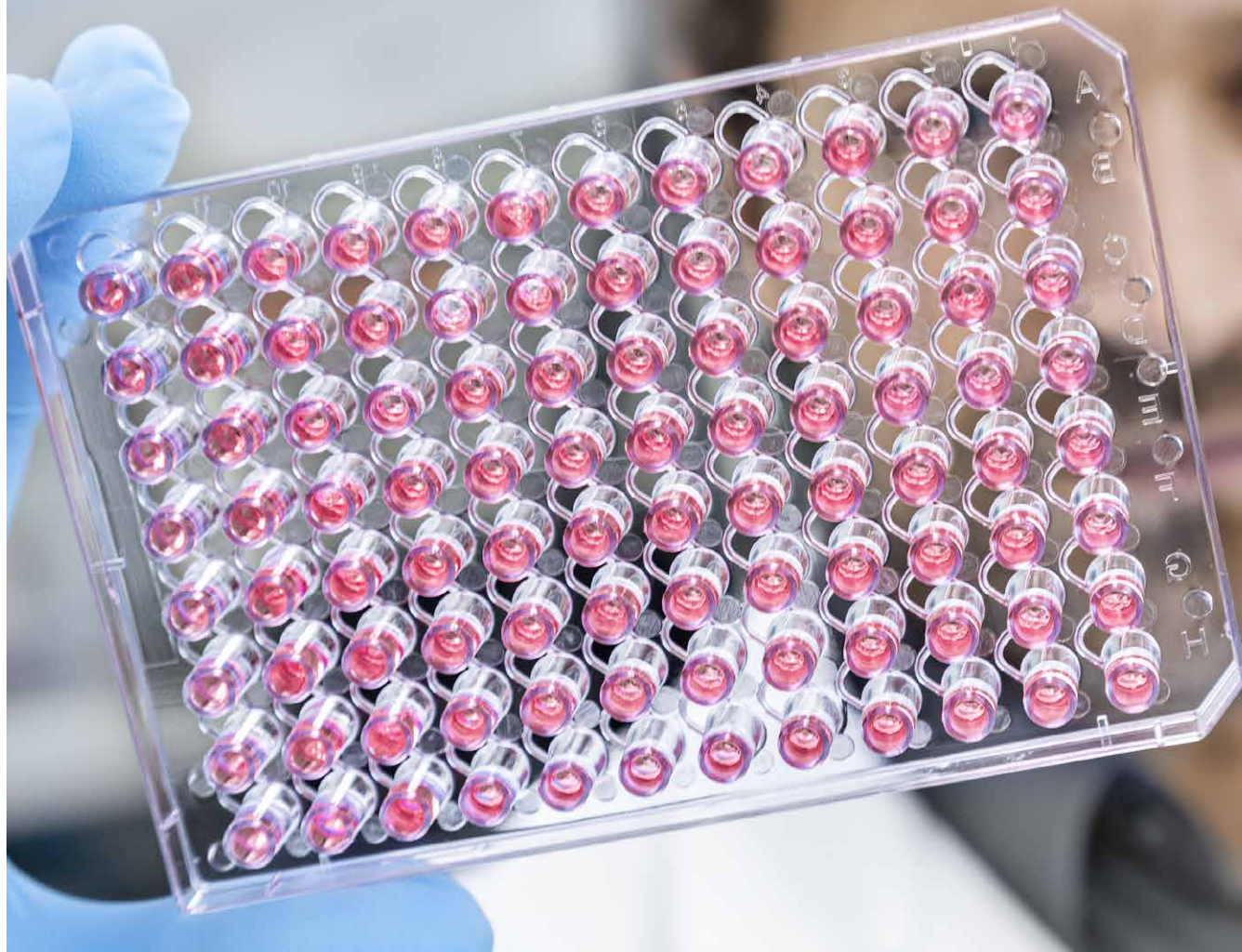


making a difference



APPLICATION NOTE

ThinCert® 96ウェルHTSインサートを使用した、
ハイスループット細胞遊走アッセイ

www.gbo.com/bioscience


greiner
BIO-ONE

このアプリケーションノートについて

実験系を並列化・小型化した新しいハイスループットソリューションである ThinCert® 96ウェル HTS インサートを使用すると、細胞遊走研究を前例のない効率で実施することができます。透明な多孔質メンブレンは一貫性のある化学誘引物質濃度勾配を確立し、より高い精度と最小限の実験誤差を実現します。これによりお客様が細胞遊走ダイナミクスについての詳細な知見を得る機会を提供します。

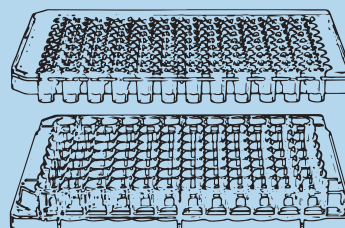
このアプリケーションノートでは、ハイスループットワークフローへのシームレスな統合に重点を置いて、HTSインサートの細胞遊走研究における利用法を詳細に説明します。



詳細情報と推奨ご利用例はこちら (英語)

THINCERT® 96ウェルHTSインサートキーファクト

- 遊走および浸潤研究に最適
- ハイスループットアッセイのための96ウェルフォーマット
- ポア径3 μm または8 μm のポリカーボネートメンブレン
- 高い透明性
- メンブレンプレートとレシーバープレートの高いフィット性により、ウィッキングを最小化



1. 序論

細胞の遊走と浸潤は、形態形成 [1, 2]、組織修復 [3]、炎症 [4, 5]、腫瘍形成 [6, 7] など、多くの生理学的および病理学的事象において重要な役割を果たす基本的なプロセスです。細胞遊走を研究するための *in vitro* アッセイ系の構築は、根底にある生物学的メカニズムをより深く理解するために、また潜在的な治療法開発のために非常に重要です。科学者は、腫瘍細胞の *in vitro* における遊走能と、*in vivo* における浸潤特性との間に高い相関があることを利用しています [8]。このことから、細胞遊走アッセイは新しい抗がん剤の研究において重要性を増しており、細胞遊走アッセイを利用することで研究者はさまざまな薬剤候補物質の有効性と可能性を効果的に評価できます。細胞遊走を研究するためのアッセイはこれまでに複数開発されており、その中でもボイデンチャンバーアッセイは良く使用される *in vitro* 技術です [9]。このアッセイは2つのコンパートメントからなる系を利用して、化学誘引物質の濃度勾配に従って細胞が上部コンパートメントから多孔質メンブレンを通して下部コンパートメントへ移動するように誘導します。アッセイの有効性を確保するためにメ

ンブレンのポアサイズは慎重に選択して、能動的な細胞移動を可能にしながら受動的な細胞の通過を防ぐ必要があります。ボイデンチャンバーアッセイにはいくつかの改良型が開発されており、細胞外マトリックスコーティングを使用した浸潤アッセイや、細胞単層を使用した経上皮遊走アッセイなどの例が挙げられます。

本アプリケーションノートでは、自動化システムでも使用できる新しいハイスループットソリューションである ThinCert® 96 ウェル HTS インサートを使用した細胞遊走アッセイについて説明します。本アッセイ系は、多数の実験条件を同時に実施する効率的な手段を提供するとともに、時間やその他リソースの使用を削減し、全体的な費用を軽減します。最適化されたポリカーボネート製メンブレンは安定した化学誘引物質濃度勾配を生成し、その高い透明度により適切なイメージングを可能にします。これらの特性により、ThinCert® 96ウェルHTSインサートは大規模な細胞運動性研究に最適なソリューションとなります。

2. 材料と方法

製品	製造元	製品番号
細胞		
ヒト結合組織繊維肉腫由来細胞 (HT-1080)	DSMZ	ACC 315
ヒト乳がん由来細胞 (MCF-7)	DSMZ	ACC 115
培地		
DMEM (HT-1080細胞の培養に使用)	PAN Biotech	P04-04500
RPMI 1640 (PAN Biotech) に、非必須アミノ酸 および 1 mM ビルビン酸を添加 (MCF-7細胞の培養に使用)	PAN Biotech	P04-18500
培養試薬		
ウシ血清アルブミン溶液	Sigma Aldrich	A7284-10ML
トリプシン/EDTA溶液 (0.05 %/0.02 %)	PAN Biotech	P10-023100
ウシ胎児血清	PAN Biotech	P30-3306
染色試薬		
カルセインAM	Sigma Aldrich	206700-1MG
消耗品		
ThinCert® 96ウェル HTSインサート TC ポア径8.0 μm	Greiner Bio-One GmbH	655680
96ウェルマイクロプレート 平底 チムニーウェルブラック PS	Greiner Bio-One GmbH	655076

3. アッセイ要綱

ThinCert® HTSインサートは、96 個の細胞移動チャンバーを備えたプラットフォームであり、ハイスループット実験を促進するように設計されたツールです。それぞれのチャンバーは独立しており、メンブレプレート上にある上部コンパートメントと、レシーバープレート上にある下部コンパートメントの、異なる2つのコンパートメントで構成されています。アッセイを行う際は、細胞を上部コンパートメントに播種し、メンブレンに接着させます。

次に、化学誘引物質を下部コンパートメントに添加し、メンブレンを通して受動的に拡散すると、化学誘引物質に向かう細胞の走化性を誘導します。

細胞をカルセインAMで蛍光標識した後、遊走した細胞はポリカーボネートメンブレンの下面から剥離させ、標準的な蛍光マイクロプレートリーダーを使用して定量することができます。

さらに、定性的な顕微鏡検査を実施して、メンブレン上で直接移動した蛍光標識細胞を検出することもできます。

3.1 細胞播種の準備 (一般的な細胞培養)

1. HT-1080細胞を一般的なプロトコルに従って、血清添加済み培地で培養する。
2. アッセイ前日に培地交換し、血清フリー培地 (0.2 % BSA) に置き換える。
3. 血清フリー培地で一晚培養した後、培地を取り除きPBSでリンスする。
4. トリプシン溶液を添加し、細胞を剥離する。
5. 細胞懸濁液を遠心管に移し、350 x gで5分間遠心する。
6. 細胞ペレットを、予め温めておいた培地で再懸濁する。
7. 細胞懸濁液を希釈し、100,000 cells/ml に調整する。

3.2 THINCERT® 96ウェルHTSインサートに細胞を播種する

1. 化学誘引物質を添加した培地 200 μ l を、レシーバープレートの各ウェルに加える。(本稿では、0.25 % から 10 % までの複数の濃度に調整したFCSを添加した。)
2. 3.1.7で準備した細胞懸濁液50 μ l を、メンブレプレートの各ウェルに加える。
3. 37°C, 5 % CO₂存在下で24時間インキュベートする。

3.3 カルセイン染色

1. レシーバープレートから培地を取り除く。
2. カルセインAM (DMSO溶液) を添加して8 μ Mに調製した血清フリー培地を、レシーバープレートの各ウェルに150 μ lずつ加える。
3. 37°C, 5 % CO₂存在下で45分間インキュベートする。

3.4 細胞剥離と蛍光強度測定

4. メンブレプレートとレシーバープレートの双方から、培地を取り除く。
5. 両方のプレートの各ウェルをPBSでリンスする。
6. メンブレンの下側表面に移動した細胞を剥離するために、レシーバープレートにトリプシン溶液を加える。
7. 10分間インキュベートして、穏やかに振とうする。
8. トリプシン細胞懸濁液を180 μ lずつ、レシーバープレートからブラック96ウェルマイクロプレートに移す。
9. プレートリーダーで蛍光強度を測定する。
励起波長 485 nm / 蛍光波長 520 nm

レシーバープレートの培地交換について：

インサートプレートには培地交換のためのアクセスポート (図1) があります。マルチチャンネルピペット等を用い、アクセスポートを通してレシーバープレートの培地交換が可能です。または、インサートプレートを持ち上げて培地交換を行うこともできます。

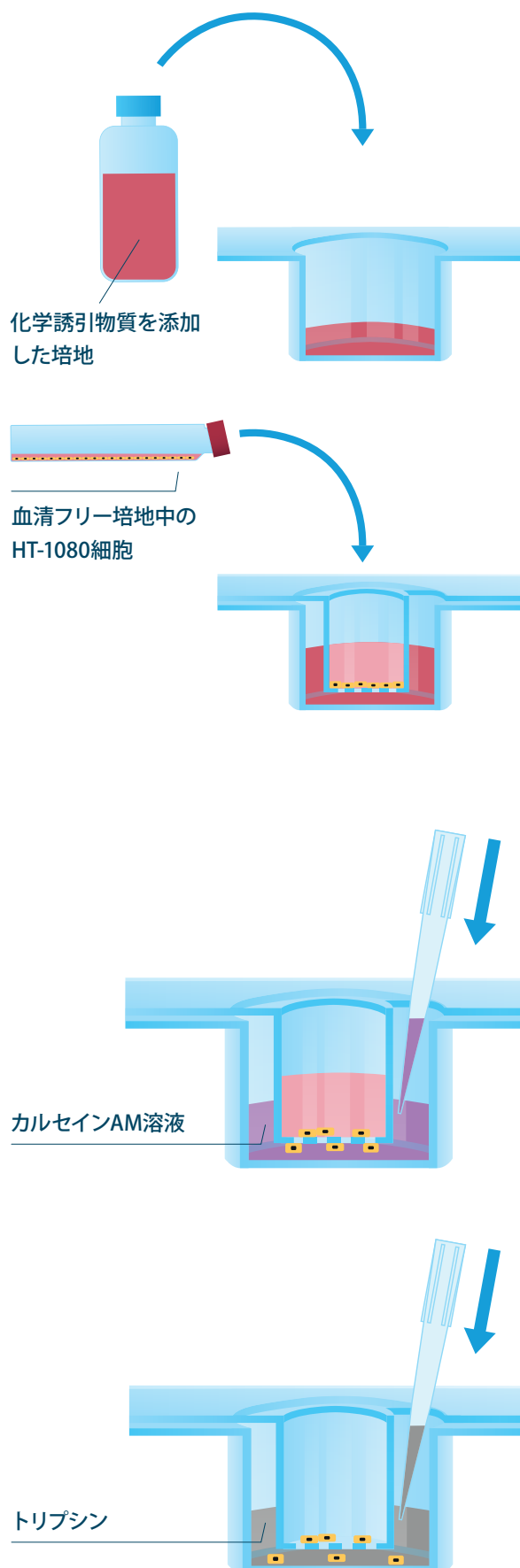
取り扱い上の注意：

レシーバープレート内の培地が過度に動かないように、プレートの取り扱いには注意してください。



図1：アクセスポートはインサートプレート上の各ウェルのすぐ隣にあります。ここからシングルチャンネル/マルチチャンネルピペットまたはロボットによる液体分注に対応できます。

4. 細胞遊走アッセイのワークフロー



1

準備

レシーバープレートに化学誘引物質を添加した培地を加える。

2

細胞播種

インサートプレートの各ウェルに細胞懸濁液を加える。

24時間インキュベート

3

カルセイン染色

メンブレンプレートとインサートプレートの両方の培地を、カルセインAMを添加した血清フリー培地に交換する。

45分間インキュベート

4

細胞剥離

上下両方のプレートから培地を取り除き、レシーバープレートにトリプシンを加えて細胞を剥離する。

5. 顕微鏡での定性的観察

プレートリーダーを用いた定量的検出プロトコルの3.1から3.3までの手順に従います。基底側細胞を剥離させずに、メンブレン上の細胞を直接観察します。そのために下記手順に従ってください。

1. メンブレンプレートから培地を取り除く。
2. あらかじめ湿らせた綿棒を使用して、綿棒をインサートの周りで時計回りと反時計回りにゆっくりと回転させ、メンブレンの上側（頂端側）に残っている遊走しなかった細胞を除去する。
3. 緑色のチャンネルの蛍光顕微鏡を使用して、膜の下側に移動した細胞の蛍光シグナルを検出する。

さらに、ThinCert® 96ウェルHTSインサートは、その独特のポア構成により高い透明性を実現します。この特性により、生細胞の観察が容易になり、細胞の形態の確認、細胞の集密性の評価、およびコンタミネーションモニタリングの精度と信頼性が向上します。したがって、各実験では細胞の継続的な顕微鏡モニタリングが可能となります（図2）。

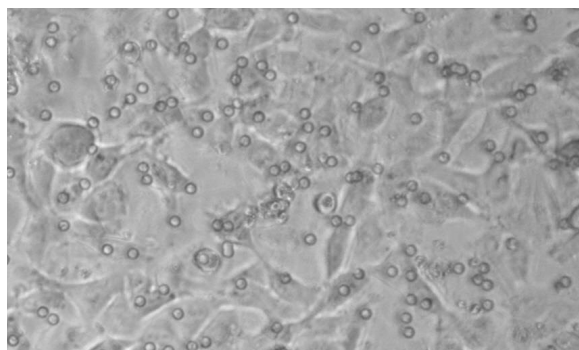
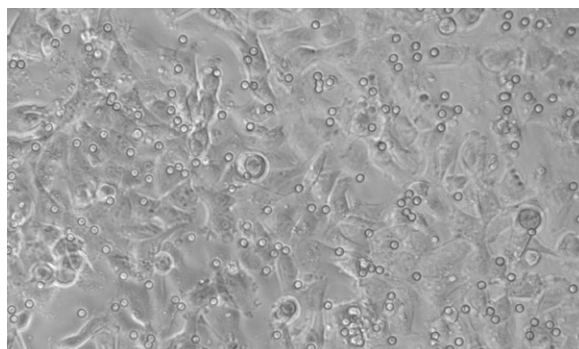


図2：ThinCert® 96ウェルHTSインサート上のHT-1080細胞の生細胞観察（明視野）

6. 結果

この研究では、前述のプロトコルを使用して、化学誘引物質（ウシ胎児血清FCS）の濃度勾配に応答したヒト結合組織線維肉腫（HT-1080）細胞の遊走挙動についての包括的な調査を実施しました。細胞遊走の評価は、蛍光測定による定量的分析と顕微鏡による定性的検査を組み合わせた多面的なアプローチで実施しました。

6.1 遊走挙動の定量化

HT-1080 細胞を ThinCert® 96 ウェル HTS インサートのメンブレンに播種すると、細胞の移動が FCS 濃度勾配の影響を受けることが明らかでした。結果は、より高い濃度の勾配（下部チャンバーの 5 % または 10 % FCS）がより顕著な移動速度を示したことを示しています。逆に、0.5% FCS および 2% FCS のより低い濃度の勾配では、比較的低い移動速度が得られました（図3 および 5）。

実験系の機能をさらに証明するために、低遊走性の MCF-7 細胞を追加のコントロールとして使用しました。図4に示すように、10 % FCS 条件の平均値は、0 % FCS のコントロールと比較してわずかな増加しか示しませんでした。

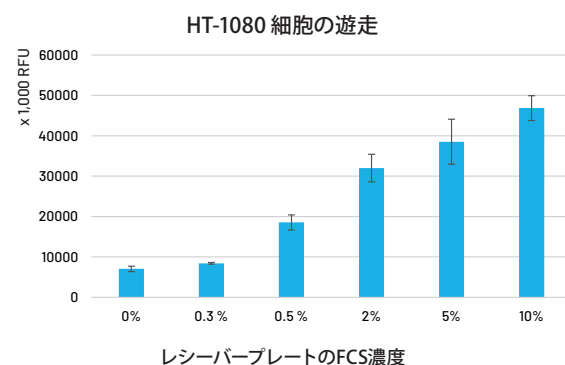


図3：FCS 濃度に応じたHT-1080 細胞の遊走（24時間後）。各数値は、並行して実行した6つのウェルの平均値。エラーバーは標準偏差を示します。

(RFU: relative fluorescence units, 相対蛍光単位)

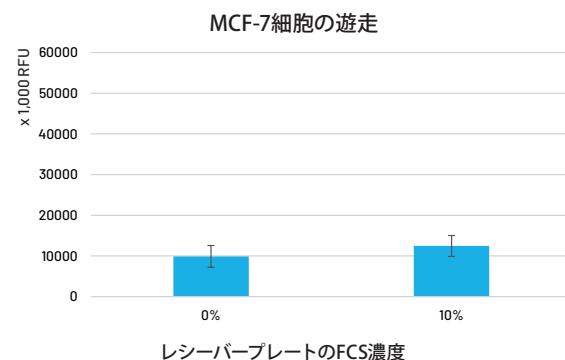


図4：MCF-7 細胞の0% および 10% FCS への遊走（24時間後）。各数値は、並行して実行した6つのウェルの平均値。エラーバーは標準偏差を示します。

(RFU: relative fluorescence units, 相対蛍光単位)

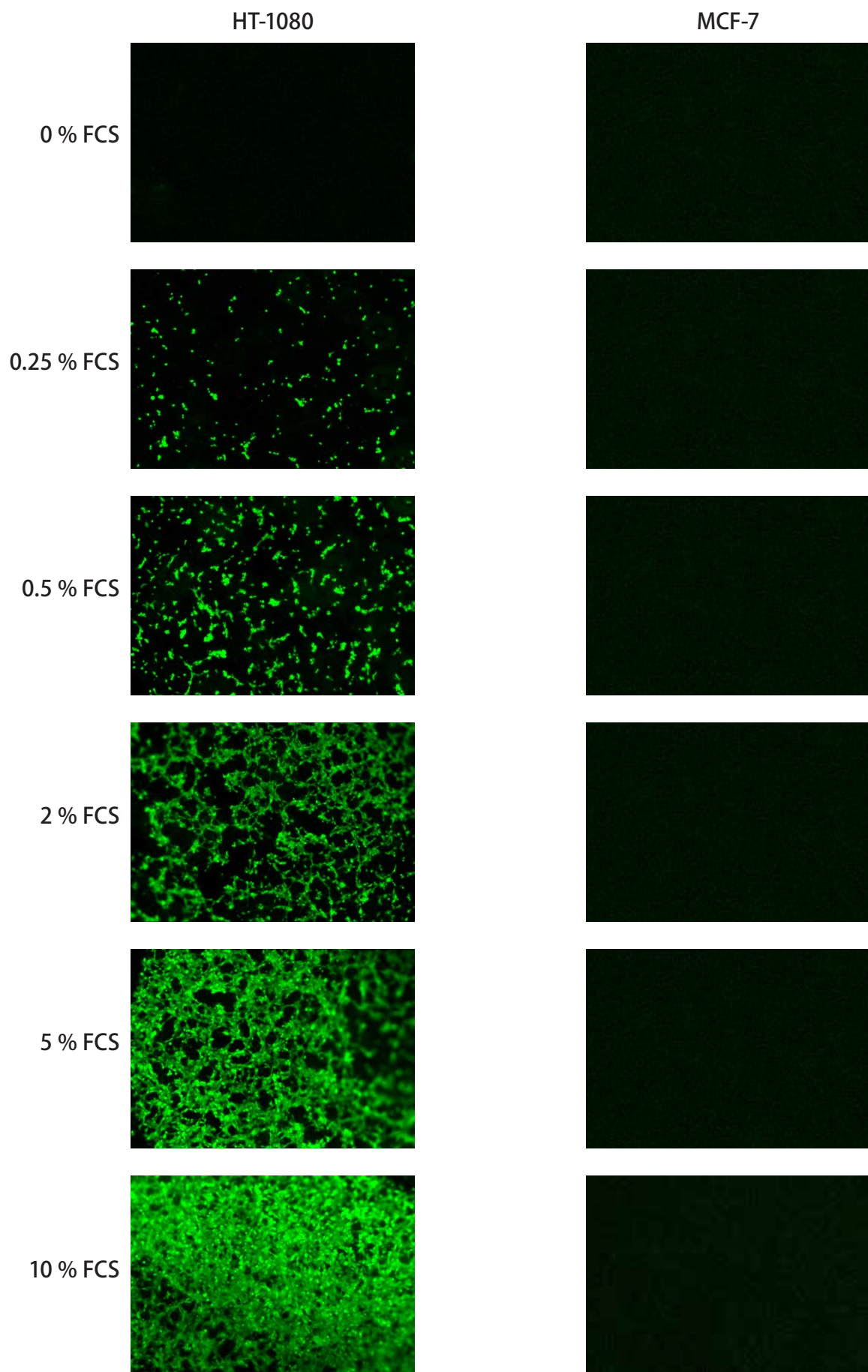


図5：FCS濃度に応じたHT-1080 細胞 および MCF-7 細胞の遊走挙動の顕微鏡観察 (24時間後)。緑色の構造は、メンブレンの下側に存在する蛍光染色された細胞を表します。

6.2 顕微鏡による定性的検査

さらに、蛍光顕微鏡を使用して視覚的に定性的検査を実行しました。この目的のために、メンブレンプレートの内側にある遊走しなかった細胞を湿った綿棒で穏やかに取り除きました。顕微鏡検査は、マイクロプレートリーダーで行われた定量分析の結果を裏付けます。データは、FCS 濃度と HT-1080 細胞の遊走促進との間に直接的な関連があることを明確に示しています。予想通り、低遊走性の MCF-7 細胞は、同じ条件下では有意な遊走活性を示しませんでした。

6.3 最適な播種密度の探索

細胞株ごとに播種密度を最適化することは重要です。濃度が高すぎると、細胞を正確に計数することが困難になり、メンブレンのポアが過飽和になる可能性もあります。一方、追加する細胞数が少なすぎると、計数に一貫性がなくなり、信頼性の低い結果が得られる可能性があります。また、播種密度が上昇するにつれて、細胞がメンブレンポアの真上に位置する可能性が高まります。密度が上昇すると、この現象は化学動態（運動活性の亢進によるランダムな遊走）と走化性または触走性効果（化学誘引物質の濃度勾配によって促進される遊走）との区別が難しくなります。

播種密度に基づく遊走挙動を調査するために、さまざまな細胞密度を調べました。図 6 に示すように、広範囲の細胞集団（ $1.25 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 細胞/チャンバー）にわたって、遊走性 HT-1080 細胞は総細胞数と直線相関を示しました。細胞遊走アッセイを行う場合は、この範囲内の細胞濃度を使用することをお勧めします。

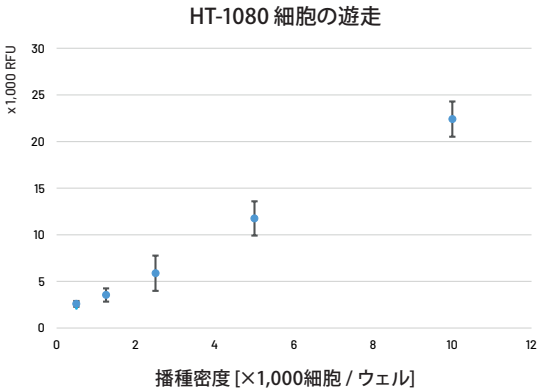


図 6：10% FCS に応答した HT-1080 細胞の遊走（24 時間後）。遊走細胞の相対蛍光単位 (RFU) は、細胞培養インサート内の細胞の総数と直線相関を示します。各数値は、並行して実行した 7 つのウェルの平均値。エラーバーは標準偏差を示します。
(RFU: relative fluorescence units, 相対蛍光単位)

7. 結論

in vitro 細胞遊走アッセイは、がん転移、血管新生、炎症性疾患などの複雑な現象に介入するための、より優れたバイオマーカー、治療標的、薬剤を探索する上で不可欠なツールです。細胞の遊走を測定し、成長因子やケモカイン、薬剤候補物質などのさまざまな分子の影響を分析するための制御された環境を提供します。本アプリケーションノートで取り扱った実験例は、ThinCert® 96 ウェル HTS インサートの細胞遊走アッセイへの優れた適合性を示しています。

細胞遊走実験では、ポアサイズを正確に選択することが重要です。ポアサイズが研究対象の細胞の大きさに対して適切であり、細胞が受動的に移動するのを防ぐのに十分な制限性と、細胞の能動的な移動を可能にするために十分な許容性の両方を備えていることが重要です。表 1 に、一般的な推奨ポア径を示します。

細胞の種類	例	推奨ポアサイズ [μm]
上皮細胞	MCF-7, MDA-MB-231	3
内皮細胞	HUVEC, HMVEC	3
多形核好中球	-	3
リンパ球	T細胞, B細胞	3
線維肉腫細胞	NIH3T3, HT-1080	8
白血球	マクロファージ, 単球	8
樹状細胞	BMDC	8

表 1：一般的な細胞に対する推奨ポア径

THINCERT® 96ウェルHTSインサート (メンブレンプレートおよびレシーバープレート)

増殖面積: 14 mm²、ワーキングボリウム (メンブレンプレート): 15 ~ 160 µl、ワーキングボリウム (レシーバープレート): 120 ~ 300 µl、蓋: あり (低蒸発リング付き)

製品番号	ポア密度	ポアサイズ	メンブレン色	表面処理	滅菌	包装単位
655630	2 x 10 ⁶ 個 / cm ²	3 µm	透明	TC*	滅菌済	個別包装5枚入り
655680	1 x 10 ⁵ 個 / cm ²	8 µm	透明	TC*	滅菌済	個別包装5枚入り

THINCERT® 96ウェルHTSインサート用レシーバープレート

ワーキングボリウム (レシーバープレート): 120 ~ 300 µl、蓋: あり (低蒸発リング付き)

製品番号	培養面積	表面処理	滅菌	包装単位
655169	-	無処理	滅菌済	32枚入り (8枚 / パック × 4)
655167	53 mm ²	TC*	滅菌済	32枚入り (8枚 / パック × 4)

*TC表面処理: 接着細胞のための物理的表面処理 ("TC" は Tissue Culture の略)

THINCERT® 96ウェルHTSインサートの他のご利用例はこちら

"ThinCert® 96ウェルHTSインサートを使用した、ハイスループット in vitro 気道モデル構築"



弊社製品担当者はこちら

弊社製品担当者にご質問・ご相談がありましたらご連絡ください。



参考文献

1. Friedl, P., Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 445–457 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2720>
2. Aman A, Piotrowski T. Cell migration during morphogenesis. Dev Biol. 2010 May 1;341(1):20-33. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.014. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914236.
3. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. Cells. 2019 Jul 28;8(8):784. doi: 10.3390/cells8080784. PMID: 31357692; PMCID: PMC6721499.
4. Liu, J., Zhang, X., Cheng, Y. et al. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. Cell Mol Immunol 18, 2461–2471 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00726-4>
5. Luster, A., Alon, R. & von Andrian, U. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. Nat Immunol 6, 1182–1190 (2005). <https://doi.org/10.1038/ni1275>
6. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. J Vis Exp. 2014 Jun 1;(88):51046. doi: 10.3791/51046. PMID: 24962652; PMCID: PMC4186330
7. Trepas X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Compr Physiol. 2012 Oct;2(4):2369-92. doi: 10.1002/cphy.c110012. PMID: 23720251; PMCID: PMC4457291
8. Klemke R.L., Leng J., Molander R., Brooks P.C., Vuori K., Chersesh D.A. (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. J Cell Biol. Feb 23;140(4):961-72
9. Boyden S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. Mar 1;115:453-66.

株式会社グライナー・ジャパン

〒101-0047 東京都千代田区内神田1-14-10 PMO内神田ビル

TEL 03-5843-9159 FAX 03-6275-0546

URL https://www.gbo.com/ja_JP.html

グライナー・ジャパン取扱店

■お願いおよび注意事項

【使用範囲】記載の商品は全て、「研究用器材・機器」です。人や動物の医療用としては使用しないよう、十分ご注意ください。

Document Number 202401010