

1. 研究課題名：アルギン酸ゲルビーズ内における細胞培養法
2. 研究機関：科学技術振興事業団長崎研究室
(現長崎大学医学部原研放射 luna@net2.nagasaki-u.ac.jp)
3. 研究者：森田直子(長崎大学医学部原研放射)
4. 研究協力者：松田尚樹(長崎大学アイソトープ総合センター)
児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己(長崎大学薬学部放射線生命科学教室)
竹下哲史(長崎大学医学部原研放射)
横山兼久(科学技術振興事業団長崎研究室)
柳瀬 浩(倉敷紡績・技術研究所)
5. 研究期間：平成9年～11年

6. 要約

哺乳類細胞を3次元的な状態で培養することは、生体内の生理的環境を再現する方法として有効であるが、これまで正常細胞の増殖活性を維持したまま3次元的に培養することは難しかった。そこで本研究ではヒト胎児由来正常細胞(HE49)をアルギン酸ゲルビーズ内に包埋し細胞の挙動を観察した。アルギン酸ゲルビーズをEDTA処理後、回収した細胞は60%以上の生存率を示し、またコロニー形成率は10~15%であった。包埋した時点では細胞は個々にビーズ内に分散していたが、培養を続けるとビーズ内全体にスフェロイド様構造を形成し、そのサイズ、数とも増加した。また、細胞倍化時間は約108時間と推測された。さらに、ビーズ内でのHE49細胞の増殖能は、ミトコンドリア脱水素酵素活性が高く維持されたことから確認された。以上の結果から、ヒト正常細胞がアルギン酸ゲルビーズ内において3次元的なスフェロイド様構造を形成し、且つ増殖できることが示唆された。

7. 研究目的

3次元的に培養された細胞は、単層培養においては見られないような独自の特徴を示し、また細胞の本質的な特性の発現を維持することができる。3次元細胞培養の技術は生体環境に近い条件での機能的培養法のモデルとしてすでいくつか確立されている。しかしながら、正常細胞においては、本来の特性は維持し機能的にはアクティブであるが、活発に増殖することは出来ない¹⁻⁴⁾。そのため、*in vivo*において起こるような組織の構築や再生の段階を仮定した正常細胞の3次元増殖のメカニズムについての研究はほとんど不可能であった。今回我々は、哺乳類の組織には存在せず、褐藻類に豊富に含まれる多糖類のアルギン酸を用いた。アルギン酸は2価の金属イオンと作用して容易にゲル化する性質を有しており⁵⁾、そのアルギン酸ゲル内に哺乳類細胞を包埋し、細胞を3次元的に培養する方法として既に用いられている⁶⁾。アルギン酸ゲル内では増殖活性はみられないものの、単層培養よりも更に長い期間、異なった表現型を維持することが、肝細胞⁷⁾、骨芽細胞⁸⁾及び軟骨細胞^{1,2)}などの正常細胞について報告されている。これらの結果に基づき、ヒト胎児由来細胞(HE49)のアルギン酸ゲルビーズ内におけるスフェロイド様構造の形成及び3次元的増殖性を明らかにすることを目的とした。

8. 材料と方法

【細胞培養】

ヒト胎児由来正常細胞 (HE49) はヒト胎児より単離されたものを用いた⁹⁾。培養液には 10% の FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) を用い、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞の回収には 0.05% トリプシン / 0.53mM EDTA (Gibco) を用い、継代は 1 : 4 split ratio で行った。全ての実験には継代数 9 から 13 の細胞を用いた。

【アルギン酸ゲルビーズの形成】

モノレイヤーにて培養した細胞をトリプシン処理後、1200xg にて 5 分間遠心し細胞を回収後、DMEM 培地 (無血清) にて細胞浮遊液を作り、この浮遊液と同量の 1.0% のアルギン酸ナトリウム (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) / PBS(-) 溶液とを緩やかに混ぜ合わせ、この混合液を 1ml のシリンジ (針なし) を用いて、0.5% CaCl₂ / DMEM 溶液 (無血清) 中に滴下する。この時、ゆっくりとかき混ぜながら行う。このようにして、直径約 4~5mm のアルギン酸ゲルビーズが直ちに形成される。全て作り終わったら、アルギン酸とカルシウムとの結合を安定させるため 0.5% CaCl₂ / DMEM 溶液に浸したまま、37℃、5% CO₂ インキュベーター内に 30 分間静置した。その後、余分なカルシウムを除くため PBS(-) 溶液にて洗浄後 10% FBS を含む DMEM 培地にビーズを浸し培養を開始した。ビーズ内の細胞の形態観察は位相顕微鏡により培養日数毎に行った。

【細胞増殖測定法】

培養 1、2、4 及び 7 日後のアルギン酸ゲルビーズを、2、5 または 10mM の EDTA 溶液に室温にて 30 分間浸した後、ゆっくりとピペッティングを行い細胞を回収して細胞数を測定した。この様に EDTA を用いることによりゲルの構造が緩くなり、包埋した細胞をゲル内から容易に回収できる。細胞数は血球計算盤を用いて測定した。また、回収した細胞の生存率をトリパンブルー色素排除法及びコロニー形成率により調べた。

一方、アルギン酸ゲルビーズ内の生細胞数は、ミトコンドリア脱水素酵素活性に基づく MTT 法の改良法¹⁰⁾ を用いて推測した。簡単にその方法を述べると、細胞を包埋後 1、2、4 及び 7 日間培養したアルギン酸ゲルビーズを 96 穴の丸底プレートに入れ、100 µl の DMEM / 10% FBS 培地を加え、3.26mg/ml の 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium Na (WST-1; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)、20mM HEPES, pH7.4 及び 0.2mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (Wako) を含む溶液 10 µl を各々のウェルに加え、37℃ インキュベーター内で 2 時間培養を行った。このようにして、ミトコンドリア脱水素酵素により生成するホルマザンの 450nm における吸光度を分光光度計を用いて測定した。

9. 結果

アルギン酸ゲルビーズ内に包埋した細胞は、金属キレート剤である EDTA に浸すことにより回収することができるが、その時の細胞の生存率は、図 1 より EDTA の濃度にかかわらず 60%以上であった。また、コロニー形成率は 10~15%となりモノレイヤーの細胞と比較すると僅かに低い結果となったが、細胞はゲル内で生存可能であることがわかった。

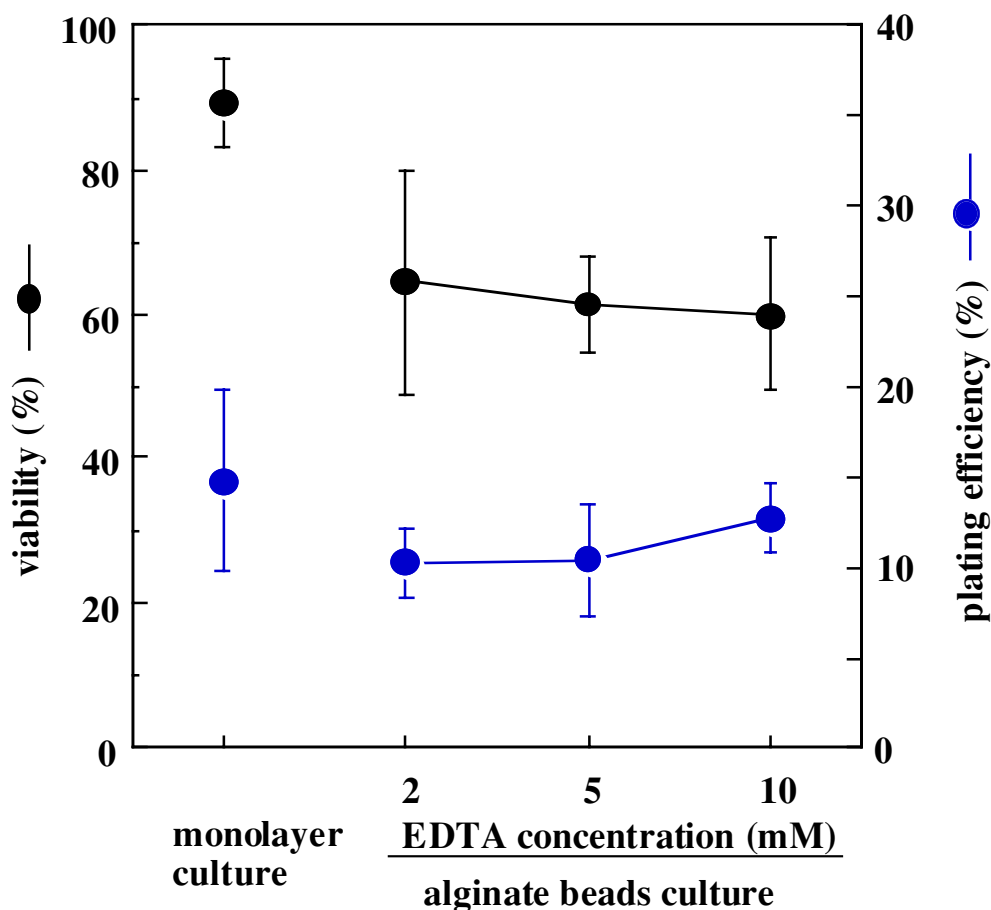


図 1 HE49 細胞の単層培養時とアルギン酸ゲルビーズ内に包埋し EDTA にて細胞を回収した後の生存率とコロニー形成率

次に、ゲル内に包埋した細胞の形態変化を培養日数を追って調べたところ、培養 1 日目は、個々の細胞がアルギン酸ゲルビーズ内で偏ることなく分散した状態であった (図 2 a)。培養開始 2 日後に、単一の細胞よりも明らかに大きな細胞が現れ、スフェロイド様構造の形成が見られた (図 2 b)。このようなビーズ内でのスフェロイド形成は、更に 7 日後まで培養日数に依存してその数及び大きさ共に増加が見られた (図 2 b、2 c)。培養 7 日目以降にはスフェロイドがビーズの外に出て、さらにそのスフェロイドから細胞が浸出してくる様子が確認された (図 2 d)。このような、ビーズからのスフェロイドの浸出は、ゲル内においてスフェロイドが飽和状態となったため、またはアルギン酸とカルシウムの結合が弱くなりゲルの構造が保たれなくなったため¹¹⁾ではないかと考えられる。

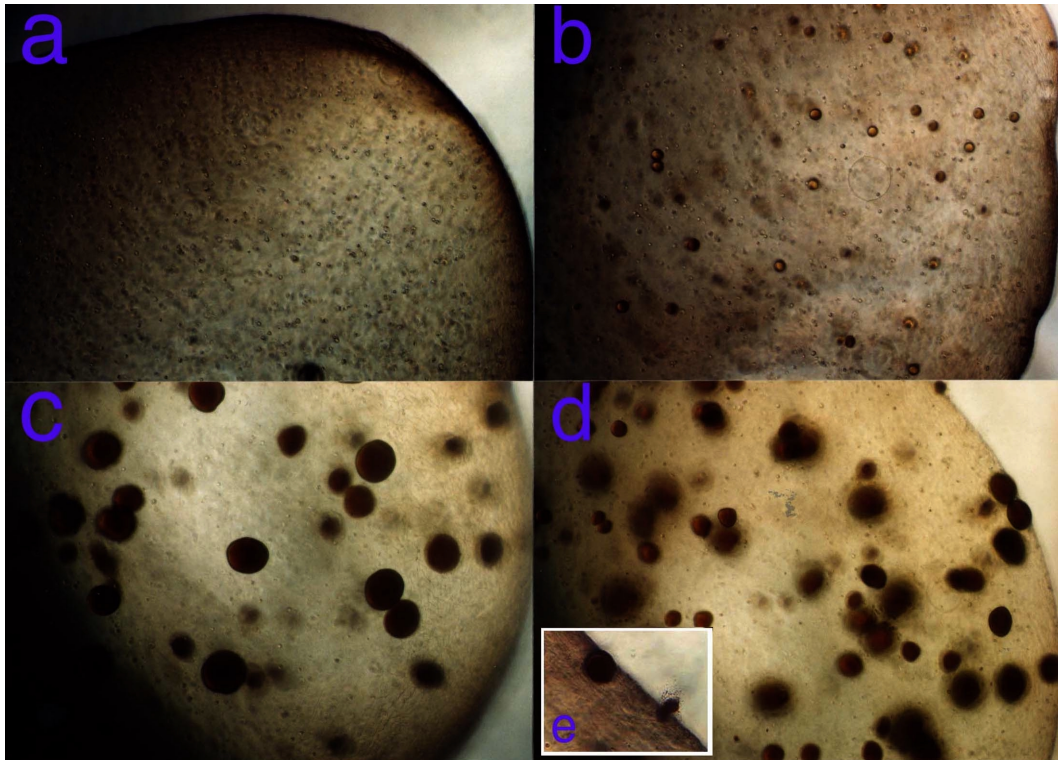


図2 HE49細胞をアルギン酸ゲルビーズ内に包埋したときの形態変化
 培養1日後(a)、2日後(b)、4日後(c)、7日後(d)及び7日後に
 観察されたビーズからの細胞の浸出(e)

このような形態変化に伴うビーズ内の細胞数の変化を測定した結果、培養1日目、細胞個々が均等にビーズ内に分散した状態において回収された生細胞数は、 0.2×10^4 個であり、これは包埋した時点での細胞数と比較すると約40%低下していた(図1、3)。その後7日目まで、細胞がビーズ内でスフェロイドを形成し発達する間において、細胞数は対数的な増加を示しているため、ゲル内でのスフェロイドの数及びサイズの増加は、細胞が増殖していることによるものであると示唆された。図3を基に細胞倍化時間を推測した結果、およそ108時間となりモノレイヤー細胞(倍化時間は24時間、データは示さず)と比較すると4.5倍であることがわかった。

また、EDTAによる処理は細胞の生存に影響を及ぼさと思われるため、ゲルを分解する必要のないミトコンドリア脱水素酵素活性に基づくビーズ内の細胞数の推測を行った。その結果、スフェロイド形成に伴い酵素活性も増加することが分かった(図3)。

以上の結果より、アルギン酸ゲルビーズ内において、ヒト胎児由来正常細胞(HE49)は3次元的なスフェロイド様構造を形成しながら、ゆっくりではあるが指数関数的に増殖可能であることが確認された。

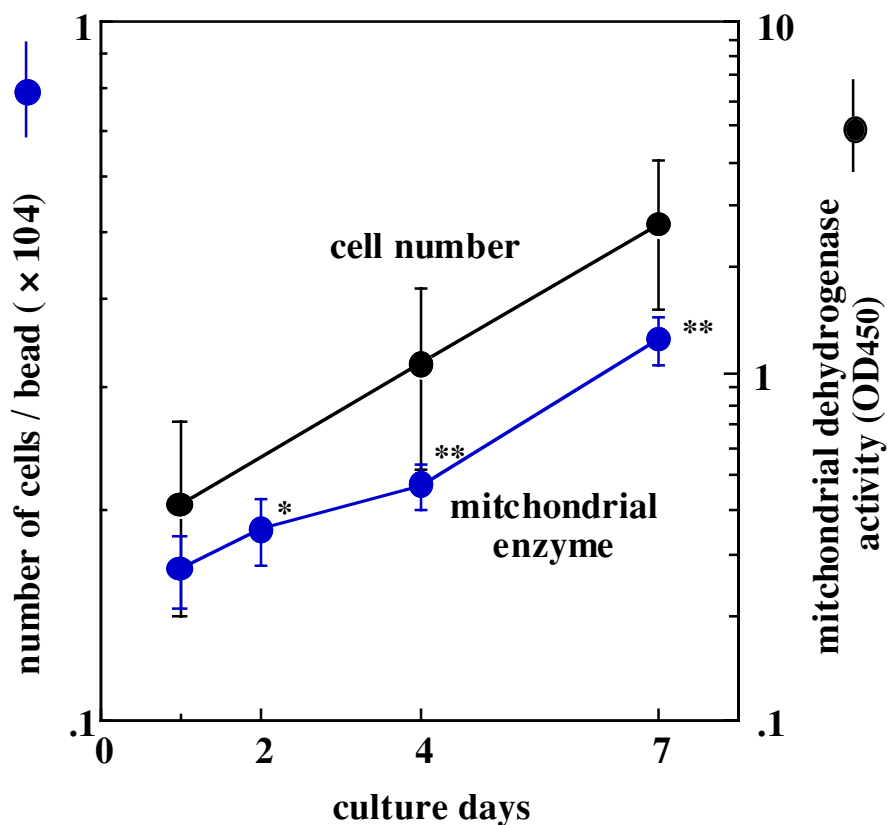


図3 HE49細胞のアルギン酸ゲルビーズ内における細胞数及びミトコンドリア脱水素酵素活性の測定による増殖曲線 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;コントロールとの有意差)

10. 考察

アルギン酸ゲルビーズ内に哺乳類の細胞を包埋する方法は、哺乳類細胞にとっての生理的培養法としてすでに提案されていた。しかしながら、ビーズ内における正常細胞の3次元的増殖は、これまでに軟骨細胞を用いた研究が報告されているが、その細胞増殖は今回用いた細胞よりも著しく遅いものであり、51日以上での培養で細胞数は3倍の増加を示したただであった^{1,2)}。Shimiらは、Flow 2002 ヒト二倍体線維芽細胞が1.2%のアルギン酸ゲルビーズ内で生存可能であり、ごく僅かに増殖することを発見した⁴⁾。多くの研究においては、包埋に用いるアルギン酸ナトリウムの濃度は0.6-1.8%であった。我々は今回の実験で0.5%にて用いたが、これはアルギン酸ゲルの形成による細胞への"solid stress"を避け、またEDTA処理によるゲルの分解が短時間で行えるよう、できるだけ低濃度に設定した。このような条件がゲル内での細胞の3次元的増殖及びスフェロイド構造の形成に適していたのかもしれない。実際に最近では、高濃度のゲルがスフェロイドの増殖を抑制するという報告もある¹²⁾。HE49細胞は、非接着性の丸底プレートにて培養した時スフェロイドを形成することができるが、この時スフェロイド内部では増殖できない。加えて、この細胞は足場非依存増殖能や腫瘍性は有していない⁹⁾。ビーズ内における細胞の増殖活性獲得を説明する1つの可能性

として、アルギン酸と細胞膜構成成分との相互作用が挙げられる。例えば、アルギン酸の構成成分である 1-4 結合グルロン酸は、細胞膜上の結合部位でリポ多糖やその結合タンパクの複合体と結合可能な CD14 と相互作用することが知られている^{13,14)}。リポ多糖は CD14 を介して細胞に様々な作用を誘導することが知られており、アルギン酸もまた細胞膜上の CD14 及びその他の部位を介した多様な細胞の機能に影響を及ぼすと考えられる。

また一方で、アルギン酸をモノレイヤーの HE49 細胞に添加しても、ほんの僅かに分裂を促進しただけであった(データ示さず)。このことから、ビーズ内での細胞の増殖はアルギン酸による直接的な作用の結果ではないことが示唆され、むしろ 3 次元的なスフェロイド様構造とアルギン酸の存在とが、細胞にとって適切な条件を作りだし、正常細胞の増殖を促進するものと推測された。

以上の結果をまとめると、アルギン酸ゲルビーズ内にて培養したヒト正常細胞は 3 次元的な条件で増殖活性を維持することができたが、このような培養方法は正常細胞の 3 次元増殖に関するメカニズムの研究を可能とし、さらに、化学物質、サイトカイン、放射線及び酸素などを含む各種ストレスに対する生理的条件下での細胞の応答性を明らかにする新しい手掛かりを与えるものである。このような意味において、ミトコンドリア脱水素酵素活性に基づく細胞の生存率測定のような、ゲル内での細胞機能のダイレクトな測定法は、3 次元培養における細胞機能の容易な評価法として大変有効である。

11. 今後の展開

正常細胞の 3 次元培養法は、生体内成分であるコラーゲンゲルを用いる方法が一般に知られているが¹⁵⁾、アルギン酸ゲルでのヒト線維芽細胞の 3 次元培養モデルによる紫外線(UVA)照射の影響を測定した報告によると、コラーゲンゲルを用いた場合、紫外線照射による分解が起こり不安定であるため、生体外成分であるアルギン酸ゲルを用いる方が細胞の測定には適しており、単層培養の細胞と比較すると紫外線の影響は大きく異なりアルギン酸ゲルではかなりの細胞死が起こることが分かった¹⁶⁾。このように、アルギン酸ゲルによる 3 次元培養細胞を用いることにより、単層培養細胞では得られなかった、より生体内の環境に近い状態での紫外線や X 線を始めとする種々の放射線感受性の影響を明らかにすることが可能である。また、ヒト肝細胞を用いた実験では、3 次元的に培養を行うと細胞の生存や機能発現を *in vivo* のレベルに近い状態まで再現できることが証明され、また、これまでの単層培養では測定されなかった新たな細胞の機能がアルギン酸ゲルでの培養法では測定可能となり、特に人工肝臓の開発には大きく寄与するものである¹⁷⁾。

また、軟骨細胞¹⁸⁾や膵臓細胞を包埋し、それらを体内に移植することにより細胞増殖能を高めたり、細胞が産生する物質を長期間にわたって分泌させることにより生体の機能維持を補佐する試みも進められている¹⁹⁾。この場合、細胞をアルギン酸ゲル内に包埋したのち、さらにその周りを生体適合成分でコートすることにより移植した細胞に対する免疫反応を抑制し、細胞本来の機能を発現させることが可能であることが分かった²⁰⁾ほか、培養細胞以外の用途については、乳酸菌をアルギン酸ビーズ内に包埋することにより、生存率や安定性を高く保持したまま保存・貯蔵することが可能であると報告されている²¹⁾。

以上述べたように、アルギン酸ゲルビーズを用いた細胞の3次元培養方は様々な利用価値が見いだされてきており、今度は培養細胞レベルに留まらず、特に臨床での有効性が確認されることを期待したい。

12. 参考文献

1. Ramdi, H., Legay, C. and Lievremont, M. *Exp. Cell Res.*, 207, 449-454, 1993
2. Hauselmann, H.J., Masuda, K., Hunziker, E.B., Neidhart, M., Mok, S.S., Michel, B.A. and Thonar, E.J.M. *Am. J. Physiol.*, 271, C742-C752, 1996
3. Gillery, P., Bellon, G., Coustry, F. and Borel, J.-P. *J. Cell Physiol.*, 140, 483-490, 1989
4. Shimi, S.M., Hopwood, D., Newman, E.L. and Cuschieri, A., *Br. J. Cancer.*, 63, 675-680, 1991
5. Yotsuyanagi, T., Yoshioka, I., Segi, N. and Ikeda K. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1072-1074, 1991
6. Smidsrod, ø. and Skjåk-Bræk, G. *TIBTECH* 8, 71-78, 1990
7. Yagi, K., Tsuda, K., Serada, M., Yamada, C., Kondoh, A. and Miura, Y. *Artif. Organs.*, 17, 929-934, 1993.
8. Majmudar, G., Bole, D., Goldstein, S.A. and Bonadio, J. *J. Bone Miner. Res.*, 6, 869-881, 1991
9. Watanabe, M., Suzuki, K., Kodama, S. and Sugahara, T. *Carcinogenesis* ., 16, 2373-2380, 1995
10. Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. and Watanabe, M. *In vitro toxicol.* , 8, 187-190, 1995
11. Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrod, ø., Soon-Shiong, P. and Skjåk Bræk, G. *Biomaterials.*, 17, 1031-1040, 1996
12. Helmlinger, G., Netti, P.A., Lichtenbeld, H.C., Melder, R.J. and Jain, R.K. *Nature Biotech.*, 15, 778-783, 1997
13. Otterlei, M., Sundan, A., Skjåk-Bræk, G., Ryan, L., Smidsrod, ø. and Espevik, T. *Infect. Immun.*, 61, 1917-1925, 1993
14. Espevik, T., Otterlei, M., Skjåk-Bræk, G., Ryan, L., Wright, S.D. and Sundan, A. *Eur. J. Immunol.*, 23, 255-261, 1993
15. Schor SL., *J. Cell.Sci.*, 41, 159-175, 1980
16. Pascual LTL. Korwin-Zmijowska. Adolphe M. *Cell. Biol. Toxicol.* 13, 95-102, 1997
17. Selden C. Shariat A. McCloskey P. Ryder T. Roberts E. Hodgson H. *Ann. N. Y. Acad Sci.*, 875, 353-363, 1999
18. Gregory KE. Marsden ME. Anderson-MacKenzie J. Bard JB. et al. *Exp. Cell. Res.*, 246, 98-107, 1999
19. Zekorn TD. Horcher A. Siebers U. Federlin K. Bretzel RG. *J. Mol. Med.*, 77, 193-198, 1999

20. van Schilfgaarde R, de Vos P *J. Mol. Med.*, 77, 199-205, 1999
21. Selmer- Olsen E. Sorhaug T. Birkeland SE. Pehrson R. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 79-85, 1999

13. 研究業績

13 - 1. 原著論文：なし

13 - 2. 総説など：なし

13 - 3. 国際学会発表：なし

13 - 4. 国内学会発表

森田直子、松田尚樹、横山兼久、竹下哲史、渡邊正己：アルギン酸ビーズ状ゲルを用いた細胞培養法、日本動物細胞工学会第7回大会、平成9年7月11日-7月12日、東京

13 - 5. 新聞など：なし

13 - 6. 特許申請：なし

14.

(1) Normal Human Embryonic Cells Proliferate Three-Dimensionally in Alginate Gel Beads

(3) Naoko Morita (Nagasaki University School of Medicine)

Naoki Matsuda, PhD. (Nagasaki University Radioisotope Center)

Seiji Kodama, PhD. Keiji Suzuki, PhD. Masami Watanabe, PhD.

(Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

Satoshi Takeshita, PhD. (Nagasaki University School of Medicine)

Kanehisa Yokoyama (JST at Nagasaki)

Hiroshi Yanase (Kurabo Industries Ltd.)

(5) 1997 ~ 1999

(6) Abstract

Three-dimensional culture systems provide a physiological environment for cultured mammalian cells, however, it is difficult to culture normal cells with growth ability in three-dimensional conditions. In this study, we encapsulated normal human embryonic cells (HE49) in alginate gel beads by mixing a cell suspension and a 0.5% sodium alginate solution, and pouring this mixture into 0.5% CaCl₂/DMEM solution. At the beginning of culture, each cell separately and evenly populated an alginate bead. The cells released from beads by EDTA digestion of the gel exhibited viability of more than 60% and cloning efficiencies between 10 and 15%. Subsequently, cells formed a spheroid-like structure

filling the entire bead. These spheroids increased both in size and in number thereafter, accompanied by an increase in the number of cells released from individual beads after EDTA digestion. The estimated cell doubling time was approximately 108 hr. The ability of HE cells to proliferate in a bead was further confirmed, without digestion of the gel, by the elevated level of the mitochondrial dehydrogenase activity of intact cells during the course of spheroid development. These results suggest that normal human embryonic cells are able to grow in alginate gel beads forming three-dimensional spheroid-like structures.