

接着細胞の自己凝集化誘導技術を用いた スフェロイド作製行程における凍結保存の可能性

草加 直幸・信政 郁弥*・滝澤 昇*・岩井 良輔**

岡山理科大学大学院工学研究科生体医工学専攻

*岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

**岡山理科大学フロンティア理工学研究所

2019年12月15日受理

1. はじめに

数百から数千個程度の細胞が集まった“スフェロイド”と呼ばれる細胞凝集小塊は、生体組織に近い機能を発揮することから再生医療の移植体や創薬試験の培養モデルとしての応用が期待されている。特に、再生医療においては細胞が分散した懸濁液ではなく3次元のスフェロイドとして移植することで、細胞の高機能化に加えて、患部への生着率も向上し高い組織再生効果が得られることから、本邦で認可が進む人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の幹細胞を用いた再生医療の臨床試験においても、分化細胞をスフェロイドの形態にして移植する方法が積極的に採用されている^{1),2)}。一方で、スフェロイドを再生医療や創薬試験用途として実用的な製品とするには、それらを均一かつ大量に作製することに加えて、凍結保存して必要に応じて随時出荷し、臨床現場にてReady to Shelfにて使用できることが望まれる。ここで、スフェロイドは一般的に細胞低接着処理を施したU底形状の培養ウェルに細胞を添

加することで底に沈降した浮遊細胞の自発的な凝集化現象を利用して作製されるが、この方法では大量の培養ウェルに細胞を添加する必要があるため、培養ウェルの製造コストから見積もとると量産には向かない。また、スフェロイドのサイズは培養ウェルのサイズに規定されるため制限があり、治療に適したスフェロイドのサイズを検討することができない場合もある。他方、細胞の凍結保存には一般的にジメチルスルホキシドやグリセロールに代表される凍結保護剤が用いられ、最近では幹細胞に適した各種組み換えタンパクを凍結保護剤に加えることによって高い生存率で凍結保存を可能とする再生医療用途を指向した製品も販売されている。しかしながら、細胞を懸濁液ではなくスフェロイドの形態にて凍結保存することを想定した場合には、凍結保護剤がスフェロイドの内部まで完全に浸透できないため、スフェロイド内部の細胞に氷晶が生じて細胞が解凍後に死滅してしまうことが予想される。実際に、Leeらは凍結保護剤を加えて凍結保存した肝細胞

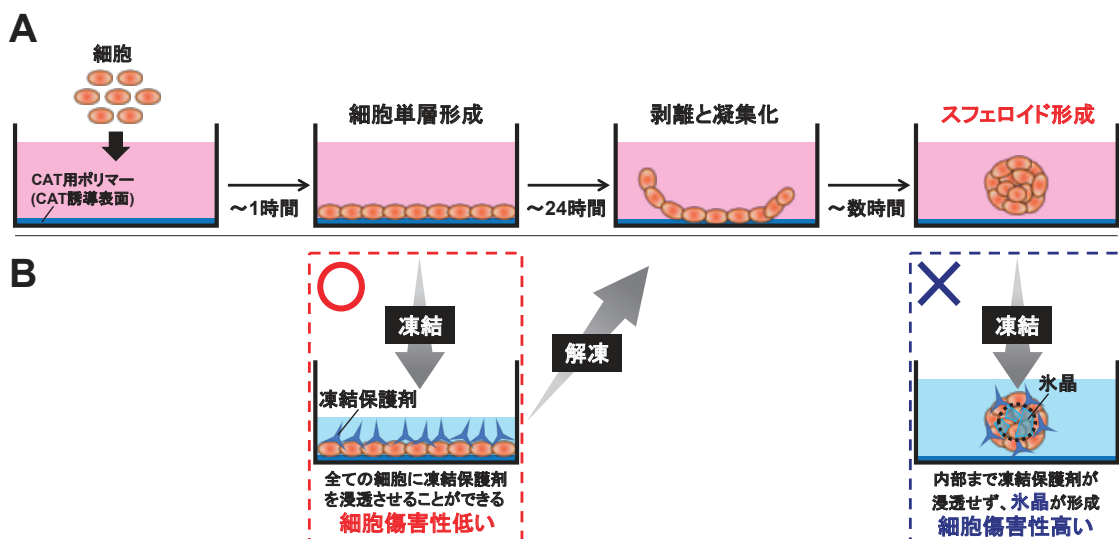


図1 細胞の自己凝集化誘導技術（CAT）を用いたスフェロイド成形機構（A）と凍結保存プロセス（B）

のスフェロイド中の細胞生存率は凍結前の70-80%と報告している。

我々は接着細胞の自己凝集誘導技術 (Cell self-Aggregation inducible Technology : CAT) を開発した⁴⁾⁻⁶⁾。CATを誘導する高分子を塗布した表面 (CAT誘導表面) に高密度に播種した細胞は、接着して隙間のない細胞単層を形成した後、1日程度の培養の間に細胞単層が自発的にCAT誘導表面から剥離すると同時に凝集化を生じることで、スフェロイドが形成する (図1A)。高分子をインクジェットプリンターを用いて培養皿表面にドット印刷することで、そのドット印刷面のみ細胞が接着し凝集化を生じてドット面積で精密に制御されたサイズのスフェロイドをドット数分だけ、一回の播種操作で得ることが可能であった。また、高分子を培養皿全面に塗布し、細胞懸濁液をドット状に滴下することでも、液滴量で制御されたサイズのスフェロイドをドット液滴数分だけ得ることが可能であった⁷⁾。ここで、我々のCATを用いたスフェロイド作製法においては、従来のU底形状の培養ウェルを用いた方法とは異なり、細胞を一度培養表面に接着させた後、自発的な凝集化が誘導されスフェロイドが形成する。すなわち、この細胞の単層接着段階にて凍結保護剤を加えて凍結すれば、全ての細胞に凍結保護剤が浸透し保護され、解凍して培養するだけで細胞死を伴わず、生きたスフェロイドが得られるのではないかと考えた (図1B)。

以上より、本研究ではCATを用いたスフェロイド作製法において、細胞接着段階での凍結保存の可能性を検討することを目的とした。

2. 細胞懸濁液の滴下量の検討

CATを用いたスフェロイド作製においては、CAT誘導表面上への細胞懸濁液の液滴数と分量がそれぞれス

フェロイドの数とサイズを決めるキーパラメーターとなる。ここで、液滴量を μL オーダーまで微量化すると、液滴内の細胞がCAT誘導表面上に沈降して接着する前に液滴が蒸発し細胞死が生じると予想される。そこで、液滴が蒸発する前に培養液を添加することで細胞死を防げる可能性があるが、その場合には培養液の添加により細胞が拡散しないように細胞がCAT誘導表面に堅固に接着した状態である必要がある。すなわち、CAT誘導表面上に細胞が接着するまでの時間を調べ、少なくともその時間内は乾燥しない液滴量を実験的に知っておく必要がある。

そこで、我々が独自に合成したCAT誘導用の特異荷電高分子⁶⁾ を $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の密度で塗布した培養皿 (2 cm^2 , AGC株式会社) にヒト骨髄液由来の間葉系幹細胞 (hBMSC, PromoCell GmbH) の間葉系幹細胞増殖培地 (PromoCell) の懸濁液 ($5.0 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$) 1 mLを培養皿全体に播種したところ、hBMSCは数分で培養表面に沈降し15分後では球状の形態で表面に弱く付着した状態であったが、30分後には半分以上の細胞が球状から扁平状に伸展した形態に変化して表面に接着した (図2)。このような伸展状態の細胞は、培養液の添加やピペッティング操作によって表面から剥離しないことを確認した。一方で、上記のhBMSCの懸濁液を $0.5\text{-}5.0 \mu\text{L}$ の量で滴下して培養し経時的に培養皿の重量変化を測定することで滴下した懸濁液の乾燥量を見積もると、液量が $3 \mu\text{L}$ 以下では図2で示した細胞接着に要する30分の培養の間に液滴の40%以上が蒸発し滴内の細胞のほとんどが死滅してしまうことが分かった (図3)。すなわち、CAT誘導表面に細胞懸濁液を滴下し接着に必要な30分間の培養において細胞を生存した状態で維持させておくには、少なくとも $3 \mu\text{L}$ よりも多い液量が必要であることが分かった。

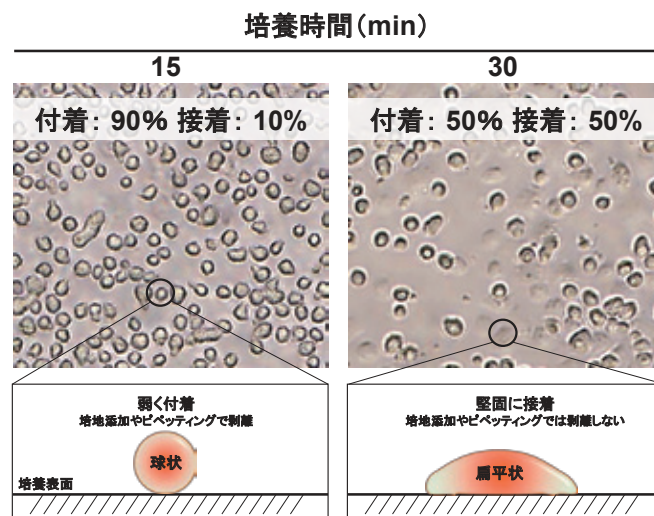


図2 CAT誘導培養表面に沈降した細胞の時間経過による形態と接着挙動の変化

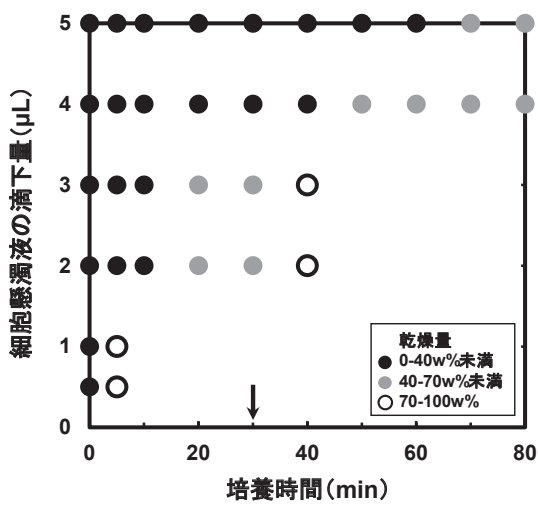


図3 細胞懸濁液の滴下量及び培養時間と乾燥量との関係
矢印：50%以上の細胞が接着するのに要する時間

3. 細胞単層の凍結解凍とスフェロイド形成培養

図2および図3より、3 μ Lよりも多い細胞懸濁液の滴下量にて細胞を生存状態で接着させ得ることが分かった。そこで、5 μ LのhBMSCの懸濁液をCAT誘導用の高分子を塗布していない従来の培養表面とCAT誘導表面にそれぞれ滴下し培養すると、細胞はいずれの表面にも1時間の培養で接着し液滴内に円形の隙間のない細胞単層を形成した。ここで、hBMSCの増殖培養液を培養皿全体に添加しさらに3時間培養しても細胞単層からの細胞の剥離は全く認められなかったため(図4 黄点線枠内)、培養液を細胞凍結保護液(バンバンカー, 日本ジェネティクス株式会社)に交換し、冷凍庫内に静置して-20℃で1時間、さらに-80℃で24時間凍結した。冷凍庫から取り出し室温にて5分静置することで凍結保護液を解凍し増殖培養液1 mLと交換し1時間培養したところ、細胞単層の培養表面からの剥離や死細胞の浮遊などは生じることなく、細胞は生存して単層接着状態を維持していた。続いて、24時

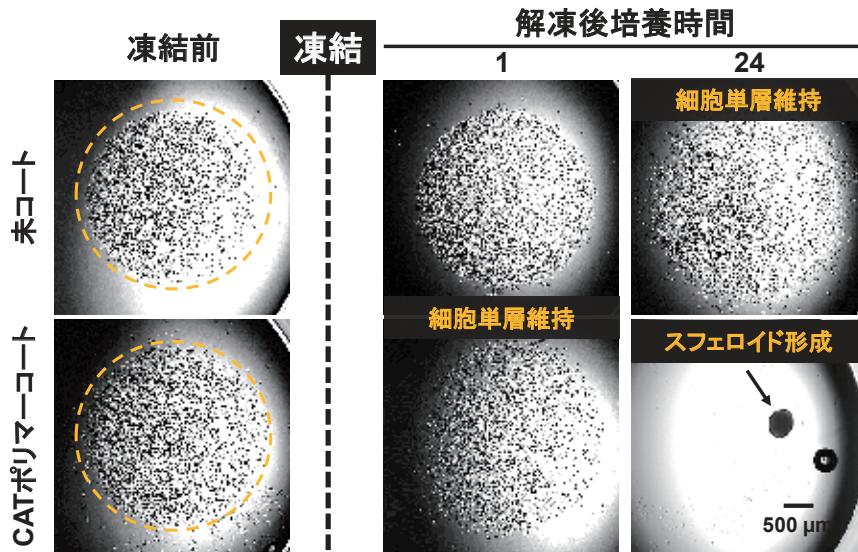


図4 細胞単層の凍結解凍前後の接着状態と培養によるスフェロイド形成
黄点線枠内：細胞単層

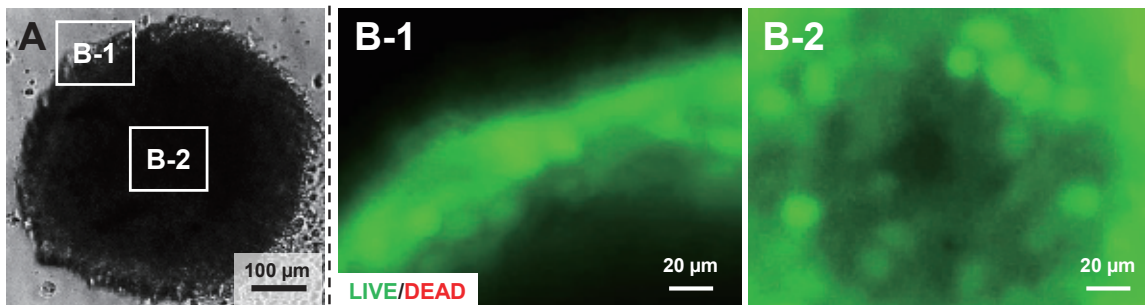


図5 スフェロイド (A) のLIVE/DEAD染色後の外縁部 (B-1) および中心部 (B-2) の蛍光顕微鏡観察像

間培養すると、従来の培養皿表面に形成した細胞単層は凝集化を生じることがなかったが、CAT誘導表面にて形成した細胞単層は外縁部より剥離すると同時に凝集化を生じ、液滴あたり1個のスフェロイドが形成した(図4)。そこで、スフェロイド中の細胞の生存率をLIVE/DEAD Cell Staining Kit (PromoCell) を用いて評価したところ、スフェロイドの内外で偏りなく95%以上の細胞が生存していることが確かめられた(図5)。

4. おわりに

CATを用いた均一性と量産性に優れたスフェロイド作製法において、細胞接着段階における凍結保存が可能であった。Leeらの報告においては、肝細胞をスフェロイドの形態にして凍結し、凍結保護剤の種類や濃度を変化させて細胞生存率の向上を試みているが、高くても70~80%程度との実験結果を報告している³⁾。本研究においては、従来のU底形状の培養ウェルを用いて作製したスフェロイドとの細胞生存率の直接の比較は行っていないが、細胞を単層接着状態で凍結保存する本法においては、全ての細胞を十分に細胞保護剤に曝すことができ、かつ解凍後に溶液交換により凍結保護剤を完全に除去することが出来るため、これまでの

報告よりも高い細胞生存率が達成されたと考えている。今後は、hBMSC(やiPS細胞)のスフェロイドの未分化性や分化能を凍結解凍前後で評価し、本法の安全性をさらに示すとともに、本法を自動液滴突出装置と組み合わせることによる量産化の可能性についても検討することで、スフェロイドを用いた再生医療の実用化に向けた基盤技術としての実装化を目指したい。

参考文献

- 1) Kikuchi T et al., Nature. 548, 592-596 (2017).
- 2) 朝日新聞デジタル「iPS細胞で心臓再生、慶応大が計画承認」: <https://www.asahi.com/articles/ASN263SJ8N25ULBJ011.html> (2020年2月6日)。
- 3) Lee JH, Jung DH, Lee DH, Park JK, Lee SK, Transplant Proc., 44(4), 1015-7 (2012).
- 4) Iwai R, Nemoto Y and Nakayama Y., Biomaterials., 34(36), 9096-102 (2013).
- 5) Iwai R, Nemoto Y and Nakayama Y., J Biomed Mater Res A., 104(1), 305-12 (2016).
- 6) Iwai R, Haruki R, Nemoto Y and Nakayama Y., J Biomed Mater Res B Appl Biomater., 105(5), 1009-1015 (2017).
- 7) 草加直幸, 橋本真悟, 岩井良輔, OUSフォーラム2018要旨集, 106 (2018)。

Possibility of cryopreservation in spheroid production process using adhered cell self-aggregation inducible technology.

Naoyuki KUSAKA, Fumiya NOBUMASA^{*}, Noboru TAKIZAWA^{*}, Ryosuke IWAI^{**}

Graduate School of Engineering, Okayama University of Science,

**Faculty of Engineering, Okayama University of Science,*

***Research Institute of Frontier Science and Technology, Okayama University of Science,*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama-shi, Okayama 700-0005, Japan

Cell aggregates called “spheroids”, which are composed of hundreds to thousands of cells, have functions similar to those of living tissue, so they are promising transplant for regenerative medicine and culture models for drug discovery tests. However, for their practical use, there is a need for the development of a technology that enable us to obtain them uniformly and in large quantities, and moreover that can be cryopreserved with a high survival rate. We have developed cell self-aggregation inducible technology called “CAT” and succeeded in producing large quantities of uniform spheroids by inducing self-aggregation of adherent cells. In this study, we attempt to examine the possibility of cryopreservation of cells before spheroid formation at the adhesion stage in spheroid production using CAT. Even if the human bone marrow-derived mesenchymal stem cells monolayer adhered on the surface of culture dish coated with a polymer for CAT induction was frozen in a commercially available cell cryoprotectant for 24 hours, it was maintained without occurring cell death. Subsequently, after culturing for about 24 hours, the cell monolayer was separated from the outer periphery and caused aggregation to form a single spheroid. Live/Dead assay confirmed that 95% or more of the cells constituting spheroids survived. As a result, it was possible to cryopreserve at the cell adhesion stage in the spheroid production method using our unique CAT with excellent uniformity and mass productivity. Further mass production is expected by combining CAT with an automatic cell ejection device.

Keywords: tissue engineering; multi cellular spheroid; cell self-aggregation; cell cryopreservation