

Application

ibidiポンプシステムを用いたHUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) と HPA-SMC (ヒト肺動脈平滑筋細胞) の灌流 (perfusion) アッセイ

製品名

ibidi Pump System (ibidiポンプシステム)

メーカー名

イビディ
ibidi 社

下記のデータは、産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ グループ長 木田 泰之 博士、産総研特別研究員 榎筒 博子 博士 のご厚意により掲載させていただきました。

はじめに

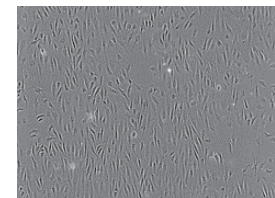
in vitro における高血圧症などの血管疾患研究では生体内組織を再現することが必要です。血管はシヤーストレスを受けるHUVEC (血管内皮細胞) とHPA-SMC (血管平滑筋) の複合組織であり、両細胞を組織構築させた上で灌流実験を行うことが理想です。

本実験ではibidiスライドへの接着条件の検討のため、HUVEC (血管内皮細胞) とHPA-SMC (血管平滑筋細胞) へ負荷実験を行いました。

使用条件

- 細胞名 : HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) (PromoCell. C-12203)
HPA-SMC (ヒト肺動脈平滑筋細胞) (PromoCell. C-12521)
- 細胞培養容器 : μ -Slide VI 0.4 (ib80606)
- コーティング : ibiTreat
- 培地 : 内皮細胞増殖培地 2キット (Takara Cat.No.D12024)
- 灌流培養システム : ibidi ポンプシステム (ibidi 社)
平滑筋細胞増殖培地 2キット (Takara Cat.No.D12027)
- シヤーストレス設定 :
2dyn/cm² 30min→5dyn/cm² 30min→5dyn/cm² 24hr : HUVEC
2dyn/cm² 30min→5dyn/cm² 30min→10dyn/cm² 1hr→20dyn/cm² 24hr : HPA-SMC
- 観察機器 : EVOS Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific)

HUVEC

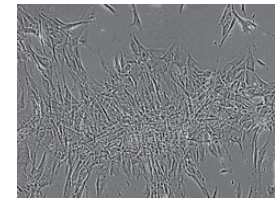


負荷方向



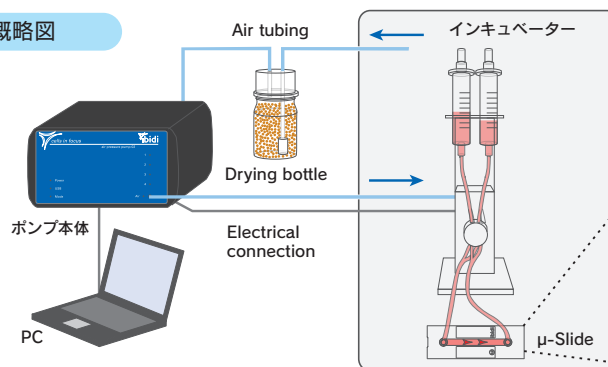
シヤーストレス
5dye/cm²

HPA-SMC

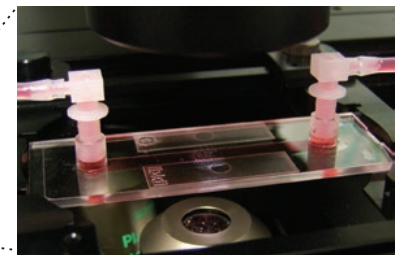


シヤーストレス
20dye/cm²

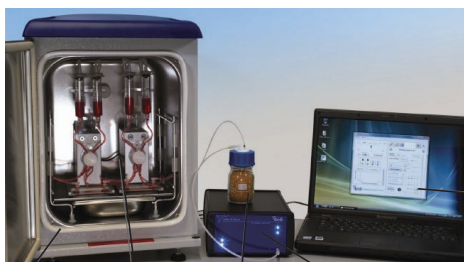
ibidiポンプシステムの概略図



拡大イメージの一例 顕微鏡上で直接観察も可能

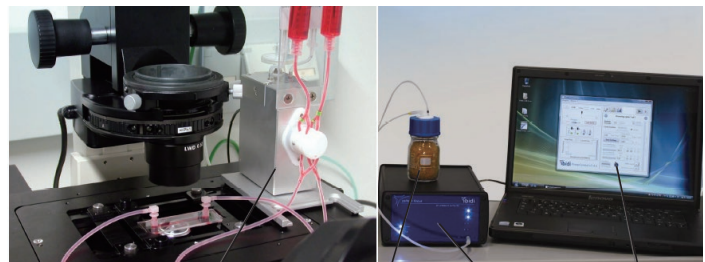


ibidi ポンプシステムの使用例



インキュベーター ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体

例1：インキュベーター内で灌流培養した後で顕微鏡観察



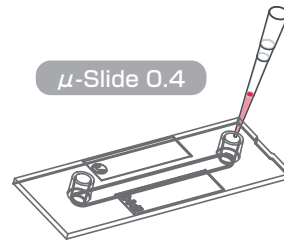
ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体 PC

例2：灌流培養しながら顕微鏡観察

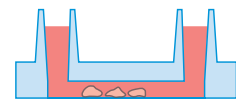
アッセイプロトコル

1) 2枚のibidi社チャンネルスライドチャンバーμ-Slide I Luer 0.4を1mg/mlのファイブロネクチンでコート(室温30分) PBSで洗浄後、HUVECをそれぞれ最終密度 1×10^5 cells/cm²になるよう播種

2) CO₂インキュベーター内でオーバーナイトで静置して細胞を接着

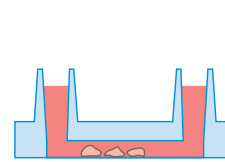


μ-Slide I Luer0.6, ibiTreatを横から見た図

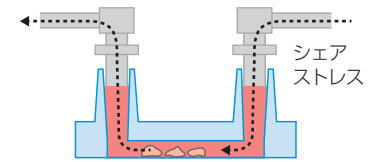


培養 ↑ 底面フィルム ibiTreat 180μm

3) 培地の交換後、チャンネルスライド1枚はそのまま静置培養を継続し、もう一方はibidiポンプシステムを用いてシェアストレス条件下で灌流培養

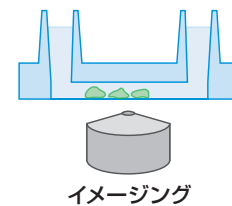


静置培養



灌流培養

4) 「静置培養」および「灌流培養」それぞれ細胞形態を比較



イメージング

結果

24時間後の結果

細胞種	培養条件	静置培養	灌流培養
HUVEC	静置培養		負荷方向 シェアストレス：5dye/cm ²
	灌流培養		
HPA-SMC	静置培養		負荷方向 シェアストレス：20dye/cm ²
	灌流培養		

- ibidiポンプシステムを用いてシェアストレス条件下で培養した50%confluencyのHUVECは、静置培養したHUVECと比較し、5dynの弱い負荷においても灌流方向に沿って細胞が並びました。
- 50%confluencyのHPA-SMCは、20dynの負荷においてもibidiスライドから剥がれることなく、シェアストレスに反応して細胞が生育しました。



お客様のコメント

操作が簡便で、また精密に制御が可能な灌流システムとして大変魅力を感じました。生体を模写する実験システムの構築が望まれる中で、このポンプシステムだけでなく、ibidi社の様々な培養デバイスにも興味を持っています。特に本実験には、内皮細胞と平滑筋細胞を隔離培養できるibidiPore Flow (85035-Sなど) が望ましいと思っています。この度は実験系のセットアップから助言いただき、誠に感謝しております。