

肝臓オルガノイドにおける ミトコンドリア毒性の定量的評価

Agilent Seahorse XF Flex を用いた Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイの適用

著者

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

概要

肝臓オルガノイドは、肝臓代謝機能、組織構造、および細胞不均一性を従来の 2 次元肝細胞培養や一部の動物モデルよりも正確に再現する、生理学的に適切な in vitro モデルです。このアプリケーションノートでは、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートで培養したマウス肝臓オルガノイドシステムを使用して Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイを実行するワークフローについて取り上げます。Seahorse XF Mito Tox アッセイと Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートを組み合わせて使用することで、マトリックス足場内で成長したオルガノイドにおける薬物誘発性ミトコンドリア機能障害を Mito Tox Index (MTI) によって定量できます。MTI には、薬物化合物のミトコンドリア阻害や脱共役の程度が反映されます。4 種類の参照ミトコンドリア毒性物質 (3 種類の阻害剤と 1 種類の脱共役剤) を Cmax の 10 倍濃度で評価しました。その結果、ミトコンドリア毒性を定量的に評価できる堅牢性と再現性に優れたプラットフォームであることが実証され、このワークフローの実行可能性が確認されました。また、医薬品の安全性の予測に対する、オルガノイドを使用したミトコンドリア毒性アッセイの可能性が明確になりました。

はじめに

医薬品の開発と安全性評価において、薬物性肝障害（DILI）は依然として大きな障壁となっており、ミトコンドリア機能障害がその主な機序的要因として認識されています。多能性幹細胞または初代肝組織由来の3次元（3D）肝臓オルガノイドでは、従来の2次元（2D）肝細胞培養や多くの動物モデルよりも正確に肝臓構造、細胞不均一性、および代謝活性を反映した、生理学的に適切なモデルが提供されます^{1, 2}。これらの利点により、オルガノイドは前臨床スクリーニングにおけるミトコンドリア障害の評価に有効なプラットフォームとなっています。

Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイでは、ミトコンドリア機能障害を Mito Tox Index（MTI）によって定量することができます。MTI は、ミトコンドリア阻害と脱共役を識別し、多様な培養フォーマットにわたる再現性の高い比較を可能にする、正規化された、単位のない指標です^{3, 4}。従来、このアッセイは、ミトコンドリア毒性に関連する肝毒性を評価するために2Dシステム（HepG2、初代肝細胞、HUREL 共培養など）に広く適用されてきましたが、マイクロプレートフォーマットに対応していないことから、3Dマトリックス埋め込みオルガノイドでの使用は限られていました。

Agilent Seahorse XF Flex アナライザーは、さまざまな24ウェル形状で酸素消費速度（OCR）と細胞外酸化速度（ECAR）を通して細胞呼吸および解糖活性を測定できるように設計されています。専用の 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条件で成長したオルガノイドに対応しており、肝臓オルガノイドの培養に広く用いられているフォーマットである3D肝臓モデルの代謝を直接調べることができます。

このアプリケーションノートで紹介する実験では、マウス肝臓オルガノイドを、XF Flex オルガノイドマイクロプレートで凍結オルガノイド片から直接再構成することに成功しました。また、ミトコンドリア機能障害や肝毒性を誘発することで知られる4種類のモデル化合物（ネファゾドン、ニメスリド、ロシグリタゾン、トログリタゾン）を使用してミトコンドリア毒性を評価しました^{5~7}。XF Mito Tox アッセイとXF Flex オルガノイドマイクロプレートを組み合わせることで、3D肝臓モデルでミトコンドリア障害を評価する堅牢なワークフローが実現し、前臨床医薬品開発における予測的DILIリスク評価に対するアッセイの有用性が高まります。

実験

材料

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 FluxPak-XF Flex オルガノイド用		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
マウス肝臓オルガノイド	STEMCELL Technologies	70932
オルガノイド培養プレート、96 ウェル		200-0562
HepatiCult Organoid Growth Medium (Mouse)		06030
Hoechst 33342	Thermo Fisher	62249
ネファゾドン	Millipore Sigma	N5536
ニメスリド		N1016
ロシグリタゾン		R2408
トログリタゾン		T2573

肝臓オルガノイドの培養

凍結したマウス肝臓オルガノイドを解凍し、最初にマトリゲルドーム内で培養してから、サプライヤーの指示に従って HepatiCult Organoid Growth Medium（STEMCELL Technology 社製）を用いて継代培養しました。Seahorse XF アッセイと画像解析のため、約 50 個のオルガノイド片を 10 µL のマトリゲルとともに各ウェルに播種し、3 ~ 4 日間培養しました。オルガノイドを 96 ウェル STEMCELL オルガノイド培養プレートに播種する際にも、同じ継代培養条件を適用しました。

Seahorse XF ミトストレステスト

XF ミトストレステストキットを使用して、オリゴマイシンとロテノン/アンチマイシン A (Rot/AA) の最適な濃度をそれぞれ 1.5 μM および 0.5 μM に決定しました (データは示していません)。アッセイ当日、培養培地を、予熱した 500 μL の Agilent Seahorse XF DMEM 培地 (pH 7.4、グルコース、グルタミン、およびピルビン酸塩を添加) に交換しました。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。また、アッセイ開始直前に培地を一度交換し、最終容量を 500 μL に調整しました。キットに含まれる試薬のストック溶液の調製と注入量の決定は、Agilent 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手順に従って行いました⁸。

Seahorse XF Mito Tox アッセイ

テスト化合物によるミトコンドリア毒性の評価には XF Mito Tox アッセイを使用しました。連続注入するオリゴマイシンと FCCP の最適な濃度 (それぞれ 1.5 μM と 4 μM) は、前のセクションで説明した滴定実験によって決定しました (図 2 も参照)。アッセイ培地の交換は前述の XF ミトストレステストと同じですが、非 CO_2 インキュベーターでの脱気ステップは 30 分に短縮しました。XF アッセイ培地での最終的な洗浄後 (最終容量 = 500 μL)、表 2 に示すテスト化合物を添加して、または添加せずに、オルガノイドを非 CO_2 インキュベーター内で 37 $^\circ\text{C}$ でさらに 30 分間インキュベートしました。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 アッセイに関する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^{3,4}。

表 2. ミトコンドリア毒性テストに用いたモデル化合物の濃度

化合物	Cmax の 10 倍濃度	Cmax ⁹
ネファゾド	10 μM	1 μM
ニメスリド	100 μM	10 ~ 40 μM
ロシグリタゾン	10 μM	1 μM
トログリタゾン	50 μM	5 μM

画像解析とデータ正規化

Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・プレートリーダーで 4 倍の PL FL 対物レンズを使用して、オルガノイドのイメージングを実施しました。明視野画像と蛍光画像を撮影し、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した総蛍光強度 (Object Sum Int) を Gen5 ソフトウェアで定量し、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。同じアッセイプレートと機器で実施した 3 回の独立したアッセイの結果を、Seahorse Analytics ソフトウェアの **Project** 機能を使用して統合しました。

結果と考察

Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートでの肝臓オルガノイドの培養

凍結保存された肝前駆細胞オルガノイド (STEMCELL Technologies 社製) からマウス肝臓オルガノイドを再生し、Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートで直接拡大培養することに成功しました。継代培養開始から 4 日以内に、オルガノイド片から球状構造が形成されました (図 1A)。その形態、成長速度、または生存率に、標準のマトリゲル埋め込みドーム培養との違いは認められませんでした (データは示していません)。XF Flex オルガノイドマイクロプレートと STEMCELL オルガノイド培養プレートの代表的な明視野像 (図 1B) から、同等のマトリゲル条件 (ウェルあたり 10 μL) を持つどちらのプレートフォーマットでもオルガノイドが均一に成長していることがわかります。これらの観察により、XF Flex オルガノイドマイクロプレート内で、正常な発達や増殖の特徴を乱すことなく、高い再現性でオルガノイドを生成し、維持できること、また、これによってマトリックス埋め込み 3D 肝臓モデルを必要とする代謝アッセイに対応できることが確認されました。

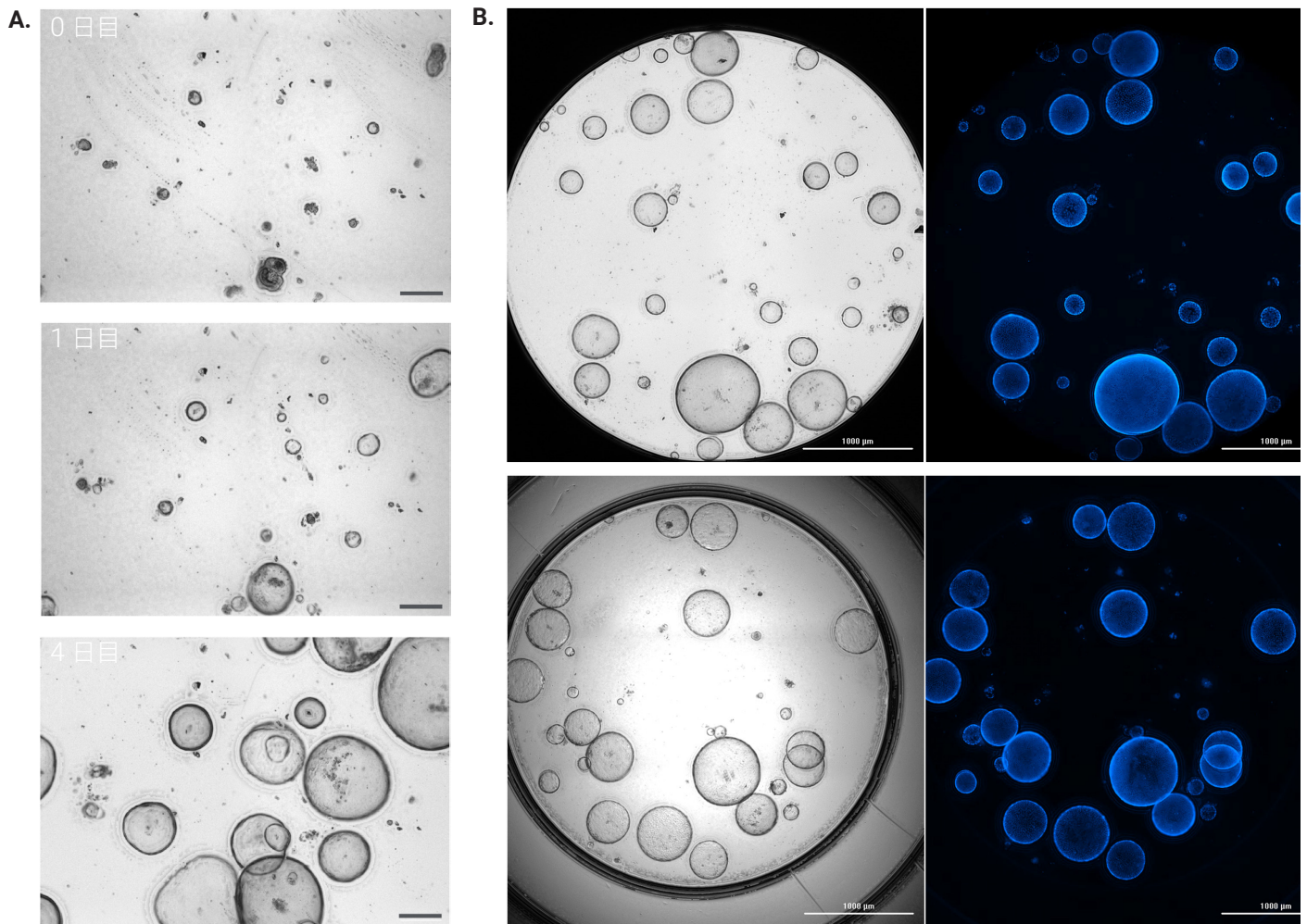


図 1. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートでのマウス肝臓オルガノイドの成長。A) マウス肝臓オルガノイド片を、Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレート上の各ウェルに 10 μL のマトリゲルとともに播種し、4 日間培養しました。マトリゲル架橋直後 (0 日目)、1 日後 (1 日目)、および 4 日後 (4 日目) に、Gen5 ソフトウェアを使用して Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・プレートリーダーで Z プロジェクションの 4 倍高コントラスト明視野 (HCBF) 画像を撮影しました。スケールバー = 200 μm 。B) 肝臓オルガノイドを XF Flex オルガノイドマイクロプレート (上段パネル) と STEMCELL オルガノイド培養プレート (下段パネル) で培養し、Hoechst 33342 で染色しました。Z プロジェクションの 4 倍 HCBF 画像 (左) と DAPI 蛍光画像 (右)。スケールバー = 1,000 μm

XF Mito Tox アッセイ条件の最適化

肝臓オルガノイドに最適な XF Mito Tox アッセイ条件を確立するために、最大 OCR を達成するアッセイの FCCP 濃度を滴定により求めました。オリゴマイシン (1.5 μM) および Rot/AA の濃度 (0.5 μM) は一定のまま、3種類の FCCP 濃度 (1、2、および 4 μM) を使用して、オルガノイドサンプルに対して XF ミトストレステストを実施しました。図 2 に示すように、ベースライン OCR (オリゴマイシン添加前の最終測定値) で正規化したカイネティックストレスは、4 μM FCCP により最も堅牢で再現性の高い最大呼吸が生成されたことを示しています。この最適化により、MTI にもとづく以降のミトコンドリア毒性物質の定量的評価に使用する条件が確立されました。

テスト化合物の毒性を測定する前に、Z' ファクター解析によってアッセイの堅牢性を評価しました (図 3)。ミトコンドリア阻害剤の検出に関する Z' 値は、2 回の独立した実験で 0.5 を超えました。これは、ミトコンドリア阻害の検出に対するアッセイ品質の高さを示しています。また、MTI 脱共役モードに関する Z' 値は、閾値である 0.5 に達しませんでした。これは、脱共役化合物のハイスループットスクリーニングに対するアッセイの堅牢性不足が懸念されるが、慎重に解釈すれば信頼性の高い機序的評価が可能なことを示唆しています。

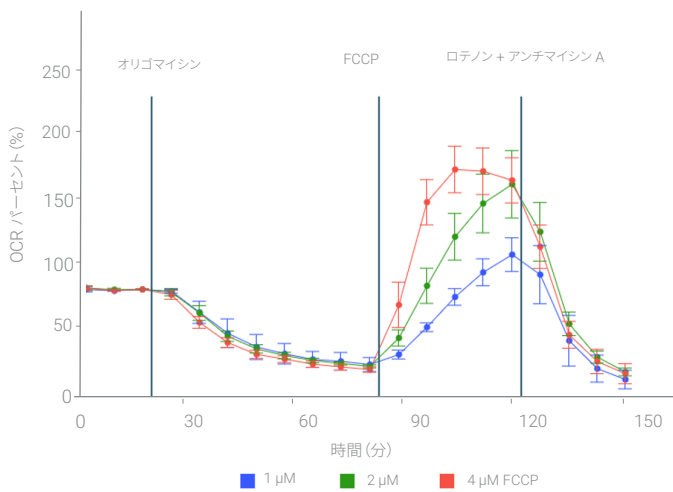


図 2. FCCP 注入濃度の最適化。オリゴマイシンとロテノン/AA の濃度は一定のまま、FCCP 濃度を変化させて、マウス肝臓オルガノイドの OCR を測定しました。ベースラインで正規化したカイネティクスストレスから、4 μM FCCP で最大の OCR 応答が得られることがわかります。

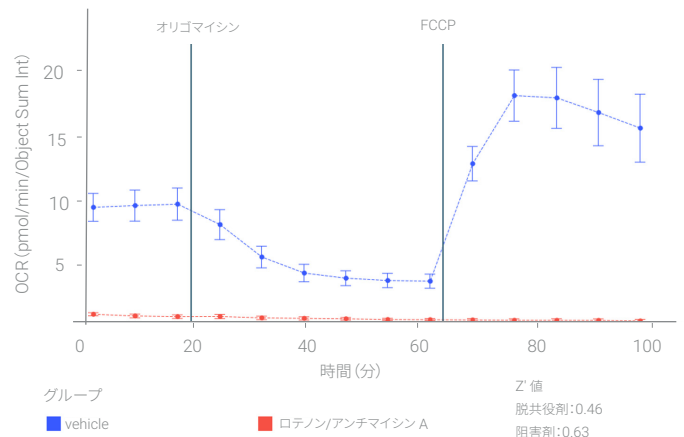


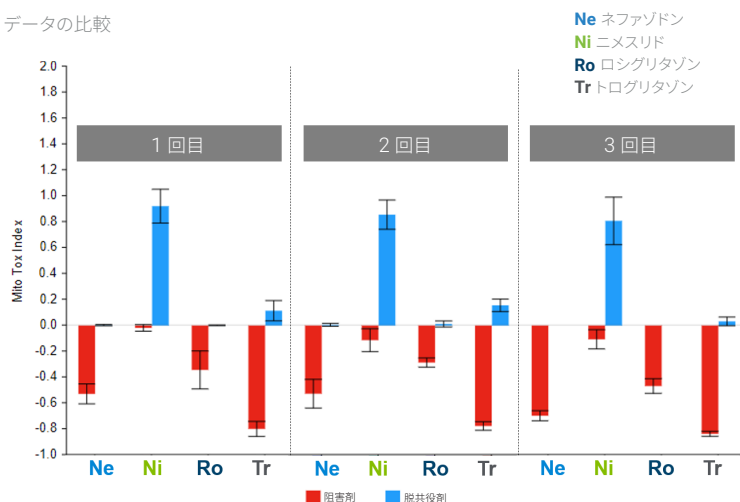
図 3. Z' 値によるアッセイ性能の評価。肝臓オルガノイドを使用した Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイの堅牢性を Z' 値の計算値により評価しました。すべてのデータは、Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・プレートリーダーで撮影した画像から測定した Hoechst 33342 染色の蛍光強度を統合したものの (Object Sum Int) で正規化されています。

モデル化合物の Mito Tox Index の評価

それぞれ異なるバッチに由来する肝臓オルガノイドを用いた 3 回の独立した実験にわたり、4 種類のミトコンドリア毒性物質 (ネファゾドン、ニメスリド、ロシグリタゾン、トログリタゾン) の MTI 値を測定しました (図 4A)。すべての実験にわたって一貫した機序的分類が得られ、ネファゾドン、ロシグリタゾン、およびトログリタゾンはミトコンドリア阻害を示す一方、ニメスリドはミトコンドリア脱共役を誘発しました。すべてのアッセイによるデータを統合したところ (図 4B)、MTI 応答の大きさや方向は、これらの化合物のミトコンドリア障害に関する以前のレポートと合致していました。

テスト対象の阻害剤のうち、トログリタゾンは Cmax の 10 倍濃度で最も強い阻害 MTI を示しました。この結果は、その既知のミトコンドリア毒性および重症 DILI を理由とする臨床利用の中止と一致するものでした。また、ミトコンドリアへのリスクがトログリタゾンより低い条件次第であるロシグリタゾン^{7, 10~12} では中程度の MTI 応答が得られ、ネファゾドンは報告されている肝毒性と一致する強い阻害作用を示しました。以上の結果から、肝臓オルガノイドの XF Mito Tox ワークフローにより、従来の毒性学的データと合致する化合物固有のミトコンドリア障害を識別できることが実証されました。

A. データの比較



B. 統合したデータ

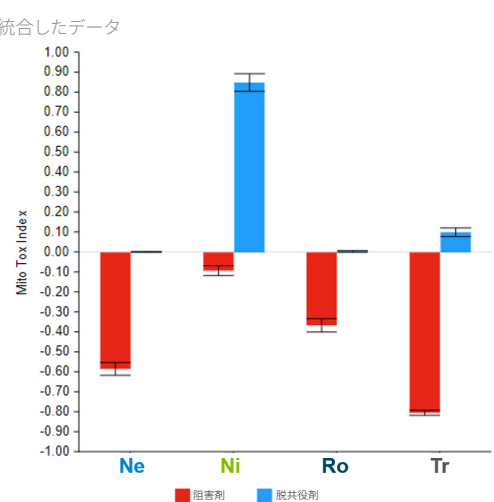


図 4. Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイで測定したマウス肝臓オルガノイドにおけるモデル化合物のミトコンドリア毒性。Cmax の 10 倍濃度の各モデル化合物を使用して、3 回の独立した XF Mito Tox アッセイを実施しました。(A) にそれぞれのアッセイで得られた MTI 値を並べて示し、パネル (B) にそれらを統合した結果を示しています。解析には Agilent Seahorse Analytics ソフトウェアを使用しました。

結論

今回の研究により、Agilent Seahorse XF Mito Tox アッセイと Agilent XF Flex オルガノイドマイクロプレートを組み合わせて肝臓オルガノイドに適用することの実行可能性と堅牢性が実証されました。マウス肝臓オルガノイドは、XF Flex オルガノイドマイクロプレート内で直接、成長や形態を妨げることなく確実に再生され、マトリックス埋め込み 3D 肝臓モデルのリアルタイム代謝解析を直接実行することができました。また、アッセイ条件、特に FCCP 濃度を最適化することで、オルガノイドにおけるミトコンドリア応答の定量に適したパラメーターを確立できました。

このワークフローでは、十分に特性解析された 4 種類のミトコンドリア毒性物質を使用して、ミトコンドリア阻害と脱共役の明確な識別など予想される機序のプロファイルを反映した、再現性の高い MTI 値が生成されました。以前報告されたミトコンドリアプロファイルおよび肝毒性プロファイルと強く一致していることから、このプラットフォームの定量機能と生物学的適切性が明確になりました。

以上の結果は、XF Flex オルガノイドマイクロプレートを使用した XF Mito Tox ワークフローが、肝臓オルガノイドにおける化合物起因のミトコンドリア機能障害の評価に適した堅牢な予測ツールであることを裏付けています。このオルガノイド培養プラットフォームを使用することで、XF Mito Tox アッセイを 3D 培養システムにも適用できるようになります。また、前臨床 DILI リスク評価への関連性が高まり、従来の 2D システムより優れた生理学的適切性が得られます。

参考文献

1. Liu, S.; Cheng, C.; Zhu, L.; Zhao, T.; Wang, Z.; Yi, X.; Yan, F.; Wang, X.; Li, C.; Cui, T.; Yang, B. Liver organoids: updates on generation strategies and biomedical applications. *Stem Cell Res Ther.* **2024**, *15* (1), 244. DOI: 10.1186/s13287-024-03865-3
2. He, J.; Cui, H.; Shi, X.; Jin, Q.; Han, X.; Han, T.; Peng, J.; Guo, S.; Zhang, L.; Zhao, Y.; et al. Functional hepatobiliary organoids recapitulate liver development and reveal essential drivers of hepatobiliary cell fate determination. *Life Med.* **2022**, *1* (3), 345–358. DOI: 10.1093/lifemedi/lnac055
3. 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**.
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. Dykens, J. A.; Jamieson, J. D.; Marroquin, L. D.; Nadanaciva, S.; Xu, J. J.; Dunn, M. C.; Smith, A. R.; Will, Y. In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone, and buspirone. *Toxicol Sci.* **2008**, *103* (2), 335–45. DOI: 10.1093/toxsci/kfn056
6. Ong, M.M.; Wang, A. S.; Leow, K. Y.; Khoo, Y. M.; Boelsterli, U. A. Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2(+/-) mice. *Free Radic Biol Med.* **2006**, *40* (3), 420–9. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.038
7. Rachek, L. I.; Yuzefovych, L. V.; Ledoux, S. P.; Julie, N. L.; Wilson, G. L. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2009**, *240* (3), 348–54. DOI: 10.1016/j.taap.2009.07.021
8. Seahorse XF Cell Mito Stress Test kit user manual. *Agilent Technologies user guide*, **2024**.
9. Schulz, M.; Iwersen-Bergmann, S.; Andresen, H.; Schmoltdt, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care.* 2012, *16* (4), 136. DOI: 10.1186/cc11441.
10. LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda, MD*, **2012**.
11. Garcia-Ruiz, I.; Rodríguez-Juan, C.; Díaz-Sanjuán, T.; Martínez, M. A.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J. A. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology.* **2007**, *46* (2), 414–23. DOI: 10.1002/hep.21687
12. Lloyd, S.; Hayden, M. J.; Sakai, Y.; Fackett, A.; Silber, P. M.; Hewitt, N. J.; Li, A. P. Differential in vitro hepatotoxicity of troglitazone and rosiglitazone among cryopreserved human hepatocytes from 37 donors. *Chem Biol Interact.* **2002**, *142* (1-2), 57–71. DOI: 10.1016/s0009-2797(02)00054-6

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 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

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。

DE-013673

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, March 31, 2026

5994-9075JAJP

販売店