

3D細胞培養プラットフォーム を介した*in vitro/ex vivo*がん 薬理学分析

Crown Bioscienceの大規模な3D *ex vivo*および*in vitro*アッセイプラットフォームで化合物を評価することにより、*in situ*でがん生物学の実際を捉えます

新しい抗がん剤は、既存の*in vitro*前臨床モデルで高い活性を示しますが、臨床試験での失敗率は95%にも達します[1]。これは、*in vivo*で腫瘍生物学をよりよく模倣するための革新的なモデルの必要性を示しています。現在、前臨床の腫瘍学研究プロセスのペースを加速し、研究効率を高めることを目的として、細胞培養モデルを利用して大量の創薬開発が行われています。ただし、平らなプラスチック皿で細胞を培養すると、人工的な2D単層化に誘導されます。細胞が培養フラスコのプラスチック表面上で広がり、平らになると、細胞は追加のストレスにさらされ、細胞間および細胞-マトリックスの効果的な接触が妨げられます。これらの要因はすべて、遺伝子発現とタンパク質機能に影響を及ぼします。したがって、2D細胞培養モデルが腫瘍の *in situ* 特性を十分な忠実度で表すことができるかどうかという疑問が生じます。

組織の構成細胞は、生理機能に重要である複雑で動的な3D配置にまです。細胞の3D構造は、外部刺激に応答し、適切な応答を活性化する能力に影響を与えます。通常細胞と非常に高度に似ているがん細胞は、独自の成長ニッチである腫瘍微小環境(TME)を確立することにより、この3D構造と周囲の細胞外マトリックスとの相互作用の恩恵を受けています。抗がん剤としての新しい化合物の治療効果を研究するには、がんの3Dの性質とTMEとのコミュニケーションを考慮する必要があります。

3D細胞培養モデルは、真の*in situ* 腫瘍生物学を理解するためのステップとなります。3D細胞培養モデルでは、腫瘍細胞はプラスチックと接触することなく成長させる必要があります。これにより、腫瘍細胞は本の構造を維持し、相互作用してストレスを最小限に抑え、アーチファクトを減らすことができます。2D培養モデルと比較した3D細胞培養モデルの改善比較を表1に示します。

表1: 2Dおよび3D細胞培養モデルの比較

| | 2D | 3D |
|------|---|---------------------------------|
| 細胞形状 | 平面、厚さ: 3µm | 楕円、厚さ: 10-30µm |
| 環境 | 細胞表面の約50%がフラスコと接触しており、ごくわずかな割合の細胞が隣接する細胞と接触しています。 | 表面のほぼ100%が他の細胞またはマトリックスに接しています。 |
| 細胞作用 | 分化(2)、薬物代謝(3)、遺伝子発現(4)、増殖率(5)、刺激への反応(6)および生存率(7)の違い | |

細胞培養モデルリソース

Crown Bioscienceは、前臨床腫瘍学研究のためのさまざまな*ex vivo*および*in vitro* 3D分析システムと*ex vivo*および*in vitro*モデルを提供しています。

Crown Bioscienceの*ex vivo*モデルは性質がよく分かっているヒト腫瘍異種移植(PDX)モデルライブラリ、HuPrimeとHuKemiaから派生しています。これらは現在最大の商業化されたPDXモデルライブラリです。

これらのモデルには、プライマリー細胞と細胞株の豊富な供給源があり、多くの分子標的を持つさまざまな種類のがんをカバーしています。

当社の*ex vivo*モデルには、PDX腫瘍から新たに単離された細胞が含まれています(単離日の直後にアッセイで利用されます)。現在、3D細胞培養アッセイ用に約70個のPDX由来のプライマリー細胞を検証していました。固形腫瘍と血液がんモデルの両方に由来する細胞を使用しています(表2に詳細を示します)。

また、3Dアッセイ用に新鮮な凍結PDX細胞も提供しています。細胞懸濁液は、分析のために必要に応じて分離、凍結、解凍されます。これにより、PDX腫瘍ドナーが成長する間、遅延時間なしで、試験のタイムラインが2週間に短縮されます。Crown Bioscienceは、さまざまな種類のがんに対応する新鮮凍結PDX細胞を提供しており(表3を参照)、開発中のモデルもあります。

表2: 3D細胞培養アッセイによって検証されたPDX由来のプライマリー細胞

| Tissue of Origin | HuPrime Identifier |
|------------------|--|
| ALL | AL5511, AL7443, AL7473 |
| AML | AM5512, AM7440, AM7577 |
| 脳 | BN2276, BN2287, BN2331, BN2338 |
| 胸部 | BR1282, BR1283, BR1458, BR1474 |
| 結腸直腸 | CR0029, CR1520, CR1560, CR1574, CR2161, CR2506, CR2518, CR2520, CR2524, CR2545, CR3085 |
| 食道 | ES0195, ES0201 |
| 胆嚢 | GL0440 |
| 肝臓 | LI0050, LI0574, LI0612, LI0752, LI0941, LI1037, LI1098, LI1646 |
| 肺 | LU0038, LU0299, LU0330, LU0367, LU0377, LU0387, LU0395, LU0743, LU0755, LU0884, LU1143, LU1144, LU1147, LU1155, LU1215, LU1271, LU1380, LU1423, LU1868, LU1901, LU2503, LU2505, LU2512, LU3075, LU6409 |
| 卵巣 | OV0205, OV0273, OV1658 |
| 膵臓 | PA1168 |
| 胃 | GA0037, GA0087, GA0103, GA0114 |

ハイライトされたモデルは、最近検証されました。



HuPrimeモデルは、マウス間質細胞が枯渇したがん細胞培養物からなる独自のPrimePanel細胞株コレクション(8)を確立するためにも使用されました。当社の細胞株はすべて初期継代(<10)細胞株であり、ゲノム変異状態、生化学的特徴、がん細胞自律ターゲット療法への反応など、オリジナルの患者の腫瘍の基本的な組織病理学および遺伝的特徴を保持しています。PrimePanelは、*in vivo*研究の前に薬効を評価するための、用途が広く、費用効果が高いハイスループットのスクリーニングプラットフォームを提供します。

Crown Bioscienceは、3D細胞培養用に5つのPrimePanel細胞株を確立しました。詳細については、表4を参照してください。

表3:3D細胞培養分析によって検証されたPDX由来の新鮮な凍結細胞

| PDX がんモデルタイプ | モデル数 | PDX がんモデルタイプ | モデル数 |
|--------------|------|--------------|------|
| 膀胱 | 2 | 腎臓 | 1 |
| 脳 | 2 | 肝臓 | 11 |
| 胸部 | 5 | 肺 | 20 |
| 子宮頸 | 1 | リンパ腫 | 3 |
| 胆管がん | 3 | 転移性がん | 1 |
| 結腸直腸 | 18 | 卵巣 | 6 |
| 食道 | 7 | 膵臓 | 3 |
| 胆嚢 | 2 | 肉腫 | 3 |
| 胃 | 10 | 合計 | 103 |
| 頭頸部 | 5 | | |

*In vitro*モデルを補完するために、Crown Bioscienceは、乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がんなど、*in vitro*薬効試験で検証した100以上の商業化された細胞株の3D細胞培養モデルを確立しました。検証済みの*in vitro*3D細胞株の概要を表5に示します。

3D細胞培養プラットフォームでは、上記のモデルを利用でき、化合物スクリーニングにはメチルセルロースアッセイおよび3DAlvetex®マトリックス(エチルセルロースで十分に増殖しない細胞に使用できる)、軟寒天コロニー形成、3D腫瘍増殖アッセイ(3D TGA)などの市販のシステムが含まれます。

表4:3D細胞培養分析によって検証されたPrimePanel細胞株

| PrimePanel ID | がんのタイプ | 患者と疾患の背景 |
|---------------|--------|--|
| CR5063CL | 結腸がん | 27歳女性FOLFOX、Camptosar®、Eribitux®、FUDR®、フォリン酸による前治療 |
| LU5143CL | NSCLC | 78歳男性 |
| LU5224CL | SCLC | 48歳女性浸潤性高悪性度がん |
| LU5381CL | NSCLC | 57歳女性。IFEX®、タキソール®、ゲムザール®による前治療 |
| ME5338CL | 悪性黒色腫 | 転移性悪性黒色腫(脳) |

表5:3D細胞培養アッセイによって検証された*in vitro*細胞株

| がん種 | メチルセルロース細胞株 | Alvetex | 軟寒天 |
|------|---|---------|--|
| 血液 | Daudi, DoHH-2, EHEB, Jurkat (clone E6-1), JVM-13, JVM-2, JVM-3, K-562, Karpas299, Kasumi, MEC-1, MEC-2, MEG-01, Molm-16, MOLT-4, Namalwa, OCI-LY19, REH, SU-DHL-10, SU-DHL-5, SUP-B15, TF-1, THP-1, Toledo, U-937, WSU-DLCL-2 | | |
| 骨 | CADO-ES1, RD-ES | | |
| 脳と神経 | A172, H4, IMR-32, LN18, LN229, SF126, SH-SY5Y, SK-N-SH, U-118 MG, U251, U-87 MG | | |
| 胸部 | T-549, DU4475, MDA-MB-231, MDA-MB-436 | | MDA-MB-231 |
| 結腸直腸 | HT-29, HCT 116 | | HT-29, HCT-116 |
| 食道 | KYSE70, KYSE270, KYSE410, TE-1 | | |
| 頭頸部 | FaDu, SW579 | | |
| 肝臓 | HCCLM3, Hep G2, HLF, HUH-7, JHH-5, JHH-7, MHCC97H, PLC/PRF/5, SK-HEP-1, SNU-398, SNU-878, SNU-886 | Hep 3B | Hep 3B, Hep G2, JHH-7, PLC/PRF/5, SK-HEP-1 |
| 肺 | A549, Calu-6, DMS53, DMS79, DMS114, EBC-1, H69AR, HCC4006, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1373, NCI-H1395, NCI-H1417, NCI-H1435, NCI-H1437, NCI-H157, NCI-H1581, NCI-H1650, NCI-H1688, NCI-H1703, NCI-H1792, NCI-H1836, NCI-H1975, NCI-H2052, NCI-H209, NCI-2227, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H358, NCI-H446, NCI-H460, NCI-H520, NCI-H522, NCI-H526, NCI-H69, NCI-H82, SK-MES-1 | | NCI-H1299 |
| 卵巣 | OVCAR-8, SK-OV-3, SW626, SW756 | | |
| 膵臓 | AsPc-1, Capan-1, MIAPaCa-2, PANC-1, PL45 | | CFPAC-1, MIAPaCa-2 |
| 前立腺 | PC-3 | | |
| 胃 | A3/KAW, AGS, AZ521, GTL-16, HGC-27, Hs 746T, IM95, IM95m, KATO III, MKN1, MKN45, MKN74, NCI-N87, NUGC-3, NUGC-4, OCUM-1, SCH, SNU-1, SNU-16, SNU-5, SNU-484, SNU601, SNU-620, SNU-638, SNU-668, SNU-719, YCC-2, YCC-7, YCC-10, YCC-11 | | AGS, AZ-521, GTL-16, HGC-27, MKN1 |



HuPrimePDXモデルを使用したメチルセルロースアッセイのex vivoモデル

当社の3Dクローンジェニック*in vitro/ex vivo*メチルセルロースアッセイは、低コスト、ハイスループットの*in vitro*薬物スクリーニングと、独自のHuPrimeモデルを使用した臨床関連の*in vivo*薬物有効性研究との密接な関係があります(アッセイの概念を図1に示します)。上記のPDX由来の*in vitro*モデルをこの実験に使用することができます。

たとえば、新たに単離したプライマリー細胞を免疫不全マウスに接種し、腫瘍が適切なサイズ(通常は400 mm³~800 mm³)に達した際に採取されます。採取した腫瘍は溶解され、細胞が適切に希釈された後、3Dモデルに成長するようにメチルセルロースまたは3D Alvetexプレート上で培養されます。細胞密度は再現性の高い結果を提供するように最適化されます。

次に、試験される抗がん剤を、培養の2日目から10日目まで細胞に投与することができます。エンドポイントには、細胞の位相差イメージングと、CellTiter-Glo®(CTG)アッセイにより抗がん剤の効果を確認することができます。

胆嚢がんモデルGL0440から新たに分離したプライマリー細胞に対するシスプラチンの*ex vivo*有効性研究の例を表6に示します。シスプラチンを0.1μM、1μM、および100μMでがん細胞に投与し、薬剤治療効果を評価するために、各用量に対して位相差イメージング(10倍)を行いました。その後、用量反応曲線を作成します;図2は、メチルセルロースアッセイにおけるOV5397卵巣がんPDXモデル由来細胞に対するシスプラチンの用量反応を示しています。

HuPrimePDXモデルとPrimePanel細胞を使用した3D TGA分析のex vivoモデル

3D TGAアッセイは、腫瘍学の創薬のための実証済みのプラットフォームです。さまざまな種類のがん種(9、10、11、12)における研究を網羅した複数の論文が発表されています。3D TGAアッセイは、軟性のラミニンリッチ細胞外マトリックス(IrBME, Cultrex®)を利用してがん細胞を埋め込み、hMSC(IL-6, HGFなど)およびCAFと混合することで、固形がんのTMEに存在する傍分泌シグナルを提供します。3Dア

図1: ex vivoクローニングアッセイ(HuPrime PDXモデルから新たに単離された細胞を使用)

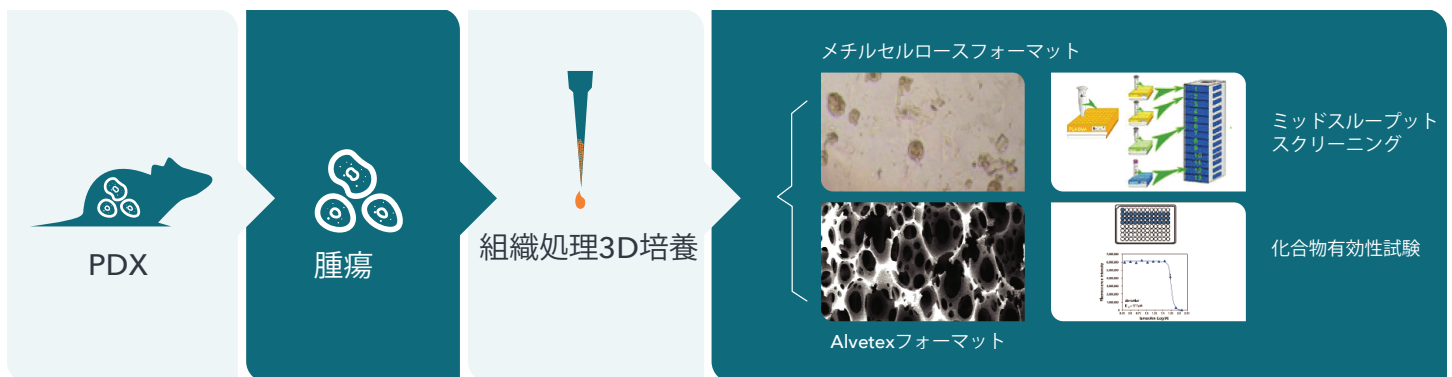


表6: 3D培養したGL0440由来のプライマリー細胞に対するシスプラチンのex vivo有効性試験

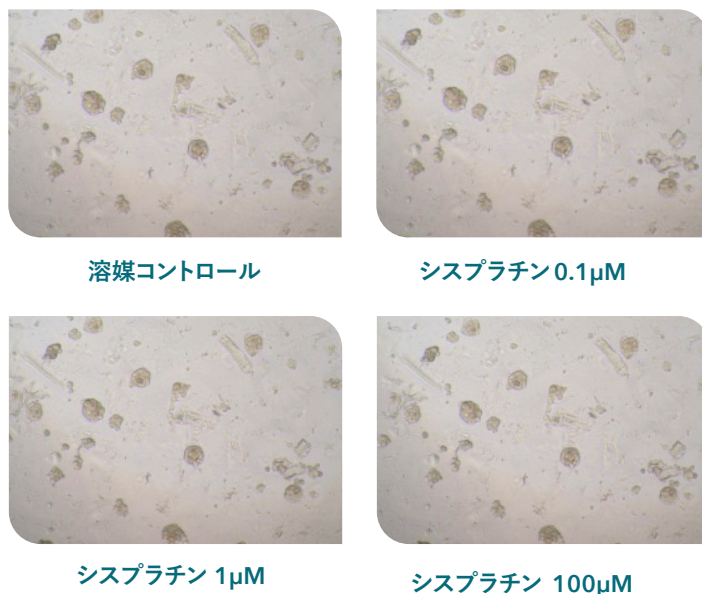
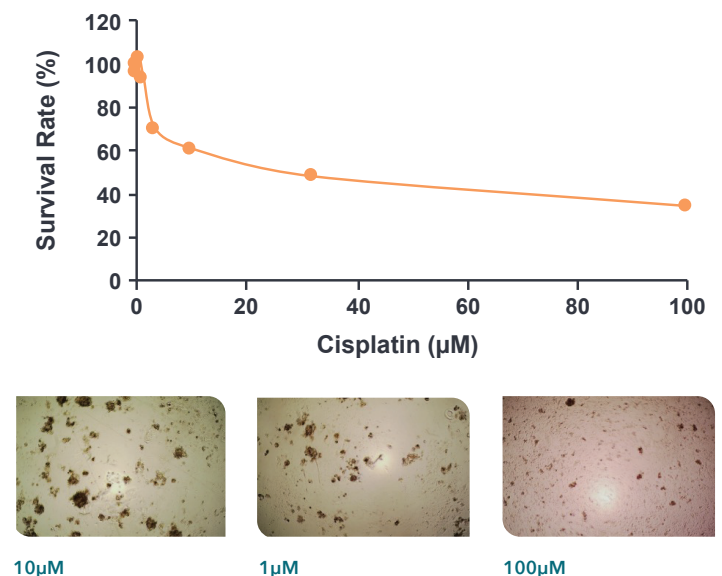


図2: 3D培養したOV5397由来のプライマリー細胞に対するシスプラチンの有効性の用量反応曲線



ッセイを行うため、ホルモンの添加(例:DHT / E2)、グルコースの制限($\leq 7\text{mM}$)、および酸性pHの維持(6.8)を行います。この環境でPDX由来細胞と薬物パネル(9)を用いることにより、プロファイリングのための「ヒト化」およびTME環境の構築という条件を満たすことができます。

表7は、患者腫瘍、2D培養、およびヒト化3D細胞培養環境を比較したもので、3次元培養の方がよりヒトに近い状態を再現していることが分かります。

3D TGAアッセイを最適化し、AlamarBlue®比色法を使用して細胞増殖の線形範囲と総細胞集団数を定義しました(3D Gloなどの他のエンドポイントも利用可能です)。個々の細胞タイプは、蛍光/生物発光によるモニターを行うこともできます。3D TGAは、薬物評価および更なる試験(必要に応じて)のために、上記のすべてのex vivoモデルで使用できます。図3は、大腸がん、肺がん、黒色腫のPrimePanel細胞株で3D TGAアッセイを使用したIC₅₀評価の例を示しています。

PDXの腫瘍モデルは、元の腫瘍の病理学的表現型を厳密に模倣しているため、抗がん剤有効性の前臨床評価に理想的なモデルです。しかし、in vivo動物試験の労働集約的、長時間、低スループット性、および高い費用などの特徴は、薬剤開発初期段階において制限の要因となります。PrimePanel細胞はすべてのPDXから生成されるわけではありませんが、3D TGAシステムでは、96ウェルプレートで新鮮なPDX由来材料を使用できます。

3D TGAおよびin vivoモデルにおける抗がん剤への応答と予想される臨床での試験結果との間に相関関係が示されています。LU6422は、腺がんサブタイプのNSCLC PDXモデルです。このPDXモデルは、細

胞内キナーゼドメインにヘテロ接合c.2573T> G(L858R)を含み、これは、患者のエルロチニブなどのEGFR標的療法に対する高い感受性に関連しています。がん細胞をMSCと混合して皮下に移植したin vivo試験で、このPDXモデルに25および50mg/kgのエルロチニブを投与すると、すべての腫瘍増殖が完全に抑制されることが確認されました。(図4A)。LU6422に由来する細胞は、3D TGAにおいてエルロチニブに対しても感受性があり、in vivoでの反応と相関しています(図4B)。これらの研究データは最近、Molecular Cancer Therapeuticsの共同研究者とともに公開されました⁽⁹⁾。

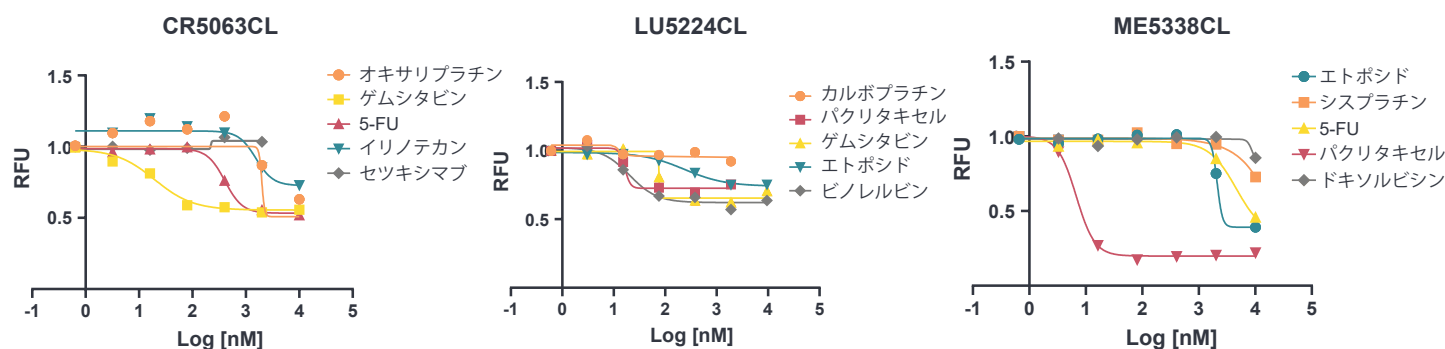
3D TGAの大規模なスクリーニング

PDXモデルを、マウスの臨床試験(HuTrials)で使用して、レスポンドーとノンレスポンドーの集団を識別し、臨床における患者の層別化のための特徴と予測バイオマーカーを完全に解明できます。これらのPDXに由来する細胞は、3D TGAアッセイでも使用できます。大規模な有効性スクリーニングを実行して、治療効果の高い薬剤の組み合わせを特定できる可能性があります⁽⁹⁾。

表7:ヒト体内、2Dおよび3D腫瘍培養環境の比較⁽¹¹⁾

| 腫瘍コレクション | ヒト体内 | 2D 培養 | 3D-TME 培養 |
|----------|------------------|-----------------------|------------------|
| 酸素(低酸素) | 0-5% | 21% | $\leq 5\%$ |
| 酸 | 200-4,000 Pa | 3,000,000,000 Pa | 200-4,000 Pa |
| pH | 酸性(≤ 7.0) | バッファリング(≥ 7.2) | 酸性(≤ 7.0) |
| 次元 | 3D | 2D | 3D |
| ブドウ糖濃度 | $< 7\text{mM}$ | 10-25mM | $< 7\text{mM}$ |

図3:PrimePanel細胞株の3D TGAによる薬物パネルIC₅₀の評価



| PrimePanel細胞株 | IC ₅₀ (μM) | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------------|---------|--------|---------|--------|-------|--------|--------|----------|---------|--------|
| | 5-FU | カルボプラチン | シスプラチン | ドキシソルビン | セツキシマブ | エトポシド | ゲムシタピン | イリノテカン | オキサリプラチン | パクリタキセル | ビノレルビン |
| CR5063CL | 0.405 | - | - | - | ~0.157 | - | 0.020 | 1.54 | ~1.99 | - | - |
| LU5224CL | - | ~0.014 | - | - | - | 0.248 | 0.080 | - | - | ~0.017 | 0.021 |
| ME5338CL | 4.59 | - | >100 | 8.67 | - | ~2.09 | - | - | - | 0.007 | - |



細胞株を使用したメチルセルロースおよび軟寒天アッセイの*in vitro*モデル

Ex vivoアッセイを補完するために、Crown Bioscienceは3Dアッセイ用のさまざまな商業化された*in vitro*細胞株を検証しました。増殖中の細胞を回収し、メチルセルロース、軟寒天、または他の市販の基質にプレーティングして、各細胞株に最適化された最終細胞密度（たとえば、5000細胞/ウェル）まで培養しました。2日目から、適切な濃度条件に従って、抗がん化合物を各ウェルに投与します。細胞がCTGアッセイによってカウントされ、エンドポイントまで、細胞増殖を毎日モニターします。図5は、FaDu頭頸部がん細胞株の用量反応曲線を示しています。FaDuは3Dモデルで成長し、その有効性をテストするために実験的に抗がん剤の用量を増やして処理しました。

また、低接着性の96ウェルプレートでの軟寒天アッセイも提供可能です。細胞株を0.4%寒天に 3×10^3 細胞/ウェルでプレーティングし、0.6%寒天のベース層を覆いました。試験薬は増殖培地に添加され、エンドポイントでの測定項目はCTGまたは画像解析です。図6は、両方の測定項目で軟寒天アッセイにおける濃度依存的なシスプラチン添加時の比較結果を示しています。EC50の測定値は同等であり、イメージングがこの分析のエンドポイントとなることが検証できました。

図5: FaDu頭頸部がん細胞株の薬剤投与量反応曲線

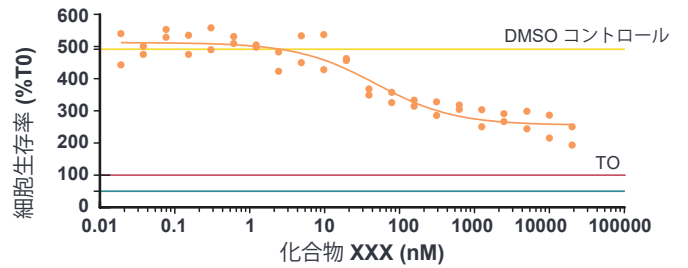


図4: *in vivo*および3D TGAにおけるLU6422 PDX応答の相関

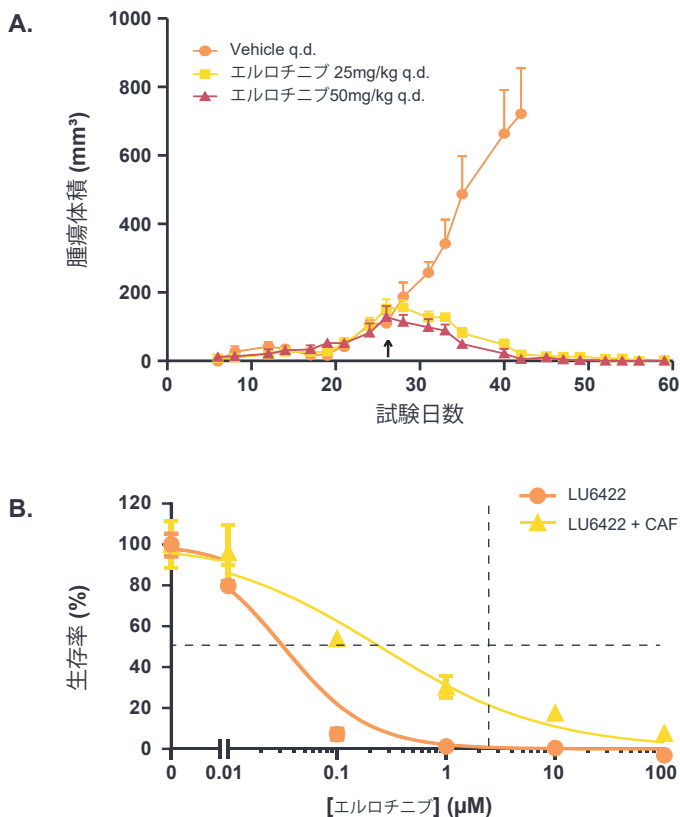
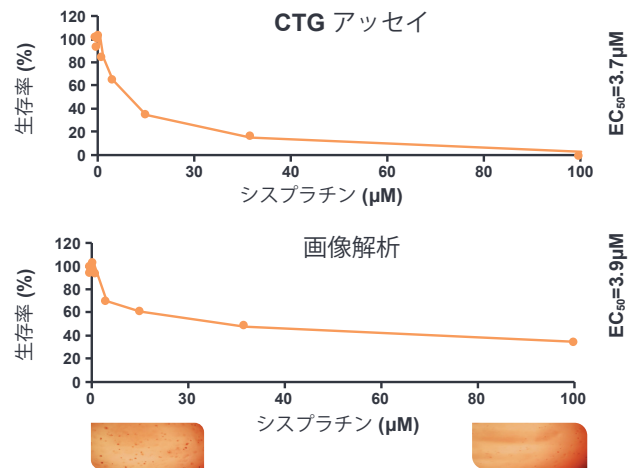


Figure 6: Dose Response Curve for CFPAC-1 Cancer Cell Line Treated with Cisplatin





まとめ

実際の腫瘍は病理学的に3Dの構造です。新しい抗がん剤の有効性を評価するときは、化学療法などの外部刺激からの影響評価するため、3Dの性質を考慮する必要があります。がん薬開発における失敗率は、他の疾患領域の薬剤よりも大幅に高くなっています。既存の前臨床モデルでは、第III相試験に合格した後、認可されている抗がん剤はわずか5%であり、これらの薬剤は既存の前臨床モデルで効果が示されています[1]。これらの失敗の大部分は、毒性の問題よりもむしろ有効性に関連しており、現在の前臨床腫瘍学の2D細胞培養システムは、対応する3D腫瘍の性質を示しておらず、モデルの忠実度が不十分であることが確認されました。

Crown Bioscienceは、3D培養および前臨床腫瘍学研究のために、さまざまな*ex vivo*および*in vitro*モデルを開発しています。当社の*ex vivo*モデルは、性質が十分検討され、検証されたHuPrimeおよびHuKemia PDXモデルから派生しています。新たに単離された細胞株、新鮮な凍結細胞、および独自のPrimePanel細胞株で利用可能なこれらの細胞株は、元の患者腫瘍の基本的な組織病理学および遺伝的特徴を維持する初期継代(<10)細胞株です。これらのリソースを補完するために、3D培養で検証された100を超える市販の細胞株を提供しています。

当社の*ex vivo*および*in vitro*モデルは、さまざまな3Dアッセイに利用できます。Crown Bioscienceは3Dクローン*in vitro* / *ex vivo*メチルセルロースアッセイを提供します。これにより、低コスト、ハイスループットの*in vitro*薬物スクリーニングと臨床的に関連する*in vivo*薬物有効性試験を密接に結び付けることができます。軟寒天アッセイにも同様の機能があり、必要に応じてCellTiter-Gloまたはイメージングによるエンドポイントでのアッセイを提供します。また、がん領域の前臨床薬開発のプラットフォームとなった3DTGAも提供しています。

3D TGAは上皮細胞がストローマ細胞や細胞外マトリックスと一緒に無血清状態で培養されるため、TMEと密接に連携しており、より臨床に近い培養方法といえます。3D TGAをPDXモデルと組み合わせて使用すると、複数の単剤および併用薬の迅速かつスケーラブルな*ex vivo*薬剤感受性スクリーニングが可能になり、研究を加速できます[9]。

3D細胞培養プラットフォーム、またはその他のCrown Bioscience製品やサービスに関するその他の質問や情報については、busdev@crownbio.comまでお問い合わせください。



参考文献

- 1 Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates - where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011; 8:189-190.
- 2 Tian XF, Heng BC, Ge Z et al. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation* 2008;68(1): 58-67.
- 3 Elkayam T, Shaprut S, Dvir-Ginzberg M et al. Enhancing drug metabolism activities of C3A - A human hepatocyte cell line - By tissue engineering within scaffolds. *Tissue Engineering* 2006;12(5): 1357-1368
- 4 Shoeters G, Leppens H, Van Gorp U, and Van Den Heuvel R. Haemopoietic long-term bone marrow cultures from adult mice show osteogenic capacity in vitro on 3-dimensional collagen sponges. *Cell Proliferation* 1992;25(6): 587-603.
- 5 Scaglione S, Braccini A, Wendt D et al. Engineering of osteoinductive grafts by expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 2005;93(1): 181-187.
- 6 Debeb BG, Zhang X, Krishnamurthy S et al. Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Molecular Cancer* 2010;9: 180.
- 7 Laurencin CT, El-Amin SF, Ibim SE et al. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *Journal Biomedical Materials Research* 1996;30(2): 133-138.
- 8 Zhang Y, Ge Y, Liu Y et al. PrimePanel provides a high throughput in vitro drug screening platform that intimately links to in vivo pharmacological analysis in PDX models [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Research* 2013;73(8 Suppl):Abstract nr 2787.
- 9 Onion D, Argent RH, Reece-Smith AM et al. 3-Dimensional Patient-Derived Lung Cancer Assays Reveal Resistance to Standards-of-Care Promoted by Stromal Cells but Sensitivity to Histone Deacetylase Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016;15(4): 753-756.
- 10 Casneuf T, Axel AE, King P et al. Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent, estrogen receptor- α -positive breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 2016;8: 13-27.
- 11 Krausz E, de Hoogt R, Gustin E et al. Translation of a Tumor Microenvironment Mimicking 3D Tumor Growth Co-culture Assay Platform to High-Content Screening. *Journal of Biomolecular Screening* 2013;18(1): 54-66.
- 12 Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK et al. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS ONE* 2009;4(4): 34992.

