングルスフェロイドでプレートに撒いた3日後、薬剤MG132濃度に依存する細胞への効果を確認した(図3)。

図 1

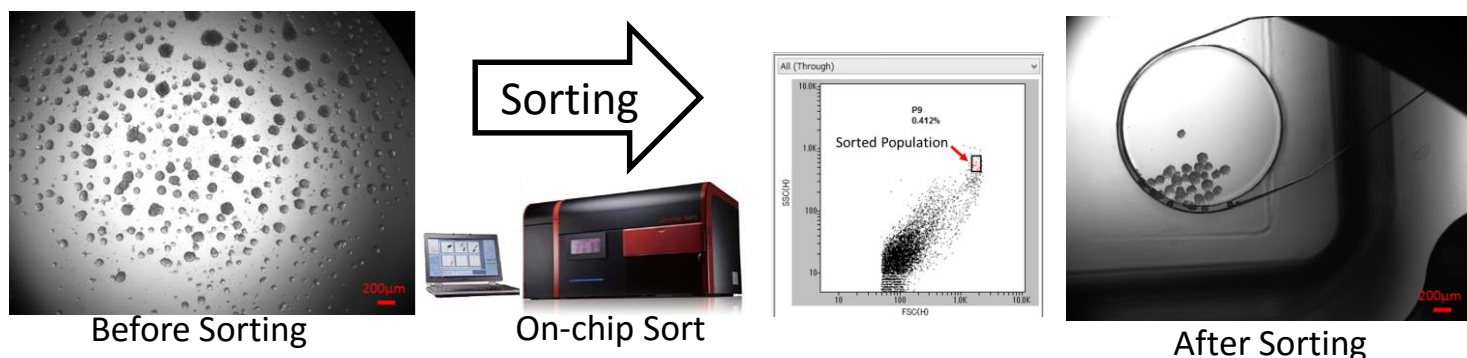
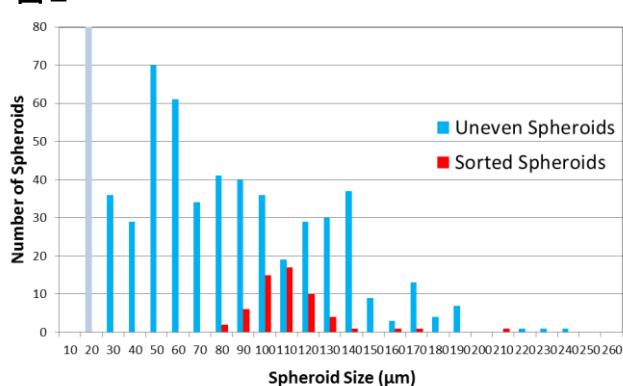


図 2

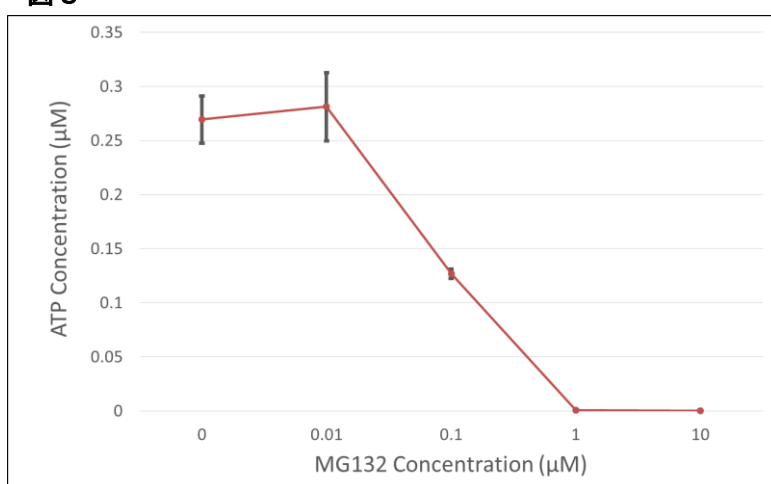


まとめ

On-chip Sortでスフェロイドサイズを限定し、
 On-chip SPiSで更にサイズを均一化して分注することで
 均一サイズのスフェロイドによる薬剤感受性評価が可能になることがわかった。

(協力: ORGANOGENIX株式会社)

図 3



1) Ivascu, A. and M. Kubbies, Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. Journal of Biomolecular Screening, 2006. 11(8): p. 922-932.