

Corning® マトリゲル™ 基底膜マトリックスを用いたマウス腸ポリープからの腫瘍スフェロイドの樹立

京都大学医学研究科 消化管外科学 / 遺伝薬理学

三好 弘之

イントロダクション

がんモデルマウスの表現型から得られた知見を *in vitro* で検証する場合、同じマウスの腫瘍組織から分離した初代培養細胞を用いるのが理想的であるが、悪性度の低い上皮性腫瘍から継代可能な細胞株を樹立することはこれまで困難とされてきた。しかし近年の培養技術の進歩によって、腫瘍細胞をオルガノイド / スフェロイドとして立体培養することが可能になった。Corning® マトリゲル™ 基底膜マトリックスは初代培養からの上皮細胞オルガノイド / スフェロイド樹立に欠かせない基底膜成分で構成されており、マトリゲル中で 3D 培養された上皮細胞は生体内と同様の組織学的形態を保っている。正常腸上皮細胞の培養には Wnt リガンド、R-spondin などを培地に添加する必要があるが、恒常的に Wnt シグナルが活性化している腸腫瘍細胞は比較的単純な組成の培地で培養することができる。本プロトコルでは、家族性大腸腺腫症のモデル動物である *Apc^{Min}* マウスの腸管に発生するポリープ（腺腫）から継代可能な腫瘍上皮スフェロイドを樹立、維持する方法を紹介する。

準備

—マウス—

Apc^{Min} などの消化管腫瘍モデルマウス

—試薬(青字以外はメーカーを問わない)—

Corning® マトリゲル™ 基底膜マトリックス (Corning 356234, 354234)、Corning® セルリカバリーソリューション (Corning 354253)、Advanced DMEM/F12 (Invitrogen 12634-010)、コラゲナーゼ Type I 粉末 (Invitrogen 17100-017)、DMEM/Ham's F-12 (HEPES、L-グルタミン含有)、ペニシリン - ストレプトマイシン (100 X) (Invitrogen)、L-グルタミン溶液 (100 X) (Invitrogen)、牛胎仔血清 (fetal bovine serum : FBS)、50 mg/mL ゲンタマイシン溶液 (Invitrogen 15750-060)、Y-27632 dihydrochloride (TOCRIS 1254)、SB435142 (TOCRIS 1614)、0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen 25300-054)、DMSO (SIGMA D2650)、DPBS (Invitrogen 14190-144)、0.5 M EDTA 溶液 (Invitrogen 15575-020)、iPGell (Geno Staff : PG20-1)

—器具(いずれもメーカーを問わない)—

24 ウェル細胞培養プレート、10 mL シリンジ、18G ブラント針 (ニプロ)、100 mm ペトリディッシュ、35 mm ペトリディッシュ、100 μm セルストレーナー (Corning 352360)、0.22 μm シリンジフィルター、解剖用はさみ、解剖用ピンセット、エタノール綿、温度制御用アルミプレート (イナオプティカ AB-TC2) もしくは適当な金属板、2 mL クライオチューブ、15 mL コニカルチューブ、50 mL コニカルチューブ、1.5 mL 遠心チューブ、ピペッター (10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL)、フィルター付きピペットチップ

—実験装置—

クリーンベンチ、バキュームアスピレーター、実体顕微鏡、位相差倒立顕微鏡、スイングローター低速遠心機、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂)、ウォーターバス (37°C)

CORNING

試薬の準備

－初代培養培地(Primary culture medium)－

Advanced DMEM/F12 培地に 1/100 容の L- グルタミン溶液 (100 X)、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (100 X)、5% の FBS を加える。4℃ で保存するか、分注して -20℃ で保存する。参考文献では FBS 濃度は 20% だが、これは正常腸上皮細胞を培養するのに必要な濃度であり、腫瘍細胞を培養する場合は 5% でよい。

－Y-27632 dihydrochloride－

精製水で 10 mM に調製し、分注して -20℃ で保存する。

－SB435142－

DMSO で 10 mM に調製し、分注して -20℃ で保存する。

－洗浄培地(Washing medium)－

DMEM/F12 培地 (HEPES、L- グルタミン含有) に 1/100 容のペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (100 X) と 10% の FBS を加える。4℃ で保存する。

－PBS-EDTA－

PBS 500 mL に 0.5M EDTA 溶液を 500 μ L 加える。室温で保存する。

－コラゲナーゼ溶液－

コラゲナーゼ Type I 粉末 0.1 g を 50 mL の洗浄培地に溶解し、50 μ L の 50 mg/mL ゲンタマイシン溶液を加える。0.22 μ m シリンジフィルターでろ過後、15 mL コニカルチューブに分注して -20℃ で保存する。

－Corning® マトリゲル™ 基底膜マトリックス－

発泡スチロールボックスに氷を詰め、凍結されたボトルを氷中に置く。冷蔵庫で 1 晩かけてマトリゲルを融解させる。緩やかにピペティングしてマトリゲルを均一に混合した後、あらかじめ氷中に置いた 1.5 mL 遠心チューブに分注する。分注したマトリゲルは -20℃ で再凍結し、1 本ずつ氷中で融解させて使用する。

参考) 再融解したマトリゲルはしばらく冷蔵庫で保存可能であるが、冷蔵庫内の温度が高いと粘性が増して固まりやすくなる。これを避けるため冷蔵庫の設定を強にするか、常に氷中で保存する。

方法

1. 腫瘍細胞の分離

マウスを人道的な方法で安楽死させ、小腸もしくは大腸を摘出する。氷冷した PBS を 10 mL シリンジに充填し、ブラント針を取り付ける。腸管の一端にブラント針を差し込み、腸壁と針を指で固定して腸内を PBS でフラッシュする (2-3 回)。この際内容物が飛び散らないよう、腸管のもう一端をビーカーの中へ入れておく。腸間膜に沿って腸管をはさみで開き、20 mL 氷冷 PBS の入った 50 mL コニカルチューブの中に入れる。コニカルチューブを 20 回ほど激しく振って腸管を洗浄する。腸管を氷冷 PBS の入ったペトリディッシュに移し、実体顕微鏡下で腫瘍 (ポリープ) を確認する。腫瘍をはさみで分離し、ピンセットで氷上の 35 mm ペトリディッシュに移す (写真 1)。はさみをエタノール綿で消毒し、ペトリディッシュ中の腫瘍を 1 mL ピペットチップを通るほどに細切する (注 1) (写真 2)。



写真 1 *Apc^{Min}* マウスから摘出した小腸ポリープ

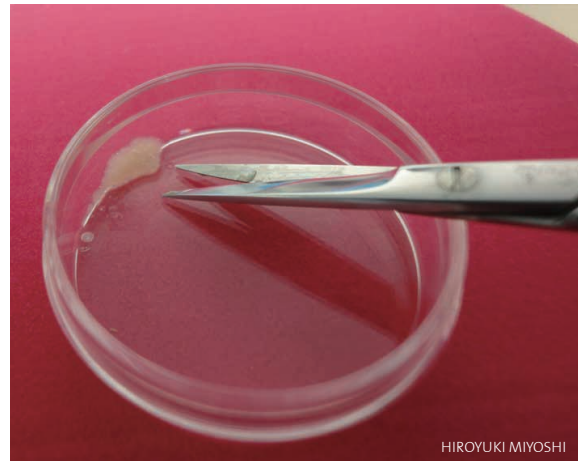


写真 2 写真 1 のポリープ 1 個を細切した

細切した組織片に 1 mL のコラゲナーゼ溶液を加え、軽くピペッティングする。組織片がピペットチップを通らない場合はチップの先で分散させる。これを位相差顕微鏡下で観察すると腫瘍片の内部に管腔状の上皮細胞が詰まっているのがわかる (写真 3)。ディッシュを 37°C インキュベーター中で保温し、10 から 15 分ごとに強くピペッティングして位相差顕微鏡下で腫瘍片から上皮細胞が分離しているかどうか確認する (写真 4)。

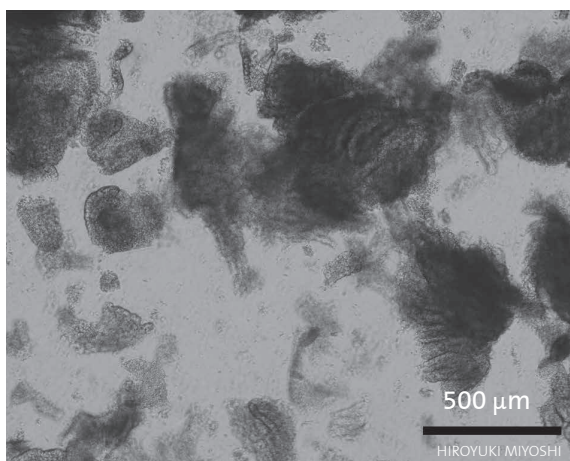


写真 3 コラゲナーゼ溶液を加えた直後の組織片

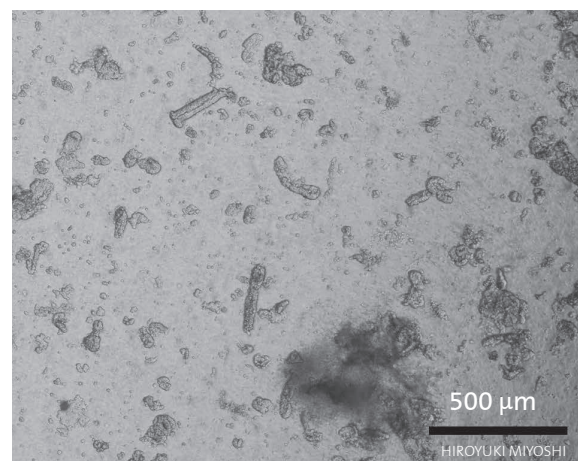


写真 4 15 分ごとに 2 回ピペッティングを行った後の組織片。上皮細胞の塊が多数分離している

注 1) 腫瘍の量が多すぎるとコラゲナーゼ処理後の溶液の粘性が高くなり、上皮細胞がうまく分離できなくなる。写真 2 の量ぐらいが適切である。

ある程度(半分以上)上皮細胞が分離したら50 mL コニカルチューブにセットしたセルストレーナーにアプライする(注2)(写真5)。さらにセルストレーナーを9 mLの洗浄培地で洗い、ろ過された培地を15 mL コニカルチューブに移す。これを20 gの低速で5分間遠心する。低速で遠心することによって大きな腫瘍細胞塊が優先的に沈殿し、単一細胞やデブリは上清に留まる(写真6)。培地の粘性が強く、20 gで沈殿が見られない場合は200 gで遠心する。200 gで遠心した場合夾雑物の混入が多くなるが、スフェロイドを継代する毎に希釈されるので大きな問題にはならない。バキュームアスピレーターで上清を注意深く除き、ペレットを600-800 μL の洗浄培地に懸濁する。この時点で一部(10 μL 程度)をペトリ皿にとって観察すると、様々な大きさの上皮細胞塊が確認できる(写真7)。



写真5 セルストレーナーを用いて大きなデブリや組織片を除く

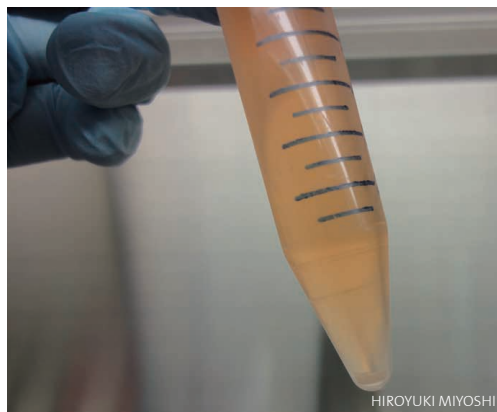


写真6 低速(20 g)で遠心すると主にサイズの大きな上皮細胞塊がペレットを形成し、単一細胞や細かいデブリは上清に留まる

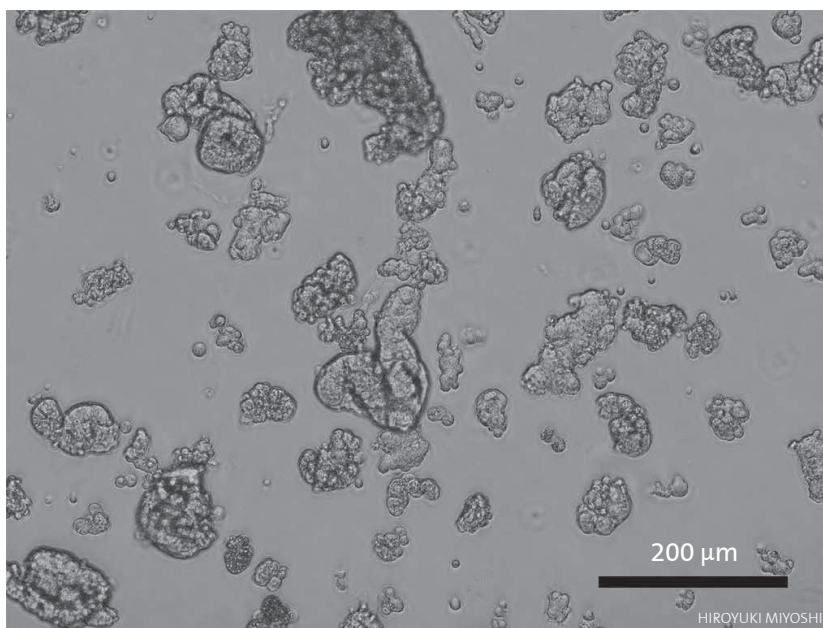


写真7 写真6のペレットを洗浄培地に再懸濁したもの

注2) 参考文献では70 μm セルストレーナーを使用しているが、腫瘍由来の上皮は正常クリプトよりも大きいため、ここでは100 μm のものを用いる。

参考) ピペティングは組織のコラゲナーゼ処理やスフェロイドのトリプシン処理の過程で均質な上皮細胞塊を得るのに非常に重要な操作である。また、スフェロイドのペレットをマトリゲルに懸濁する際、気泡を入れないようピペティングを微妙にコントロールしなければならない。ピペットを新たに購入する際はある程度ブランジャのストロークが重く、力の加減に合わせてスムーズに動くものを選ぶとよい。

2. マトリゲル培養のセットアップ

上皮細胞の懸濁液を 1.5 mL 遠心チューブに移し、200 g で 5 分間遠心する。スイングローター遠心機に 1.5 mL 遠心チューブ用のアダプターがない場合は空の 50 mL コニカルチューブに入れて遠心する。バキュームアスピレーターで 100 μ L 程度を残して上清を吸引し、残りは 200 μ L ピペットで完全に除く（写真 8）。チューブを氷中で冷却し、マトリゲルを 200 μ L ピペットで適当量取ってペレットを懸濁する。24 ウェルプレート 1 ウェル当たり 15-20 μ L のマトリゲルを使用する。写真 8 のペレットでだいたい 6-8 ウェル分である。懸濁は気泡を発生させないように慎重かつ手早く行う。アルミプレートが氷上に置き、その上に 24 ウェルプレートを置く。氷上に直接 24 ウェルプレートを置いてもよいが、冷却が不均一になりやすいので注意する。20 μ L ピペットでマトリゲル - 細胞混合液をウェルの中心にアプライし（写真 9）、チップの先で円形に広げる（写真 10）。広げる大きさの目安はウェルの直径の半分ぐらいで、マトリゲルがウェルの側面に達しないように注意する。

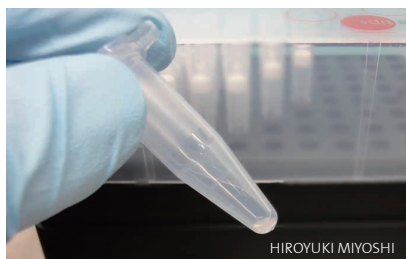


写真 8 マトリゲルに懸濁する直前の上皮細胞ペレット

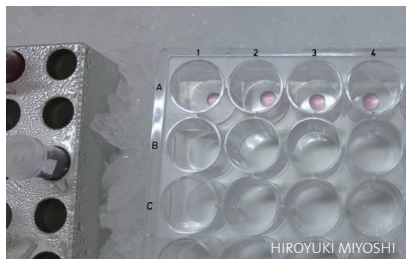


写真 9 マトリゲル培養のセットアップ(1)

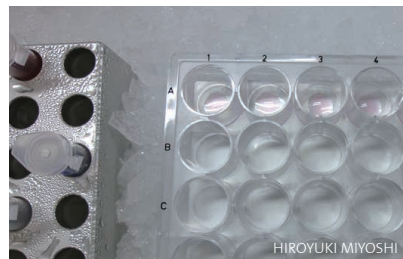


写真 10 マトリゲル培養のセットアップ(2)

この時泡を入れないようにピペット操作を加減する。プレート逆さにして 37°C インキュベーター中で保温し、マトリゲルをゲル化させる（写真 11）。プレート逆さにすることによって上皮細胞がプレートに直接接触するのを防ぐ。1/1000 容の 10mM Y-27632 と 10mM SB435142（最終濃度各 10 μ M）を添加した初代培養培地を 1 ウェル当たり 500 μ L アプライし、培養を開始する。2 日毎に培地を交換するが、4 日以上培養するとスフェロイドが大きくなりすぎて培地が疲弊するので、2-3 日目に継代もしくは凍結する（写真 12）。



写真 11 プレート逆さにしてマトリゲルをゲル化させる

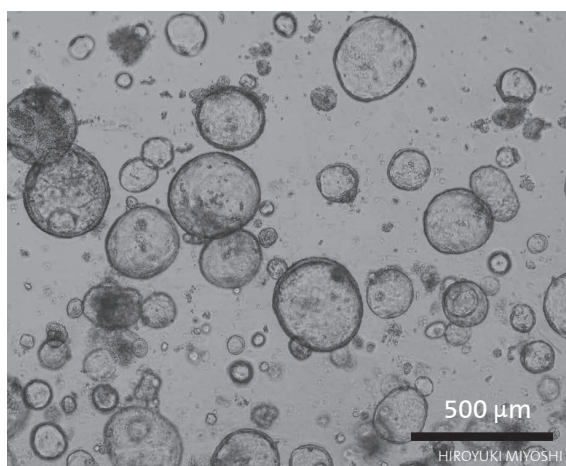


写真 12 培養開始後 2 日目のスフェロイド

参考) マトリゲルを吸引するピペットチップは低吸着タイプで薄いものが望ましい。

参考) マイコプラズマの感染が予想される場合はマイコプラズマ予防薬を培地に加えることが望ましい。

3. 継代

コンフルエントになったスフェロイドをマトリゲルごとピペッティングして培地に分散させ、15 mL コニカルチューブに回収する（注 3）。200 g で 5 分間遠心する。マトリゲルの層ぎりぎりまで上清を除去し、5 mL の PBS-EDTA を加えてスフェロイドを分散させる。再び 200 g で 5 分間遠心し、マトリゲルの層ぎりぎりまで上清を除去する。200 μ L のトリプシン溶液を加えて軽くピペッティングし、37 $^{\circ}$ C のウォーターバス中で 5 分間インキュベートする。洗浄培地 1 mL を加えてチップの先をチューブの底に押し付けながら強くピペッティングする。溶液を光に透かして細胞塊の大きさがほぼ均一になっていることを確認する（注 4）。ピペッティングの回数を調節してすることによって平均の細胞塊の大きさをコントロールすることができる（注 5）。チューブに 9 mL の洗浄培地を加えてトリプシンを完全に不活性化し、200 g で 5 分間遠心する。マトリゲルは完全に消化され、トリプシン処理前よりもペレットは小さくなる。上清を 100 μ L 程度の溶液を残してアスピレーターで除去し、ペレットを 600-800 μ L の洗浄培地に再懸濁して 1.5 mL 遠心チューブに移す（写真 13）。以下の操作は前項と同様に行う。

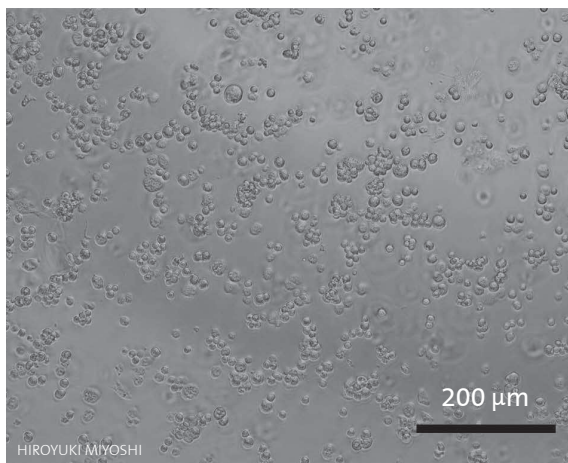


写真 13 トリプシン処理後のスフェロイド細胞

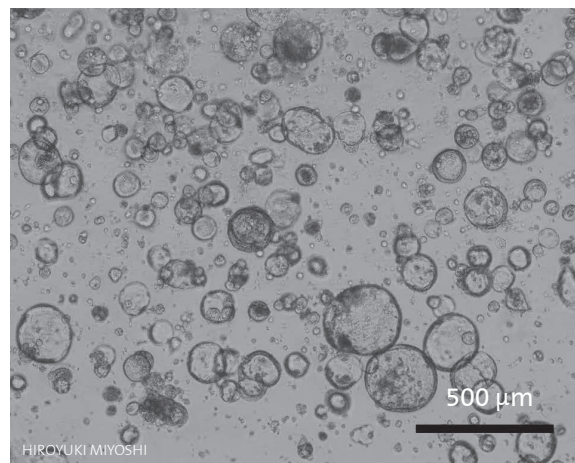


写真 14 写真 13 の細胞から形成された培養開始後 3 日目のスフェロイド

注 3) スフェロイドの内部に死細胞が蓄積する前に継代するのが望ましい。

注 4) 実験上細胞塊の大きさを均一にする必要がある場合は 40 μ m セルストレーナーを通す。普段の継代操作では不要である。

注 5) 写真 13 はかなり強めにピペッティングしている。

参考) 継代の希釈倍率はスフェロイドの増殖速度と継代時の密度によって変わってくる。おおよそ 1 : 3 から 1 : 8 の間である。

参考) アッセイのために 96 ウェルプレートを使用する場合は 4 μ L のマトリゲル - スフェロイド混合液をウェルの中心にアプライする。チップの先でマトリゲルを広げる必要はない。

4. 凍結保存・融解

2-3 日培養したスフェロイドをマトリゲルごとピペッティングして培地に分散させ、15 mL コニカルチューブに回収する。200 g で 5 分間遠心する。マトリゲルの層ぎりぎりまで上清を除去する。ペレットを 1 well あたり 500 μ L の凍結培地（洗浄培地 : 400 μ L、FBS : 50 μ L、DMSO : 50 μ L）に懸濁し、500 μ L ずつクライオチューブに分注する。適切な細胞凍結容器を用いて凍結する。融解時にはあらかじめ洗浄培地（5 mL 以上）を入れた 15 mL コニカルチューブをウォーターバスで 37 $^{\circ}$ C に加温しておく。凍結チューブをディープフリーザーもしくは液体窒素タンクから取り出してウォーターバスで加温し、凍結培地が融解したら直ちに中身をコニカルチューブの培地中に移す。以下、遠心からプレーティングまでの手順は継代と同様に行う。融解直後のスフェロイドは脆弱なのでピペッティングは緩やかに行う。

5. セルリカバリーソリューションによるマトリゲルの除去

スフェロイドからキットを用いて RNA を抽出する場合は培地をアスピレーターで除去して直接リシスバッファーでマトリゲルごとスフェロイドを溶解する。DNA やタンパク質の抽出や組織標本の作製を行う場合はあらかじめマトリゲルを除く必要がある。スフェロイドを培養したウェルの培地をアスピレーターで除き、500 μ L 程度の PBS でウェルを洗浄する。PBS をアスピレーターでよく除いたら培養プレートを氷上に置き、氷冷したセルリカバリーソリューションを加える。複数のウェルから 1 つの 1.5 mL 遠心チューブにスフェロイドを回収する場合、例えば 6 ウェルなら 1 ウェルあたり 200 μ L のセルリカバリーソリューションを加える。DNA やタンパク質を抽出する場合はスフェロイドをマトリゲルごとピペティングして 1.5 mL 遠心チューブに回収する。組織標本を作製する場合は、先を少し切った 1000 μ L ピペットチップでマトリゲルをこそげとるようにして大きな塊を回収し、スフェロイドの形態を壊さないようにする（写真 15）。氷中に 30 分以上置き、時々転倒混和してマトリゲルの分解を促す。コールドチャンバー内のローテーターを用いると時間を短縮できる。200 g で 2 分間遠心し、スフェロイドのペレットを確認する。この時ペレットの上に半透明のマトリゲルの層が見えれば分解が不完全であるので再び転倒混和し、遠心する。2-3 回氷冷 PBS で洗って次の実験に用いる。DNA やタンパク質を抽出する場合は適当なリシスバッファーに溶解する。組織標本を作製する場合は次項へ進む。



写真 15 セルリカバリーソリューション中に回収したスフェロイド

6. iPGell (GenoStaff : PG20-1)を用いた組織標本の作製

マトリゲルを除去したスフェロイドのペレットに PBS を加え、液量が約 25 μ L になるように合わせる（25 μ L の液体が入った 1.5 mL 遠心チューブを並べて比較し、おおよそ液面が揃っていればよい：写真 16）。iPGell A-solution を 5 μ L 加え、チップの先で緩やかに溶液をかき混ぜる。スフェロイドを破壊する可能性があるため、この時点でピペティングをしてはならない。次に 200 μ L ピペットチップの先を少し切り、iPGell B-solution を 25 μ L 取る。このチップをスフェロイド溶液の中に入れて直ちにピペティングする。この際チップの先をよく見ながら大きな気泡が入らないように注意し、かつスフェロイドを均一に分散させる。3 秒以内にピペティングを終わらせ、しばらく静置すると 10 秒以内にゲル化する。チューブを逆さにしてゲル化したことを確認し（写真 17）、4% パラホルムアルデヒド溶液を 1 mL 加える（写真 18）。

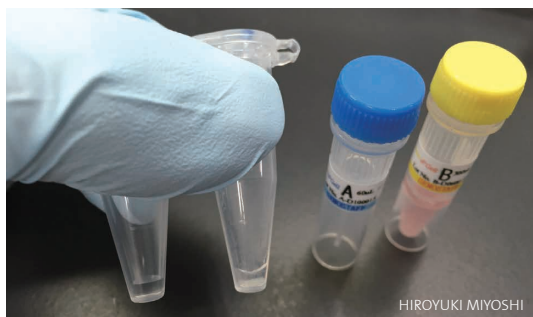


写真 16 25 μ L の液体が入ったチューブ（左端）と並べて液量を調整する

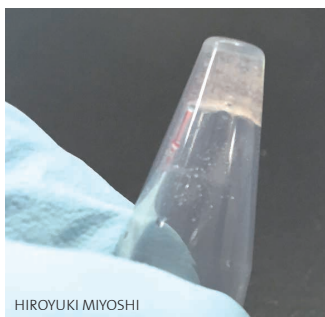


写真 17 ゲル化した iPGell

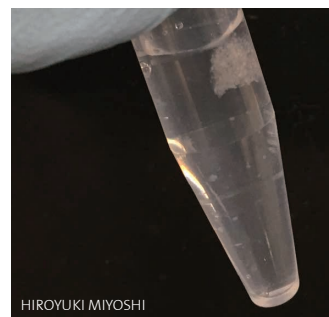


写真 18 固定液中の iPGell

数時間から 1 晩固定した後、ゲルを組織サンプル用カセットに移してパラフィン包埋装置にセットし、パラフィンブロックを作製する（写真 19-21）。凍結標本を作製する場合はシュークローズ置換を行う。

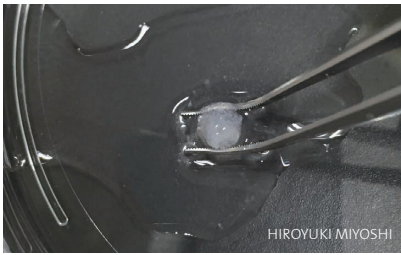


写真 19 固定後、ゲルを包埋カセットに移す

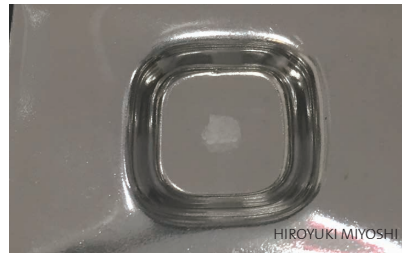


写真 20 ゲルをパラフィンに包埋する

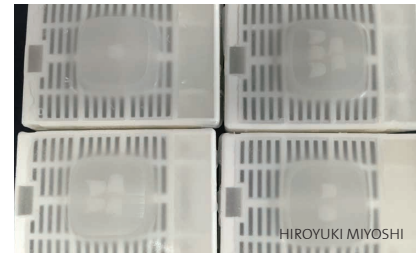


写真 21 一つのブロックに複数のゲルを並べることもできる

このようにして作製されたスフェロイド標本を用いて、H&E 染色（写真 22-23）や免疫染色など生体組織由来の標本と同じ解析が可能である。

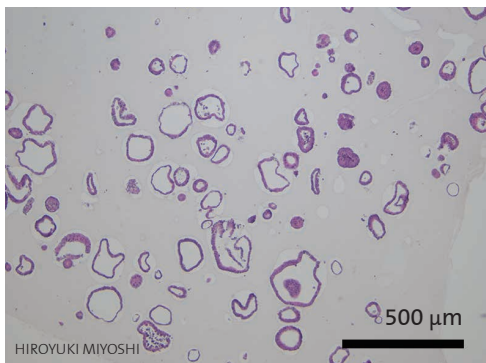


写真 22 Apc^{Min} マウス小腸腫瘍スフェロイドの H&E 染色像（弱拡大）。iPGell の成分が薄く染色されるが、観察には支障がない

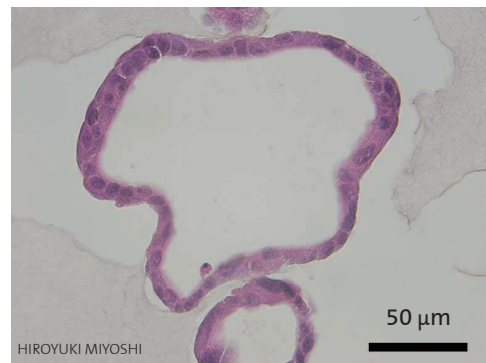


写真 23 腫瘍スフェロイドの H&E 染色像（強拡大）

終わりに

本プロトコールはマウス腸腫瘍細胞を対象としているが、他の内胚葉系組織に由来する腫瘍やヒトがん組織にも応用可能である。また、Wnt3a、R-spondin3、Noggin を分泌する L-WRN 細胞 (ATCC: CRL-3276) のコンディショニング培地を使用すれば正常組織からスフェロイドを樹立することができる。

参考文献

Miyoshi and Stappenbeck. Nat. Protocols, 2013; 8 : 2471-2482.

- Corning® は CORNING Incorporated の登録商標です。
- 商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承ください。
- For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks
- All other trademarks are the property of their respective owners.
- 保証・免責事項：特に記載がない限り、記載中の製品は研究用機材および試薬です。診断、または治療用途には使用しないでください。また人体には使用しないでください。コーニングライフサイエンスは本製品の臨床または診断用途でのいかなるパフォーマンスについても保証しません。

CORNING

FALCON®

AXYGEN®

PYREX®

GOSSSELIN™

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

技術サポートへのお問い合わせは
Tel : 03-3586-1268
ScientificSupportJP@corning.com