SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

三次元ナノファイバー HYDROX™
平面/三次元細胞イメージングシステム Cell3iMager duos

均質な三次元細胞塊の形成 ー HYDROX とCell3iMager duosの活用 ー

榎本詢子、加地徹、奥村由紀、山崎 春香、叶井正樹、松井勇人

ユーザーベネフィット

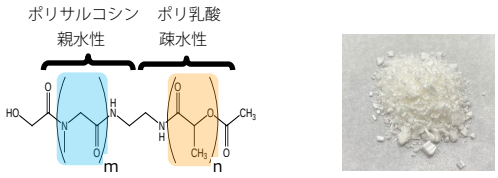
- ◆ 化学合成ポリマー由来であり、動物由来の成分を含まないためロット間のばらつきが小さい。
- ◆ 細胞を播種するのみで、簡便に均一な細胞塊を形成することができます。
- ◆ 培地や生理食塩水を添加するのみで、細胞のみを簡便に回収することができます。

■はじめに

細胞研究や創薬スクリーニング、再生医療の分野では、生体の機能に近い三次元細胞塊を生体外（試験管内）で簡便に作製する技術が求められています。これまでは、二次元や三次元の細胞培養用材料として動物性由来成分を含む細胞外マトリックスを用いた研究が盛んに行われてきました。しかし、近年はロット差に起因して、実験結果にばらつきが生じること、4℃付近で使用する必要があるといった操作性の観点から、化学合成由来の三次元培養基材に大きな注目が集まっています。

当社は、特許技術である親水性「ポリサルコシン」と疎水性「ポリ乳酸」の組み合わせから成る化学合成ポリマーを用いて、新しいタイプの培養基材「HYDROX（ハイドロックス）」を開発しました[1]（図1）。化学合成品の使用により、実験結果のばらつきが解消され、操作性や安全性が向上しています。

本稿では、HYDROXのプレートへのコーティング方法、HYDROX培養による細胞塊の作製と評価結果について紹介します。非侵襲的な評価として、Cell3iMager duosによる細胞塊の直径評価、および培養経時変化における細胞塊の個数を測定しました。また、細胞の機能評価としては、遺伝子発現による肝機能を比較しました。



両親媒性ポリマー
m = 90以上、n = 28-34

実物；HYDROX 粉末

図1　新しい培養基材：HYDROX

■HYDROXプレートの作製と細胞の培養方法

HYDROXプレートの作製方法

HYDROXコーティングプレートの作製方法を図2に示します。具体的には、HYDROX原料ポリマー粉末を95%エタノールで溶解し、70℃で加温することで、10, 2 mg/mLの濃度のHYDROXポリマー溶液をそれぞれ準備します。溶解したポリマー溶液を培養プレートに滴下し（0.1 mL/96wellプレート）、終夜乾燥することでエタノールを除去し、培養プレート底面にHYDROX原料ポリマーがコーティングされたHYDROXプレートを作製します。なお、乾燥後のHYDROXコーティングプレート内のエタノール残存量をガスクロマトグラフィー（GC）で評価した結果、エタノール残存量は0.04 w/v%以下であり、細胞の生存率には影響はなく、細胞生存率も良好であること事を確認しています[1]。

図 2　HYDROXプレートの作製方法

HYDROXによる細胞の三次元培養

本手法で作製したHYDROXプレートに細胞と培養培地を混合した細胞懸濁液を添加するだけで、細胞の三次元培養を開始することができます（図3）。これまで、ヒトiPS由来肝細胞・心筋細胞・膵細胞・神経細胞の他、初代肝細胞などの多数の細胞に適用した実績があります[2]。さらにはオルガノイド培養にもHYDROXプレートは適用可能であることが明らかとなっています。

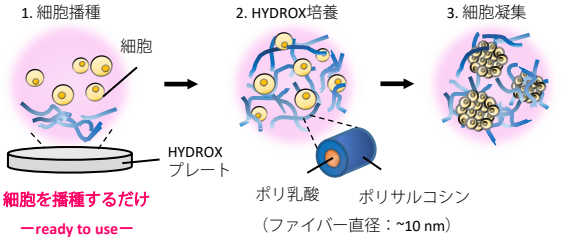


図3　HYDROXを用いた三次元細胞培養

■HYDROXを用いたより均一な細胞塊の作製

一般的に均質な細胞試験のためには、細胞塊のサイズや形が均一であることが望ましいと考えられています。しかし、従来のHYDROX培養では細胞塊の大きさは不均一となり、大きさを揃えることは困難でした。そこで、均一な細胞塊を作製するために、HYDROXとEZSPHERE 96wellプレート（AGCテクノグラス社製、以下EZSPHEREプレート）を組み合わせることとしました（図4）。EZSPHEREプレートの底面には微細な凹凸の構造が形成されており、この凹ウェルに数百の細胞が自発的に凝集することで細胞塊が形成されます。自発的な細胞凝集塊形成に加え、HYDROX培養による凝集促進を組み合わせることでより均一な細胞塊を形成できると考えられます。ここでは、ヒト肝がん細胞（HepG2）を用いて実験を行いました。

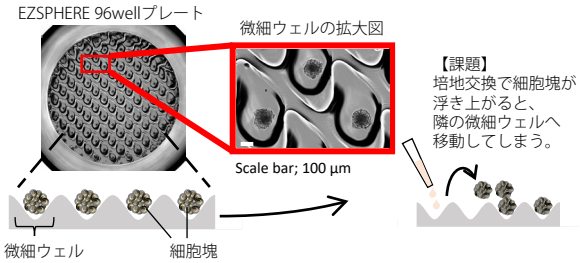


図4　底面に微細凹凸構造をもつ培養プレート（EZSPHERE）

Cell3iMager duosを用いた細胞塊の観察と解析評価

EZSPHEREプレートには、1プレートあたり96個のウェルがあり、その中に微細凹ウェルが95個配置されています。その一つ一つの微細凹ウェルに細胞塊が一つずつ形成されることが特徴となっています。つまり、EZSPHEREプレート1枚あたり、約9,120（= 96×95）個の微細凹ウェルが配置されており、個々に細胞塊が形成されます。この細胞塊を一つずつ手作業で撮影・解析するとなると、非常に多くの時間を要してしまい、多大な労力がかかります。実際に、従来の位相差顕微鏡では、プレート1枚を撮影するために約2時間を要し、ウェル中心部以外のウェル辺縁部の細胞をクリアに撮影することができませんでした。そこで本稿では、細胞塊のサイズ・均一性を経時的に評価するためにCell3iMager duos（図5左）を用いて観察しました。Cell3iMager duosにはホールウェルクリアスキャンという独自技術が用いられており、EZSPHEREプレート全体を撮影するのに要する時間はわずか10分です。また、ハイパーセントリック・テレセントリックの独自光学系の採用により、メニスカスの影響を低減してホールウェルを高画質に撮影し、各ウェル辺縁部までの細胞を正確に撮影・計測できます。図6に示す通り、Cell3iMager duosを用いることで、各ウェルを含むプレート全面において非常に鮮明な画像を取得することができました。また、従来の顕微鏡では、ウェルの全面画像を作成するために手作業で個々の画像を連結する必要がありましたが、Cell3iMager duosでは、自動でウェル全体の画像を1枚の画像として保存でき、これらの取得画像を基に細胞塊の個数および直径について解析を行いました。従来の顕微鏡では、１プレートあたり約2-４時間を要するため、培養プレートを大量に培養・撮影・解析することは困難でした。加えて、微細凹ウェルの周辺部を細胞として誤認識してしまい（図7右）、手動で細胞とウェルを分ける作業が不可欠でした。一方、Cell3iMager duosでは、deep learningによる解析技術が搭載されており、約15分でプレート1枚を解析することが可能です（学習時間を除く）。 Deep learningにより、微細凹ウェル辺縁部を細胞であると誤認識することなく、細胞塊のみを認識できました（図7左）。

実際にEZSPHEREプレートにHYDROXを適用して培養したHepG2細胞の画像をもとに解析を行ったところ、HYDROXをコートした実験条件において、HYDROXをコートしなかった条件よりも、より均一な細胞塊を形成できることを確認しました（図8）。この結果から、細胞自身がもつ凝集力に加えて、HYDROXコートによって細胞凝集が促進され、均一な細胞塊が形成されたと考えられます。

図5　Cell3iMagerシリーズ

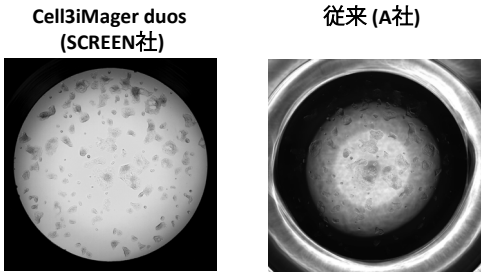


図6　平面培養プレートのウェル全面の位相差像
（撮影倍率：４倍）

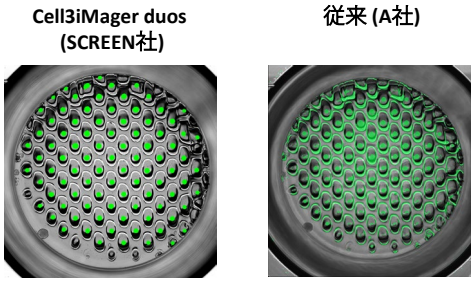
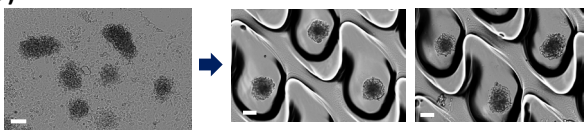


図7　細胞塊の自動解析
（細胞塊が自動で認識され、緑色で標識されている）

(a)



EZSPHERE適用前
(HYDROX 10 mg/mL)

EZSPHEREのみ
HYDROXコートなし

HYDROX-EZSPHERE
(HYDROX 10 mg/mL)

(b)

培養条件	細胞塊の直径平均（µm）	標準偏差
コートなし	180.0	30.4
HYDROX 2mg/mL	170.4	22.7
HYDROX 10mg/mL	178.6	26.5

図8　均一な細胞塊の形成
（a）培養ウェル全面の位相差像、スケールバー：100 µm
（b）培養7日目における細胞塊の直径評価

培養経過における細胞塊の評価

EZSPHEREプレートのように底面に凹凸形状がある培養器は、一度の播種で大量の細胞塊を簡便に作製できる点がメリットとして挙げられる一方、長期培養時の培地交換によって作製した細胞塊が培養液の流れとともに移動したり、培地の除去とともにロスしてしまう（培地吸引時に細胞塊も吸引してしまう）ことが課題として挙げられています。そこで、EZSPHEREプレートにHYDROXをコートすることで、細胞塊のロスを低減できるか検討を行いました。

プレートにヒト肝癌由来細胞（HepG2細胞）を播種し、培養7日目と10日目に培地交換を行い、3日目、7日目、14日目にCell3iMager duosでプレート全体の位相差像を取得しました。それらの画像データを可視化するためにCell3iMager duosのdeep learningによる自動測定を利用してヒートマップを作成しました（図9a）。また、ヒートマップのデータを折れ線グラフで表したものを図9bに示しました。培養日数とともに細胞塊の個数は減少するものの、HYDROXをコートすることで培養3日目から14日目までに88%の細胞塊が微細ウェル内に残存していることが示されました。一方で、HYDROXをコートしていないプレート（Non-coat）では、残存率は63%であり、HYDROXコートによって微細ウェル内に形成された細胞塊が保持されることが示されました（図9）。この結果から、HYDROXコートによって、培地交換による液流れ発生時においても細胞塊は浮遊せず、個々の微細ウェル内に留まらせる効果があることがわかりました。

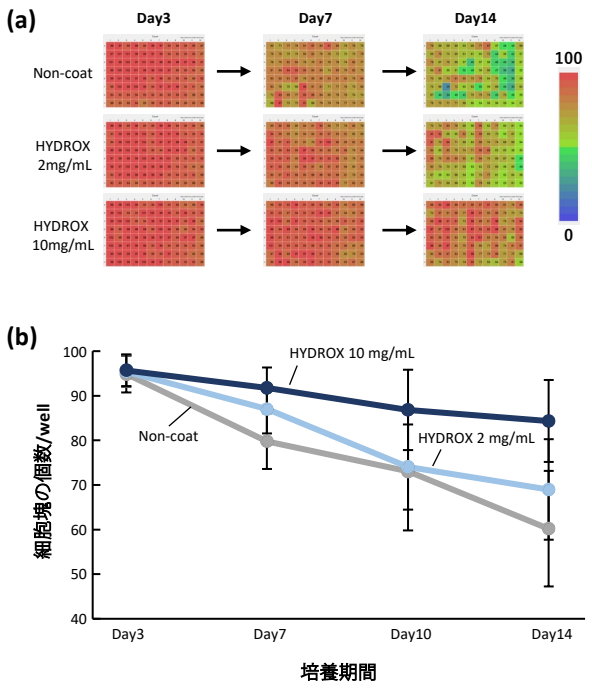


図9　経時変化における細胞塊の個数評価

（a）EZSPHERE 96wellプレートで培養した細胞塊個数のヒートマップ：96wellのウェルごとに微細凹ウェル数が異なり、おおよそウェルあたり100～110個程度の細胞塊が形成される。ここでは、ヒートマップカラーレンジの上限値は揃えられ、101個以上の細胞塊が形成されたウェルは、100として表示される。
（b） EZSPHERE 96wellプレートの1プレートあたりの細胞塊の総数評価

HYDROX培養で作製した細胞塊の回収

培養した細胞塊を評価するために、HYDROX培養した細胞塊の回収を試みました。HYDROXプレートの各ウェルに細胞懸濁液と等量の培地を加え、ピペッティング操作を行うことで、微細ウェルに沈殿していた細胞塊を培地中に浮遊させました。次に、ピペッティングによって浮遊した細胞塊とHYDROXを含む培地を遠沈管に移し替え、遠心操作を行い上清を除去することで、HepG2細胞塊を回収しました。HYDROXコートなしのプレートと同様の作業で容易に回収することができました。

細胞塊の遺伝子発現評価

回収したHepG2細胞塊について、肝臓特異的に発現する遺伝子であるアルブミン（ALB）の遺伝子発現についてqPCRで比較評価しました。図10に示すように、HYDROXをコートすることで、コートしなかった場合と比較して、ALBの遺伝子発現が同程度以上となりました。ヒトiPS細胞由来の肝細胞やヒト初代培養肝細胞をHYDROXで培養した際にも同様の傾向が認められ[2)]、HYDROXは、培養した細胞の機能を向上するための足場基材として適している可能性を示しています。

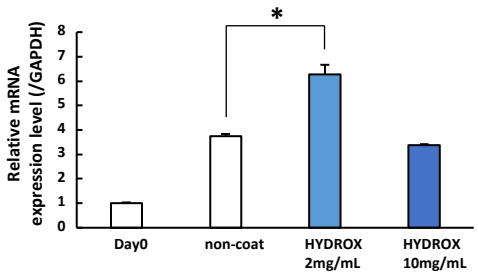


図10　細胞塊の遺伝子発現評価
*; p<0.01 (Steel-Dwass法による検定)

■まとめ

新規の細胞三次元培養基材（HYDROX）を作製し、細胞懸濁液をHYDROXプレートに添加するのみで、安全かつ簡便に細胞塊を形成できることを示しました。HYDROX原料ポリマーは化学合成品由来であることから、実験再現性や操作性の向上、安全性の向上が期待できます。

さらにHYDROXを培養底面に微細凹凸を有するEZSPHEREプレートに適用することで、細胞塊の形状を均一化できました。加えて、HYDROXをコートすることで、培地交換による細胞塊のロスを抑制し、肝機能の高い細胞塊を作製できることを示しました。

これらの評価にはCell3iMager duosが非常に有用であり、微細凹ウェルの細胞塊をクリアに撮影できるだけでなく、deep learningによって、わずか約15分で細胞塊のサイズや個数などの情報を取得できることを示しました。

本アプリケーションの作成にあたり、株式会社SCREENホールディングス　森 友紀様には、装置の使用方法などに関するご教示など多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

＜参考文献＞

1) H. Matsui, et al, “Novel Class of Nanofiber Hydrogels Based on the Biodegradable Amphiphilic Copolymers Poly(Sarcosine) and Poly(l-Lactic Acid) and Prepared Using Alcohols”, *Mater. Today Commun.* 11, 156－162, 2017.
2) J. Enomoto et al, “Development of a 3D cell culture system using amphiphilic polydepsipeptides and its application to hepatic differentiation”, *ACS Applied Bio Materials*, 4(9), pp.7290–7299, 2021.

HYDROXは株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/
01-00608-JP　初版発行：2023年 9月
島津コールセンター　0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

© Shimadzu Corporation, 2023

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

Cell3iMagerシリーズ
ラベルフリーイメージングシステム

関連分野

- バイオ医薬品
- 細胞培養 - 医薬品
- ライフサイエンス
- 細胞解析

- 価格お問い合わせ
- 製品お問い合わせ
- 技術お問い合わせ
- その他お問い合わせ