

スフェロイド形成基板の作製とヒト由来毛乳頭細胞の培養

本田 晴香* 古川 優輝*
吉田 圭吾** 宮本 憲隆**

Development of Culture Substrate for Formation of Spheroids and Dermal Papilla Cell Culture

Haruka Honda*, Yuki Furukawa*, Keigo Yoshida**, Noritaka Miyamoto**

Dermal papilla cells are located in the dermal papilla at the base of hair follicles. When dermal papilla cells form “spheroid” *in vitro*, they have many similarities to intact dermal papilla cell *in vivo*. In this study, we developed a culture substrate that can produced of human dermal papilla spheroids with uniform size using micromolding technique. We fabricated agarose gel culture substrate with microwell structure using micromolding technique. Micromold was fabricated by using a machining center in our Technical Practice Center. We designed culture substrate with microwell diameter and depth of 500 μm . Human dermal papilla cells formed monolayer on general culture dish, in contrast they formed spheroid on agarose gel culture substrate. A single spheroid was formed in each microwell under round bottom microwell (Round-well) and spheroid size was constant during culture periods. This cell culture substrate is a promising culture substrate for regenerative medicine research, pharmacological and toxicological studies, and fundamental studies in dermatology.

キーワード：スフェロイド培養、マイクロモールディング法、毛乳頭細胞

Keywords：Spheroid culture, Micromolding technique, Dermal papilla cell

1. 緒言

1.1 スフェロイド培養の意義とその形成手法

ヒトをはじめ、ラット、マウスなどの哺乳類の細胞培養技術は、再生医療、創薬スクリーニング、安全性試験などの幅広い分野で用いられている。多くの動物細胞は培養担体に接着する性質を有しており、培養フラスコやディッシュなどの基板底面に接着・伸展させる「単層培養法」が、一般的に行われている。しかし培養基板上に接着した細胞は、伸展して二次元的な構造となり、本来 *in vivo* の細胞が有する三次元的な立体構造を失ってしまう。*in vitro* での細胞の機能発現を向上させるためには、「細胞の三次元的な立体構造を再現する」ことが重要なポイントとなっている。

in vitro の細胞の機能向上を目指し、様々な培養方法が模索されてきた中で、細胞の三次元的な立体構造を維持しながら培養を行う「スフェロイド培養」がある。スフェロイ

ドとは、動物細胞が接着する性質を活かし、細胞と培養基板ではなく「細胞と細胞同士」を三次元的に接着・集合させた細胞集合体を指す。

スフェロイドを形成させるためには、隣接する細胞間の接着を促進する、すなわち、細胞同士以外への接着を防ぐ必要がある。汎用的に利用されているスフェロイド形成法として、細胞非接着性を持つ培養基板を利用した浮遊培養法、細胞懸濁液の液滴をぶら下げて重力でスフェロイドを形成するハンギングドロップ法、細胞培養チャンバーを回転させながらスフェロイドを形成するロータリー法などがある^{(1),(2)}。それぞれの手法にメリット、デメリットがあるが、本研究では、様々なスフェロイド形成法の中のひとつである「マイクロモールディング法」に着目した。

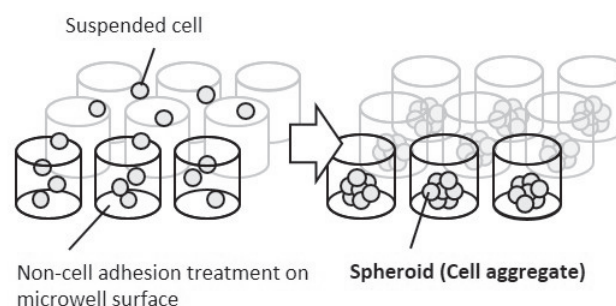


Fig.1 Schematic of micromolding technique for spheroid culture.

* 生物化学システム工学科
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Dept. of Biological and Chemical Systems Engineering,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

** 八代キャンパス 技術センター
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Yatsushiro campus Technical Practice Center,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

マイクロモルディング法は、マイクロメートルオーダーの規則的なウェル構造を培養基板上に多数配置し、スフェロイドを得る手法である。微細ウェルの表面に細胞非接着処理を行うことで、微細ウェル中にトラップされた細胞は自発的にスフェロイドを形成することが出来る (Fig.1)。マイクロモルディング法の利点として、ひとつの基板から均一なサイズのスフェロイドを多数得ることが出来る点がある。また、一般的な培養ディッシュやプレートを利用することが出来るため、プレートリーダーなどの解析装置との相性も良く、細胞アッセイ分野での利用が期待される手法である。

1.2 毛乳頭細胞とスフェロイド培養

スフェロイド培養の対象となる細胞種に着目してみると、スフェロイド化が取り組まれている細胞種には、肝細胞、がん細胞、幹細胞、神経細胞など多岐に渡る⁽³⁾⁻⁽⁵⁾。本研究では、様々な細胞種の中でも「毛乳頭細胞」に着目した。

毛乳頭細胞は、毛包の形成と毛の伸長に大きく関わる細胞である。毛包は、毛幹（いわゆる「毛」と呼ばれる）を鞘のように包み、複雑な構造を持つ器官である (Fig.2)。毛包下部の膨らんだ部分を「毛球」と呼び、中央に毛乳頭細胞が存在している。この毛乳頭を取り囲むように毛母細胞が存在し、毛母細胞の増殖・分化・角化によって毛が形成されていく。毛乳頭細胞は直接毛を生み出すわけではないが、毛母細胞の増殖・分化、および毛包組織の形成をサポートする重要な役割を担っている^{(6),(7)}。

近年では、*in vitro* での毛包再生に向けた研究において、毛乳頭細胞が有力な細胞ソースのひとつとして注目されている。Claire らは、ハンギングドロップ法を用いて毛乳頭細胞をスフェロイド培養すると、単層培養に比べ、より生体内に近い遺伝子発現を示すことを明らかにしており⁽⁸⁾、毛乳頭細胞スフェロイド培養は、毛髪研究のキーテクノロジーとなっている。

毛乳頭細胞スフェロイド研究において、スフェロイド形成方法の観点から見ると、主にハンギングドロップ法が用いられてきたが、熟練の操作を必要とし、培地交換を行うことが出来ないといった課題もある。Tai-Horng らは、PVA (poly(ethylene-co-vinyl alcohol)) をコーティングした基板上で、毛乳頭細胞が自発的にスフェロイド化することを見出している⁽⁹⁾。この知見を利用し、Yi-Ching らは PVA を 96 ウェルの PCR 用プレートにコーティングし、スフェロイドのサイズ制御に成功している⁽¹⁰⁾。しかし、この手法では培地交換が煩雑であり、よりハンドリングが簡便なスフェロイド形成技術が望まれている。

そこで本研究では、効率的にヒト由来毛乳頭細胞のスフェロイドを形成可能な培養基板の開発を目的とし、マイクロモルディング法を用いた基板の作製、および形成したヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドの形状評価を行った。

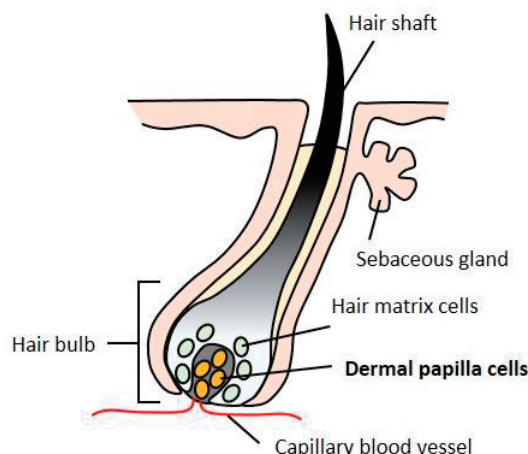


Fig.2 Schematic of structure of hair follicle

2. 実験方法

2.1 スフェロイド培養基板の設計と一次鋳型の作製

マイクロモルディング用の鋳型の設計は、3D CAD (ダッソー・システムズ・ソリッドワークス) を用いて行った。本研究では、底面が平坦な微細ウェルを持つ培養基板 (Flat-well) と、U 字型の微細ウェルを持つ培養基板 (Round-well) の 2 種類を設計した (Fig.3 (A)、(B))。直径 0.5 mm、深さ 0.5 mm の微細ウェルを、ウェル間距離 0.2 mm として 400 個配置した (Fig.3 (C))。この CAD のデータを元に、スフェロイド形成基板の元となる一次鋳型をマシニングセンター (NV5000/40、森精機) により作製した。鋳型材料には、厚さ 3 mm のアルミ合金 (A5052) を用い、Flat-well の切削にはスクエアエンドミル (XAL-PEM2S0.5、ミスミ) を、Round-well の切削にはボールエンドミル (XAL-BEM2S0.25、ミスミ) を用いた。切削後、平面部のみ 2 種類の研磨剤で磨き作業を行った。

2.2 スフェロイド培養基板の作製

Fig.4 に、スフェロイド培養基板の作製フローを示す。上述のように作製したアルミ合金製の一次鋳型に、モノマーと硬化剤を 10 : 1 の体積比で混合したポリジメチルシロキサン (PDMS) (Silgard184、東レ・ダウコーニング) を流し込み、デシケーターに入れて真空脱気した。この PDMS を一次鋳型から剥離し、剥離した PDMS 基板を二次鋳型とした。微細ウェル部分以外の余白をカッターでカットし、プラスチックシャーレ (φ 100 mm) に 4 個貼り付けた。

続いて、アガロース粉末 (アガロース 36NA、フナコシ) を 2 wt% となるように超純水で調製し、電子レンジで加熱して溶解した。このアガロースゾルを、シャーレに配置した二次鋳型上に約 30mL 流し込んだ。ピペットチップの先端で気泡を取り除き、4 °C の冷蔵庫に静置してゲル化させた。ゲル化後、2cm×2cm 程度のサイズになるように、余白をカッターでカットした。二次鋳型からアガロースゲルを剥離し、これをアガロースゲル基板 (Fig.5) とした。

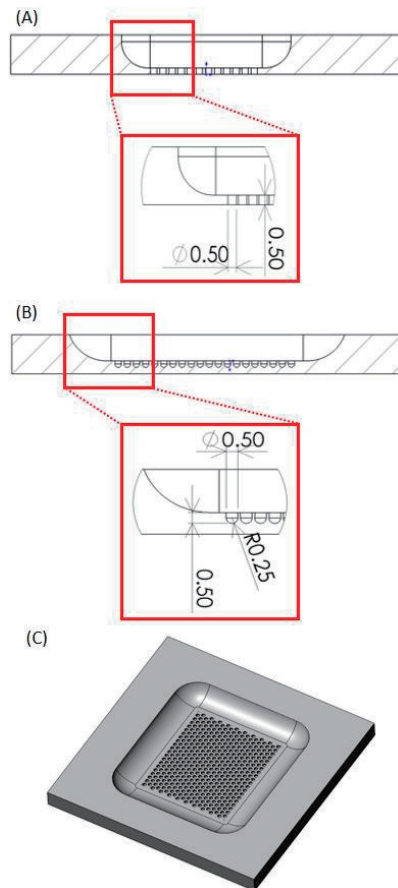


Fig.3 Sectional view of microwell with a flat bottom (Flat-well) (A), microwell with a round bottom (Round-well) (B) and Top view of micromold (C).

2.3 ヒト由来毛乳頭細胞の前培養

実験に用いた初代ヒト由来毛乳頭細胞（白人女性由来、Promo cell）は、Promo cells 社のプロトコールに従い培養を行った。毛乳頭細胞増殖基本培地 (Promo cell) に、Supplement Mix (Promo cell) を添加した培地を用い、細胞培養ディッシュ (violamo、 $\phi 100$ mm) に播種して前培養を行った。コンフルエントになるまで培養し、PBS (-) で洗浄、トリプシン-EDTA (Gibco) を用いて剥離し、細胞懸濁液を得た。

2.4 ヒト由来毛乳頭細胞の培養と評価

細胞培養ディッシュ (violamo、 $\phi 35$ mm) に、作製したアガロースゲル基板を設置した。このアガロースゲル基板を滅菌水で2~3回洗浄し、クリーンベンチのUV下で1時間滅菌した。滅菌後、10%のFBS (Gibco) を添加したDMEM培地 (Gibco) を2 mL 入れ、一晚 37°C でインキュベートした。インキュベート後、1 microwell あたり 100 cells、または 1000 cells となるように、細胞培養エリアに細胞懸濁液 (350 μL) を播種した (Fig.6 (A))。

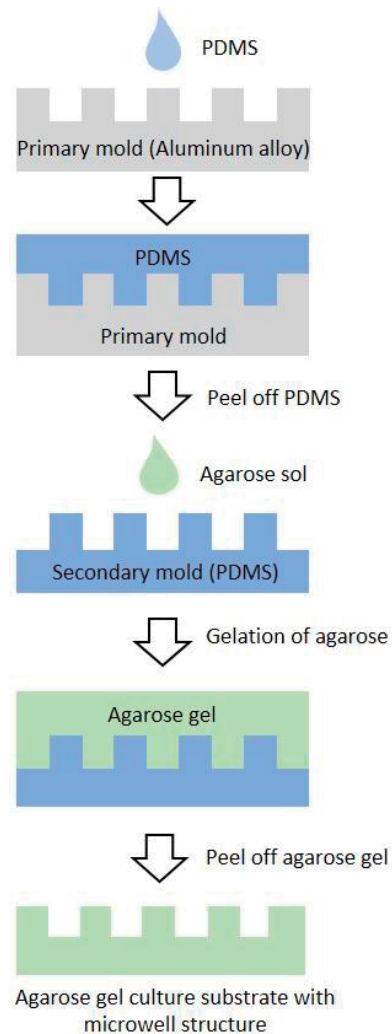


Fig.4 Schematic of preparation process of agarose gel culture substrate with microwell structure.

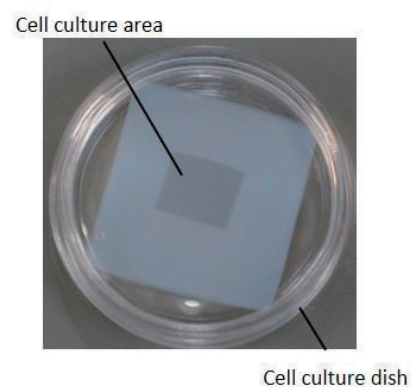


Fig.5 Top view of agarose gel culture substrate with microwell structure.

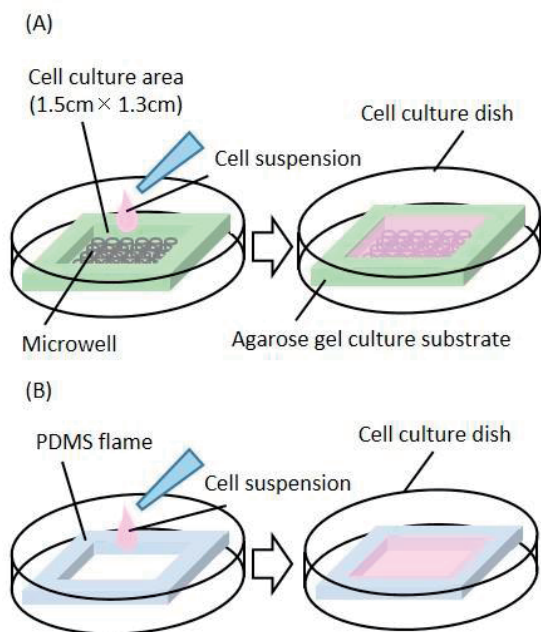


Fig.6 Schematic of cell seeding on each culture substrate. Agarose gel culture substrate (Spheroid culture) (A) and Monolayer culture (B).

単層培養法でもアガロースゲル基板と培養面積を同じにするため、細胞培養エリアと同じ面積の四角を繰り返し抜いたPDMS 枠を作製した。この枠を培養ディッシュに貼り付け、アガロースゲル基板と同じ培養面積とした (Fig.6 (B))。枠内に細胞懸濁液を播種し、スフェロイド培養と形態の比較を行った。細胞を播種して数十分インキュベートし、細胞が完全に底面に沈降した後、アガロースゲル基板、単層培養のいずれの場合も、2 mL/dish となるように培地を加えた。

播種した細胞は、倒立型培養顕微鏡 (TS-100、Nikon) で形態観察を行い、顕微鏡に設置したカメラ (NEX-5N、SONY) で画像を取得した。この画像を画像解析ソフト (imageJ、National Institutes of Health) で読み込み、スフェロイドのサイズ (直径) を測定した。

3. 実験結果・考察

3.1 二次鋳型の微細ウェルの形状観察

PDMS 製の二次鋳型は、アルミ合金製の一次鋳型 (Fig.7 (A)) に PDMS を流し込んで作製した。しかし、一次鋳型は微細ウェル内の空気の逃げ道がウェルの上面のみとなる。そのため、ウェル内部の脱気が十分に行われ、粘性の高い PDMS が微細ウェル内に入るかどうか懸念された。また、一次鋳型からの離型が完全に行われたかどうかを確認するため、剥離後の鋳型形状の観察を行った。

剥離した後の Round-well の二次鋳型をマイクロスコープで観察すると、一次鋳型の構造を忠実に再現出来ていることが確認出来た (Fig.7 (B))。



Fig.7 Top view of primary mold (Aluminum alloy) (A) and surface of the secondary mold (PDMS) (B).

一般的に、切削後の刃物の削り痕が転写されることを防ぐため、金型は研磨剤を用いて磨き作業を行うことが多い。また、PDMS やシリコンで鋳型の構造を転写する際には、離型を促進するため、鋳型表面にプラズマ処理などの表面処理を行うことが好ましい。しかし本実験ではウェルのサイズが小さく、技術的に困難であったため、ウェル内部の磨き作業は行っていない。また、アルミ合金の表面処理も全く行っていない。しかし、PDMS に微細構造が忠実に転写されたことから、特殊な処理がなくとも微細 PDMS 鋳型の成形が可能であることが示された。

3.2 ヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドの形成

Fig.8 に、培養 0、1、および 5 日目のヒト由来毛乳頭細胞の形態写真を示す。単層培養法のヒト由来毛乳頭細胞は、播種した直後は丸い状態であったが (Fig.8 (A))、培養 1 日目にはディッシュ底面に接着、伸展した (Fig.7 (B))。培養 5 日目にはほぼコンフルエントとなるまで良好に増殖した (Fig.8 (C))。一方、アガロースゲル基板の毛乳頭細胞は、播種直後、均一に微細ウェルに入っていた (Fig.8 (D)) 培養 1 日目には、基板に接着せずに細胞同士が凝集し、スフェロイドを形成した (Fig.8 (E))。その後もその形状を維持し続け (Fig.8 (F))、少なくとも 2 週間程度はスフェロイドの形状を維持した。形態写真は Round-well のみを示しているが、Flat-well においてもスフェロイドを形成した。

動物細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンなどの接着タンパク質を認識して基板に接着する。そのため、細胞が接着するためには、基板表面にタンパク質が吸着する必要がある。親水性の面は、接着タンパク質が吸着しにくいため、細胞接着が阻害される⁽¹¹⁾。

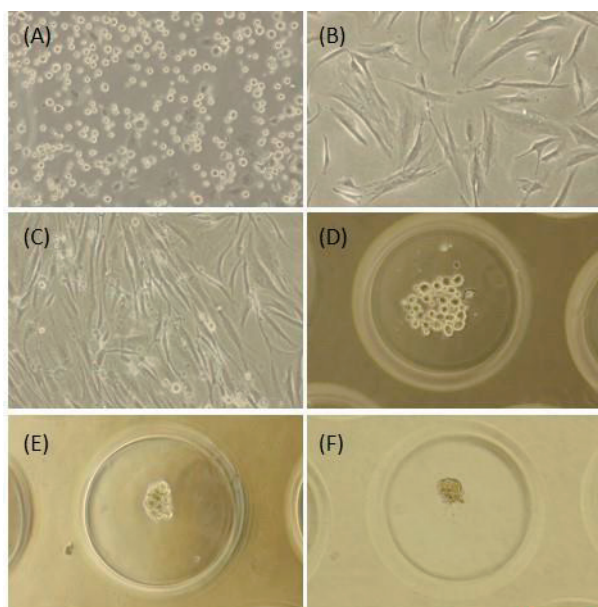


Fig.8 Phase contrast image of dermal papilla cells. (A) Culture 0day, (B) 1day and (C) 5day of dermal papilla cells on culture dish (Monolayer culture). (D) Culture 0day, (E) 1day and (F) 5day of dermal papilla cells on agarose gel culture substrate with Round-well (Spheroid culture). Scale bar is 250 μ m.

そこで、水を多く含むアガロースゲルは、古くから細胞非接着性材料として肝細胞や、各種がん細胞のスフェロイド形成に利用されている^{(12),(13)}。これらの結果より、ヒト由来毛乳頭細胞のスフェロイド形成に対しても、アガロースゲルが有効な材料であることが示された。

3.3 微細ウェルの形状と

ヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドの形成

マイクロモルディング法の利点のひとつに、「均一なサイズのスフェロイドが多数形成できる」点がある。そこで、作製した 2 種類の微細ウェルの形状が、スフェロイド形成効率に与える影響を評価した。

本研究では、「一つのウェルに、単一のスフェロイドが形成できていること」をスフェロイド形成効率と定義した。形態写真を元に、一つのウェルの中にスフェロイドが一個のみ形成されているウェル数をカウントした (N=36)。その結果、Round-well のスフェロイド形成効率は Flat-well の 2 倍以上高くなった (Fig.9)。

Flat-well でもスフェロイドは形成されるが、インキュベーター内に静置しただけでは、ウェル内で細胞が分散してしまい、一つのウェルに複数のスフェロイドが形成されてしまう (Fig.10 (A))。一方、Round-well のように底面を U 字にすることで、沈降した細胞が凝集しやすくなり、基板全体で均一なサイズのスフェロイドを形成することが出来た (Fig.10 (B))。

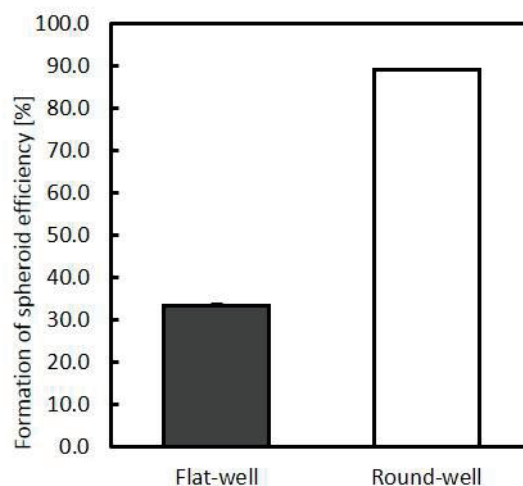


Fig.9 Formation of spheroid efficiency on agarose gel culture substrate with Flat-well and Round-well.

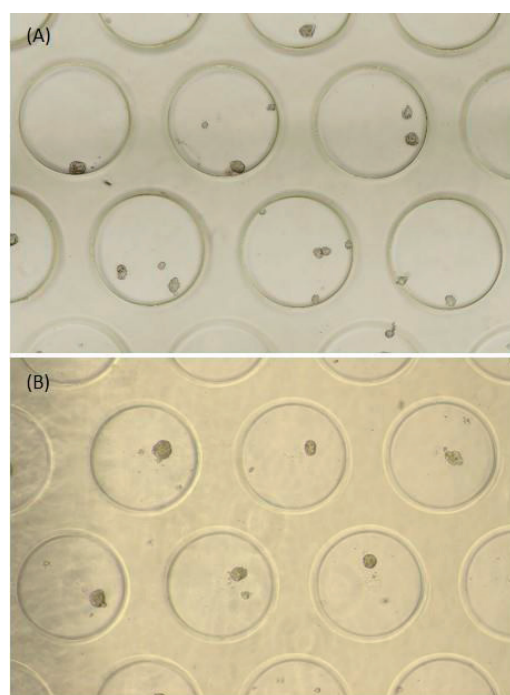


Fig.10 Phase contrast image of dermal papilla cells on agarose gel culture substrate with Flat-well (A) and Round-well (B). Scale bar is 250 μ m.

これらの結果より、アガロースゲルと底面が U 字型の微細ウェルを組み合わせ、均一なサイズの毛乳頭細胞スフェロイドを効率的に形成することが出来た。

3.4 ヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドのサイズ変化

スフェロイドの形成効率が高かった Round-well を用いて、スフェロイドのサイズの制御を試みた。播種細胞密度を 100 cells/microwell、および 1000 cells/microwell と変化させたところ、サイズの異なるスフェロイドを形成することが出来た (Fig.11、Fig.12)。スフェロイドは内部に血管構造

を持たないため、サイズの大きなスフェロイドは内部に壊死層が発生してしまう。そのため、細胞アッセイや再生医療への応用を考えると、スフェロイドのサイズを制御することは大変重要である。本法でも、播種する細胞数を変えるだけで、容易にスフェロイドのサイズをコントロールすることが出来た。

培養経過に伴うスフェロイドのサイズ変化を見てみると、培養1日目から3日目にかけて、100 cells/microwellでは約1 μm 、1000 cells/microwellでは約10 μm 、スフェロイドの縮小が見られた (Fig.11)。培養経過に伴って徐々に細胞同士の接着が強まり、スフェロイドを形成していると思われる。さらに、Fig.7 を見てみると、培養ディッシュ上のヒト由来毛乳頭細胞は、培養経過と共に増殖していた。一方、ヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドは、培養初期は徐々に小さくなり、そのまま同じサイズを維持している傾向があった。すなわち、ヒト由来毛乳頭細胞は、スフェロイド化によって細胞増殖が抑制されている可能性が示唆された。

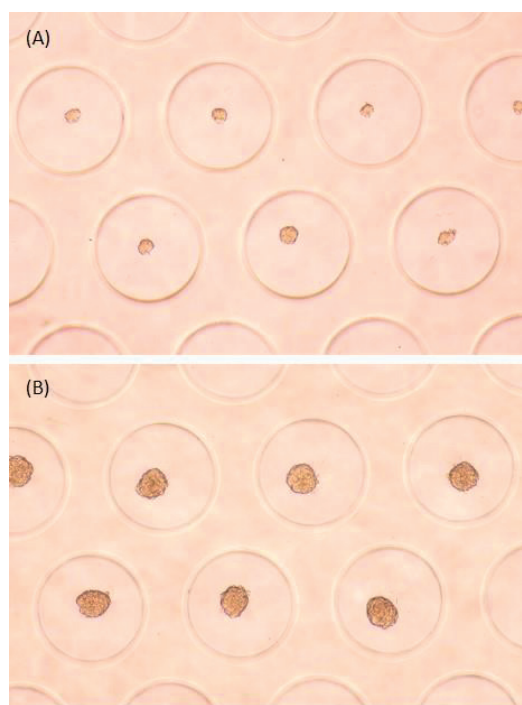


Fig.11 Phase contrast image of dermal papilla cells on agarose gel culture substrate. Seeding cell density is 100 cells/microwell (A) and 1000 cells/microwell (B). Scale bar is 250 μm .

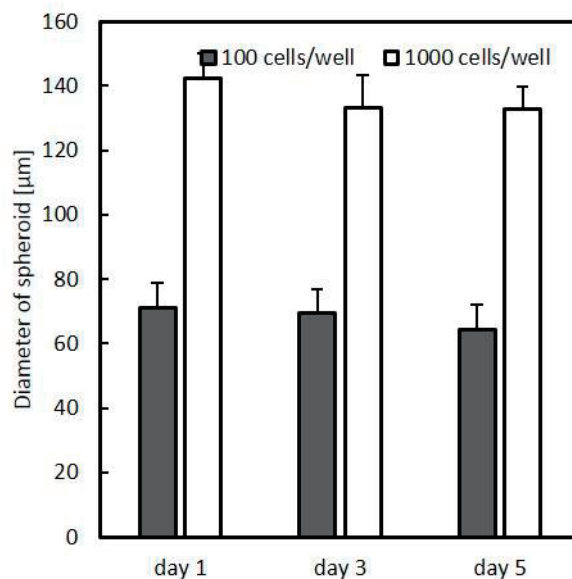


Fig.12 Diameter of dermal papilla cells spheroids on agarose gel culture substrate with Round-well.

今回用いたヒト由来毛乳頭細胞は正常細胞（がん化していない）であり、100 cells/wellの播種密度で形成したスフェロイド内部の細胞は、全て生存していることを確認している（データは示していない）。よって、内部への栄養素や酸素供給不足によってサイズに制限がかかっているのではなく、「接触阻害」による効果だと考えている。接触阻害は、正常細胞であれば単層培養法でも見られる一般的な現象である。伸展状態だった細胞が、増殖に伴って細胞密度上がると、ひとつひとつの細胞が丸くなる。この形態変化がトリガーになり、接触阻害が起こると言われている⁽¹⁴⁾。形成したスフェロイドの増殖性や内部の状態については、今後詳細な検討を行っていく必要があるが、スフェロイド内部は細胞が密になった状態であるため、接触阻害と同じような現象が起こっているのではないかと考えている。

4. 結論

本研究より、マイクロモルディング法を用いて、ヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドを形成させることが可能であった。微細ウェルの構造は、スフェロイドの形成効率に影響を与えることが示された。また、この基板上で形成されたヒト由来毛乳頭細胞スフェロイドは、培養日数が経ってもサイズの変化がほとんど見られないことから、細胞増殖が阻害されている可能性が示唆された。

本法は、鋳型さえあれば簡便に毛乳頭細胞スフェロイドを形成でき、培養プレートやディッシュのサイズに合わせて基板の形状のアレンジも容易である。プレートリーダーや蛍光顕微鏡などの解析装置を組み合わせれば、細胞アッセイにおける有力なツールとして期待出来る。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 15H06820 の助成を受けて行われたものである。

（平成 29 年 9 月 25 日受付）

（平成 29 年 12 月 6 日受理）

参考文献

- (1) 草森浩輔 他:「細胞スフェロイド化技術の開発と細胞治療への応用」, Drug Delivery System, 28, pp.45 (2013).
- (2) Ruci-Zhen Lin et al.: “Recent advances in three dimensional multi cellular spheroid culture for biomedical research”, Biotechnology Journal, 3, pp.1172 (2008).
- (3) Carlsson J et al.: Liquid-overlay culture of cellular spheroids”, Recent Results in Cancer Research, 95, pp.1 (1984).
- (4) Lund-Johansen M et al.: “Tumor spheroids from monolayer cultures”, CRC press, pp.3 (1992).
- (5) Yusuke Sakai et al.: “Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 2, pp.223 (2010).
- (6) 王寺幸輝 他:「発毛の再生医学」, p p.38 (2008).
- (7) 松崎貴:「毛の再生技術と創薬研究へのアプローチ」, YAKUGAKU ZASSHI, 128, 1, pp.11 (2008).
- (8) Claire A. Higgins et al.: “Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth”, PNAS, pp. 19679 (2013).
- (9) Tai-Hong Young et al.: Self-assembly of dermal papilla cells into inductive spheroidal microtissues on poly (ethylene-co-vinyl alcohol) membranes for hair follicle regeneration”, Biomaterials, 29, pp.3521 (2008).
- (10) Yi-Ching Huang et al.: Scalable production of controllable dermal papilla spheroids on PVA surfaces and the effects of spheroid size on hair follicle regeneration”, Biomaterials, 34, pp.442 (2013).
- (11) 石原和彦 他:「バイオマテリアルの基礎」, 株式会社日本医学館, pp.142 (2010).
- (12) Toshiaki Takezawa et al.: “Morphological and immuno-cytochemical characterization of a hetero-spheroid composed of fibroblasts and hepatocytes”, Journal of Cell Science, 101, pp.495 (1992).
- (13) Yuichi Hasebe et al.: “Formation of rat hepatocyte spheroids on agarose”, Hepatology Research, 32, 2, pp. 89 (2005).
- (14) Ken-Ichi Wada et al.: “Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers”, Development, 138, pp.3907 (2011).