

**Introduction** 近年、2次元と3次元培養細胞において、培養環境に起因する違いがあることが判ってきた。分子生物学分野では、細胞を生体に近い形態で培養する3次元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、2次元培養で評価されたものであるが、より生体内に近い環境と思われる3次元培養で評価されるのが好ましいと考えられる。そのため、我々は、感光材ポリマーを利用して新たな3次元培養システムを構築した。本ポリマーは、UV照射によりハイドロゲルとなり、ポリマーがコートされた領域には細胞が接着することが出来ない性質を有する。この性質を利用することにより、培養表面上に接着領域と非接着領域を自由に構築することが可能となった。この技術を利用して、多数の100μm径の細胞接着領域とそれ以外のエリアを非接着領域にパターンニングした培養表面では、細胞は自ら細胞接着領域にスフェロイドを形成する。

今回、我々は、この技術を利用して作成したマルチウェル培養プレートを用いて、がん細胞スフェロイドを形成し、血清培地または無血清培地を用いて培養を行い、2次元培養との比較を行った。その結果、化学療法剤に対する抵抗性、幹細胞マーカーの発現、薬物トランスポーター発現などが、2次元培養と比較して3次元培養では高くなる傾向を示した。よって、本技術で培養した癌細胞スフェロイドを用いて抗がん剤の薬剤感受性試験、開発に役立てることが出来ると考えられる。

Materials and methods

**細胞培養**  
ヒト肺がん細胞A549と前立腺がん細胞DU145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)又はコラーゲンコート2次元プレート (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又は 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。

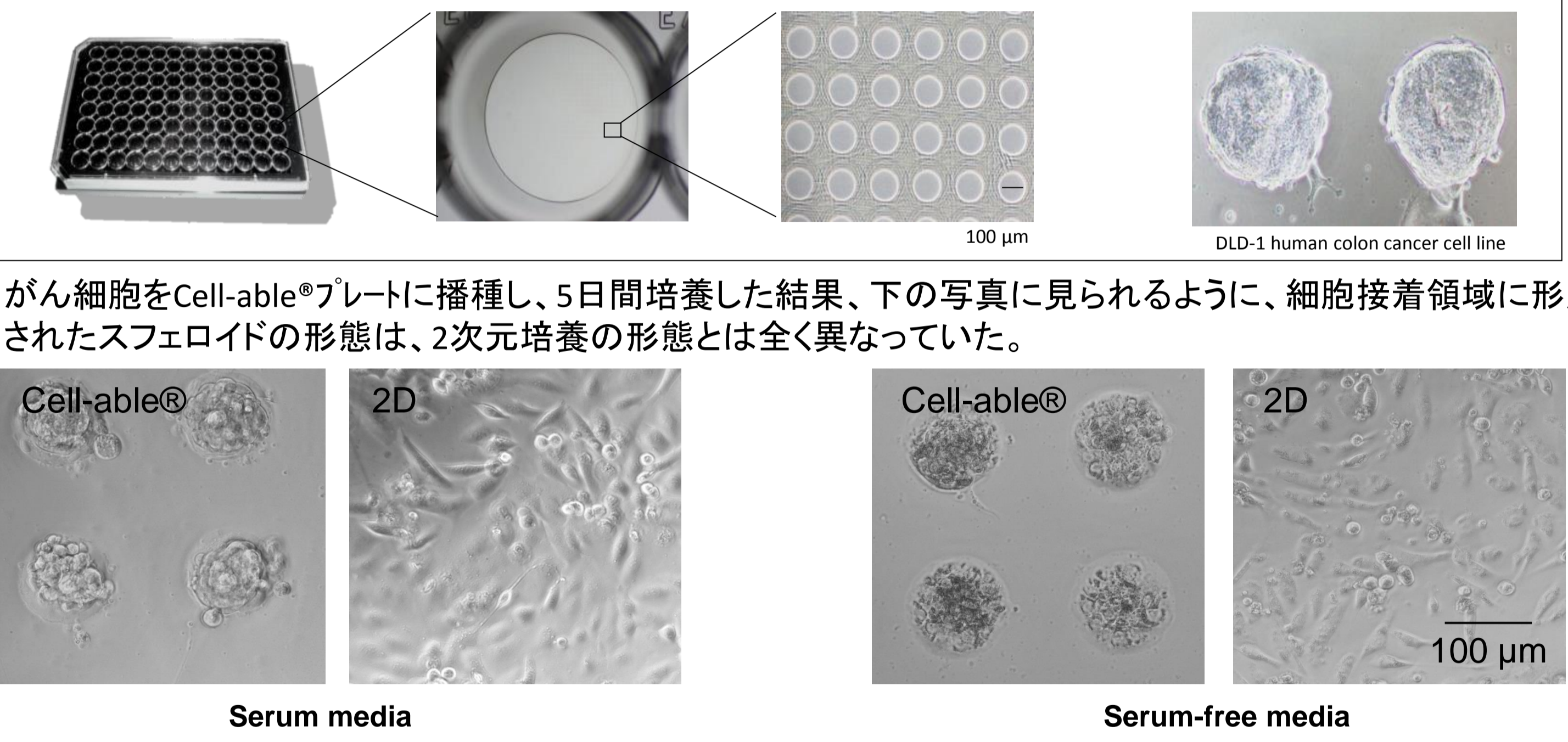
**FACS 測定**  
細胞をAccutase® (Innovative Cell Technologies)で処理して細胞を分散させ、3.8% formaldehydeで固定化した。ブロッキング後、FITC標識 anti-human CD24 抗体 (Invitrogen) とAPC標識 anti-human CD44 抗体 (BD Biosciences)で染色した。蛍光強度をMACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec)で計測した。

**qRT-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 (Hs04260\_366\_g1); ABCG2 (Hs0105370\_m1) (Applied Biosystems)

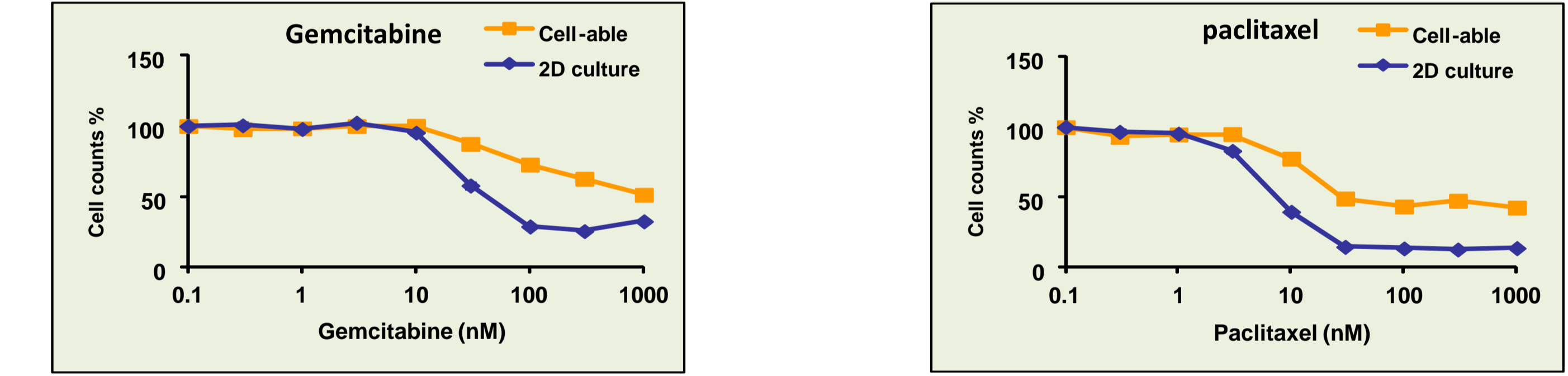
Results

Cell-able®プレートでの3次元培養

Cell-able®は、培養表面に100μm径の細胞接着領域サークルを配列した3次元培養プレートである。がん細胞をCell-able®に播種することにより、細胞は接着領域に集まって接着し、増殖してスフェロイドを形成する。

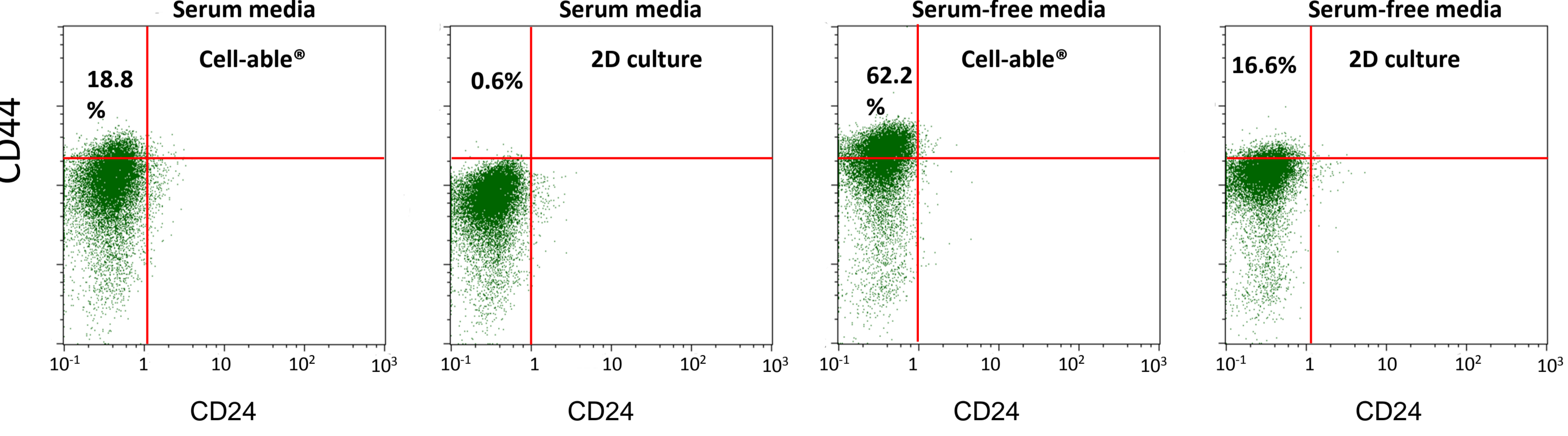


Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイドにおける抗がん薬感受性



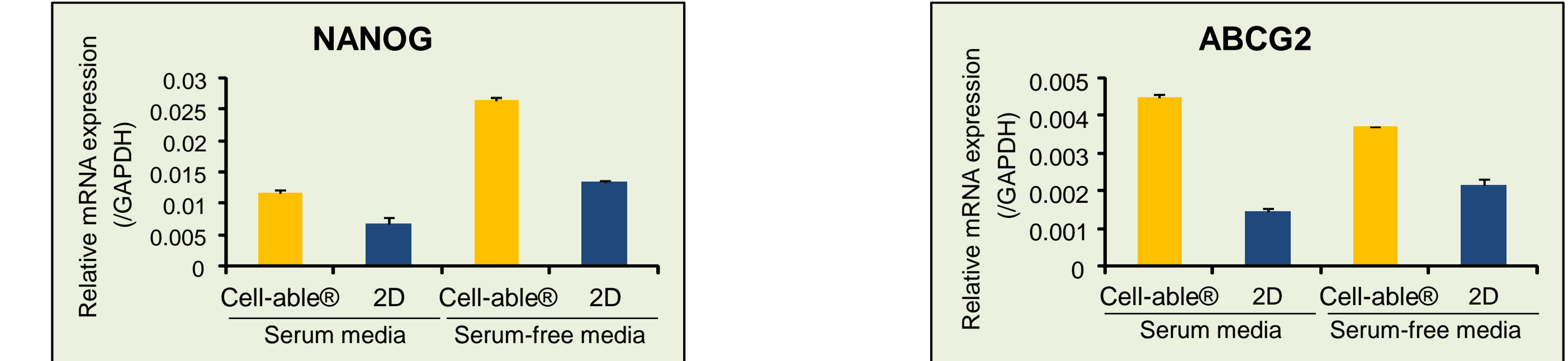
Cell-able®で培養したスフェロイドと2次元培養細胞の、Gemcitabine又はPaclitaxel (PTX)に対する薬物耐性を比較した。培地はserum mediaを用い、薬物を3日間曝露し、生細胞数をCellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ)で測定した。いずれの薬物でも、2次元培養細胞に比較して、スフェロイドの薬物に対する耐性が高くなっていた。

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<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>



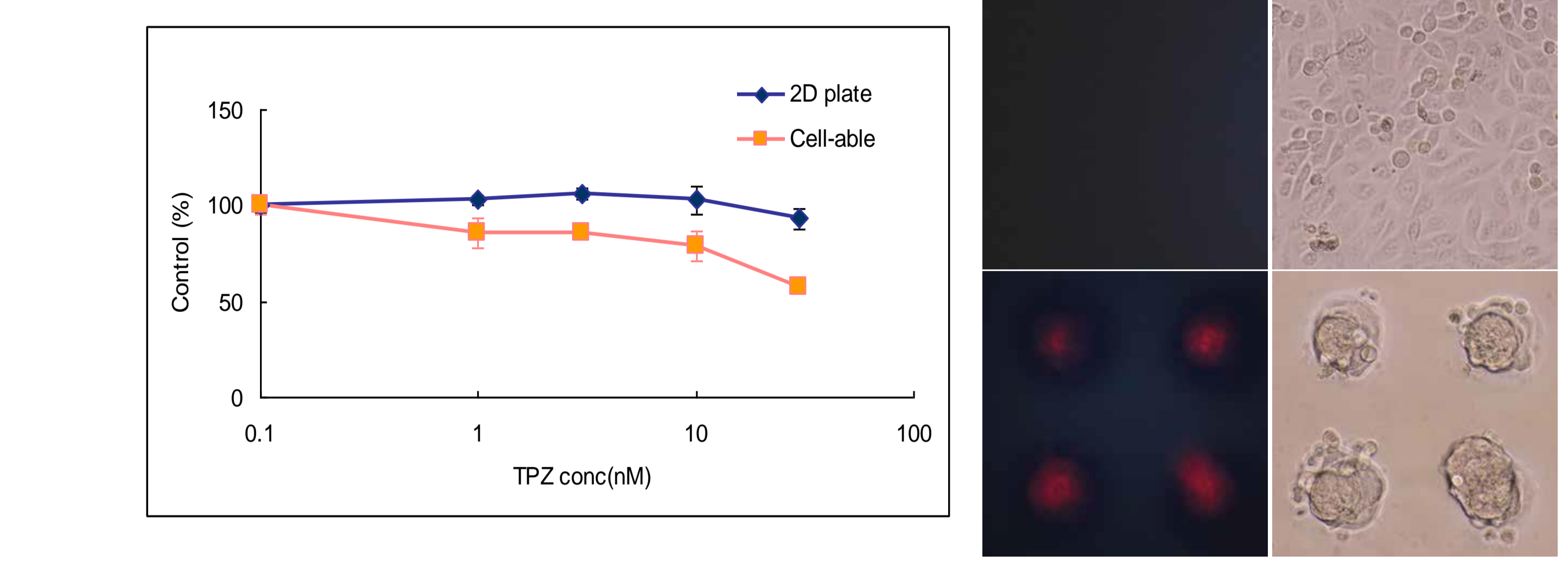
DU145をCell-able®でスフェロイド培養した場合と、2次元プレートで単層培養した場合の、CD44及びCD24 表面抗原をFACSを用いて比較した。2次元培養と比較して、スフェロイド培養ではCD44+/CD24-細胞の割合が高い結果を示した。また、2次元培養、スフェロイド培養とも、同一の培養方法においては、serum mediaよりserum-free mediaで培養した細胞でCD44+/CD24-細胞の割合が高くなる傾向を示した。

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



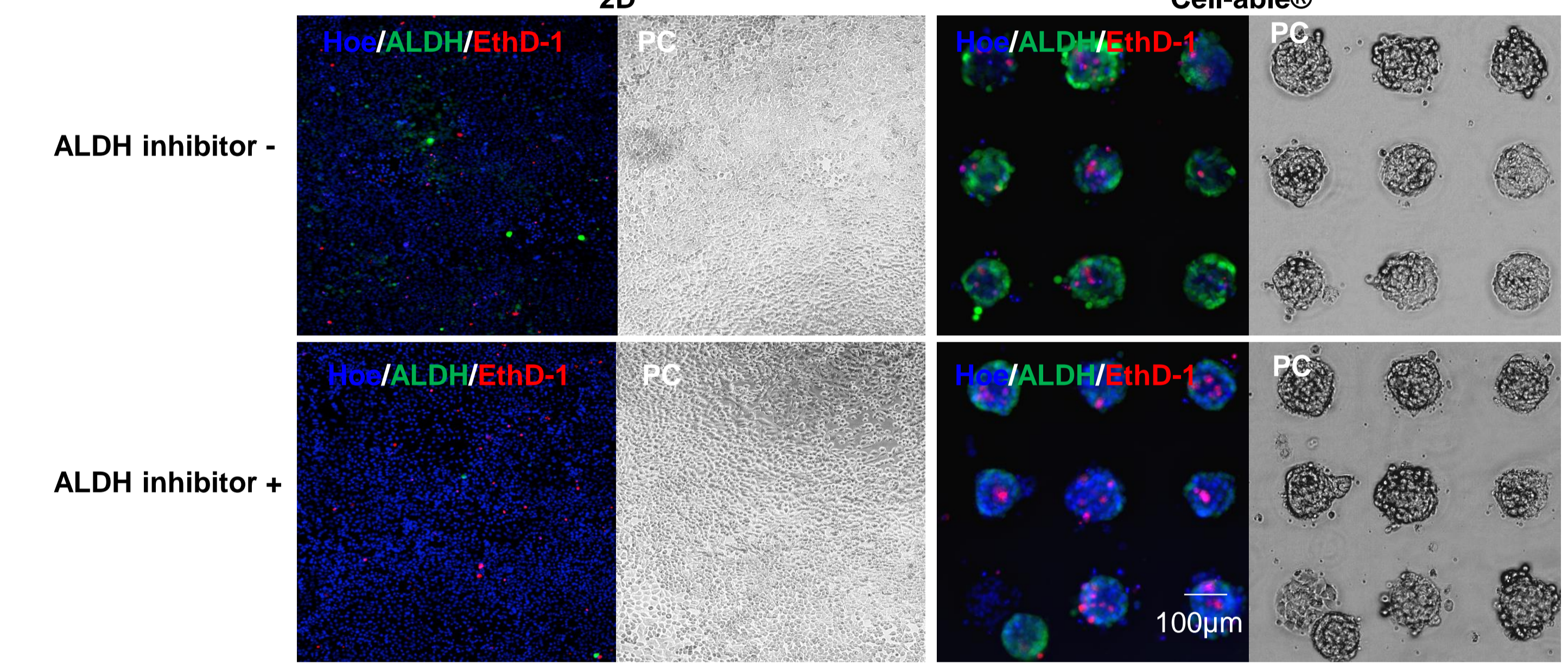
DU145を、serum media 又はserum-free mediaを用いてスフェロイド培養及び2次元培養し、NANOGとABCG2の遺伝子発現量をqRT-PCRで比較した。その結果、両遺伝子とも、2次元培養と比較してスフェロイド培養細胞で高発現であった。

Cell-able®で培養したがん細胞スフェロイド内の低酸素環境



Tirapazamine (TPZ)は低酸素細胞に特異的に細胞毒性を示す抗がん薬である。Cell-able®または2次元プレートでヒト前立腺がんDU145を培養し、TPZを24時間曝露した後、生細胞数をCellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability Assayを用いて測定した。この結果、Cell-able®で培養した場合のみ、生細胞数の減少が認められた(左グラフ)。写真は、低酸素の度合いを低酸素蛍光プローブLox-1 (Scivax)を培地に添加し、DU145をCell-able®で培養した場合と2次元プレートで培養した場合の低酸素の度合いを比較した。赤い蛍光が低酸素状態を示す。写真 左: Lox-1 染色、右: 明視野 ; 上段: 2次元培養、下段: Cell-able®培養

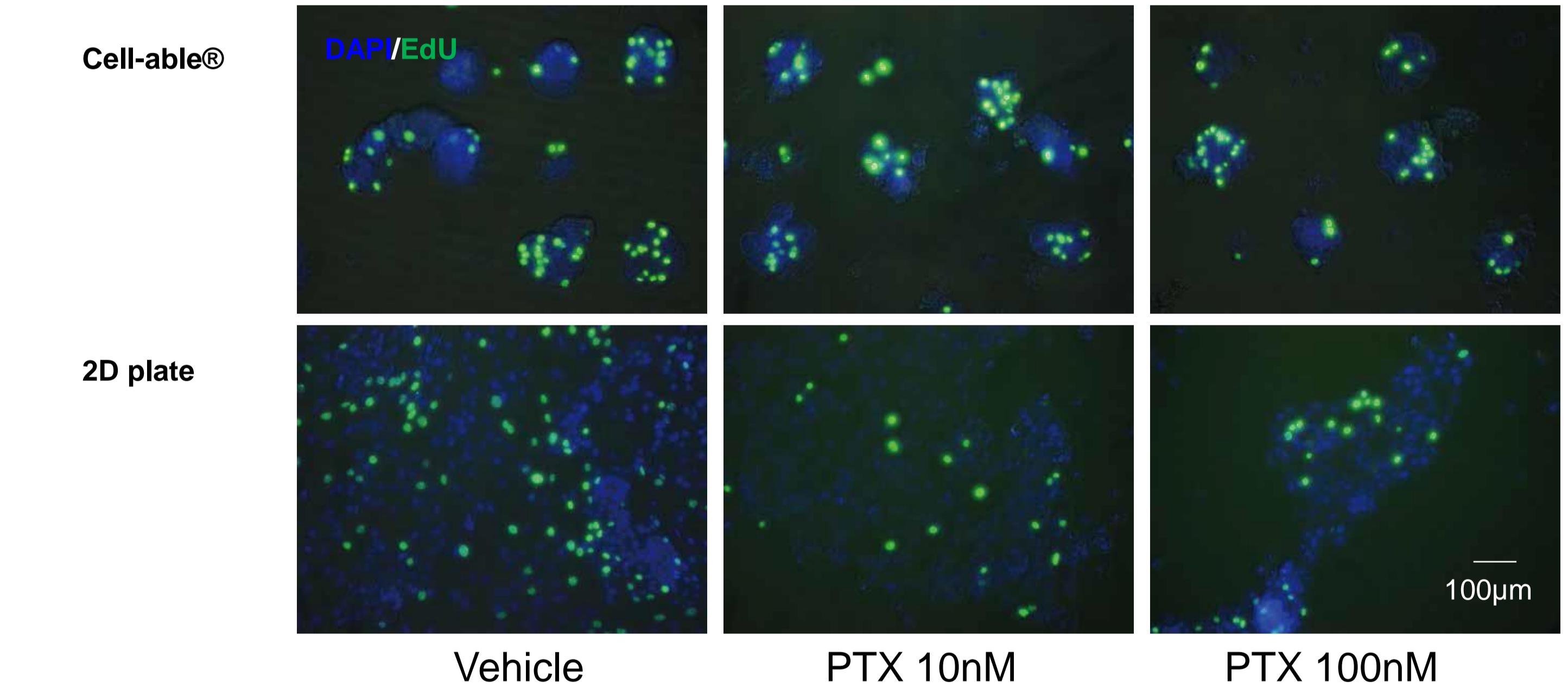
Cell-able®スフェロイドにおけるALDH活性



A549をCell-able®又は、2次元プレートで培養した。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 (Invitrogen)で染色した。ALDH<sup>high</sup>細胞の割合が2次元培養に比較して3次元スフェロイド培養で多くなる傾向がみとめられ、ステム様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) Molecular Devices

Cell-able®で培養した患者由来のがん細胞の抗がん薬感受性



患者由来細胞子宮内膜がん細胞をCell-able®または2次元培養プレートで培養し、PTXに対する薬物耐性を比較した。子宮内膜癌組織をコラーゲナーゼで消化して回収したがん細胞をCell-able®または2次元培養プレートに播種して2-3日間培養した。PTXを72時間曝露し、核をDAPI (青)、EdUの取り込みをEdU Cell Proliferation assay (緑) (Invitrogen)で染色した。PTXの濃度依存的に細胞の増殖抑制が観察されたが、2次元培養と比較して、Cell-able®で培養したがん細胞は、PTXに対して耐性を示した。

画像取得: ImageXpress micro (モレキュラーデバイス) Molecular Devices

- ✓Cell-able®で培養されたDU145や患者由来のがん細胞スフェロイドは、2次元培養細胞より抗がん薬に対する耐性が高い結果を示した。
- ✓Cell-able®で培養されたスフェロイドにおいて、ステムマーカーであるCD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>の細胞の割合が2次元培養より多い傾向を示した。また、NANOG, ABCG2遺伝子も2次元培養と比較して高発現であった。
- ✓CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>の細胞は、serum mediaよりserum-free mediaで培養した場合のほうが、割合が多かった。NANOGとABCG2もserum mediaよりserum-free mediaで培養した場合のほうが高発現であった。
- ✓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した。低酸素細胞に対し毒性を示すTPZの曝露でスフェロイド培養では生細胞数が減少した。

Conclusion

Cell-able®上で培養したがん細胞スフェロイドは、2次元培養細胞と比較してより生体内に近いモデルであると考えられた。よって、Cell-able®上で培養したがん細胞スフェロイドは抗がん薬のスクリーニングや試験のツールとして、有用であると考えられる。