

HydroCell® を利用した がん細胞株スフェロイド形成

がん細胞の *in vitro* 研究において、従来用いられていた単層培養ではなく、より生体内のがんに近いと考えられる細胞塊（スフェロイド）培養が注目されています。ある種の抗がん剤の培養細胞での作用は、単層培養した場合とスフェロイドとは異なる挙動を示すことがあります。また、がん再発の原因のひとつとして注目されているがん幹細胞は、がんスフェロイドを形成すると共にスフェロイド内で増殖および維持されていることが明らかになってきました。さらに、これらのがんスフェロイドから分泌されるエクソソームは癌の転移にも関係しています。このようにがんスフェロイドは、薬剤スクリーニングに加えて、がんの発生や転移メカニズムにおいても注目されています。

細胞のスフェロイドの *in vitro* 形成には、ハンギングドロップ法、旋回培養法、低付着性培養容器による培養などが知られています。これらの方法のうち、低付着性培養容器による培養法では、操作が簡便なことから多く使用されています。通常の培養容器で増殖した付着性の細胞は、低付着性の容器で培養すると、細胞自身が持つ性質により、細胞同士が付着してスフェロイドを形成します（図 1）。この際、細胞が少しでも培養容器に付着すると、スフェロイドがいびつな形になったり、形成効率が低くなるため、より低付着性の培養容器を使用する事が重要です。



通常の組織培養用容器で培養



低付着性培養容器で培養

（図 1）低付着性培養容器によるスフェロイドの形成

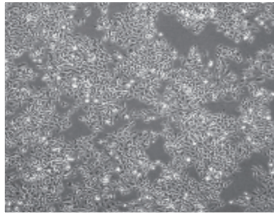
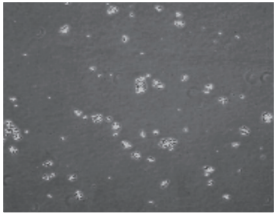
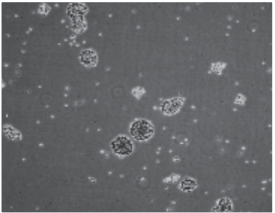
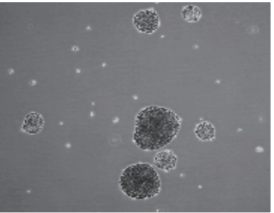
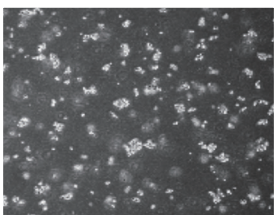
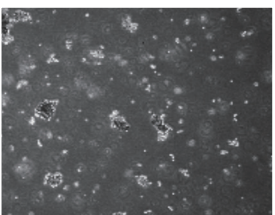
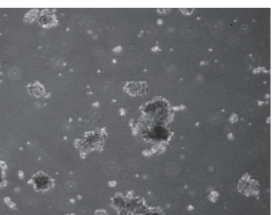
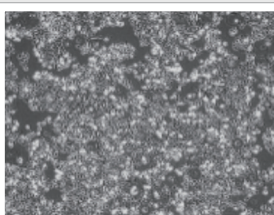
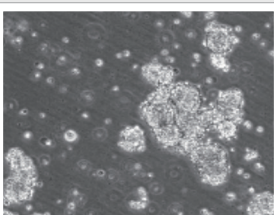
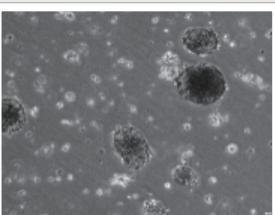
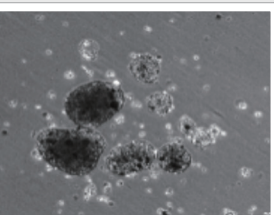
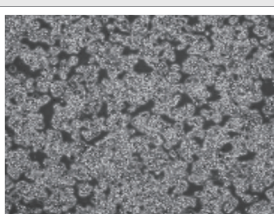
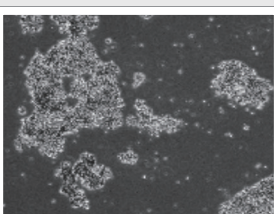
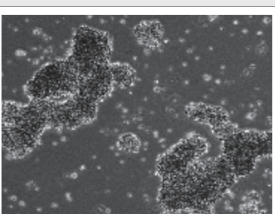
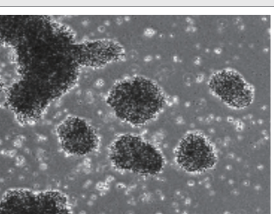
セルシード社の **HydroCell®** は、超親水性ポリマーを培養表面に固定化させた超低付着性細胞培養器材で、マイクロファージの浮遊培養、ニューロスフェア、ES 細胞での胚様体形成、等様々な細胞種でのスフェロイド形成

の実績があります。本稿では、**HydroCell®** を使用した癌細胞株のスフェロイド形成方法と実績についてご紹介いたします。

HydroCell® フラスコを利用したがん細胞株スフェロイドの大量培養

福島県立医科大学 医療一産業トランスレーショナルリサーチセンターでは、多種のがん細胞株を平面培養およびスフェロイドを作製し、遺伝子発現解析やゲノム解析、プロテオーム解析による網羅的な解析データベースを構築し、これらのデータを活用して、薬剤感受性試験などに活用しています。セルフアクトリー部門では、スフェロイドによる新規化合物のスクリーニング系を構築しています。ここでは、これらの解析に使用するために超低付着性細胞培養器材 **HydroCell®** のフラスコ

タイプを用いて、複数の解析に用いるのに十分なスフェロイドの調製を行いました。以下にその方法と結果を示します。細胞は $3-7 \times 10^6$ cells/**HydroCell®** T75 フラスコで播種し、それぞれの推奨培地で 6-10 日間培養し、スフェロイドの形成を行った。その結果、神経がん細胞、皮膚がん細胞、膵臓癌細胞、卵巣がん細胞など様々な組織由来のがん細胞株において、播種後 2-6 日後にスフェロイドの形成がみられました（図 2）。

	接着系培養フラスコ	<i>HydroCell</i> [®]		
	<i>HydroCell</i> [®] 播種前日	播種翌日	播種 3日後	播種 6日後
LN-229 (神経がん細胞)				
SH-4 (皮膚がん細胞)	<i>HydroCell</i> [®] 播種前日	播種翌日	播種 3日後	播種 5日後
				
PK-1 (膵臓がん細胞)	<i>HydroCell</i> [®] 播種前日	播種翌日	播種 2日後	播種 6日後
				
COV434 (卵巣がん細胞)	<i>HydroCell</i> [®] 播種前日	播種翌日	播種 4日後	播種 5日後
				

(図 2) 種々のがん細胞種による *HydroCell*[®] フラスコでのスフェロイド形成
成データ提供：福島県立医科大学 高木基樹教授

また、同様に種々の癌細胞株で*HydroCell*[®]フラスコを用いてスフェロイドの形成を行ったところ、42種類の様々な組織由来のがん細胞株でスフェロイドの形成が確認されました(表 1)。

これらの結果から、*HydroCell*[®]は、様々ながん細胞種においてスフェロイドの形成に適しており、複数の解析に使用するために必要な量のスフェロイドの調製には、T75フラスコが有用でした。

(表 1) **HydroCell®** フラスコでスフェロイドを形成したがん細胞株と由来がん種

	細胞名	がん種		細胞名	がん種
1	1-7HB2	乳	22	LU99B	肺
2	8305C	甲状腺	23	MB 157	乳
3	ASH-3	甲状腺	24	MTSV1-7 CE1	乳
4	COV434	卵巣	25	NCCIT	テラトカルシノーマ
5	D283 Med	神経	26	NCC-IT-A3	テラトカルシノーマ
6	Daoy	神経	27	NCI-H1770	肺
7	EFM-19	乳	28	NCI-H2106	肺
8	HRT-18G	大腸	29	NCI-H2228	肺
9	Hs 343.T	乳	30	NCI-H841	肺
10	Hs 362.T	乳	31	NEC14	テラトカルシノーマ
11	Hs 742.T	乳	32	NEC8	テラトカルシノーマ
12	Hs 748.T	乳	33	NIH:OVCA-3	子宮
13	Hs 852.T	皮膚	34	NTERA-2 cl.D1	テラトカルシノーマ
14	Hs 906(B).T	皮膚	35	ONS-76	神経
15	Hs 936.T(C1)	皮膚	36	PA-1/6TG-r	テラトカルシノーマ
16	HTC/C3	甲状腺	37	PK-1	脾臓
17	IHH-4	甲状腺	38	SH-4	皮膚
18	ITO-II	テラトカルシノーマ	39	SK-PN-DW	神経
19	KHM-5M	甲状腺	40	sNF94.3	神経
20	KMH-2	甲状腺	41	TCO-1	甲状腺
21	LN-229	神経	42	Tera-2	テラトカルシノーマ

データ提供：福島県立医科大学 高木基樹教授

メチルセルロースを使用した均一なスフェロイド形成法

培地の粘性を高めて、細胞やスフェロイドの接触を抑制する事により、均一な大きさのスフェロイド形成を促進する事が可能です。ここでは、増粘剤として、0.6% のメチルセルロースを添加します。0.6% の濃度では、ハンドリングには影響が少なく、かつ細胞間の接着を抑制する事が可能です (図 3)。

方法

- ① Methyl cellulose, viscosity 400 cPs (富士フィルム和光純薬株式会社, Code 043147) 2.6g を 80-90℃の精製水 (25mL) に徐々に添加し、激しく浸透して十分に溶解する。
- ② 4℃の精製水 (75mL) を加えて激しく浸透後、4℃以下で 3 時間以上、液が半透明になるまでマグネチックスターラーで攪拌する。121℃、10分間オートクレーブ滅菌する。滅菌溶液は、4℃以下で 24 時間以上保存し、透明な状態にする。
- ③ ②の溶液に等量の 2 倍濃度の培地 (2xMEM 等) を添加し、室温で数時間マグネチックスターラーで拡販し、1.3% のメチルセルロース溶液とする。
- ④ 細胞の懸濁液に終濃度が 0.6% になるように③の 1.3% メチルセルロース溶液を添加し、混和する。
- ⑤ 細胞密度が 10,000cells/cm² 以下になるように **HydroCell®** に播種する。
- ⑥ 3 日間、5 %炭酸ガスインキュベーターで培養。



A-549



NRK

(図 3) 0.6% メチルセルロース添加により形成したスフェロイド

まとめ

HydroCell® を使ったがんスフェロイドの作製は、がん種を選ばず、多種多様ながん細胞株でのスフェロイド形成が確認された。また培養条件検討や前処理などが不要なため、多種のがん細胞を扱う研究において有用でした。

また、**HydroCell®** は、ディッシュタイプ (3.5cm, 6cm, 10cm)、マルチウェルプレート (6 穴、12 穴、24 穴、48 穴、96 穴) およびフラスコタイプ (T25 および T75) が使用可能である。このことは、同じ培養条件でのスケールアップやスケールダウンが容易であり、単一スフェロイドを用いた細胞アッセイにおいても、複数種の解析を行うためのスフェロイドの大量調製まで、幅広い用途での使用が期待されます。

【謝辞】

福島県立医科大学 医療—産業トランスレーショナルリサーチセンター セルファクトリー部門の高木基樹教授および比嘉亜里砂先生には、がん細胞株のスフェロイド培養実績についてのデータのご提供および本稿についてのご助言をいただきました事を感謝いたします。

参考資料

ふくしま国際医療科学センター 医療—産業トランスレーショナルリサーチセンター ホームページ

<https://www.fmu.ac.jp/home/trc/>

HydroCell® 超低付着性細胞培養器材

品名	サイズ (mm)	表面積	容量	品番	包装	希望販売価格 (税込)
96 穴平底マルチウェル	86 (L) × 128 (W)	0.33cm ² /well	0.4mL/well	CS2001	20 枚	¥58,300
				CS2011	5 枚	¥16,500
24 穴マルチウェル		1.9cm ² /well	1mL/well	CS2006	20 枚	¥58,300
				CS2016	5 枚	¥16,500
12 穴マルチウェル		3.5cm ² /well	2mL/well	CS2002	20 枚	¥58,300
				CS2012	5 枚	¥16,500
6 穴マルチウェル		9.6cm ² /well	3mL/well	CS2008	20 枚	¥58,300
				CS2018	5 枚	¥16,500
10cm ディッシュ	92 (D) × 21 (H)	56.7cm ²	12.5mL	CS2003	20 枚	¥39,600
				CS2013	5 枚	¥12,100
6cm ディッシュ	60 (D) × 15 (H)	21.5cm ²	5mL	CS2004	20 枚	¥33,000
				CS2014	5 枚	¥9,900
3.5cm ディッシュ	40 (D) × 12 (H)	8.8cm ²	3mL	CS2005	20 枚	¥26,400
				CS2015	5 枚	¥8,800
T75 フラスコ	81 (W) × 125 (L) * * キャップおよびネックを除く	75cm ²	260mL	CSF075	20 個	¥46,200
T25 フラスコ	50 (W) × 76 (L) * * キャップおよびネックを除く	25cm ²	70mL	CSF025	12 個	¥18,700

※仕様は改良のため、予告なく変更する事があります。

※本製品は、医療機器ではなく、研究用に限定しております。医薬品の製造、品質管理、各種診断および研究などその使用目的にかかわらず、人体には使用しないでください。

販売代理店

販売代理店