

細胞の動きや状態変化を 広視野で効率的に共焦点イメージング

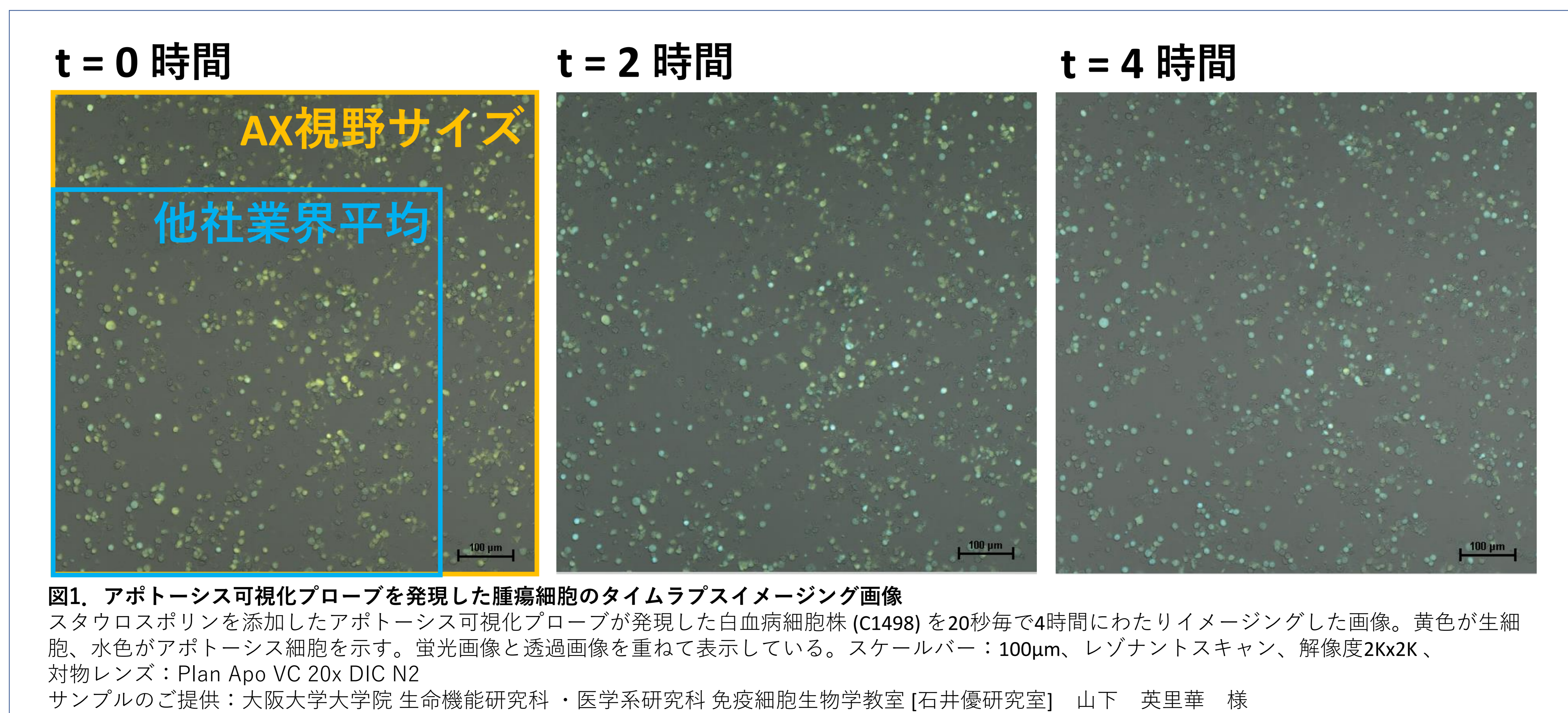
大阪大学大学院医学系研究科の石井優教授（免疫細胞生物学）らの研究グループは、顕微鏡イメージングの手法を用いて細胞を動的に可視化することで、生体内で腫瘍細胞がどのように動いているのかを研究しています。本アプリケーションノートでは、ニコンの共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを使用し、本顕微鏡の特徴である広視野を活かして、腫瘍細胞の動きや状態変化の様子を的確に捉えた画像取得の例を紹介します。

背景

細胞の「動き」は免疫や発生などの根幹的な生命現象を支えており、細胞機能を決定する上で重要な性質といえます。一方で、腫瘍細胞においては動くことは浸潤や転移を可能とし、最終的にはがんの再発など生命を脅かす危機を招きます。これまでに腫瘍細胞の運動に関わる分子についてはさまざまな研究が行われていますが、生体内での腫瘍細胞の実際の動きについては未だ不明な点も多く残されています。石井教授らの研究グループは腫瘍細胞の動きに着目した生体イメージング研究を精力的に行っており、これまでに大腸癌細胞の運動や転移が細胞周期に依存すること、また白血病細胞の運動と化学療法に対する抵抗性が深く関与することを明らかにしてきました。これらの知見は腫瘍細胞の動きをターゲットとする次世代のがん治療開発につながることで期待されています。本アプリケーションノートではニコンの共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを用いて、腫瘍細胞の動きと生命現象を時空間的に可視化した事例を紹介します。

AX Rの広視野画像取得

共焦点顕微鏡AX Rは撮像視野数がΦ25の広い視野のイメージングが可能です。図1に示したように他社の平均的な視野サイズに比べて約1.25倍広くなっており、細胞のN数を増やすメリットがあります。免疫細胞や今回の用いた腫瘍細胞（白血病細胞）のように広範囲を動き回る細胞であっても、細胞の状態変化を効率的に撮像することができます。本実験では白血病細胞にアポトーシスを誘導した様子を観察しています。具体的には、アポトーシス可視化プローブを発現した白血病細胞を35mmディッシュに播種し、アポトーシス誘導試薬（スタウロスポリン）を添加してタイムラプスイメージングを行っています。白血病細胞はアポトーシスを起こすことで蛍光色がYFPからCFPへ変化します。図1に示すように、試薬の添加後、時間が経つにつれてYFPを発現した細胞が減少し、反対にCFPを発現した細胞が増加していきます。多くの細胞が1視野で観察されており、本顕微鏡の広視野という特徴によって効率的にタイムラプスイメージングできることを示す一例です。



また、図1で観察されたYFPからCFPへ色調変化を分かりやすく示すために、撮像した画像を輝度（YFP/CFP）をレインボーカラーで表示しました。t=0 時間の結果を図2 (a) に示します。さらに、図2に示した輝度比の画像に対して、イメージングソフトウェア NIS - Elementsの画像解析機能“GA3”を使って、CFP優位の細胞数を計測しました。図2(b)で示すように時間経過とともにCFP優位の細胞数が増加していることが分かります。このように本製品では画像取得のみならず、その後の定量的な解析においても一貫してNIS - Elementsを使うことで、簡便かつ迅速に解析結果を確認することができます。

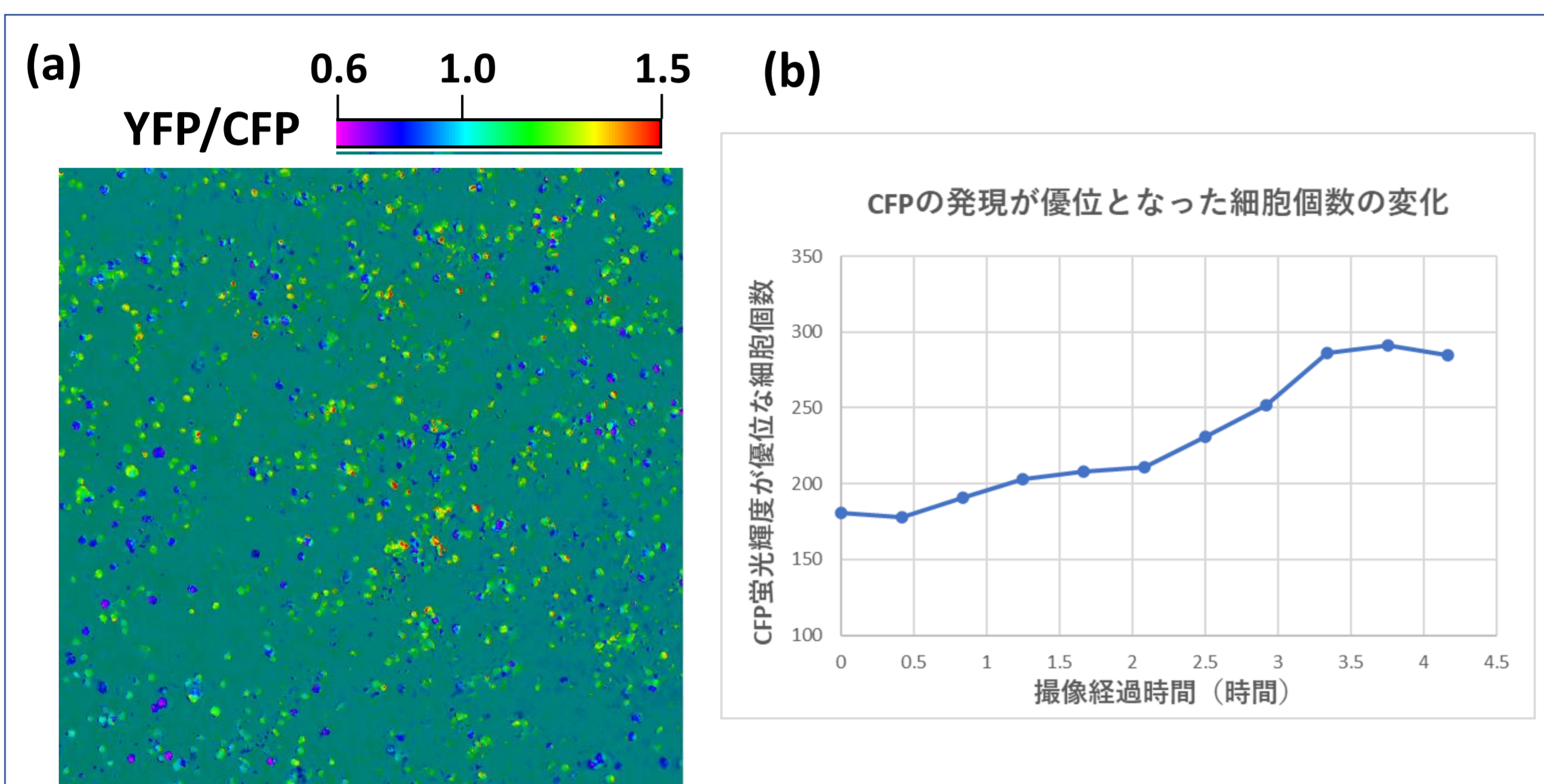


図2. CFP優位となっている細胞数をカウントした時系列的な変化
 (a)図1のt=0h時点の画像を蛍光タンパクの輝度比（YFP/CFP）をレインボーカラーにて表示した像。
 (b)図2で示した輝度比画像に対して、蛍光輝度比(YFP/CFP)が閾値0.9以下の細胞数をカウントし、その変化を時系列で示したグラフ。

画質改善をDenoise.ai 機能でサポート

細胞にダメージを与えることなく、長時間にわたり共焦点顕微鏡で観察するには、できる限り照射する励起光が弱い必要があります。しかしながら、弱い励起光では検出される蛍光強度が弱くなり、S/N比の悪い画像となってしまいます。Denoise.ai 機能を活用すれば、取得した画像から不要なノイズを除去して、高いS/N比の画像として観察することができます。Denoise.ai機能を使用して、腫瘍細胞の動きをとらえたS/N比の高いイメージング画像を図3に示します。18時間という長時間のタイムラプス撮影においても、ノイズの少ないイメージング画像が得られており、詳細な細胞形態の変化や色調変化を追うことが可能です。

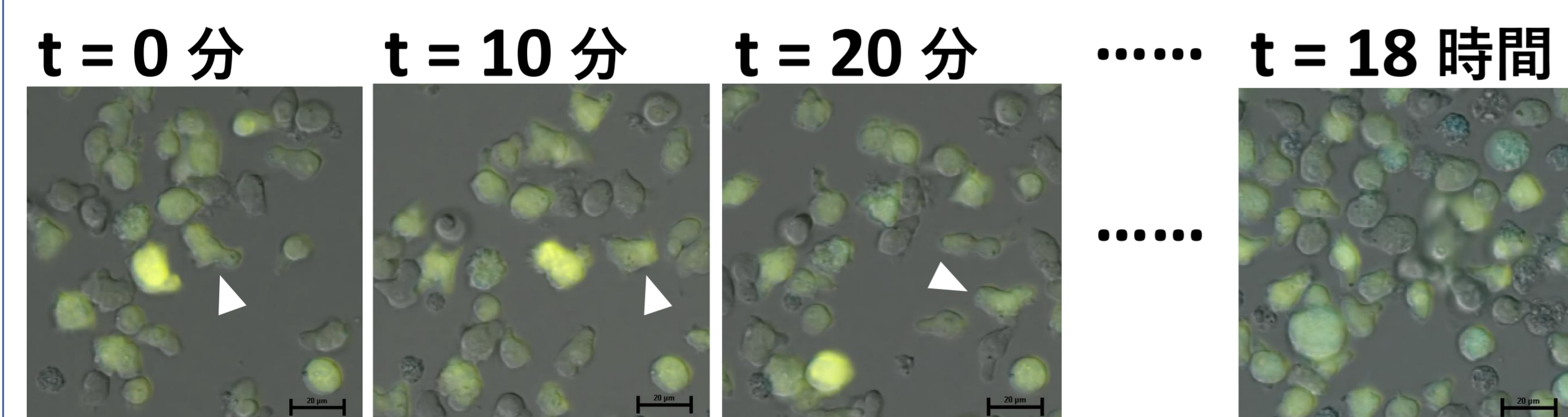


図3. 腫瘍細胞のタイムラプスイメージング画像
 白血病細胞のタイムラプス画像。蛍光画像と透過画像を重ねて表示している。スケールバー：20μm、レゾナントスキャンでイメージング、解像度2Kx2K、対物レンズ：Plan Apo VC 20x DIC N2

サンプルのご提供：大阪大学大学院 生命機能研究科 ・医学系研究科 免疫細胞生物学教室 [石井優研究室] 山下 英里華 様

まとめ

共焦点顕微鏡AX Rでは広視野という特徴によって、一つの視野で観察できる細胞数が増加するため、実験効率が上昇します。また、取得後の解析についてもイメージングソフトウェアNIS-Elementsでサポートでき、定量的解析にも素早く対応可能です。さらに、Denoise.ai機能を組み合わせることで、細胞へのダメージを抑えた長時間タイムラプスイメージングを高いS/N比で行うことが可能となります。

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX R

生細胞への光毒性が低く、褪色の少ない、高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート。

- ・高速：
最速毎秒720フレーム（レゾナントスキャン 2048x16Pix）
- ・高解像度：
最高8K（ガルバノスキャン）
最高2K（レゾナントスキャン）
- ・高スループット：視野数25mmの超広視野



NEW