



CL-Quantアドオンモジュール

「スクラッチアッセイ」を用いた 間葉系幹細胞の間隙閉鎖率の評価

< BioStation CT 使用例 >

細胞遊走は発生や分化過程、免疫反応、癌細胞の浸潤や転移、創傷治癒において主要なプロセスの一つであり、その評価は発生学、細胞生物学や癌細胞研究に大変有用です。近年、間葉系幹細胞 (MSC) において、細胞遊走能が重要な特性の一つであることが報告されています。

細胞培養観察装置BioStation CTはインキュベーター内に顕微鏡とカメラを内蔵しており、MSCの長期のタイムラプスイメージを自動で取得することが可能です。画像解析ソフトウェアCL-Quantと組み合わせてCL-Quant アドオンモジュール「スクラッチアッセイ」を使用することにより、取得した画像のスクラッチ領域の面積と領域に遊走した細胞の面積を計測し、スクラッチ面の閉鎖率を自動で算出することができます。

MSCの遊走能評価を目的としてスクラッチアッセイを行い、継時的に取得した位相差画像からスクラッチ面の閉鎖率を測定しました。

観察装置

- BioStation CT (Nikon, MLA10000)

画像解析ソフトウェア

- CL-Quant ver. 5.02 (Nikon, MLS21000)

CL-Quant アドオンモジュール

- スクラッチアッセイ PC-AR04 (Nikon, MLS30204)

細胞

- ASC52telo, hTERT immortalized adipose derived Mesenchymal stem cells (ATCC® SCRC-4000™)

試薬及び材料

- MesenPRO RS™ Medium (Thermo Fisher Scientific, 12746012)
- L-Glutamine, 200 mM Solution (Thermo Fisher Scientific, 25030081)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, 15140122)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, 14190144)
- TrypLE™ Express Enzyme (1x), no phenol red (Thermo Fisher Scientific, 12604013)
- TPP® tissue culture test plate (6-well) (TPP, 92406)
- Culture-Insert 2 well in μ -Dish 35mm, High (ibidi, 81176)

方法

MSCをDPBSで洗浄後、TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol redを用いて細胞を分散し、MesenPRO RS™ MediumにL-glutamine及びPenicillin-Streptomycinを加えた培地を使用して、6ウェルプレートの各ウェルにカルチャーインサートを設置し、 9×10^3 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。細胞はBioStation CTで37°C、加湿した5% CO₂環境下で培養しました。播種後、細胞が接着したことを確認し、カルチャーインサートを除去しました。除去16分後から1時間毎に約2日間、4倍の対物レンズで、ウェル中心部の8×8視野の位相差画像を撮影しました。撮影条件はオートフォーカス設定で、ウェルごとにウェル中心でフォーカス調整を行い、その後は同じフォーカス位置で撮影しました。撮影した画像をCL-Quantに取り込み、カルチャーインサート除去で生じた間隙（細胞のない領域）を含む観察領域（約1.2mm×1.2mm）をクロップして、アドオンモジュール「スクラッチアッセイ」を用いて解析しました。CL-Quantによる自動計算で「Cell migration Area to Scratch region Area Ratio」[スクラッチ領域（本実験ではカルチャーインサート除去で生じた間隙）に対する侵入した細胞領域の面積比]として得られた数値を百分率に変換し間隙閉鎖率として、経時変化をグラフ化しました。

結果

MSCを播種後、細胞が接着したことを確認し、カルチャーインサート除去16分後から1時間毎に約2日間、位相差画像を撮影しました。カルチャーインサート除去16分後の最初の撮影を撮影時間0として、24時間後及び46時間後の画像を図1に示しました。位相差画像と比較して、間隙の領域と間隙に侵入した細胞の領域を正確に認識していることが確認できました。

CL-Quantにより自動計測された間隙閉鎖率の測定値を表に示しました(表1)。さらに、間隙閉鎖率の経時変化をグラフに示しました(図2)。本実験では、細胞を染色することなく、間隙閉鎖の様子を継続的に観察できました。

撮影時間 (時間)	間隙 閉鎖率 (%)	位相差画像	マスク画像
0	0.0		
24	53.4		
46	98.4		

図1 MSCのスクラッチアッセイの位相差画像と間隙閉鎖率

位相差画像に、間隙を紫色マスクで、間隙に侵入した細胞の領域を緑色マスクで表示した。

(画像提供：国立研究開発法人産業技術総合研究所 伊藤弓弦先生)

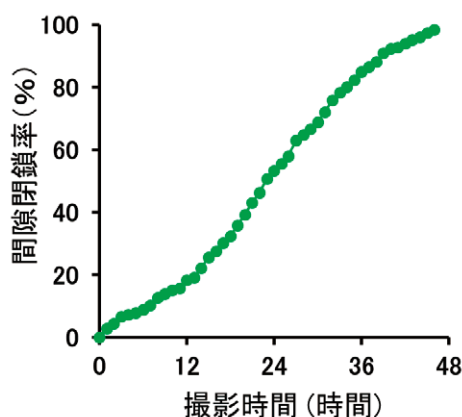


図2 間隙閉鎖率の時間推移

(データ提供：国立研究開発法人産業技術総合研究所 伊藤弓弦先生)

表1 間隙閉鎖率の測定値

撮影時間 (時間)	細胞侵入面積 (μm^2)	間隙面積 (μm^2)	間隙閉鎖率 (%)
0	-	506,176	0.0
1	14,960	506,176	3.0
2	22,528	506,176	4.5
3	34,128	506,176	6.7
4	37,024	506,176	7.3
5	40,320	506,176	8.0
6	45,040	506,176	8.9
7	52,416	506,176	10.4
8	64,016	506,176	12.6
9	70,848	506,176	14.0
10	76,624	506,176	15.1
11	79,952	506,176	15.8
12	92,960	506,176	18.4
13	96,960	506,176	19.2
14	112,016	506,176	22.1
15	129,856	506,176	25.7
16	139,904	506,176	27.6
17	152,752	506,176	30.2
18	164,224	506,176	32.4
19	181,728	506,176	35.9
20	199,264	506,176	39.4
21	218,112	506,176	43.1
22	234,576	506,176	46.3
23	256,448	506,176	50.7
24	270,080	506,176	53.4
25	281,440	506,176	55.6
26	293,568	506,176	58.0
27	319,248	506,176	63.1
28	327,808	506,176	64.8
29	336,848	506,176	66.5
30	348,064	506,176	68.8
31	364,928	506,176	72.1
32	384,672	506,176	76.0
33	396,656	506,176	78.4
34	405,120	506,176	80.0
35	416,304	506,176	82.2
36	429,984	506,176	84.9
37	438,592	506,176	86.6
38	445,904	506,176	88.1
39	460,256	506,176	90.9
40	467,792	506,176	92.4
41	469,888	506,176	92.8
42	476,128	506,176	94.1
43	482,432	506,176	95.3
44	485,952	506,176	96.0
45	493,568	506,176	97.5
46	498,064	506,176	98.4

(データ提供：国立研究開発法人産業技術総合研究所 伊藤弓弦先生)

まとめ

- MSCのスクラッチアッセイの位相差画像をCL-Quantで解析することにより、スクラッチ領域の閉鎖率の自動算出が可能です。
- マスク画像を参照することで、スクラッチ領域や細胞の遊走領域が正しく認識されているかどうかを簡単に確認できます。
- 培養の継続中に、培養状況をモニターしながら間隙閉鎖率を評価し、アッセイ完了を確認できます。

お問い合わせ先

株式会社 **ニコンインステック**

バイオサイエンス営業本部

140-0015 東京都品川区西大井1-6-3(株式会社ニコン 大井ウエストビル3F)

Tel: (03)773-8138

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/



株式会社 **ニコン**

108-6290 東京都港区港南2-15-3 (品川インターシティ C棟)

<https://www.nikon.co.jp/>