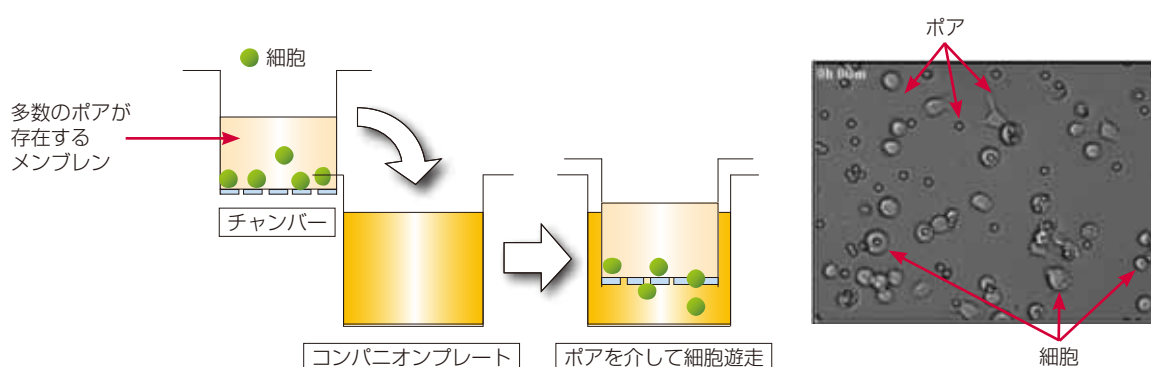


リアルタイム細胞観察システム CCM (株式会社アステック) を用いた Corning® フルオロブロック™ セルカルチャーインサートでの細胞遊走性評価

株式会社アステック 細胞科学研究所 緒方 貴宏

イントロダクション

細胞の遊走性を評価する手法の一つにボイデンチャンバーによる実験が挙げられます。ポアが多数存在するメンブレンを底面に持つ「チャンバー」と呼ばれる培養容器内に細胞を播種し、この「チャンバー」を別の培養容器（コンパニオンプレート）に設置すると「チャンバー」のポアを通して細胞が遊走します。



ボイデンチャンバーには様々な種類があります。Corning® フルオロブロック™ セルカルチャーインサートのようにポアが存在するメンブレンが遮光タイプを使用する場合、蛍光染色した細胞をリアルタイム細胞観察システム CCM (株式会社アステック) でモニタリングすることにより、細胞遊走性の評価をリアルタイムに行うことが容易になります。

準備

- 細胞株 -

HT-1080 細胞

- 試薬 -

DMEM (カタログ番号 :D5796)(Sigma-Aldrich, USA)、ウシ胎児血清 (FBS) (カタログ番号 : 26140) (Life technologies, USA)、Cytochalasin D (カタログ番号 : BML-T109-0001) (Enzo Life Sciences, USA)、Vybrant CM-Dil (カタログ番号 : V-22888) (Life technologies, USA)、D-PBS(カタログ番号 : 14200-075)(Life technologies, USA)

- 培養器具 -

Corning® フルオロブロック™ 個別型セルカルチャーインサート 8.0 μm ポアサイズ (カタログ番号:351152) (Coring Incorporated, USA)、Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート 24 ウェルプレート (カタログ番号 : 353504) (Coring Incorporated, USA)、Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ (カタログ番号: 353003) (Coring Incorporated, USA)

CORNING

- 実験装置 -

インキュベーター SMA-165DR (アステック、福岡)、リアルタイム培養細胞観察装置 CCM-1.4XYZ/CO2* (アステック、福岡)、高速画像解析ソフト ASBRO (アステック、福岡)

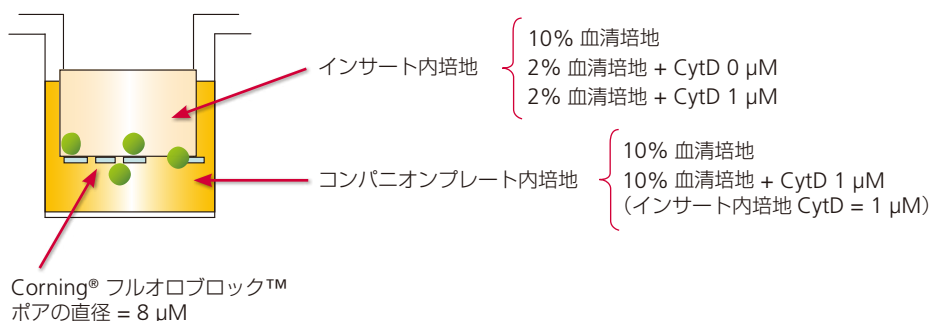
* リアルタイム培養細胞観察装置 CCM につきましては「特許出願 2003-298942」

方法 ※ 実験手順は一例です

HT1080 細胞を細胞膜染色試薬 (CM-Dil) で蛍光染色した上で Corning® フルオロブロック™ セルカルチャーインサート内に播種後、専用のマルチウェルプレートに設置し CCM でモニタリングを行います。

この時セルカルチャーインサート内の培地に含まれる血清濃度を 10% または 2% の二種類とし、コンパニオンプレート内の培地に含まれる血清濃度を 10% とすることで細胞血清の濃度勾配をつけます。

さらにセルカルチャーインサート内の 2% 血清を含む培地には CytD を 0 μ M、1 μ M を含む二種類のものを使用します。セルカルチャーインサート内の培地に CytD を 1 μ M とした場合、コンパニオンプレート内の培地にも CytD を 1 μ M とし、細胞遊走の評価を行います。CytD (Cytochalasin D) は、細胞骨格タンパク質であるアクチンの重合を阻害し細胞遊走を抑制します。



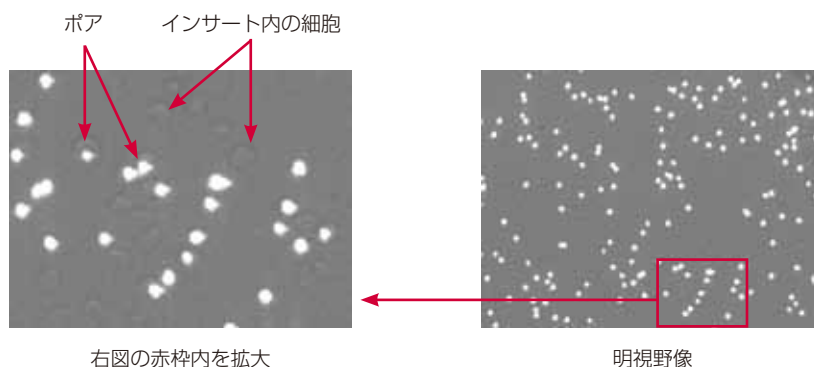
- HT1080細胞の蛍光染色 -

- ① 15 mL 遠沈チューブに D-PBS (-) を 4 mL 添加し、加温のためインキュベーター内で 20 分間静置した後に Vybrant Dil Cell-Labeling solution を 20 μ L 添加し、ボルテックスミキサーで完全に攪拌することで染色溶液を取得します。
- ② HT1080 細胞を回収し、①で作成した染色溶液を用いて細胞密度 1×10^6 cells/mL となるよう細胞懸濁液を作成し、インキュベーター内に 20 分間静置します。染色時の細胞密度を 1×10^6 cells/mL とします。
- ③ 遠心分離により細胞を回収した後、 1×10^5 cells/mL となるよう 2% 血清培地で懸濁します。
- ④ Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレートの各ウェルに 10% 血清培地 750 μ L を加えます。この時、インサート内培地の CytD の濃度を 1 μ M とした場合は、コンパニオンプレート内の培地にも CytD を 1 μ M 添加します。
- ⑤ ④のウェルの中に Corning® フルオロブロック™ セルカルチャーインサートをセットし、③の細胞懸濁液 500 μ L をセルカルチャーインサート内に入れます。この時、インサート内の培地として 10% 血清培地を用いる場合は、血清を追加し最終濃度 10% となるようにします。また CytD を添加する場合は、最終濃度 1 μ M となるように添加し、プレートを CCM にセットします。

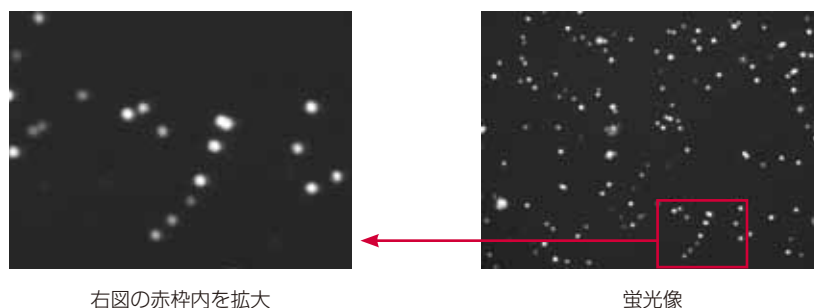
- CCM撮影 -

- ① 対物レンズ 10 倍を装着した状態で、撮影箇所を設定します。Corning® フルオロブロック™ セルカルチャーインサートは完全遮光タイプのメンブレンが底面にあるため、CCM で明視野観察した場合、焦点が合うとポアを通した光（透過光）を見ることができますので、まずはこれが確認できる Z 位置を探します。

* 二波長励起タイプではインサート内に存在する細胞を多数確認できる場合があります。



- ② 次に蛍光観察を行います。焦点が正しく合うと、ポアを通してセルカルチャーインサート内の細胞から放出された蛍光を見ることができます。このときポアが明瞭に判別できる Z 位置（ポアの直径が最も小さく見える Z 位置）となるよう、微調整を行います。



- ③ 撮影条件を設定し、CAPTURE を開始します。今回は以下のような条件を設定しています。

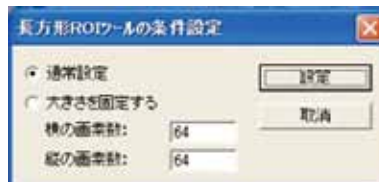
- FL1 露光時間 = 2000 msec
- FL1 ゲイン = 15
- FL1 オフセット = 0
- インターバル = 6 min
- Z スライス = ②で設定した Z 位置を中心として上下 25 μm を設定。1 箇所でも 3 回 Z スライス撮影します。

撮影条件（特に蛍光観察やインターバル）は適宜変更してください。

- ④ CAPTURE 終了は、インサートから移動してきた細胞数から適宜判断してください。今回は CytD を加えた状態のものと比較して、細胞遊走に明らかな差があると判断した「50 時間 00 分」を CAPTURE 終了としています。

- 撮影後の画像処理 -

- ① 各撮影箇所から、最も焦点が合っている蛍光画像のみから構成されるスタックファイルを作成します。
- ② 「画像ツールバー」にある「長方形 ROI」「楕円 ROI」「フリー ROI」「多角形 ROI」のいずれをクリックして蛍光画像内に ROI 範囲を設定します。今回は「長方形 ROI」をダブルクリックし、「長方形 ROI ツールの条件設定」ダイアログから「大きさを固定する」を選択し、「横の画素数 = 1392」「縦の画素数 = 1040」と設定し、視野全体での測定とするよう設定しています。

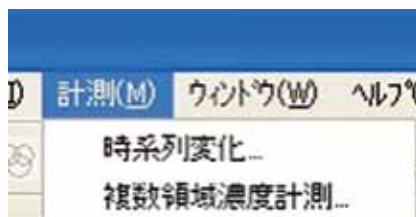


- ③ 蛍光画像内（ここでは視野全体）を ROI 指定します。

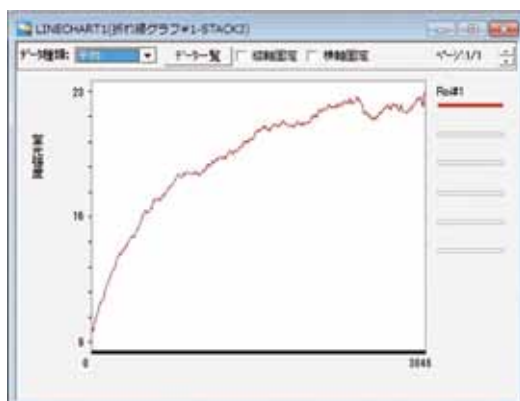


- * 視野外に ROI を指定することはできません。
- * 視野全体を ROI 指定した場合、視野の最外端が指定され、そこから ROI を移動することはできません。

- ④ 「計測」メニューから「時系列変化」を選択すると、ROI で指定した範囲内に対して解析処理が始まります。



- ⑤ 解析処理が完了すると「LINECHART」ウィンドウに折れ線グラフが表示されます。「データ種類」を「平均」とすると ROI 範囲内の平均蛍光強度の経時変化が表示されます。ROI 範囲内に蛍光染色された細胞が多いほど、平均蛍光強度値は高くなります。



- ⑥ 「データ種類」の横にある「データ一覧」ボタンを押すと、グラフの数値データが「SHEET」ウィンドウに表示されます。「編集」メニューの「コピー」を選ぶことにより、他のソフトへの数値データのペーストが可能となります。今回は全ての蛍光画像に対して平均蛍光強度の数値データをコピーし、別の表計算ソフトにペーストします。

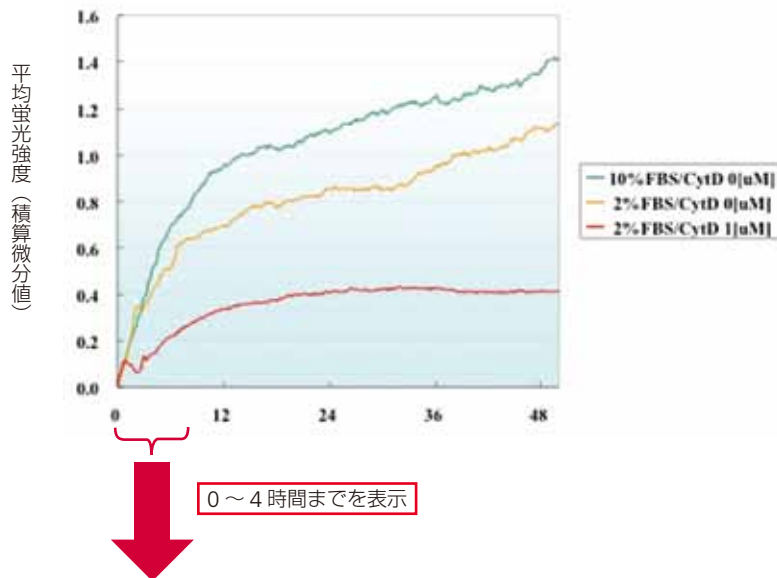
項目	1	2			
番号	経過時間	ROI #1			
585	3504.00000	22.208632			
586	3510.00000	22.211389			
587	3516.00000	22.049163			
588	3522.00000	22.029788			
589	3528.00000	22.017771			
590	3534.00000	21.862693			
591	3540.00000	21.883836			
592	3546.00000	21.859249			
593	3552.00000	22.065379			
594	3558.00000	22.200462			
595	3564.00000	22.158283			
596	3570.00000	22.065729			
597	3576.00000	21.915692			
598	3582.00000	21.883896			
599	3588.00000	21.825916			
600	3594.00000	21.810480			

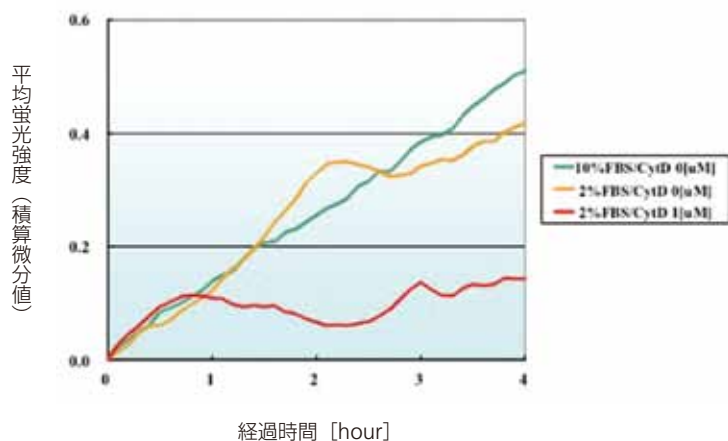
- * 今回は平均蛍光強度の数値データを用いて表計算ソフトによる標準化処理を行いません。
- * 今回使用した標準化処理の手順は以下の通りです。

- ① 各経過時間での微分値の計算を行います。

$$dF/dt = [(次のインターバル後の平均蛍光強度) - (平均蛍光強度)] / [インターバル時間]$$
- ② ①で得られた微分値の積算を、各経過時間に対して行います。

$$\sigma = [(次の経過時間での dF/dt) + (今までの経過時間の dF/dt 積算値)]$$
- ③ 各培養条件で 3 箇所の蛍光画像から 2 を取得し、その平均値を計算しグラフ化します。





* FBS = 血清

今回の観察からインサート内血清濃度を 2%、プレートのウェル内血清濃度を 10% とし血清の濃度勾配をつけることにより、観察初期（開始 2 時間）では細胞遊走性が向上したことが確認されました。それ以降の時間では血清の濃度勾配をつけていないものと同程度の平均蛍光強度の経時変化となり、濃度勾配が無くなったことが予想されます。また CytD によって細胞遊走が大幅に抑制されていることも確認されました。

Corning フルオロブロック™ セルカルチャーインサートのメンブレンが遮光性である特性と、CCM の長期間安定したリアルタイムモニタリングを組み合わせることにより細胞の遊走性、特にガン細胞の浸潤や走化性因子による細胞遊走をより詳細に観察することが可能となります。これにより、これまでは得ることが比較的困難と思われていた、遊走性の経時変化を容易に評価することが可能となり、薬剤スクリーニングを始めとする様々な分野での応用が期待されます。

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-019-00