



高速ポイントスキャン共焦点顕微鏡を利用した、オンチップ生体培養の定量三次元解析

Organs-on-chips(臓器チップ)は、標準的な二次元組織培養システムよりも、生体組織の三次元構造および機能の複雑さを忠実に再現できます。しかし、この高度な細胞培養プラットフォームの画像取得をベースとするアプリケーションにおいては、技術的な課題があります。本アプリケーションノートでは、ニコンのA1R HD25ポイントスキャン共焦点顕微鏡およびCFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズ、NIS-Elementsソフトウェアを使用して、Emulate社のOrgan-Chipプラットフォーム上で生細胞を高速かつ深部まで定量的にイメージングした例を紹介します。

近年、細胞や組織の複雑な三次元培養モデルの急速な普及に伴い、生細胞の深部イメージングのための安定したソリューションの必要性が注目されています。このような高度な細胞培養モデルは一般的に「organs-on-chips」と呼ばれ、多くは半導体産業で培われてきた微細加工技術とリソグラフィ技術を利用して、生体内の細胞により近い、構造的に複雑な微小環境を構築しています。たとえばEmulate社は、柔らかい細孔膜組織で上下に仕切られた2層の微小成型チャンネルを内蔵するPDMS「チップ」、Organ-Chip (Chip-S1™)を商品化しています。各チャンネルの表面を組織特異的な細胞外マトリックスでコーティングした後、それぞれに細胞を接種し、膜組織の表裏に単層を形成します。Organ-Chipプラットフォームは、さまざまなバリア組織のモデリングに特に好適です。たとえば、Caco-2結腸直腸腺癌細胞などの上皮細胞を上部チャンネルの膜組織上側で増殖させ、ヒト内皮血管細胞などを下部チャンネルの膜組織下側で培養することにより、腸の上皮バリアをモデリングすることができます(略して「Caco-2 腸チップ」と呼びます)。この革新的なチップ設計により、上皮-内皮間の相互作用や細孔膜組織を通じた傍分泌シグナル伝達、チャンネル内の培地灌流による栄養素-老廃物の交換や流体せん断の他、柔軟な膜組織を一方方向に伸長することによる腸の蠕動を模倣した機械的応力の伝達などを、正確に制御できます。

このEmulate Organ-Chipのようなorgan-on-chip技術は、毒性学などの分野で利用されていますが、チップの設計が三次元的な性質を持つことから、生細胞イメージングのアプリケーションでは使用が困難です。たとえば、Organ-Chipの断面図を見ると、下層のPDMSサポートスラブ(600 μm)と下部チャンネル(200 μm)、膜組織界面(50 μm)の厚さが、合計で850 μm 以上になることがわかります。

Michael Yang* and Jeffery Bylund*

Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA.
*e-mail: michael.yang@nikon.com; jeffery.bylund@nikon.com

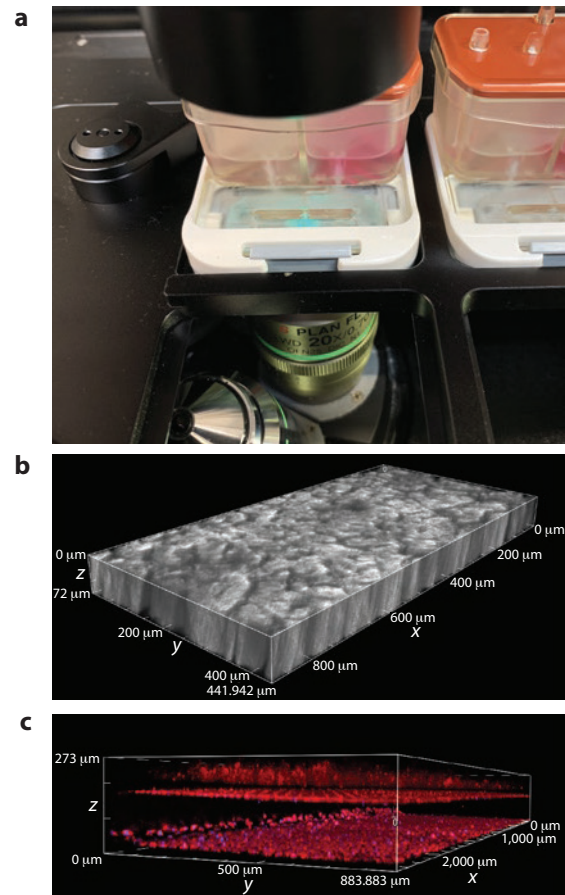


図1. 生体Emulate Organ-Chipの高速深部イメージング

a、ニコンのステージアダプター(TI2-S-HP)に置いたPod-1モジュール内のChip-S1。b、上部チャンネル内のCaco-2絨毛状構造を撮影した透過光Zスタック画像。c、下部チャンネルと上部チャンネルの一部までわたるZスタックタイリング画像。内皮単層が下部チャンネルの上面($Z = 180\mu\text{m}$)と底面($Z = 30\mu\text{m}$)を覆っている。Caco-2絨毛状構造が、膜組織表面から上部方向に伸びている($Z = 200\mu\text{m}$)。細胞はTMRE(赤)とHoechst 333342(青)で標識した。

APPLICATION NOTES

また、生体Organ-Chipは、培地の灌流と微小環境の制御のためにPod-1™モジュール(図1a)に収納されているため、対物レンズとOrgan-Chip底面との間には、ミクロン単位の余分なスペースが生じます。ニコンは、CFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズを開発することで、Organ-Chipなどの三次元細胞培養システムを使用した深部イメージングに対する、安定したソリューションのニーズに応えました(図1a)。この対物レンズは2,300 μm もの作動距離があり、高さがさらに1,000 μm ある上部チャンネル全体もイメージングすることが可能です。CFI S Plan Fluor LWD対物レンズを使用することで、膜組織界面の上部(図1b)に形成され、Caco-2 Chip内の上部方向に向かって70 μm 以上も伸びているCaco-2絨毛状構造を容易にイメージングできます。さらにCFI S Plan Fluor LWD対物レンズは、このような長作動距離を持つ20倍の対物レンズとしては非常に高い開口数(0.7)を持ち、蛍光イメージングのアプリケーションに適しています。これらの機能は、業界最大の25mmの視野数と、高速画像取得(フルフレームで最大毎秒30フレーム)を実現する高精細レゾナントスキャンモードを搭載した、A1R HD25ポイントスキャン共焦点顕微鏡において特に重要となります。たとえば図1cは、核と活性ミトコンドリアをそれぞれHoechst 33342とテトラメチルローダミンエチルエステル(TMRE)で蛍光染色して可視化した生細胞を、Caco-2 Chip内でレゾナントスキャンにより取得してデノイズ処理を施した後、タイリングした3x1のZスタック画像を示しています。25mmの広視野により、チャンネル幅のほぼ全域が20倍の倍率で取得できています。さらに、レゾナントスキャンによりZスタックの範囲を高速で取得でき、下部チャンネルの上面と底面を覆う上皮細胞に加えて、膜組織界面の上部に伸びているCaco-2絨毛状構造も捉えられています。人工知能(AI)技術を採用したNIS-Elements Denoise.aiモジュールにより、取得後の画像から簡単に高速に、かつ確実にショットノイズを除去でき、時間のかかるガルバノモードと同等の画質が得られています。この構成は、生細胞やハイコンテンツの三次元イメージングアプリケーションに適した速度で、数百ミクロンの厚みの空気とPDMS、細胞を通して高品質な共焦点画像を高速に取得できます。生物学的な機能分析におけるA1R HD25共焦点顕微鏡とCFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズの有用性を実証するため、Caco-2絨毛状構造の形成後に、異なる用量のGFP発現大腸菌をCaco-2 Chipに接種し、ヒトの腸内細菌の相互作用をモデリングしました。20時間にわたってGFP発現大腸菌と共培養したところ、Caco-2絨毛状構造は接種量に応じて劣化しました(図2a~c)。これがCaco-2上皮バリアの浸透性にどのように影響するかを評価するため、細胞不透過性極性トレーサーであるCascade Blueを上部チャンネルから培地に灌流させ、損傷したCaco-2単層と細孔膜組織を通して下部チャンネルまで透過させました。高速での深部イメージングが可能なA1R HD25レゾナントスキャナーとCFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズを使用して、下部チャンネルから上部チャンネルの大部分にわたるCascade Blue蛍光のZスタックバンドスキャンを行いました(図2d)。NIS-ElementsのGeneral Analysis 3を使用することで、このZスタック画像からCascade Blue蛍光の強度Zプロファイルを定量化できます。特に、チャンネル内の異なるX位置で取得したZスタック画像により、Cascade Blue色素が

チャンネルの長さ全域に渡って、徐々に下部チャンネルに蓄積していることがわかります(図2e)。色素の下部チャンネルへの浸透が、主に分子拡散によって起こることを考えれば、これは驚くべきことではありません。しかしこれにより、色素の蓄積および上皮バリア機能を代替するCascade Blue蛍光強度の微妙な変化を検出できており、A1R HD25はin situの条件下において蛍光強度の検出に関して高い感度を有していることが明らかになりました。通常、プレートリーダーを使用して排出培地のバルク蛍光を測定し、見掛け上の透過係数を推定しますが、この方法ではGFP発現大腸菌に20時間暴露した後のCaco-2 Chip内において、透過性の大きな変化は検出できませんでした(図2f)。対照的に、A1R HD25は、下部チャンネルにおけるCascade Blue蛍光の大幅な増加を一貫して検出し、GFP発現大腸菌への同じ時間の暴露に対応してバリアの完全性が劣化していることを示しました(図2g)。しかも、GFP発現大腸菌の用量の増加に対応する蛍光の変動も識別できました。

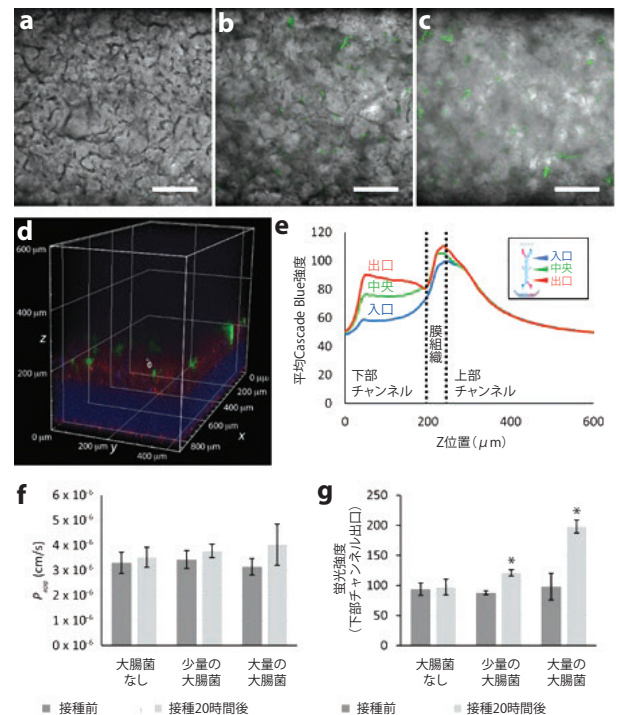


図2. 生体Emulate Organ-ChipにおけるCaco-2上皮バリア機能の定量イメージング

a~c. GFP発現大腸菌がない場合(**a**)、少量存在する場合(**b**, $\text{OD}_{600} = 0.01$)、大量に存在する場合(**c**, $\text{OD}_{600} = 0.1$)のそれぞれにおける20時間のCaco-2絨毛状構造のガルバノ画像。スケールバー:200 μm 。**d.** 上部チャンネルと下部チャンネルを分離する膜組織($z = 200\mu\text{m}$)の上のCaco-2単層(赤)とGFP発現大腸菌(緑)を通過する、Cascade Blue蛍光色素の浸透を示すレゾナントZスタック画像。**e.** Emulate Chip-S1(挿入図)内の異なる位置におけるCascade Blue強度のZプロファイルを定量化。**f.** a~cの接種条件に対応するCascade Blueの見掛け上の透過係数(P_{app})をプレートリーダーを使用して定量化。**g.** 同じ接種条件においてCascade Blueの蛍光強度をin situでA1R HD25共焦点顕微鏡を使用し測定。* $P < 0.05$ は、対応するtテストで判定されたもの。エラーバーは条件あたり $n = 4$ Organ-Chipsの標準偏差。

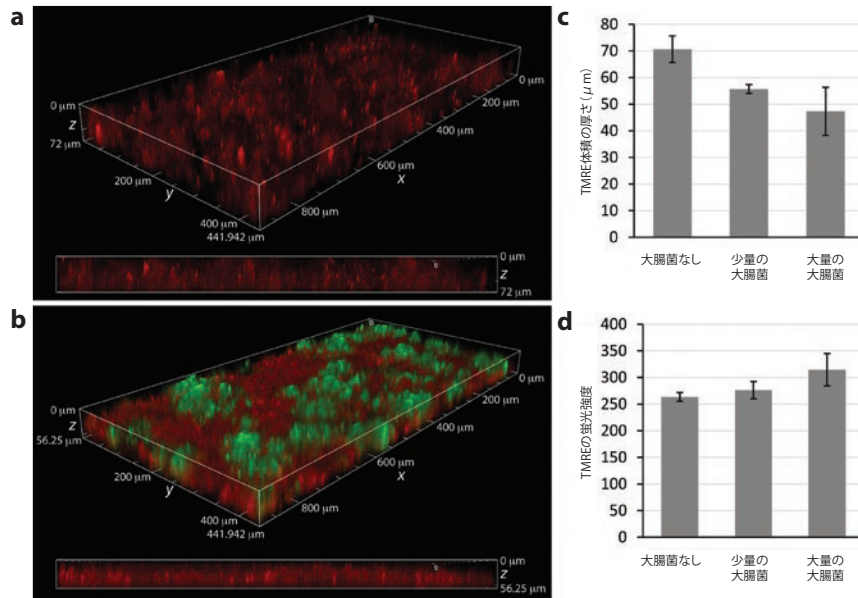


図3. 生体Emulate Organ-Chipのミトコンドリア膜電位イメージング

a, b. GFP発現大腸菌(緑)がない場合(a)または存在する場合(b)における20時間の、Chip-S1内のCaco-2細胞を撮影したZスタック3D投影図および断面図。細胞はその後、活性ミトコンドリアに蓄積しやすいTMRE(赤)で染色した。c, d. Zスタック画像のTMRE信号を3Dしきい値処理し、ミトコンドリア膜電位の測定手段となるCaco-2単層の厚さ(c)およびTMRE蛍光強度(d)を推定した。エラーバーは条件あたりn = 2 Organ-Chipsの標準偏差。

A1R HD25共焦点顕微鏡とCFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズは、バリア機能の変動の測定以外にも、TMRE色素を使用した、Caco-2単層のミトコンドリア活性の評価にも使用可能です。確立されたOrgan-Chip腸内細菌叢モデルでは、GFP発現大腸菌を共培養したCaco-2細胞においてTMRE蛍光がより強くなりますが、これはミトコンドリアの過分極を示唆しています(図3a, b)。また、TMRE信号の体積分布からは、Caco-2細胞の単層が、GFP発現大腸菌の存在下では薄く平板になっていることがわかりますが、これは、すでに観察された絨毛状構造の劣化と同一の結果です。より定量的な評価を得るために、NIS-ElementsのGeneral Analysis 3を使用して、TMRE Zスタック画像で3Dしきい値処理を実行し、蛍光信号を含む3次元領域を識別しました。短軸の長さ(または厚さ)および輝度を測定した結果、Caco-2上皮単層の厚さとミトコンドリア膜電位では、大腸菌による損傷への反応について逆の傾向が見られ、定性的観察を裏付ける結果となっています。

結論

ニコンは、A1R HD25高速ポイントスキャン共焦点顕微鏡や、長作業距離のCFI S Plan Fluor LWD 20XC対物レンズ、NIS-Elementsに搭載した多機能なAI対応画像処理解析ソフトウェアなど、高速・深部・定量的な生細胞イメージングのための確実なソリューションを提供します。本アプリケーションノートでは、Emulate Organ-Chipプラットフォームのイメージングアプリケーションを紹介しましたが、ニコンの高機能 A1R HD25や関連するイメージング技術を活用することにより、他のイメージングプラットフォームでは観察困難なオルガノイドやスフェロイド、人工微細組織など、その他の複雑な三次元細胞培養システムの、ハイコンテンツおよびライブタイムラプス取得のアプリケーションも開発することが可能です。