

The Nunclon Sphera surface supports formation of three dimensional cancer spheroids in suspension

Louise Gaarn, Tina Marwood, Robert Scott, Stephanie Carter, Joseph Granchelli, and Cindy Neeley

Nunclon Sphera表面における 浮遊状態での効率的な3次元がん細胞スフェロイド形成サポート

【キーワード】

Nunclon Sphera、がん細胞スフェロイド、低細胞接着、3次元細胞培養

【序文】

単層細胞培養は多くの種類のがん細胞を用いた広範な *in vitro* 実験に用いられていますが、がん細胞スフェロイドの3次元 (3D) 培養はより *in vivo* 環境に類似しているため、単層細胞培養以上に正確な腫瘍生物学の理解を深めることができます。

ここで、我々は *in vitro* でのがん細胞スフェロイド形成を恒常的にサポートする「Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™」という新しい細胞培養表面を紹介致します。Nunclon Sphera表面コーティングは、通常、細胞接着を仲介する細胞外マトリックスタンパク質 (コラーゲンI、ファイブロネクチンなど) の吸着を阻害することで培養ディッシュへの細胞接着を阻害します。このことはNunclon Sphera表面への接着細胞株 (Vero、A549、U937 など) の接着の抑制という結果により裏付けられています。表面の性能はNunclon Spheraディッシュ上でHeLa、MCF7、HepG2、Panc-1、Saos-2、A549を含む幾つかの一般的に使用されるがん細胞株のがんスフェロイド形成により確認されています。Nunclon Sphera表面の無欠性と一貫性はP19.CL6がん幹細胞のスフェロイド培養でも追確認されました。また、比較的低濃度で細胞を播種した場合、P19.CL6スフェロイドは容量が大きくなるのに時間がかかりました。また、未処理ペトリディッシュとの比較では、未処理ペトリディッシュは有意に細胞が接着してしまい、がんスフェロイド形成ができませんでした。

【イントロダクション】

単層培養システムを用いた *in vitro* 細胞生物学の研究は、細胞が *in vivo* で受けている複雑な環境を必ずしも正確に反映していません。細胞と細胞外マトリックス間の不可欠な相互作用はしばしばこれらの単純な培養システムでは反映されていません。一方、3次元 (3D) 細胞培養システムは複雑な相互作用をより良く模倣し、細胞生物学の広いアプリケーションに最も有効な培養法です。ヒトがん生物学では、3D培養システムは腫瘍細胞プロGRESSIONや抗がん剤に対する感受性を研究する目的で、腫瘍の細胞塊フェロイドを形成するために使用することができます。しかしながら、がんスフェロイド形成の変動性は、培地組成、容量、細胞密度、培養期間、特に培養ディッシュとの細胞相互作用の変化に関する恒久的な問題です。そのため、一貫した結果というものは、上質な低接着の特長を有する高品質な培養表面を使用することでのみ成し遂げることができます。本アプリケーションノートにおいて、我々は表面の変動性を最小化し、*in vitro* で安定したがんスフェロイド形成をサポートする親水性ポリマーでコーティングしたThermo Scientific Nunclon Spheraを紹介致します。



【実験の詳細】

ECMタンパク質非特異的結合

Nuncun Sphera 96 ウェルプレートとNuncun Delta (標準的な細胞培養処理) 96 ウェルプレートを100 μ L の24 μ g/mL FITC 標識ウシコラーゲンタイプIまたは20 μ g/mL TAMRA 標識ファイブロンクチンでコートしました。プレートは2–8℃でそれぞれ24時間または16時間インキュベートしました。溶液を吸引し、プレートを200 μ L のPBST (0.05% Tween20 in PBS) で3回洗浄しました。蛍光強度をPOWERSCAN MX (DS pharma) を用いて、コラーゲンに対してはEx495/Em525、ファイブロンクチンに対してはEX543/Em570 で測定しました。

細胞接着

U937 細胞は接着試験の前に分化させました。簡単に説明すると、U937 細胞は10ng/mL のphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で1日間培養しました。その後、細胞をPMA を含まない培地で2日間培養しました。接着試験では分化したU937とその他2種類の細胞株 (VERO、A549) を用いました。細胞を6ウェルマルチディッシュに 1.5×10^5 cells/cm² (U937) または 4×10^4 cells/cm² (VEROとA549) で播種しました。30分 (U937) または24時間 (VEROとA549)、37℃、5% CO₂ でインキュベートした後、培養ディッシュを洗浄し、残った細胞を2% Triton in PBS (DPBS) で溶解しました。ディッシュを30分間インキュベートした後、100 μ L のライゼートを96 ウェルプレートの各ウェルに移しました。アッセイは490nm の波長でサンプルの蛍光強度を得るために市販のキット (Roche, 11644793001) を用いて行いました。培養ディッシュに接着した細胞数を決定するため、サンプル示度を既知量で作成された標準と比較しました。結果を標準的な細胞培養処理をした培養ディッシュの結果でノーマライズしました。

がん細胞株の培養

様々な低細胞接着ディッシュでスフェロイドを形成する前に、がん細胞株 (HeLa、HepG2、A549、MCF7、P19.CL6、Panc-1、Saos-2) を10–15% FBS (SH3007103) を含む適当なHyClone培地を用い5% CO₂、37℃の条件でNuncun Delta表面で培養しました。

スフェロイド形成

HeLa、HepG2、A549、MCF7 細胞株をNuncun Spheraと他社ブランドCの6ウェルマルチディッシュに10% FBS (SH3007103) を含む適当なHyClone培地を用い 2×10^4 cells/well (HeLa、HepG2、A549) または 4×10^4 cells/well (MCF7) で播種しました。未処理および細胞培養処理したディッシュにも対照として播種しました。細胞を5% CO₂、37℃の条件でインキュベートし、新鮮な培地を2–3日後に添加しました。7日後に細胞の写真を撮影し、スフェロイドサイズ、スフェロイド数、ウェル中の総細胞数を測定しました。

がんスフェロイド増殖におけるNuncun Spheraの影響をモニターするためP19.L6がん幹細胞をU底の96ウェルNuncun Spheraに500、1,000、2,500、5,000、10,000 cells/wellの密度で播種しました。細胞を5日間インキュベートし、スフェロイドサイズを顕微鏡により1、3、5日で測定しました。

Extracellular Matrix Adsorption

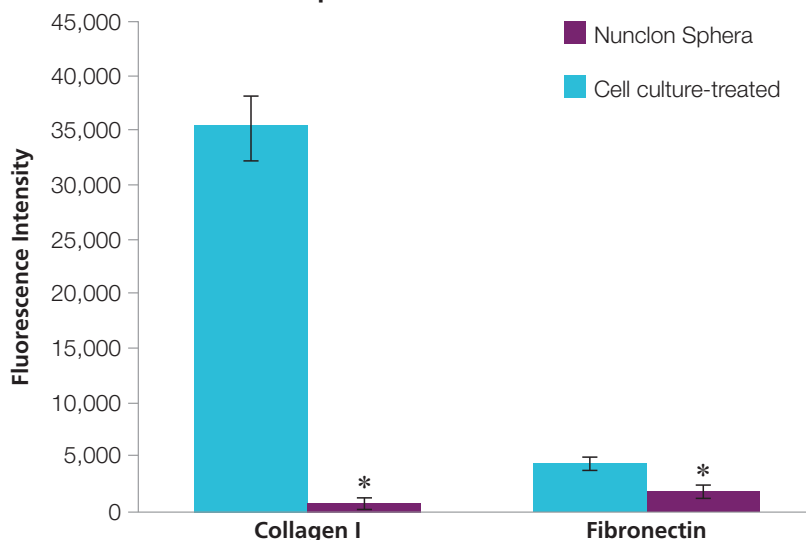


Figure 1

Nuncun Sphera表面へのコラーゲンIとファイブロンクチンの吸着は、標準的な細胞培養処理表面と比較してきわめて低い。
(* Student's T test, $p < 0.01$)

【結果と考察】

Nunclon Sphera表面へのECMの吸着はきわめて低い

一般的なECMタンパク質は培養表面への細胞接着を仲介することが知られています。Nunclon Sphera表面は接着細胞を浮遊状態でスフェロイドを形成させるため、プラスチック表面へのECMの結合を阻害することによって、細胞-細胞結合を介した細胞の凝集を助長すると考えられています。この研究の中で、コラーゲンIとファイブロネクチンの吸着はNunclon Sphera表面で最小化されています。このことは、ECMタンパク質溶液を一晩インキュベートした後に、もっとも低い蛍光強度であったことにより証明されました (**Figure 1**)。さらに、このことは標準的な細胞培養処理表面と異なり、Nunclon Sphera表面がECM結合能を最小化し、結果として表面への接着ができなくなることを示唆しています。

表面への細胞の接着はNunclon Spheraではきわめて低い

Nunclon Sphera表面への接着細胞の接着性の低さを証明するため、Nunclon Sphera表面、他社の低接着表面 (ブランドC) または非接着細胞用として一般に使用されている未処理ポリスチレンを用いて接着細胞の量を測定しました。さらに、標準の接着細胞ディッシュを接着細胞のポジティブコントロールとして使用しました。Nunclon Sphera表面は全ての細胞種に対して実際に非接着であることを示しましたが、ブランドCは分化したU937細胞に対して若干、接着性を示しました (**Figure 2**)。未処理ポリスチレン表面は細胞培養処理表面に匹敵する有意な細胞接着を示しました。それはおそらく血清と豊富なECMタンパク質が存在していることが理由と考えられます。

未処理ポリスチレン表面はスフェロイド培養には適していませんでしたが、低接着な性能を有するNunclon Sphera表面はこのアプリケーションにおいて実用的であることが示されました。

Minimal Cell Adhesion on Nunclon Sphera Surface

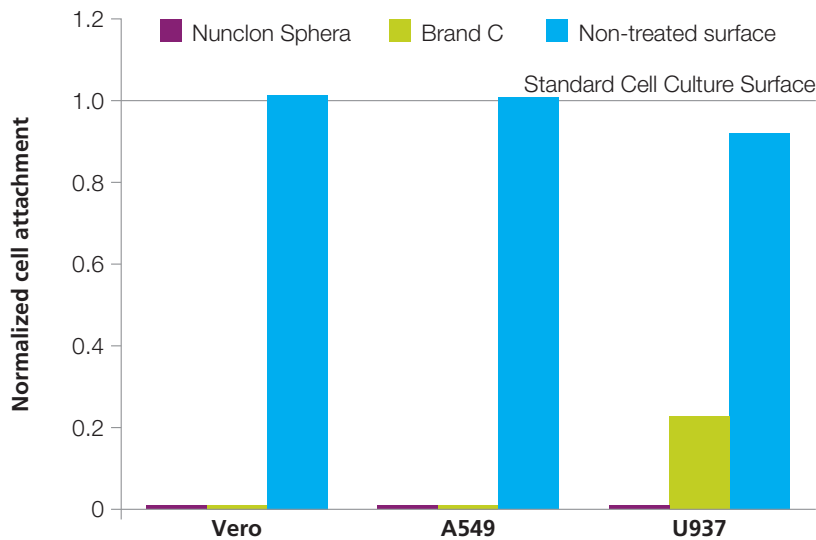


Figure 2

細胞接着は全ての細胞種に対して、細胞培養表面や未処理に比べてNunclon Sphera表面がとて低かった。Nunclon Sphera表面はU937細胞を用いた場合、ブランドCよりも有意に低い接着性を示した。

P19.CL6 Spheroid Formation Over Time

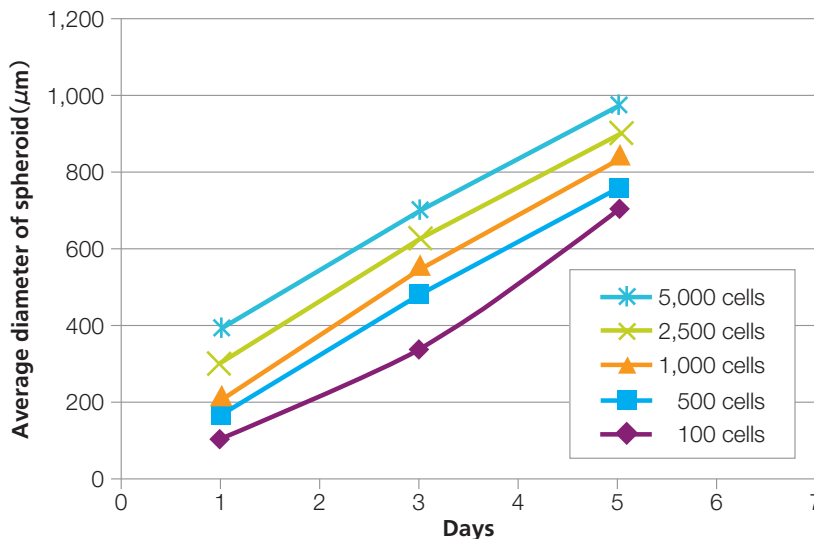


Figure 3

Nunclon Sphera表面で培養した場合、がん幹細胞スフェロイドのサイズは一貫して増大し、そのサイズは初期の細胞播種密度に相関していた。

Nunclon Sphera表面は細胞の増殖に対して有害な影響を有さない。

細胞がNunclon Spheraに接着しない一方で、表面コーティングが細胞の通常の増殖を阻害しないことを証明することが重要です。細胞の増殖能を調べるため、P19.CL16マウスがん幹細胞をNunclon Spheraに5種類の異なる細胞密度で播種しました。その結果、スフェロイドは5日間増殖続けました。スフェロイドのサイズは最低密度の場合に約6.5倍、最高密度の場合に2.5倍に増加しました (**Figure 3**)。これらの結果は播種細胞数がスフェロイドの増殖速度に影響することを示唆しています。また、全ての初期播種密度のスフェロイドが増加出来たという事実は、Nunclon Spheraポリマーコーティングが細胞生存率や増殖に悪影響を与えないことを示しています。

Nunclon Sphera表面は多種のがん細胞株のスフェロイド形成と増殖を支持する。

培養における細胞低接着表面の重要な要素は、3Dスフェロイドの形成および増殖のパフォーマンスです。これを検討するため、数種のがん細胞株をNunclon Sphera、他社製品ブランドC表面、未処理ペトリディッシュを含む数種の低接着表面で培養しました。標準の細胞培養処理Nunclon Deltaディッシュをスフェロイド形成のネガティブコントロールとしました。スフェロイドの形成と増殖能を培養1週間後に査定しました。顕微鏡観察により、Nunclon Sphera表面が全ての細胞株のスフェロイド形成をサポートし、スフェロイドが健康で正常な形態を維持することを示しました。 (**Figure 4**) ブランドCはサイズがやや不均一なスフェロイドを形成しましたが、Nunclon Sphera表面とほぼ類似し

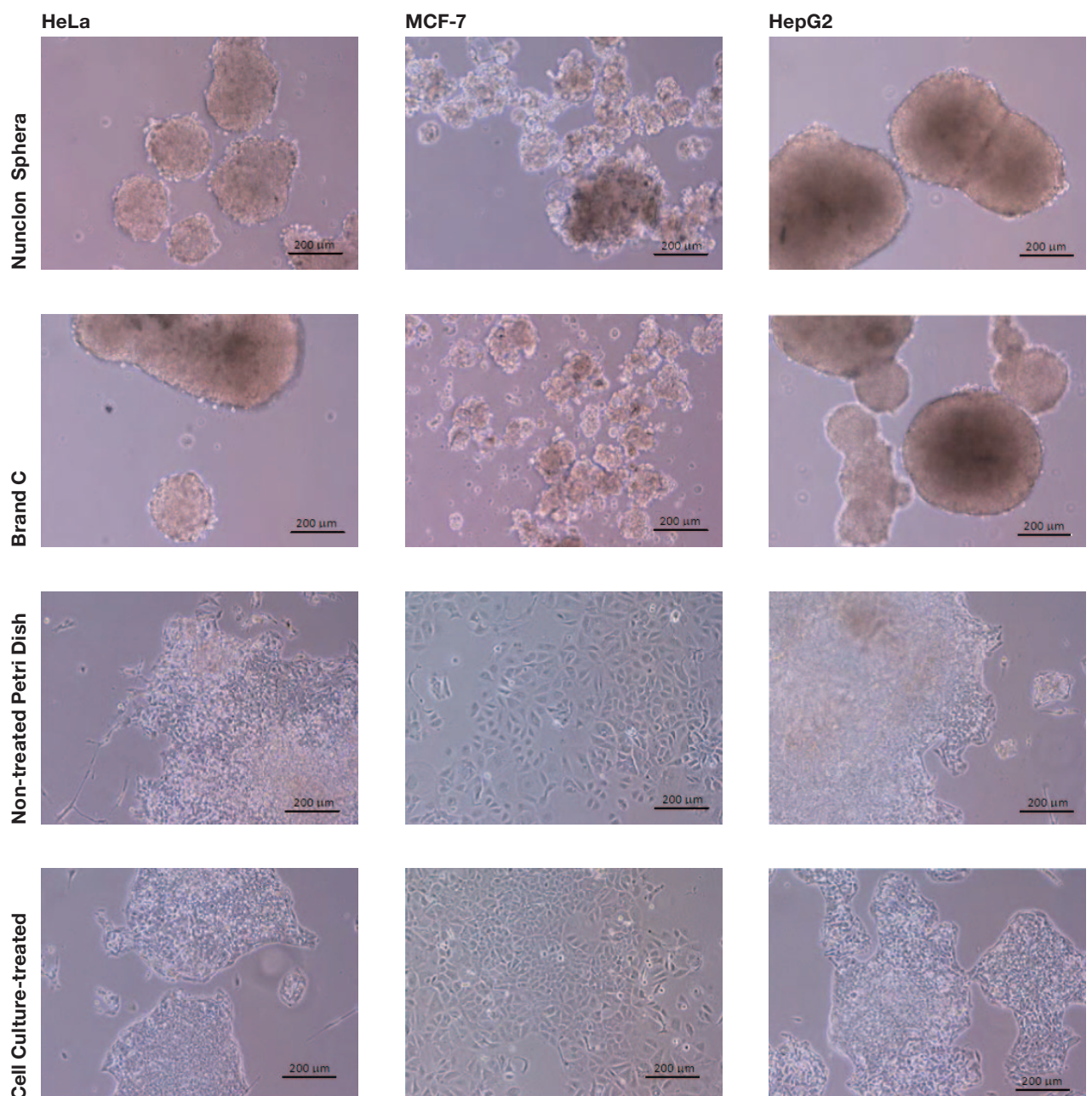


Figure 4

Nunclon Sphera表面は効果的に培養中のがん細胞スフェロイド形成をサポートします。HeLa、MCF-7、HepG2細胞はNunclon Sphera、ブランドC、標準的細胞培養&未処理ディッシュで増殖した。

た結果でした。(Figure 4) 興味深いことに、疎水性の高いポリスチレンから作製された通常浮遊細胞培養に使用される未処理ペトリディッシュには全てのがん細胞株が接着してしまいがん細胞スフェロイド増殖がうまく行きませんでした。(Figure 4) HeLa、MCF-7、HepG2細胞に加え、Panc-1、Saoa-2、A549細胞も同様の結果でした(データなし)。表面のパフォーマンスを定量化するため、培養1週間後のウェル内の細胞数と同様に、がん細胞スフェロイドのサイズと数を査定しました。Nunclon Sphera表面はスフェロイド数、スフェロイドサイズ、総細胞数など全てのカテゴリーにおいてブランドCと同様の結果を示しました(Figure 5)。

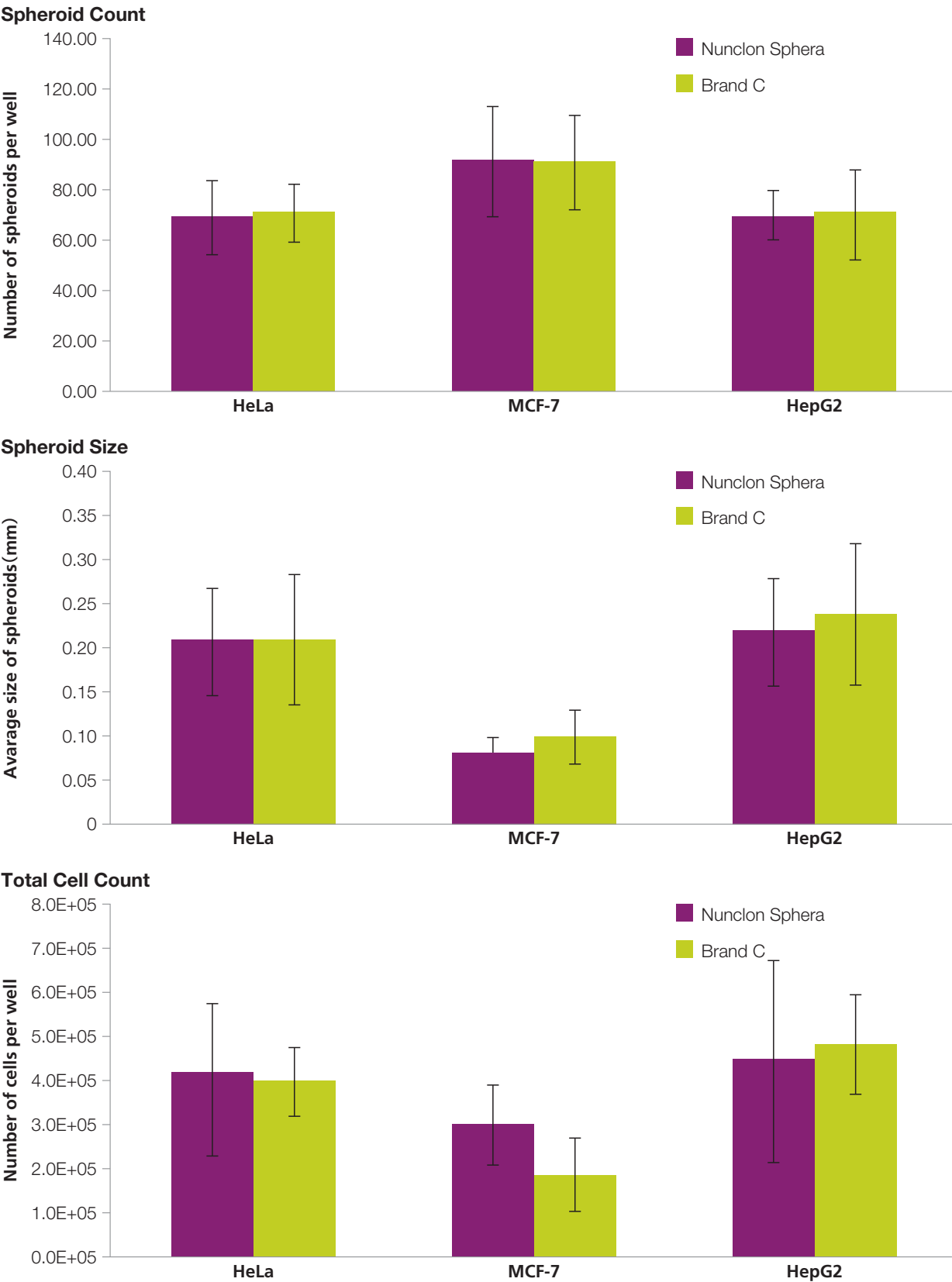


Figure 5
Nunclon Sphera表面は、スフェロイド数、スフェロイドサイズ、総細胞数においてブランドCと同等のパフォーマンスであった。

【結論】

Nunclon Sphera表面はECMの最小限の吸着およびきわめて低い細胞接着性を示し、数種の一般的ながん細胞のスフェロイド形成と増殖をサポート致しました。要するに、これらの結果はNunclon Sphera表面が3Dがん細胞スフェロイド培養において優れた選択であることを示しました。

- 最小限のECMタンパク質吸着と細胞接着性はNunclon Sphera表面の低接着性を裏付けています。
- Nunclon Spheraポリマーコーティングは、低密度細胞播種におけるがん細胞スフェロイドの数やサイズで示されたように、細胞生存率や増殖に悪影響を及ぼしませんでした。
- Nunclon Sphera表面は多くの異なるがん細胞株によるスフェロイド形成を効率的にサポートすることにより、スフェロイド増殖のための培養システムを提供し、*in vitro*での3Dがん細胞モデリングをサポート致します。

オーダーインフォメーション

カタログNo.	Description	Units per bag	Units per case
174925	Microwell 96U-Well Plate, Round Bottom, Well Volume 300 μ L	1	8
174927	Microwell 96F-Well Plate, Flat Bottom, Well Volume 400 μ L	1	8
174929	Microwell 96U-Well Plate, Round Bottom Bulk Pack	1	8
174930	Multidish 24-Well, Culture Area 1.9 cm ²	1	7
174931	Multidish 12-Well, Culture Area 3.8 cm ²	1	7
174932	Multidish 6-Well, Culture Area 9.6 cm ²	1	7
174943	Dish 35 MM, Culture Area 8.8 cm ²	5	20
174944	Dish 60 MM, Culture Area 21.5 cm ²	5	20
174945	Dish 90 MM, Culture Area 56.7 cm ²	5	20
174951	T25 Cell Culture Flask, Culture Area 25 cm ²	6	18
174952	T75 Cell Culture Flask, Culture Area 75 cm ²	4	24

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
ラボプロダクツ事業本部

お問い合わせ



TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671

info.LPG.jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp

販売店

2014.5.SK

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand