

# μ-Slide Angiogenesisを使用したチューブ形成アッセイ

## 目次

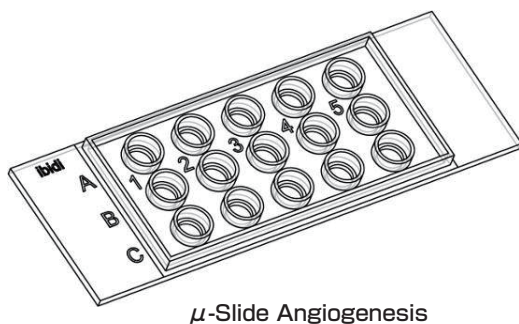
1. 概要 .....	1
2. 材料 .....	2
3. ワークフローの概要 .....	3
4. ゲルおよびスライドの調製 .....	4
ゲルのアプライ .....	4
ゲルの容量を正確にコントロールする方法 .....	5
ゲル化 .....	5
5. 細胞の播種 .....	6
6. 顕微鏡による観察 .....	7
自動観察 .....	7
手動観察 .....	7
7. データ解析および解釈 .....	7
8. 染色プロトコール .....	8

## 1 概要

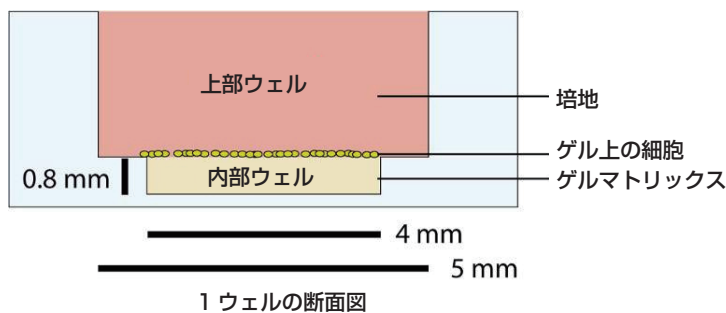
μ-Slide Angiogenesisは、倒立顕微鏡上でのチューブ形成観察用に設計されています。マトリゲル™、コラーゲンゲルおよびヒアルロン酸ゲルなど、一般に使用されるあらゆるゲルマトリックスを使用することができます。1ウェルあたりに必要なゲルの容量はわずか10 μlです。

μ-Slide Angiogenesisのプラットフォームでは、他のウェルフォーマットにおいて観察されることの多いメニスカス<sup>1)</sup>効果を抑制することができます。平坦なゲル表面上に存在するすべての細胞が高品質の位相差顕微鏡または蛍光顕微鏡により視覚化されます。

1) メニスカス: 界面張力によって細管内の液体の表面がつくる凸状または凹状の曲面。管の壁を水で濡らせば凹状、濡らさなければ凸状になる。



μ-Slide Angiogenesis



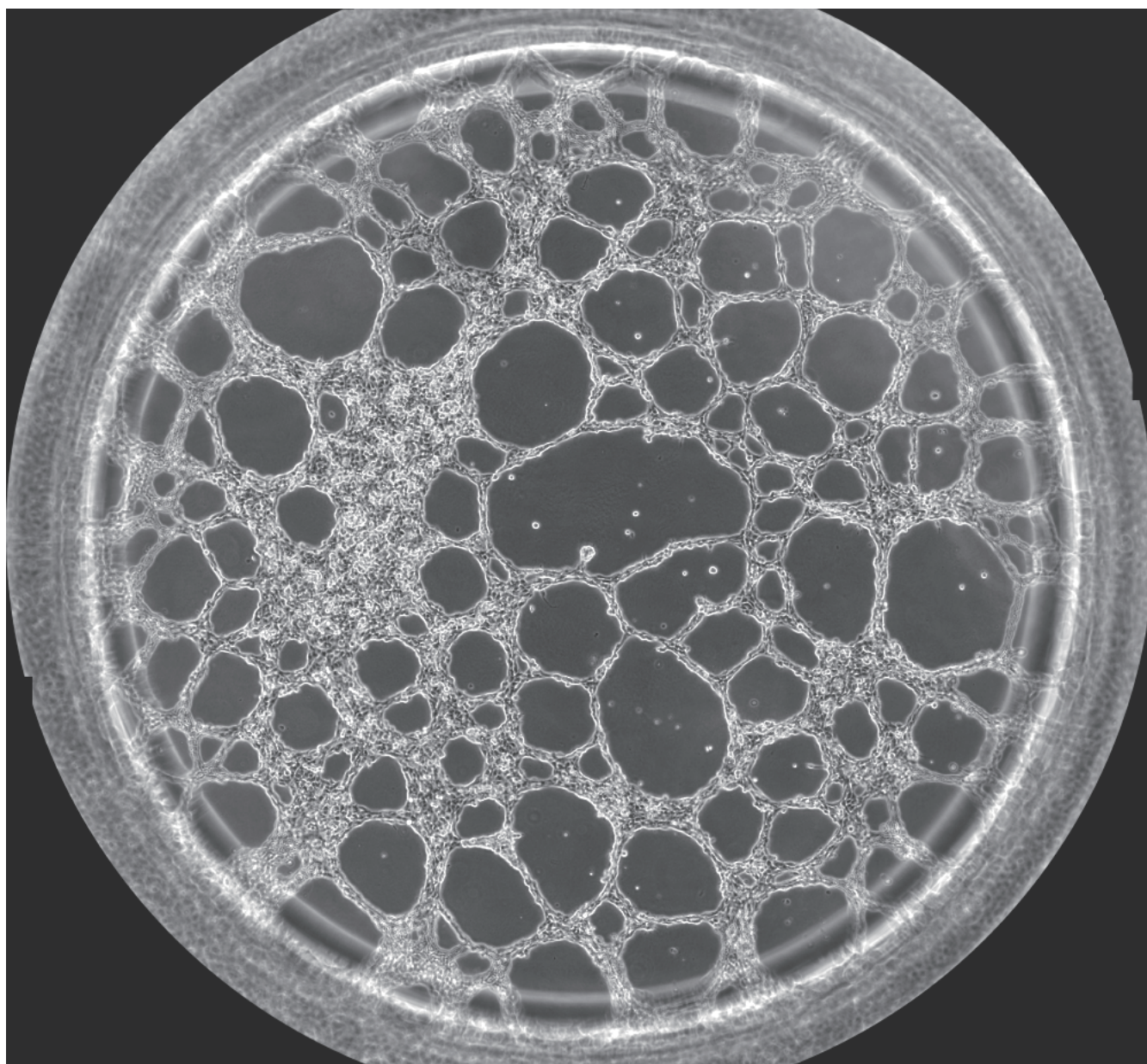
1 ウェルの断面図

このアプリケーションノートでは、マトリゲル™上での内皮細胞 (HUVEC) の血管形成に使用されているμ-Slide Angiogenesisのサンプルのセットアップについて説明しています。

## 2 材料

細胞：	HUVEC (Lonza)	10 <sup>4</sup> 個/ウェル
培地：	内皮細胞増殖培地 (Lonza)	50 μl/ウェル
ゲルマトリックス：	BDマトリゲル™(増殖因子低減、#356231)	10 μl/ウェル
スライド：	μ-Slide Angiogenesis, ibiTreat (ibidi)	1枚
蛍光色素：	カルセインAM (Lonza)	1 ml (6.25 μg/ml)
その他：	確認用の方眼紙	1枚

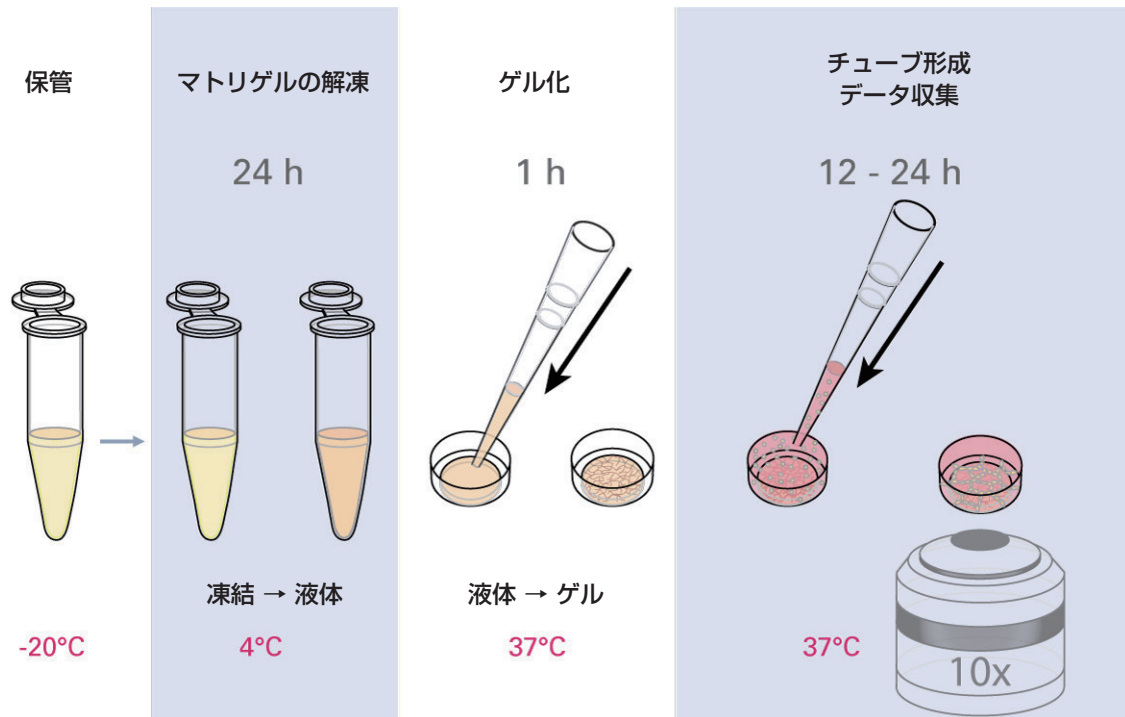
使いやすいように、ウェルはマルチチャンネルピペッターと互換性をもたせています。プラスチックはイソプロパノール、メタノール、パラホルムアルデヒドなどのさまざまな固定溶液に適合しています。プラスチック底の光学的性質はカバーガラスに匹敵します。



10倍の対物レンズを使用して撮影した位相差顕微鏡画像(単一画像を5 × 6枚配置しました)。HUVECを入れたウェルの全体で細胞ネットワークが形成されたことを示しています。細胞の接種から10時間後に画像を撮影しました。ウェルの直径は4 mmです。

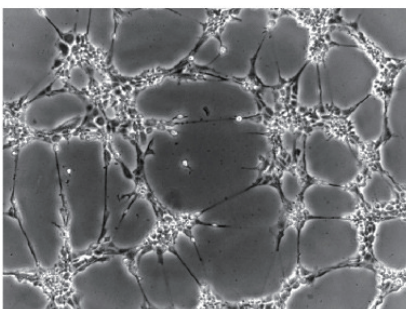


### 3 ワークフローの概要



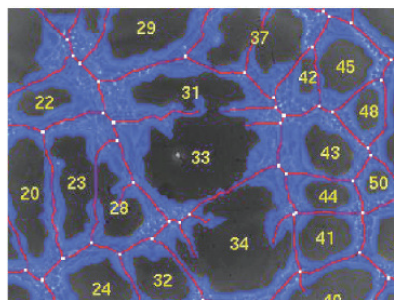
実験ワークフローを上図に示します。ここではマトリゲルを解凍して、μ-Slide Angiogenesisの上部ウェルに注入しています。ゲル化後に細胞懸濁液を上部ウェルにアプライし、その後でネットワーク形成を顕微鏡で観察します。

データ収集  
6 - 24 h



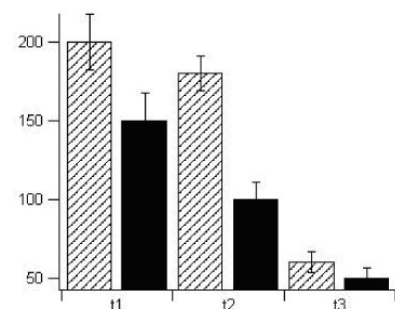
位相差顕微鏡または蛍光顕微鏡画像

データ解析  
15 min



自動画像解析 (Wimasis)  
\* 画像枚数が 50 枚程度の場合

データ解釈



シミュレーション結果および  
対照データの統計学的検定

画像処理のワークフロー。顕微鏡画像は複数の時点で取得された後、自動的に解析されます (例、血管、ループ、細胞で覆われた領域および分岐点の決定)。実験の結果を確認するため、このデータは統計学的検定により分析されます。

## 4 ゲルおよびスライドの調製

### ゲルのアプライ

以下のステップにしたがってください。

- 1) 細胞を播種する前日に、マトリゲル™を4℃の冷蔵庫内で氷上に置きます。ゲルはオーバーナイトでゆっくり解凍させます。

**注意：ゲルをピペティングする際には、必ず予冷したピペットチップ（4℃）を使用してください！**

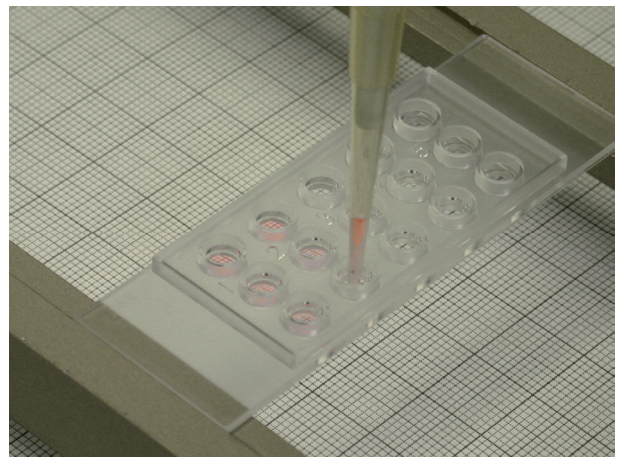
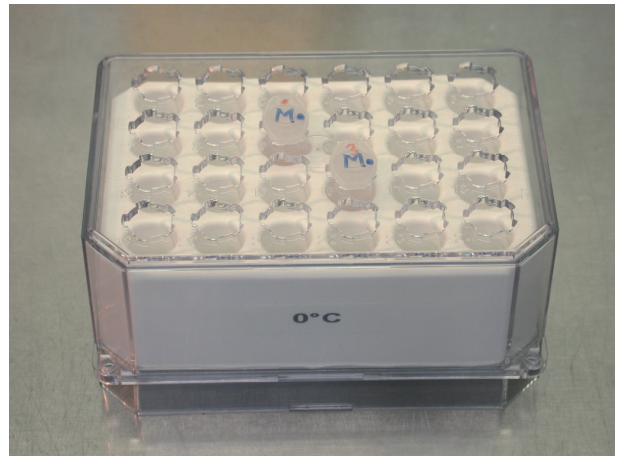
- 2) 実験開始時に、ゲルの入っている容器を層流内に置かれた冷たいラック内に入れます。
- 3) μ-Slide Angiogenesisの無菌包装を開封し、μ-Slide専用ラック上に置きます。
- 4) 内部ウェルにゲルを10 μlずつアプライします。ピペットチップはウェルの中央で垂直に保ってください。こうすることで、ゲルの上部ウェルへの流入を防ぎます。

### ピペティング操作について

気泡を避けるために、チップをゲル内に入れたままでピペットを用いて吸引および吐出（10 μl）を3回行います。その後、10 μlをウェルに移します。

マトリゲル™は粘度が高いため、ピペットの容量を10 μl超または10 μl未満に調整する必要がある可能性があります。

ゲルの容量を正確にコントロールするために、注入後のウェルを通して方眼紙を観察してください。容量が適切であれば、拡大または縮小効果は見られません。容量が適切でない場合には、ゲルの容量を調整してください（次のページをご覧ください）。



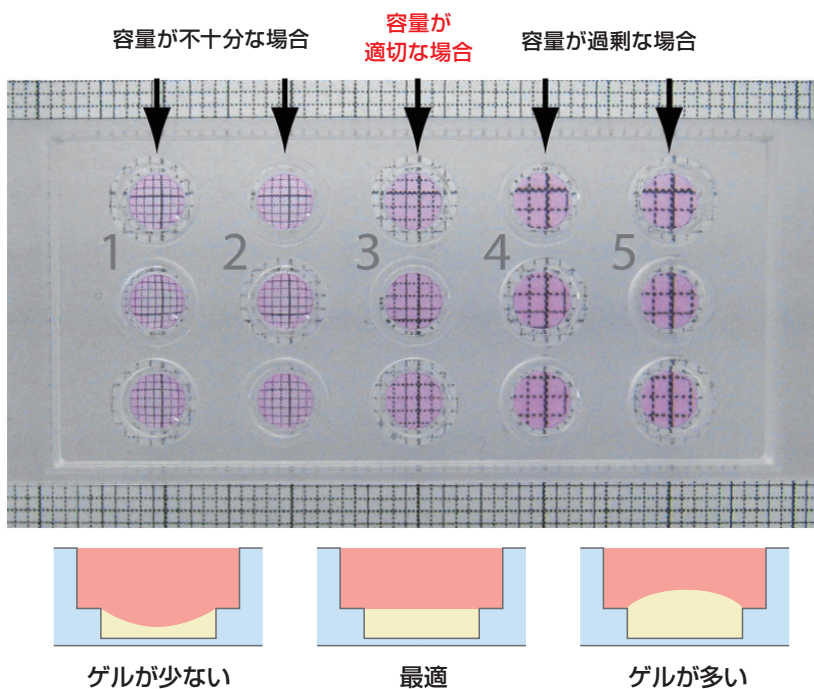


### ゲルの容量を正確にコントロールする方法

内部ウェルの容量はちょうど10 μlです。ウェル内の容量が適切であれば、下の写真のような拡大または縮小効果は観察されません。この効果を視覚化するには、スライドを方眼紙から数センチメートル離れた状態で観察してください。

ピペットを10 μlにセットして注入してもメニスカス<sup>1)</sup>がなくなる場合には、ピペッティング容量を少し変えて方眼紙で確認し、どのセッティングが適しているかを検討してください。

1) メニスカス：界面張力によって細管内の液体の表面がつくる凸状または凹状の曲面。管の壁を水で濡らせば凹状、濡らさなければ凸状になる。



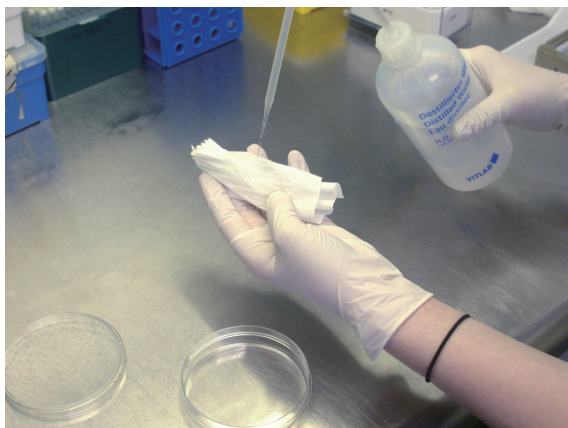
各列でピペットの設定を変更して分注した結果です。

- 列1, 2 ⇒ ゲルの量が不十分です。  
(マス目が縮小されます)
- 列3 ⇒ 正確な分注ができています。  
(マス目に変化はありません。)
- 列4, 5 ⇒ ゲルの量が多過ぎます。  
(マス目が拡大されます)

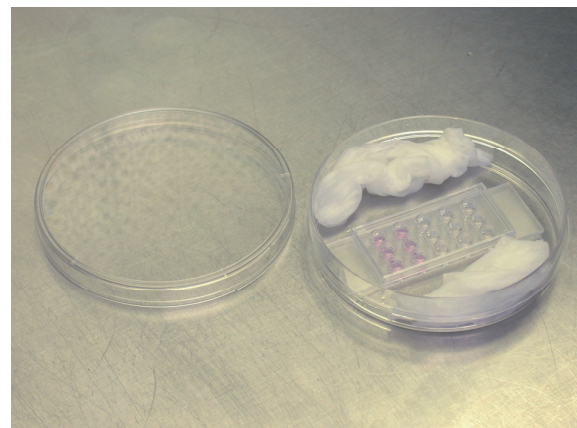
### ゲル化

以下のステップにしたがってください。

- 1) ゲルをアプライ後、スライドのフタを閉じます。
- 2) 臨時の加湿チャンバーとして使用するために、水に浸した紙タオルを入れたペトリ皿を準備します。
- 3) μ-Slideをペトリ皿に入れ、フタを閉じます。
- 4) ゲル化させるために、μ-Slideを入れた加湿チャンバー全体をインキュベーター内に置きます (30分間)。
- 5) この間に細胞懸濁液を調製します。



加湿チャンバーを準備します



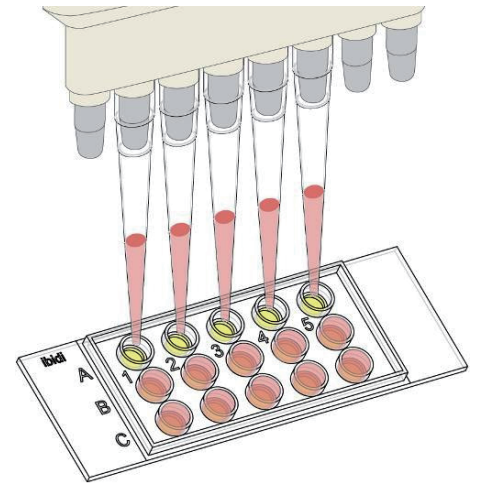
加湿チャンバー内に入れられたμ-Slide

## 5 細胞の播種

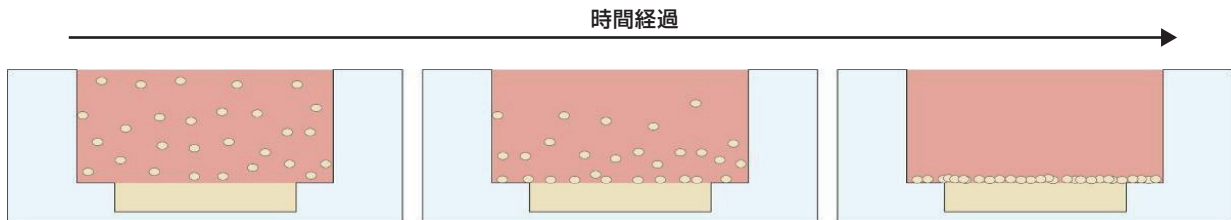
ゲル表面に播種される細胞数は、信頼性が高い結果を得るために重要なパラメータです。必要な細胞数は、細胞の種類および大きさによって決まります。最良の結果を得るために、実験を開始する前に播種する細胞数を最適化してください。詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」をご覧ください。

以下のステップにしたがってください。

- 1) 最終的な細胞数を1ウェルあたり10,000個とするために、細胞懸濁液の濃度を $2 \times 10^5$  cells/mlに調整します。その後、十分に混合します。
- 2) インキュベーターからμ-Slideを取り出し、ラック上に置きます。
- 3) 上部ウェルに細胞懸濁液を50μlずつアプライします。ピペットチップは垂直に保ち、ピペットチップがゲルに触れないように注意してください。このステップには、マルチチャンネルピペットが有効です。
- 4) 上述の手順に従い、もう一度方眼紙を使用して容量が正確かどうかを確認します。容量が適切でない場合には、細胞を含まない培地を用いて容量を調整してください。
- 5) スライドのフタを閉じます。これで、スライドを観察するための準備は整いました。
- 6) 数分後にすべての細胞がゲル面に落下し、1平面上に並びます。スライドの構造上、縁に位置する細胞はプラスチック表面と接触します。

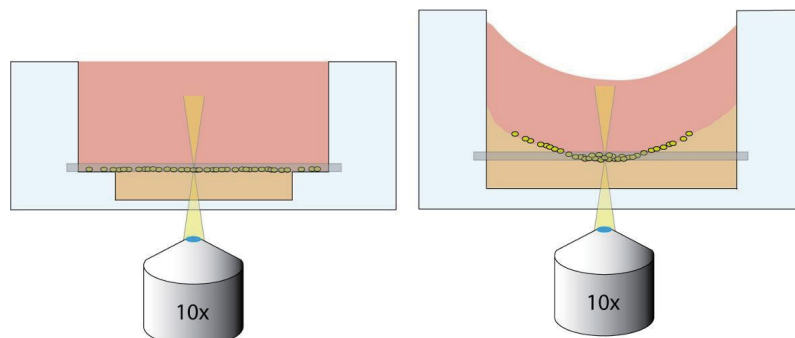


マルチチャンネルピペットを使用して、細胞懸濁液を上部ウェルに注入します。



細胞の沈降プロセス。数分後にすべての細胞がゲル面に落下しました。

この段階のウェルの断面図には、マトリゲル™自体およびその上にある培地という2つの平坦な表面が存在します。通常のウェルフォーマットとは異なり、優れた光学的性質がメニスカスによって妨げられることはありません。



μ-Slide Angiogenesisのウェルの平坦な表面と96ウェルプレートのウェルの比較

## 6 顕微鏡による観察

顕微鏡を用いてデータを収集する方法としては、手動または自動の2種類が考えられます。曲線の時間依存性および特徴（例、極大および安定相）を確認するためには、タイムラプス撮影動画の記録が推奨されます。この後で物質がチューブ形成に及ぼす影響を検討するには、1回の手動測定を行うだけで十分です。

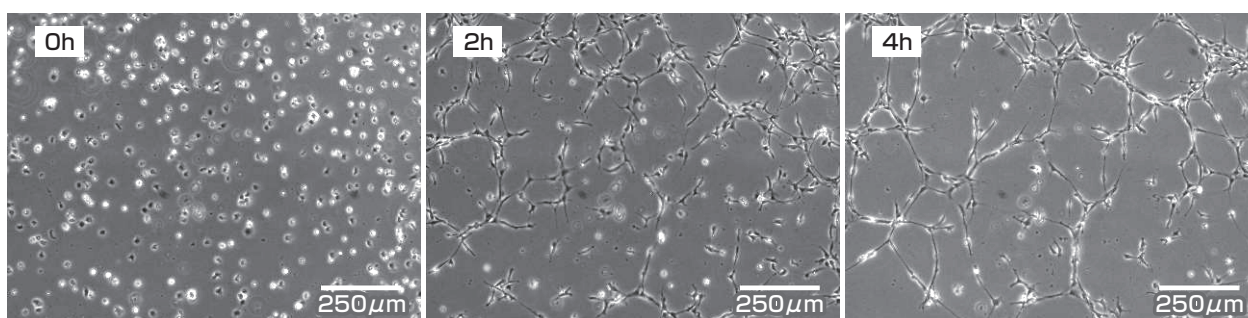
これらのタイムラプスによる特性の解析方法の詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」に記載されています。

### 自動観察

細胞を播種した直後に、インキュベーションチャンバー（例、ibidi ヒーティングシステム）を搭載した倒立顕微鏡にスライドをセットします。イメージングシステム上で観察したい領域を選択後、タイムラプス撮影を開始します。HUVECの場合には低倍率（4倍または10倍）および5分間隔での撮影が推奨されます。経過時間全体にわたってシャープな写真を撮影するには、ソフトウェアのオートフォーカスプログラムを使用してください。細胞がゲル内に移動して焦点面が変化することがあります。

### 手動観察

ネットワーク形成の曲線が分かっている場合には、最も関心のある時点で撮影するだけで十分です。スライドを入れた加湿チャンバーをインキュベーター内でインキュベートします。さまざまな時点でスライドを取り出し、顕微鏡上で手動撮影します。



0、2 および 4 時間後に倍率10倍で撮影したタイムラプス撮影写真

## 7 データ解析および解釈

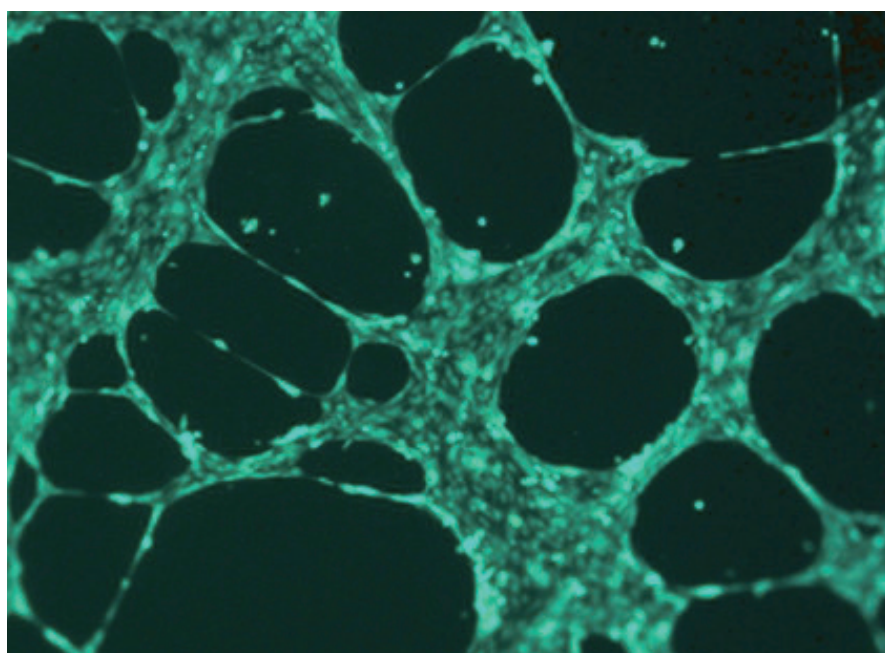
写真はさまざまなパラメータ（例、血管の長さ、ループまたは細胞で覆われた領域など）に基づいて解析されます。データ解析および解釈の詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」に記載されています。



## 8 染色プロトコール

以下のステップにしたがってください。

- 1) 染色前にウェルの写真を撮影します。この画像により、染色前後の細胞のパターンの比較が可能になります。
- 2) 上清を慎重に廃棄します。ゲルまたは細胞のネットワークを傷つけないように注意してください。
- 3) カルセインを終濃度 $6.25\mu\text{g/ml}$ となるよう添加 ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ カルセインストック溶液 $12.5\mu\text{l}$ を添加) した無血清培地 $50\mu\text{l}$ を添加します (1 : 160)。
- 4) 暗所にて室温で30分間インキュベートします。
- 5) PBSで3回洗浄します。上部ウェルの側面からPBSをゆっくりと注入してリンスします。細胞にPBSを直接ピペッティングしないでください。ウェルの反対側からPBSを除去して、細胞をPBSで非常にやさしくリンスします。
- 6)  $485\text{ nm} / 529\text{ nm}$ で蛍光画像を撮影します。



カルセイン ( $6.25\mu\text{g/ml}$ ) で染色されたHUVECネットワーク