

Corning® Matrigel® Matrix

CORNING

目次

基本情報	2
由来	2
構成成分	2
解凍方法	2
保存上の注意	2
コーティング方法	2
使用用途	3
Corning® Matrigel® Matrix の種類	4
Corning マトリゲル基底膜マトリックスシリーズ	4
Corning マトリゲル基底膜マトリックス高濃度シリーズ	4
Corning Matrigel Matrix を使用した製品	5
Corning BioCoat® 製品	5
癌細胞浸潤関連製品	6
Corning Matrigel Matrix から細胞を回収する際に使用する製品	6
Corning Matrigel Matrix に関する Q&A	7
Application note : Corning マトリゲル基底膜マトリックス ヒト ES 細胞用を 用いての ES 細胞短期間培養評価	9
Application note : マウスへの Corning マトリゲル基底膜マトリックス移植と 組織固定方法	10
Application note : Corning マトリゲル基底膜マトリックスを用いた MDCK 細胞の 3 次元培養と蛍光免疫染色法	11
Application note : Corning マトリゲル基底膜マトリックスを用いた <i>in vivo</i> / <i>ex vivo</i> 血管新生定量法	14
Application note : 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	19

基本情報

由来

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスは細胞外基質タンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品です。主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、エンタクチン、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンです。これには TGF- β 、線維芽細胞増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、EHS 腫瘍に自然に産生される他の増殖因子も含まれます。マトリゲル基底膜マトリックスは室温において重合して哺乳類の細胞基底膜と似た生物活性のあるマトリックスとなります。

構成成分

マトリゲル基底膜マトリックスと GFR (Growth Factor Reduced) マトリゲル基底膜マトリックスの細胞外基質組成

マトリゲル基底膜マトリックス成分	マトリゲル基底膜マトリックスにおける組成比率	GFR マトリゲル基底膜マトリックスにおける組成比率
ラミニン	56%	61%
コラーゲン IV	31%	30%
エンタクチン	8%	7%

タンパク質濃度

マトリゲル基底膜マトリックス	マトリゲル基底膜マトリックス 高濃度
8-12 mg/mL	18-22 mg/mL

マトリゲル基底膜マトリックスと GFR マトリゲル基底膜マトリックスにある増殖因子 (GF) の量

増殖因子	マトリゲル基底膜マトリックスにおける GF 濃度の範囲	マトリゲル基底膜マトリックスにおける平均 GF 濃度	GFR マトリゲル基底膜マトリックスにおける標準的 GF 濃度
IGF-1	11-24 ng/mL	15.6 ng/mL	5 ng/mL
TGF-b	1.7-4.7 ng/mL	2.3 ng/mL	1.7 ng/mL
EGF	0.5-1.3 ng/mL	0.7 ng/mL	< 0.5 ng/mL
PDGF	5-48 pg/mL	12 pg/mL	< 5 pg/mL
bFGF	< 0.1 pg/mL	n.d.	n.d.
NGF	< 0.2 ng/mL	n.d.	< 0.2 ng/mL
VEGF	5.0-7.5 ng/mL	n.d.	1.0-1.5 ng/mL

n.d. (not determined)

解凍方法

ゲル調製の前に、一晩かけて低温室内で氷上または温度変化の少ない 4 °C に保たれた保冷庫でマトリゲル基底膜マトリックスを解凍してください。使用時まで氷上で冷やしておいてください。ゲル調製は予め冷やしたピペット、プレート、チューブを使用してください。マトリゲル基底膜マトリックスは 8 ~ 10 °C でゲル化が一部始まり、22 ~ 35 °C になると速やかにゲル化します。

保存上の注意

毎回少量しかマトリゲル基底膜マトリックスを使用しない場合、初回の解凍時に小分けにして、- 20 °C ~ - 80 °C で保存することができます。凍結融解は何度も繰り返さないでください。なお、マトリゲル基底膜マトリックスにはプロテアーゼが含まれていますので、長期間の保存でタンパク質の分解がみられることがありますので、ご注意ください。

コーティング方法

マトリゲル基底膜マトリックスにはいくつかのコーティング方法があります。Thin Gel 法は、ゲルの上に細胞を播種するときに使用し、Thick Gel 法は 3 次元マトリックス中で細胞を培養するときに使用します。薄層コーティング (ゲルではない) は、複合タンパク質の層上で、細胞を培養するときに用います。目的のアプリケーションに応じて選択してください。

留意：マトリゲル基底膜マトリックスを希釈して用いる場合、ゲル化させるためには、3 mg/mL 以下には希釈しないでください。また、希釈には無血清培地を用い、ゲル化した後は直ちに使用してください。

Thin Gel 法 (0.5 mm くらいの厚さになります。)

- 1) マトリゲル基底膜マトリックスを 2～8℃の冷蔵庫、もしくは低温室内で氷上に静置し、一晩かけてゆっくり解凍します。冷やしたピペットを用いてマトリゲル基底膜マトリックスが均一になるよう混合してください。
- 2) コーティングしたいディッシュやプレートを氷上に置いたまま、培養表面の面積 1 cm² 当り 50 µL を分注します。
- 3) 37℃で 30 分ゲル化させます。すぐに使用できます。

Thick Gel 法 (1 mm くらいの厚さになります。)

- 1) マトリゲル基底膜マトリックスを 2～8℃の冷蔵庫、もしくは低温室内で氷上に静置し、一晩かけてゆっくり解凍します。冷やしたピペットを用いてマトリゲル基底膜マトリックスが均一になるよう混合してください。
- 2) コーティングしたいディッシュやプレートを氷上に置いたまま、培養表面の面積 1 cm² 当り 150～200 µL を分注します。
- 3) 37℃で 30 分ゲル化させます。すぐに使用できます。

薄層コーティング法 (Thin Coating 法)

- 1) マトリゲル基底膜マトリックスを 2～8℃の冷蔵庫、もしくは低温室内で氷上に静置し、一晩かけてゆっくり解凍します。冷やしたピペットを用いてマトリゲル基底膜マトリックスが均一になるよう混合してください。
- 2) 無血清培地でマトリゲル基底膜マトリックスを希釈します。アプリケーションに応じて適切な希釈濃度を調べるために、予備実験をする必要が生じる場合もあります。
- 3) 希釈したマトリゲル基底膜マトリックスをコートするディッシュやプレートに加えます。培養表面を覆うのに充分な量を添加してください。室温で 1 時間インキュベートします。
- 4) 結合しなかった溶液を吸引し、無血清培地で穏やかにリンスします。プレートはすぐに使用することができます。

浸潤実験用コーティング法

別途資料がありますので、ご希望の方は、下記へご依頼ください。
ScientificSupportJP@corning.com

使用用途

1. 細胞の 3 次元培養 (ゲル培養)
 - Corning[®] マトリゲル基底膜マトリックス 3D プレート
 - Corning マトリゲル基底膜マトリックス オルガノイド形成用
2. 動物体内への移植
 - ガン細胞の生着
 - 血管新生
3. 基底膜モデル
 - ガン細胞浸潤アッセイ
 - Corning BioCoat[®] Matrigel[®] インベーションチャンバー
 - Corning BioCoat グロースファクターリデューストインベーションチャンバー
 - 血管内皮細胞浸潤アッセイ

Corning® Matrigel® Matrixの種類



通常のマトリゲル基底膜マトリックス、増殖因子類を少なくしたマトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR)、タンパク質の濃度が約2倍のマトリゲル基底膜マトリックス高濃度があります。また、フェノールレッドを含まないマトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリーもあります。マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR) 製品は、増殖因子の影響を低減したい場合に、マトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー製品は、色の検出 (ヘモグロビン測定など) が必要なアッセイに適しています。実験の目的に応じてお選びください。

マトリゲル基底膜マトリックス ヒトES細胞用は、STEMCELL Technologies の mTeSR[®]1 を用いて培養確認済みの基質です。ヒトES/iPS細胞のフィーダーフリー培養に重要な再現性と安定性を提供します。

マトリゲル基底膜マトリックス オルガノイド形成用は、オルガノイド培養に最適な可溶性基底膜調製品です。マウスならびにヒトの健常および疾患細胞由来オルガノイドの増殖と分化をサポートすることを確認しています。

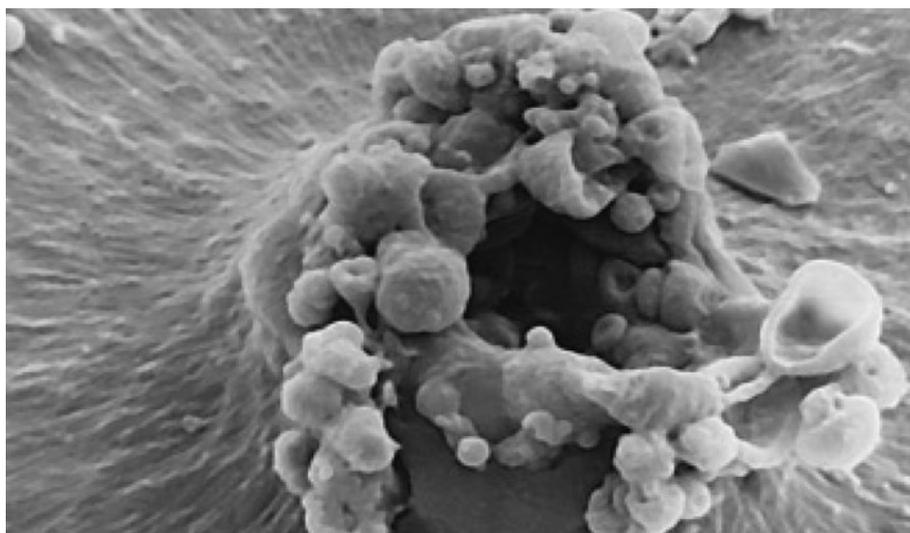
Corning マトリゲル基底膜マトリックスシリーズ

カタログ番号	製品名	容量	メーカー希望小売価格(円)
356234	Corning マトリゲル基底膜マトリックス	5 mL	29,500
354234	Corning マトリゲル基底膜マトリックス	10 mL	46,900
356237	Corning マトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー	10 mL	49,700
356230	Corning マトリゲル基底膜マトリックス	5 mL	30,800
354230	Corning マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR)	10 mL	52,600
356231	Corning マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR)	10 mL	55,100
	フェノールレッドフリー		
354277	Corning マトリゲル基底膜マトリックス ヒトES細胞用	5 mL	43,800
356255	Corning マトリゲル基底膜マトリックス オルガノイド形成用 フェノールレッドフリー	10 mL	56,300

Corning マトリゲル基底膜マトリックス 高濃度シリーズ

カタログ番号	製品名	容量	メーカー希望小売価格(円)
354248	Corning マトリゲル基底膜マトリックス 高濃度	10 mL	75,200
354263	Corning マトリゲル基底膜マトリックス 高濃度グロースファクターリデュースト (GFR)	10 mL	86,400
354262	Corning マトリゲル基底膜マトリックス 高濃度フェノールレッドフリー	10 mL	86,400

Corning® Matrigel® Matrix を使用した製品



Corning BioCoat® 製品

Corning マトリゲル基底膜マトリックス薄層コート

カタログ 番号	製品名	入数	メーカー希望 小売価格(円)
354607	96 ウェルプレート	5	28,400

Corning BioCoat マトリゲルヒト ES 細胞用コート製品

ヒト ES 細胞培養用に最適化された Corning マトリゲル基底膜マトリックスをコートしています。

カタログ 番号	製品名	入数	メーカー希望 小売価格(円)
354671	6 ウェルプレート	5	25,600

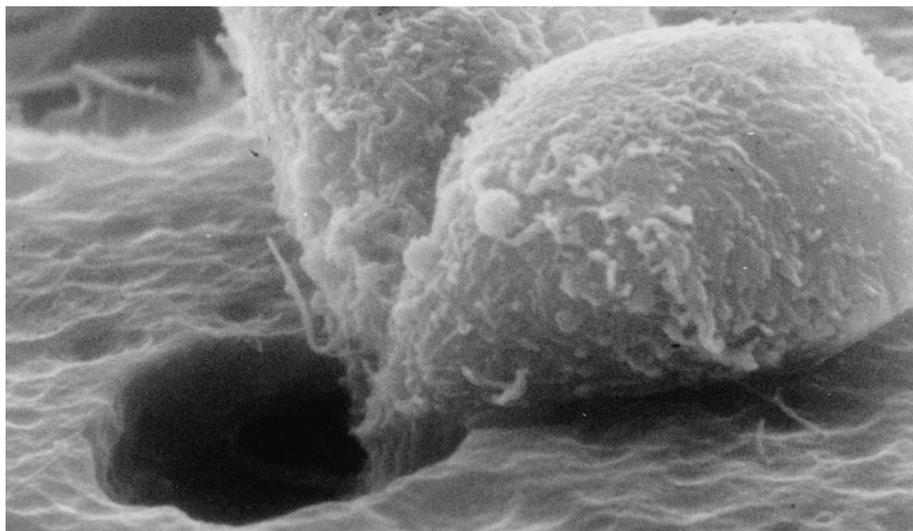
Corning マトリゲル基底膜マトリックス 3D プレート

コート済みですぐに使用できます。マトリゲル基底膜マトリックスが 96 ウェルと 384 ウェルのハイスループットフォーマットの各ウェルに分注されており、3D 細胞培養に最適です。3D 細胞培養の「オントップ/サンドイッチ法」、「包埋法」いずれでも使用できます。

カタログ 番号	製品名	入数	メーカー希望 小売価格(円)
356259*	96 ウェル黒色 / 透明プレート	1	32,800
356256*	384 ウェル黒色 / 透明プレート	5	157,600
356258*	384 ウェル白色 / 透明プレート	1	32,800
356257*	384 ウェル白色 / 透明プレート	5	157,600

*受発注品です。ご注文いただいてからお届けするまでにお時間がかかります。あらかじめご了承ください。

癌細胞浸潤関連製品



Corning® BioCoat® Matrigel® インベーションチャンバー

基底膜を通過する癌細胞浸潤研究のための *in vitro* アッセイシステムです。8.0 μm ポアサイズ PET メンブレンの Falcon® セルカルチャーインサートに、Corning マトリゲル基底膜マトリックスを均一にコートしてあります。Corning マトリゲル基底膜マトリックスは、メンブレンのポアを塞ぎ非浸潤性細胞の遊走を遮断します。*in vitro* における腫瘍細胞の浸潤能を迅速かつ再現性良くアッセイできます。

カタログ番号	製品名	入数	メーカー希望小売価格(円)
354481	8 μm ポアインサート付き 6 ウェルプレート用	24 インサート	65,300
354480	8 μm ポアインサート付き 24 ウェルプレート用	24 インサート	59,000

Corning BioCoat グロースファクターリデュースト Matrigel インベーションチャンバー

カタログ番号	製品名	入数	メーカー希望小売価格(円)
354483	8 μm ポアインサート付き 24 ウェルプレート	24 インサート	60,500

Corning Matrigel Matrix から細胞を回収する際に使用する製品

Corning ディスパーゼ

Corning ディスパーゼは *bacillus* 属由来の中性メタロプロテアーゼであり、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに、かつ効率的に細胞を単離することができます。Corning ディスパーゼは、コラーゲン IV やフィブロネクチンと少量のコラーゲン I を分解しますが、コラーゲン V とラミニンは分解しません。

カタログ番号	製品名	容量	メーカー希望小売価格(円)
354235	Corning ディスパーゼ	100 mL	53,200

Corning セルリカバリーソリューション

Corning セルリカバリーソリューションは酵素消化、高温での長時間によるインキュベーションなしに 2 ~ 8 °C でマトリゲルを脱重合させます。よって、細胞は、インキュベーション時の生化学的変化を回避でき、細胞表面のレセプターや接着分子の分解を抑えて回収されます。Corning セルリカバリーソリューションは、細胞から mRNA やタンパクを回収したい場合に適しています。

カタログ番号	製品名	容量	メーカー希望小売価格(円)
354253	Corning セルリカバリーソリューション	100 mL	5,700

Corning® Matrigel® Matrix に関する Q&A

Q: マトリゲル基底膜マトリックスの種類にはどんなものがありますか？

A: 通常のマトリゲル基底膜マトリックス、増殖因子類の含有量を少なくしたグロースファクターリデュースト、フェノールレッドを含まないフェノールレッドフリー、タンパク質の濃度が約 2 倍の高濃度のマトリゲル基底膜マトリックスがあります。その他にもフェノールレッドフリーの増殖因子類の含有量を少なくしたものもあります。

*フェノールレッドはエストロゲン活性を示すことがあります。

Q: マトリゲル基底膜マトリックスに含まれるラミニンは、どのアイソフォームですか？

A: マトリゲル基底膜マトリックスに含まれるラミニンは、Laminin-111 です。

Q: マトリゲル基底膜マトリックスの溶かし方はどのようにしたらよいでしょうか？

A: -20℃の冷凍庫から4℃の冷蔵庫に移して、一晩かけて溶かしてください。その時に使用する冷蔵庫は、霜取り機能がないものをお勧めします。また、開け閉めを良く行う冷蔵庫を使用したり、冷蔵庫のドア付近にマトリゲル基底膜マトリックスを置いておきますと、完全に融解せず、一部がゲル化する場合もありますのでご注意ください。(ゲル化する心配がある場合は、低温室内で氷上に静置し、溶かしてください。)

Q: マトリゲル基底膜マトリックスを解凍したのに、一部がゲル化しています。どうしたらよいでしょうか？

A: 冷蔵庫の温度変化によって、一部がゲル化した可能性があります。もう一度、-20℃で凍結し、氷上に置き、冷蔵庫(4℃)にて解凍してみてください。

Q: 毎回少量しかマトリゲル基底膜マトリックスを使用しません。残ったものはどのように保存するのが適当ですか？

A: 初回の解凍時に小分けにして、-20℃~-80℃で保存することをお勧めします。同じサンプルで、凍結融解を何度も繰り返さないでください。

Q: マトリゲル基底膜マトリックスの色がいつもと違うのですが？

A: マトリゲル基底膜マトリックスは pH の調整を行っておりませんので、黄色からピンク色まで製品にばらつきがあります。CO₂ インキュベーター内で、無菌的に空気にふれさせて、pH を安定させると色が中性付近に安定し、通常の赤色に戻ります。(溶かしてビンの中の空気に触れるだけで、色が戻ることもあります。)

Q: コート製品でマトリゲル基底膜マトリックスと薄層マトリゲル基底膜マトリックスの 2 種類がありますが、違いは何ですか？

A: マトリゲル基底膜マトリックスを希釈せず、約 10 mg/mL の濃度で 1~2 mm の厚さでコートしたものが通常のマトリゲル基底膜マトリックス製品です。薄層マトリゲルは、希釈したマトリゲル基底膜マトリックスを 100 µg/cm² でコートし、蒸発乾固させたものです。細胞をゲル上で培養したい場合、通常のマトリゲル基底膜マトリックスコートを使用し、上皮細胞などの接着を強化する目的で使用する場合には薄層マトリゲル基底膜マトリックスコートを使用します。

Q: 薄層コーティングを自分で行う場合は、どの程度の量を目安にすればよいでしょうか？

A: コーニングが販売している薄層コート製品は、100 µg/cm² でコートされています。セルフコートの際は、こちらを目安に、ご自分が使用する細胞に適した濃度をご確認ください。

Q: マトリゲル基底膜マトリックスからの細胞回収はどのようにしたらよいでしょうか？

A: コーニングでは、細胞回収にご使用できる試薬を 2 種類ご用意しております。Corning ディスパーゼはメタロプロテアーゼであり、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに、かつ効率的に細胞を単離することができます。ディスパーゼは、コラーゲン IV やフィブロネクチンと少量のコラーゲン I を分解しますが、コラーゲン V とラミニンは分解しません。

一方、Corning セルリカバリーソリューションは酵素消化、高温での長時間によるインキュベーションなしに 2~8℃でマトリゲル基底膜マトリックスを脱重合させます。よって、細胞はインキュベーション時の生化学的変化を回避でき、細胞表面レセプターや接着分子の分解をおさえて回収できます。Corning セルリカバリーソリューションは、反応温度が低いため細胞から mRNA やタンパクを回収したい場合に適しています。両製品共にマトリゲル基底膜マトリックスを物理的に壊してから使用すると、多少細胞回収までの時間が短くなります。どちらを選択するかは、細胞回収後の目的(タンパク抽出、DNA 抽出、RNA 抽出、継代)に応じて、お選びください。

Q: マトリゲル基底膜マトリックスには自家蛍光はありますか？

A: マトリゲル基底膜マトリックスには自家蛍光はありません。しかし、蛍光抗体の非特異的結合によりバックグラウンドが高くなる場合があります。これはブロッキングにより減らすことができます。また、通常のマトリゲル基底膜マトリックスにはフェノールレッドが含まれていますので、色の検出(蛍光など)を行う場合には、フェノールレッドフリータイプのマトリゲルをご使用ください。

Q : マトリゲル基底膜マトリックスを使用した血管新生の実験はどのように行うのでしょうか？

A : マウスの皮下に直接マトリゲル基底膜マトリックスを注射します。マトリゲル基底膜マトリックスに血管が伸長してきますので、その様子を観察します。詳しいアプリケーションは、巻末をご覧ください。

Q : 血管新生の実験を行いました。結果の評価はどのように行えばよいのでしょうか？

A : Hemoglobin 測定試薬に含まれるヘモグロビンを測定したり、蛍光試薬を血中に注入して測定した論文が出されています。

ヘモグロビン測定

Mol Cancer Res. 2004 May;2(5):281-8.
Nucleosomes bind fibroblast growth factor-2 for increased angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.
Tanner JE, Forté A, Panchal C.

FITC-Dextran 測定

J Cell Sci. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3759-68.
VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling.
Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K, Miyazawa K.

FACS での測定

J Immunol Methods. 2009 Mar 15;342(1-2):78-81. Epub 2008 Dec 25.
Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis *in vivo*.
Adini A, Fainaru O, Udagawa T, Connor KM, Folkman J, D'Amato RJ.

Q : 癌細胞の生着率を高めるためにヌードマウスにマトリゲル基底膜マトリックスをインジェクションしようと思います。どのマトリゲルが適当ですか？

A : まずは通常のタンパク質濃度のマトリゲルをお試しください。マトリゲル基底膜マトリックスは、室温で速やかにゲル化しますので、使用する器具を充分冷やしてください。詳しいアプリケーションに関しましては、こちらをご覧ください。移植後取り出す際、ゲルが崩れやすいなど不便を感じる時は、マトリゲル基底膜マトリックス高濃度シリーズをお試しください。

Q : マトリゲルヒト ES 細胞用はありますか？

A : カタログ番号 354277 がヒト ES 細胞用のマトリゲルです。また、京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターによる本製品を用いた hES 細胞培養評価の技術資料が 10 ページにあります。

本製品には DILUTION FACTOR が設定されており、25 mL の DMEM/F-12 培地に DILUTION FACTOR 分を添加してコーティング液を調製します。詳しくは製品添付のユーザーガイドをご参照ください。

Q : どのタイプの Corning[®] マトリゲル基底膜マトリックスでもオルガノイド培養に使用できますか？

A : 全てのタイプが使えるわけではありません。オルガノイド形成用以外の Corning マトリゲル基底膜マトリックス製品でもこのアプリケーションに使用できますが、結果がばらつく可能性があります。Corning マトリゲル基底膜マトリックス オルガノイド形成用はオルガノイド培養に均一性と信頼性のあるプラットフォームです。マウス小腸オルガノイドを 7 継代以上の長期の増殖を維持することを、オルガノイドに典型的な出芽した形態とマーカーの発現により確認しています (CLS-AN-542 参照)。また、初代ヒト気道上皮細胞の極性化した 3D 構造をサポートすることを、特徴的なマーカーの発現により確認しています (CLS-AN-534 参照)。加えてロットごとに、ゲルの固さを示す弾性率を測定しており、オルガノイド培養プロトコールで一般的に用いられる "3D ドーム構造" を安定的に形成することを確認しています。

Q : 3D 細胞培養をハイスループット環境で行うための、マトリゲル基底膜マトリックスコート済みの製品はありますか？

A : Corning マトリゲル基底膜マトリックス 3D プレートがあります (5 ページ)。コート済みですぐに使用でき、96 ウェルと 384 ウェルから選択できます。

Corning® マトリゲル基底膜マトリックス ヒト ES 細胞用 (カタログ番号: 354277) を用いてのヒト ES 細胞短期間培養評価

日本で hES 細胞株を 3 株 (KhES-1、KhES-2、KhES-3) 樹立し、国内他施設へ提供されている京都大学 再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターのご協力を得て、mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) とヒト ES 細胞用マトリゲルを用いての培養評価を行っていただきました。

評価方法

国内で樹立された hES 細胞、3 株を StemCell Technologies Inc の mTeSR 1 と Corning ヒト ES 細胞用マトリゲル (ロット番号: 89372) を用いて、プロトコルに従って、1 ヶ月 (5 ~ 6 継代) 培養を行った。評価は、顕微鏡下での形態観察、ES 細胞での発現が確認されている未分化マーカーの Oct-3/4 とアルカリ性フォスファターゼ染色を用いた。

結果

mTeSR1 とヒト ES 細胞用マトリゲルを用いた培養において、3 株とも 1 ヶ月くらいの短期間培養で使用できることが確認できた。コロニー形態は、多少の周辺部の崩れが観察されたが、培養そのものへの影響は観察されなかった。

Oct-3/4 とアルカリ性フォスファターゼ染色も陽性であり、未分化性が保たれていた。

培養における注意点

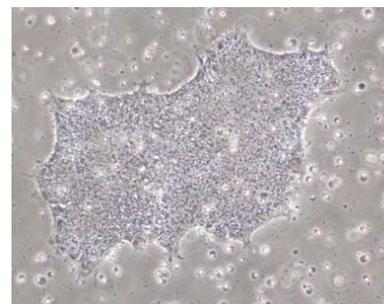
コンディション培地 (マウスフィーダー細胞の培養上清) とマトリゲルを組み合わせた培養に比較すると増殖速度がやや落ちる傾向であった。

- 通常マトリゲルに比較するとヒト ES 細胞用マトリゲルを使用した場合、接着後の細胞の広がりがやや遅いが、培養には影響はない。
- mTeSR 1 を使用した場合、コンディション培地を使用した場合と比較すると、細胞継代、培地交換の際に死細胞が目立つが、培養に問題はない。
- mTeSR 1 とヒト ES 細胞用マトリゲルで培養を行う際には、特に馴化する必要はない。

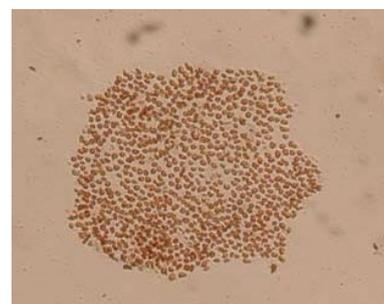
写真・情報提供:

京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター

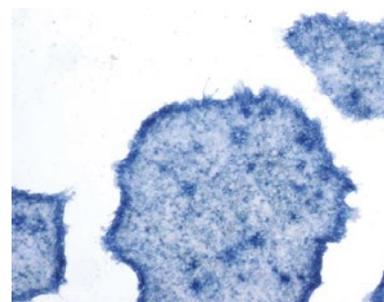
例: KhES-1 株



Phase contrast



Oct-3/4



アルカリ性フォスファターゼ

マウスへの Corning® マトリゲル基底膜マトリックス移植と組織固定方法

マトリゲル基底膜マトリックスの種類

1. 腫瘍細胞などの生着を助ける足場としては通常のマトリゲル基底膜マトリックス（カタログ番号：354234、356234）をご使用ください。マトリゲル基底膜マトリックス中に含有されるグロースファクターの量を減少させたい場合には、グロースファクターリデュースト マトリゲル基底膜マトリックス（カタログ番号：354230、356230）もあります。
2. 血管新生のアプリケーションで、最終的にヘモグロビン量をシアンメトヘモグロビン法（赤褐色の吸光）で測定する場合には、マトリゲル フェノールレッド フリー（カタログ番号：356237）やグロースファクター リデュースト マトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッド フリー（カタログ番号：356231）を使用するのが一般的です。なお、経験的に血管新生のアプリケーションではタンパク濃度の高いマトリゲル基底膜マトリックスで行なうと血管新生量が多くなるようです。

手順

マウス皮下へのマトリゲル基底膜マトリックス注射：

1. 注射のために使用する全ての器具や試薬（注射器、針、マトリゲル基底膜マトリックス溶液等）を氷上に静置し、十分冷やしておきます。マトリゲル基底膜マトリックスは 10℃以上でゲル化し始めるので、液体のまま注入するためにはマトリゲル基底膜マトリックスに触れるもの全てについて低温を保つことに細心の注意を払ってください。
2. マトリゲル基底膜マトリックスと細胞懸濁液を混合した^{注1)}後、注射器（注射針は 21-25 G：細胞の大きさに応じて細胞が壊れないサイズを選択します）で溶液を皮下に注射^{注2)}します（写真1）。このとき、針を動かさずに注入した場合にはマトリゲル基底膜マトリックスは一ヶ所で塊状にとどまりません。皮下組織との接触面積を増やしたい（球状ですと、細胞集団の中央に栄養が届かず、その部分の細胞の生存率が悪くなる場合があります。）ときには、通常の皮下注射と同様に皮下に針を刺し、その後に針先を左右に動かしてスペースを確保し、そこにマトリゲル基底膜マトリックスを注入してください。

注1) 今回の実験ではマトリゲル基底膜マトリックスを原液で注入しており、細胞は接種していません。腫瘍細胞などの生着の場合には細胞濃度を 2×10^7 cells/mL 程度に調整してください。実際の細胞接種量は 10^6 オーダーになります。また、ゲル化しにくくなるので、マトリゲル基底膜マトリックスを 1:3 以上には希釈しないでください。

注2) 一連の写真では 0.7 mL のマトリゲル基底膜マトリックス溶液を注入しています。後にマトリゲル基底膜マトリックスを含む組織を取り出すために、生体内での若干の吸収も考慮して、扱いやすいように大きめにしています。腫瘍細胞の生着の場合には 0.1 mL 程度しか注入しないこともあります。血管新生は 0.5 mL を目安にしてください。

マウスからのマトリゲル基底膜マトリックスの切除：

3. 適当な期間^{注3)}が経過したのち（写真2）、マウスを麻酔し、マトリゲル基底膜マトリックスの周囲をマトリゲル基底膜マトリックスから約 5 mm 離して、はさみで四角に切り取ります。ゲルの形状をきれいに保つためには、皮下だけではなく、皮膚から腹膜までを含めた組織を切り取り、固定します。参考までに、腹膜側より見たマトリゲル基底膜マトリックスの写真を載せます（写真3）。マトリゲル基底膜マトリックスは生体に吸収・分解され、注入した体積よりも小さくなっています。皮膚から取り出したマトリゲル基底膜マトリックスはやや黄色がかった透明で、血管などが入り込んでいると赤くなります（写真4）。

注3) この実験では 1 週間経過したマトリゲル基底膜マトリックスを取り出しています。血管構築の評価をヘモグロビン量で行なう場合には、VEGF とヘパリンをマトリゲル基底膜マトリックスに添加し、血管新生が亢進した状態において 3 日程度でマトリゲル基底膜マトリックスのみを摘出できます。

マトリゲル基底膜マトリックスを含む組織の固定：

4. 切り取った組織がしわにならないように、腹膜側を厚紙（カレンダーなどを利用）に伸ばしてのせ、保護のためにナイロンメッシュの袋に入れます。10%中性緩衝ホルマリン溶液中で 1 日以上室温^{注4)}で固定する（写真5）と、ナイフで切ったときにも崩れにくくなります（写真6）。ある程度の厚さをもたせて切断しないと、ゲルだけが飛び出してしまうおそれがあります。

注4) マトリゲル基底膜マトリックスを低温（8℃以下）で固定しますと、脱重合する可能性がありますので、室温で固定してください。

5. 固定した組織の切片をパラフィンなどに包埋し、組織染色のための薄切片を作製します。HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色を行った例を写真7に示します。マトリゲル基底膜マトリックスはこの染色方法により薄い赤色になります。



写真1：
皮下注射部位



写真2：
Corning マトリゲル基底膜マトリックス注入部位（矢印）、標本として切除する部位（四角）



写真3：
注入したCorning マトリゲル基底膜マトリックスを腹膜側からみた図（針先）



写真4：
皮下組織から剥がして取り出したCorning マトリゲル基底膜マトリックス



写真5：
固定した組織（表面は皮膚側）

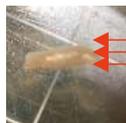


写真6：
切断面（上：皮膚、中：Corning マトリゲル基底膜マトリックス、透明に見える部分、下：腹膜と筋層）

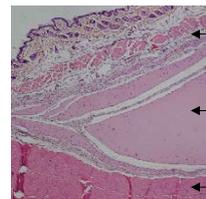


写真7: HE染色像

資料協力：
奈良県立医科大学 消化器・総合外科
大橋一夫先生
横山貴司先生

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスを用いた MDCK 細胞の 3次元培養と蛍光免疫染色法

大阪大学大学院 医学系研究科 分子病態生化学教室
松本 真司、藤原 誠、岡本 健吾、菊池 章

Corning マトリゲル基底膜マトリックスは細胞外基質 (ECM) タンパク質を豊富に含んでおり、室温で重合して細胞基底膜と似た生物活性のあるマトリックスとなることから、細胞の3次元培養が可能となる。マトリゲル基底膜マトリックスは基底膜の3次元モデルとして多様な細胞、特に上皮、内皮、筋、および神経細胞において細胞の成長や発達、および分化を特徴づける生理的な環境を提供し得る。イヌ腎臓から樹立された Madrin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞は極性が発達した形態を示す典型的な上皮細胞として細胞接着や極性の解析に繁用されている。特に、細胞外マトリックス内で3次元培養することで内腔を有する球状の Cyst と呼ばれる特徴的な構造を形成することが知られている。今回はマトリゲル基底膜マトリックスを用いた MDCK 細胞の3次元培養法と、形成された Cyst の蛍光免疫染色法を紹介する。

準備

細胞株

MDCK 細胞 (strain II)

試薬・機器

Corning マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR) (カタログ番号: 356230) (Corning Incorporated, USA)、仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、トリプシン (GIBCO, USA)、パラフォルムアルデヒド (TAAB, UK)、ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, USA)、抗βカテニン抗体 (カタログ番号: 610154) (BD, USA)、Alexa Fluor 標識抗マウス IgG 抗体、ファロイジン (Molecular probes, USA)、Propidium iodide 溶液 (同仁化学, 熊本)、76 × 26 mm スライドガラス、18 mm 四方カバーガラス (MATSUNAMI, 大阪)、ビニールテープ 0.2 mm 厚 (NICHIBAN, 東京)

培養器具

Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ (カタログ番号: 353003)、Falcon 24 ウェルマルチウェルプレート (カタログ番号: 353047) (Corning Incorporated, USA)、15 mm 丸カバーガラス (MATSUNAMI, 大阪)

実験装置

倒立顕微鏡 Axiovert 200M、共焦点顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Germany)

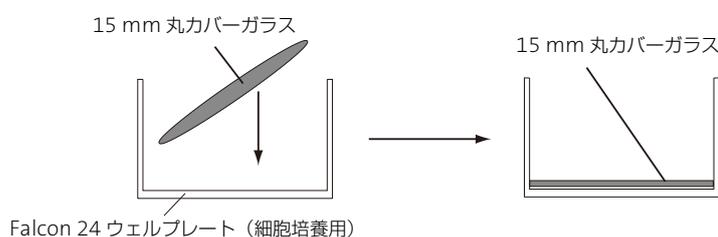
方法

細胞の準備

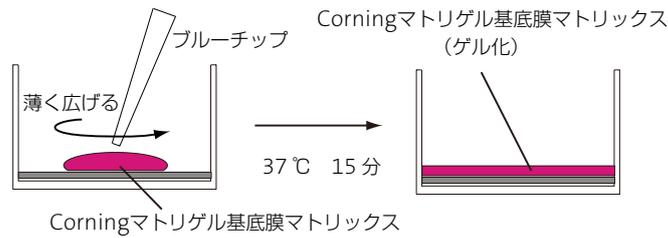
MDCK 細胞 (strain II) を 100 mm カルチャーディッシュを用いて 10% FBS 含有 DMEM で培養する。コンフルエントになるまで増殖させた後、細胞を 3 mM EDTA 含有 PBS にて 15 分間処理する。細胞間接着が分離していることを確認後、0.02% EDTA 含有 0.25% トリプシンで細胞をカルチャーディッシュ上から剥離させ、 5×10^4 個 / mL に細胞数を調整する。

マトリゲル基底膜マトリックス内培養

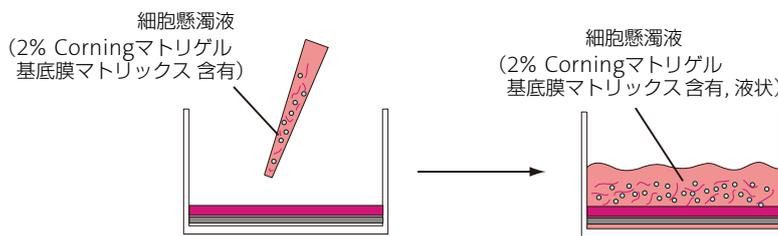
① 24 ウェルマルチプレートのウェル内に火炎滅菌した 15 mm 丸カバーガラス 1 枚を入れる。プレートは使用するまで 4 °C で冷却しておく。



- ② 50 μL の Corning マトリゲル基底膜マトリックスをカバーガラス上に置き、ブルーチップで手早く底面全体へ広げる。
- ③ プレート を 37 $^{\circ}\text{C}$ にて 15 分間静置し、マトリゲル基底膜マトリックスを重合させる。



- ④ 10% FBS 添加 DMEM 細胞懸濁液 1 mL (5×10^4 個細胞を含む) に 20 μL の Corning マトリゲル基底膜マトリックスを加えて十分に攪拌後 (最終濃度 2% Corning マトリゲル基底膜マトリックス)、全量をウェル内へ入れる。



- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 日間培養する (培養時間は適宜延長、短縮可能)。

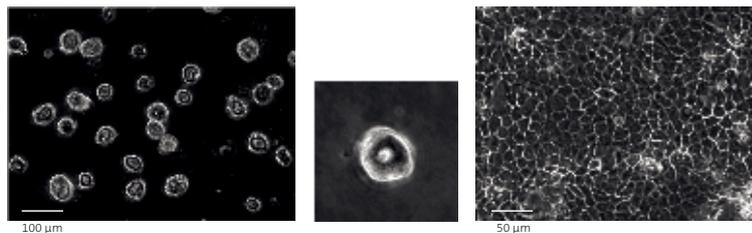


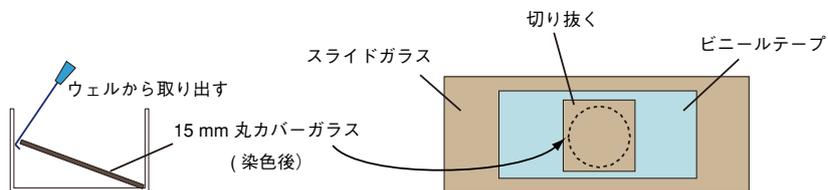
写真 1 : MDCK 細胞を Corning マトリゲル基底膜マトリックス内で 3 日間培養して形成された Cyst とディッシュ上で単層培養した際の光学顕微鏡像

蛍光免疫染色

核染色および頂端部マーカーとしてアクチン、側底部マーカーとして β カテニンを染色する。

- ① 試薬の調整 :
 - ・ 4% パラフォルムアルデヒド含有 PBS (pH 7.4)
 - ・ 浸透化・ブロッキング溶液 (4% BSA, 0.5% Triton-X100, 0.04% NaN_3 含有 PBS)
- ② 固定 : PBS 1 mL にて緩やかに洗浄後、4% パラフォルムアルデヒド含有 PBS (pH 7.4) で 30 分間、室温で固定する。
- ③ 浸透化、ブロッキング : 固定後、PBS にて洗浄し、浸透化・ブロッキング溶液を 1 mL 加えて、30 分間、室温で静置。
- ④ 一次抗体反応 : 浸透化・ブロッキング溶液に 100 倍希釈した抗 β カテニン抗体 250 μL を加えて、室温で 3 時間静置。

- ⑤ 洗浄：浸透化・ブロッキング溶液にて洗浄する。
- ⑥ 二次抗体反応：浸透化・ブロッキング溶液に 250 倍希釈した Alexa Fluor 標識抗マウス IgG 抗体およびファロイジン 250 μL を加えて、室温で 2 時間静置。
- ⑦ 洗浄：浸透化・ブロッキング溶液、次いで PBS にて洗浄する。



- ⑧ 標本作製：スライドガラスにビニールテープを 1 枚はり、15 mm 四方をカッターで切り抜く。プレートから染色後の丸カバーガラスを取り出し（先端を曲げた 30G 注射針とピンセットなど用いるとよい）、切り抜いた窪みに置く。50% グリセロール含有 PBS にて 500 倍希釈した PI 溶液 40 μL 滴下する。18 mm 四方カバーガラスを上からかぶせて封入する。余分な封入剤を拭き取り、周囲をマニキュア等で固めて完成。
- ⑨ 共焦点顕微鏡にて標本を観察。

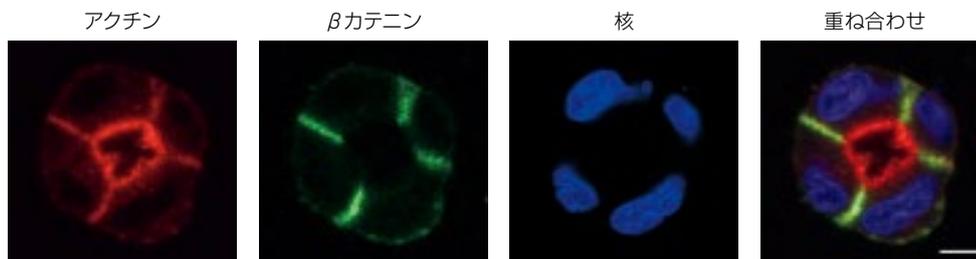


写真 2：Cyst の蛍光免疫染色像 スケールバー：5 μm

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスを用いた *in vivo* / *ex vivo* 血管新生定量法

東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学分野
末弘 淳一、南 敬

イントロダクション

血管新生 (angiogenesis) は腫瘍進展や糖尿病網膜症といった生活習慣病と深く関わっており、抗血管新生療法がそれらに対する効果的な治療法として近年広く選択されるようになってきた。血管新生を引き起こす機序は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) をはじめとして多くのシグナル経路が同定されているが未だ不明な点も多く、マウスなど動物モデルを用いた血管新生定量アッセイを通して詳細に解析していくことが求められている。今回はマウスやラットなど小動物を対象とした血管新生定量法として知られている Matrigel plug アッセイ、Aortic ring アッセイを Corning マトリゲル基底膜マトリックスを用いて行う方法を紹介する。

1. Matrigel plug アッセイ

準備

マウス

C57BL/6J マウス (6 週齢から 10 週齢くらいの若いマウス)

試薬・器具

Corning マトリゲル基底膜マトリックスグロースファクターリデュースト (GFR) (カタログ番号: 356230) (Corning Incorporated, USA)、Avertin (2, 2, 2 tribromoethanol, 2-methyl-2butanol)、1 mL シリンジ (TERUMO, Japan)、26G / 27G ニードル (TERUMO, Japan)、O.C.T Compound TissueTek (Sakura FineTek, USA)、パラホルムアルデヒド (WAKO, Japan)、スクロース (WAKO, Japan)、PBS (Sigma Aldrich, USA)、ヘマトキシリン溶液 (WAKO, Japan)、エオジン溶液 (WAKO, Japan)、ホルムアミド (WAKO, Japan)、1.5 mL マイクロチューブ、エバンスブルー (Sigma Aldrich, USA)、Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ (カタログ番号: 353003) (Corning Incorporated, USA)、Falcon® セルカルチャー 6 ウェル マルチウェルプレート (カタログ番号: 353046) (Corning Incorporated, USA)、マイJECTA 注射針付シリンジ (TERUMO, Japan)、動物用バリカン、anti-mouse CD34 (PECAM1) 抗体 (カタログ番号: 550274) (BD Biosciences, USA)、Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) (カタログ番号: A-11006) (Molecular Probe, USA)

実験装置

DM LS 正立顕微鏡 (Leica, Germany)、CM3050S クライオスタット (Leica, Germany)、Ultrospec 2000 分光光度計 (Pharmacia Biotech, USA)

方法と結果

Matrigel plug アッセイのフローチャートを示す (Fig.1)。今回は、摘出した Corning マトリゲル基底膜マトリックスで凍結切片を作成してヘマトキシリンエオジン染色、または内皮マーカである CD31 (PECAM-1) 特異的抗体を用いた免疫組織化学により観察する方法、及びマウスにエバンスブルーを静注し、吸光度計により血管密度を定量する方法を以下で紹介する。

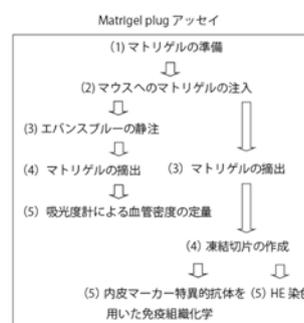


Fig.1 Matrigel plug アッセイのフローチャート

Corning マトリゲル基底膜マトリックスの準備

Corning マトリゲル基底膜マトリックスは使用前日から 4 °C にし解凍しておく。当日は 1.5 mL チューブに 500 µL のマトリゲルを分注し、氷上に置いたままマウス室へ持ち込む。

マウスへの Corning マトリゲル基底膜マトリックスの注入

C57BL/6J マウスに Avertin を用いて麻酔をかけてマトリゲルを注入するわき腹 (もしくは足の付け根) の毛を動物用バリカンで剃る。27 G ニードルを用いてマトリゲル 500 µL を皮下に注入する (Fig.2 A)。この際、すぐにニードルを抜くと固まる前に Corning マトリゲル基底膜マトリックスが出てくる場合があるので、注入後落ち着くまでしばらくニードルはそのまましておく。

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスの抽出

Corning マトリゲル基底膜マトリックスを埋め込んで 10 日後、マウスに Avertin で麻酔をかけて Corning マトリゲル基底膜マトリックスを抽出する。周囲組織をまとめて抽出すると、凍結切片を作成する際にカットしやすくなる (Fig.2B)。Corning マトリゲル基底膜マトリックスを抽出する前にエバンスブルーを静注しておく、Corning マトリゲル基底膜マトリックス内に漏出してくるエバンスブルーの量により血管密度を定量することができる。

凍結切片の作成

4% パラホルムアルデヒド溶液に浸して室温で 4 時間固定し、20% スクロース溶液に浸して室温で 18 時間放置した後 (Fig.2C、D)、OCT compound TissueTek に包埋する (Fig.2E)。以上の作業は、低温で行うと Corning マトリゲル基底膜マトリックスが溶けてしまうので室温で行う。凍結はメタノールをドライアイスで冷やしたものをを用い (Fig.2F)、凍結後 -80℃ で保存する。

切片を作成する 1 時間ほど前に -80℃ 冷凍庫からクライオスタット内 (Object Temperature: -20℃、Chamber Temperature: -12℃) に入れておく。その後、クライオスタットにサンプルを設置し、厚さ 14 μm で凍結切片を作成し、スライドガラスに貼りつける。マトリゲルはやわらかく切片が作りづらいのでサンプルと刃の温度管理をしっかり行うことに注意する。スライドガラス上のサンプルは -80℃ で保存可能である。

この後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い血管の様子を正立顕微鏡で観察する (Fig.2G)。ヘマトキシリンエオジン染色を行わず内皮細胞のマーカーを用いた免疫組織化学を行うことで蛍光顕微鏡を用いた画像解析で定量を行うことも可能である。

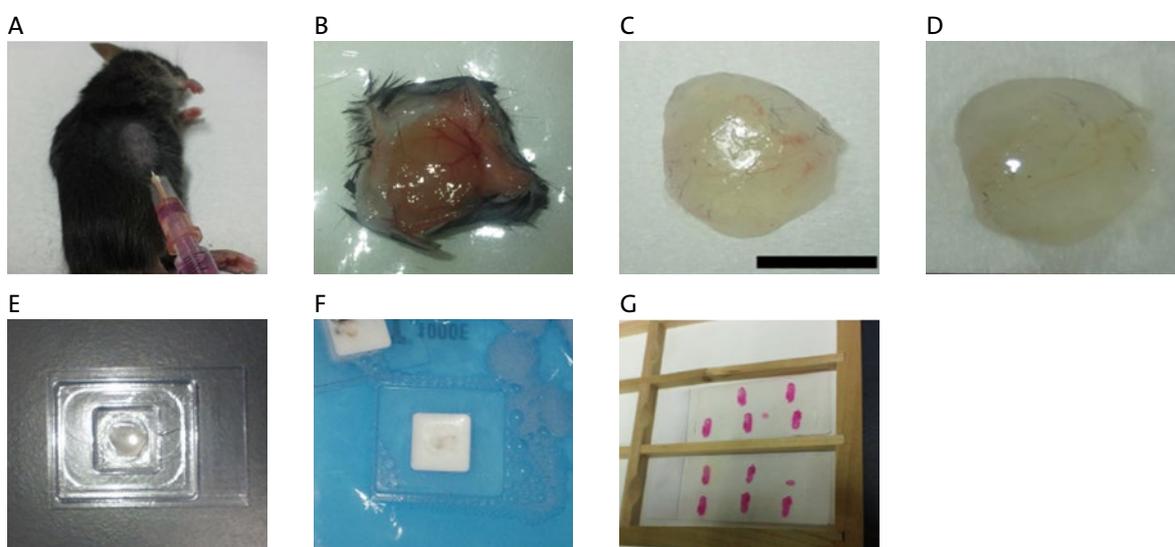


Fig.2 A. マトリゲル基底膜マトリックスをマウスのわき腹に注入する様子、B. 周囲組織とともにマトリゲル基底膜マトリックスを抽出したもの、C. 抽出直後のマトリゲル基底膜マトリックス。1 目盛り 0.5 cm、D. ホルマリン固定後に 20% スクロースで置き換えたマトリゲル基底膜マトリックス、E. O.C.T. compound に包埋したもの、F. ドライアイスで冷やしたメタノールを用いた凍結、G. HE 染色後の切片。サイズを示す bar はいずれも 0.5 cm

ヘマトキシリンエオジン染色による血管観察 (Fig.3A)

スライドガラス上のサンプルを室温に戻し、4% パラホルムアルデヒド溶液で室温、10 分間再度固定を行う。PBS で洗浄した後に以下の方法で、ヘマトキシリン溶液とエオジン溶液で染色を行う。ヘマトキシリンエオジン染色による新生血管の観察像を示す (Fig.3A)

- ① PBS で 1 分洗浄。
- ② ヘマトキシリン溶液に 10 ~ 30 秒浸す。
- ③ 青色がきれいに表れてくるまで流水で洗う。
- ④ エオジン溶液に 30 ~ 60 秒浸す。
- ⑤ 70% エタノールに 1 分浸す。
- ⑥ 80% エタノールに 1 分浸す。
- ⑦ 90% エタノールに 1 分浸す。
- ⑧ 95% エタノールに 1 分浸す。
- ⑨ 100% エタノールに 1 分浸す。
- ⑩ キシレンに 3 分 × 3 回浸す。
- ⑪ マリノール液を用いて、カバーガラスで封入する。
- ⑫ 乾燥した後、正立顕微鏡で観察する。

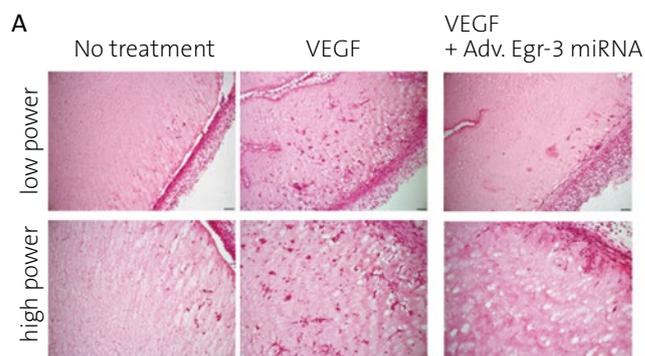


Fig.3A. 内皮活性化に関わる転写因子を miRNA 発現アデノウイルスで抑制した際の新生血管の観察

内皮細胞マーカーを用いた免疫組織化学による血管新生の定量 (Fig.3B)

スライドガラス上のサンプルを室温に戻し、4% パラホルムアルデヒドで室温、10 分間再度固定を行う。PBS で洗浄した後に以下の方法で内皮細胞マーカーである PECAM1 (CD31) の特異的抗体を用いて免疫組織化学により血管新生を定量する (Fig.3B)。

- ① PBS で 3 分×3 回洗浄する。
- ② 1%BSA を含む PBS を適量たらし室温で 60 分間静置し、ブロッッキングを行う。以下の作業では、スライドガラスに液を加えた後はパラフィルムを乗せて乾燥を防ぐようにする。
- ③ 1%BSA を含む PBS に anti-mouse CD34 (PECAM1) 抗体を 100 ~ 200 倍希釈して、スライドガラス上に載せ、室温で 45 ~ 60 分間静置する。
- ④ キムタオルなどを用いて液を吸い取ってから PBS で室温、10 分間×3 回洗浄する。
- ⑤ 1%BSA を含む PBS に Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) を 100 ~ 500 倍希釈してガラス上に載せ、室温で 45 ~ 60 分間静置する。
- ⑥ キムタオルなどを用いて液を吸い取ってから PBS で室温、10 分間×3 回洗浄する。
- ⑦ PBS を入れ、シェイカーで室温、10 分間洗浄する (計 3 回行う)。
- ⑧ マウント液を垂らし、空気が入らないようにカバーガラスを載せる。
- ⑨ スライドガラスをマッペに載せて、暗所 4℃で 1 日間乾燥させる。

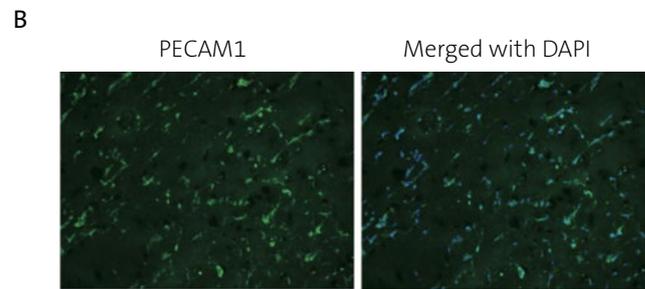


Fig.3B. C57BL/6J マウスで Matrigel plug assay (VEGF 有)

エバンスブルーによる血管新生の定量 (Fig.3C)

10 日間 Corning® マトリゲル基底膜マトリックスを埋め込んだマウスに対し、PBS で 1% エバンスブルーを溶解し、マイJECTA 注射針付シリンジを用いて眼底静脈、もしくは尾静脈から 100 μ L 注入する。その後、2 mM EDTA を含む PBS で心臓から灌流し血液が洗い流されたのを確認し Corning マトリゲル基底膜マトリックスを抽出する。Corning マトリゲル基底膜マトリックスの重さを量り、1.5 mL チューブにいれたホルムアミド 500 μ L へ Corning マトリゲル基底膜マトリックスを浸漬して 37℃、48 時間静置する。ホルムアミド中に Corning マトリゲル基底膜マトリックス内のエバンスブルーが溶出されたのを確認し、620 nm 吸光度にて溶出された Corning マトリゲル基底膜マトリックス単位重量あたりのエバンスブルー (血管密度に相当) を定量する。測定するホルムアミドは吸光度計のキュベットの容量に合わせて一部を使用すればよい。VEGF 有無による新生血管の定量結果を示す。(Fig.3C)

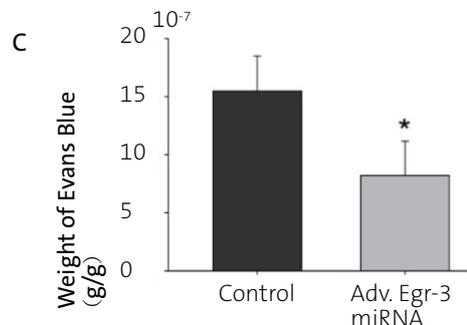


Fig.3C. エバンスブルーによる定量結果 詳細は文献を参照

2. Aortic ring アッセイ

準備

マウス

C57BL/6J マウス (6 週齢から 10 週齢くらいの若いマウス)

試薬・器具

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスグロースファクターリデュースト (GFR) (Cat# 356230) (Corning Incorporated, USA)、Avertin (2, 2, 2 tribromoethanol, 2-methyl-2butanol)、解剖用ナイフ、ハサミ、各種ピンセット、1 mL シリンジ (TERUMO, Japan)、26G / 27G ニードル (TERUMO, Japan)、PBS (Sigma Aldrich, USA)、アガロース Type VII (cat.# A9045, Sigma Aldrich, USA)、MCDB131 (Sigma Aldrich, USA)、Glutamine (Sigma Aldrich, USA)、penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich, USA)、FBS (GIBCO, USA)、17 mm · 10 mm 径の金属型

実験装置

MZ 125 実体顕微鏡 (Leica, Germany)、DM LS 正立顕微鏡 (Leica, Germany)、画像解析ソフトウェア (Photoshop, Image J)、血管新生定量ソフトウェア (KURABO, Japan)

方法と結果

Aortic ring アッセイのフローチャートを示す (Fig.4A)。ドーナツ状のアガロースカルチャーウェルを作成して中心の穴に Corning マトリゲル基底膜マトリックスを流し込み、摘出したマウス大動脈を入れて培養を行う。位相差顕微鏡で観察し、画像解析により新生血管を定量する。

アガロース カルチャーウェルの作成

超純水にて 1.5% (w/v) Type IV アガロースを調製しオートクレーブ滅菌する。10 cm ディッシュに流し込み、冷蔵庫で 30 分間静置し固まったのを確認し、オートクレーブ滅菌した金属型を用いて外径 17 mm、内径 10 mm ドーナツ状にアガロースを型抜きする (Fig.4B)。

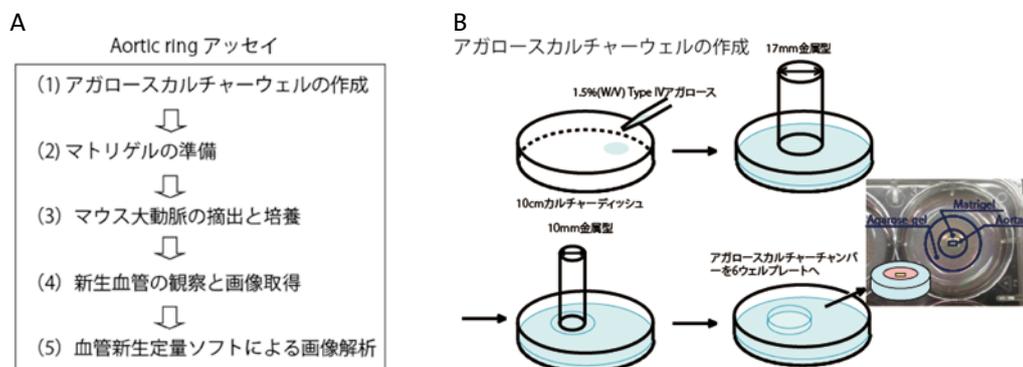


Fig.4A. Aortic ring アッセイのフローチャート、B. アガロースカルチャーウェル作成の模式図

Corning® マトリゲル基底膜マトリックスの準備

Corning マトリゲル基底膜マトリックスは使用前日から4℃にし解凍しておく。アガロースカルチャーウェルを6ウェルプレートに置き、リング内にマトリゲルを500 μL 注入する。37℃で30分以上静置し、Corning マトリゲル基底膜マトリックスが重合するのを待つ。Corning マトリゲル基底膜マトリックスはマウス大動脈摘出後も使用するため、氷上においておく。

マウス大動脈の摘出と培養

Avertin 麻酔下のマウスからマウス大動脈を摘出し、冷 PBS に浸し実体顕微鏡下で脂肪組織などを剥離する。マウス大動脈のみの状態にした後、解剖用ナイフを用いて1 mm 間隔にセクションする。先ほど用意したアガロースゲル内の Corning マトリゲル基底膜マトリックス上にセクションしたマウス大動脈を置き、Corning マトリゲル基底膜マトリックスを重ねる。37℃で Corning マトリゲル基底膜マトリックスを重ねさせ、アガロースリング外に MCDB131 培養液 (0.5%FBS 含、血管新生因子有無) を流し込み10日程度培養する。アガロースゲルリングの外に培養液があることでアガロースゲルリング内に血管誘引因子の濃度勾配ができ、その結果マウス大動脈から周辺に向けて新生血管が伸びてくる。数日たつと、新生血管が伸びてくる様子が観察できるので、位相差顕微鏡とカメラで様子を経時的に観察する。

新生血管の定量解析

位相差顕微鏡で取得した画像を Photoshop によりコントラストを調節し、新生血管が見えるように加工する。定量性を損なわせないため、すべての画像を同じ条件で処理することに注意する。処理後の画像を血管新生定量ソフトウェアにより解析し、新生血管の長さ・分岐数を定量する (Fig.5)。

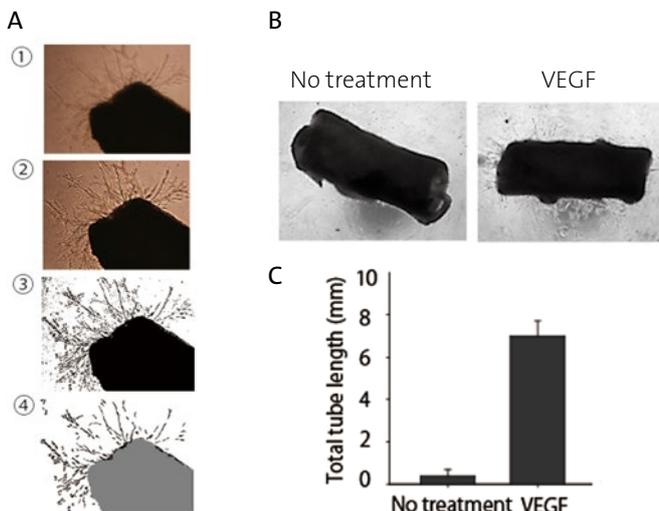


Fig.5A. Aortic ring アッセイにおける画像解析の例、

- ①位相差像、
 - ②新生血管のアンシャープマスクによる強調、
 - ③画像の2階調化、
 - ④血管新生解析ソフトによる新生血管の抽出
- B. 新生血管の様子
C. 定量結果

参考文献

Suehiro J, et. al. Blood, 2010; 115 (12) : 2520-2532

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。本プロトコールでは、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)、iPCell (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 プラント針（ニプロ）、100 mm ペトリディッシュ、35 mm ペトリディッシュ、100 μ m セルストレーナー (Corning 352360)、0.22 μ m 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 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）、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）

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°C で保存するか、分注して -20°C 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°C で保存する。

SB435142

DMSO で 10 mM に調製し、分注して -20°C 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°C 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°C 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°C 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、プラント針を取り付ける。腸管の一端にプ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、腸管の另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

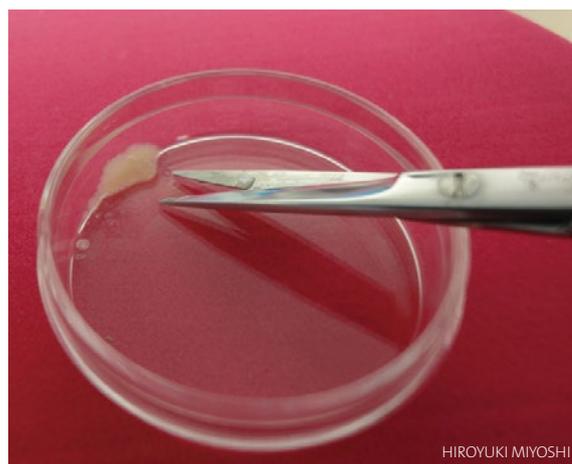


写真 2 写真 1 のポリープ 1 個を細切した

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)。

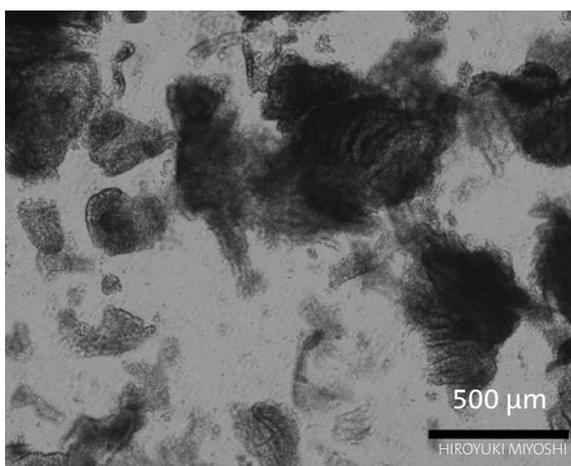


写真 3 コラゲナーゼ溶液を加えた直後の組織片

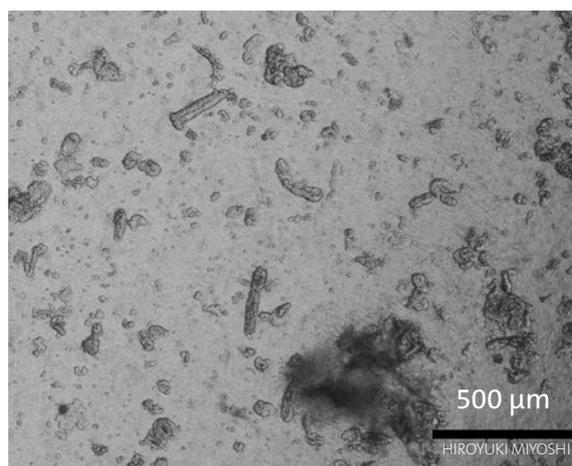


写真 4 15 分ごとに 2 回ピペッティングを行った後の組織片。上皮細胞の塊が多数分離している

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 μ L の洗浄培地に懸濁する。この時点で一部(10 μ L 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

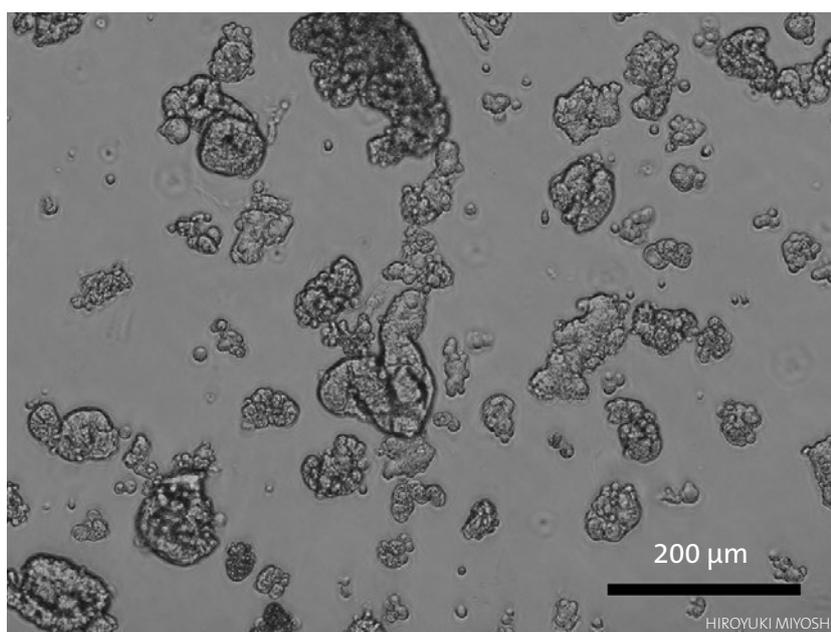


写真7 写真6のペレットを洗浄培地に再懸濁したもの

注2) 参考文献では 70 μ m 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 μ m 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プ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。アルミプレートに氷上に置き、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。

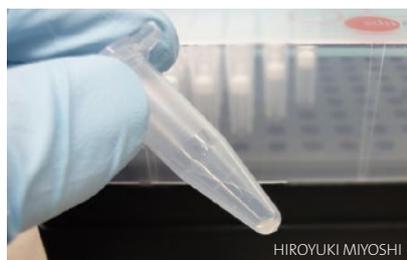


写真 8 マトリゲルに懸濁する直前の上皮細胞ペレット



写真 9 マトリゲル培養のセットアップ (1)

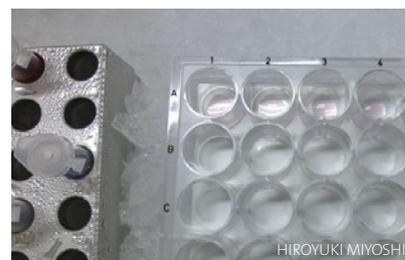


写真 10 マトリゲル培養のセットアップ (2)

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)。プレート逆にする事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 プレートを逆にしてマトリゲルをゲル化させる

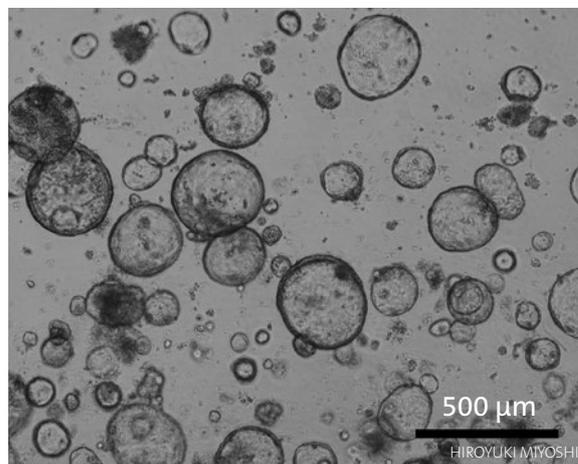


写真 12 培養開始後 2 日目のスフェロイド

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ティングし、37°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。

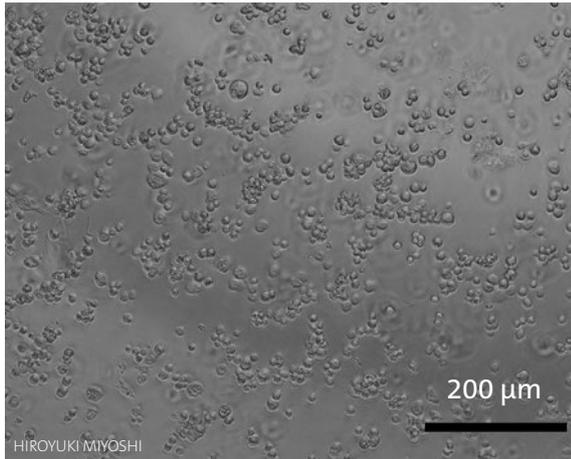


写真13 トリプシン処理後のスフェロイド細胞

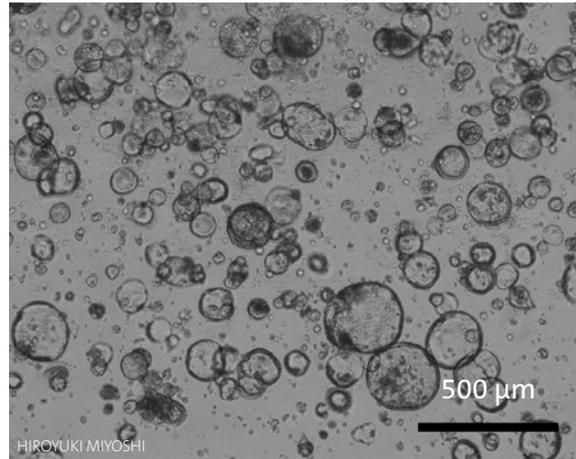


写真14 写真13の細胞から形成された培養開始後3日目のスフェロイド

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ウェルあたり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°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が氷上に置き、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ッティングして1.5 mL 遠心チューブに回収する。組織標本作製する場合は、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、この時点でピペッ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に入れて直ちにピペッティングする。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秒以内にピペッ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）。

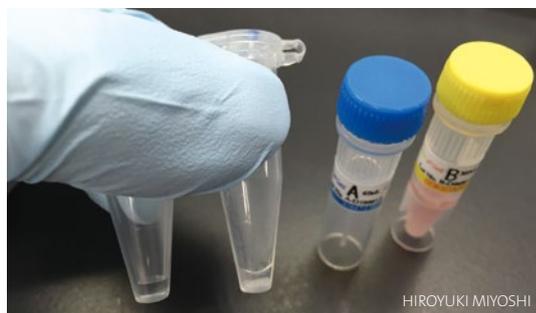


写真16 25 μ L の液体が入ったチューブ（左端）と並べて液量を調整する



写真17 ゲル化した iPGell

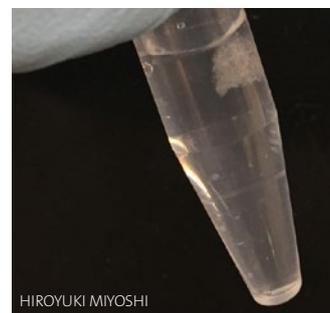


写真18 固定液中の iPGell

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）。凍結標本作製する場合はシュークロース置換を行う。

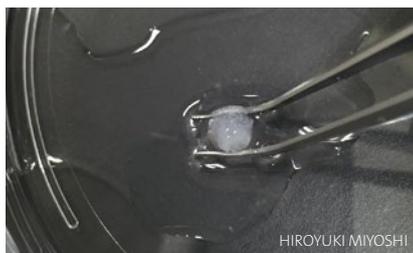


写真 19 固定後、ゲルを包埋カセットに移す



写真 20 ゲルをパラフィンに包埋する

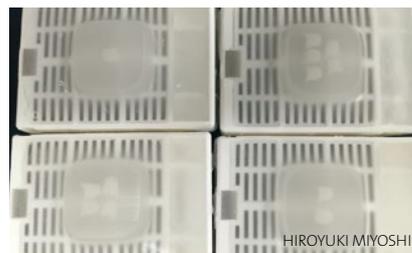


写真 21 一つのパックに複数のゲルを並べることもできる

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。

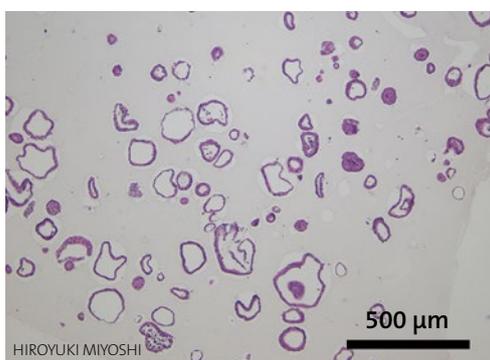


写真 22 *Apc^{Mn}* マウス小腸腫瘍スフェロイドの H&E 染色像（弱拡大）。iPCell の成分が薄く染色されるが、観察には支障がない



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) のコンディション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.

- ・ 価格は 2025 年 4 月現在のものです。価格は税抜き価格で記載しております。
- ・ 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 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

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
www.corning.com/jp/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

© 2025 Corning Incorporated
CLS-047-07
R0-2504-B