

# Agilent Seahorse XF Flex アナライザーを用いたマトリックス埋め込みオルガノイドのミトコンドリア機能の測定

## はじめに

ミトコンドリア機能を評価する能力は、細胞生理学、疾患病理学、および病因学において代謝が果たす中心的な役割に関する理解を大きく前進させました。生理学的に関連性のある 3 次元 (3D) モデルへの関心が高まるとともに、オルガノイドは前臨床研究における強力なツールとして浮上しています。オルガノイドは、実際の臓器の構造的および機能的特性をより正確に再現することで、従来の 2 次元 (2D) 細胞培養や生きた動物モデルに関連する多くの限界を克服しています。特に、米国食品医薬品局 (FDA) による動物実験を減らすためのロードマップは、オルガノイドの利用を含む新たな評価手法 (NAMs) の重要性を強調しており、生物医学研究におけるトランスレーショナルな関連性と倫理基準の向上を目指しています。

アジレントは、FDA が新たな評価手法に優先的に重点を置く方針に沿い、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレート (XF Flex オルガノイドマイクロプレート) および Agilent Seahorse XF Flex アナライザー (XF Flex) を用いて、オルガノイド培養におけるエネルギー代謝を調査するアッセイワークフローを開発しました。XF Flex オルガノイドマイクロプレート (図 1) には、1 mm (高さ) x 4 mm (直径) のサンプルリザーバーが備えられており、このリザーバーにより、足場構造 (マトリゲルや、その他の細胞外マトリックスを含むヒドロゲルなど) に埋め込まれたオルガノイドを、Agilent Seahorse XF アッセイや高分解能イメージングアッセイに使用する前に、数日間培養することができます。Seahorse XF Flex オルガノイドワークフローでは、研究者は生理学的により関連性の高いモデルを用いて、ミトコンドリアの健康状態、毒性、解糖、および全体的な細胞機能 (障害) を示す重要な指標となる主要な代謝パラメーターを取得することができます。

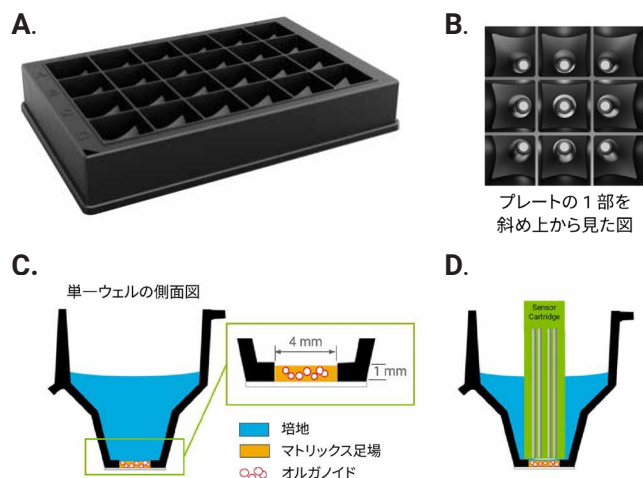


図 1. Agilent Seahorse XF OrganoIDマイクロプレートを示す図。高分解能イメージングに対応した、黒色の側壁と透明/薄いフィルムの底部を備えた 24 ウェルマイクロプレート (A および B)。マトリゲルなどのマトリックス足場に埋め込まれたオルガノイドは、1 mm (高さ) × 4 mm (直径) のサンプルリザーバーで培養されます (C)。これにより、センサープローブで形成されたマイクロチャンバー内に、ウェルあたり  $10 \pm 2 \mu\text{L}$  のマトリックス容量を確実に配置できます (D)。

この技術概要では、Seahorse XF Flex OrganoIDマイクロプレート内のオルガノイド培養の確立と維持、および Seahorse XF アッセイの実施に関する詳細な手順とガイドラインを提供します。これには、このワークフローを用いたオルガノイド代謝プロファイルの特定に関する概念実証例と、データ正規化の考慮事項に関するガイダンスが含まれます。サンプルの由来や特性によってオルガノイド培養条件に変動が生じるため、ユーザーは提供されたガイドラインを用いて、プロトコルと手順を最適化する必要があります。

## マトリックス足場で培養したオルガノイドのための Seahorse XF Flex アッセイワークフロー

図 2 に示すアッセイワークフローは、オルガノイドサンプルを用いた Seahorse XF アッセイを実施するための、オルガノイド調製からデータ解析までの主要な手順について説明しています。オルガノイドは、単一細胞、オルガノイド、または組織片から、マトリゲルなどのマトリックス足場を充填したサンプルリザーバーで、数日間培養することができます。センサーカートリッジは、Seahorse XF アッセイ実施の前日に水和させる必要があります。このワークフローに含まれる手順の詳細については、以下のセクションで説明します。ユーザーは、オルガノイドのタイプ、マトリックス足場、研究目的に基づいて、このワークフローを調整できます。

### XF Flex OrganoIDマイクロプレートでのオルガノイド培養の調製

オルガノイドは、*in vitro* で取得したか、または生物や生検材料から単離した細胞またはオルガノイドから、XF Flex OrganoIDプレートで培養できます。オルガノイドの培養条件は、ユーザーの実験ニーズによって異なる場合があります。したがって、ユーザー固有のオルガノイドプロトコル、最適なマトリックス足場のタイプ、および濃度を適応させることができます。ここで紹介するプロトコルの例は、50 ~ 100 % マトリゲルでのオルガノイド培養に関するものです。

マトリゲルに懸濁させた細胞またはオルガノイドは、1 ステップ手順または 2 ステップ手順を用いて、XF Flex OrganoIDマイクロプレートに播種できます (図 3)。最初の手順は、各サンプルリザーバーに対して、10  $\mu\text{L}$  の細胞またはオルガノイド/マトリゲル懸濁液を単純に直接入れるものです (図 3A)。この手順は、手動または自動パイオプリンティング装置で実施できます。2 番目の手順は、オルガノイド材料を添加する前に、

#### アッセイ前日より前

XF Flex OrganoIDマイクロプレートでのオルガノイド培養の調製



#### アッセイ前日

アッセイの準備



#### アッセイ当日

化合物の調製と XF アッセイの実施



#### データ解析

データ/画像処理と正規化

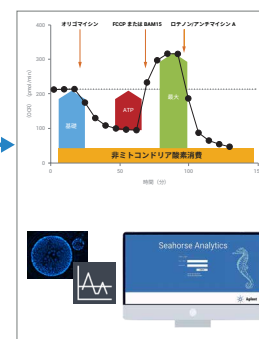


図 2. Agilent Seahorse XF Flex OrganoIDマイクロプレートを使用した、Seahorse XF Flex OrganoIDアッセイワークフロー。

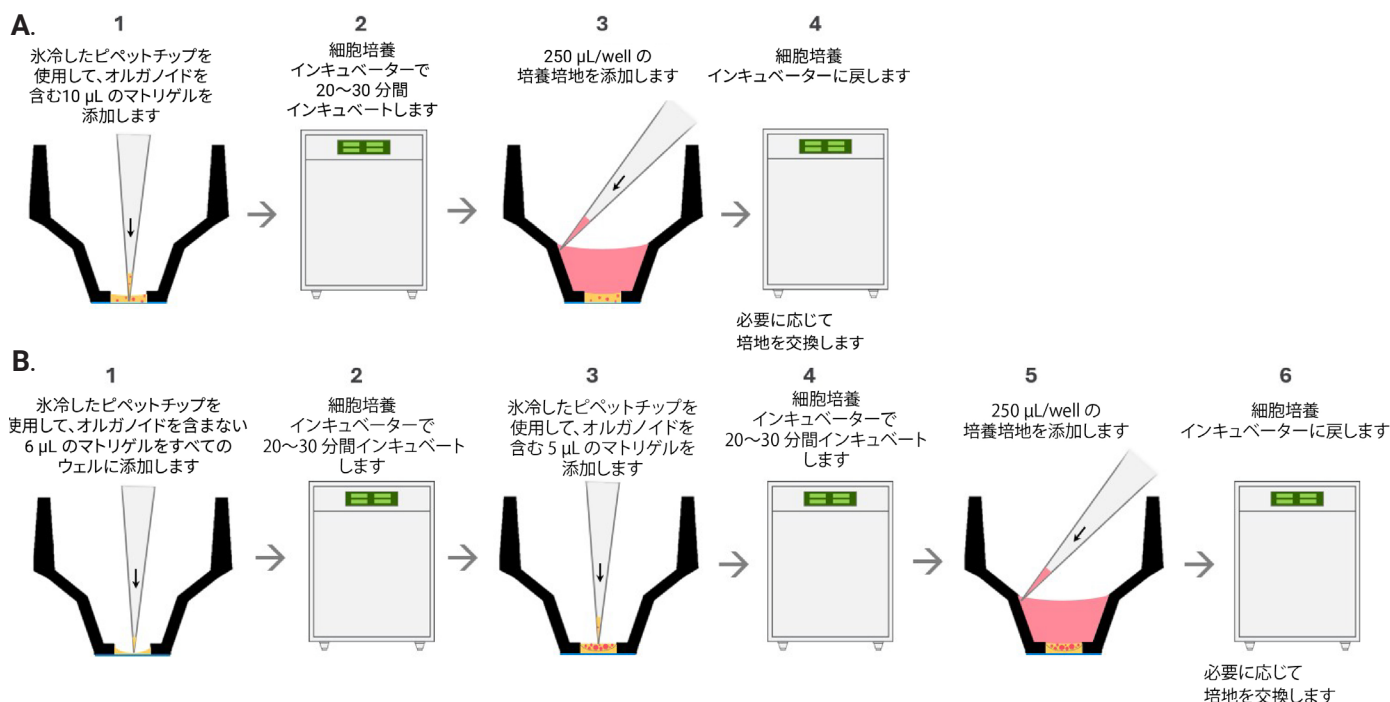


図 3. オルガノイド播種手順。A. 1 ステップ播種手順。B. 2 ステップ播種手順。オルガノイドは、Agilent Seahorse XF アッセイに使用可能になるまで培養されます。

プレーンマトリゲルによるコーティングステップを実施するものです（図 3B）。この手順では、マトリゲル下での意図しない細胞の2次元増殖や、ウェル縁部でのオルガノイドのクラスタリングを防止できます。

XF Flex オルガノイドマイクロプレートにおけるオルガノイド培養の調製を完了するには、以下の手順に従います。

### 1 ステップ播種手順

1. 細胞またはオルガノイドを、培養培地またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈した氷冷の50%マトリゲルに再懸濁します。氷冷したピペットチップを使用して温度を維持し、早期の重合を防止します。
2. 各ウェルのサンプラーリザーバーに、10 µLのマトリゲル-細胞/オルガノイド懸濁液を慎重に分注します。ピペットチップを穏やかに攪拌して、材料が均一に分布するようにします。**ウェル A1 および D6 には播種しないでください。これらは、Seahorse XF アッセイ時にバックグラウンドウェルとして使用するためです。**
3. **A1 および D6 ウェルに**、細胞やオルガノイドを含まない10 µLの希釈したマトリゲルを同様に添加します。
4. プレートを、37 °Cの加湿 CO<sub>2</sub> インキュベーターで20～30分間インキュベートし、マトリゲルを重合させます。
5. 各ウェルに250 µLの予熱した培養培地を慎重に添加し、サンプルを含む重合させたマトリゲルを覆います。
6. 必要に応じて、オルガノイド培養を維持します。ユーザーの特定のオルガノイド培養条件に従って、培地を交換します。

### 2 ステップ播種手順

1. 各ウェルのサンプラーリザーバーに、細胞やオルガノイドを含まない希釈したマトリゲルを6 µL/wellで分注します。ピペットチップを穏やかに攪拌して、マトリゲルがウェルの底面と縁部に均一にコーティングされるようにします。
2. プレートを、37 °Cの加湿 CO<sub>2</sub> インキュベーターで20～30分間インキュベートし、マトリゲルを重合させます。
3. 細胞またはオルガノイドを、冷やしたピペットチップを使用して、培養培地またはPBSで希釈した氷冷のマトリゲルに再懸濁します。重合させたマトリゲル層の上部に、4～5 µLのマトリゲル-細胞/オルガノイド懸濁液を慎重に分注します。**ウェル A1 および D6 には播種しないでください。これらは、Seahorse XF アッセイ時にバックグラウンドウェルとして使用するためです。**
4. バックグラウンドウェルに、細胞やオルガノイドを含まない4～5 µLの希釈したマトリゲルを同様に添加します。
5. プレートを、37 °Cの加湿 CO<sub>2</sub> インキュベーターで20～30分間インキュベートし、上部のマトリゲル層を重合させます。
6. 各ウェルに250 µLの予熱した培養培地を慎重に添加し、重合させたマトリゲル層を覆います。
7. 必要に応じて、オルガノイド培養を維持します。ユーザーの特定のオルガノイド培養条件に従って、培地を交換します。

**注記：**各 Seahorse XF Flex アッセイでは、最低 2 つのバックグラウンドウェル（通常、A1 および D6）が必要になります。したがって、各アッセイでは合計 22 サンプルを解析することができます。バックグラウンドウェルには、細胞やオルガノイドを含めてはいけません。これらのウェルには、サンプルウェルと同じ濃度および容量のマトリゲルを充填する必要があります。

オルガノイドの由来および培養条件は、サンプルリザーバー内に収まるように最適化することが必要になる場合があります。ウェルあたり合計 10 ± 2 µL のマトリックス足場に埋め込まれる場合があります。マトリックス足場のタイプおよび濃度は、ユーザーのプロトコルおよびオルガノイドの特性によって異なる場合があります。37 °Cでの Seahorse XF 解析時には、足場がゲルの状態を維持して、アッセイ培地の pH を変化させないことが非常に重要になります。

## アッセイ前日の準備

### カートリッジの水和

ユーティリティプレートの各ウェルに 1 mL の XF キャリブレーション溶液を充填し、カートリッジとユーティリティプレート一式を、37 °Cの非 CO<sub>2</sub> インキュベーターに一晩入れます。

**注記：**Seahorse XF Flex アナライザーの電源を入れ、一晩かけて温度を安定化させてください。

## テンプレート設計

Seahorse XF アッセイテンプレートには、Seahorse アナライザーに対して測定値の収集と注入の実施を指示する機器プロトコルが含まれています。また、Agilent Seahorse Analytics 内での下流のデータ変換をサポートするために必要なアッセイ設計情報（プレートレイアウトなど）も含まれています。Seahorse XF アッセイテンプレートは、アッセイ前に準備する必要があり、これは Agilent Seahorse XF Flex Controller または Wave Pro ソフトウェアを使用して作成できます。テンプレート作成には、ウェブベースツールである Agilent Seahorse Analytics も使用できます。

このソフトウェアでは、XF Flex オルガノイドマイクロプレートを使用して Agilent Seahorse XF オルガノイドミトストレステスト（XF オルガノイドミトストレステスト）を実施するためのデフォルトのアッセイテンプレートが提供されています。このテンプレートの機器プロトコルでは、3 分間の混合、0 分間の待機、4 分間の測定を 1 測定サイクルとしています（図 4）。合計 18 サイクル（ベースライン測定用 3 サイクル、オリゴマイシン注入後 6 サイクル、FCCP 注入後 4 サイクル、ロテノン/アンチマイシン A 注入後 5 サイクル）が設定されています。測定サイクル内でのパラメーター変更は推奨されていません。ただし、必要に応じて、サイクル数は変更することができます。例えば、ミトコンドリアモジュレーターへの反

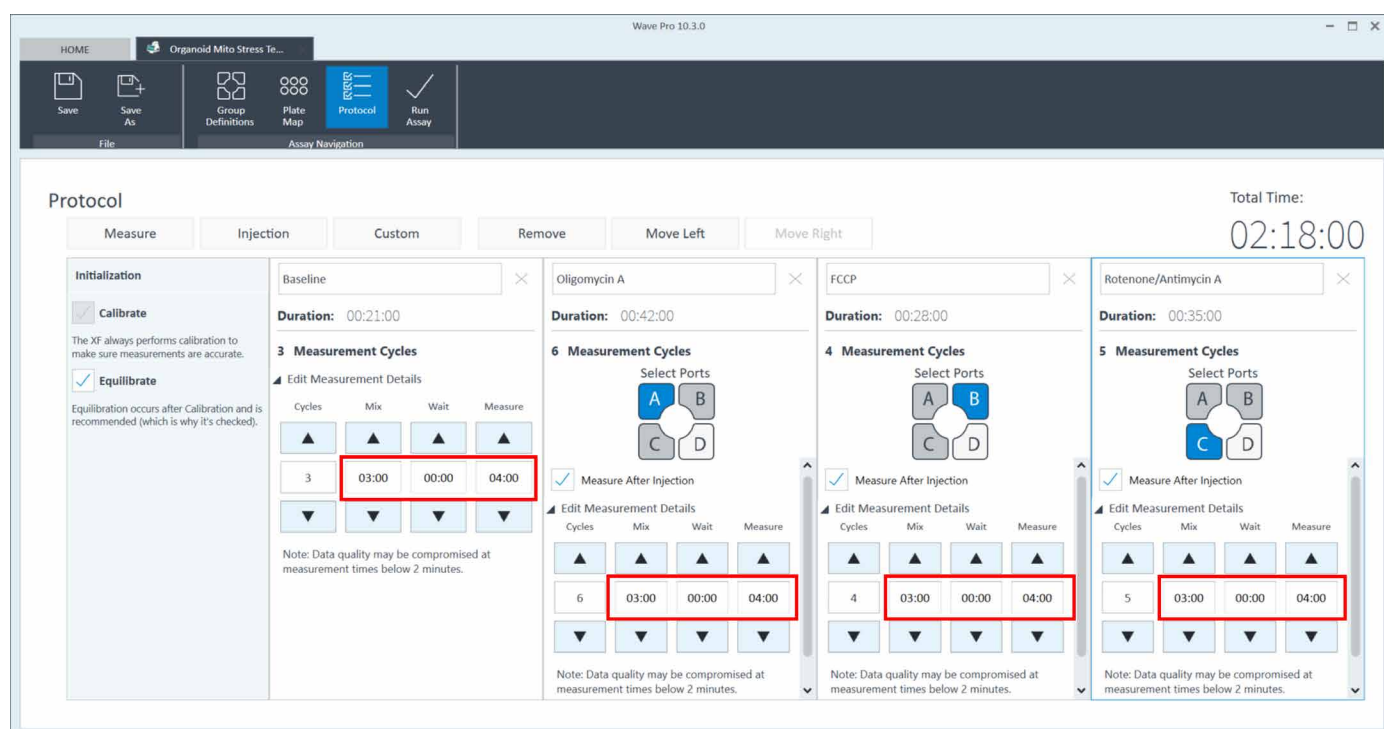


図 4. デフォルトの XF Organoid Mito Stress Test テンプレートでの Agilent Seahorse XF Flex 機器プロトコル。

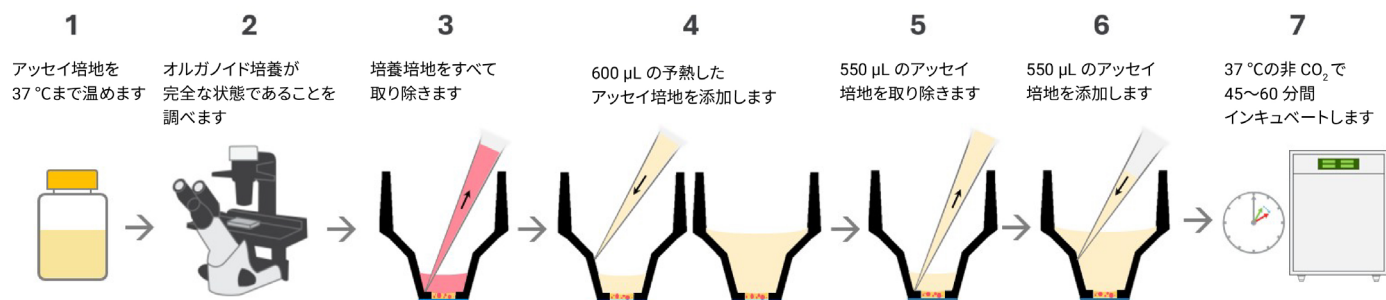


図 5. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートの培養培地を、予熱した Agilent Seahorse XF アッセイ培地に交換します。

応が、プログラムされた測定サイクル内で最大反応に達しない場合、完全な反応を捕捉するために、測定サイクル数を延長することが必要になる場合があります。

## アッセイ当日

### アッセイ培地の調製

表 1 の情報に従って、アッセイ培地を調製します。標準的な Agilent Seahorse XF サプリメント濃度を使用する場合、アッセイ培地の pH を調整する必要はありません。ただし、必要に応じて、アッセイ培地の組成は変更することができます。

表 1. Agilent Seahorse XF アッセイ培地の調製

成分	容量 (mL)	最終濃度 (mM)
Seahorse XF DMEM 培地、pH 7.4 または XF RPMI 培地、pH 7.4	97	–
Seahorse XF 1.0 M グルコース溶液	1	10
Seahorse XF 100 mM ピルビン酸塩溶液	1	1
Seahorse XF 200 mM グルタミン溶液	1	2

注記：BSA と血清は、培地および、インジェクションポートに含めてはいけません。

### XF Flex オルガノイドマイクロプレートの調製

図 5 に示す手法を用いて、オルガノイド培養培地を、予熱した (37 °C) Seahorse XF アッセイ培地と交換します。

1. 各ウェルの側壁にピペットチップを配置し、オルガノイド培養層に触れないようにして培養培地を取り除きます (ステップ 3)。

2. 600 µL の予熱した Seahorse XF アッセイ培地を慎重に添加します (ステップ 4)。
3. 550 µL Seahorse XF アッセイ培地を取り除いて、550 µL の Seahorse XF アッセイ培地を添加します (ステップ 5 および 6)。
4. XF Flex オルガノイドマイクロプレートを 37 °C の非 CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、プレート脱気のため 45 ~ 60 分間保持します (ステップ 7)。

### ミトストレステスト化合物の調製

**注記：**再構成した化合物は調製当日に使用してください。残りの化合物溶液はすべて廃棄してください。冷凍して再利用しないでください。

**注記：**最終注入 (例えば、ロテノン/アンチマイシン A) 溶液には、イメージングおよびデータ正規化の目的で核を染色するために、10 µM Hoechst 33342 (ウェル最終濃度 1 µM) を含めることができます。

各バイアルの内容物を、表 2 に示された容量の予熱したアッセイ培地を用いて再懸濁します。30 秒間ボルテックスするか、または溶液を上下に穏やかにピペッティングして、内容物を完全に溶解させます。得られたストック溶液は、表 3 に示すように、ポートのロード前にさらに希釈することが必要になる場合があります。各試薬の最適な濃度は、オルガノイドのサイズやタイプによって異なる場合があります。したがって、特に異なるオルガノイドモデル間で反応が変動する可能性がある FCCP については、適切な動作濃度を決定するために滴定アッセイを実施することが推奨されます。

表 2. Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキット用ストック溶液の調製。

試薬	キャップの色	添加するアッセイ培地 (mL)	注入溶液濃度 (倍)	ストック溶液濃度 (µM)	最終ウェル濃度 (µM)
オリゴマイシン A	青	2.7	9	270	30
FCCP	黄	2.7	10	200	20
ロテノン/ アンチマイシン A	赤	2.7	11	110	10



表 3. Agilent Seahorse XF 3D ミストストレステストキット用注入溶液の調製。濃度およびロード容量は、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートにおいて、ウェルあたり 600 µL の開始容量に対応します。

注入溶液	ストック溶液 (µL)	アッセイ 培地 (µL)	ウェルでの濃度 (µM)	インジェクション ポートと容量
オリゴマイシン A (9 倍)	1000	2000	10	ポート A : 75 µL
	2000	1000	20	
	2700	0	30	
FCCP (10 倍)	750	2250	5	ポート B : 75 µL
	1500	1500	10	
	2250	750	15	
	2700	0	20	
*ロテノン/ アンチマイシン A (11 倍)	2700	0	10	ポート C : 75 µL

注記：一部の小さいサイズのオルガノイドにおける最適な試薬濃度は、Agilent Seahorse XF ミストストレスキット（103595-100）で対応できます。この場合、Agilent Seahorse XF ミストストレスキットのユーザーガイドに記載された手順に従って、アッセイ培地および注入溶液を調製してください。

注記：一部の細胞またはオルガノイドタイプは、FCCP よりも脱共役剤 Bam15 に対して、より良好な脱共役反応を示します（例えば、T 細胞、NK-T 細胞、MCF-10A など）。これらのタイプのサンプルには、Agilent Seahorse XF T Cell 代謝プロファイリングアッセイキット（103772-100）を使用することを推奨します。

オリゴマイシン注入前に、試験化合物を追加注入する改変型アッセイ（3D ミストストレステスト（急性））を実施する場合は、ウェルでの開始容量を 525 µL として、表 4 に示すインジェクションポート容量を使用してください。

表 4. 改変型アッセイ用注入溶液の調製。濃度およびロード容量は、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートにおいて、ウェルあたり 525 µL の開始容量に対応します。

注入溶液	ポート濃度（倍）	インジェクションポートと容量
試験化合物	8 倍	ポート A : 75 µL
オリゴマイシン A	9 倍	ポート B : 75 µL
FCCP	10 倍	ポート C : 75 µL
ロテノン/ アンチマイシン A	11 倍	ポート D : 75 µL

インジェクションポートへのロード

- 組み立てたセンサーカートリッジを、Seahorse XF ハイドロブラスターおよびユーティリティプレートとともにインキュベーターから取り出します。センサーカートリッジを、上下反対にしてユーティリティプレートの隣に置きます。片手でユーティリティプレートをしっかりと保持し、もう一方の手で 1 つの隅からハイドロブラスターを持ち上げて取り外します。センサーカートリッジを、ユーティリティプレートの元の場所に戻します。各ウェルの側壁にピペットチップを配置し、オルガノイド培養層に触れないようにして培養培地を取り除きます（ステップ 3）。

- 表 3 または表 4 に示したとおりに、ポート注入溶液を各ポートに慎重に分注します。
- インジェクションポートに均一にロードされていることを目視で確認します。ポート内に液体が存在している必要があります。カートリッジの上部に残留液滴が存在しないことを確認します。

Seahorse XF アッセイの実施

注記：測定サイクルは、03:00 分間の混合、00:00 分間の待機、04:00 分間の測定で構成されている必要があります（図 4）。

- 利用可能なテンプレートのリストから適切なアッセイテンプレートを選択し、機器の指示に従ってアッセイを実施します。
- アッセイのグループ（細胞のタイプまたは条件）、プレートレイアウトマップ、機器プロトコルを確認し、必要に応じて変更します。
- Start Run**（分析を開始）をクリックして、Seahorse XF アッセイを開始します。
- 指示が表示されたら、カートリッジの蓋を取り外し、ロードしたセンサーカートリッジとユーティリティプレートをサーマルトレイ上に配置します。プレートの方向が正しく、カートリッジの蓋が取り外されていることを確認します。その後、**I'm Ready**（準備完了）をクリックします。キャリブレーションには約 15 ～ 30 分かかります。
- キャリブレーションの完了後、**Open Tray**（トレイを開く）をクリックしてユーティリティプレートを取り出し、細胞プレートをロードします。ロードする前に、細胞プレートの蓋が取り外されていることを確認します。
- Load Cell Plate**（細胞プレートをロード）をクリックして、アッセイを実施します。

注記：Seahorse XF アッセイ後、データ正規化の目的で各ウェルのオルガノイドの量を定量するために、オルガノイドサンプルをイメージングベースまたはその他の方法でさらに処理できます。詳細については、この文書の最後の「データ正規化」セクションを参照してください。

データ解析

Seahorse アッセイの結果ファイルは、Seahorse Analytics にアップロードして、詳細にデータ解析することができます。図 6 は、「Standard Companion View（標準のコンパニオンビュー）」における代表的な OCR カイネティクスグラフを示しています。Seahorse XF オルガノイドマイクロプレートは、特定の Agilent Seahorse XF アッセイにのみ対応しています（「材料および機器」セクションの表 6 を参照）。解糖は、細胞外酸化速度（ECAR）の測定によってのみ評価できます。マトリゲルによりプロトン拡散速度が変動するため、XF Flex オルガノイドマイクロプレートで生成されたデータでは、PER または glycoPER の計算は利用できません。

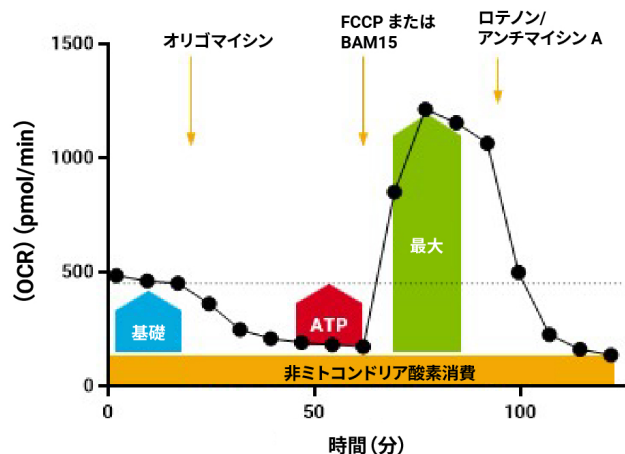


図 6. オルガノイド培養を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステストの例の概略図。

## 材料および機器

表 5. XF オルガノイドワークフローで使用した材料および機器。

材料	販売元	部品番号
Seahorse XF Flex アナライザー	アジレント・テクノロジー	S7851A または S7851AN
Seahorse FluxPak-XF Flex オルガノイド用		103866-100
Seahorse XF Flex 用オルガノイドマイクロプレート		103865-100
Seahorse XF 3D ミトストレスキット <sup>1</sup>		103016-100
Seahorse XF ミトストレスキット <sup>2</sup>		103015-100
Seahorse XF DMEM アッセイ培地/パック、pH 7.4		103680-100
BioTek Cytation 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
セルリカバリーソリューション	Corning	354253
マウス肝前駆細胞オルガノイド	STEMCELL Technologies	70932
HepatiCult Organoid Growth Medium (Mouse)	STEMCELL Technologies	06030
DMEM/F-12 with 15 mM HEPES	STEMCELL Technologies	36254
HCT116-H2B-GFP		
DMEM	Gibco	11995-065
Hoechst 33342	Thermo Fisher	62249

- 一部の細胞タイプは、FCCP よりも Bam15 に対して、より良好な脱共役反応を示します (例えば、T 細胞、NK-T 細胞、MCF-10A など)。これらの細胞タイプで構成されるオルガノイドには、Agilent Seahorse XF T Cell 代謝プロファイリングアッセイキット (103772-100) が使用できます。
- 高化合物濃度を必要としない小さいサイズのオルガノイドには、代替として Seahorse XF ミトストレステストキット (103595-100) が使用できます。
- 別の Seahorse アッセイについては、『[Seahorse XF assay kits and reagents brochure](#) (Seahorse XF アッセイキットおよび試薬カタログ)』を参照してください。

## アプリケーション

### 肝臓オルガノイド：1 ステップ播種手順

マウス肝前駆細胞オルガノイド (STEMCELL、部品番号 70932) から生成した機能性オルガノイドにおいて、代謝表現型を評価しました。簡単に説明すると、オルガノイド片を、メーカーのガイドラインに従って 100 % マトリゲルに再懸濁して継代培養し、1 ステップ播種手順を用いて、XF Flex オルガノイドマイクロプレートにマトリゲル-オルガノイド懸濁液をウェルあたり 10  $\mu$ L 分注しました (図 3A)。安定した球状オルガノイドが 3 日以内に形成され、播種後最大 5 日間使用できます。3 日齢のマウス肝臓オルガノイドの z プロジェクション明視野画像および蛍光画像を図 7 に示します。

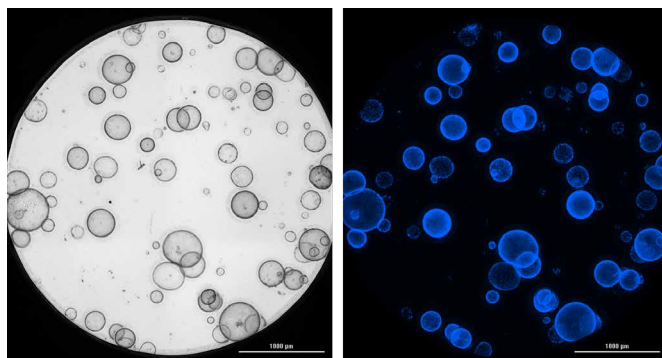
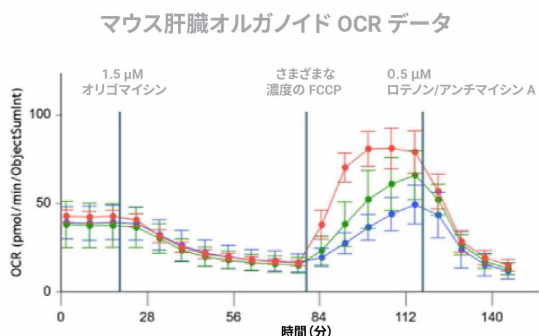


図 7. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートで培養した 3 日齢のマウス肝臓オルガノイド。明視野 (左) および蛍光 (右) 画像は、Agilent BioTek Cytation 細胞イメージングシステムで、Gen5 ソフトウェアプロトコル (厚さ 800  $\mu$ m にわたる 5 スライスの z スタッキング (z プロジェクション) を含む) を用いて、XF ミトストレステスト実施後に撮影しました。アッセイの最終ステップにおいて、Hoechst 33342 をロテノン/アンチマイシン A とともに注入しました。

図 8 に、異なる FCCP 濃度を用いた代表的な XF ミトストレステストの結果を示します。このデータは、XF Flex オルガノイドプレートと XF Flex アナライザーを用いたオルガノイドの代謝解析が実施可能であることを実証しており、すべてのモジュレーターに対して堅牢な反応が観察されています。この FCCP 滴定実験により、脱共役剤注入後の最大 OCR を生じさせる濃度は 4  $\mu$ M であることが明らかになっています。オリゴマイシンとロテノン/アンチマイシン A の最適な濃度もそれぞれ、1.5  $\mu$ M および 0.5  $\mu$ M と決定されています (データは示していません)。ミトコンドリアモジュレーターに対する最大反応は、即座には到達しないことに注意してください。特にオリゴマイシンは、6 回の測定内でもプラトーには到達しません。このため、オリゴマイシン注入後、合計 8 回の測定サイクルを実施し、正確な ATP 産生関連 OCR およびその他のパラメーターを評価しました。これは、マトリゲルの存在が化合物のオルガノイドへの浸透を遅延させるため、頻繁に観察されます。

A.



B.

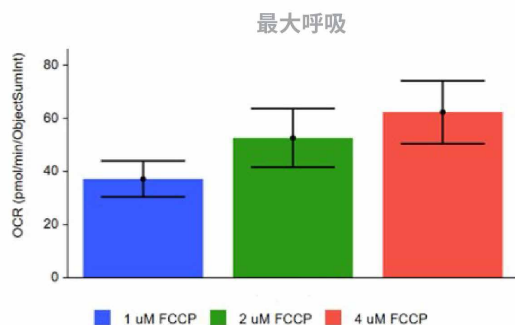


図 8. マウス肝臓オルガノイドにおける FCCP 滴定アッセイ。A. FCCP 濃度の増加に対する反応を示す OCR カイネティクスグラフ。B. パネル A から得た最大呼吸値。OCR データは、Agilent BioTek Cytation 細胞イメージングシステムで測定された、Hoechst 33342 核染色から統合した蛍光強度 (ObjectSumInt) により正規化しました。詳細な手法については、「データ正規化」セクションを参照してください。

## がん細胞由来オルガノイド：2 ステップ播種手順

腫瘍オルガノイド培養は、in vitro 培養した初代細胞または組織生検から開始できます。この例では、XF Flex オルガノイドマイクロプレートにおいてマトリゲルで 5～6 日間培養した、HCT116-H2B-GFP 細胞株を使用しました。簡単に説明すると、氷冷した培養培地に  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  cells/mL で細胞を再懸濁し、1:1 の比率でマトリゲルと混合しました (最終タンパク質濃度約 5 mg/mL の 50 % マトリゲル)。5  $\mu$ L の混合液を、各ウェルで事前に形成されていたマトリゲル層の上部に、2 ステップ播種手順 (図 3B) に従って添加し、500～2,000 cells/well の播種密度を得ました。図 9 の画像は、XF Flex オルガノイドマイクロプレートで 1,000 cells/well という播種密度を用いて生成した、5 日間のオルガノイド培養を示しています。培養中の複数のオルガノイドが、50～150  $\mu$ m の範囲のサイズで確認できます。このタイプのオルガノイド培養 (小さく、サイズが比較的均一) は、低濃度のミトコンドリアモジュレーター (1.5  $\mu$ M オリゴマイシンおよび 0.5  $\mu$ M ロテノン/アンチマイシン混合物) に対してよく反応します。

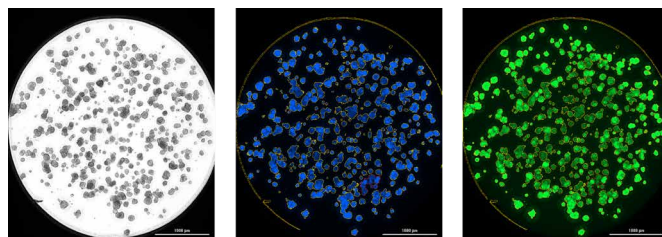
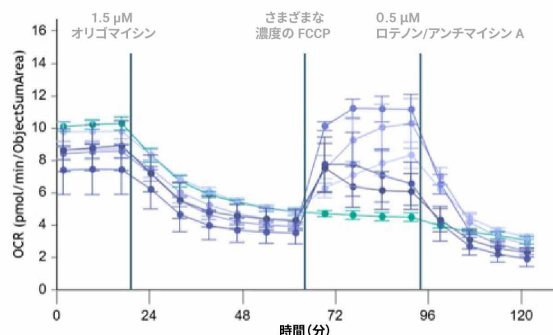


図 9. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートでの 5 日間の HCT116-H2B-GFP オルガノイド培養。明視野 (左) および蛍光 (中央および右) 画像は、Agilent BioTek Cytation 細胞イメージングシステムで、Gen5 ソフトウェアプロトコル (厚さ 800  $\mu$ m にわたる 5 スライスの z スタッキング (z プロジェクション) を含む) を用いて、XF ミトストレステスト実施後に撮影しました。アッセイの最終ステップにおいて、Hoechst 33342 をロテノン/アンチマイシン A とともに注入了。

FCCP 滴定アッセイでは、0.25～4  $\mu$ M の範囲の 6 つの濃度を評価しました。データは、明視野画像で特定された対象物の総面積により正規化しました (詳細については、「データ正規化」セクションを参照)。図 10 に示すように、試験した濃度範囲において FCCP に対する典型的なベル形状の OCR 反応が観察されており、最大反応は 1  $\mu$ M FCCP において得られました。

A.

## HCT116-H2B-GFP オルガノイド OCR データ



B.

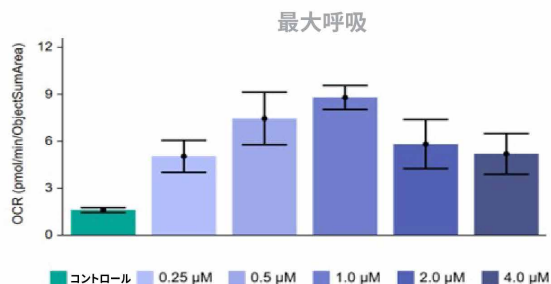
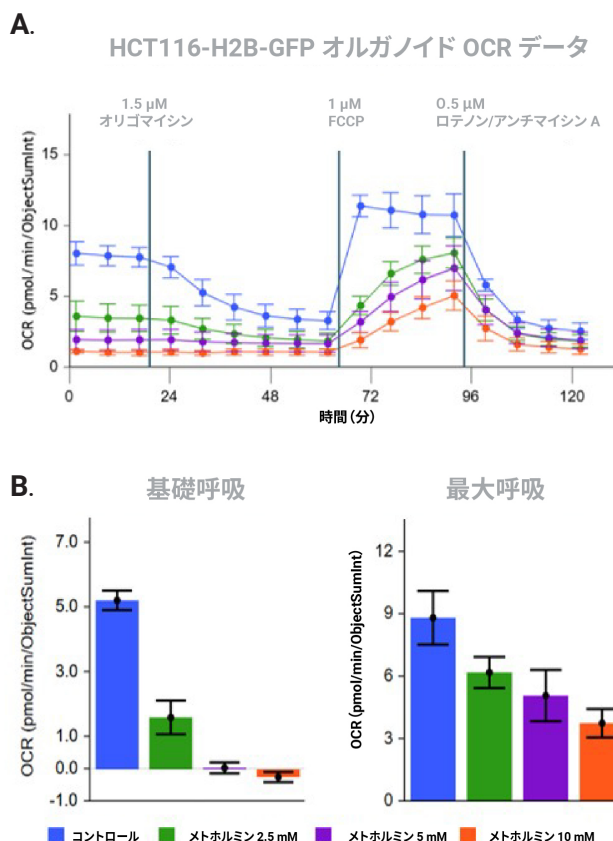


図 10. Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートで培養した HCT116-H2B-GFP オルガノイドの FCCP 滴定。HCT116-H2B-GFP 細胞を、ウェルあたり 11  $\mu$ L の 50 % マトリゲルに埋め込まれた 1,000 細胞で播種してから、5 日間培養しました。A. 明視野の対象物の総面積に対して正規化した OCR カイネティクスグラフ。B. Agilent Seahorse Analytics ソフトウェアにより計算した最大呼吸値。



図 11 のデータは、オルガノイド培養を用いてミトコンドリア機能をターゲットとする化合物の影響を評価する手法を示しています。メトホルミンは、ミトコンドリア呼吸を抑制することでよく知られています。図に示すように、オルガノイド培養をメトホルミンに一晩曝露すると、がんオルガノイドでのミトコンドリア呼吸に濃度依存性の阻害が生じます。



**図 11.** HCT116-H2B-GFP 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影響。HCT116-H2B-GFP 細胞をマトリゲル (5 mg/mL タンパク質) で 6 日間培養し、XF ミトストレステスト実施前に、2.5、5、または 10 mM メトホルミンに一晩曝露しました。OCR データは、Agilent BioTek Cytation 細胞イメージングシステムで DAPI チャンネルを用いて測定した、Hoechst 33342 から統合した蛍光強度により正規化しました。

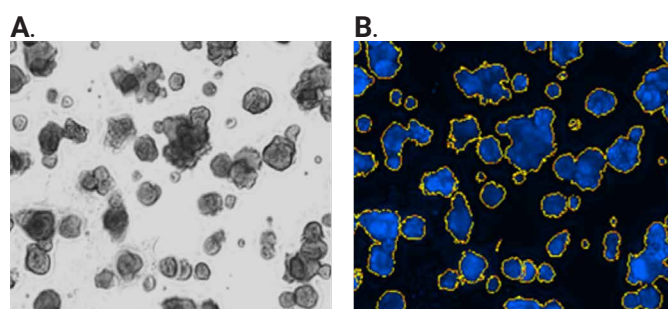
## データ正規化

多くの場合、オルガノイド培養は、数日間にわたるプロセスに依存しており、複雑な増殖と分化が含まれるため、オルガノイドの数、サイズ、形態においてウェル間で大きい変動が生じる場合があります。個々の細胞を計数することはできないため、データ正規化にはオルガノイド特有のサンプル定量手法が必要になります。以下に、幅広いオルガノイドモデルに適用できる 2 つの手法を示します。1 つ目は、z プロジェクション明視野画像で特定された対象物の総面積 (Object Sum Area) または領域内で

統合した蛍光強度 (Object Sum Int) を用いて、ウェルのオルガノイド材料の量を定量する画像ベースの手法です。2 つ目は酵素による手法であり、Seahorse XF アッセイ終了時にウェルに存在する生存細胞の量を、CellTiter-Glo cell viability assay (Promega) などの生存率アッセイを用いて定量します。

## イメージングベースの手法を用いたオルガノイドの定量

顕微鏡イメージングは、サンプルのサイズ/量を推定するのに一般的に適用できる手法です。図 12 は、Cytation 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取得した 4 倍の高コントラスト明視野 (HCBF) 画像と蛍光画像による、オルガノイドの特定例を示しています。合計 5 つの異なる焦点画像を撮影し、単一平面画像にプロジェクションしました (図 12A)。同時に、Hoechst 33342 画像を収集およびプロジェクションしました (図 12B)。Gen5 ソフトウェアによりオルガノイド対象物を特定した結果を、図 12B の黄色の境界線で示しています。すべてのオルガノイド対象物の総面積 (Object Sum Area) を分母として使用し、アッセイデータを正規化できます。各オルガノイド対象物の細胞密度の変動を考慮するため、図 12B に示すように、対象物の境界内で統合した総蛍光強度 (Object Sum Int) を測定できます。



**図 12.** 画像ベースのオルガノイド特定と蛍光強度検出の例。A. 5 つの z スタックスライスからプロジェクションされた明視野画像。このプロジェクション画像から、対象物とその境界を定義しました。B. 同一ウェルにおける蛍光画像。Hoechst 33342 核色素で染色しています。黄色の線は、z プロジェクションされた明視野画像から定義された対象物の境界を示しています。境界内の蛍光強度は、Gen5 ソフトウェアで計数することができます。

## 生存率アッセイを用いたオルガノイドの定量

発光ベースの ATP 定量は、ATP レベルに比例した発光シグナルを測定することで細胞生存率を評価するために広く使用されている手法です。この目的には、CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega、部品番号 G9241) および CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega、部品番号 G9681) が一般的に利用されます。マトリックス足場 (マトリ

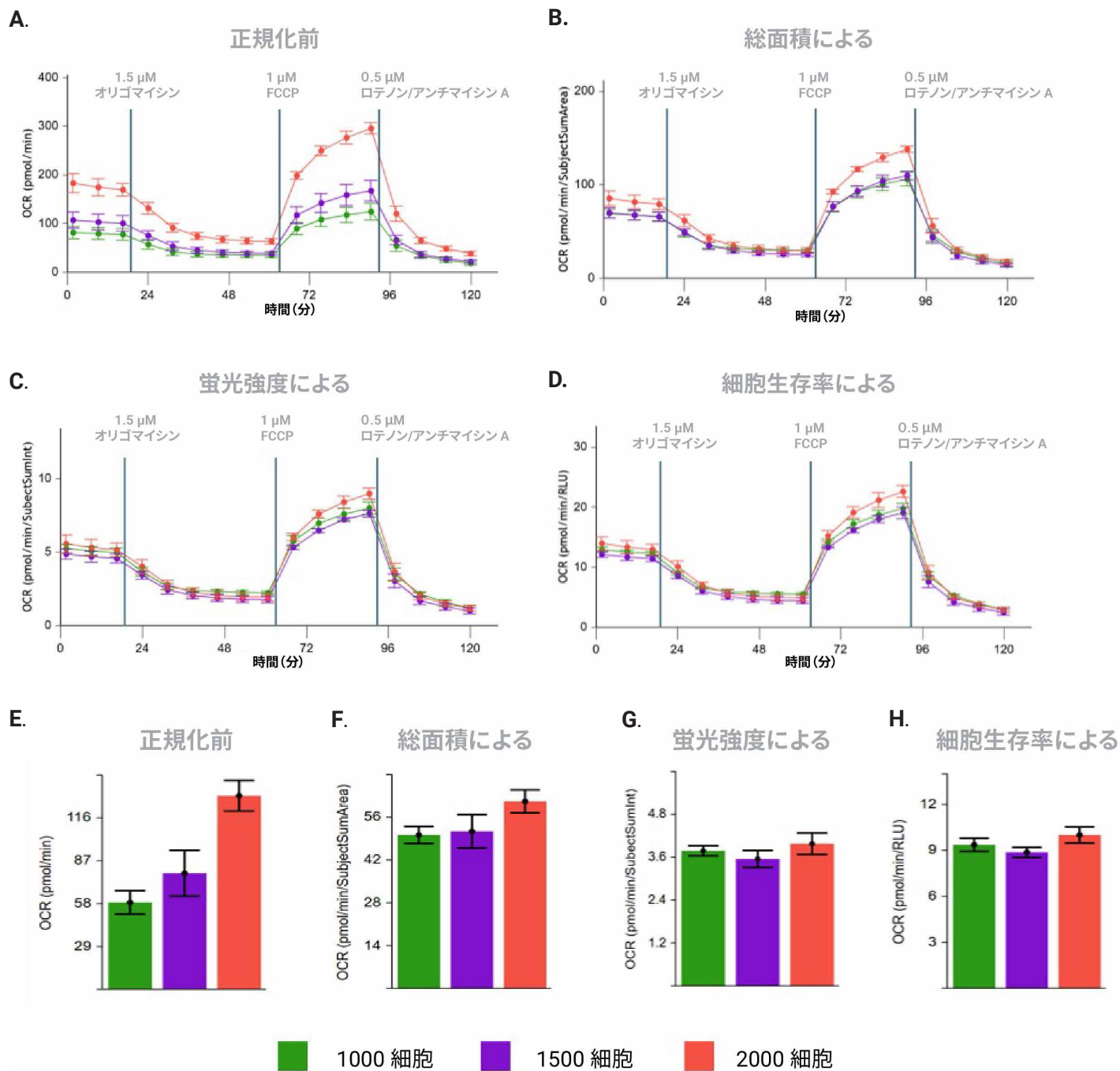


図 13. 対象物の総面積 (ObjectSumArea)、統合した蛍光強度 (ObjectSumFit)、および CellTiter-Glo 2.0 cell viability assay で測定した生存率 (RLU) による正規化方法の比較。A ~ D. 正規化前後のカイネティクス OCR グラフ。E ~ H. 正規化前後の基礎 OCR。

ゲルなど) 内に埋め込まれたサンプルの生存率を評価するには、細胞生存率アッセイを実施する前に、マトリックス溶出とサンプル回収を含む、Seahorse XF アッセイ後の適切な手順が必要になります。

以下に示すのは、本研究でオルガノイドサンプルの生存率測定値（相対発光強度として表される）を取得するために使用した簡単な手順です。使用する特定のオルガノイドタイプとマトリックス足場によっては、さらなる最適化が必要になる場合があります。

1. Seahorse XF アッセイ後、図 5（ステップ 3）に示すように、XF アッセイ培地を完全にに取り除きます。
2. 30  $\mu$ L の氷冷した Corning のセルリカバリーソリューションまたは同等のマトリゲル分解試薬を添加します。
3. プレートと、氷上または 4  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートします。
4. 160  $\mu$ L の Seahorse XF アッセイ培地または PBS を添加し、上下にピペティングを繰り返して、マトリゲルからオルガノイドを回収します。
5. 200  $\mu$ L の CellTiter-Glo ワーキング試薬を添加して、十分に混合し、室温で 10 分間インキュベートします。
6. XF Flex オルガノイドマイクロプレートの発光強度をプレートリーダーで測定します。

## 正規化方法の選択

正規化方法は、オルガノイドの特性と具体的な研究目的の両方に基づいて選択する必要があります。上で紹介した 2 つの手法は、オルガノイド内の絶対細胞数を示すものではないため、独立した実験間でデータを比較する能力には限界があります。これに対処するためには、各実験に参照コントロールグループを含めるか、または利用可能な場合には検量線を使用することが推奨されます。信頼性と再現性の高い結果を得るためには、正規化手順のさらなる改良と最適化が必要になる場合があります。

図 13 に示す例では、前述した 3 つのデータ正規化方法が適用されています。そのすべてにおいて、ウェル間のサンプルのサイズ/量の変動により生じるウェル間変動が低減されています。ここで、3 つの実験グループは、異なる 3 つの初期播種密度（1000、1500、2000 cells/well）から作製された HCT116-H2B-GFP オルガノイドを表しており、Seahorse XF ミトストレステストは、1.5  $\mu$ M オリゴマイシン、1  $\mu$ M FCCP、0.5  $\mu$ M ロテノン/アンチマイシン A を用いて実施しました。HCT116-H2B-GFP オルガノイドは、播種密度に対応する基礎 OCR 増加量（80 ~ 180 pmol/min）を示しました。正規化後、異なる播種密度における基礎 OCR シグナルは、互いに 15 % 以内に収まりました（図 13 E ~ H）。さらに、3 つの方法すべてにおいて OCR 変動が大幅に低減されており、データ正規化に適していると考えられます。

## 結論

この技術概要で示した Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドワークフローは、Seahorse XF 技術が提供する一連のツールに追加された革新的な機能であり、これにより研究者は、従来の 2 次元細胞培養を超えてリアルタイム代謝解析を拡大することができます。このワークフローは、Agilent Seahorse XF Flex オルガノイドマイクロプレートにより実現されており、マトリックスに埋め込まれたオルガノイドを数日間培養して、代謝解析や高分解能イメージングアッセイの実施時に、オルガノイドサンプル（または、その他の 3D サンプル）を所定の位置に確実に保持することができます。このワークフローは簡単に採用して、多くのオルガノイドタイプに適応することができ、ここで示す例が実証しているように、堅牢な代謝測定を実現できます。Seahorse XF 技術のこの新機能により、幅広い生物医学研究分野において、生理学的に関連した発見が可能になります。

さまざまなユーザー間でオルガノイドの由来、培養方法、研究目的が異なることを考慮し、このアッセイを日常的に実施する前に、最適化研究を実施することを強く推奨します。この技術概要で示したガイドラインに従うことは、特定の実験ニーズに合わせた堅牢で再現性の高い結果を保証するのに役に立ちます。

このアプリケーションで使用されている製品

#### 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 ミトストレスキット](#)

[Agilent Seahorse XF ミトストレスキット](#)

[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](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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おりません。  
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。

RA251017.531

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, October 31, 2025

5994-8742JAJP

販売店