



Cell3iMager duos / duos2 を用いたオルガノイドのラベルフリー解析

はじめに

近年、再生医療や創薬研究におけるオルガノイドの研究が急速に発展しています。一般的にゲル等を用いた三次元培養法を用いるため、オルガノイドのイメージングは困難です。また、オルガノイドはヘテロな細胞集団であり個々のオルガノイドごとに不均一な形態を示します。したがって、単純な2値化閾値による画像処理方法では、明視野画像から高精度なオルガノイドのセグメンテーションができず、画像解析による定量は困難です。蛍光標識を用いた場合は画像解析が容易になりますが、細胞にダメージを与えてしまい、サンプル作製の手間やコスト増加に加えて、イメージング作業自体にも時間を要します。これはオルガノイドを用いたハイスループットスクリーニングや品質管理を行う際に大きな問題となります。

Cell3iMager duos / duos2を使用することでオルガノイドの明視野/蛍光イメージングを簡単に行うことができます(図1)。また、Deep Learningプラグインを使用することで、誰でも簡単に明視野画像中のオルガノイドを画像解析できるようになり、オルガノイドのモニタリングや毒性評価、その他のラベルフリーアッセイに応用することが可能です。本実験ではディープラーニングを用いて、ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの様々なアッセイをラベルフリーで評価しました。

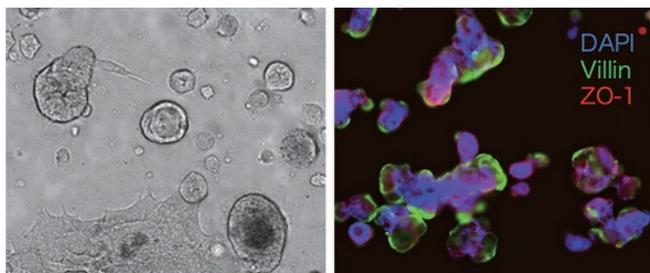


図1: Cell3iMager duos2で撮像したオルガノイドの画像例
(左) 明視野画像(右) 蛍光画像

Materials&Methods

使用製品

Cell3iMager duos / duos2
Deep Learningトレーニングツール
Deep Learningプラグイン
Multi Type Objectsプラグイン

外部ツール

Python(グラフ作成とIC50計算に使用)

サンプルおよび試薬

hiPSC由来腸管オルガノイド(DefiniGEN)
オルガノイド専用培地(DefiniGEN)
Matrigel GFR(CORNING)
24ウェルプレートF底(CORNING)
96ウェルプレートF底(CORNING)
DMSO(Wako)
Forskolin(R&D Systems)
IBMX(Sigma)
CFTRinh-172(R&D Systems)
GlyH-101(R&D Systems)
lavopiridol(Sigma)
Loperamide(Sigma)
5-FU(Sigma)

方法

オルガノイドをマトリゲルドームまたはマトリゲル混合培地に包埋し、37°C、5%-CO₂条件下で培養しました(図2)。

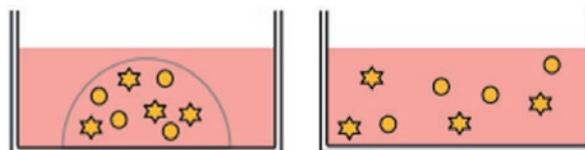


図2: 培養中オルガノイドの模式図
(左) マトリゲルドーム(右) マトリゲル混合培地

定期的にインキュベーターからウェルプレートを取り出し、Cell3iMager duos / duos2の高倍率レンズを用いて明視野撮像を行いました。フォーカス位置を変動させながら撮像を行うことで、ドーム内の異なる高さに位置するオルガノイドそれぞれにフォーカスの合った画像を取得し(50 μmピッチ、31レイヤー)、取得したフォーカス変動画像を自動合成することにより(図3)、すべてのオルガノイドに焦点があった全焦点画像を得ることができます(図4)。



図3: オルガノイドの撮像方法
 (左) 培養中オルガノイドとフォーカス変動位置の模式図
 (右) フォーカス変動画像と合成後の全焦点画像

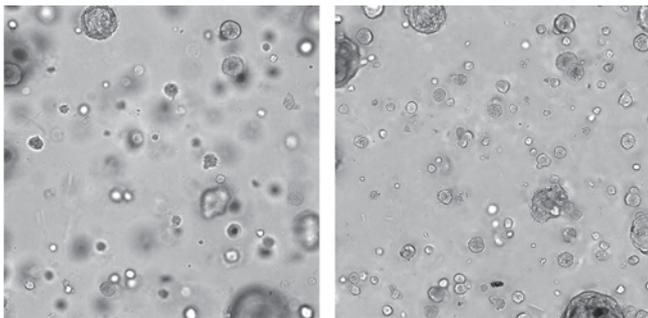


図4: オルガノイドの自動フォーカス合成画像
 (左) フォーカス合成前の画像
 (右) フォーカス合成後の全焦点画像

Deep Learningトレーニングツールを用いて明視野画像中の目的とするオルガノイド領域をラベルすることで教師画像を作成しました。次に、作成した教師データセット(明視野画像とラベル画像)を用いて1~3時間の学習を行いました(図5)。学習によって作成されたモデルファイルを未知の画像に適用するだけで、ディープラーニングや画像処理の経験が少ない研究者であっても明視野画像中のオルガノイドを簡単にセグメンテーションし、解析することができるようになります。

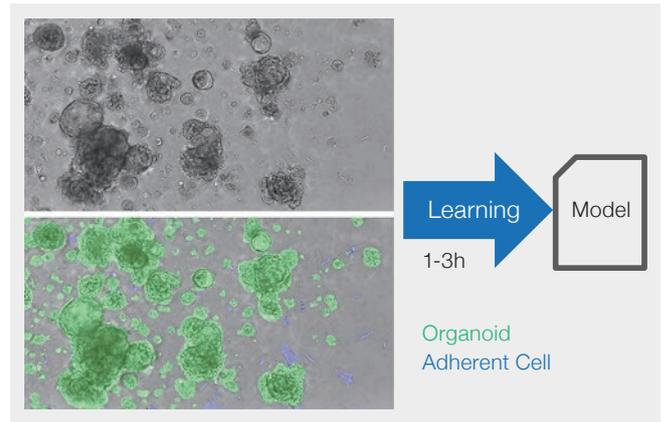


図5: ディープラーニングの概要
 明視野画像中のオルガノイドをラベルし、明視野画像とラベル画像の教師データセットを学習することでモデルを作成します

結果

オルガノイドのモニタリング

24ウェルプレートにオルガノイドをドーム培養し、24時間毎に撮像した明視野画像からオルガノイドと接着細胞をそれぞれセグメンテーションしました。Multi Type Objectsプラグインを用いることで複数細胞種を同時に解析することが可能になります(図6)。セグメンテーション画像から、ドームの端部分に接着細胞が多いことが分かりました。

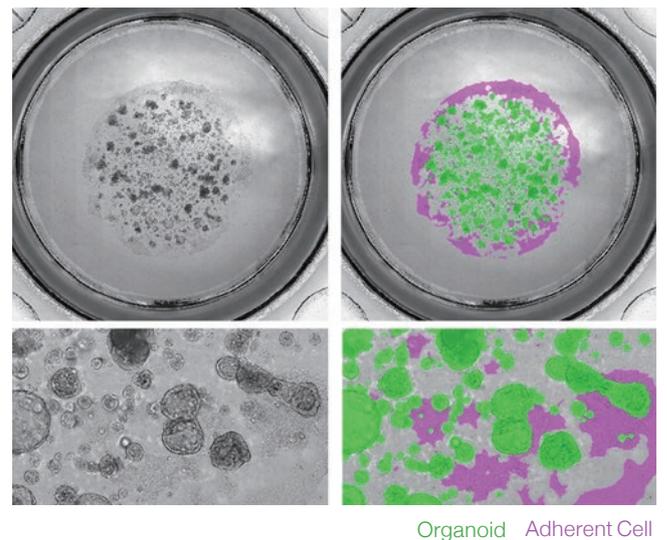


図6: 培養7日目の明視野画像とセグメンテーション画像
 (左) 明視野画像
 (右) オルガノイドと接着細胞のセグメンテーション画像

明視野撮像は非侵襲撮像のため、同じサンプルを撮像してもオルガノイドと接着細胞は問題なく増殖することが確認できました(図7)。



図7: 経時的なセグメンテーション画像

また、セグメンテーション画像から面積値を計測した結果、接着細胞は培養7日目まで面積が増加し続けた一方で、オルガノイドは培養6日目以降は面積が増加していないことがわかりました(図8)。この結果から、培養6~7日目がオルガノイドの継代時期として適していると考えられます。

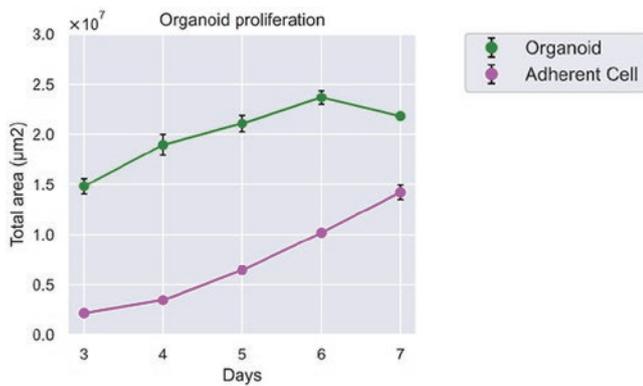


図8: オルガノイドと接着細胞面積の定量結果

オルガノイドの中心領域をラベルし学習することで、オルガノイドの中心領域をセグメンテーションすることもできました(図9)。この方法により培養中のオルガノイド数を非侵襲でカウントすることができます(図10)。

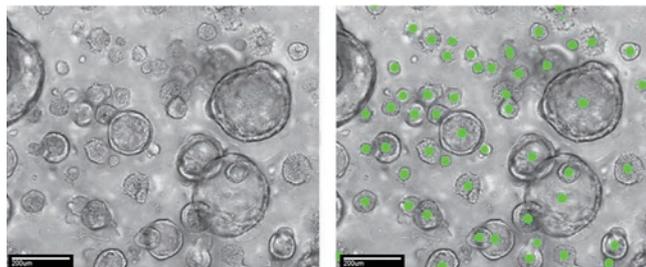


図9: オルガノイド中心領域のセグメンテーション
(左) 明視野画像
(右) オルガノイド中心領域のセグメンテーション



図10: オルガノイド数の定量結果

オルガノイドの毒性評価

96ウェルプレートにオルガノイドをマトリゲル混合培地で培養し、腸管毒性誘導薬剤の添加0、24、48、72時間後に明視野撮像を行いました。Calcein-AM/PI染色したオルガノイドの蛍光画像をもとにディープラーニングのモデルファイルを作成し、明視野画像から生死それぞれのオルガノイドをセグメンテーションしました(図11)。

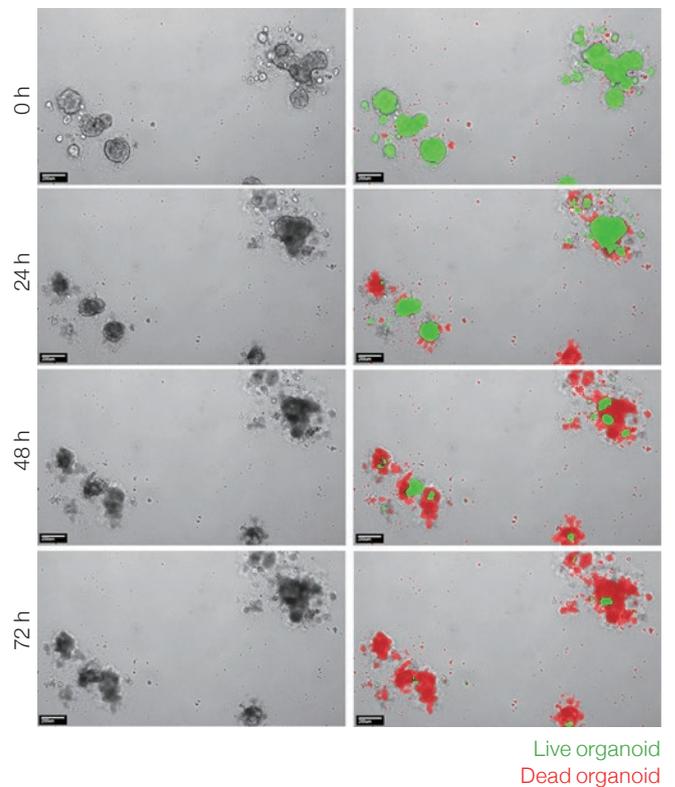


図11: Flavopiridol添加0、24、48、72時間後の明視野画像とセグメンテーション画像

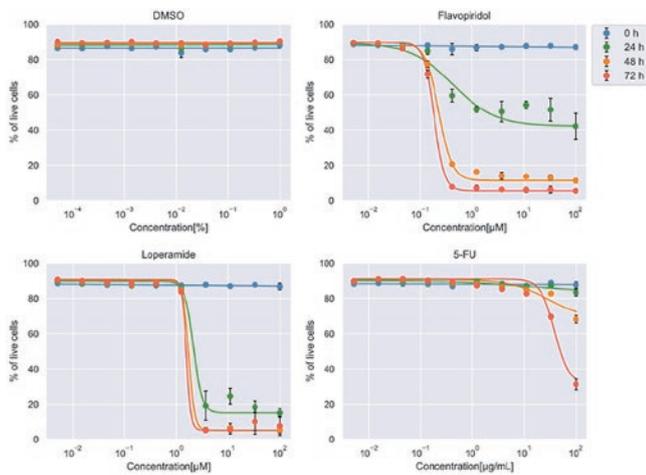
(左) 明視野画像
(右) 生死オルガノイドのセグメンテーション画像

セグメンテーション結果から細胞生存率を定量し(図12)、4パラメータ回帰曲線によりIC50を算出しました(図13)。

$$\% \text{ of live cells} = \left(\frac{\text{Area sum of live organoid}}{\text{Area sum of total organoid}} \right) \times 100$$

$$y = \text{bottom} + \frac{(\text{top} - \text{bottom})}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^{\text{slope}}}$$

図12: 用いた計算式
(上) 細胞生存率
(下) フィッティング関数



Drug	IC50 ± SD	unit
DMSO	1.00 <	%
Flavopiridol	0.19429 ± 0.00088	μM
Loperamide	1.91493 ± 0.04452	μM
5-FU	58.07319 ± 4.57565	μg/mL

図13: 回帰曲線フィッティングとIC50
(上) 回帰曲線フィッティングの結果
(下) IC50の計算結果

また、Calcein-AM / PI染色した蛍光画像と明視野画像の定量結果を比較したところ高い相関性が認められました。したがって、蛍光染色を用いた毒性評価試験をラベルフリーで代替できる可能性があります(図14)。

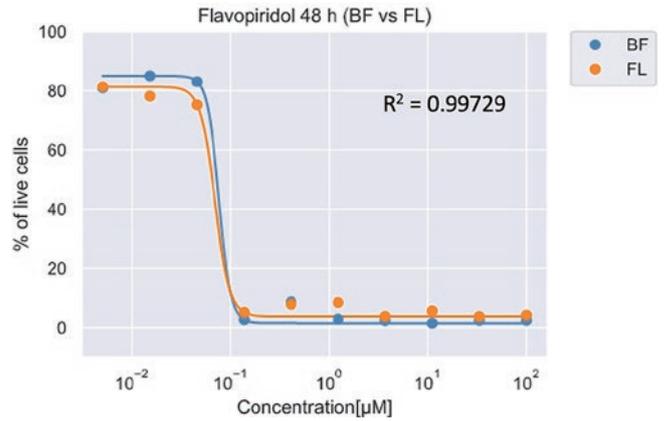


図14: 蛍光画像解析と明視野画像解析の比較

Forskolin-induced swelling (FIS) アッセイ

腸管オルガノイドにForskolinを添加するとcAMP依存的にCFTR活性が上昇し、オルガノイドが膨張することが分かっています。そこで、96ウェルプレートにオルガノイドをマトリゲル混合培地で培養し、Forskolin添加0、24時間後に明視野撮像を行いました。Calcein-AM染色したオルガノイドの蛍光画像をもとにディープラーニングのモデルファイルを作成し、明視野画像から生死それぞれのオルガノイドをセグメンテーションしました(図15)。

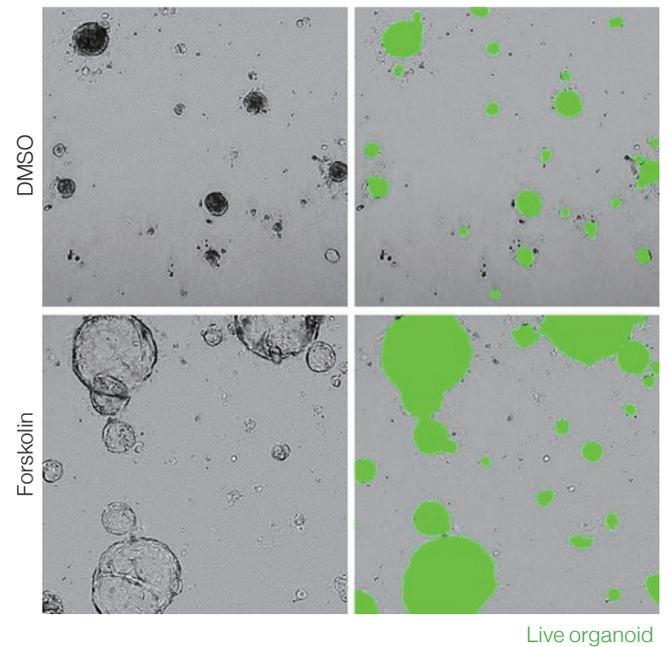
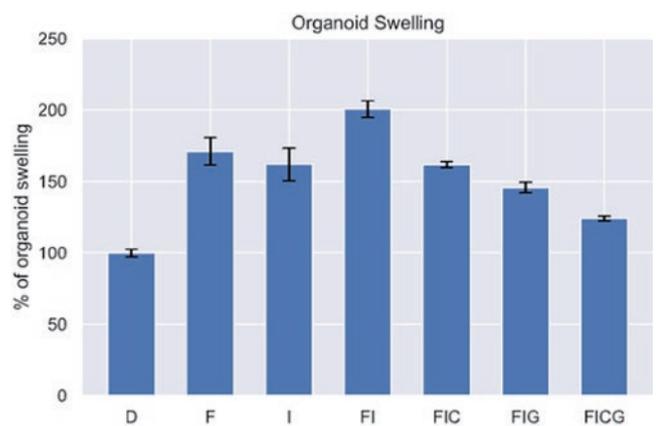


図15: Forskolin添加24時間後の明視野画像とセグメンテーション画像
(左) 明視野画像
(右) セグメンテーション画像

セグメンテーション結果からオルガノイドの面積値を算出し膨張率を定量したところ、ForskolinやIBMXを添加した場合は膨張率が増加しており、CFTR阻害剤(CFTRinh-172、GlyH-101)の存在下では膨張率の増加が抑制されることが確認できました(図16)。



D: DMSO / F: Forskolin / I: IBMX / C: CFTRinh172 / G: GlyH101

図16: Forskolin添加24時間後のオルガノイド膨張率

Calcein-AM染色蛍光画像と明視野画像定量結果を比較しても有意差は認められなかったため、蛍光染色を用いたFISアッセイをラベルフリーで代替できる可能性があります(図17)。

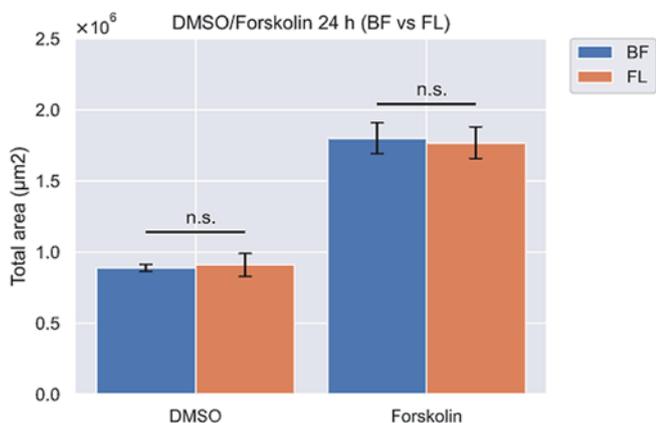


図17: Forskolin添加24時間後のオルガノイド膨張率
(明視野画像解析結果と蛍光画像解析結果の比較)

まとめ

Cell3iMager duos / duos2を用いることで三次元培養したオルガノイドの明視野/蛍光イメージングが可能になります。また、ディープラーニングを用いることで明視野画像中のオルガノイドや接着細胞を簡単にセグメンテーションすることができ、ラベルフリー解析が可能になります。オルガノイド形状毎のセグメンテーションが可能であるため、これまで顕微鏡観察で行ってきたオルガノイド成長過程のモニタリングをラベルフリー解析で代替できる可能性があります。同様に、ATPアッセイや蛍光染色で行ってきた毒性評価、FISアッセイなどをラベルフリー解析で代替できる可能性があります。Cell3iMager duos / duos2を用いた非侵襲かつ経時的な撮像・解析アプローチは、細胞へのダメージ低減や試薬コストの削減につながるだけでなく、高速に三次元培養細胞を定量解析できるためオルガノイド研究に最適です。

株式会社 SCREENホールディングス

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1

ライフサイエンス事業室

京都(洛西) / 〒612-8486 京都市伏見区羽東師古川町322
Tel: 075-931-7824 Fax: 075-931-7826

東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島一丁目2-21 ヤマトネビル7階
Tel: 03-4334-7977 Fax: 03-4334-7978

<https://screen-cell3imager.com/>

各種お問い合わせは
こちらのQRコードから

