

Agilent Seahorse XF Flex オルガノイド マイクロプレートで培養された がんオルガノイドの代謝プロファイリング

著者

Yoonseok Kam, Lisa Winer,
and Natalia Romero,
Agilent Technologies, Inc.

概要

本文書では、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーおよび Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートを用いた、がんオルガノイドの代謝プロファイリングのための Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドワークフローのアプリケーションについて説明します。このワークフローを、Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキットおよび Mito Tox アッセイを用いて、がん細胞由来オルガノイドにおけるミトコンドリア機能に対するメトホルミンの影響を調べることで評価しました。主要要素として、オルガノイドの播種手順の最適化、画像ベースの正規化、および Mito Tox Index (MTI) を用いたメトホルミン誘発性ミトコンドリア機能障害の定量的評価があります。このアプローチにより、がんオルガノイドなどの三次元 (3D) 培養モデルにおいて、ミトコンドリア機能をターゲットとする薬物のスクリーニングおよび特性解析が可能になります。

はじめに

オルガノイドは前臨床研究において有用なツールであり、従来の二次元 (2D) 細胞培養よりも天然組織の構造と機能を適切に再現する、生理学的に関連のある三次元 (3D) モデルを提供します。通常、腫瘍学における薬物スクリーニングは、2D 単層培養を用いた *in vitro* 力価試験から開始され、その後異種移植片などの動物モデルで検証が実施されます。臨床的トランスレータビリティを向上させるために、患者由来異種移植モデル (PDX) やヒト化マウスモデルが開発されてきました。しかし、これらのモデルには、コストの増加、期間の長期化、倫理的な考慮事項が伴い、重大な制約となっています。

患者由来オルガノイド (PDO) は、薬物評価や個別の治療設計における有望な代替手段として提案されています。PDO は、元の腫瘍の重要な遺伝的特徴および表現型の特徴を保持しており、生理学的により関連のある環境でのハイスループットスクリーニングを可能にします。この移行を支援するために、米国食品医薬品局 (FDA) は、動物実験への依存度の低減を目的としたロードマップを導入して、オルガノイドやオーガノンチップシステムを含む、新たな評価手法 (NAM) の開発と検証を強調しました。

酸素消費速度 (OCR) に基づいたミトコンドリア呼吸の解析は、がん代謝研究における基礎的な技術です。Agilent Seahorse XF アナライザーは、特にミトコンドリアをターゲットとする薬物やミトコンドリア毒性スクリーニングに関する研究において、OCR およびミトコンドリア機能の *in vitro* 評価に広く使用されています。また、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーは、オルガノイドや組織検体を含む多くのサンプルタイプにおいて、細胞生体エネルギーのリアルタイムでの測定を可能にします。特に、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートは、マトリックス埋め込みオルガノイド培養に最適化されており、長期的な培養、高分解能イメージング、包括的な代謝プロファイリングが可能です。

このアプリケーションノートでは、XF Flex オルガノイドマイクロプレートを用いて、マトリゲルに埋め込まれた HCT116-H2B-GFP (HCT116) 大腸がん細胞由来オルガノイドにおけるミトコンドリア機能を評価するための Seahorse XF Flex オルガノイドワークフローの使用方法について詳細に説明します。腫瘍代謝をターゲットとする十分に研究された試薬であるメトホルミン (1,1-ジメチルピグアニド塩酸塩) を用いて、ミトコンドリア活性を阻害しました。この概念実証の研究では、がんオルガノイドに対する薬物の作用を評価する際には、Mito Tox Index (MTI) に基づいた定量が有用であることを強調しています。提示されたワークフローは、将来のアプリケーションにおいて PDO モデルに容易に適応できる可能性があります。

実験方法

材料と実験方法

表 1. Agilent Seahorse XF オルガノイドワークフローに使用する材料および機器

製品	販売元	部品番号
Seahorse XF Flex アナライザー	アジレント	S7851A または S7851AN
Seahorse XF アッセイ培地		103866-100
Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレート		103865-100
Seahorse XF 3D ミトストレステストキット		103016-100
Seahorse XF ミトストレステストキット		103015-100
Seahorse XF DMEM アッセイ培地パック、pH 7.4		103680-100
BioTek Cytation 5 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダー		
マトリゲルマトリックス	Corning	356231
HCT116-H2B-GFP CRC 細胞株		
DMEM	Gibco	11995-065
ウシ胎児血清 (FBS)		
Hoechst 33342	Thermo Fisher	62249
メトホルミン (1,1-ジメチルピグアニド塩酸塩)	Sigma	D150959

XF Flex オルガノイドマイクロプレートでのオルガノイド培養

HCT116-H2B-GFP (HCT116) 細胞を、10 % ウシ胎児血清 (FBS) を添加した高グルコース DMEM で培養しました。オルガノイドを形成するために、500 ~ 1,000 個の細胞を、ウェルあたり 10 μ L の 50 % マトリゲル (約 5 mg/mL タンパク質) に埋め込みました。細胞は、平均直径が $\geq 100 \mu$ m に到達するまで 5 ~ 7 日間培養しました。マトリゲル層下での細胞接着を防止するために、2 ステップの播種手順を使用しました。最初に、6 μ L の氷冷マトリゲルを添加して、37 $^{\circ}$ C で 20 ~ 30 分間インキュベートしました。次に、4 μ L の氷冷マトリゲル中の細胞懸濁液を上部に添加して、さらに 20 分間インキュベートしました。最後に、250 μ L の予熱した培養培地をウェルごとに添加して、2 ~ 3 日おきに交換しました。詳細については、アジレント技術概要を参照してください。¹

Seahorse XF ミトストレステスト

以前の実験において、オリゴマイシンとロテノン/アンチマイシン A (Rot/AA) の最適な濃度がそれぞれ 1.5 および 0.5 μM と特定されたため¹、十分な化合物材料を提供する Agilent Seahorse XF ミトストレステストキットを使用しました。簡単に言えば、培養培地を、グルコース、グルタミン、ピルビン酸塩を添加した Seahorse XF DMEM 培地 (pH 7.4) ベースの、予熱した XF アッセイ培地 500 μL と交換しました。450 μL のアッセイ培地を 1 回交換して洗浄した後、プレートを、非 CO_2 インキュベーター内で 37 $^{\circ}\text{C}$ で 45 分間インキュベートしました。キット成分の注入量は、Seahorse XF ミトストレステストキットのユーザーマニュアルに記載されているとおりに決定しました。²

Seahorse XF Mito Tox アッセイ

メトホルミンによるミトコンドリア機能障害を、Seahorse XF Mito Tox アッセイを用いて評価しました。³オルガノイドを、さまざまな濃度のメトホルミンで一晩処理しました。Vehicle コントロールグループと Rot/AA コントロールグループも含めるようにしました。アッセイの間、オリゴマイシンと FCCP を、Seahorse XF ミトストレステストで特定された濃度で注入しました (前のセクション参照)。このアッセイの原理とアプリケーションの詳細については、Agilent Seahorse Mito Tox アッセイのホワイトペーパーおよびアプリケーションノートを参照してください。^{4, 5}

画像解析とデータ正規化

オルガノイドの画像化は、4 倍対物レンズを備えた Agilent BioTek Cytation 5 を用いて実施しました。明視野および蛍光画像 (Hoechst 33342 および GFP) を撮影して、z プロジェクションを実施しました。総対象物面積 (Object Sum Area) または対象物内で統合された総蛍光強度 (Object Sum Int) を Gen5 ソフトウェアで定量して、OCR データの正規化に使用しました。

データ解析

すべてのデータを Agilent Seahorse Analytics にアップロードし、3D Mito Stress Test および Mito Tox Screen のコンパニオンビューを用いて解析しました。同一のアッセイテンプレートおよび機器を用いて実施した 3 回の独立したアッセイの結果を、ソフトウェアの Project 機能を用いて統合しました。メトホルミンの MTI に関する 2D サンプルとオルガノイドサンプル間の統計的な比較は、GraphPad Prism (バージョン10.6.1) を用いて実施しました。

結果と考察

HCT116 オルガノイドの XF ミトストレステストの最適化

HCT116 細胞を、「実験方法」セクションで詳述した 2 ステップの手順を用いて、ウェルあたり 1,000 個の細胞で播種しました。簡単に言えば、細胞をマトリゲルに埋め込んで、5~6 日間培養することにより、ウェルごとに複数のオルガノイドを形成しました。図 1 は播種後 1 日目、3 日目、6 日目のオルガノイドの代表的な z プロジェクション画像です。これらは成長と構造的な発達の進行状態を示しています。

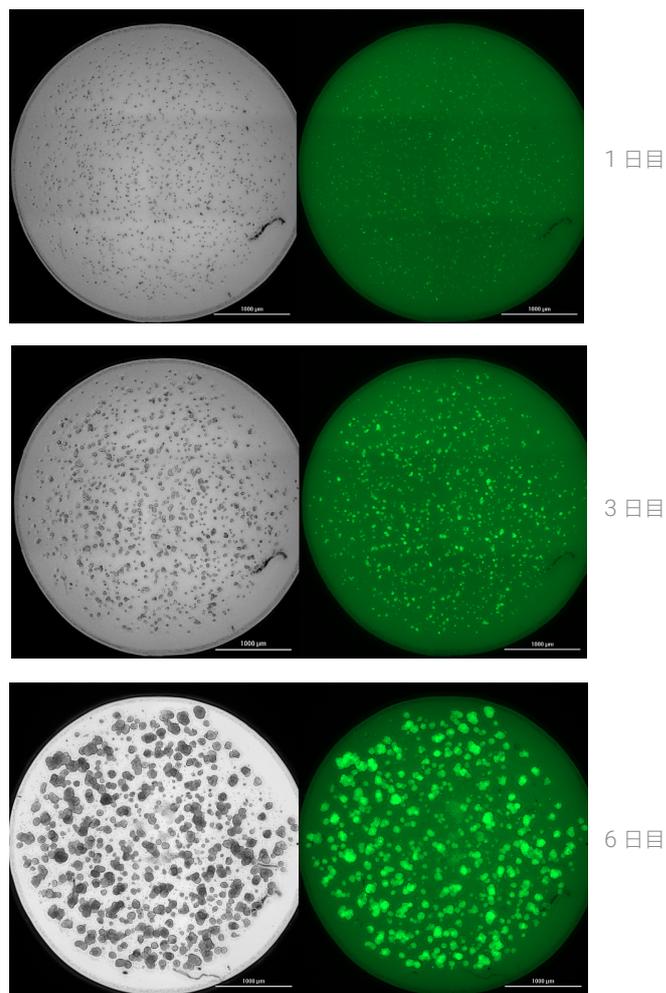


図 1. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレート内のマトリゲルに埋め込まれた HCT116-H2B-GFP がんオルガノイドの形成。明視野 (左) および GFP 蛍光画像 (右) は、Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーにより、800 μm の厚さにわたる 5 スライスの z スタッキング (z プロジェクション) を含む Gen5 プロトコルを用いて撮影しました。スケールバー = 1,000 μm

XF アッセイ試薬、特にカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) の最適化はきわめて重要ですが、これは、有効濃度がオルガノイドのタイプや由来によって異なる場合があります。HCT116 オルガノイドの場合、オリゴマイシンおよび Rot/AA の最適な濃度は、2D 単層で培養した HCT116 細胞に使用した濃度と一致していました (データは示していません)。FCCP の最適化のために、5 つの FCCP 濃度 (0.25、0.5、1、2、4 μM) を用いた滴定アッセイを実施しました。最大呼吸を誘発するのに最適な濃度は 1 μM と判定されました (図 2)。最適化の結果に基づいて、以降の実験では、XF 3D ミトストレステストキットの代わりに XF ミトストレステストキットを使用しました。

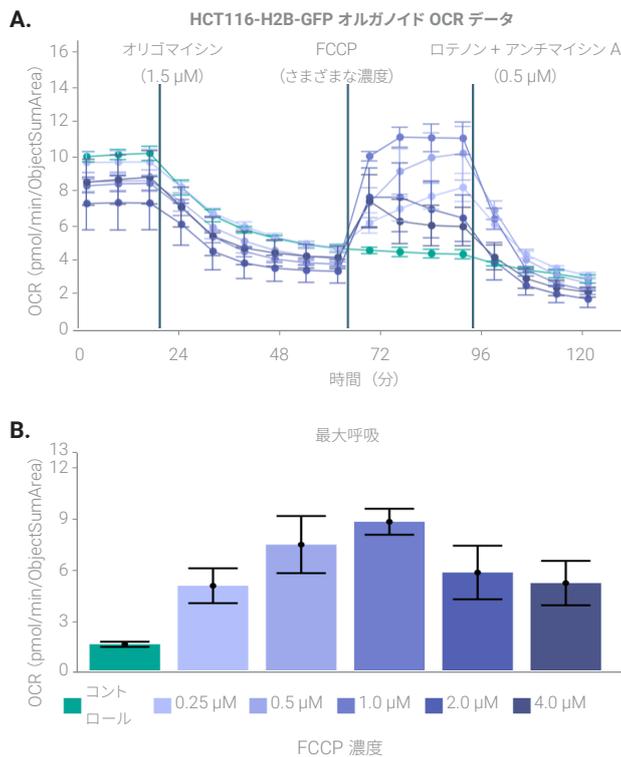


図 2. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートを用いた、HCT116 細胞由来オルガノイド培養における FCCP 滴定。HCT116 細胞を、ウェルあたり 11 μL の 50% マトリゲルに 1,000 個埋め込んで播種した後、5 日間培養しました。A. 明視野の総対象物面積で正規化した OCR カイネティクスグラフ。B. Agilent Seahorse Analytics ソフトウェアにより計算された最大呼吸

がんオルガノイドにおけるメトホルミン誘発性ミトコンドリア機能障害

がんオルガノイドモデルにおけるミトコンドリア機能に対するメトホルミンの作用を評価するために、さまざまな濃度のメトホルミンにより一晩処理した後の 5 日目に、XF ミトストレステストを実施しました。図 3 に示すように、基礎 OCR および最大 OCR はいずれも、用量依存的に大幅に低下しており、メトホルミンが HCT116 オルガノイドでのミトコンドリア呼吸を阻害することを示しました。

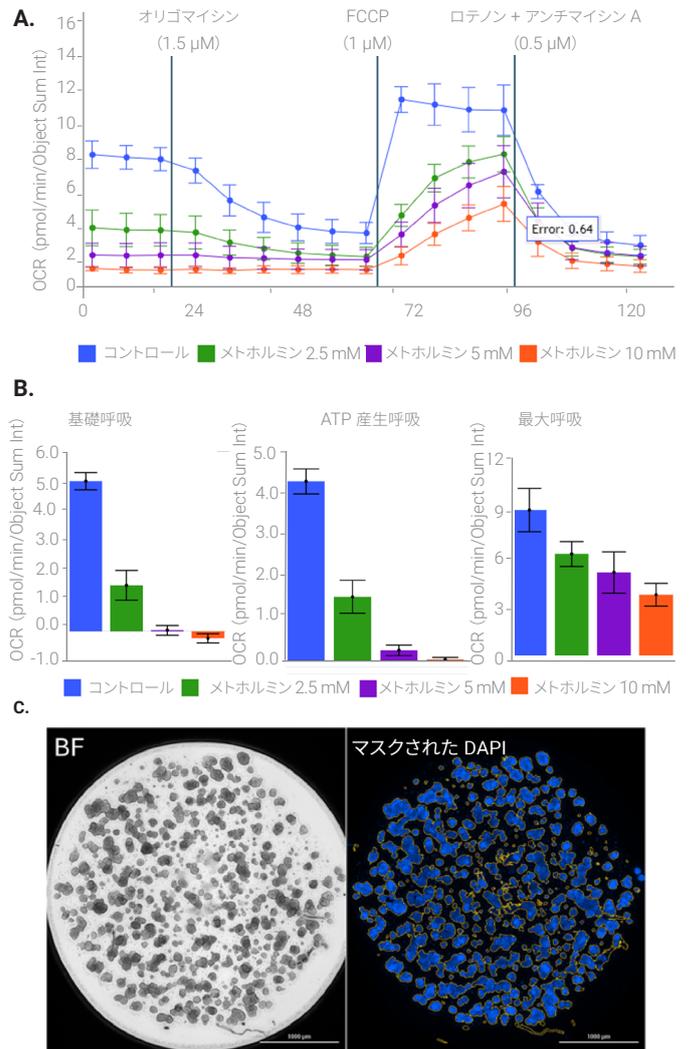


図 3. HCT116 がんオルガノイドにおけるミトコンドリア呼吸に対するメトホルミンの作用。HCT116-H2B-GFP 細胞を、50% マトリゲルで 5 日間培養しました。Agilent Seahorse XF ミトストレステストを実施する前に、メトホルミンの存在下 (2.5、5、または 10 mM) で、オルガノイドをさらに 1 日間培養しました。核は、最終注入で添加された Hoechst 33342 で染色されました (この場合は、ロテノン/アンチマイシン A 混合物)。
A. さまざまな用量のメトホルミンに対する OCR データの変化。
B. 主要な生体エネルギーパラメーターの変化。
C. データ正規化のために Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを用いてアッセイ後に撮影されたオルガノイド画像 (4 倍)。OCR データは、Hoechst 33342 の総蛍光強度 (Object Sum Int) により正規化しました。スケールバー = 1,000 μm

Mito Tox Index によるメトホルミン誘発性ミトコンドリア毒性の定量的評価

XF ミトストレステストは、ミトコンドリア機能の評価のための確立された広く使用されているツールで、基礎呼吸、ATP 産生、最大呼吸能などの生体エネルギーパラメーターを提供します。しかし、ミトコンドリア機能やミトコンドリア毒性に対する化合物の影響を迅速に特定するように設計されたものではありません。これに対して、XF Mito Tox アッセイは、

異なる培養条件やモデル（2D 細胞と 3D オルガノイドの比較など）におけるミトコンドリア機能の障害や毒性を評価するための、より直接的な情報を提供します。このアッセイでは、定義されたコントロール条件（vehicle およびロテノン/アンチマイシン A）を組み込むことにより、用量依存的なミトコンドリア阻害や脱共役を比較するための標準化された指標である MTI の計算が可能です。このターゲットを絞ったアプローチにより、特に薬物スクリーニングや作用機序研究において、より正確で再現性の高い化合物毒性プロファイリングが可能になります。^{4, 5}

この理由により、HCT116 オルガノイドにおけるメトホルミンの影響を評価するために、XF Mito Tox アッセイを採用しました。最初に、アッセイの堅牢性とサンプルの適合性を評価するために、図 4 に示すように Z' ファクター解析を実施しました。脱共役剤および阻害剤の両方の条件において Z' 値が 0.5 を超えており、このアッセイが HCT116 オルガノイドモデルにおける薬物誘発性ミトコンドリア機能障害のスクリーニングに適していることが確認されました。次に、メトホルミンの濃度を漸増させて一晩前処理したオルガノイドにおいて、MTI 値を測定しました。Seahorse Analytics ソフトウェアを用いて MTI を正確に計算するには、vehicle コントロールとロテノン/アンチマイシン A (R/AA) コントロールという 2 つの特定のコントロールグループが必要になります。図 5A は、メトホルミンの阻害作用を調べるために使用した XF Mito Tox アッセイのプレートマップを示しており、2 つのコントロールグループに加え、さまざまなメトホルミン濃度の 4 つの実験グループが含まれています。図 5B は、3 回の独立したアッセイから得られた代表的なデータを示しています。図に示すように、メトホルミンの MTI 値は用量依存的に増加しました。

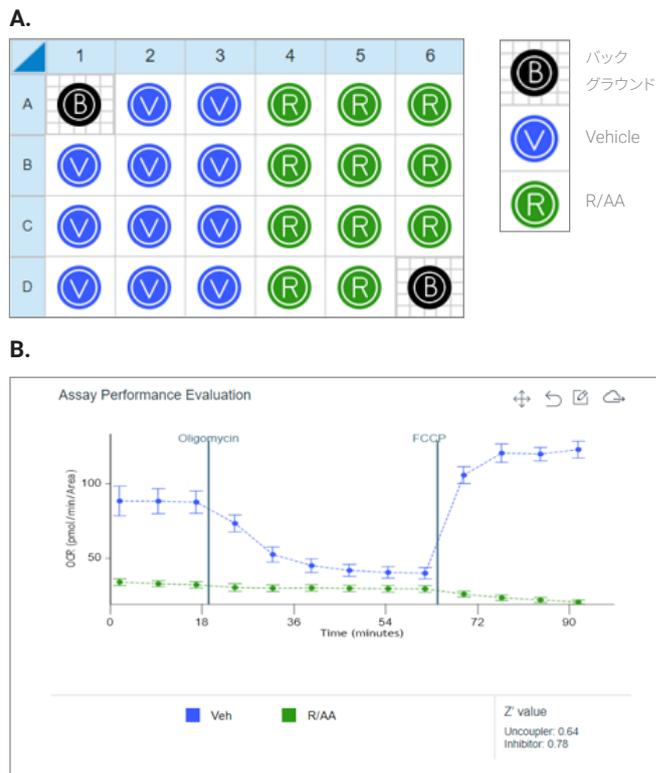


図 4. Z' 値によるアッセイ性能の評価。HCT116 オルガノイドを用いた Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイの堅牢性を、Z' 値計算により評価しました。A. Z' 評価のためのプレートマップ。B. Z' 評価の結果。データはすべて、Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーで撮影された画像から測定した、オルガノイドのサイズ（Object Sum Area）で正規化しました。

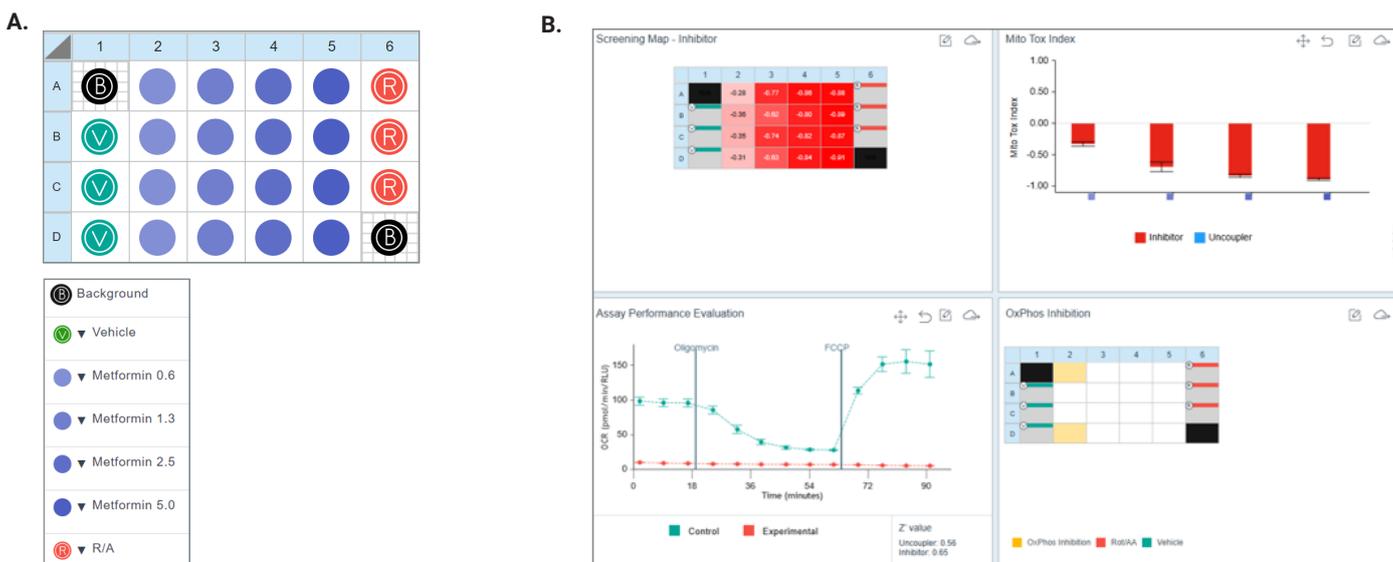


図 5. メトホルミン処理した HCT116 オルガノイドの Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイの結果。A. XF Mito Tox アッセイのプレートマップ。ここに示した 4 つの異なる濃度（n = 4）でメトホルミンを一晩曝露した後、メトホルミンの阻害剤 MTI を測定しました。B. 3 回繰り返した XF Mito Tox アッセイからの代表的なデータセット。表示されているデータは、Seahorse Analytics ソフトウェアから取得しました。これには、阻害剤 MTI ヒートマップ、Mito Tox Index の棒グラフ、酸化的リン酸化（OxPhos）の潜在的阻害剤のヒートマップ、内部 Z' 値計算が含まれます（左上のパネルから時計回り）。

このアッセイの条件下において、2D 培養 HCT116 細胞を用いた独立した XF Mito Tox アッセイ (n = 3) では、メトホルミンの IC₅₀ は 2.05 mM と決定されました (データは示していません)。特に、HCT116 オルガノイドを使用した場合、MTI はより低い濃度 (1.3 mM) で -0.5 に到達しており、オルガノイドがメトホルミンの阻害作用に対してより高い感度を示す可能性があることを示唆しています。この仮説を検証するために、2D 培養と 3D オルガノイドの両方を用いた XF Mito Tox アッセイから得られた MTI 値を集計して比較しました。図 6 に示すように、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) により、3 つの高いメトホルミン濃度 (1.3、2.5、5 mM) において、2 つの培養形式 (2D 対オルガノイド) 間で、MTI 値に統計的に有意な差が認められました。これらの結果は、2D モデルとオルガノイドモデル間で、メトホルミンの感度に一貫した用量依存的な差が存在することを示しています。

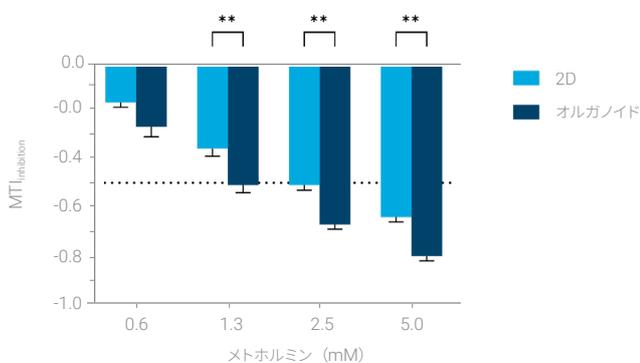


図 6. 2D で培養された HCT116 細胞および HCT116 細胞 3D オルガノイド間のメトホルミンによるミトコンドリア阻害の比較。2D 培養 HCT116 およびオルガノイドをそれぞれ一晩曝露した後、Agilent Seahorse XF Pro および Agilent Seahorse XF Flex により、メトホルミンの阻害剤 MTI を評価しました。値は、各培養条件について異なる日に実施した、3回の独立したアッセイの平均値 ± S.E.M. (標準誤差) を示しており、Seahorse Analytics ソフトウェアの Project 機能を用いて計算しました。差の有意性は、GraphPad Prism ソフトウェアを用いた二元配置分散分析により解析しました。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーおよび Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートを用いて、がんオルガノイドの代謝プロファイリングと、ミトコンドリア機能に対する薬物の影響の評価を実施するための堅牢なワークフローの使用方法を実証しました。メトホルミンに対するオルガノイドの感度が向上したことは、薬物スクリーニングおよび作用機序研究における 3D モデルの重要性を明確に示しています。このアプローチは、さまざまなオルガノイドタイプに適応可能であり、前臨床研究のための NAM の開発を支援します。

参考文献

1. [Measuring Mitochondrial Function of Matrix-Embedded Organoids Using the Agilent Seahorse XF Flex Analyzer](#). Agilent Technologies technical overview, 5994-8742EN, **2025**.
2. [Agilent Seahorse XF 3D Mito Stress Test Assay](#). Agilent Technologies user guide, 5994-8177EN, **2025**.
3. [Agilent Seahorse XF Mito Tox Assay Kit](#). Agilent Technologies user guide, 5994-3715EN, **2022**.
4. Rogers, G.W.; Winer, L.; Schwalfenberg, M.; Romero, N.; Kam, Y. [Principle of Mitochondrial Toxicity Assessment Using Agilent Seahorse XF Solution](#). Agilent Technologies white paper, 5994-4732EN, **2023**.
5. Kam, Y.; Rogers, G.W.; Winer, L.; Schwalfenberg, M.; Romero, N. [A Customized XF Workflow for Detection and Characterization of Mitochondrial Toxicity](#). Agilent Technologies application note, 5994-4778EN, **2022**.

このアプリケーションで使用された製品

アジレント製品

[Agilent Seahorse XF Flex アナライザー](#) 

[Agilent Seahorse FluxPak-XF Flex オルガノイド用](#) 

[Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキット](#) 

[Agilent Seahorse XF ミトストレステストキット](#) 

[Agilent Seahorse XF DMEM アッセイ培地パック](#) 

[Agilent BioTek Cytation イメージング・マルチモードプレートリーダー](#) 

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA260114.593

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, January 21, 2026

5994-8888JAJP