

Introduction

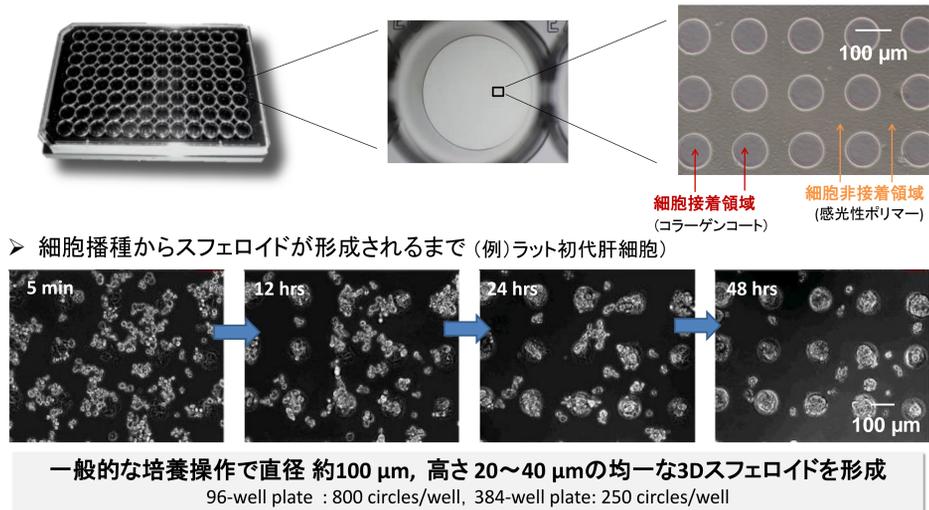
近年、2次元(2D)培養と3次元(3D)培養細胞において、培養環境に起因する違いがあることが明らかになっており¹⁾、細胞をより生体に近い形態で培養する3D培養に注目が集まっている。これまで多くの抗がん薬の効果は2D培養で評価されたものであったが、3D培養によって初めて薬効が確認できる抗がん薬の報告²⁾などもあり、より生体内に近い環境と思われる3D培養で評価されるのが好ましいと考えられる。その中で我々は、3D培養プレートCell-able®(東洋合成工業株)の、がん細胞3D培養への適用可能性の評価を実施した。Cell-able®では、細胞非接着性を持つ独自の感光性ポリマーを利用してプレートの培養表面を微細加工し、細胞接着領域と非接着領域を作り出すことで、均一なサイズの複数の接着型スフェロイドが簡単に形成できる。これらの特徴は、ハイコンテンツスクリーニングなどを用いたがん細胞スフェロイドの評価に、Cell-able®が適していることを示唆している。

今回は、Cell-able®を用いて種々のがん細胞スフェロイドを血清培地または無血清培地を用いて培養し、がん幹細胞マーカー発現および抗がん薬感受性の観点から、2D培養と比較した結果について報告する。

Materials and Methods

【Cell-able®】

Cell-able®とは、東洋合成工業(株)製3D培養用マルチウェルプレートである。培養用マイクロプレートの底面を特殊な細胞非接着性の感光性ポリマーで微細加工することで、培養表面に細胞接着領域と細胞非接着領域を作り出している。Cell-able®に細胞を播種すると、細胞は自発的に細胞接着領域に集まるため、2D培養に近い簡単な操作で均一なスフェロイド形成が可能となる。肝細胞をはじめ、様々な接着性細胞のスフェロイド培養に利用されており、形成されたスフェロイドは培養面に接着しているため2D培養と同様に洗浄・染色操作なども簡単に実施できる特徴を持つ。



【細胞培養】

ヒト肺がん細胞A549、前立腺がん細胞DU145、結腸がん細胞DLD-1はRPMI1640、10%FCS、1%ペニシリン、ストレプトマイシン培地(serum media)で培養した。トリプシン処理で細胞を回収し、serum media 又はReproFF2 (ReproCELL), 10 ng/ml EGF(Upstate), 20ng/ml basic FGF (和光純薬), インシュリン5μg/mlを添加した無血清培地(serum-free media)に再懸濁し、Cell-able® (東洋合成)又はコーゲンコート2Dプレート(BD Biosciences)に播種し、培養した。

【感受性試験】

がん細胞を抗がん薬又はvehicle(<0.1% DMSO)を含む培地に72時間曝露した。その後、Click-iT® EdU 細胞増殖assay及びDAPI (Invitrogen)で染色し、ImageXpress Micro system (Molecular Devices)で解析を行った。生細胞の計測は、CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay (Promega) 又はHoechst33342による核染色を用いて行った。

【FACS 測定】

細胞をAccutase® (Innovative Cell Technologies)で処理して細胞を分散させ、3.8% formaldehydeで固定化した。ブロッキング後、FITC標識 anti-human CD24 抗体 (Invitrogen) とAPC標識 anti-human CD44 抗体(BD Biosciences)で染色した。蛍光強度をMACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec)で計測した。

【RT-PCR】

細胞から、NucleoSpin® RNAII (Takara Bio)を用いてトータルRNAを抽出した。cDNAの合成には、PrimeScript® RT Master Mix (Takara Bio)を用いた。定量リアルタイムPCR (qRT-PCR) は TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix と以下のプローブを用いて行った。プローブ: NANOG (Hs04260366_g1); ABCG2 (Hs0105370_m1) (Applied Biosystems)

【ALDH活性測定】

細胞を培養後Aldefluor™(StemCell Technologies Inc.)にてALDH活性を検出した。

Results

【細胞の形態観察】

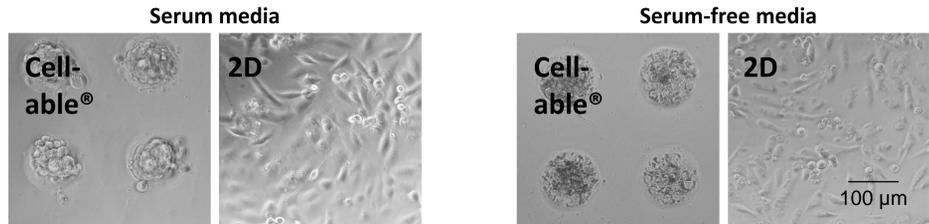


Fig. 1: 位相差顕微鏡写真

DU145をCell-able®プレートに播種し5日間培養した結果、細胞接着領域に形成されたスフェロイドの細胞の形態は、2D培養の細胞の形態とは全く異なっていた。

【Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイドにおける表面マーカーCD44^{high}/CD24^{low}】

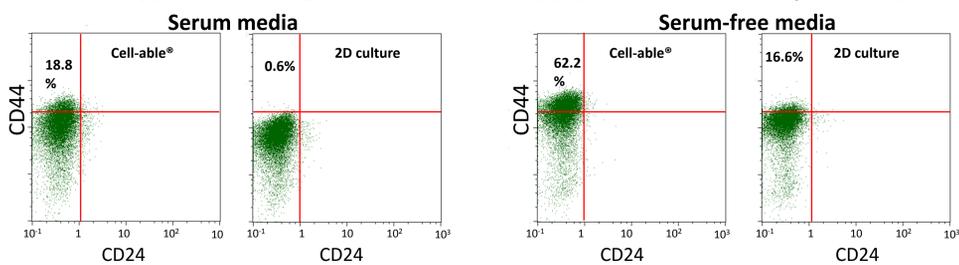


Fig. 2: FACS解析による表面マーカーの比較

DU145をCell-able®でスフェロイド培養した場合と、2Dプレートで単層培養した場合の、CD44及びCD24 表面抗原をFACSを用いて比較した。2D培養と比較して、スフェロイド培養ではCD44^{high}/CD24^{low}細胞の割合が高い結果を示した。また、2D培養、スフェロイド培養とも、同一の培養方法においては、serum mediaよりserum-free mediaで培養した細胞でCD44^{high}/CD24^{low}細胞の割合が高くなる傾向を示した。

【Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイドにおけるNANOG / ABCG2 の遺伝子発現】

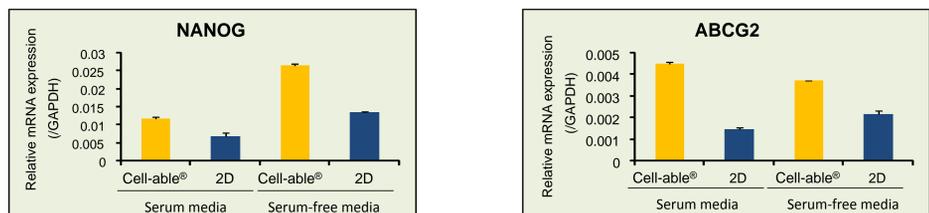


Fig. 3: 幹細胞マーカー遺伝子発現の比較

DU145を、serum media 又はserum-free mediaを用いてスフェロイド培養及び2D培養し、NANOGとABCG2の遺伝子発現量をqRT-PCRで比較した。その結果、両遺伝子とも、2D培養と比較してスフェロイド培養細胞で高発現であった。

【Cell-able®スフェロイドにおけるALDH活性】

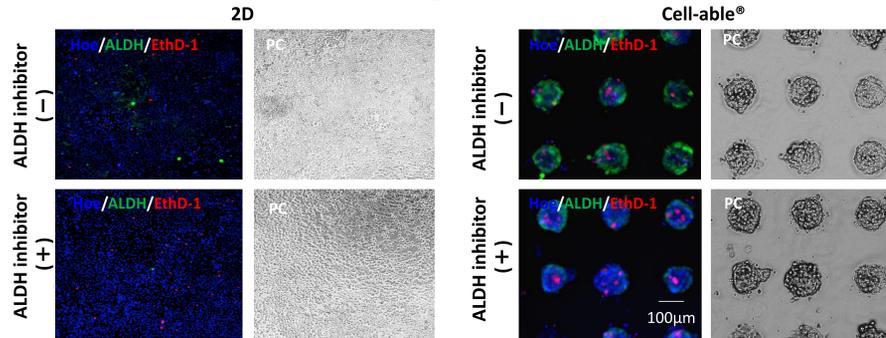


Fig. 3: ALDH活性のイメージングによる検出

A549をCell-able®又は、2Dプレートで培養し、細胞中のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)活性をALDEFUOR™ (Stemcell Technologies)で染色した。核はHoechst33342、死細胞はEthidium homodimer (EthD-1, Invitrogen)で染色した。ALDH^{high}細胞の割合が2D培養に比較して3Dスフェロイド培養で多くなる傾向が認められ、幹細胞が多く含まれることが示唆された。画像取得: ImageXpress micro (モレキュラーデバイス)

【Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイドにおける抗がん薬感受性】

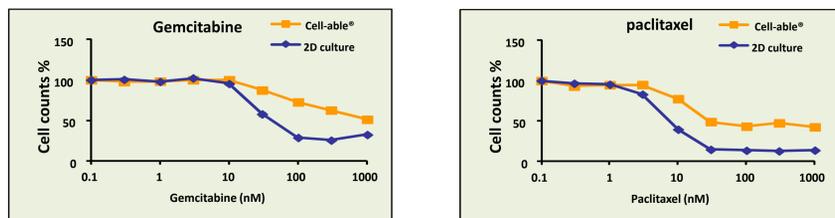


Fig. 4: 生細胞率による抗がん薬感受性試験

DU145をCell-able®又は2Dプレート培養し、Gemcitabine又はPaclitaxel (PTX)に対する薬物耐性を比較した。培地はserum mediaを用い、薬物を3日間曝露し、生細胞数をCellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ)で測定した。いずれの薬物でも、2D培養細胞に比較して、スフェロイドの薬物に対する耐性が高くなっていた。

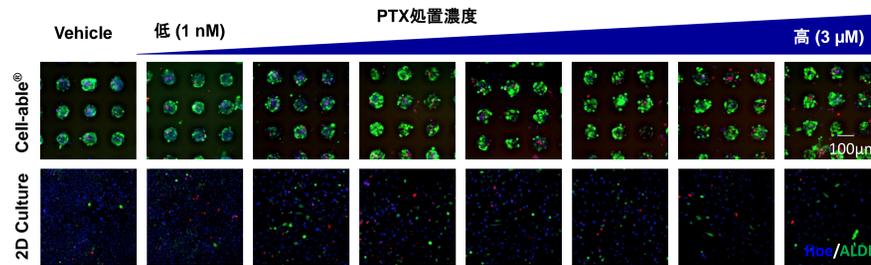


Fig. 5: ALDH活性のイメージングによる抗がん薬感受性試験

Cell-able®プレート上でヒト肺腺がん細胞A549をserum mediaを用いて培養して得られたスフェロイド中に含まれる細胞の核、及びALDH活性を、それぞれ、DAPI(青)とALDEFUOR™(緑)で染色し、ImageXpress Micro Systemで測定、2D培養と比較した。Cell-able®プレート上で形成されたスフェロイドはALDH陽性の細胞を多く含み、ALDH陽性の細胞はPTXに対して高い薬剤耐性を示した。画像取得: ImageXpress micro (モレキュラーデバイス)

【Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイド内部の酸素濃度状態】

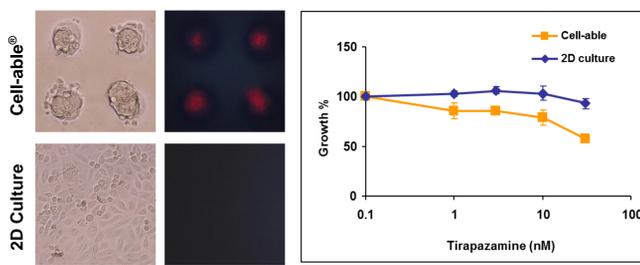


Fig. 6: LOX-1による低酸素状態の検出

Fig. 7: Tirapazamineに対する感受性比較

Fig. 6, 7: スフェロイドにおける低酸素状態の検証

Cell-able®プレート又は2Dプレートで培養したDLD-1細胞における低酸素状態をLOX-1で検出した。この結果、Cell-able®で作製したスフェロイドは低酸素状態であることが確認された (Fig. 6)。低酸素状態で細胞毒性を示すTirapazamineに対する感受性を比較したところ、2D培養細胞と比較してスフェロイド培養した細胞で感受性が高い結果であった (Fig. 7)。

Conclusions

- ✓ Cell-able®で培養されたDU145細胞スフェロイドにおいて、幹細胞マーカーであるCD44^{high}/CD24^{low}の細胞の割合が2D培養より多い傾向を示した。また、NANOG、ABCG2遺伝子も2D培養と比較して高発現であった。この傾向はSerum-mediumでもSerum-free mediumでも同様であった。
- ✓ Cell-able®で培養されたDU145細胞スフェロイドは、2D培養細胞より抗がん薬 (GEM, PTX)に対する耐性が高い結果を示した。
- ✓ Cell-able®で3D培養されたA549は、ALDEFUOR™を用いたイメージングassayにより2D培養されたがん細胞より高ALDH活性の細胞の割合が高いことが確認された。更に本イメージングassayで、3D培養された高ALDH活性の細胞はPTXに対して高い耐性を持つことが確認された。このことは、3D化によるPTX耐性の上昇にも寄与しているものと考えられる。
- ✓ Cell-able®で培養されたスフェロイドの中心部は、低酸素濃度環境を示すことがイメージングにより確認された。低酸素状態で細胞に対し毒性を示すTirapazamineの曝露で、スフェロイド培養では濃度依存的に生細胞数の減少が認められた。

以上の結果より、Cell-able®で3D培養されたがん細胞は、2D培養されたがん細胞と比較して、より幹細胞様の性質を持っていると考えられ、*in-vitro*がん幹細胞研究には3D培養が適していると考えられた。また、Cell-able®プレートは、2D培養と同様の操作でプレートに接着した状態の3D培養が可能であった。このため、Cell-able®では、複数のプローブによる染色や洗浄操作を伴う免疫染色なども可能であり、HCS等によるハイスループットのスクリーニングにも適用可能と考えられた。

Acknowledgements

本発表にあたり御協力頂いたモレキュラーデバイス株式会社 鈴木 真帆海 様に心より感謝申し上げます。

References

- 1) Kim JB., *Seminars in Cancer Biology*, 2005, 15, 365-77
- 2) M Pickl et al., *Oncogene*, 2009, 28, 461-468