[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.68, No. 4, pp.783~792, 1994]

温度感受性ポリマーとデキストラン硫酸を用いた 初代ヒト癌細胞の新しい培養方法

肥塚正博^{*,***}, 只左弘治, 原 聡^{**}

高野俊和^{***}, 茅原 紘

(*岐阜大学大学院連合農学研究科, 信州大学農学部,

近畿大学第1外科, *新田ゼラチン研究所)

平成5年7月26日受理

Method for Culture of Human Cancer Cells with a Thermoresponsive Polymer and Dextran Sulfate

Masahiro KOEZUKA^{*,***}, Koji TADASA, Satoshi HARA^{**}, Toshikazu TAKANO^{***}, and

Hiroshi KAYAHARA

* *United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido,
Gifu 501-11*

*Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University, 8304
Minamiminowa, Kamiina, Nagano 399-45*

** *Department of Surgery, Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohnohigasi,
Osakasayama, Osaka 589*

*** *Research Laboratory, Nitta Gelatin Inc., 2-22 Futamata, Yao, Osaka 581*

A method for cell culture with a thermoresponsive polymer and dextran sulfate was developed. In the culture of human cancer cell lines, the polymer had no cytotoxicity and the cells attached, spread, and grew well on a substrate conjugated with type I collagen and the polymer. Use of different collagen : polymer ratios in the primary culture of cells from human cancer which had serially been transplanted into nude mice showed that the ratio of 2 : 1 gave satisfactory attachment and detachment of the cells. At each ratio tested, cell attachment was greater with type IV collagen than with type I collagen. When human cancer cells obtained from surgical specimens were cultured on type IV collagen-polymer substrate with a medium containing dextran sulfate (10 µg/ml), the growth of contaminating fibroblasts was suppressed and the cancer cells proliferated. During subculture, the cancer cells detached from the primary culture on the type IV collagen-polymer substrate by treatment with ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid and low-temperature treatment (at about 25°C) without trypsin, and the cells continued to proliferate. These observations suggest that culture with a type IV collagen-polymer substrate and a culture medium containing dextran sulfate is useful for establishment of human cancer cell lines.

(Received July 26, 1993)

緒 言

ヒトの場合は生体レベルでの実験ができないので、培

養細胞を活用することに重要な意義がある。とくにヒト癌細胞株の樹立はヒト癌の原因、診断、治療などの研究手段として大切な研究材料となる^(1,2)。このヒト癌細胞

株を樹立する過程での技術的問題は初代培養系においては、癌間質から混入した線維芽細胞の優先的増殖^(3,4)であり、継代培養においては、細胞の回収の過程で用いるトリプシンなどのタンパク分解酵素による細胞障害^(5,6)である。

われわれ⁽⁷⁾は、初代培養系における線維芽細胞の優先的増殖に関する問題点を解決するために、デキストラン硫酸を含有した選択培地を開発した。この選択培地は、初代培養系に混入した線維芽細胞の増殖を抑制し、ヒト癌細胞を優先的に増殖させることができる。

Takezawa ら⁽⁸⁾は下限臨界共溶温度 (Lower Critical Solution Temperature ; LCST) が 30°C、つまり培養温度 37°C では溶解せず、室温 (約 25°C) で溶解する温度感受性ポリマーであるポリ N イソプロピルアクリルアミド (以下 PNIPAAm) と、I 型コラーゲンの混合物を、ヒト真皮由来線維芽細胞の培養基質として用いる新しい細胞剥離法を報告している。この方法を用いると、従来のタンパク分解酵素を使うことなく、温度変化のみで PNIPAAm-I 型コラーゲン基質を固相状態から液相状態へ変化させることで細胞を剥離し回収することができる。

そこで今回、われわれはヒト癌細胞を用いて温度感受性ポリマー (PNIPAAm) の基礎的検討を行うとともに、培養基質としては温度感受性ポリマーを用い、培養液としてはデキストラン硫酸を含有した選択培地を用いて、ヒト癌細胞の樹立化のための新しい培養方法を検討した。

実験方法

1. 材料 ヒト肺癌細胞株として免疫生物研究所より購入した PC-3, PC-13, PC-14 を実験に用いた。それぞれの細胞株は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DME, 日水製薬) に 10% ウシ胎児血清 (FBS, Gibco), 100 μ g/ml ペニシリン, 100 units/ml ストレプトマイシンを含む培地で継代培養した。ヌードマウス移植可ヒト悪性腫瘍株としてはヒト肺癌由来細胞株である KUM-LK 17 N, KUM-LK 35 N, P-1, P-2 を実験に用いた。KUM-LK 17 N と KUM-LK 35 N は近畿大学医学部第 1 外科で、P-1, P-2 は新田ゼラチン(株)研究所で樹立された。臨床手術材料としては、近畿大学第 1 外科学教室において、ヒト癌患者から手術によって摘出されたヒト肺癌 3 例、ヒト大腸癌 2 例、ヒト胃癌 2 例、ヒト

乳癌 2 例を対照とした。ヌードマウス移植可ヒト悪性腫瘍株および臨床手術材料は次に述べる方法によって単離癌細胞を得た。

2. 単離癌細胞の作製 得られた手術材料は無菌下でハサミ、ピンセットにて被膜、脂肪などを除去し、カミソリで細切した。次に細切した組織を DME 液 50 ml に移し、0.1% コラゲナーゼ (Type I, 190 units/mg : Sigma), および 0.2% ディスパーゼ (合同酒精) で 37°C で 2 時間処理し、組織中の結合組織を消化した。その後、ナイロンメッシュ・フィルター (ϕ 250 μ m) にて濾過し、遠心分離にて単離した細胞を回収した。

3. PNIPAAm の合成 PNIPAAm の合成は、Takezawa ら⁽⁸⁾の方法に従って行った。すなわち、N-イソプロピルアクリルアミドモノマー (NIPAAm, Eastman Kodak Co.) 50 g を、ベンゼン 500 ml に溶解し、2,2'-アゾビスイソブチルニトリル (AIBN) 0.2 g を重合開始剤として使用し、60°C で 12 時間、窒素気流中攪拌下で重合を行った。重合物はベンゼン中で沈殿するため、デカンテーションした後、沈殿物をテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、エチルエーテルを用いて沈殿精製を行った。

4. PNIPAAm の細胞毒性試験 ヒト肺癌細胞株 (PC-3, PC-13, PC-14) を 10% FBS 含有 DME 培養液にて 5×10^4 個/ml 濃度になるように細胞分散液を 0.5 ml ずつ 16 mm マルチウェル (Corning) に播種し、3 日間培養を行った。3 日間培養後、ヒト肺癌細胞株に任意の濃度の NIPAAm (モノマー) 含有培地と PNIPAAm (ポリマー) 含有培地を重層し、その後、3 日間培養を行った。試験物質処理後、Torishima ら⁽⁹⁾の方法に従い、マルチウェル内の生存細胞をニュートラルレッドの取込みで測定した。取込まれたニュートラルレッドは、50% エタノール-1% 酢酸液で抽出し、抽出液の吸光度をマイクロリーダー (540 nm) で測定し、percent of control で表示した。

すなわち、percent of control = $B/A \times 100$ (%)
(A, 対照群の OD 値 ; B, 試験物質処理群の OD 値)

5. PNIPAAm とコラーゲンの培養皿へのコーティング 約 4°C で 0.5% 濃度となるように蒸留水に PNIPAAm を溶解した後、濾過滅菌 (ϕ 0.45 μ m) した。この 0.5% PNIPAAm 水溶液と 0.5% I 型コラーゲン水溶液 (Cellmatrix Type I-C, Nitta Gelatin Inc.), または 0.5% PNIPAAm 水溶液と 0.5% N 型コラーゲン

(Cellmatrix Type IV, Nitta Gelatin Inc.) を 4°C で任意の混合比で混合した. 35 mm ディッシュ (Corning) には 0.45 ml の混合液を, 16 mm マルチウェル (Corning) には 0.1 ml の混合液を入れ, 表面上に均一に広げ, 約 12 時間 25°C 以下の温度でクリーンベンチ内で乾燥した (おのおの約 $125\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$). また, 同様の方法で, 0.25% PNIPAAm 水溶液, 0.25% I 型コラーゲン水溶液, 0.25% N 型コラーゲン水溶液を用いて PNIPAAm のみ (約 $125\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), I 型コラーゲンのみ (約 $125\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), N 型コラーゲンのみ (約 $125\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) をコートした培養皿を調製した.

6. 培養操作 ヒト癌細胞株を 10% FBS 含有 DME 培養液にて 5×10^4 個/ml 濃度になるように細胞分散液を調製し, 37°C に保温した. 次に 37°C に保温した細胞分散液を 37°C のウォームプレート (DC-MP 100 DM, 北里サプライ) 上で 2 ml ずつおのおのの基質をコートした 35 mm ディッシュ (Corning) に播種し, 5.0% CO_2 , 95% air, 37°C 条件下のインキュベーター内で培養を行った. 培養終了後, LCST より低い室温 (約 25°C) に培養皿を取り出して基質ポリマーの溶解に伴う細胞挙動を顕微鏡で観察した.

ヌードマウス移植可ヒト癌細胞株および外科手術から得たヒト癌細胞は, 先に述べた方法によって, 細胞分散液を調製し, 37°C に保温した.

次にこの細胞分散液 (1×10^5 個/ml) を 0.5 ml ずつ, おのおのの基質をコートした 16 mm マルチウェル (Corning) に 37°C のウォームプレート上で播種し, 培養を行った. 培養液は DME 培地+10% FBS+インシュリン ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma)+上皮細胞生長因子 (EGF; $10\ \text{ng}/\text{ml}$, Collaborative Research) とし, 必要に応じてデキストラン硫酸ナトリウム (500 k daltons, Sigma) を最終濃度 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した.

おのおのの基質に対する癌細胞の細胞接着度, 細胞剥離度, および細胞増殖度は, マルチウェル内の細胞の DNA 量を測定することによって判定した. DNA 量は Hinegardner ら⁽⁹⁾の方法に準じて塩酸ジアミノ安息香酸液 (Aldrich) を用いた蛍光法によって測定した. 細胞の剥離方法は, 何もコートしていない培養皿上, およびコラーゲンのみをコートした培養皿上 (以下, コラーゲン基質) では, 1 mM EGTA を 3 分間処理し, 吸引後, 0.1% トリプシン (1:250, Difco) を 5 分間処理することによって, 細胞を剥離させた. PNIPAAm とコラー

ゲン混合物をコートした培養皿 (以下 PNIPAAm-コラーゲン基質) では, 1 mM EGTA を 3 分間処理し, 吸引後培地を加え, 培養皿を室温 (約 25°C) に, 約 15 分間放置することによって細胞を剥離させた.

結 果

1. ヒト癌細胞株を用いた PNIPAAm 基質の基礎的検討

まず, 最初に予備的な検討として NIPAAm (モノマー) と PNIPAAm (ポリマー) の細胞毒性を調べた. 実験には, 3 日間培養した 3 種類のヒト肺癌細胞株 (PC-3, PC-13, PC-14) に NIPAAm 含有培地と PNIPAAm 含有培地を添加し, その後 3 日間培養を行い, 培養終了後, ニュートラルレッドの取込み量を測定することによって判定した. Fig. 1 に示されるように, NIPAAm は $0.2\ \text{mg}/\text{ml}$ の低濃度において強い細胞毒性を示した. これに対して, PNIPAAm は $2\ \text{mg}/\text{ml}$ の高濃度においても細胞毒性を示さなかった.

次に PNIPAAm 基質上, および PNIPAAm-I 型コラーゲン (混合比 1/1) 均一混合基質上で, 3 日間ヒト肺癌細胞株 (PC-14) を培養した. PC-14 細胞は PNIPAAm ポリマー基質には接着, および伸展しなかった

Fig. 1. Cytotoxicity of NIPAAm and PNIPAAm against Cancer Cell Lines. The cells were cultured in DME medium+10% FBS containing different concentrations of NIPAAm (O, Δ, □) or PNIPAAm (●, ▲, ■) for 3 days. Cytotoxicity was estimated by the uptake of neutral red by viable cells. O, ●, PC-13; Δ, ▲, PC-14; □, ■, PC-3. Data are expressed as mean of triplicate cultures. The standard deviation was less than 10% in all cases.

Fig. 2. Attachment, Spreading and Growth of PC-14 Cancer Cells on PNIPAAm. The cells were cultured for 3 days. (A) On PNIPAAm-coated dish, (B) On collagen-PNIPAAm mixture-coated dish. Bars indicate 100 μ m.

(Fig. 2 A). しかし, PNIPAAm に I 型コラーゲンを混合することによって, PC-14 細胞は接着, 伸展, 増殖した (Fig. 2 B).

さらに PNIPAAm-I 型コラーゲン (混合比 1/1) 均一混合基質上で, PC-14 細胞を subconfluent になるまで 37°C で培養した (Fig. 3 A). 培養終了後, 細胞を EGTA で 3 分間処理後, この培養皿を PNIPAAm の LCST より低い室温 (約 25°C) に放置することにより, PNIPAAm ポリマー-I 型コラーゲン基質は液化し, 細胞は培養皿底面から剥離し, 単離された状態で浮遊してきた (Fig. 3 B). この単離された細胞浮遊液の 1/10 量を PNIPAAm-I 型コラーゲン基質上に継代すると細胞は再び接着, 伸展, 増殖した (Fig. 3 C). また, PC-3 細胞, および PC-13 細胞についても同様の結果が得られた.

以上のことから, PNIPAAm はヒト癌細胞株に対して細胞毒性を示さず, さらに癌細胞株は PNIPAAm-I 型コラーゲン均一混合基質上で, 接着, 伸展, 増殖し, EGTA 処理と温度変化のみで単一細胞の状態で剥離し,

継代培養が可能であることが確認された.

2. ノードマウス移植可ヒト癌細胞を用いた PNIPAAm-コラーゲン基質の混合比の検討

PNIPAAm-I 型コラーゲン (混合比 1/1) 均一混合基質 (以下, 均一混合基質) がヒト癌細胞の初代培養においても有効であるか否かを検討した. 実験には, 4 種類のノードマウス移植可ヒト悪性腫瘍を用いて, 何もコートしていないウェル (以下コントロール), I 型コラーゲンをコートしたウェル (以下 I 型コラーゲン基質), および混合基質に対する細胞接着性を比較した. 細胞接着性は, 播種した細胞の DNA 量 (A) と各基質に接着した細胞の DNA 量 (B) を測定することによって % of cells attached で Fig. 4 に示した.

すなわち, $\% \text{ of cells attached} = B/A \times 100 (\%)$

Fig. 4 に示されるように, KUM-LK 17 N の細胞接着性は, コントロール群, I 型コラーゲン基質群, 均一混合基質群との間で比較すると有意な差はなかったが KUM-LK 35 N, P-1, P-2 の均一混合基質に対する細胞接着性は, コントロール群, I 型コラーゲン基質群と比べると, 有意に低値であった. そこで, 癌細胞の均一混合基質に対する細胞接着性を改善するために, PNIPAAm と I 型コラーゲンとの混合比について検討するとともに, IV 型コラーゲンについても併せて検討した. 実験には前述した 4 種類のヒト肺癌細胞を用い, コラーゲンと PNIPAAm の混合比が 0.5/1~5/1 (コラーゲン/PNIPAAm) の範囲で細胞の接着性, および剥離度を検討した. 細胞の接着性は, 何もコートしていないウェルに接着した細胞の DNA 量 (A) をコントロールとし, 混合基質に接着した細胞の DNA 量 (B) を測定することによって, % of control で Fig. 5 に示した. すなわち, $\% \text{ of control} = B/A \times 100 (\%)$.

細胞の剥離度は剥離前の DNA 量 (A) をコントロールとし, EGTA-低温処理によって剥離した細胞の DNA 量 (B) を測定することによって % of cells detached で Fig. 6 に示した. すなわち, $\% \text{ of cells detached} = B/A \times 100 (\%)$.

Fig. 5 に示されるように, 混合基質に占めるコラーゲンの比率が高くなると細胞の接着性は高くなり, 逆に細胞の剥離度は低下した (Fig. 6). Fig. 5 および Fig. 6 の結果から判断すると, 細胞の接着性が高く, かつ細胞の剥離度が高い混合比は, I 型コラーゲンおよび IV 型コラーゲン共に 2/1 (コラーゲン/PNIPAAm) であった. ま

Fig. 3. Detachment and Growth of PC-14 Cancer Cells Cultured on a Collagen-PNIPAAm Mixture Substrate. The cells were cultured on the substrate for 7 days (A) and the cultured cells were detached from the substrate by using EGTA and low temperature treatment (B). The detached cells were subcultured on the substrate for 3 days (C). Bars indicate 100 μ m.

Fig. 4. Attachment of 4 Human Cancer Cells to Various Substrata. The cells obtained from a human cancer transplanted into nude mouse were plated on the substrata. After 24h of incubation at 37°C, the cells were fixed and the DNA contents were measured. (A) On plastic dish; (B) On collagen-coated plastic dish; (C) On collagen-PNIPAAm mixture-coated plastic dish. □, KUM-LK 17N; ▨, KUM-LK 35N; ▤, P-1; ■, P-2. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of triplicate cultures. * $p < 0.05$ compared with (A) or (B) (by Student's *t*-test)

た, 同一の混合比における I 型コラーゲン-PNIPAAm 基質に対する細胞接着性 (Fig. 5 A) と IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質に対する細胞接着性 (Fig. 5 B) を比較すると, IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質のほうが細胞接着性が高いことも確認された。

以上の結果から, 以降の検討は IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質を用い, 混合比は 2/1 (コラーゲン/PNIPAAm) とした。

3. IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質とデキストラン硫酸を用いたヒト癌細胞の初代培養および継代培養

IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質 (配合比 2/1) と, デキストラン硫酸を含有した選択培地を用いて, ヒト癌細胞の初代培養, および継代培養を行った。対照としては, IV 型コラーゲン基質を用いた。実験には, ヒト癌患者から外科手術によって得た肺癌 3 例, 大腸癌 2 例, 胃癌 2 例, 乳癌 2 例を用いた。ヒト癌細胞はデキストラン硫酸を含まない通常の培地では, IV 型コラーゲン-PNIPAAm 基質上で線維芽細胞が優先的に増殖した (Fig. 7 A)。これに対して, デキストラン硫酸を含む選択培地では線維芽細胞の増殖は抑制され, ヒト癌細胞が優先的に増殖した (Fig. 7 B)。Fig. 7 A に示されるように, デキストラ

Fig. 5. Attachment of 4 Human Cancer Cells to Collagen-PNIPAAm Mixture Substrata. The cells obtained from human cancer transplanted into nude mouse were plated on a plastic dish (control) or on plastic dishes coated with various ratio mixtures of collagen and PNIPAAm. After 24 h of incubation at 37 °C, the cells were fixed and the DNA contents were measured. (A) Type I collagen-PNIPAAm mixtures. (B) Type IV collagen-PNIPAAm mixtures. □, KUM-LK17N; ▨, KUM-LK35N; ▩, P-1; ■, P-2. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of triplicate cultures. * $p < 0.05$ compared with the same ratio as (A) (by Student's *t*-test)

ン硫酸無添加群において、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm 基質上で線維芽細胞が優先的に増殖した症例は、肺癌 3 例中 1 例、大腸癌 2 例中 1 例、胃癌 2 例中 1 例、乳癌 2 例中 2 例であった。しかし、デキストラン硫酸添加群においては全例において Fig. 7 B に示されるように、線維芽細胞の増殖は抑制され、癌細胞の優先的増殖が確認された。

そこで、デキストラン硫酸を含有した選択培地を用いて、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm (混合比 2/1) 基質上、およびⅣ型コラーゲン基質上でヒト癌細胞の初代培養、および継代培養を行い、それぞれの基質上における細胞接着性と細胞増殖度を比較した。細胞接着性は、播種した細胞の DNA 量 (A) と各基質に接着した細胞の DNA 量 (B) を測定することによって % of cells attached で Fig. 8 に示した。すなわち、% of cells

Fig. 6. Detachment of Cancer Cells Cultured on Collagen-PNIPAAm Mixture Substrata. The cells were cultured on plastic dishes coated with various ratio mixtures of collagen and PNIPAAm for 10 days. After the cultured cells were treated by using EGTA and low temperature treatment (at about 25°C), the detached cells were fixed and the DNA contents were measured. (A) Type I collagen-PNIPAAm mixtures. (B) Type IV collagen-PNIPAAm mixtures. □, KUM-LK17N; ▨, KUM-LK35N; ▩, P-1; ■, P-2. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of triplicate cultures.

attached = $B/A \times 100$ (%). 細胞増殖度は、播種した細胞 (0 time) の DNA 量 (A) と各基質上で 10 日間培養した細胞の DNA 量 (B) を測定することによって、Growth Rate で Fig. 9 に示した。すなわち、Growth Rate = B/A 。

ヒト癌細胞の初代培養における細胞接着性 (Fig. 8) と細胞増殖度 (Fig. 9) を、Ⅳ型コラーゲン基質上 (Fig. 8 A, Fig. 9 A) とⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質上 (Fig. 8 B, Fig. 9 B) で比較すると、Ⅳ型コラーゲン基質上のほうが細胞接着性、および細胞増殖度が高い症例が多かった。

次に、それぞれの基質上で、ヒト癌細胞を 2 週間培養した後に継代培養を行った。Ⅳ型コラーゲン基質上では EGTA-Trypsin 処理によって、細胞を再びⅣ型コラーゲン基質に継代した (以下、EGTA-Trypsin 処理法)。Ⅰ型コラーゲン-PNIPAAm 基質では、EGTA 処理後、培

Fig. 7. Effect of Dextran Sulfate on Growth of Human Cancer Cells in Primary Culture on a Type IV Collagen-PNIPAAm Mixture Substrate. The breast cancer cells obtained from surgery were cultured without (A) and with (B) dextran sulfate at 10 μ g/ml for 10 days. Bars indicate 100 μ m.

養皿を室温(約 25°C)に放置することによって細胞を剝離し、剝離した細胞を、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm 基質に継代した(以下、EGTA-低温処理法)。

EGTA-Trypsin 処理法によって継代した癌細胞の細胞接着性 (Fig. 8 A), および細胞増殖度 (Fig. 9 A) は、継代前より低下する症例が多かった。EGTA-Trypsin 処理法によって継代した癌細胞の細胞接着性が有意に低下した症例は、肺癌 3 例中 2 例、大腸癌 2 例中 1 例、胃癌 2 例中 0 例、乳癌 2 例中 1 例であった。また、細胞増殖度が有意に低下した症例は、肺癌 3 例中 2 例、大腸癌 2 例中 1 例、胃癌 2 例中 1 例、乳癌 2 例中 2 例であった。これに対して、EGTA-低温処理法によって継代した癌細胞の細胞接着性 (Fig. 8 B), および細胞増殖度 (Fig. 9 B) が低下した症例は 1 例もなく、継代後、肺癌 2 例、大腸癌 1 例、乳癌 1 例の細胞接着性と大腸癌 1 例、胃癌 1 例の細胞増殖度は、継代前より有意に高い値を示し

Fig. 8. Attachment of Cancer Cells on Substrates in Primary Culture and Subculture. (A) The cells were plated on a Type IV collagen-coated dish in primary culture (□) and subculture (▨). The cells primarily cultured on the substrate were detached by EGTA-trypsin treatment. (B) The cells were plated on a Type IV collagen-PNIPAAm mixture-coated in primary culture (□) and subculture (▨). The cells primarily cultured on the substrate were detached by EGTA-low temperature treatment. After 24 h of incubation at 37°C, the cells were fixed and the DNA contents were measured. L-1, L-2, L-3, Lung cancer cells; C-1, C-2, Colon cancer cells; S-1, S-2, Stomach cancer cells; M-1, M-2, Breast cancer cells. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of triplicate cultures. * p < 0.05 by Student's t -test.

た。

以上のことから、培養液にデキストラン硫酸を含有した選択培地を用い、培養基質にⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質(混合比 2/1)を用いた培養方法は、初代培養系に混入した線維芽細胞の増殖を抑制するとともに、EGTA と温度変化のみで効率的にヒト癌細胞の継代培養を行うことが可能であることが確認された。

考 察

本研究はヒト癌細胞株の樹立のための新しい培養方法

Fig. 9. Growth of Cancer Cells in Subculture after Detaching by Using EGTA-Trypsin Treatment or EGTA-Low Temperature Treatment. (A) After the cells were cultured on a type IV collagen-coated dish (□), the cultured cells were subcultured after EGTA-Trypsin treatment on the substrate (▨). (B) After the cells were cultured on a type IV collagen-PNIPAAm mixture-coated dish (□), the cells were subcultured after EGTA-low temperature treatment on the substrate (▨). On day 10, the cells were fixed and the DNA contents were measured. Growth Rate=DNA content on 10 days/DNA content at "0" time. L-1, L-2, L-3, Lung cancer cells; C-1, C-2, Colon cancer cells; S-1, S-2, Stomach cancer cells; M-1, M-2, Breast cancer cells. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of triplicate cultures. * $p < 0.05$ by Student's t -test.

の開発を目的として行われた。その結果、細胞培養の基質として、PNIPAAm とコラーゲンの混合物を用い、培養液としてはデキストラン硫酸を含有した選択培地を用いることによって、ヒト癌細胞の初代培養、および継代培養を効率的に行うことが可能であることを明らかにした。すなわち、PNIPAAm はヒト癌細胞に対して細胞毒性を示さず、さらに癌細胞は PNIPAAm にコラーゲンを混合することによって、接着、伸展、増殖し、EGTA 処理と温度変化のみで細胞が剥離し、継代培養が可能であった。PNIPAAm 基質が温度変化によって液化する

のは、水と PNIPAAm のアミドグループと水素結合が温度に依存して形成されるためである^(6,10)。すなわち、温度が LCST 以下であれば、この水素結合が形成されて PNIPAAm は水に不溶性となる。また、細胞が PNIPAAm 基質上に接着、伸展しないのは PNIPAAm 基質の細胞表面が疎水性を示すためであると考えられる。接着依存性細胞が接着、伸展、増殖するためには、細胞基質の表面が親水性であることが必要である⁽¹¹⁾。すなわち、PNIPAAm に親水性タンパク質、および細胞接着因子であるコラーゲン⁽¹²⁻¹⁴⁾を混合することによって、PNIPAAm 基質の表面が親水性となり、細胞接着、伸展、増殖が著しく改善されたと推定される。

PNIPAAm-コラーゲン基質をヒト癌細胞の初代培養に応用する際の重要なポイントの 1 つは、コラーゲンと PNIPAAm の混合比であった。すなわち、コラーゲンの混合比の増加に伴い、細胞接着性は向上するが、逆に細胞の剥離度は低下した。ヒト癌細胞の初代培養系において、良好な細胞接着性および細胞剥離度を示した混合比は、2/1 (コラーゲン/PNIPAAm) であった。

もう 1 つの重要なポイントは、PNIPAAm に混合する際のコラーゲンのタイプであった。すなわち、I 型コラーゲン-PNIPAAm 基質は、培養細胞株においては良好な細胞接着性を示したが、初代培養系においては癌細胞との接着性が低かった。そこで、この問題を解決する手段として、基質膜成分の 1 つである N 型コラーゲンのコーティングが上皮細胞の接着や遊走に有効であるという報告⁽¹⁵⁻¹⁷⁾に基づき、今回の実験で N 型コラーゲンを PNIPAAm に混合した。その結果、ヒト癌細胞の初代培養系において、N 型コラーゲン-PNIPAAm 基質は I 型コラーゲン-PNIPAAm 基質より細胞接着活性が高いことが明らかになった。しかし、癌細胞の細胞接着性、および細胞増殖度を、N 型コラーゲン-PNIPAAm 基質上と N 型コラーゲン基質上で比較すると、N 型コラーゲン-PNIPAAm 基質上での細胞接着性と細胞増殖性は低値であった。これは前述した PNIPAAm の疎水性が N 型コラーゲンの効果を阻害しているためであると考えられる。

一方、N 型コラーゲン基質上で培養し、EGTA-Trypsin 処理によって細胞を剥離し、N 型コラーゲン基質に継代培養したヒト癌細胞の細胞接着性と細胞増殖度は継代前より有意に低下した。これは、樹立細胞株と異なり、初代培養系の癌細胞の細胞膜はきわめて脆弱なも

の⁽⁵⁾であり、そのため、トリプシンによって細胞が損傷を受けたと考えられる。これに対して、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm 基質で培養し、EGTA-低温処理によって細胞を剥離し、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm 基質に継代培養したヒト癌細胞は安定に増殖した。すなわち、EGTA-低温処理法では癌細胞は細胞膜の損傷を受けることなく基質の溶解に伴い、その結果として癌細胞はその足場を失い、自然に培養皿底面から剥離してきたと考えられる。また、EGTA-低温処理法によって継代した癌細胞の細胞接着性と細胞増殖度は、継代前より高値を示す症例も確認された。これは初代培養において、細胞接着活性、および細胞増殖活性の高い細胞の比率が増加し、それが損傷を受けることなく継代された結果、継代前よりも高い値を示したと考えられる。

PNIPAAm-コラーゲン基質上で培養したヒト癌細胞を継代培養する際の重要なポイントは、低温処理前のEGTAの使用であった。Takezawa ら⁽⁶⁾は、PNIPAAm-コラーゲン基質上で増殖した線維芽細胞を温度変化のみで剥離させると、球状凝集細胞塊を形成すると報告している。そして、この球状凝集細胞塊は、*in vitro* 三次元構築モデルとして有用であると述べている。しかし、この球状凝集細胞塊は、ヒト癌細胞株の樹立のための継代方法には適さない(私信)。すなわち、ヒト癌細胞株の樹立のための継代培養においては、単一細胞の状態で剥離させ、継代する必要がある。EGTAは、細胞間の結合に関与しているカルシウムイオンを選択的に除去する。すなわち、基質上で培養されたヒト癌細胞に対してEGTA処理を行うと細胞間の結合が緩み、次に低温処理を行うと、単一細胞の状態で剥離した。

ヒト癌細胞の樹立化のためのもう1つの問題点は、冒頭で述べたように初代培養系に癌間質から混入した線維芽細胞の優先的増殖である。われわれ⁽⁷⁾はこの問題点を解決するためにデキストラン硫酸を含有した選択培地を開発した。また、今回の検討において、このデキストラン硫酸を含有した選択培地は、PNIPAAm-コラーゲン基質上のヒト癌細胞の初代培養系においても線維芽細胞の増殖を抑制し、ヒト癌細胞を優先的に増殖させることを明らかにした。

結論として、培養液にデキストラン硫酸を含有した選択培地を用い、培養基質にⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質を用いた培養方法は、従来の単層培養法に比べ、ヒト癌細胞の樹立を効率的に行うことを可能にする新しい

培養方法であると考えられる。

要 約

温度感受性ポリマー (PNIPAAm) とデキストラン硫酸を用いた新しい培養方法を開発した。

(1) ヒト癌細胞株を用いた検討では、PNIPAAm はヒト癌細胞に対して細胞毒性を示さなかった。そして、ヒト癌細胞は PNIPAAm-I 型コラーゲン混合基質上で、接着、伸展、増殖した。

(2) ノードマウス移植系ヒト癌細胞を用いて、PNIPAAm とコラーゲンの混合比を検討したところ、細胞の接着性が高く、かつ細胞の剥離度が高い混合比は 2/1 (コラーゲン/PNIPAAm) であった。また、同一混合比での細胞接着性はⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質のほうがⅠ型コラーゲン-PNIPAAm 基質よりも高い値を示した。

(3) 外科手術から得たヒト癌細胞を、Ⅳ型コラーゲン-PNIPAAm 基質で 10 µg/ml のデキストラン硫酸を含む培地で初代培養した結果、癌間質から混入した線維芽細胞の増殖は抑制され、そして、ヒト癌細胞が優先的に増殖した。次にⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質上で初代培養したヒト癌細胞をトリプシンを使うことなく、EGTA と低温処理 (約 25°C) によって剥離させ、継代培養した結果、ヒト癌細胞は安定に増殖した。

以上の結果から、培養液にデキストラン硫酸を含有した選択培地を用い、培養基質にⅣ型コラーゲン-PNIPAAm 基質 (混合比 2/1) を用いた培養方法は、ヒト癌細胞の樹立化のための新しい培養方法として有用であることが示唆された。

- (1) 菅野晴夫:「人癌細胞の培養」, 大野章一, 菅野晴夫編, 朝倉書店, 東京, 1975, pp.3—6.
- (2) 野澤志朗, 塚崎克己, ツオクロ・ウイジャヤ, 山田素子, 酒依元子, 成沢園子, 票原操寿, 上田政嗣: 組織培養, **10**, 373—380 (1984).
- (3) W. W. Kao and D. J. Prockop: *Nature*, **266**, 63—64 (1977).
- (4) T. Okabe, A. Suzuki, N. Ohsawa, K. Kosaka, and T. Terasima: *Cancer Res.*, **39**, 4189—4194 (1979).
- (5) 山根 績, 菅 幹雄: 組織培養, **9**, 432—436 (1983).
- (6) T. Takezawa, Y. Mori, and K. Yoshizato: *Bio/Technology*, **8**, 854—856 (1990).
- (7) 肥塚正博, 只左弘治, 原 聡, 小田幸子, 谷坂圭造, 茅原 紘: 農化, **67**, 1591—1597 (1993).

- (8) H. Torishima, H. Arakawa, S. Matsui, and M. Watanabe : *AATEX*, **1**, 20—26 (1990).
- (9) R. T. Hinegardner : *Anal. Biochem.*, **39**, 197—201 (1971).
- (10) M. Heskins and J. E. Guillet : *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A 2**, 1441—1455 (1968).
- (11) 下岡正志, 伊井一夫 : 組織培養, **15**, 474—479 (1989).
- (12) J. Yang and S. Nandi : *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249—286 (1983).
- (13) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橘陽一, 草間良恵, 古閑睦好 : 組織培養, **13**, 26—30 (1987).
- (14) T. Shimo-Oka, Y. Hasegawa, and I. Ii : *Cell. Struct. Funct.*, **13**, 515—524 (1988).
- (15) J. C. Murray, G. Stingle, H. K. Kleinman, G. R. Martin, and S. I. Kats : *J. Cell Biol.*, **80**, 197—202 (1979).
- (16) M. Aumailley and R. Timpl : *J. Cell Biol.*, **103**, 1569—1575 (1986).
- (17) 大谷津恭之, 古山登隆, 猪原節之介 : 北里医学, **20**, 121—131 (1990).
-