

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12137

研究課題名(和文) 新しい三次元細胞培養技術を利用した再生医療等製品の造腫瘍性関連試験の開発

研究課題名(英文) Development of a tumorigenicity-related test for regenerative medicinal products using a new 3D cell culture technique

研究代表者

草川 森士(KUSAKAWA, Shinji)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・主任研究官

研究者番号：80462802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：天然物由来の新規ポリマーLA717を含有させた培地を用い、低接着性培養容器内で培養した細胞は三次元的に均一に分散する。正常細胞とがん細胞(形質転換細胞)を当該三次元環境で共培養すると、分散した正常細胞は足場がないため増殖しないのに対し、足場非依存的増殖能を有するがん細胞は、単一細胞から一定の期間内に一定の確率で分裂・増殖し、コロニーを形成することが見出された。また、それらのコロニーを蛍光標識することで、画像解析によってコロニーを効率的に検出することを可能にした。新規三次元培養法を応用し、ヒト細胞加工製品中の形質転換細胞の混在を評価するための新たなin vitro試験法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で検討された新しい三次元細胞培養法は、市販のポリマー試薬をごく少量添加した培地と低接着性培養容器を用いるだけのシンプルなものである。当該培養法は、寒天培地等を用いる方法と比較して、非常に簡便な操作で三次元培養環境を構築し、細胞の足場非依存的増殖能の効率的な評価が可能であることが明らかとなった。新規三次元培養法を応用した、ヒト細胞加工製品中の形質転換細胞の混在を評価するための新たなin vitro試験法は、再生医療等製品の品質評価に有用な試験と考えられ、製品開発を後押しするものとして実用化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cells cultured in a medium containing a novel polymer LA717 derived from natural products and in a low-adhesion culture vessel are uniformly dispersed in a three-dimensional environment. When normal cells and tumorigenic cells (transformed cells) were co-cultured in this three-dimensional environment, it was revealed that the dispersed normal cells did not proliferate due to the lack of a scaffold, whereas tumorigenic cells with anchorage-independent growth ability divided, increased, and formed colonies from single cells with a specific frequency within a specified period. By fluorescently labeling these colonies, it became possible to detect them efficiently by image analysis. Applying the novel three-dimensional culture method, a new in vitro test method was established to evaluate the contamination of human cell-based therapeutic products with transformed cells as cellular impurities.

研究分野：レギュラトリーサイエンス、幹細胞生物学

キーワード：三次元培養 造腫瘍性試験 細胞加工製品 再生医療等製品

1. 研究開始当初の背景

再生医療で用いられるヒト細胞加工製品（再生医療等製品）の製造において、交差汚染によるがん細胞の混入や、形質転換を起こした造腫瘍性細胞の発生は、安全性上の大きな懸念である。製品の品質・安全性確保の観点から、製品中の造腫瘍性細胞の混在を否定するためには、複数の造腫瘍性関連試験を実施し総合的な評価が行われることになる。

正常細胞は、細胞外基質（足場）に接着しなければ増殖できない一方、がん細胞のような形質転換細胞は足場がなくても増殖が可能である。この足場非依存性増殖という特性を利用する軟寒天コロニー形成試験は、正常細胞中に混在する悪性形質転換細胞の存在を比較的短期間かつ簡便に評価することが可能な試験としてよく利用されている。また、被検細胞試料をマルチウェルプレートに分割、播種して軟寒天培養を行い、各ウェル内での細胞コロニー形成の有無を画像解析し、足場非依存的に増殖する悪性形質転換細胞の混在を高効率かつ高感度に評価することを可能とする、デジタル軟寒天コロニー形成試験が新たな試験法として近年報告されている。

しかしながら、軟寒天コロニー形成試験は複雑な操作が多く熟練を要するため、試験法の改良が期待されている。特に、軟寒天培地を利用する三次元細胞培養法には、①濃度の異なる寒天培地層の調製が煩雑、②寒天培地の温度管理がシビア、③粘性の高い培地の取り扱いが困難、④寒天培地が固化しないよう分注操作に迅速性が求められる、などの課題がある。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト細胞加工製品中に混在する造腫瘍性細胞（形質転換細胞）を、従来の軟寒天コロニー形成試験よりも簡便かつ効率的に検出するための新たな手法の開発を目的とした。市販の新規ポリマー試薬を添加した培地と細胞接着性の低い培養器材を組み合わせて利用する新しい三次元細胞培養法を用い、形質転換細胞の足場非依存的増殖能を評価するための培養条件を検討し、正常細胞中に微量混入させた形質転換細胞の検出法の確立するための実験を行った。

3. 研究の方法

(1) LA717 含有培地を用いた三次元細胞培養

LA717 は、細胞凝集の抑制効果が見いだされた低分子寒天であり、その 1.0%溶液は、”SphereMax™”という商品名で三次元培養用培地作成試薬として販売されている。LA717 を添加した培地では細胞は低接着培養容器内で均一に分散するので、浮遊培養を簡便に行うことが可能となる。また、がん細胞のような増殖性の高い細胞は、LA717 添加培地中で足場非依存的に増殖しスフィアを形成し、さらに、形成されたスフィアは培養器材底面に沈むので検鏡観察やイメージング解析を簡便に行えることが報告されている (Abe-Fukasawa *et al.* 2018)。

本研究では、この先行報告を参考にして、LA717 と細胞低接着性 96 ウェルプレート (Corning 社) を用いた新規三次元培養法による、造腫瘍性細胞（形質転換細胞）の足場非依存的増殖能を評価するための培養条件を検討した。

(2) 正常細胞を用いた培養条件の検討

正常細胞モデルとして、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 (MRC-5、ATCC より入手)、ヒト不死化間葉系幹細胞 (以下 hMSCim と略す、UE6E7T-3、JCRB より入手) について、基礎培地 (D-MEM+10%FBS) への LA717 の添加濃度 (0%、0.03%、0.06%)、培養密度 (1 ウェルあたりの細胞数: 10000 個、30000 個、90000 個) を検討した。培養期間は 20 日とした。

(3) 形質転換細胞と正常細胞の共培養の検討

形質転換細胞モデルとして、HeLa-GFP (Cell Biolabs 社)、HEK293-GFP (Cell Biolabs 社)、U87MG-GFP (ECACC から入手した野生型株に GFP を導入しクローン化した細胞) について、MRC-5 との共培養を検討した。LA717 の添加濃度は 0.03% とし、1 ウェルあたり形質転換細胞株 0.25 個+ MRC-5 20000 個の培養密度で 180 ウェルに播種した。培養期間は 14 日とした。

(4) 正常細胞中に微量混入させた形質転換細胞の検出感度の評価

MRC-5 120 万個に HeLa-GFP を 1 個混入させた被検試料を用意し、60 ウェルに分割して播種し、0.03% LA717 含有培地を用いて培養した。14 日間の培養後、共焦点イメージサイトメーター CQ1 (横河電機) で各ウェルの画像を取得し、コロニーの検出を検討した。

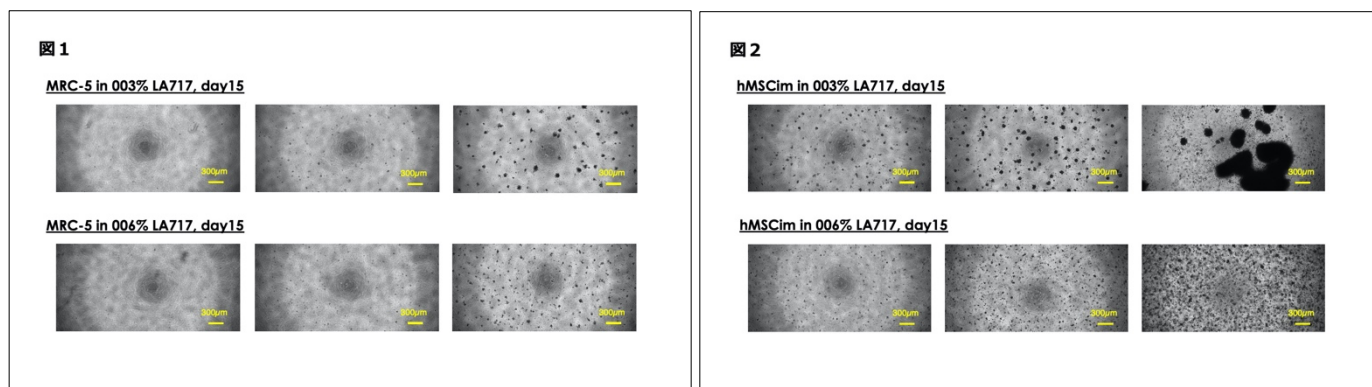
(5) 形質転換細胞由来コロニーの検出方法の検討

野生型の HeLa (ATCC より入手) と MRC-5 を 0.03% LA717 含有培地で共培養した。細胞を蛍光標識するための試薬として、Calcein-AM (同仁化学)、Hoechst 33342 (同仁化学)、MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher Scientific)、LysoTracker Red DND-99 (ThermoFisher Scientific) などを用い、コロニーの染色を検討した。14 日間の共培養後、各試薬を用いた蛍光染色を実施し、CQ1 を用いて明視野像、蛍光像を取得した。

4. 研究成果

(1) LA717 を用いた正常細胞の三次元培養

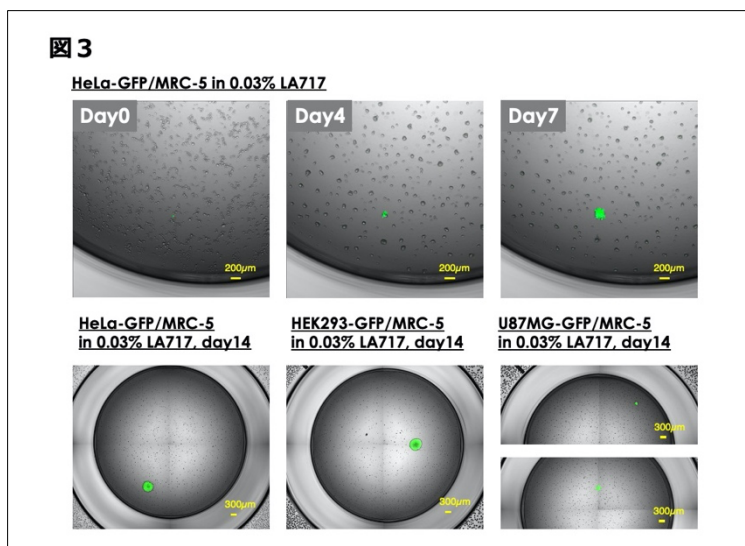
MRC-5、hMSCim とともに、細胞は LA717 含有培地内で適度に分散し、培養容器底部に接着することなく、浮遊状態を維持していた (図 1、図 2)。hMSCim については、培養密度に依存し



て細胞の凝集傾向が強く認められたが、LA717 が高濃度の場合では凝集は抑制された（図2）。凝集の仕方は細胞種によって異なっていたが、凝集した細胞は増殖することではなく、時間と共に縮小していく傾向にあった。以上の結果は、LA717 を用いた三次元培養において、正常細胞は足場非依存的増殖をしないことを示唆していた。

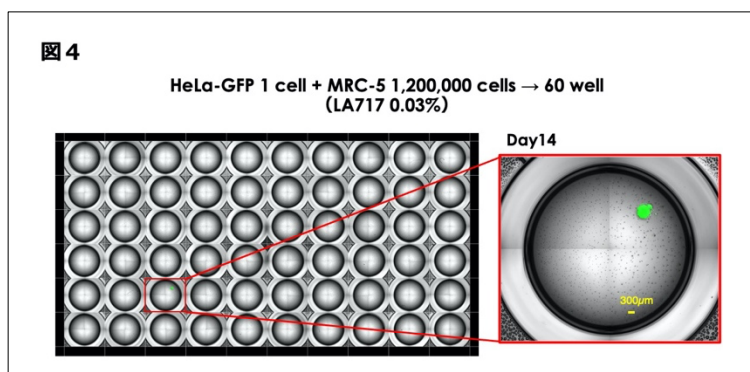
(2) LA717 を用いた形質転換細胞と正常細胞の三次元共培養

図3に示すように、MRC-5 と共培養した HeLa-GFP が、単一細胞から分裂・増殖しコロニーを形成する様子が観察された。HEK293-GFP、U87MG-GFP も HeLa-GFP と同様に、14 日間の内に、ほぼ一定の頻度で単一細胞からの足場非損滴増殖を示すことが確認された（図3）。増殖、コロニー形成の仕方は形質転換細胞種によって異なっており、明瞭なコロニーを形成するものもあれば、コロニー化しにくいものもあった。



(3) 正常細胞中に微量混入させた形質転換細胞の検出感度

120 万個の MRC-5 に混入させた 1 個の HeLa-GFP を、60 ウェルに分割して 0.03% LA717 含有培地で 14 日間培養した結果、図4に示すように 1 つのウェル内で GFP を発現する 1 つコロニーが検出された。独立した実験を 3 回実施した結果、3 回のうち 2 回で HeLa-GFP 由来コロニーを 1 個検出することに成功した。



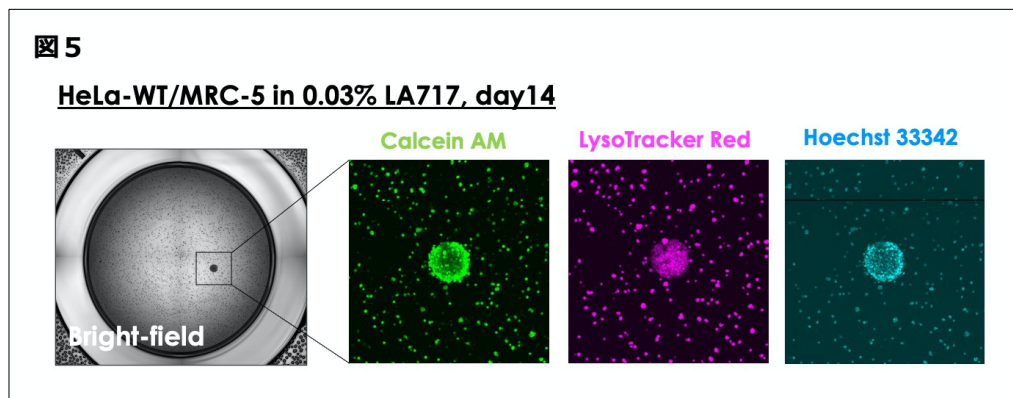
(4) 新規三次元培養法で形成された形質転換細胞由来コロニーの画像解析

MRC-5 と共培養した野生型の HeLa は、14 日間の内に一定の頻度で分裂・増殖しコロニーを形成した。培養 14 日後に、Calcein-AM (1µM)、LysoTracker Red DND-99 (50nM)、Hoechst 33342 (1µg/ml) をそれぞれ添加した結果、図5に示すように細胞を各色（緑、赤、青）で染め分けることができた。なお、染色は試薬添加後 1 時間の培養で十分であった。

増殖を示さない MRC-5 も蛍光試薬を取り込んでおり蛍光発現を呈していたが、生きた細胞が凝集したコロニーには強い蛍光発現を示す細胞が集積しており、結果としてコロニーを際立た

せていた。

また、コロニーのサイズ（面積）、コロニーの形状（真円度）、蛍光強度（コロニーあたりの平均蛍光強度）などを指標にした画像解析によって、コロニーを効率的に検出することにも成功した。



(5) まとめ

以上の結果から、LA717 と細胞低接着性培養容器を用いた培養法によって、従来の軟寒天培養よりも簡便に三次元培養法を行うことが可能となり、形質転換細胞の足場非依存的増殖能についても一定の効率で短期間に確認できることが明らかとなった。約 100 万分の 1 の割合で MRC-5 に混入させた HeLa-GFP の検出に成功したことから、本培養法を応用することで、正常細胞中に混在する HeLa 相当の形質転換細胞を高感度に検出することが可能な試験系になることが示唆された。

本研究成果を論文としてまとめるべく、現在準備を進めているが、その一方で、当該新規培養法の有用性や汎用性についてのさらなる評価、また、試験系としての最適化を目的とした多施設でのバリデーション研究などを今後進めていく予定である。

<引用文献>

Natsuki Abe-Fukasawa, Keiichiro Otsuka, Ayako Aihara, Nobue Itasaki, and Taito Nishino. Novel 3D Liquid Cell Culture Method for Anchorage-independent Cell Growth, Cell Imaging and Automated Drug Screening. Scientific Reports, 8 Article number: 3627 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草川森士, 鎌田敦音, 安田智, 黒田拓也, 西野泰斗, 大塚敬一郎, 佐藤光利, 佐藤陽治
2. 発表標題 簡便な三次元培養法を利用した再生医療等製品の造腫瘍性関連試験の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草川森士, 安田智, 平井孝昌, 河野健, 西野泰斗, 大塚敬一郎, 佐藤陽治
2. 発表標題 正常細胞中に混入させたHEK293細胞の造腫瘍性評価
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草川森士, 松坂恭成, 植沢芳広, 佐藤陽治, 佐藤光利
2. 発表標題 足場非依存的コロニー形成試験における異常細胞コロニーの深層学習による画像識別モデルの評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------