

EZSPHERE®を用いた休眠がん細胞モデルの構築

■細胞種：PC-3 前立腺がん細胞株

■細胞培養条件

- ① PC-3細胞を、EZSPHERE®容器に、下記濃度で播種。
(培地：RPMI1640培地+10% FBS + 1% ABAM)

●播種細胞数：

	S125	S250	S500
マイクロプレート1穴あたりの播種細胞数	1.25×10^5 cells	2.50×10^5 cells	5.00×10^5 cells
1微細wellあたりの播種細胞数	約 50 cells	約 100 cells	約 200 cells

AGCテクノグラス(株)製品

- EZSPHERE® 6well マイクロプレート
(品種コード：4810-900)

微細ウエル径： 約500 μ m
微細ウエル深さ： 約100 μ m
微細ウエル数： 約2,300well/1穴

- 培地量：3mL/マイクロプレート1穴
2日目に1mLの培地交換を行った。

- ② CO₂インキュベーターで4日間培養。

<< 休眠がん細胞とは? >>

[休眠がん細胞の特長]

- ・血管から遠いがん細胞は低酸素・低栄養などの要因により、細胞増殖が抑制された休眠状態になる。
- ・休眠がん細胞 (dormant cancer cells)は、既存の抗がん剤・放射線治療に対して抵抗性がある。
- ・休眠がん細胞は、低酸素・低栄養状態から解放されると、再増殖をするため、がん再発の一因である。

in vitroにおいて休眠がん細胞のモデルを構築することが難しく、研究が進んでいない。

「細胞増殖の抑制」のみでdormantであると主張している論文もあるが、増殖抑制のみでは細胞老化と区別がつかない為、以下の4項目を休眠がん細胞の特徴として検討を行った。

1. No proliferation
2. No death
3. Metabolic suppression
4. Recovery to active status

※参考文献

Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):834-46
Dormancy of Cancer Cells with Suppression of AKT Activity Contributes to Survival in Chronic Hypoxia, PLoS One. 2014 Jun 6;9(6):e98858.

<結果>

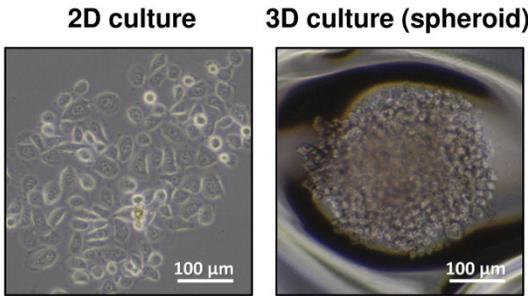
●休眠がん細胞の特徴を確認

1. No proliferation --- Result-2
2. No death --- Result-3
3. Metabolic suppression --- Result-4
4. Recovery to active status --- Result-5

Result-1 Spheroidおよび高密度な2D培養系の構築・低酸素領域の評価

培養4日後に、円状のSpheroid (S500)が作成された (Fig. 1)。また、共焦点顕微鏡において核染色 (Hoechst 33342)で染色し、Z stack画像を取得したところ、XY断面においては円状、XZもしくはYZ断面において三日月状、全体としては「おわん型」のSpheroid (S500)の作成に成功した (Fig. 2)。

共焦点顕微鏡による生存状態の細胞の観察ができることもEZSPHERE®の特徴の一つである。なお、Spheroidは一般的に、直径が200 μm を超えると中心が低酸素環境と言われているが、本Spheroidの厚さは80 μm 程度である。そのため、本Spheroidにおいて低酸素領域は存在しないと考えられる。Spheroid (S500)低酸素誘導因子 (HIFs)の発現も認められなかった (Fig. 3)。播種数とSpheroidの直径には正の相関が認められた (Fig. 4)。**EZSPHERE®ではSpheroidの大きさを簡単に制御することができた。**同様に2D培養においても播種数を変えることによって、異なる細胞密度環境を構築した (Fig. 5)。



Low Cell density High
Fig. 1 Images of a spheroid

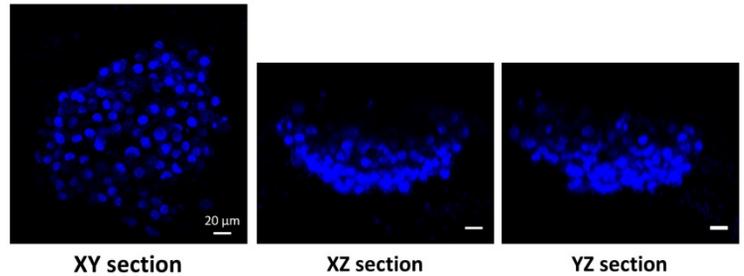


Fig. 2 Z stack images

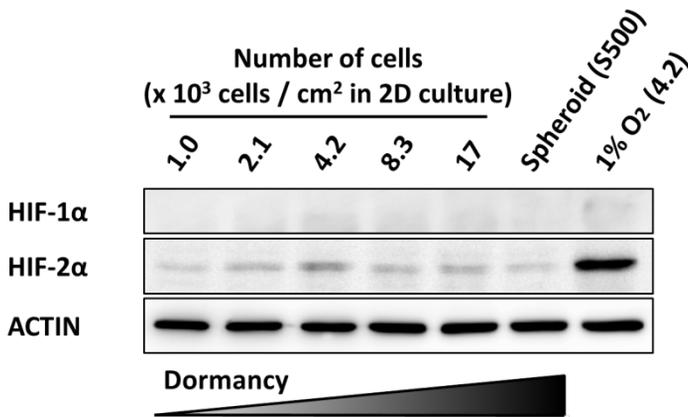


Fig. 3 HIFs expression (Western blotting)

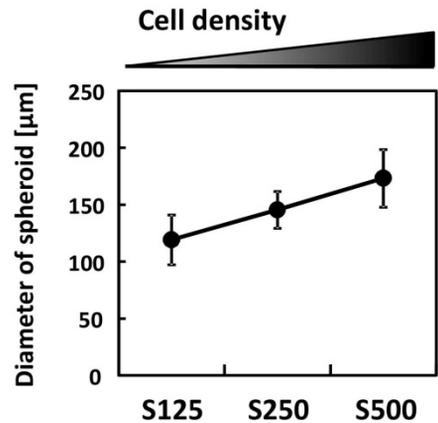


Fig. 4 Diameter of spheroids

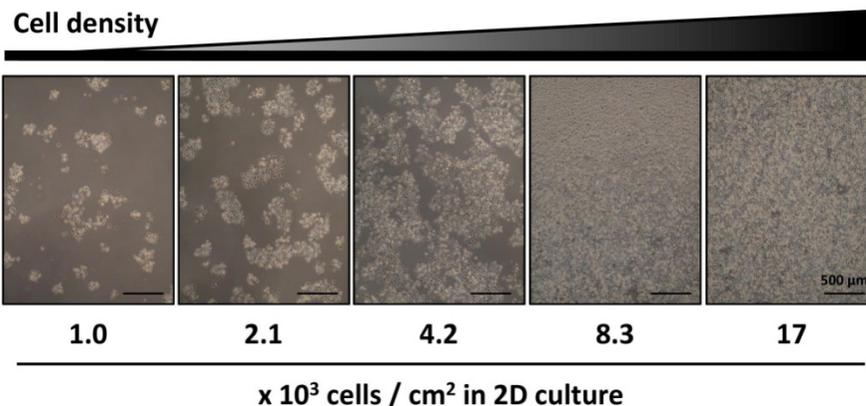


Fig. 5 Images of different cell density 2D culture

Result-2. 細胞増殖の評価 (Ki-67, BrdU陽性率)

Ki-67はG0期以外で発現するタンパク質であり、細胞増殖マーカーとして用いられている。また、p21は細胞周期がG1期→S期に移行することを妨げるタンパク質である。Spheroidの大きさ・2D培養において細胞密度依存的にKi-67の発現が低下した (Fig. 6)。また、p21はSpheroidにおいてのみ発現が認められた (Fig. 6)。

BrdUはチミジンのアナログであり、増殖中の細胞のS期で取り込まれる。2D培養においてBrdUの陽性率が評価したところ、細胞密度依存的に陽性率が低下した (Fig. 7)。

これらのことから、EZSPHERE®を用いて作成したSpheroidにおいて細胞増殖の抑制が確認された。

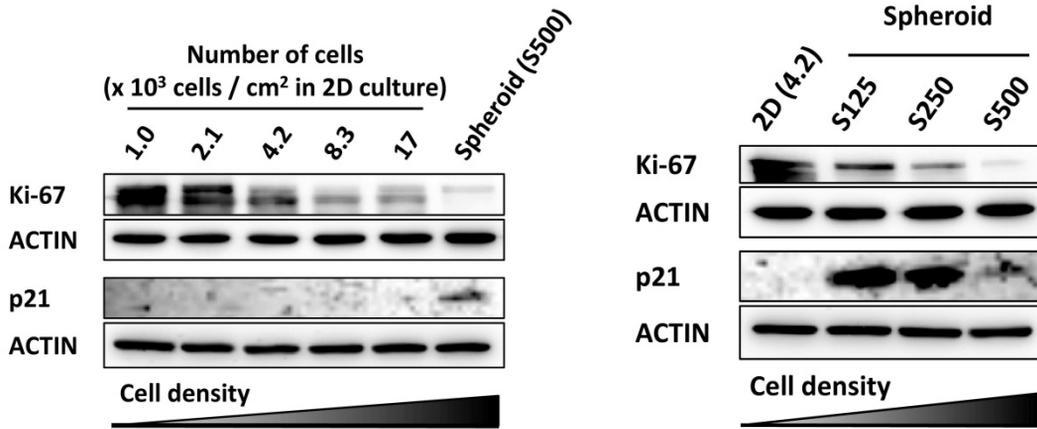


Fig. 6 Ki-67 and p21 expression (Western blotting)

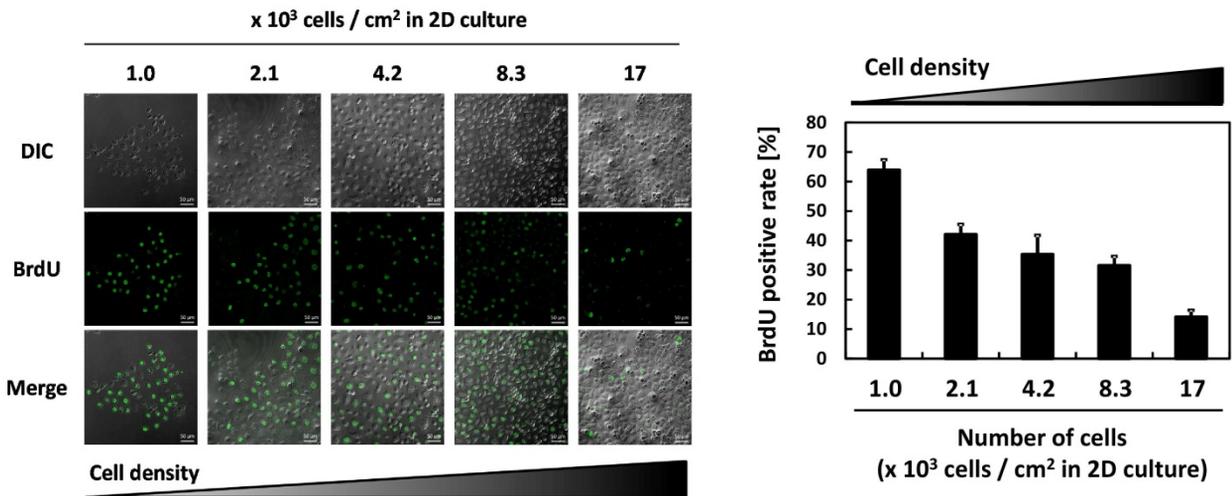


Fig. 7 BrdU positive rate (Immunostaining)

Result-3. 細胞死の評価 (トリパンプルー染色)

トリパンプルーは死細胞のみを青く染色する試薬である。Spheroidをピペッティングにより分解した後、トリパンプルー染色を行い、細胞生存率を測定した。その結果、2D培養の細胞と比べて、**Spheroidにおいて顕著な細胞死は認められなかった** (Fig. 8)。

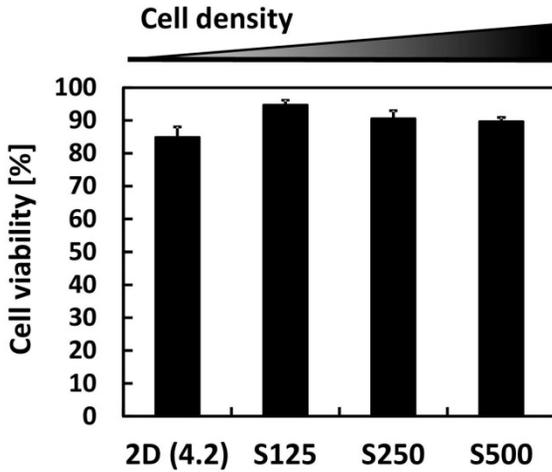


Fig. 8 Cell viability of spheroids

Result-4. 糖代謝の評価 (2-NBDG)

2-NBDGは蛍光標識されたグルコースであり、細胞内に取り込まれた量が糖代謝の指標となることが知られている。2D培養において細胞密度依存的にNBDGの取り込み量が減少した (Fig. 9)。また、全てのSpheroidにおいては取り込みが抑制されていた (Fig. 10)。このことから、**Spheroidにおける代謝の抑制が示唆された**。

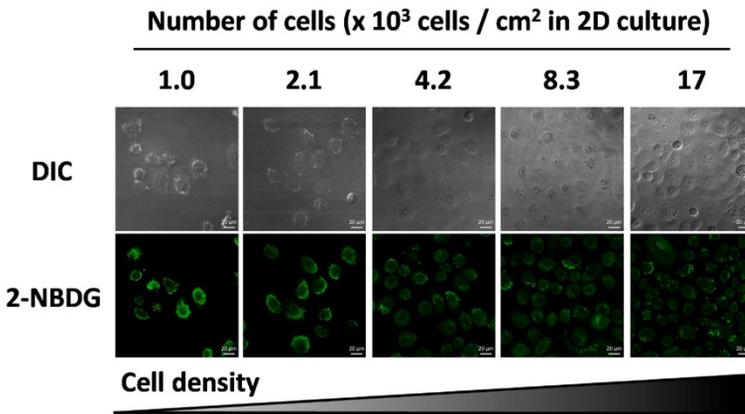


Fig. 9 2-NBDG uptake in 2D culture

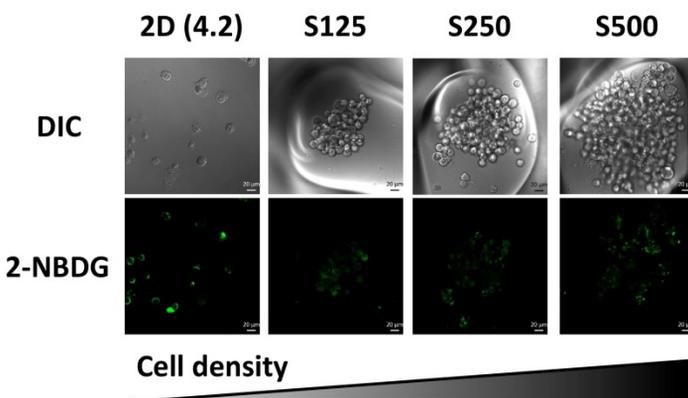
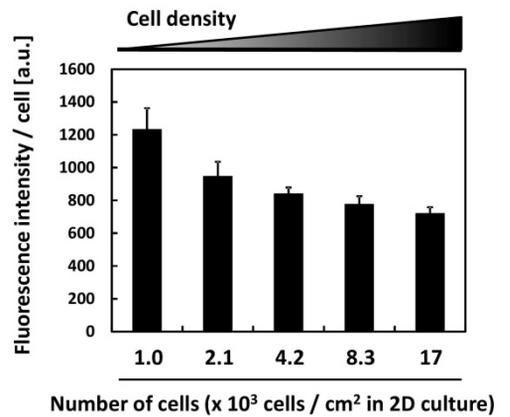
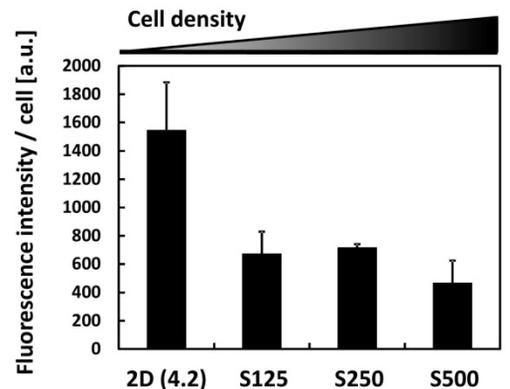


Fig. 10 2-NBDG uptake in 3D culture



Result-5. 再活性化の評価(再増殖評価)

形成後のSpheroidをピペッティングで分解し、2D培養した後の細胞増殖の評価を行った。なお、コントロールとなる2D(4.2)と3D(S500)は1 wellあたりの細胞数がほとんど同じであることを確かめている。Spheroidは2Dと比べて、再増殖が少し遅れたが、9日後には細胞数に差がなかった (Fig. 11)。このことから、**Spheroid形成後の細胞は再活性化することが確かめられた。**

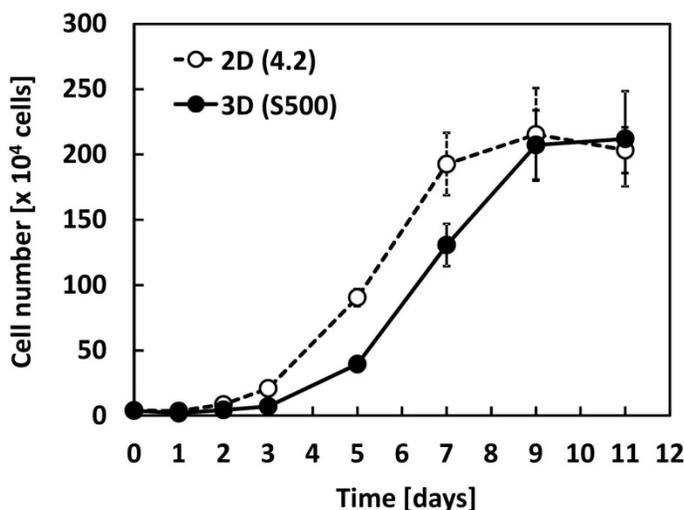


Fig. 11 Regrowth rate

以上の実験から、**EZSPHERE®で作成したがん細胞spheroidが休眠状態になることが示された。**

EZSPHERE®は以下の3点においても、他の3D培養法より優れている。

・**短期間でSpheroidを作成することができる。**

3次元培養法の有名なものとしてMatrigel®が挙げられるが、培養に2週間以上かかるため手間である。一方で、EZSPHERE®は4日間の培養でSpheroidを構築できるため、簡便である。

・**均一な大きさのSpheroidを大量に作成することができる。**

EZSPHERE®は穴の大きさが均一であるため、そこで形成されるSpheroidの大きさも必然的に、ほとんど同じである。MatrigelやSpinner flaskの場合であると大きさがばらばらになり、実験の再現性が乏しい。

・**共焦点顕微鏡で観察することができる。**

EZSPHERE®はSpheroidの3次元構造を保ったまま、培地交換やwashを行うことができるため、共焦点顕微鏡を用いたLive cell imagingに適している。

※本情報を含む論文を含む研究論文：

Taku Nakayama, Shimpei Otsuka, Tatsuya Kobayashi, Hodaka Okajima, Kentaro Matsumoto, Yuichiro Hagiya, Keiji Inoue, Taro Shuin, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura

Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

Scientific Reports 6, Article number: 36478 (2016) doi:10.1038/srep36478