

アプリケーションノート #11

薬剤耐性モデルおよび耐性克服薬のスクリーニング

【概要】

崇城大学応用生命科学科提案の薬剤耐性を有するがんモデルの培養方法です。Cellbed にがん細胞を高密度播種して1週間の前培養を行うことで、生体内の腫瘍の微小環境(低酸素領域など)を再現し、がん治療の障害となっている薬剤耐性現象を *in vitro* で誘起します。スループット性に優れるため、抗がん剤や薬剤耐性克服薬のスクリーニング評価に適しています。

【用意するもの】

器具・機器・資材:

- Cellbed 96 ウェルプレート(品番 CB-96WT1)
- 吸収波長 450 nm における吸光度が測定できるプレートリーダー
- 測定用の透明 96 ウェルプレート

試薬:

- 抗がん剤単独の希釈系列
- 被検物質(薬剤耐性克服薬候補物質)を含む抗がん剤の希釈系列
- WST-8 試薬(同仁化学研究所 Cell Counting Kit-8)

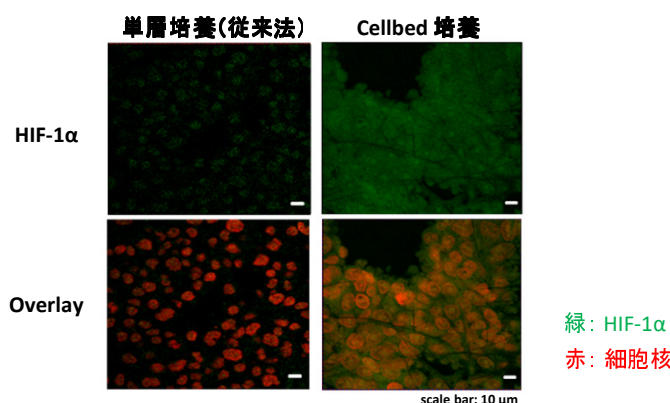
【方法】

- Cellbed 96 ウェルプレートに 50 μ L/well の培地を入れます。さらにその上から 1.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液 50 μ L/well (5.0×10^4 cells/well) を穏やかに播種します。その後、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で培養を開始します。培地交換は2日に1回の頻度で行います。
- 培養7日目に培地を除去し、抗がん剤単独および被検物質を含む希釈系列 100 μ L/well を48時間暴露します。
- 暴露48時間後にWST-8法による増殖・毒性アッセイを実施します。WST-8試薬と培地を9:1で混合した溶液を調製します。これを上清を除いたウェルに200 μ L/well 添加し、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で30分間インキュベートします。その後、測定用の96ウェルプレートに培養上清を100 μ L/well 分取し、プレートリーダーで吸収波長450 nm における吸光度を測定します。
- 吸光度のプロットから各系列の IC₅₀ 値を算出し、被検物質の薬効を判定します。

参考文献:

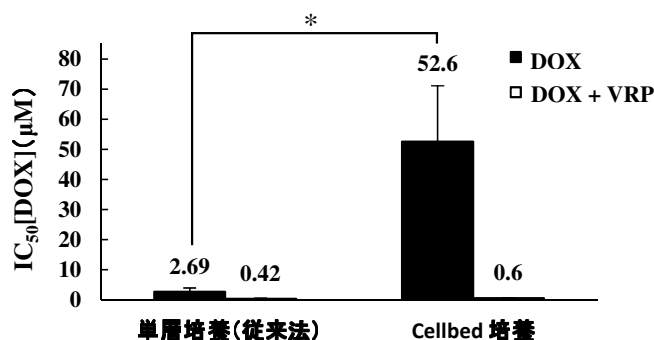
- Mizutami T et al., *Adv Biochem Biotechnol.*, 2017: 112.
- Inamura et al., *J Carcinog Mutagen.*, 2018, 9:2, DOI: 10.4172/2157-2158.1000318.

【実施例】

ヒト肝がん細胞株 HepG2 の HIF-1 α 免疫染色:

本培養法(Cellbed)で培養した HepG2 細胞には低酸素誘導因子 HIF-1 α が強く発現したことから、生体内の腫瘍の微小環境が再現されていることが示唆されました。

薬剤耐性現象の発現と克服薬薬効の確認:



抗がん剤 Doxorubicin (DOX) および既知の薬剤耐性克服薬である MDR1 阻害剤 Verapamil (VRP) 100 μ M を48時間曝露し、DOXの IC₅₀ 値を算出しました。その結果、本培養法ではMDR1に起因すると考えられる高い薬剤耐性の発現とVRPの薬効が確認されました。

注)上記方法は一例であり、諸条件によって異なりますので、結果を保証するものではありません。上記を参考にさせていただき、お客様の実験条件に合わせて調整を行ってください。

【お問い合わせ】

(技術的なお問い合わせ) 日本バイリン(株) 研究所 TEL: 0280-92-7276

(販売に関するお問い合わせ) 日本バイリン(株) Cellbed 営業担当 TEL: 080-9020-7986