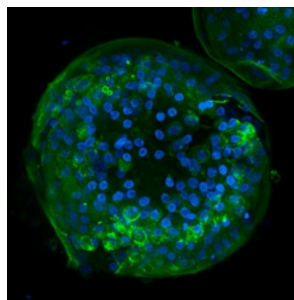


Corning® マトリゲル基底膜マトリックスとオルガノイド

研究者のための使用法ガイド



CORNING

はじめに

オルガノイドが長年にわたって人気を博してきた理由はよくわかります。この3D細胞培養の構造体は、自己組織化することで「ミニ臓器」となり、それぞれの臓器固有の機能を再現することができるのです。脳、乳房、結腸、肝臓、膵臓、胃、食道、小腸、卵巣、子宮、卵管、前立腺、網膜などの臓器オルガノイドが存在します。

ただし、オルガノイドは、従来の2D培養や3Dスフェロイドと比較して、より複雑なものとなっています。幸い、最も広く使用され、引用されている細胞外基質 (ECM) である **Corning マトリゲル基底膜マトリックス** のような製品が、より効率的な培養、保存、取扱いのワークフローに役立ちます。

このガイドでは、オルガノイド培養において考慮すべきベストプラクティス、および Corning マトリゲル基底膜マトリックスやその他の製品を使用して研究をサポートする方法について詳しく説明します。



オルガノイドの5つのアプリケーション¹

オルガノイドは、以下の5つのカテゴリーをはじめ、ライフサイエンス全般にわたって多くのアプリケーションで利用されます。

1. がんモデル

がん性腫瘍は、体内の遺伝子変異から発生します。オルガノイドは、この疾患の病態生理を研究する上で重要なものとなっており、*in vitro* 環境における変異シグネチャーへの理解を深めることができます。研究者は、乳がん、結腸がん、膵臓がん、前立腺がん、膀胱がん、肝臓がんなどをモデル化するためにオルガノイドを使用しています。この中には世界で最も致命的な悪性腫瘍も多く含まれます。

2. 創薬

オルガノイドを使用することで、ハイスループット環境で *in vivo* モデルにより近づけることができるため、創薬のスピードと質において明らかに優位に立つことができます。この3D構造体を用いて、研究者は何百万もの化合物をヒト疾患モデルに対してスクリーニングし、効果が期待できる薬剤を特定することができます。

3. CRISPR

一部の研究室で、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ゲノム編集とオルガノイドの組み合わせに利点があることが確認されています。この組み合わせは、遺伝子スクリーニングや薬物スクリーニングモデルの改善、器官形成の高度な研究をサポートできる可能性があります。

4. 個別化医療

オルガノイドは、患者自身の細胞や3D微小環境をディッシュの中で再現し、*in vivo* 環境のよりよい模倣を可能にするものです。この *in vitro* 構造を用いて、分子的小およびゲノム薬理的に患者個人に合った治療法をより正確に特定することができます。オルガノイドは、疾患モデリング、薬物反応、投与量の最適化といったプレジジョンメディシンへの応用に加え、再生医療にも利用することができます。

5. バイオプリンティング

バイオプリンティングは、**Corning Matribot® バイオプリンター**などのバイオプリンターを用いて、細胞、スフェロイド、オルガノイドなどで3D構造体を作製する方法です。これらの生物学的材料はバイオインクに懸濁後、バイオプリンターに充填され、一層ずつ「プリント」されます。この手法により、組織の機能性に影響を与える細胞間の関係をより簡単に研究することができます。

包括的なスキャフォールドマトリックスを用いたオルガノイドの開発^{2,3}

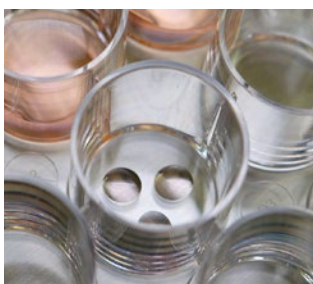
幹細胞や組織からオルガノイドを作製するには、生物学的または合成スキャフォールドが必要です。現在最も広く使用されているスキャフォールドは ECM で、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫細胞から抽出した Corning® マトリゲル基底膜マトリックスなどがあります。

これらの高タンパク質溶液は、物理的な足場材料となり、ホルモンや増殖因子を豊富に含む微小環境を提供します。研究者それぞれの独自のプロトコールと適した ECM を使用することで、オルガノイドの培養が可能になります。

オルガノイドの培養方法^{4,5,6,7}

培養方法は、オルガノイドの種類によって異なります。幹細胞由来オルガノイドは、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞から作製し、組織オルガノイドは通常、酵素分解された臓器の断片をマトリゲル基底膜マトリックスやコラーゲン I の中で作製します。試薬や容器は臓器によって異なります。

重要なことは、ECM、増殖因子、培地、シグナル伝達分子の使用など、多くの要因が培養方法とともにオルガノイド形成の有効性に影響を及ぼすということです。通常、患者由来のオルガノイドは培養に約 1 ~ 2 週間かかり、iPS 細胞から分化させたオルガノイドは培養に 20 日以上かかる場合があります。



ドーム法による培養

この方法では、細胞をマトリゲル基底膜マトリックスなどの ECM 内に懸濁させ、ドームを形成させます。これにより、細胞がマトリゲル基底膜マトリックスに均等に接触し、構造体内でオルガノイドに自己組織化することができます。この方法は、組織からの成体幹細胞由来オルガノイドによく使用されます。

バイオリクター培養

この方法は、従来から iPS 細胞由来のオルガノイドに用いられています。オルガノイドをマトリゲル基底膜マトリックス液滴に包埋し、分化誘導培地と合わせて **スピナーフラスコ** またはバイオリクターに入れます。この方法は、**脳**オルガノイドで使用されており、栄養吸収に優れ、ハイスループットな作製が可能であるという利点があります。

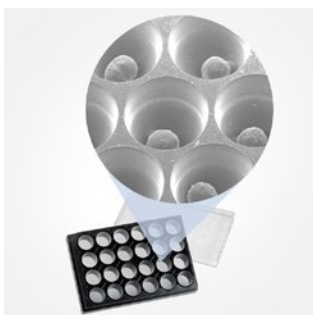


パーミアブルサポート培養

この方法では、細胞分化に最適な構造と条件を提供するために、**Transwell® (トランズウェル) や Falcon® パーミアブルサポート** のような容器が必要です。これらのインサートは、3D 培養や組織モデリングに最適な構造と条件を可能にするウェルで構成されています。パーミアブルサポートを使用した培養のアプリケーションの 1 つに、**皮膚**オルガノイドがあります。このプロセスを気液界面処理と組み合わせることで、数週間でヒトのケラチノサイトから組織を作製することができます。

低接着表面マイクロプレート培養

マイクロプレートの超低接着 (ULA) 表面は、細胞の接着を防ぐことで、3D 構造を形成します。形成された 3D 構造体は ECM に包埋することができます。この低接着メカニズムは、**Corning スフェロイドプレート および Corning Elplasia® マイクロプレート** の独自のラウンドボトム形状と相まって、マイクロプレートのウェルまたはキャビティあたり 1 つのオルガノイドの培養をより簡単なものにします。このようなプロトコールは、**腸**オルガノイドの作製に使用されています。



オルガノイドの凍結方法⁸

オルガノイドを長期間保存するためには、正しく凍結することが重要です。オルガノイドを凍結する前に、リカバリーが成功するようにサイズを最適化する必要があります。通常、このプロセスは、従来の単一細胞の凍結と非常によく似ています。これを行うには、Nature Protocolsに掲載されているこちらのプロトコルを参考にしてください。

1. 凍結用容器を 4°C に冷却します。**クライオバイアルチューブ** 1 本につき、少なくとも 1 つ (24 ウェルプレートの場合) または 2 つ (48 ウェルプレートの場合) のコンフルエントなウェルを確保します。
2. 1,000 μL ピペットと 500 μL ~ 1,000 μL の基礎培地を用いてピペティングをし、オルガノイドが含まれる基底膜マトリックスのドームを壊します。オルガノイド懸濁液を 15 mL 遠沈管に移し、冷却した基礎培地を上から加え、再懸濁を繰り返して基底膜マトリックスを除去します。
3. 8°C、100 $\times g$ ~ 200 $\times g$ で 5 分間遠心します。上清約 2 mL を残して吸引します。オルガノイドが崩壊して単一細胞にならないように注意してください。
4. チューブの上から冷却した培地をさらに加えて再懸濁します。8°C、200 $\times g$ ~ 250 $\times g$ で 5 分間遠心します。
5. 上清をすべて吸引します。
6. (使用プレートに応じて) 1 ウェルまたは 2 ウェルあたり 500 μL の凍結保存用培地で丁寧に再懸濁します。
7. 500 μL の懸濁液をクライオバイアルに移します。凍結用容器にセットし、すぐに -80°C の環境に移します。最低 24 時間フリーザーに置いてから、液体窒素 (-196°C) に移し、オルガノイドを長期冷凍保存します。



注意：凍結保存用培地に含まれる凍結保護剤の DMSO は、室温下で細胞に毒性を持ちます。このため、凍結保存用培地は冷却し、操作時間（培地を細胞に添加してからフリーザーに移す時間）を 5 分以内にする必要があります。



オルガノイドのカウントおよび測定方法

オルガノイドの増殖の進行を評価するために、オルガノイドのカウントおよび測定を行う必要があります。オルガノイドのサイズと数は、その培養物の有用性に影響し、オルガノイドは通常、*in vitro* で一定のサイズにしかならないため、このプロセスを正しく行うことが重要です。

オルガノイドのカウント

培養物は、顕微鏡を用いてプレート上で、手動でカウントすることができます。正確なカウントを行うには、対象とするオルガノイド構造を熟知し、単細胞や大きな多層組織片と区別する必要があります。カウント装置のひとつである **Corning® セルカウンター** は、3D 培養の複雑な形状やサイズをカウントできるソフトウェアを備え、より迅速なワークフローのための自動化をサポートします。

オルガノイドの測定^{9,10}

オルガノイドは形状が不規則なため、顕微鏡を使った手作業による測定は容易ではありません。ソフトウェアは、ハイスループットにおけるオルガノイドのサイズや面積の評価に役立ちます。

培養後：オルガノイドの回収、固定、イメージング、トランスフェクション

オルガノイドの回収方法¹¹

試薬を用いて ECM から細胞を回収することは、必ずしも必要なステップではありませんが、特定のアプリケーションには有用であることが示されています。Corning® マトリゲル基底膜マトリックスからオルガノイドを回収するために推奨される製品は、**Corning セルリカバリーソリューション**です。トリプシン、コラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素のような酵素系試薬とは異なり、この溶液は非酵素系であるため、オルガノイドを分解することがありません。使い方は以下のとおりです。

1. 細胞を乱すことなく、培養物からできるだけ多くの培地を除去します。
2. 予め冷やしておいた Corning セルリカバリーソリューションを、マトリゲル基底膜マトリックスの 2 倍以上の量、添加します。
3. ワイドボアチップを用いて上下に静かにピペティングし、オルガノイドを傷つけないようにマトリゲル基底膜マトリックスを慎重に破砕します。
4. セルリカバリーソリューションとともに、4°C で約 20 分間インキュベートします。
5. 顕微鏡で細胞を観察し、マトリゲル基底膜マトリックスが完全に脱重合され、オルガノイドが自由に浮遊しているかどうかを確認します。
6. 3D オルガノイドがマトリゲル基底膜マトリックスから自由に浮遊しているように見えたら、短時間遠心して、上清とオルガノイドを分離させます。上清を除去し、冷却 PBS で数回洗浄します。オルガノイドがまだ遊離していない場合は、4°C でさらにインキュベートするか、セルリカバリーソリューションを追加します。

オルガノイドの固定方法^{12,13}

マトリゲル基底膜マトリックスで培養したオルガノイドは、オルガノイドのサイズやイメージングの種類に応じて、4% パラホルムアルデヒドを用いて 4°C、30 分～4 時間で固定することができます。マトリゲル基底膜マトリックスは固定後に脱重合することがあるので、1% グルタルアルデヒドをマトリックスに添加すると防ぐことができます。

オルガノイドの染色およびイメージング¹⁴

共焦点装置や多光子装置によるイメージングでは、オルガノイドの調製が必要な場合があります。Nature Protocols の記事の中で、著者が記述しているプロトコールは以下のステップです。

1. オルガノイドを回収および固定後、洗浄バッファーでブロッキングする。
2. その後、オルガノイドに免疫標識処理を施す。
3. オルガノイドを、フルクトースグリセロール剤または組織洗浄剤で洗浄する。
4. オルガノイドをイメージング用にスライドに乗せる。

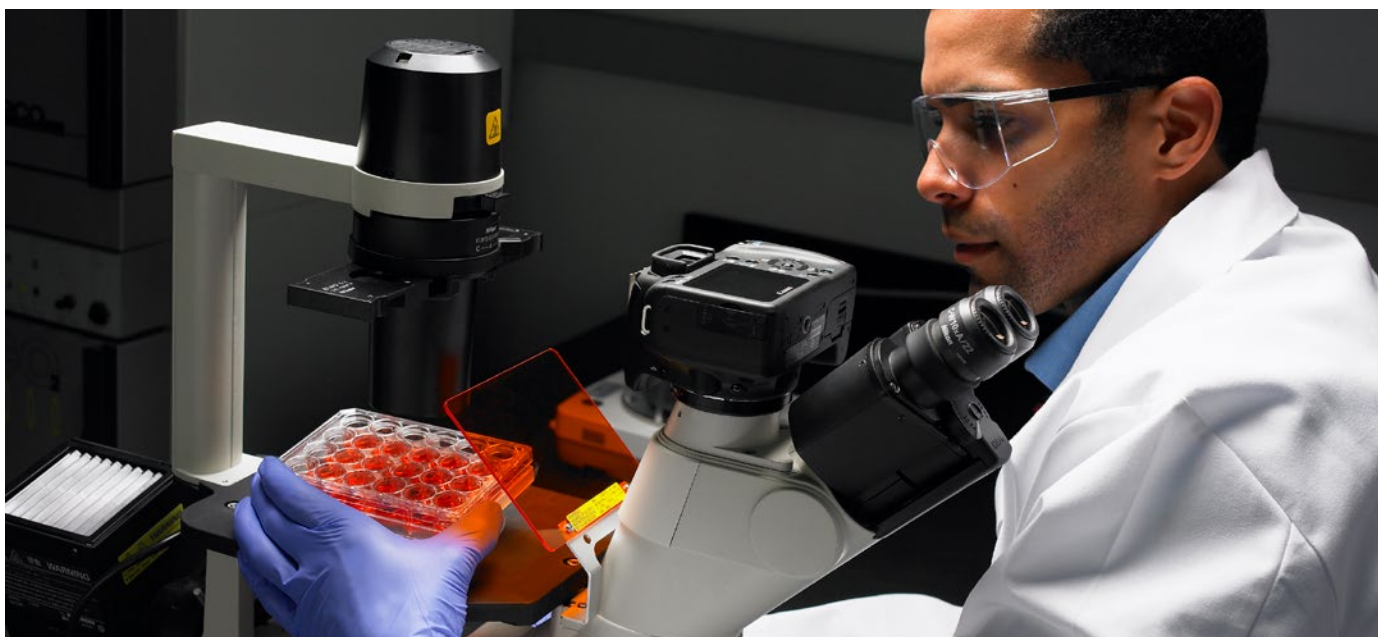
オルガノイドの染色も同様に、培地抽出、PBS 添加、抽出の調製が必要です。腸上皮オルガノイドの一連の洗浄ステップがどのように適用されたかは、Current Protocols in Mouse Biology¹⁵ を参照してください。

オルガノイドのトランスフェクション方法¹⁶

トランスフェクションのプロトコールは、細胞の種類、オルガノイドのサイズ、試薬など、いくつかの要因によって異なります。ただし、siRNA の転写の一般的なプロトコールには、以下のステップが含まれます。

1. 血清培地にトランスフェクション試薬を添加します。インキュベーターで一晩反応させます。
2. 翌日、培地を交換します。

トランスフェクションの効率を上げたい場合は、Nucleic Acids Research の論文の方法は注目に値します。研究者らは、マトリゲル基底膜マトリックスマイクロビーズにおけるマイクロカプセル化オルガノイドの自動生成とエレクトロポレーション法を組み合わせました。マイクロビーズサイズとマトリゲル基底膜マトリックス量を変更することで、効率が上がリ、少ない ECM で、同じオルガノイド数を得ることができます^{3,17}。





タスクの自動化でスケールアップの効率化を実現

オルガノイドは、より管理しやすく観察しやすい *in vitro* 環境で *in vivo* の状態を再現することができるため、3D 研究の新たなフロンティアとなっています。

ただし、オルガノイドの可能性を最大限に引き出すには、より自動化されたハイスループットのワークフローに対応する必要があります。**Corning® Matribot® バイオプリンター**のような次世代ツールが、この分野での進歩に貢献します。マトリゲル基底膜マトリックスなどの高度な生体材料に対応した最先端の機器を使用すれば、3D 研究の将来は確実に有望です。

コーニングのツールやプロトコルの詳細、オルガノイドに関するアプリケーションノートやケーススタディは、www.corning.com/jp/organoid でご覧いただけます。

References

1. Organoid Models. Corning.com. Published 2022. <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/applications/cell-culture/3D-cell-culture/organoid-models.html>.
2. Ma L, Li J, Nie Q, et al. Organoid Culture of Human Prostate Cancer Cell Lines LNCaP and C4-2B. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*. 2017;5(3):25-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698596/>.
3. Citations on Corning Matrigel Matrix and Organoid Culture (Corning, CLS-AN-503).
4. Shamir ER, Ewald AJ. Three-Dimensional Organotypic Culture: Experimental Models of Mammalian Biology and Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(10):647-664. doi:10.1038/nrm3873
5. Tuveson Laboratory Murine and Human Organoid Protocols. April 27, 2016. Prepared by: Lindsey Baker, Hervé Tiriach, Vincenzo Corbo. Based on methods described in: Huch M et al. 2013 Unlimited *in vitro* expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*. 32: 2708-21; and Boj S et al. 2015 Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160: 324-38.
6. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nature Protocols*. 2014;9(10):2329-2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
7. A Novel Method for Generating Single, Intestinal Organoids for High Throughput Screening (Corning, CLS-AN-464).
8. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, et al. Culture and Establishment of Self-Renewing Human and Mouse Adult Liver and Pancreas 3D Organoids and Their Genetic Manipulation. *Nature Protocols*. 2016;11(9):1724-1743. doi:10.1038/nprot.2016.097
9. Ma L, Li J, Nie Q, et al. Organoid Culture of Human Prostate Cancer Cell Lines LNCaP and C4-2B. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*. 2017;5(3):25-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698596/>.
10. Boehnke K, Iversen PW, Schumacher D, et al. Assay Establishment and Validation of a High-Throughput Screening Platform for Three-Dimensional Patient-Derived Colon Cancer Organoid Cultures. *Journal of Biomolecular Screening*. 2016;21(9):931-941. doi:10.1177/1087057116650965
11. Extraction of Three-Dimensional Structures from Corning Matrigel Matrix Guidelines for Use (Corning, CLS-AN-528).
12. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, et al. High-Resolution 3D Imaging of Fixed and Cleared Organoids. *Nature Protocols*. 2019;14(6):1756-1771. doi:10.1038/s41596-019-0160-8
13. Mahe MM, Aihara E, Schumacher MA, et al. Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. *Current Protocols in Mouse Biology*. 2013;3(4):217-240. doi:10.1002/9780470942390.mo130179
14. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, et al. High-Resolution 3D Imaging of Fixed and Cleared Organoids. *Nature Protocols*. 2019;14(6):1756-1771. doi:10.1038/s41596-019-0160-8
15. Mahe MM, Aihara E, Schumacher MA, et al. Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. *Current Protocols in Mouse Biology*. 2013;3(4):217-240. doi:10.1002/9780470942390.mo130179
16. Morgan RG, Chambers AC, Legge DN, Coles SJ, Greenhough A, Williams AC. Optimized Delivery of siRNA into 3D Tumor Spheroid Cultures In Situ. *Scientific Reports*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-26253-3
17. Laperrousaz B, Porte S, Gerbaud S, et al. Direct Transfection of Clonal Organoids in Matrigel Microbeads: A Promising Approach Toward Organoid-Based Genetic Screens. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(12):e70-e70. doi:10.1093/nar/gky030

- ・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 Fax : 03-3586-1291
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