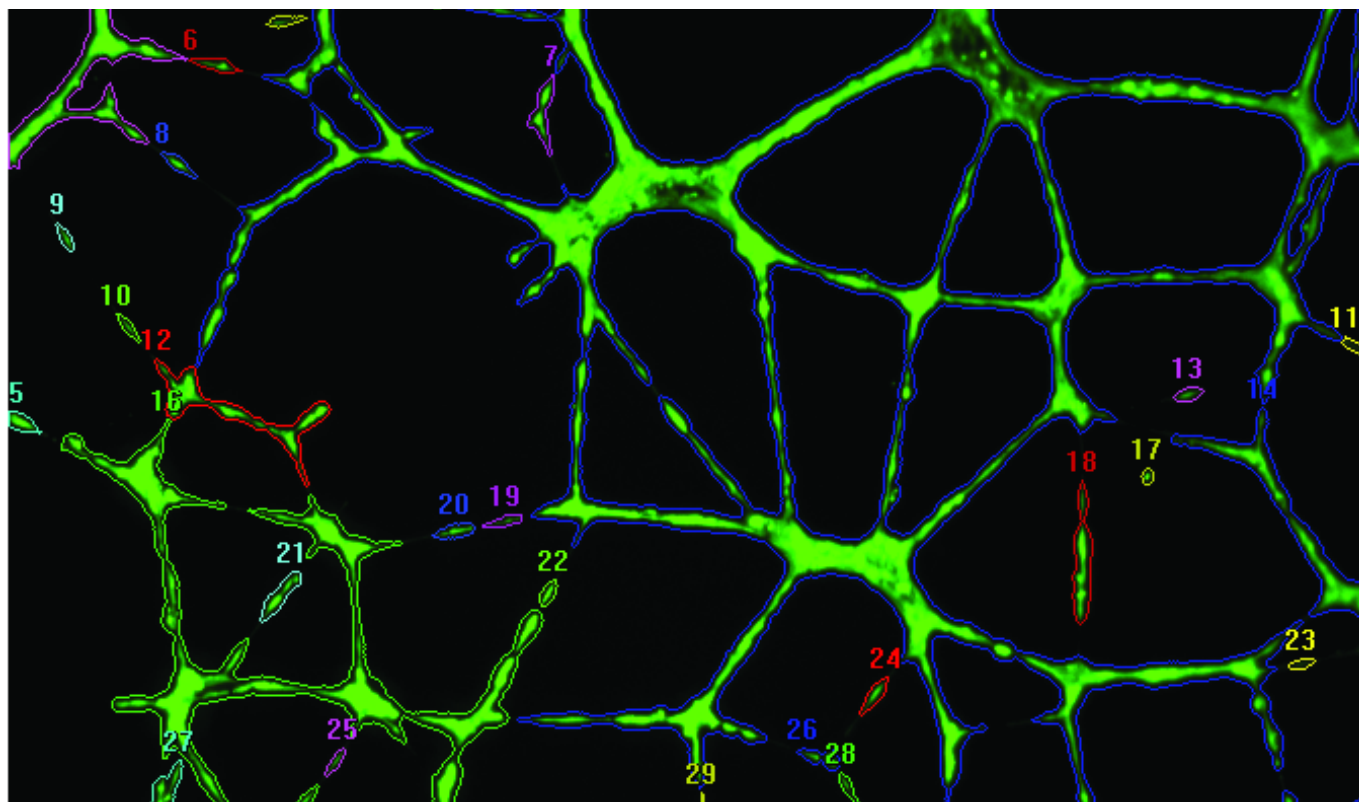


血管新生モデルとしての 血管内皮細胞チューブ形成の画像解析



はじめに

血管新生は、がん細胞塊の成長に不可欠であるため、多くの薬剤スクリーニングや細胞シグナル伝達研究で注目されています。血管新生は、腫瘍塊の形成や増殖において重要な現象であり、さらに創傷治癒、網膜症、黄斑変性に関与することが示唆されています。

血管新生を定量化するには、従来の動物モデルに代わって、細胞培養アッセイが行われるようになりました。細胞培養アッセイは、実験しやすく、統計的に信頼性があり、薬剤スクリーニングの部署で自動化して使用するのに適しています^{1,2}。

これらのアッセイは、血管内皮細胞が細胞外マトリックス(BDマトリゲル™ マトリックス)上にはっきりとしたチューブを形成し、それらを蛍光顕微鏡で観察するという方法を採用しています。チューブの定量化はマニュアル作業でもできますが、この方法では客観的なハイスループットアプリケーションに対応することはできません。ハイスループットアプリケーションに適しているのは、高度な画像・データ解析アルゴリズムを備えたBD Pathway™ バイオイメージ解析装置などの自動共焦点イメージングシステムを使用する方法です。このシステムのアッセイでは生細胞を使用するので、チューブの破壊といった細胞の固定によるアーチファクトを防ぐようデザインされています。



Helping all people
live healthy lives

方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、EGM-2(Cambrex, CC-3156)で培養しました。細胞を洗い、トリプシン処理(トリプシン-EDTA、Cambrex、CC-5012)後回収し、0.1% BSA(カタログ番号354331)含有基礎培地(Cambrex, CC-3162)に懸濁しました。その後、BD BioCoar™ アンジオジェネシス血管内皮細胞チューブ形成システム(カタログ番号354150)に20,000個/ウェルで播種し、16~18時間、37°C、5% CO₂でインキュベートしました。このプレートにはBD マトリゲル™ マトリックスが最適化された条件でコートされ、血管内皮細胞のチューブ形成を促します。スラミン(Calbiochem, 574625)を用いて、0.3~160 µMまでの用量反応曲線を作成しました。スラミンは水で溶解し、0.1% BSA含有基礎培地で段階希釈しました。

16~18時間後、培地を除去し、細胞をハンス平衡緩衝塩溶液(HBSS)で2回洗浄し、30分間、37°C、5% CO₂環境で8 µg/mLのCalcein AM(Invitrogen, C-3100MP)で染色しました。染色液を除去し、細胞を2回洗浄して、余分な色素を除きました。この染色細胞の一部を、加温した1%パラホルムアルデヒド(HBSSで希釈)で固定後、PBSで2回洗浄し、Alexa 488ファロイジン(Invitrogen, A12379、1:200希釈)で標識しました。

細胞の画像化には、BD Pathwayバイオイメージ解析装置を用い、共焦点および非共焦点モードで取り込みました。チューブ形成の定量化には4×(NA 0.13)対物レンズを用い、より高解像度な画像の作成には10×(NA 0.3)対物レンズを用いました。

結果

観察初期の結果では、低倍率を使用しても、チューブ形成現象がいくつかの焦点面にわたって発生していることがわかりました。これは、血管内皮細胞がBD マトリゲルマトリックス内を移動することが知られていることを考えれば、驚くべきことではありません。

そのため、BD Pathway バイオイメージ解析装置では、Z軸方向に沿って何枚もの写真を撮り、その中の焦点の合った部分だけを合成して、1枚の画像として自動作成するという、新規機能を使用しました。この「重ね撮り」機能とシステムの共焦点画像取り込み機能とを組み合わせることにより、画像解析に先立ち、平面性の高い試料画像を得ることができました。

画像解析は、BD™ Neurite Outgrowth解析機能をさらに改良した新しいBDチューブ形成解析機能を用いて行いました。そのアルゴリズムは、バックグラウンド由来の細胞を除き、チューブの全長、チューブの総面積、セグメントの総数を含む多くの定量的特性を求めることが出来ます。また、このソフトウェアでは、デフォルト値を用いた解析の他に、特定のアッセイに最適化するためのパラメータ調整も可能です。さらに、細胞片や未結合の毛細管断片をデータ解析前に除去することも可能です。作成されたデータはテキストファイルで保存され、BD™ Image Data Explorerで容易に統計解析することができます。

BD Pathwayバイオイメージ解析装置で取り込んだコントロール画像(図3、左パネル)は、毛細管の明瞭な発生を示し、血管内皮細胞が確かに血管によく似ていることがわかります。

図1の画像は10×対物レンズを用いて取り込まれたものであり、血管内皮細胞由来の毛細管の発生を極めて明瞭に示しています。これらの毛細管は主に、細胞凝集で生じ、他の毛細管や凝集塊と能動的に結合すると考えられます。薬剤開発では、チューブ形成に潜在的に関わるシグナル伝達や遺伝子発現プロセスが、重要なポイントになるため、形成された毛細管の総数(図3および図4)は重要な測定パラメータになります。

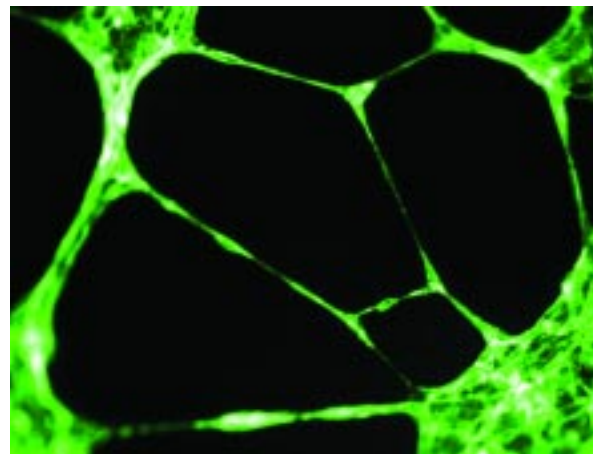


図 1. 細胞凝集塊の間を伸びる明瞭な毛細管を形成する血管内皮細胞。
10×対物レンズを用いて単一の非共焦点像として取り込んだ画像。焦点の外れた領域は、細胞がBD マトリゲル マトリックスの内部に侵入していることを示す。

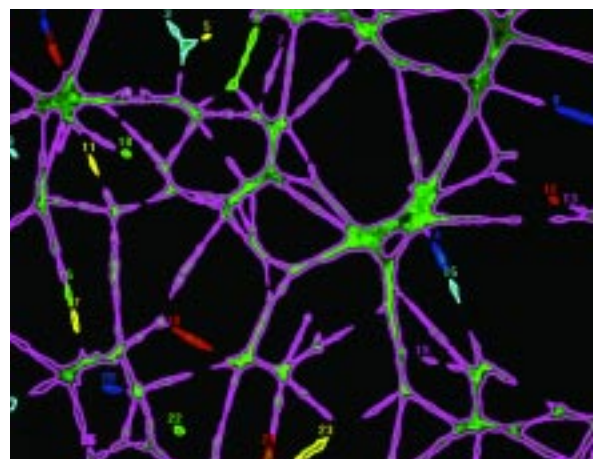
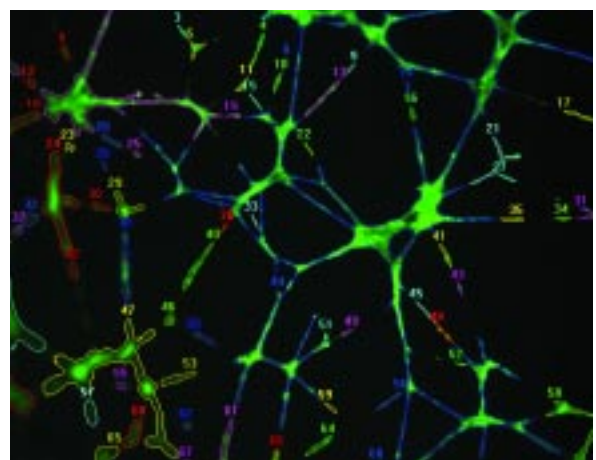


図 2. 共焦点と非共焦点像との比較。

上の画像は、非共焦点モードで単一の焦点面の画像を取り込んだコントロール細胞を示している。下の画像は、同じ視野を共焦点モードで取り込んだ10枚の画像から合成した画像である。領域の重ね合わせにより、毛細管が確認される。共焦点スライス画像と合成により、毛細管をより正確に判別できる。非共焦点像は、焦点がぼやけ、毛細管が途切れ途切れとなるため、毛細管数の過大評価、毛細管総面積と全長の過小評価を招く。数字は、識別された毛細管を示す。それぞれの色は、便宜的に着色したものである。

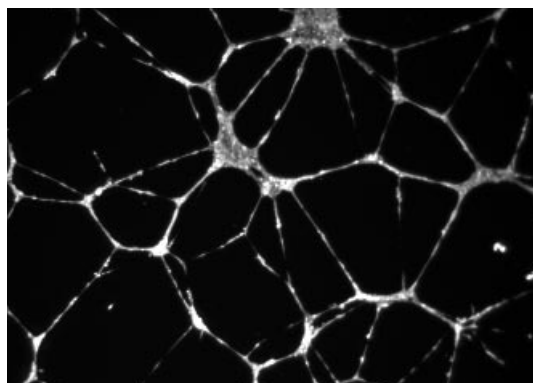


図 3. 血管内皮細胞のチューブ形成に対するスラミンの作用。

左の画像は、コントロール細胞の共焦点像を合成してフルフレームの単一画像(倍率4×)としたもの。血管内皮毛細管の網状組織の形成が明瞭に画像化されている。右の画像は、スラミンの阻害作用を示しているが、この濃度(40 μM)では、スラミンは毛細管の形成を著しく阻害している。

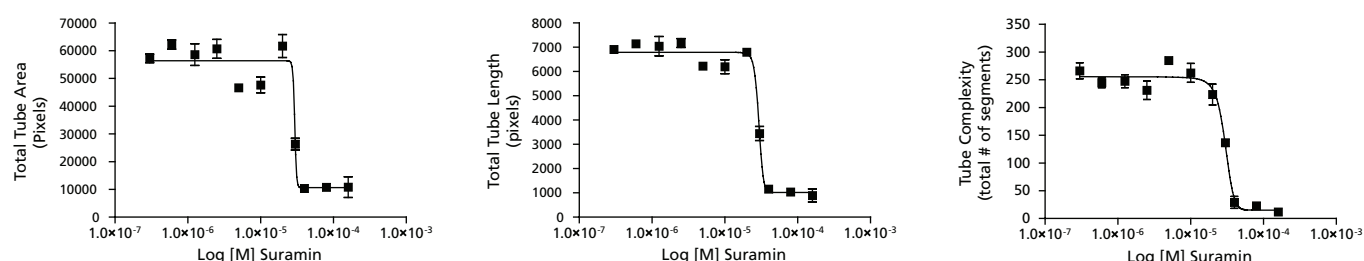


図 4. スラミンに対する用量反応曲線。

スラミンは、チューブ形成を用量依存的に阻害する。その作用は、画像の毛細管総面積(左グラフ)、毛細管全長(中央グラフ)、毛細管の複雑さ(右グラフ、毛細管総数の目安)で顕著であった。データはn=4ウェルから得られたものであり、平均値±S.E.Mで示されている。3つのパラメータすべてで、29 μM のIC50値が得られたが、それは公表されている報告に一致している。

考察

BD Pathwayバイオイメージ解析装置のような自動イメージング装置の登場により、顕微鏡を用いたアッセイが薬剤探索やシステム生物学領域に利用できるようになりました。しかし、顕微鏡をアッセイに利用するためには、画像の再現性が高く、手動操作が不要で、解析には人的介入を最少限にする必要があります。これを可能にするのが、96ウェル コーティングプレート、自動イメージングシステム、データ解析ソフトウェアです。BD Pathwayバイオイメージ解析装置の「重ね撮り」機能と共焦点顕微鏡の組み合わせで、本来の生理的環境により近い3次元マトリックスでのチューブ形成の解析が可能です。非共焦点システムを用いた方法では、観察対象を一晩乾燥させて、細胞を平面化します。この方法は生細胞で行うことが出来ず、サンプルの脆い分岐構造が著しく変形してしまうおそれがあります。

血管新生は、がんを含む複数の疾患の治療において重要なターゲットです。薬剤探索の低分子スクリーニング段階では、動物実験は、処理能力が低い、技術的に困難なことが多い、費用がかかる、不明瞭などのため利用できません。今回紹介したアッセイは、顕微鏡で客観的に血管新生を定量化できることから、多くの候補薬剤の二次スクリーニングに使用できます。現段階では、動物実験を細胞培養に完全に置き換えることはできないものの、試験すべき化合物の数を減らすのに役立ち、薬剤開発や細胞シグナル伝達現象の理解をスピードアップすることが出来ます。

参考文献

1. Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., Akhtar, N. 2003. Angiogenesis Assay: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* .49:1,32-40.
2. Taraboletti, G., Giavazzi, R. 2004. Modelling approaches for angiogenesis. *EJC* .40,881-889.
3. Fu, X.W., Nurse, C.A., Cutz, E. 2004. Expression of functional purinergic receptors in pulmonary neuroepithelial bodies and their role in hypoxia chemotransmission. *Biochem. J.* 385 (3-4), 275-284.

* BD、BDロゴはBecton Dickinson and Companyの商標です。© 2006 BD



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

製品関連・資料請求
(お客様情報センター)

技術的なお問い合わせ

 **0120-8555-90**
Fax: 024-593-5761

E-Mail: tech_cell@bd.com

65-060-00
R0-0609-003-072