

Sigma-Aldrich®

Lab & Production Materials

2022年 10月
Vol.15

sigmania

シグマニア

Sigma-Aldrichを中心に、バイオロジー研究に
役立つ新製品と注目の試薬を一気に紹介！
すでに人気の製品から、隠れた人気製品まで。
ぜんぶ知っているあなたはシグマニア？

身近になった 3D培養



CONTENTS

シグマニア必見！

2D 培養 vs 3D 培養

新たな *in vitro* モデルとしてのオルガノイドの可能性 . . . 2

無血清培地条件におけるヒト iPS 細胞の
大腸オルガノイドへの *in vitro* 分化 4

ヒト iPS 細胞由来大腸オルガノイドを用いた
薬物の細胞毒性スクリーニング 5

抗体を用いたホルマウントオルガノイドの
免疫蛍光染色 5

患者由来オルガノイド
胃腸管 (GI) バイオバンク **NEW** 6

スクリーニング用

3dGRO® ヒト CRC オルガノイド **NEW** . . . 6

そうだったんだ！

テクニカルサービスよりよくあるご質問にお答えします！

免疫染色関連 7

タンパク質間相互作用がフローサイトメトリーで検出可能

Duolink™ PLA

フローサイトメトリー検出キット **NEW** . . . 8

PROTAC® 化合物におけるリンカーの重要性 . . 9

タンパク質間相互作用、翻訳後修飾、低濃度タンパク質の可視化に

Duolink™ 近接ライゲーションアッセイ 9

～タンパク質など生体分子間の相互作用を探る～

近接依存性標識の新手法 **NEW** 10

Venture Support Program 参加企業紹介 vol.1

株式会社 幹細胞&デバイス研究所 11

パズルでハカセと対決！ 12

表紙のスポーツは？

ハカセが挑戦しているのはスラックライン。約 3 cm 幅のベルトの上でトランポリンのように
跳ねてアクロバットをしたり、綱渡りのように歩いたりするスポーツです。

2D 培養 vs 3D 培養

新たな *in vitro* モデルとしてのオルガノイドの可能性

モデルシステムを用いることで、生体のプロセスと機能を分子レベルから器官全体レベルまで再現し、生物学研究は発展してきました。人体は、高度に分化した細胞と非細胞の両方の要素で構成されています。1つの *in vitro* モデルシステムでヒトの生物学的側面をすべて模倣することは困難です。3D 細胞培養モデルは、2D 平面で細胞を成長させるのではなく、生体内の細胞が経験する自然環境をより正確に表現することができます。

既存の細胞モデルシステムの限界

動物モデル

- ヒトと動物の生物学的相違
- イメージングおよびハイスループット研究での使いやすさの限界¹
- 高コスト

2D 細胞単層

- 細胞の表現型の喪失
- 細胞 - 細胞間および細胞 - 間質間相互作用の欠如
- *In vivo* 条件と同様の細胞機能とシグナル伝達経路の模倣不可

3D 細胞集合体

- 細胞組織と相互作用の模倣が一過性
- 長期間培養を維持することが困難
- 自己複製能と分化能の欠如²

オルガノイドとは？



初代組織に似た組成
および構造

In vivo 条件に近いモデル

長期間培養に適した
安定したシステム

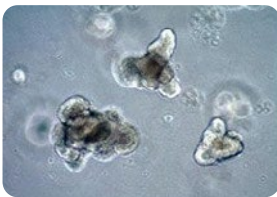
オルガノイドは、自己複製、自己組織化が可能であり、臓器の機能を発揮する初代組織または幹細胞に由来する、*in vitro* の 3D 細胞集合体です³。オルガノイドには、既存のモデルシステムにおける制約の克服につながる以下の特長があります。

オルガノイドは、自己複製する小さな幹細胞の集団を擁しており、それらは生理的な状態と同様に、あらゆる主要な細胞系列の細胞に分化することができます。

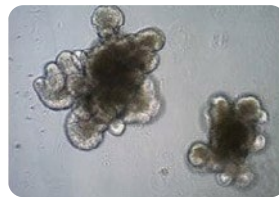
オルガノイドは、どのモデルシステムにも生物学的に適性が高く、ニッチ因子や遺伝子配列を操作することが出来ます。

オルガノイドは、バイオバンクとして凍結保存でき、幹細胞の自己複製能、分化能、自己組織化能を利用することで、際限なく拡張することが可能です。

Day 5



Day 7



Day 10

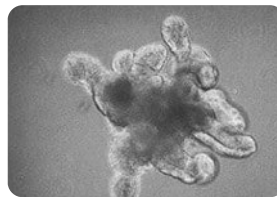


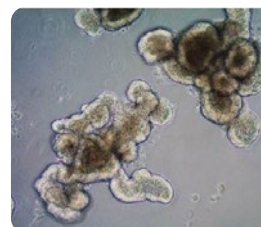
図 1. マウス腸上皮オルガノイド

Clevers ら (Science 2013) に概説されたプロトコルに従って、成体マウスの腸組織から 3D オルガノイドを作製しました。オルガノイド細胞は、培養 3 ~ 5 日頃に内腔と器官芽構造を形成し始め、7 ~ 10 日頃に複雑な陰窩様構造を形成します。これらの陰窩様領域は、機能的には腸管の機能と類似しています。腸管では、分裂した LGR5+ 腸管幹細胞が陰窩底部に局在するパネート細胞により挟まれます。

オルガノイドとスフェロイドの比較

オルガノイドとスフェロイドは、いずれも 3 次元で培養された細胞です。スフェロイドは、多くの場合、癌細胞株または腫瘍生検を超低接着表面プレートで浮遊させた状態で培養した細胞集合体として形成されますが、オルガノイドは、MATRIGEL® などの ECM ハイドロゲルマトリックス内に埋め込まれた組織幹細胞から誘導されます。オルガノイドは非常に複雑で、スフェロイドと比較すると *in vivo* に類似しています。近年、腫瘍のオルガノイドは、個別化医療のサポートを目的として、患者が抗がん剤にどれだけよく反応するかを予測することに用いられています。

Organoids



Spheroids

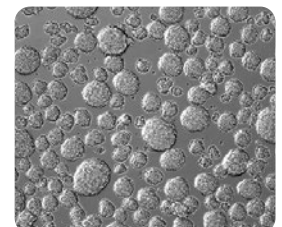


図 2. オルガノイドとスフェロイドの比較

幹細胞由来のオルガノイドは、腫瘍スフェロイドと比較してより高次の組織の複雑性を持ち、より *in vivo* に近い表現型を示します。

参考文献

1. Shanks N, Greek R, Greek J. 2009. Are animal models predictive for humans?. *Philos Ethics Humanit Med.* 4(1):2. <http://dx.doi.org/10.1186/1747-5341-4-2>
2. Yin X, Mead BE, Safaee H, Langer R, Karp JM, Levy O. 2016. Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell.* 18(1):25-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>
3. Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* 345(6194):1247125-1247125. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1247125>
4. Lancaster MA, Renner M, Martin C, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 501(7467):373-379. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12517>

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

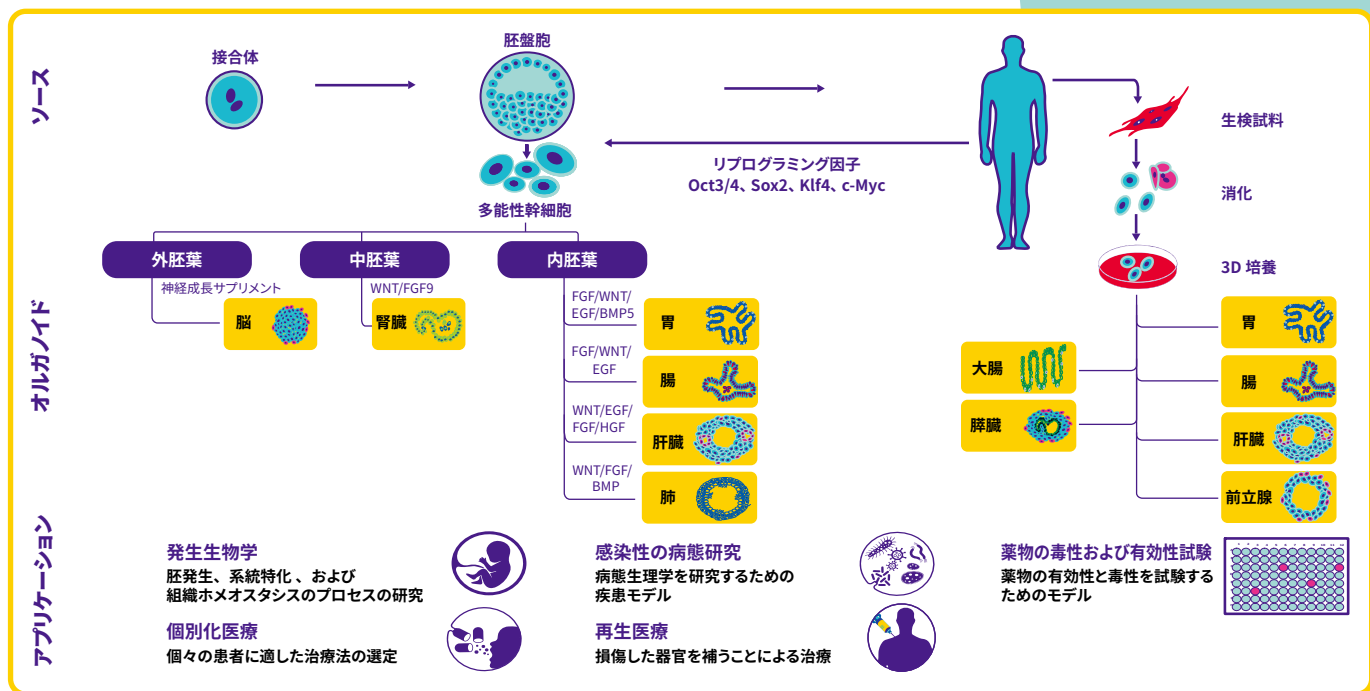


図 3. 初代組織・多能性幹細胞からのオルガノイド生成とそのアプリケーション

オルガノイドのアプリケーション

オルガノイドは適切な生理学的性質を有しており、分子生物学および細胞生物学的な分析に適しているため、基礎研究および橋渡し研究の両方で大きな期待が寄せられています (図 3)。

発生生物学

ES 細胞、iPS 細胞由来のオルガノイドは、発生段階の特徴を有しており、胚発生、系列特化、組織のホメオスタシスなどの解明に役立っています。また、幹細胞の発生やニッチの研究にも有用です。

Wnt、BMP および FGF などのシグナル伝達経路を調節することにより誘導される連続的な分化ステップを通して、脳⁴、膵臓⁵ および胃⁶などの臓器の発生プロセスが研究されました。

感染症の病態

オルガノイドは臓器のすべての構成要素を表すので、特定のタイプのヒト細胞に影響を与えるような感染症の研究に適しています。インターフェロン調節因子-7 の null 対立遺伝子を持つ、健康な子どもの iPS 細胞に由来する肺オルガノイドが、インフルエンザウイルス複製の研究に使用されました⁷。ヒト iPS 細胞に由来する前脳オルガノイドは、神経前駆細胞におけるジカウイルスの感染を研究するために用いられました⁸。

再生医療

成体幹細胞に由来するオルガノイドの移植は、損傷した臓器または組織を代替することができます。さらに、CRISPR/Cas9 テクノロジーによる遺伝子編集は、単一遺伝子の遺伝性疾患の治療に利用できる可能性があります。

小腸オルガノイドは、マウスモデルに移植した場合、絨毛形成やパネート細胞の存在など、小腸の特徴を保持していました⁹。

薬物の毒性および有効性試験

代替標的、代替臓器 (腸、肝臓、腎臓) として薬物の有効性や毒性の試験に採用すれば、実験動物の使用に関連する倫理的問題の解決につながられる可能性があります。

シスプラチンの腎毒性を実証するために、ヒト腎臓オルガノイドが使用されました¹⁰。

個別化医療

個々の患者の成体幹細胞から作製したオルガノイドにより、*ex vivo*での薬物反応性を検証することができます。

大腸オルガノイドを使用して、希少な CFTR 変異を有する患者の治療法を選定しました¹¹。

腫瘍オルガノイドは、個々の患者のレベルで薬物反応を評価するために使用できます。

- Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, Gobaa S, Ranga A, Semb H, Lutolf M, Grapin-Botton A. 2013. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development in vitro. *Development*. 140(21):4452-4462. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.096628>
- McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, Tsai Y, Mayhew CN, Spence JR, Zavros Y, et al. 2014. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*. 516(7531):400-404. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13863>
- Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, Lafaille FG, Trouillet C, Schmolke M, Albrecht RA, et al. 2015. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science*. 348(6233):448-453. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa1578>
- Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, et al. 2014. Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev.* 28(16):1752-1757. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.245233.114>
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NWM, Bijvelds MJC, Scholte BJ, et al. 2013. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*. 19(7):939-945. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3201>
- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*. 526(7574):564-568. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15695>
- Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, et al. 2011. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 470(7332):105-109. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09691>

無血清培地条件におけるヒト iPS 細胞の大腸オルガノイドへの *in vitro* 分化

Kevin Su, Nick Asbrock, Vic Chu, Ph.D., Stefanie Hoffmann, M.S., Philip Hewitt, Ph.D

オルガノイドは、幹細胞に由来する複雑な自己組織化 3D 細胞培養モデルです¹。オルガノイドは、脳²、腸³、胃⁴、大腸⁵、肝臓⁶、膵臓⁶、肺⁷、腎臓⁸ および患者由来の腫瘍⁹ を含む多様な組織から生成されています。腸様器官またはミニ腸と呼ばれる上皮性腸オルガノイドは、消化器系の生理学的特性を維持しており、大腸癌、セリアック病、炎症性腸疾患および宿主微生物叢相互作用の研究において、腸の発生と疾患のモデルとなる細胞培養ツールとして活用されてきました¹⁰。Clevers らが開発した従来の分離技術¹では、マウスまたは入手困難なヒトの組織サンプルから、多くの工程を経て初代組織を分離する必要があります。人工多能性幹細胞由来のオルガノイドにより、多様なヒトドナーから患者固有の細胞モデルを迅速に生成することが可能になります。私たちはヒト iPS 細胞由来大腸オルガノイドシステムを開発し、それにより、優れた特性を有し、すぐにアッセイ可能な凍結保存状態のヒト大腸オルガノイドと増殖培地を提供しています。また、私たちが最適化した無血清培地および試薬を使用することで、シンプルな 3 段階の分化プロセスにより、任意のヒト iPS 細胞株から大腸オルガノイドへと分化させることができます。

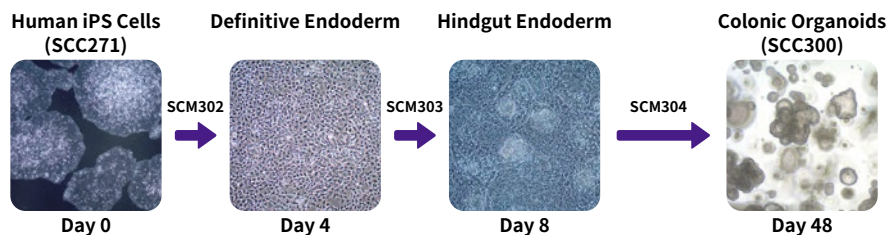


図 1. ヒト大腸オルガノイド分化ワークフロー

ヒト大腸オルガノイドは、胚体内胚葉培養、後腸内胚葉培養、大腸オルガノイド培養の 3 段階の分化プロトコルにより、ヒト iPS 細胞から生成されます。

SCM302: 胚体内胚葉誘導培地、SCM303: 後腸誘導培地、SCM304: 3dGRO™ ヒト大腸オルガノイド増殖培地、SCC300: ヒト iPS 由来大腸オルガノイド

3 段階分化プロトコル

ステップ 1 ヒト iPS 細胞から胚体内胚葉への分化 (0 ~ 4 日目)

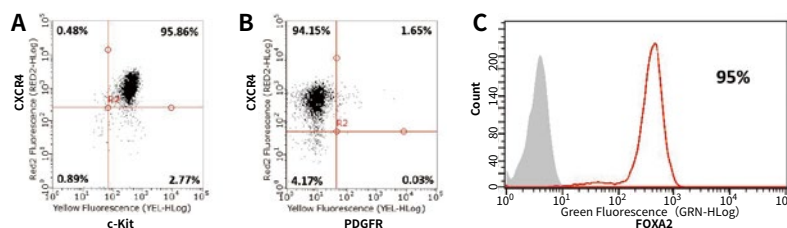


図 2. ヒト iPS 細胞の内胚葉分化

ヒト iPS 細胞由来の胚体内胚葉細胞の内胚葉マーカーを用いたフローサイトメトリー分析により、分化 4 日後に細胞が CXCR4⁺、c-Kit⁺、Sox-17⁺、PDGFR⁺ および FOXA2⁺ であることが示されています。

ステップ 2 後腸内胚葉分化 (4 ~ 8 日目)

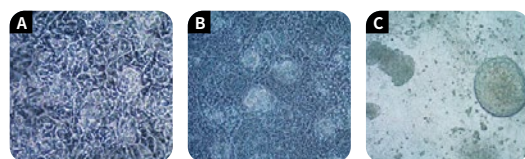


図 3. 胚体内胚葉細胞の後腸内胚葉細胞への分化
後腸内胚葉誘導後 A) 2 日目、B) 3 日目および C) 4 日目における後腸内胚葉細胞の形態

ステップ 3 大腸オルガノイドの培養と凍結保存 (8 ~ 48 日目)

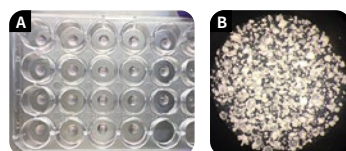


図 4. ヒト大腸オルガノイド

A) MATRIGEL® マトリックスドーム中にカプセル化された大腸オルガノイド、解凍 2 日後。
B) 培養 10 ~ 12 日目までに、大腸オルガノイドはドームの 85 ~ 90% を占め、継代が可能となります。

結果

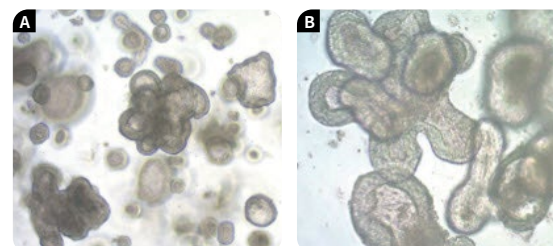


図 5. ヒト iPS 細胞由来大腸オルガノイドの形態

成熟したヒト大腸オルガノイドは、3 次元で培養すると複雑な形態を呈します。A) 4x 倍率、B) 10x 倍率。

このプロトコルを使用して生成された大腸オルガノイドは、成熟腸マーカー CDX2、 α -炭酸脱水酵素-II、 α -炭酸脱水酵素-IV、Mucin 5B、Mucin 2 および E-カドヘリンを発現し、大腸の表現型を失うことなく複数回連続的に継代可能です。

これらのオルガノイドと無血清培地は、創薬およびその研究者に、腸疾患の研究に有効性の高い新しい 3 次元細胞モデルを提供します。

プロトコルの詳細はこちら

<https://bit.ly/humancolonorganoids>

参考文献

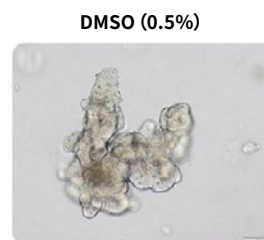
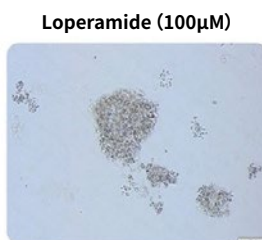
1. Sato T, et al. 2011. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology*. 141(5):1762-1772. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
2. Lancaster MA, et al. 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 501(7467):373-379. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12517>
3. Schwank G, et al. 2013. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell*. 13(6):653-658. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
4. Bartfeld S, et al. 2015. In Vitro Expansion of Human Gastric Epithelial Stem Cells and Their Responses to Bacterial Infection. *Gastroenterology*. 148(1):126-136.e6. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.042>
5. Crespo M, et al. 2017. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med*. 23(7):878-884. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4355>
6. Broutier L, et al. 2016. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc*. 11(9):1724-1743. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.097>
7. Miller AJ, et al. 2019. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc*. 14(2):518-540. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0104-8>
8. Takasato M, et al. 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*. 526(7574):564-568. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15695>
9. van de Wetering M, et al. 2015. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell*. 161(4):933-945. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>
10. Bartfeld S. 2016. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Developmental Biology*. 420(2):262-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.09.014>

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

ヒト iPS 細胞由来大腸オルガノイドを用いた薬物の細胞毒性スクリーニング

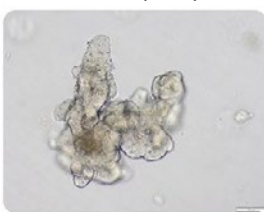
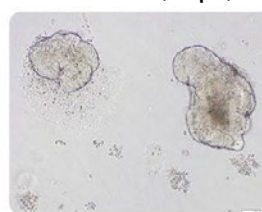
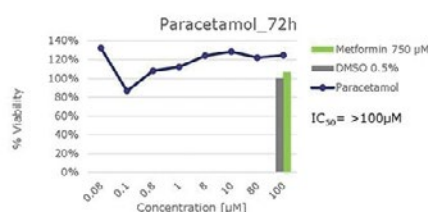
Kevin Su, Nick Asbrock, Vi Chu, Ph.D., Stefanie Hoffmann, M.S., Philip Hewitt, Ph.D.

ヒト組織に対する、薬物とその代謝物の影響を調べるスクリーニングは、新薬候補を導入する際に重要な影響を及ぼします。経口投与した薬物の吸収は、創薬の初期段階で新規化合物をスクリーニングするための重要な基準になっています¹。ヒト結腸がん由来の形質転換細胞株である Caco-2 細胞の単層培養は、薬物候補の腸透過性を予測するための標準的な腸バリアモデルとして、広く製薬企業に使用されてきました²。Caco-2 細胞は、その利便性や入手しやすさがある一方、単一の均質な表現型を持つため、本来の腸上皮の生理を構成する多様な細胞表現型への系統発生を再現することができず、不確定な実験結果をもたらします。幹細胞および組織由来のオルガノイドは、より複雑な 3D 組織のような構造を持っています³。ヒト上皮性大腸オルガノイドは、薬物スクリーニングの用途により生理学的に相関すると考えられています⁴。メルクは、アッセイ用に凍結保存されたヒト大腸オルガノイドと、多数の薬物化合物の細胞毒性効果をテストするために使用された特殊な無血清培地で構成される、高度に評価されたヒト iPS 細胞由来の大腸オルガノイド系を開発しました。



ヒト大腸オルガノイドを使用した薬物の細胞毒性試験

CellTiter-Glo™ 3D 細胞生存試験を使用したヒト大腸オルガノイドに対するロペラミド、パラセタモールの細胞毒性効果



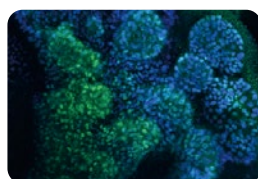
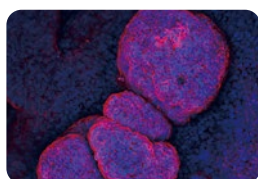
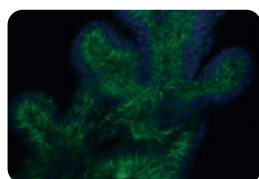
プロトコルの詳細はこちら <https://bit.ly/drug-screening-colon-organoids>

参考文献

1. Aungst BJ. 2017. Optimizing Oral Bioavailability in Drug Discovery: An Overview of Design and Testing Strategies and Formulation Options. Journal of Pharmaceutical Sciences. 106(4):921-929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.12.002>
2. Chandramouli R. 2010. Caco-2 cell lines in drug discovery- an updated perspective. J Basic Clin Pharm.. 1(2):63-9.
3. Sato T, et al. 2011. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. Gastroenterology. 141(5):1762-1772. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
4. Crespo M, et al. 2017. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. Nat Med. 23(7):878-884. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4355>

抗体を用いたホールマウントオルガノイドの免疫蛍光染色

オルガノイドは複雑な 3 次元構造を持ち、また ECM ハイドロゲルの中に埋め込まれているので特性評価が困難ですが、抗体を用いてオルガノイドを免疫蛍光染色 (IF) し、細胞の挙動、増殖、分化、細胞の健康状態や識別に関する分子マーカーを可視化すれば評価が可能になります。ホールマウント免疫染色は、切片化していない小さな組織片を対象としており、その手法は凍結切片の免疫細胞染色 (ICC) または免疫組織染色 (IHC) と非常に近いものになっています。オルガノイドのホールマウント染色でも、抗体ベースの特性評価に用いることが可能です。下記 URL のオルガノイド染色プロトコルでは、免疫蛍光染色サンプルの共焦点顕微鏡観察下での解析のために、ホールマウント用オルガノイドサンプルを固定、透過処理および染色する手法を詳述しています。



抗体を用いたオルガノイドの免疫蛍光染色

ヒト腸上皮および胚のオルガノイドを (A) 抗アセチル- α -チューブリン抗体、(B) 抗 α -炭酸脱水素酵素 IV 抗体、(C) 抗 Sox-9 抗体 (AB5535) でそれぞれ染色した

プロトコルの詳細はこちら <https://bit.ly/organoid-antibody-staining>

【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】

<メルク製品> TEL : 03-4531-1140
<シグマ製品> TEL : 03-6756-8245

Email : jpts@merckgroup.com
Email : jpts@merckgroup.com

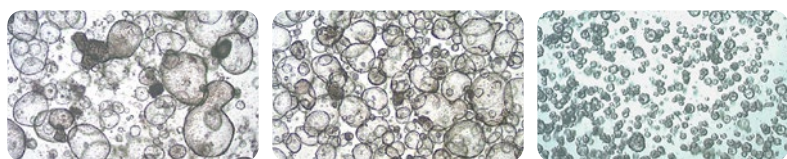
患者由来オルガノイド 胃腸管 (GI) バイオバンク NEW

患者由来オルガノイド (PDO) は、元の組織の生理学的および分子病理学的特性を維持した新しい *in vitro* 3D 細胞モデルで、従来の 2D 細胞株に代わる臨床的意義の高い代替品であり、実験動物の削減に有効なツールです。この度、患者組織から誘導済みの、すぐにご使用頂けるオルガノイドの販売を開始致しました。

成人組織由来のオルガノイドは、長期間の培養においても表現型および遺伝子型が安定しており、iPSC 由来のオルガノイドと比べて成熟した表現型を示します。

重要な点として、PDO によって化学療法に対する患者の臨床反応が予測可能であることが示されています。

胃腸管オルガノイドバイオバンクは、50 人以上の正常および疾患患者から採取した、十分に特性が評価されたオルガノイドで構成されており、それらは小腸 (十二指腸、回腸)、胃、直腸および結腸を含む複数の消化管領域に由来しています。



患者由来結腸オルガノイドを L-WRN 馴化培地中で 5 代継代したもの。SCC311、SCC321 は正常組織、SCC310 は罹患組織 (直腸腺がん) 由来。



バイオバンクの概要

これらの PDO は、LGR5+ の幹細胞集団を含む成人患者の生検や切除組織に由来しており、L-WRN 馴化培地 (SCM105) などのオルガノイド専用培地を用いて、ECM リッチな基質中で培養することができます。

- 50 人以上の患者由来のオルガノイド
- さまざまな年齢・性別
- 複数の組織：結腸、十二指腸、回腸、胃、直腸
- 複数の疾患：がん、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群
- RNA-Seq 情報あり
- 継代数が少ない状態、かつ、高い細胞生存率
- 最適化された 3dGRO® L-WRN 馴化培地で培養

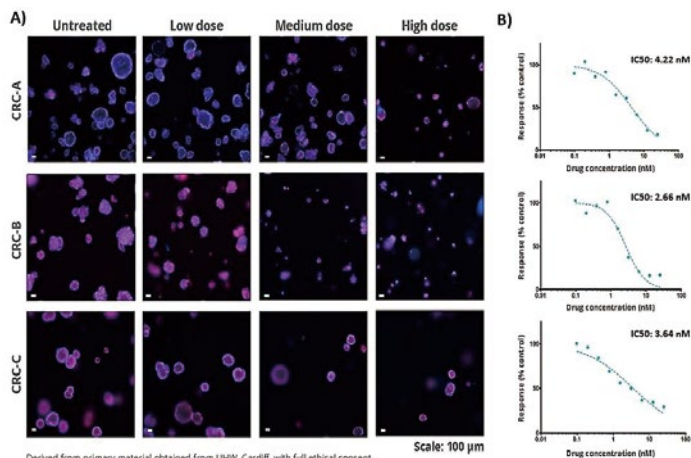
バイオバンクの詳細はこちら <https://bit.ly/intestinal-pdo-biobank>

スクリーニング用 3dGRO® ヒト CRC オルガノイド NEW

3dGRO® ヒト CRC オルガノイドは、PDO (患者由来オルガノイド) の安定した成長と増殖を可能にする Cellesce 社の特許技術を利用した、スクリーニング用の患者由来大腸がんオルガノイドのコレクションで、さまざまな遺伝子背景、ドライバー遺伝子変異、腫瘍部位、がんステージに由来しています。Cellesce 社の技術により、手間が省かれ、再現性が高まることで、オルガノイド細胞モデルを創薬の初期ステージにおける正確で費用対効果の高いツールとして位置づけることができます。

3dGRO® ヒト CRC オルガノイドの由来組織と代表的なドライバー変異

カタログ番号	由来組織	疾患および代表的なドライバー変異
SCC501	S 状結腸	大腸がん (TP53 Pro151Ser, KRAS Gly12Asp, APC Pro1443fs)
SCC502	盲腸	大腸がん (PIK3CA ΔE542K, CTNNB1 ΔS33C)
SCC503	S 状結腸下部	大腸がん (APC ΔR1450*A1446Lfs*27, TP53 ΔR248Q, KRAS ΔG12D, PIK3CA ΔE542K, FBXW7 ΔR465C)
SCC504	結腸 (直腸)	大腸がん (APC ΔR232*E1286*, TP53 ΔR248Q, KRAS ΔG12D, SMAD4 ΔE526K, SMAD2 ΔS464*)
SCC505	結腸 (上部直腸)	大腸がん (APC ΔQ978*, TP53 ΔR282W, KRAS ΔG13D)
SCC506	S 状結腸	大腸がん (APC ΔQ1096*E1408*, TP53 ΔR248W, KRAS ΔG13D, SMAD4 ΔQ534*)
SCC507	盲腸	大腸がん (APC ΔQ1291*, KRAS ΔG12D, ERBB3 ΔA232V)



3dGRO® ヒト CRC オルガノイドを用いた薬物スクリーニング

A) ヒト CRC オルガノイドを解凍し 48 時間回復させた後、トラメチニブ各濃度条件 (および DMSO をネガコン) で 5 日間培養。その後、核 (青) および細胞骨格 (赤) マーカーで染色し、共焦点イメージングを行った。

B) エンドポイントでのオルガノイドの生存率を CellTiterGlo™ 3D で測定し、滴定曲線と IC50 値を作成した。

スケールバー：100 μm

カタログ番号：SCC504 (CRC-A)、SCC506 (CRC-B)、SCC507 (CRC-C)

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

そうだったんだ！

テクニカルサービスより よくあるご質問にお答えします！



免疫染色関連

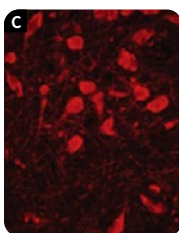
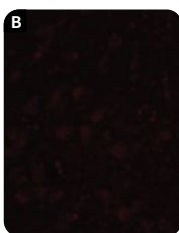
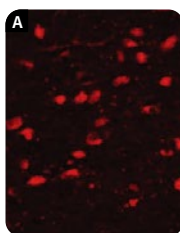
Q: BSA にはたくさん種類がありますが、ブロッキング用にはどの製品を使ったらよいですか？

A: 脂肪酸フリー、グロブリンフリーの製品をお勧めします。

ウシ血清アルブミン ウシ血清由来（製品番号 **A7030**）：ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫染色に有用。脂肪酸 0.005% 以下

Q: 神経細胞の免疫蛍光染色の際、自家蛍光を減らすことはできますか？

A: 加齢に伴い、自家蛍光色素であるリポフスチンが、ニューロンを含む多くの細胞の細胞質に蓄積します。リポフスチン顆粒は、励起および発光スペクトルが幅広く、最も一般的に用いられている蛍光プローブのスペクトルと重複しているため、中枢神経系の蛍光顕微鏡検査が複雑化する恐れがあります。Autofluorescence Eliminator Reagent（カタログ番号 **2160**）は、ヒト、サル、ラットの神経組織やその他の組織の切片において、その他の蛍光標識に有害な影響を及ぼすことなく、リポフスチンのような自家蛍光を低下させるか、除去します。



成人男性の脳のマイネルト基底核を通る 40 ミクロンの切片。切片は、未処理 (A)、Autofluorescence Eliminator Reagent (カタログ番号 **2160**) で処理 (B)、または polyclonal goat anti-ChAT antibody (カタログ番号 **AB144P**) で染色し、Cy3 標識二次抗体で視覚化後、Autofluorescence Eliminator Reagent で処理したもの (C)。画像は、20 × 対物レンズを用いた Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow 共焦点顕微鏡を用いて取得されました。543 nm のレーザーで励起し、555 ~ 625 nm で発光を計測しました。画像の取得条件（レーザー出力、PMT ゲイン、ピンホールの直径、バックグラウンドレベル）は、これらの 3 枚の画像ですべて同一です。写真は、University of Wisconsin-Madison、W.M. Keck Laboratory for Biological Imaging の Michael Hendrickson および Ronald Kalil の好意によって提供されたものです。

Q: 抗体製品ごとに推奨の染色プロトコルはありますか？

A: 製品説明に指示がなければ特に専用プロトコルの指定はありません。一般的なプロトコルを元に条件検討をお願いします。

プロトコルの一例：パラフィン包埋組織の免疫組織染色プロトコル <https://bit.ly/immunohistochemistry-protocol>

Q: 検出方法は何かを選んだらいいですか？

A: 抗体を用いた免疫染色で最も一般的に用いられている検出方法は、「発色または酵素による検出方法」と「蛍光に基づく検出方法」の 2 種類です。「発色または酵素による検出方法」の場合、酵素によって変換される基質を選択する際には、不溶性色素を生じる基質を選択しましょう。「蛍光に基づく検出方法」では、使用する顕微鏡の励起レーザー光とフィルターセットによって利用可能な蛍光色素が異なります。蛍光色素の購入前に、利用可能な蛍光色素の確認をしましょう。

代表的な酵素と基質

酵素	基質
ペルオキシダーゼ	DAB
アルカリホスファターゼ	BCIP/NBT

検出方法の詳細はこちら

<https://m-hub.jp/biology/1810/90>



じっけんレシピ

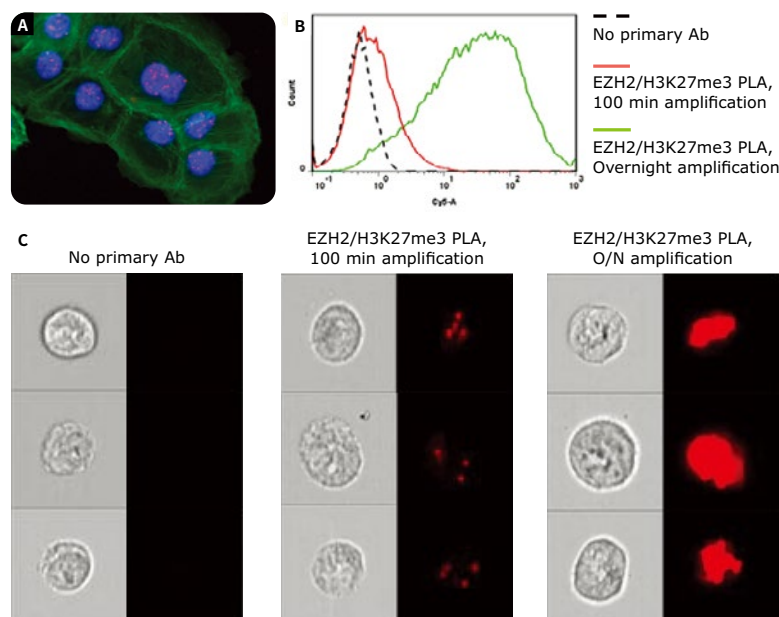
実験プロトコル集、製品選択ガイドや基礎知識等の役立つ技術情報を分野別に掲載しています。

<https://bit.ly/recipe-biology>

翻訳後修飾や微量なマーカー、一過性で起きている タンパク質間相互作用がフローサイトメトリーで検出可能 **NEW** Duolink™ PLA フローサイトメトリー検出キット

従来のフローサイトメトリーでは、例えば発現レベルが極めて微量で検出できないマーカーや、通常の抗体を用いた実験では共発現レベルでの測定になってしまうタンパク質間相互作用など、検出する機能に制限がありました。そこでメルクはフローサイトメトリーの測定値でタンパク質間相互作用を分析できるよう、Duolink™ 近接ライゲーションアッセイ (PLA) とフローサイトメトリーを組み合わせた便利なキットを作成しました。細胞集団内の微量タンパク質ターゲットを検出することが可能になり、あらゆるフローサイトメトリー機器に対応したシンプルなプロトコルに従って、すぐに発表できるレベルの結果を得ることができます。

Epigenetics 研究における Duolink™ PLA フローサイトメトリー検出キットの使用例



Duolink™ PLA の増幅時間を長くすることで、フローサイトメトリーによる低濃度タンパク質ターゲットの検出を補助することができます。

EZH2 によって媒介されたヒストン H3 上のリジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) を検出するために Duolink™ PLA を実施した。

A) 100 分増幅後、DU145 細胞の核 (青) 内にわずかな PLA シグナル (赤) が蛍光顕微鏡で検出された。FITC-Phalloidin で染色したアクチン (緑) をカウンターステインとして使用した。

B) 増幅時間を長くすることで、従来のフローサイトメトリーによる EZH2/H3K27me3 相互作用のような低濃度タンパク質イベントの検出が促進された。

C) Duolink™ PLA とイメージングフローサイトメトリーとの組み合わせにより、細胞集団におけるタンパク質またはタンパク質イベント (相互作用または修飾) の局在を特定することができる。

Duolink™ PLA フローサイトメトリー検出キット製品一覧

検出キットには、10 万個 (1×10^6 個) の細胞に対して約 40 回分の反応を行うのに十分な試薬が含まれています (1 回あたりの反応量: 100 μ L)。また、実験に必要な Duolink™ In Situ PLA Probe (PLUS および MINUS) と Duolink™ In Situ PLA 洗浄バッファーをセットにした Starter Kit もラインナップしています。

製品名	容量	励起レーザー光 * (nm)	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	カタログ番号
Duolink™ flowPLA Detection - Violet	40 tests	405	390	476	DUO94005-40TST
Duolink™ flowPLA Detection - Green	40 tests	488	495	527	DUO94002-40TST
Duolink™ flowPLA Detection - Orange	40 tests	532, 561	554	579	DUO94003-40TST
Duolink™ flowPLA Detection - Red	40 tests	532, 561	594	624	DUO94001-40TST
Duolink™ flowPLA Detection - FarRed	40 tests	638, 640, 642	644	669	DUO94004-40TST
Duolink™ flowPLA Starter Kit Mouse/Rabbit-Violet	1 kit	405	390	476	DUO94105-1KT
Duolink™ flowPLA Starter Kit Mouse/Rabbit-Green	1 kit	488	495	527	DUO94102-1KT
Duolink™ flowPLA Starter Kit Mouse/Rabbit-Far Red	1 kit	638, 640, 642	644	669	DUO94104-1KT

* 励起レーザー光: 蛍光色素の励起レーザーとして一般に使用されているものを意味します。必ずしも個々の装置で使用可能なレーザーを示すものではありません。

キットの詳細はこちら <https://bit.ly/duolink-pla-flow-cytometry-kits>

販売取扱について: カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

PROTAC® 化合物におけるリンカーの重要性

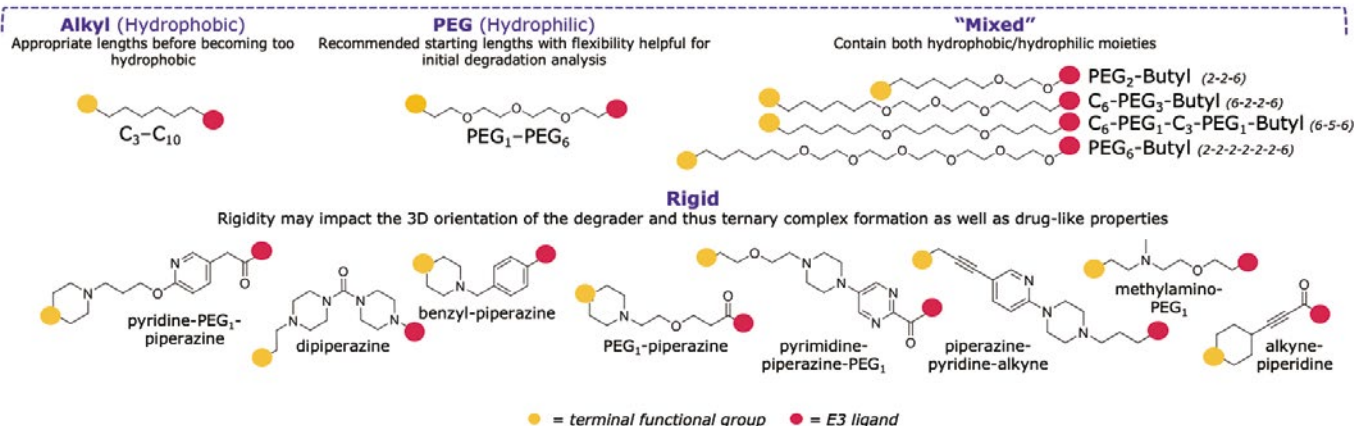
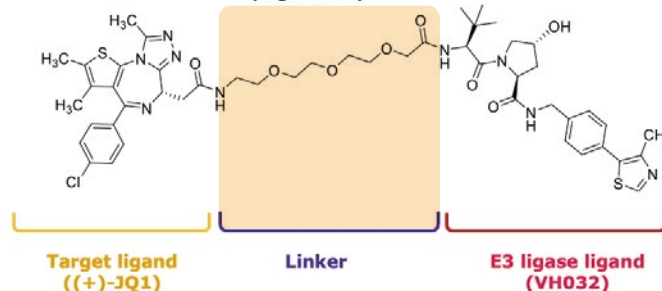
新しい創薬モダリティとして注目されている標的タンパク質分解誘導の PROTAC® 化合物設計において、適切な化学特性・長さ・配向性のリンカーを選択することは、「Linkerology^{*1}」と表現される重要なファクターです。最新製品では、以下図にあるような単純な Alkyl 鎖・PEG 鎖に加えてそれらが Mix されたリンカーや剛直性の高いリンカーのバリエーションを拡充しています。

^{*1} M.Reynders, et al., Sci.Adv., 2020, Vol 6, Issue 8

最新製品リスト掲載のカタログはこちら

https://bit.ly/CF-MK_BR8420EN

Structural components of degraders (e.g. MZ1)



タンパク質間相互作用、翻訳後修飾、低濃度タンパク質の可視化に Duolink™ 近接ライゲーションアッセイ

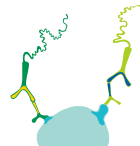
ヒト疾患の原因の正しい理解を得る、あるいは不規則なタンパク質-タンパク質相互作用を明確なシグナルで発見する機会を得るためには、強力な研究ツールと効率的なアプローチが必要です。Duolink™ 近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay: PLA) は、抗体の使用とローリングサークル増幅を組み合わせた革新的な技術で、タンパク質とその相互作用を目に見えるかたちで検出できます。

Duolink™ PLA のベースとなっている近接ライゲーションアッセイは、固定された細胞の内在性タンパク質を検出するために、二次抗体の特異性と相補的なオリゴヌクレオチドプローブのローリングサークル増幅 (RCA) を組み合わせています。一対のオリゴヌクレオチド標識抗体 (PLA プローブ) は、プローブが近接 (40 nm 以内) しているときにのみ増幅シグナルを生成します。

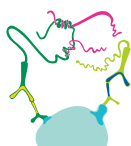
サンプル調整固定後、
一次抗体添加



PLA プローブ添加



ライゲーション



DNA 増幅および標識



イメージング



Duolink™ PLA の詳細はこちら

<https://bit.ly/duolink-proximity-ligation-assay>

スターターセットの詳細・お申込みはこちら

<https://bit.ly/duolink-starter-set-orderinfo>

Application Note 「Duolink™ PLA を用いた PROTAC® と
内在性タンパク質との相互作用の可視化」はこちら

https://bit.ly/CF-MK_AN9387EN

【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】

<メルク製品>

TEL: 03-4531-1140

Email: jpts@merckgroup.com

<シグマ製品>

TEL: 03-6756-8245

Email: jpts@merckgroup.com

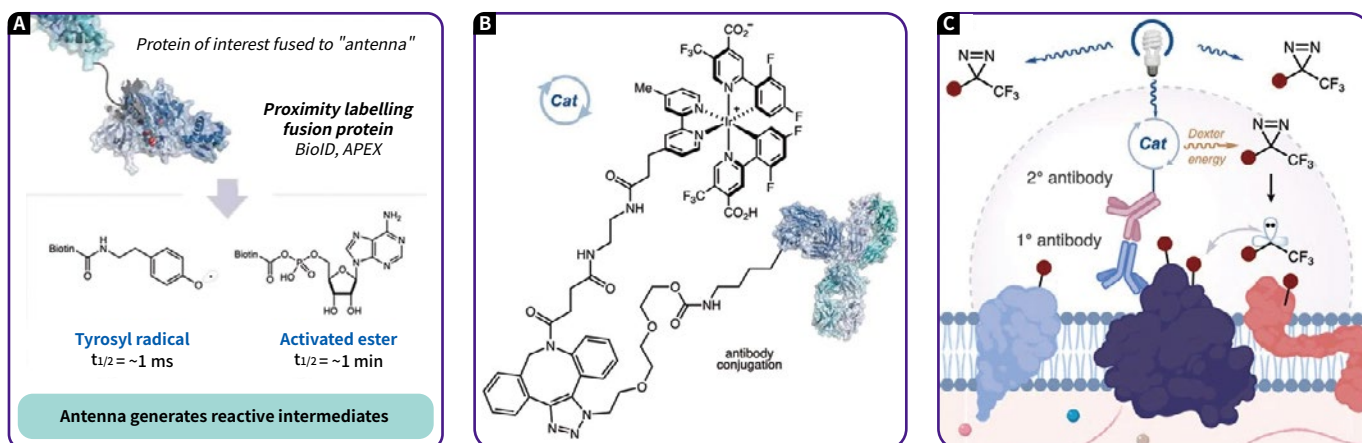
～ タンパク質など生体分子間の相互作用を解る ～ 近接依存性標識の新手法

生体分子同士がどのように相互作用しているかを理解することは、基礎生物学への新しい知見、新しい治療法の発見や医薬品開発へつながることが期待されます。近年、このような相互作用を明らかにするための手法として開発が進んでいるのが、近接依存性標識法です。

近接依存性標識では、目的の生体分子に反応中間体を生成する酵素を取り付けます。BioID (proximity-dependent **B**iotin **I**Dentification) や APEX (engineered **A**scorbate **P**eroXidase) に代表されるような、部分的に変異させたピオチンリガーゼやペルオキシダーゼをベースとしています。これらのシステムは、ピオチンと過酸化水素の添加によって活性化され、それぞれ活性化エステルおよびフェノキシラジカル中間体を生成します。これらの反応中間体は、溶液中での半減期が1ミリ秒から1分程度であり、細胞内の混雑した環境では自由拡散が制限され生体分子と速やかに反応し標識が進行します。一方で細胞外では溶液半減期が長いことから、標識精度が落ちてしまうことが問題となっていました (図 A)。

最近、プリンストン大学の MacMillan 教授 (2021 年 ノーベル化学賞受賞) らは、光レドックス触媒反応により、溶液中の半減期がナノ秒レベルと著しく短いカルベン反応中間体を生成することで、高い分解能で標識可能な「μMap 技術」を開発しました。「μMap 技術」では、抗体とコンジュゲートされたイリジウム触媒 (図 B) を準備し、外部刺激として光照射することで短時間でターゲットタンパク質の微小環境を精度高くマッピングすることが可能です (図 C)。従来の近接依存性標識法では成し得なかった、Jarkat T 細胞表面における CD29、CD45 および CD47 の選択的な標識や、PD-L1 の微小環境構成たんぱく質を同定し、免疫シナプス接合部位の選択的な標識が報告されています*¹。

*¹ Geri et al., Science 367, 1091–1097 (2020)



新製品 AtlasKit で精度の高い近接依存性標識を!

NEW

シグマ アルドリッチでは μMap 技術を皆様の実験系でお使いいただけるよう、ready-to-use なキットとして製品化いたしました。Step-by-step のプロトコルに従って、精度の高い近接依存性標識の新手法をお試しください。

製品名	容量	カタログ番号
AtlasKit (10 reactions)	1KIT	ATLASKIT-A
AtlasKit (20 reactions)	1KIT	ATLASKIT-B

Step-by-step のプロトコルはこちら

<https://bit.ly/atlas-kit-method>



販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

venture support program

参加企業紹介 vol.1



株式会社 幹細胞&デバイス研究所 様



メルクは、「サイエンスとテクノロジーで世界を変える」という大きな目標の下、新たなソリューションを追求し、よりよい世界にするための製品を開発し続けています。同様に世界を変える新たなソリューションを開発・社会実装していくために活動されているライフサイエンス領域のスタートアップ企業の支援「メルクジャパンベンチャーサポートプログラム」を実施しています。



ベンチャーサポートプログラムとは

ライフサイエンス領域でウェットの研究開発を行っているベンチャー企業を支援するプログラムです。

詳細はこちら <https://bit.ly/venture-support-program>

今回はプログラムにご参加いただいている「株式会社 幹細胞&デバイス研究所」様をご紹介します。

* 以下、M：メルク SCAD：株式会社幹細胞&デバイス研究所 様

M：御社の事業内容を教えてください。

SCAD：当社は、2014年に設立された京都大学発ベンチャーで、iPS細胞を活用した*in vitro*の薬効薬理評価系を開発し、これを応用した創薬探索、いわゆる「iPS創薬」を事業として進めています。特に希少疾患の患者さんの血液に由来したiPS細胞を作製し、これをもとに神経などの細胞へ分化誘導して疾患モデル細胞を開発し、この細胞で再現された病態を改善する薬の探索に取り組んでいます。

疾患特異的iPS細胞について、これまでは細胞バンクを含めても商用利用が可能な細胞の入手は容易ではありませんでした。当社では、治療薬の探索に活用することを目的として、商用利用を認められた患者さん由来のiPS細胞を独自に樹立し、保有しています。これをもとに自社で創薬研究を進めるとともに、製薬企業での創薬研究を支援するための共同研究や受託評価などを実施しています。

当社では、神経細胞と骨格筋細胞を扱っており、あわせてこれらの細胞を結ぶ神経筋接合部についても取り組みを進めています。

神経細胞については、遺伝性末梢神経障害で最も患者数の多いシャルコー・マリー・トゥース病（以下、CMT）の疾患モデルを開発しており、運動神経細胞や、髄鞘を形成するシュワン細胞を活用した創薬支援サービスを行っています。また、中枢神経系では小脳皮質のブルキンエ細胞について、当社で開発した3次元細胞培養用のファイバーシートを用いることで、iPS細胞から、複雑に発達した3次元の樹状構造をもつ成熟した細胞への分化誘導に成功しています。今後は、小脳皮質の疾患モデル細胞の開発も検討を進めます。

神経機能の評価系については、配向性ファイバーシート上で神経細胞を培養し、多電極アレイを用いることで、神経の電気生理学的機能の評価を実施しています。これは、神経の電気生理学的機能に影響を及ぼす化合物の評価や探索などに活用できます。なお、配向性ファイバーを神経細胞の足場として用いることで、軸索が1方向に配向した3次元構造の神経細胞シートの作製が可能となります。またこのデバイスは細胞の凝集と剥離を抑制し、かつ神経ネットワークを形成するまでの期間が半減するほど、成熟化が促進します。

筋組織の評価系については、筋組織を3次元培養するためのマイクロデバイスと収縮力を測定するためのソフトウェアを開発しており、従来の2次元培養法では測定できなかった筋組織の機能（収縮力）の定量的な評価を可能にしています。これにより、筋疾患で課題となっている「筋組織の機能低下」を直接的に評価の対象とすることができ、筋疾患を対象とした創薬研究を効率化することができます。現在は、骨格筋および心筋での収縮性の定量評価が可能です。

さらに、運動神経と骨格筋の共培養により、神経筋接合部の再現や疾患モデルの研究開発を行っています。生体を模した構造で、運動神経から軸索を伸長させ筋組織と接合させており、ここでは神経細胞だけに刺激を与えることで、骨格筋に触れずに神経筋接合部の信号伝達を介して筋収縮を実現しています。これは、神経筋接合部に影響を及ぼす化合物の評価や探索などに活用できます。

当社では、これら他社で事業化していない差別性のある技術を開発し、創薬探索に貢献しています。

疾患モデル・細胞デバイスを用いた創薬研究支援



M：御社のアピールポイントを教えてください。

SCAD：当社は2019年、内閣府と厚生労働省より、国家戦略特別区域法にもとづく事業認定と特定認定を受けたことから、ヒト血液由来物質の商用利用について特例として規制緩和を受けています。これにより患者さんの血液に由来したiPS細胞を作製し、細胞レベルで病態を再現し、これを改善する治療薬の候補物質の探索までを事業とすることが認められた国内最初の企業となりました。

この戦略特区認定によって、CMT患者さん由来の疾患モデル細胞を開発しており、研究段階ですが、細胞レベルで効果の兆候が認められた物質を特定し、特許出願を完了しています。治療法として活用できるものであるか、候補物質として非臨床での検討を進めています。

今後は、CMTに加えて、骨格筋や心筋、神経筋接合部の疾患モデルを開発し、当社の評価系も活用しながら、治療薬の探索を進めて参ります。一緒に取り組んでいただける企業を探していますので、ぜひともお声掛けくださるようお願いいたします。

企業 Information

株式会社 幹細胞&デバイス研究所 様

URL：<https://scad-kyoto.com>

掲載内容に関する問い合わせ先：scad.sales@scad-kyoto.com



募集中

研究者

共同研究
アカデミア

共同研究
企業

講演依頼
OK

パズルでハカセと対決！

問題

多くの「臓」の中に、同じ部首「にくづき」の別の漢字が5つ隠れています。その漢字5つの中から、仲間外れの漢字1つを教えてください。

臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 肝 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓
臓
臓 臓 臓 臓 臓 胃 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓
臓
臓
臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 腸 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓
臓
臓
臓 臓 臓 臓 臓 臓 脛 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓 臓
臓 腓 臓 臓 臓 臓

正解者の中から抽選で計5名様に、メルクオリジナル
「バンブータンブラー」をプレゼントいたします。
ぜひご応募ください。

応募期間

10月3日(月)～
11月30日(水)まで！

- ※ 当選者は厳正な抽選の上決定し、発表は賞品の発送をもって代えさせていただきます。
- ※ 住所・転居先不明などにより賞品をお届けできない場合には、当選を無効とさせていただきます。
- ※ 当選賞品の交換、換金、返品はできませんので予めご了承ください。

個人情報の保護について:ご提供いただきました情報につきましては、賞品の発送や、弊社の製品やサービスに関しての情報をお客様に提供する以外の目的では利用いたしません。お客様からお預かりした個人情報はメルク株式会社に管理し、弊社 Web サイトにて公表している個人情報保護方針に従い取り扱いをいたします。(http://www.merck.co.jp/ja/privacy_statement/privacystatement.html)

PROTAC® is a registered trademark of Arvinas Operations, Inc.

応募待ってるぞ！

解答

ご応募はこちらから
<https://bit.ly/SigMania15>



SigMania Vol.14 の正解:「カラム」



よりシンプルに、快適に 新しくなった SigmaAldrich.com



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
カタログ
ファインダー



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.com/wm



メルクライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2022年9月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2022 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報は [こちら www.merckmillipore.com/bio](http://www.merckmillipore.com/bio)

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140

RBM321-2209-PDF-H