

Millicell® マイクロウェルプレートを用いた 均一なマウス腸オルガノイドの作製と 大腸がんオルガノイドの表現型スクリーニング

要約

生物医学研究分野でますます一般的に使用されるツールであるオルガノイドは、体外で再現できる臓器の 3D ミニチュア モデルです。オルガノイドは、がん研究、化学療法の開発、個別化医療の開発などの用途に有望なモデルです。従来のオルガノイドは、多くの場合再現できない固化した細胞外マトリックス (ECM) 内で培養されます。形成されたオルガノイドは、不均一なサイズと形状を持つことができ、ハイドロゲル内の複数の位置と焦点面にランダムに配置される場合があります。

本資料では、Millicell® マイクロウェル 96 ウェル プレートで培養した後のマウス腸オルガノイドの発達と特性についてご説明します。作製されたオルガノイドはマイクロウェル内に限定され、均一なサイズでした。また、Millicell® マイクロウェル 96 ウェル プレートで実施した、患者由来の大腸がん (CRC) オルガノイドと HCT-116 スフェロイドに対する 80 種類の抗がん化合物を使用した自動薬物スクリーニングについても紹介します。表現型分析により、Millicell® マイクロウェル プレートで培養されたオルガノイドに毒性レベルのアフレセルチブを投与した際に、これまで観察されなかった表現型が明らかになりました。

イントロダクション

オルガノイドは、*in vitro* で再現可能な、臓器を 3 次的に小型化・簡略化したもので、本来の組織の主な特徴の一部を模倣しています¹。従来のオルガノイド培養には、オルガノイドを固化した細胞外マトリックス (ECM) の滴内に埋め込んだ培養がしばしば含まれます。生物医学研究におけるさまざまな用途に有望ではあるものの、従来のオルガノイド培養法には、本質的に再現性がありません²。このようにして得られたオルガノイドは、サイズや形状が非常に不均一であるだけでなく、複数の焦点面や位置にランダムに配置されるため、堅牢な定量データの生成が妨げられます³。初代細胞からオルガノイドを作製することで、さまざまな治療薬をより生理学的に適切な設定で試験することができます。しかし、オルガノイドをスクリーニング用途に産業応用することは、固形 ECM でのオルガノイド培養の均質性の欠如、取り扱いの難しさ、および分析の煩雑さによって、これまでのところ困難でした。

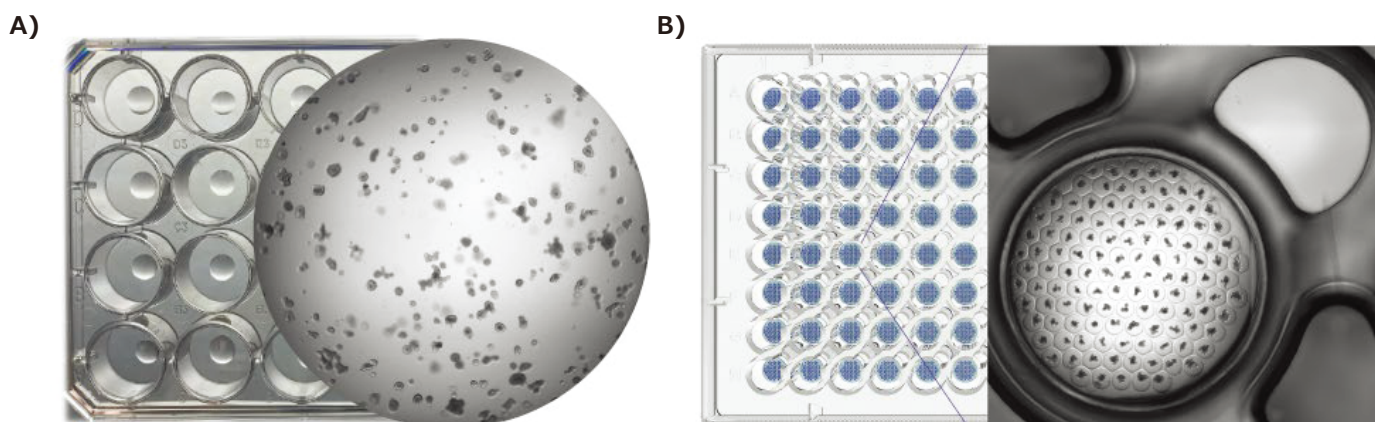


図 1. 従来のオルガノイド培養 (A) と Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレートでのオルガノイド培養 (B)

材料と方法

A. Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレート

Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレートは、ハイスループットで再現性の高いオルガノイド培養のためのすぐに使用できるプラットフォームです。これらのプレートには、ウェル内に非接着性のマイクロウェルが含まれており、均質なオルガノイドの収量が増加します。

Millicell® マイクロウェルプレートには、外部の固形 ECM をほとんどまたはまったく必要とせず、各マイクロウェルには独自の水性ポリエチレングリコール（PEG）ハイドロゲルが含まれています。PEG ハイドロゲルにより、ウェル内での細胞播種とアッセイ開発が可能になり、プレート内イメージング中の回折が少なくなります。

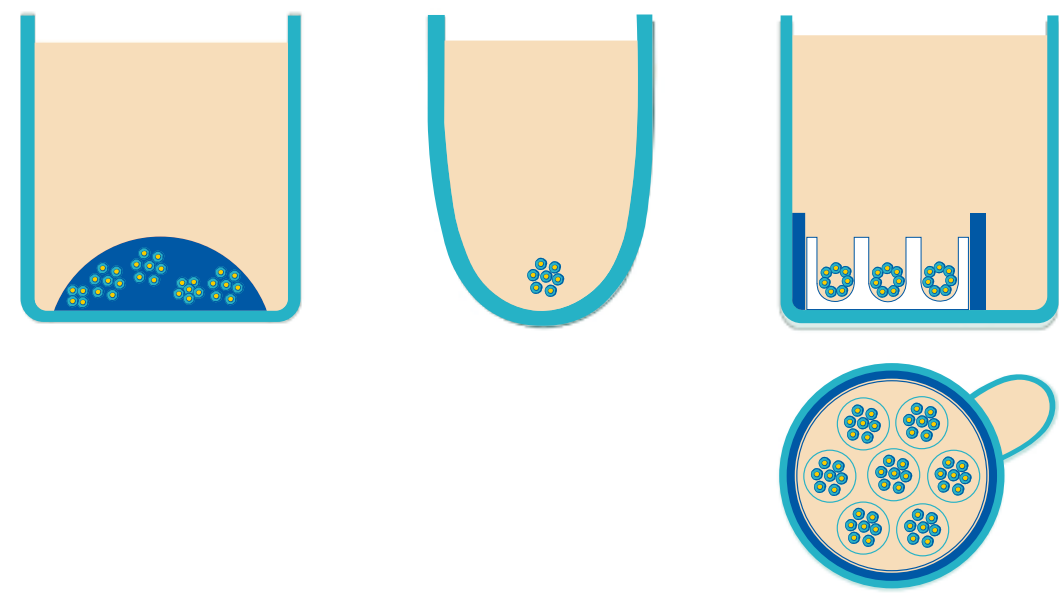


図 2. *in vitro* 3D オルガノイドスクリーニング法の概略図。左から右に、Matrigel®、非接着性表面、および Millicell® マイクロウェル プレート。

表 1. Millicell® マイクロウェルプレートのマイクロウェルサイズと容量

マイクロウェルサイズ (μm)	マイクロウェル数 / ウェル	有効容積 (μL)	底面材質	カタログ番号
400 μm	121*	200	Plastic	MC96U4005
600 μm	55*	200	Plastic	MC96U6005

*ウェルあたりのマイクロウェルの最大数を示します。正確な数はウェルごとにわずかに異なる場合があります、7%より少ない差異がある場合があります。

B. Millicell® マイクロウェルプレート上のマウス腸オルガノイド

マウス腸オルガノイドは、最初に記載されたオルガノイド システムのひとつであり、本試験では Millicell® プレート上で作製しました。細胞は Millicell® マイクロウェル 96 ウェル 400 μm マイクロウェルプレートに播種し、各ウェル内で得られる 121 個のオルガノイドの特性を評価しました。

播種・成長・イメージングの各過程でオルガノイドをモニターしたところ、時間の経過とともに、1つのウェルに対して 121 個の単一なオルガノイドを作製できる様子を観察しました。それらは均一なサイズであり、マイクロウェル内に限定されていることで、イメージングを容易にしました。マウス腸オルガノイドは分化後に典型的な出芽形態を示し、分化した腸細胞は特定の腸マーカーを発現しました。

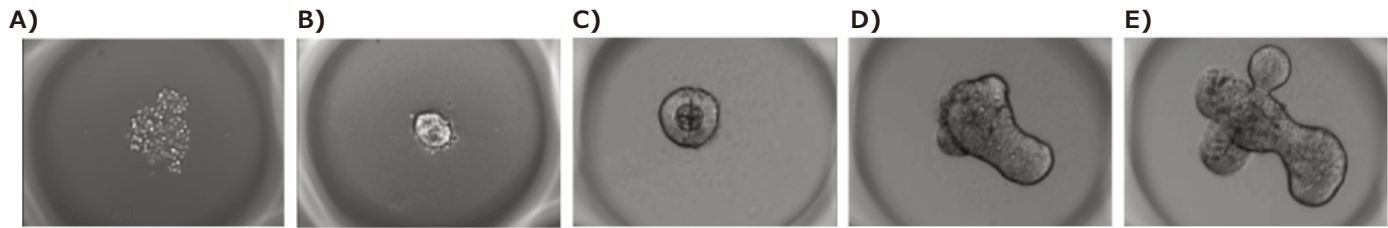


図 3. Millicell® Microwell プレート上で増殖させたマウス腸オルガノイド。播種後、A) 1 時間、B) 10 時間、C) 2 時間、D) 3 日、E) 4 日。

C. Millicell® マイクロウェルプレート上での大腸がんオルガノイドの作製とスクリーニングのセットアップ

Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレートを使用して、HCT-116 スフェロイドおよび患者由来の大腸がんオルガノイドに対して 80 種類の抗がん化合物の自動薬物スクリーニングを実施しました。

均質な微小組織の薬物応答は、ハイコンテンツイメージング表現型スクリーニングによって評価され、250 を超える表現型メトリックを抽出しました。

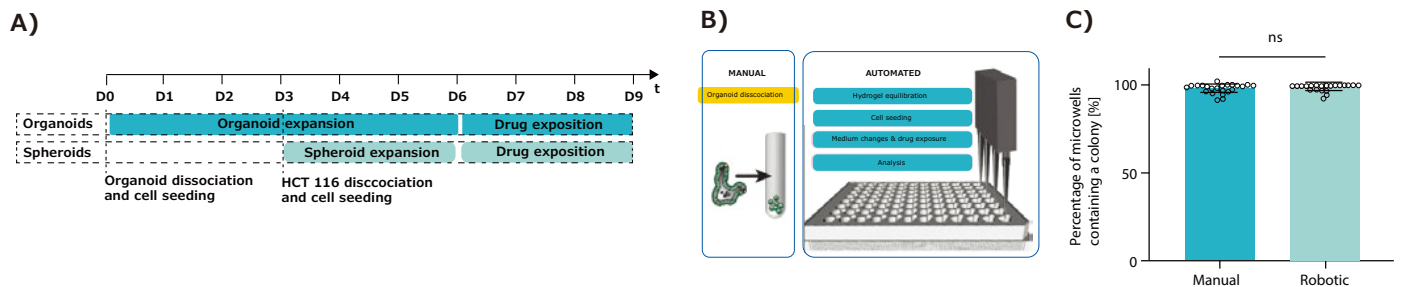


図 4. CRC オルガノイド薬物スクリーニングのワークフロー。A) Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレート上の CRC オルガノイドおよび HCT-116 スフェロイドの化合物スクリーニングのプロトコル、B) 自動（ヒドロゲル平衡、細胞播種、培地交換および薬物曝露および分析）と手動（オルガノイド解離）のオルガノイド生成概略図、C) 手動オルガノイド生成と自動オルガノイド生成におけるコロニーを含むウェルの割合の定量化。

薬物ばく露後、微小組織の生存率を評価し、ハイコンテンツイメージング解析でその表現型を調査しました。ウェルごとにセグメント化された 40 個の微小組織それぞれから 250 以上のメトリックスを抽出し、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの比較

から化合物の有効性を示しました。反復スクリーニングでは高い再現性を示しています（スフェロイドでは $R^2 = 0.9$ 、オルガノイドでは 0.79 ）。

結果

A. マウス腸オルガノイドの開発と特性評価

オルガノイドの面積は、Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレートで経時的にイメージングにより定量化しました。オルガノイドは特定の微小空洞内に閉じ込められ、成長の最初の 1 ~ 3 日間は均一なサイズでしたが、オルガノイドが出芽し始めると広がりました。オルガノイドは、これらの腸オルガノイドに典型的な出芽表現型を

示し、腸内分泌細胞、腸管上皮細胞、パネート細胞、杯細胞などの分化細胞を含んでいました。特定のマーカーと上皮極性は、ガラスイメージングスライド上で免疫蛍光法によってモニタリングされました（図 6）。Millicell® マイクロウェルプレートを使用したオルガノイドの作製ではイメージングによる測定が可能で、均質なサイズと形状のオルガノイドを作製できます。

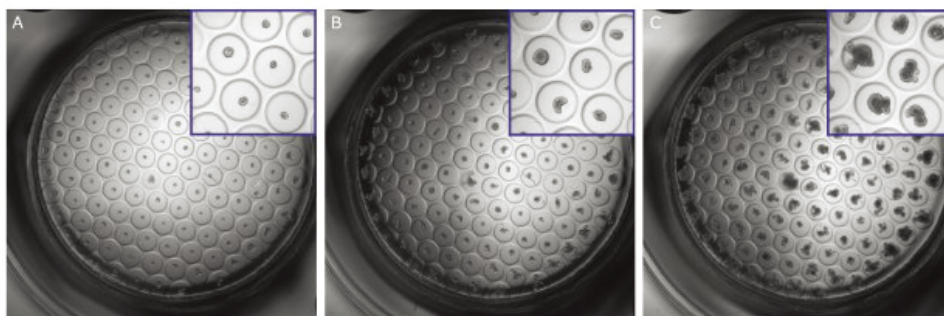


図 5. A) 3 日目に Millicell® マイクロウェルプレート上で増殖させたマウス腸オルガノイドの代表的な例。B) 5 日目 ; および C) 8 日目

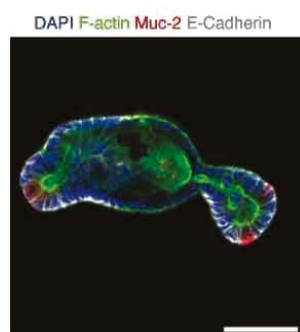


図 6. マイクロウェルアッセイで増殖させたオルガノイドにおける杯細胞の存在を強調するムチン-2 タンパク質発現。

B. アフレセルチブの大腸がんオルガノイドに対する効果

Millicell® マイクロウェル 96 ウェルプレートで培養したオルガノイドの表現型を分析したところ、アフレセルチブの投与中に、これまで観察されなかった表現型が明らかになりました。

80 種類の化合物の分析により、キナーゼ阻害剤アフレセルチブが、表現型の大きな外れ値 (Outlier) を示しました。この阻害剤は、毒性濃度未満でオルガノイドに大きな腫脹を引き起こしますが、スフェロイドには影響しませんでした。これは従来の生存率分析では検出されない表現型です。

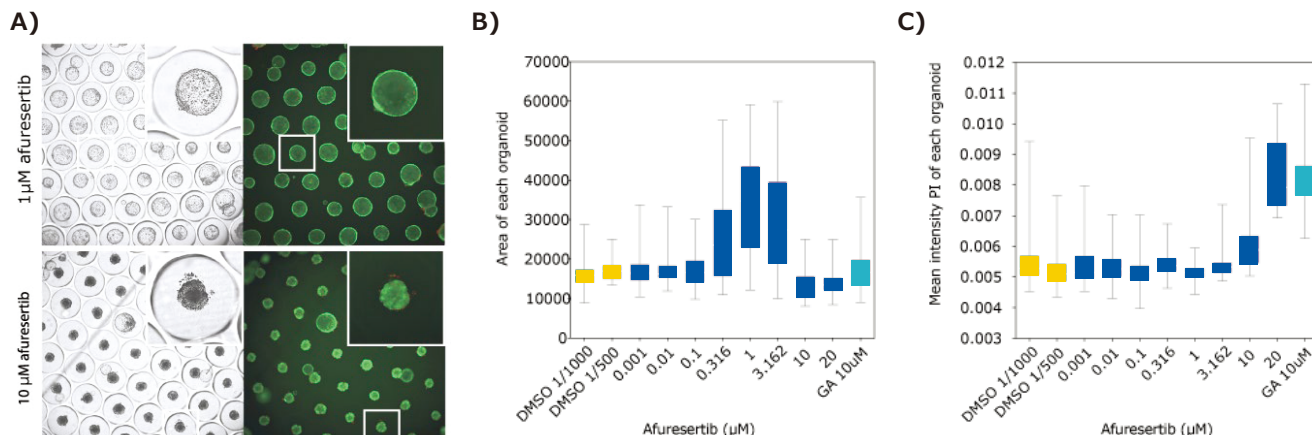


図 7. アフレセルチブの CRC オルガノイドスクリーニング。A) 異なるアフレセルチブ濃度におけるオルガノイドのサイズを示す広視野画像と蛍光画像、B) 微小組織領域別のアフレセルチブ濃度の増加に対するオルガノイドの表現型反応 (IC₅₀=0.31 μM)、C) アフレセルチブ濃度の増加におけるオルガノイドの生存率 IC₅₀=10.67 μM。ガンボギ酸: GA。

結論

Millicell® マイクロウェルプレートによるオルガノイド作製では、播種から読み取りまで自動液体分注システムと互換性がありました。本プレートの利用により、集団ベースの読み取りではなく、単一のオルガノイドを分析できるようになり、従来法では検出できなかった表現型を明らかにしました。

マウス腸オルガノイドの作製では、播種・成長・蛍光イメージングの各過程でモニタリングをしながら、1 ウェルあたり 121 個のオルガノイドを作製できました。分化後の出芽形態では、腸内分泌細胞、パネート細胞、腸管上皮細胞、杯細胞の特定のマーカーの発現を確認できました。

また、患者由来大腸がんオルガノイドでは、本プレートを用いることで、イメージング測定可能な大腸がんオルガノイドを 1 ウェルあたり 70 個以上作製することができ、ウェルごとにセグメント化された 40 個を単一視野でハイコンテントイメージング分析に利用できました。

イメージング分析では微小組織それぞれから 250 以上のメトリックスを抽出し、ハイスループットによる自動化ワークフローで単一オルガノイドレベルでの薬物応答を評価できました。これにより、Millicell® マイクロウェルプレートを利用した大腸がんオルガノイドの系が対応する腫瘍によく関連したモデルであり、薬剤に対する患者特異的な反応の研究に利用できることがわかりました。

参考文献

- Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-.). 345, (2014). doi:10.1126/science.1247125
- Fatehullah, A., Tan, S. H. & Barker, N. Organoids as an *in vitro* mode of human development and disease. *Nature Cell Biology* 18, 246–254 (2016). doi:10.1038/ncb3312
- Schneeberger, K. et al. Converging biofabrication and organoid technologies: The next frontier in hepatic and intestinal tissue engineering? *Biofabrication* 9, (2017).



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2024年10月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore 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. ©2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original Lit No. is MK_AN13597EN Ver. 1.0 55553 05/2023

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

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

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

RBM422A-2410-PDF-M