

蛍光顕微鏡を用いた Corning® BioCoat™ アンジオジェネシス： 血管内皮細胞遊走アッセイシステム

東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学分野

末弘 淳一、南 敬

イントロダクション

血管内皮細胞は血管内膜を構成する細胞で血液に直接接することから、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子といった刺激を常に受けている。このような周囲環境の変化に対して内皮細胞は自らの機能を絶えず変化させることで血管の恒常性に寄与している。遊走能は血管新生や創傷治癒と深く関わる内皮細胞の基本的な機能で、血管生理を理解する上で非常に重要である。今回は Corning BioCoat アンジオジェネシス：血管内皮細胞遊走アッセイシステム（Corning Life Sciences）を用いて、boyden chamber による血管内皮細胞の遊走能を定量する方法を紹介する。

準備

－細胞－

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC：human umbilical vein endothelial cell）（Lonza, USA）

－試薬・器具－

Corning BioCoat アンジオジェネシス：血管内皮細胞遊走アッセイシステム 24 マルチウェルインサートシステム（Cat.# 354143, 354144）（Corning Incorporated, USA）、EGM2（Lonza, USA）、EBM2（Lonza, USA）、PBS（Sigma Aldrich, USA）、Trypsin-0.05% EDTA（GIBCO, USA）、RPMI medium（Sigma Aldrich, USA）、FBS（GIBCO, USA）、PKH2 labeling kit（Sigma Aldrich, USA）、Diluent A（labeling kit 付属）（Sigma Aldrich, USA）、4 μM PKH2 dye（Sigma Aldrich, USA）（labeling kit 付属）、recombinant human VEGF165（R&D systems, USA）、Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ（Cat.# 353003）（Corning Incorporated, USA）

－機器－

遠心機（KUBOTA 5900, Japan）、恒温水槽（TAITEC, USA）、DB IRB 倒立顕微鏡（Leica, Germany）、DP70 顕微鏡付属カメラ（Olympus, Japan）、DP controller カメラ画像取り込みソフトウェア（Olympus, Japan）

The logo consists of the word "CORNING" in white, uppercase, sans-serif font, centered within a solid orange square background.

方法と結果

Boyden chamber アッセイのフローチャートと本システムによる遊走細胞観察の模式図を示す (Fig.1)。今回紹介する方法では、PKH2 により染色した HUVEC を Corning BioCoat アンジオジェネシス：血管内皮細胞遊走アッセイシステムに播種し、蛍光顕微鏡を用いて遊走細胞を観察する。さらに、蛍光顕微鏡により取得したデータを画像解析することにより遊走細胞を定量する。

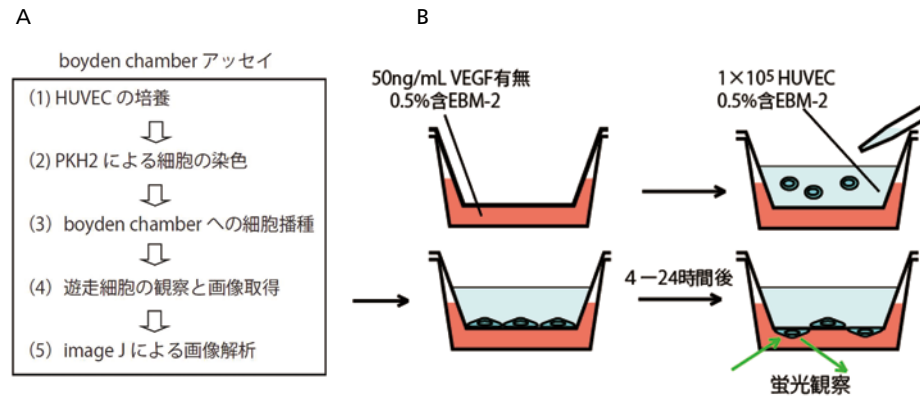


Fig.1 A. boyden chamber アッセイのフローチャート、B. boyden chamber による遊走細胞観察の模式図

—細胞の準備—

HUVEC を Falcon 100 mm セルカルチャーディッシュに播種し、EGM2 で培養する。コンフルエントになるまで増殖させた後、0.5%FBS 含 EBM2 で serum starvation を overnight で行い、染色作業に移る。

—細胞の染色—

染色は PKH-2 を用いる。この染色に時間をかけると細胞にダメージとなり遊走能にも影響するので、この操作は出来るだけ手早く行うようにする。

- ① 細胞を PBS で一度洗浄後、Trypsin-0.05% EDTA で剥離し、1000 rpm、5分遠心する。
- ② 上清を除いて、細胞ペレットを RPMI 5 mL に懸濁する。
- ③ 細胞をカウントする。
- ④ 1000 rpm、5分間遠心する。
- ⑤ 上清を除いて、ペレットを 1 mL Diluent A に懸濁する。
- ⑥ 4 μ M PKH 溶液を Diluent A に希釈することで作製し、1 mL を加える。
- ⑦ 37°C で 30 秒おきに振とうし、3分間インキュベートする。
- ⑧ 10% FBS 含む RPMI medium を 2 mL、FBS を 4 mL 加える。
- ⑨ 1000 rpm、10分間、室温で遠心する。
- ⑩ 細胞ペレットを 0.5% 含 EBM2 に溶解する。

—Boyden chamberへの播種—

血管新生因子 (VEGF) 有無の 0.5%FBS 含 EBM2 を下部のチャンバーに 500 μ L 入れ、上部チャンバーへ細胞を必要量播種する。推奨濃度は 1×10^5 cells インサートであるが、刺激前後での差が見られない場合や全く遊走細胞が観察できない場合には細胞数を $0.5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ cells インサートの範囲で調整してみる。

—遊走細胞の観察—

細胞播種後、数時間から 24 時間まで蛍光顕微鏡により経時的に観察を行う (Fig.2)。この際、露光時間は一定にし、細胞の偏りを考慮し、1 チャンバーあたり場所を変えて 3 画像以上を撮影する。

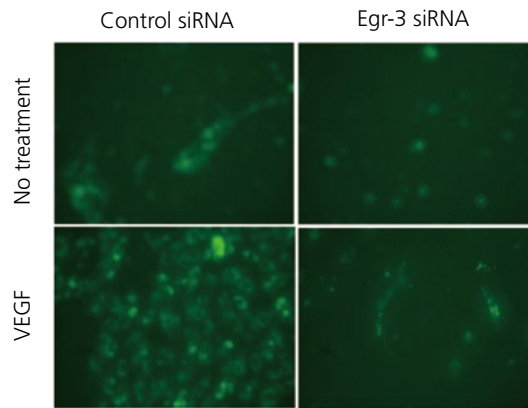


Fig.2 内皮活性化に関わる転写因子 Egr-3 を siRNA で抑制した際の遊走細胞の観察。VEGF 刺激後 24 時間で蛍光顕微鏡による観察を行った。詳細は文献を参照。

—画像解析—

取得したデータを画像解析ソフトウェア Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/> からダウンロード可能なフリーソフトウェア) (Fig.3) を用いて解析する。なお、以下の作業は血管新生定量ソフトウェア (KURABO、Japan) を用いると多くの画像を一括で処理できる。大量に画像処理する場合にはこちらを用いるほうが簡便である。

① 画像カラーモードの変換

解析を行うにあたり、RGB (CMYK) カラーの画像を 32 bit モノクロに変換する (Fig.3 A)。

Image → Type → 32 bit

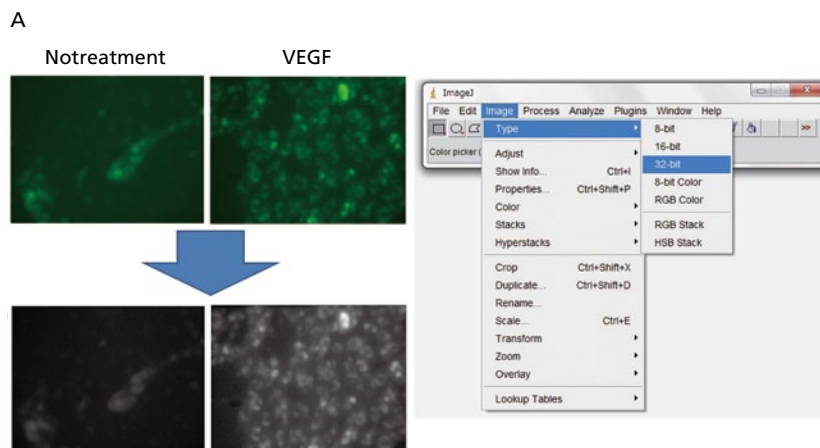


Fig.3 A. 画像カラーモードの変換

② 画像の2階調化

細胞がある領域とない領域とを区別するため、閾値を設けて2階調化する (Fig.3 B)。閾値は測定条件によって異なってくるので、ポジティブコントロールとネガティブコントロールで最も差が見やすい値に設定する。定量性を損なわないために、閾値を決めたあとはすべての画像を同じ条件で処理を行う。

Image → Type → Threshold

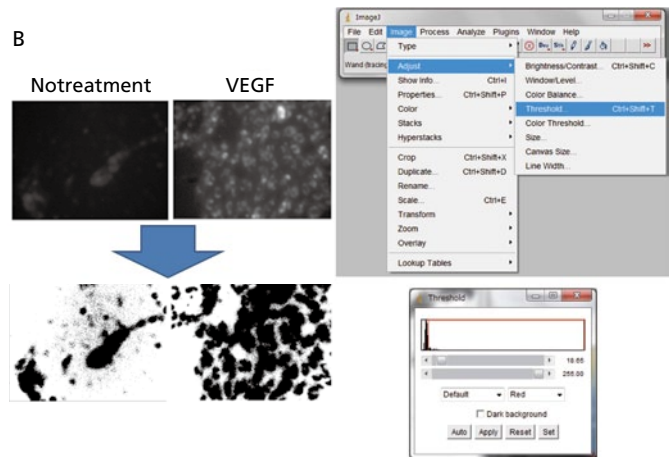


Fig.3 B. 画像の2階調化

③ 細胞が占める領域の抽出

細胞が占める割合を計算するため、analyze particles 機能を用いる (Fig.3 C)。Analyze particles では粒子上の領域を見つけるために Size と Circularity というパラメータが用意されており、細かいノイズを無視する必要がなければ default のままでよい。Display result, Clear result, Summary にチェックして OK ボタンを押すと、Summary 画面に total area が出てくるので、その値を細胞が占める領域として計算に用いる (Fig.3 D)。

Analyze → Analyze particles

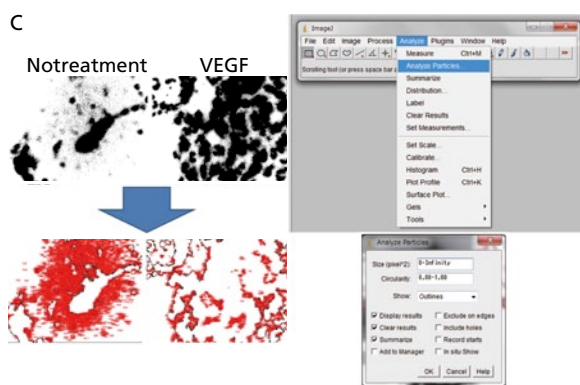


Fig.3 C. 細胞が占める領域の抽出

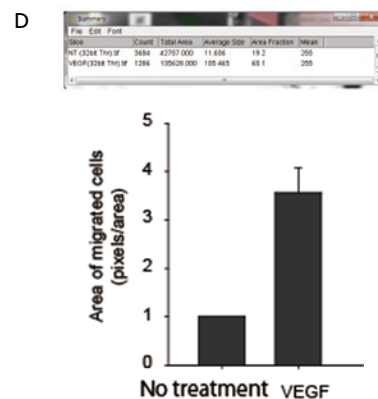


Fig.3 D. 定量結果. No treatment を 1 とした時の値で表示

参考文献

Suehiro J, et. al. *Blood*, 2010; 115 (12) : 2520-2532

Corning® は CORNING Incorporated の登録商標です。
商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit www.corning.com/discoverylabware.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks.

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

© 2012, 2013 Corning Incorporated
CLS-030-00