

ラベルフリーライブセルイメージングを活用した、低光毒性の長期ライブセルアポトーシスアッセイ

アポトーシスの異常は、癌や神経変性疾患、自己免疫疾患など多くの疾患に関与しており、創薬スクリーニングではアポトーシスを指標にした薬効試験が広く利用されています。薬効薬理試験では薬剤の濃度や処理時間など多岐にわたる条件検討が必要ですが、タイムラプス撮影は複数のタイムポイントのデータを1枚のウェルプレートで得られるため、実験効率を向上できます。また、ライブセルアッセイは同一の細胞集団を経時的に解析できるため、ばらつきの少ない結果が得られます。

アポトーシス解析は、全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合で定量評価できます。短期ライブセルアッセイでは、全細胞数の計測にHoechstなどの核染色試薬を利用しますが、長期アッセイでは、色素の毒性や蛍光励起の光毒性により細胞増殖が抑制され、薬効の定量解析における再現性低下の原因になります。

本アプリケーションノートでは、低光毒性の長期ライブセルアポトーシスアッセイの例を紹介します。焦点面の異なる複数の明視野画像から、細胞構造を反映した位相分布画像 (Volume Contrast 画像) を生成し、このVC画像を用いて視野内の全細胞数を経時的に計測することにより低光毒性を実現し、長期アポトーシスアッセイを実施できました。

長期ライブセルアッセイにおけるウェル間の比較・ノーマライズの課題

長期ライブセルアッセイでは、透過光で取得した明視野画像を用いて視野内の細胞占有面積を計測し、それを指標にウェル間をノーマライズして行う薬効比較が利用されます。しかし、細胞ごとの面積は細胞密度によって異なり、一般的に細胞の密集している領域では細胞あたりの面積が小さくなります (図1)。

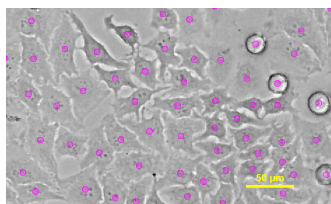


図1. 面積の異なる細胞
VC画像から生成した細胞数カウントマスク (ピンク) を、明視野画像に重ね合わせ表示。

対物レンズ: 10倍
Scale bar: 50 μm

細胞は伸展と収縮を繰り返して細胞分裂するため、細胞周期のフェーズによって細胞面積は変動します (図2)。また、細胞面積は薬剤の種類によって大きく異なるため、面積よりも視野内の細胞数を指標としてウェル間を比較することが重要です。

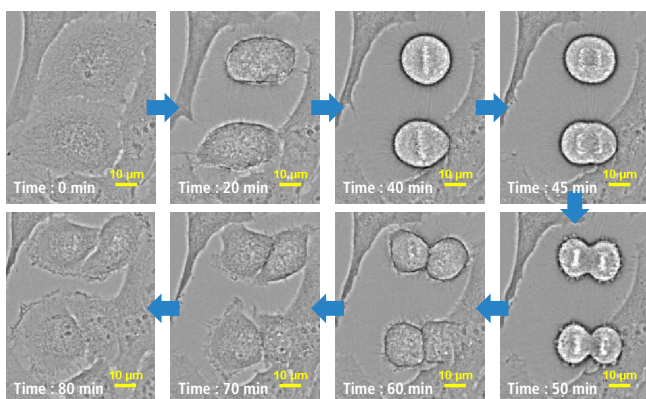


図2. 細胞分裂中の明視野タイムラプス画像
細胞周期のフェーズにより面積が異なる。

対物レンズ: 20倍
Scale bar: 10 μm

アポトーシス細胞の形態的特徴と検出方法

アポトーシス (プログラム細胞死) により、細胞は収縮や細胞膜のブレbbing、クロマチン凝集、核やDNAの断片化、アポトーシス小体の形成などの形態を示します。これらの形態的特徴の観察によりアポトーシスを定性的に判断できます。また、蛍光プローブを用いることで定量的な分析が可能です (図3)。

アポトーシスの誘導により、細胞質でタンパク質分解酵素のカパーゼが活性化すると、アポトーシス検出マーカー Caspase-3/7のDNA結合色素が核に移行し、核が緑色の蛍光を発します (図3 (c))。アポトーシス後期に、アポトーシス小体が形成されて細胞膜が損傷すると、Caspase-3/7の蛍光が徐々に消失し、死細胞になります。また、損傷した細胞膜から Ethidium homodimer-1 (EthD-1)が細胞内に流入し、核内のDNAと結合して赤色の蛍光を発します (図3 (d))。蛍光強度や面積は同一の細胞でもタイミングによって異なるため、細胞数を指標に定量解析することが求められます。

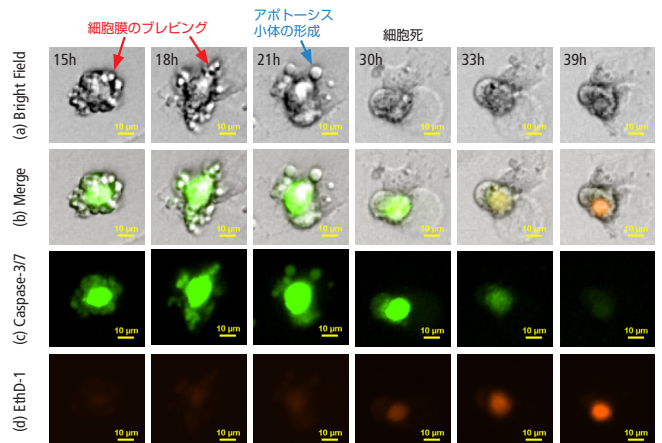


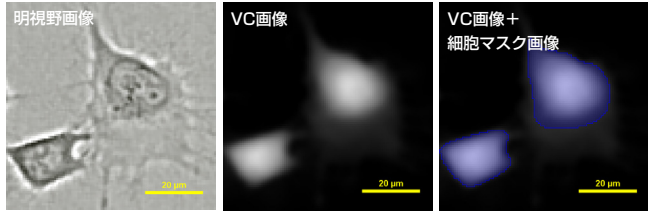
図3. アポトーシス細胞のタイムラプス画像

対物レンズ: 10倍
Scale bar: 10 μm

VC画像の二値化により細胞マスクを生成

VC画像では、細胞の厚みのある領域の画素値が大きく出力されますが、葉状仮足領域は扁平な形態のためVC画像内の輝度値が低く、核周辺領域は細胞の厚みがあるため輝度値が高くなります(図4)。

この細胞の厚みの特徴量を活用し、VC画像内の輝度値の高い領域を核周辺の細胞領域と定義し、二値化して核領域を含む細胞マスクを生成できます(図4)。



対物レンズ：10倍
Scale bar: 20 μm



図4. 細胞の厚みのある領域の二値化

クロマチンの凝集や核の断片化を呈するアポトーシス細胞も、細胞数の定量解析が可能

一般的な細胞数計測では、細胞あたり核が1つあると定義し、蛍光プローブで可視化した核の数により細胞数を推定する方法が広く利用されています。しかし、アポトーシスにより核が断片化すると細胞内に複数の核断片が生じるため、Caspase-3/7やEthD-1のObject (核断片) の数からはアポトーシス細胞や死細胞の数を正確に計測できません(図5 (a-c))。

一方、VC画像は細胞の厚みのある領域を細胞領域として捉えるため、核が断片化しても、細胞マスクを生成して細胞数を計測できます(図5 (d, e))。

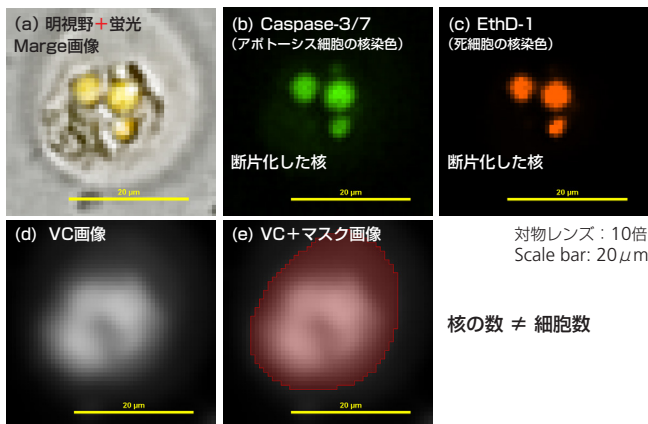


図5. 断片化した核を持つアポトーシス細胞

アポトーシスアッセイの細胞分類マスク

VC画像から生成した細胞マスクが、Caspase-3/7またはEthD-1の蛍光とオーバーラップしている細胞を、アポトーシス細胞と死細胞に分類できます。アポトーシス小体の形成後、細胞膜の完全性が失われる段階では、Caspase-3/7とEthD-1のダブルポジティブ細胞が存在します(図3、図5)。

Caspase-3/7(緑)とEthD-1(赤)の両方が検出される細胞は、Caspase-3/7の活性は残っているが細胞膜は損傷している死細胞と定義しました(表1)。

細胞分類	VC画像	Caspase-3/7 (Green)	EthD-1 (Red)	細胞分類マスクの色
非アポトーシス生細胞	+	-	-	青
アポトーシス細胞	+	+	-	緑
死細胞	+	+/-	+	赤

表1. 細胞分類マスクの定義およびその色

マスクにより細胞を分類することで、細胞数のダブルカウントを防ぎ、正確な定量解析が可能です(図6、図7)。

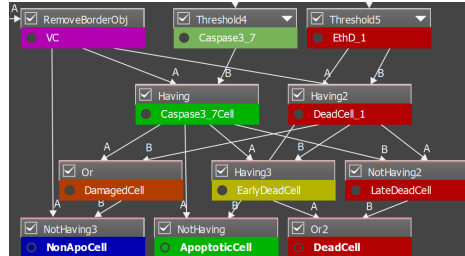


図6. NIS-Elementsの画像解析モジュールGeneral Analysis 3で細胞分類マスクを生成した解析ブロック

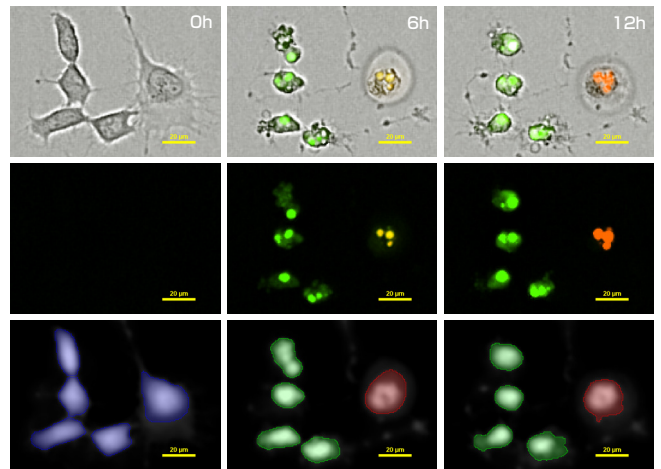


図7. スタウロスポリン添加後のタイムラプス画像

左からスタウロスポリン添加後 0h、6h、12h
上段：明視野+蛍光のマーシ画像、中段：Caspase-3/7蛍光+ EthD-1
蛍光のマーシ画像、下段：VC画像+細胞分類マスク画像
青色マスク：非アポトーシス生細胞、緑色マスク：アポトーシス細胞、
赤色マスク：死細胞

対物レンズ：10倍
Scale bar: 20 μm

広視野撮影によるアポトーシスアッセイの利点

アポトーシスの誘導後、カスパーゼが活性化するタイミングは細胞ごとに異なります。ウェル内の撮影領域によってアポトーシス細胞や死細胞の数にばらつきが大きいため、広視野で多くの細胞を捉えて解析することにより、再現性のある研究結果が得られます。

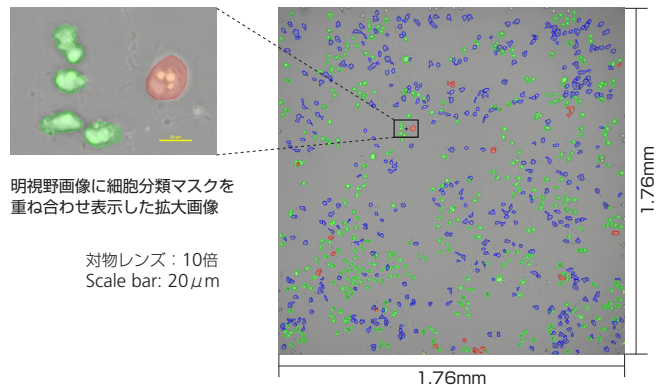
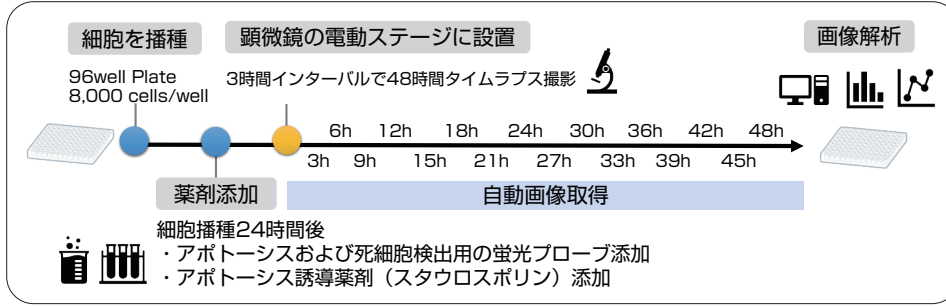


図8. 25mm FOVの広視野カメラDS-Qi2による撮像範囲

1.76 mm x 1.76 mmの範囲を1ショットで撮影した明視野画像に、細胞分類マスク画像を重ね合わせ表示。

アポトーシスアッセイの実験ワークフロー



NIS-Elements HCのHCAウィザード Sample Labelingの入力画面

細胞・試薬・材料

- ・ヒト子宮頸癌由来細胞株HeLa (Riken Cell Bank, RCB0007)
- ・Minimum Essential Medium Eagle With Earle's salts (Sigma-Aldrich, M4655)
- ・FluoroBrite™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, A1896701)
- ・Fetal Bovine Serum, qualified, USDA-approved regions (Thermo Fisher Scientific, 10437028)
- ・L-Glutamine (200mM) (Thermo Fisher Scientific, 25030081)
- ・Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, 15140122)
- ・Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermo Fisher Scientific, 25200072)
- ・DPBS, no calcium, no magnesium (Thermo Fisher Scientific, 14190144)
- ・EZVIEW® CulturePlateLB (AGCTECHNO GLASS, 5866-096)
- ・Staurosporine solution (Millipore Sigma, S6942)
- ・CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific, C10423)
- ・Ethidium homodimer-1 (Component B) of LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, L3224)

観察装置・ソフトウェア

- ・顕微鏡：Ti2-E (Nikon)
- ・対物レンズ：CFI Plan Apo Lambda S 10X NA 0.45
- ・カメラ：DS-Qi2
- ・蛍光LED照明システム：D-LED1
- ・画像解析ソフトウェア：NIS-Elements (Nikon)
- ・ステージトップインキュベーター：STX series (TOKAI HIT)

結果

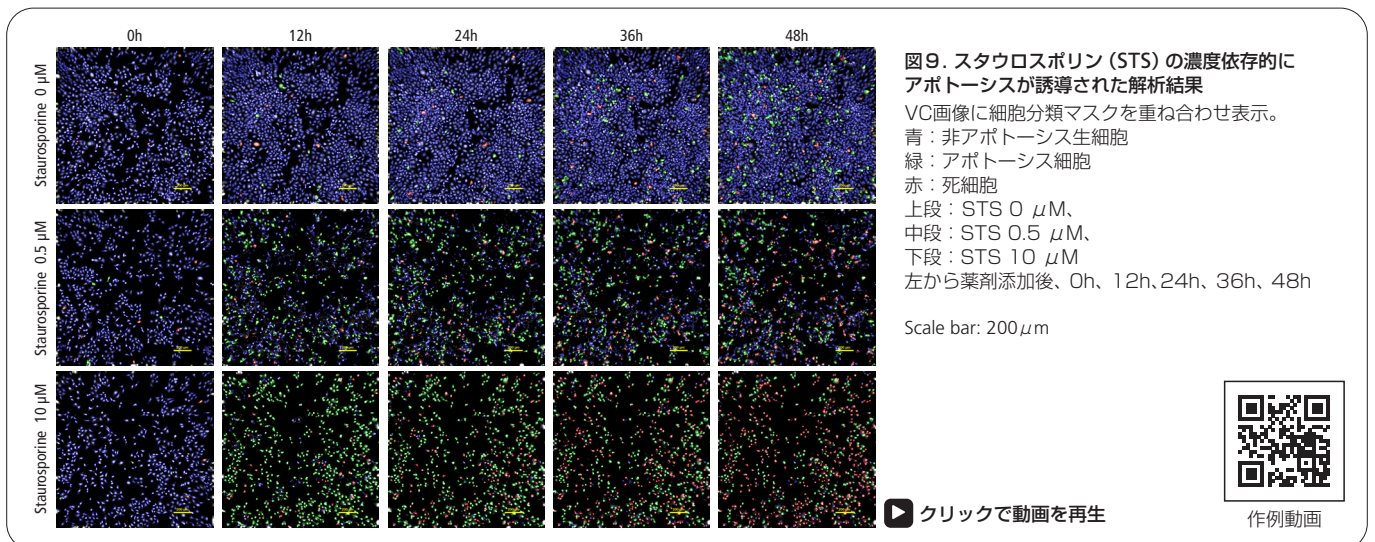


図9. スタウロスポリン (STS) の濃度依存的にアポトーシスが誘導された解析結果

VC画像に細胞分類マスクを重ね合わせ表示。

青：非アポトーシス生細胞

緑：アポトーシス細胞

赤：死細胞

上段：STS 0 μM、

中段：STS 0.5 μM、

下段：STS 10 μM

左から薬剤添加後、0h、12h、24h、36h、48h

Scale bar: 200 μm

クリックで動画を再生

作例動画

方法

HeLa細胞を8,000 cells/wellの細胞密度で96ウェルプレートに18ウェルに播種後、培地に10%のFBSを加え、約24時間培養しました。播種約24時間後に培地交換を行い、Caspase-3/7 (7.5 μM)、Ethidium homodimer-1 (4 μM)、スタウロスポリンを各ウェルに添加しました。スタウロスポリンは、0 μM、0.1 μM、0.5 μM、2.5 μM、7.5 μM、10 μMの濃度で各3ウェルに添加しました。

ステージトップインキュベーターにより37℃、5%CO₂環境を維持し、薬剤添加から3時間毎に2日間、10倍の対物レンズと25mm FOV対応の広視野カメラを用いて、ウェル中心部の1視野 (約1.76 mm x 1.76 mm) のZスタック画像を、明視野および蛍光2波長 (緑・赤) で各3枚取得しました。

	明視野	Caspase-3/7 (蛍光：緑)	EthD-1 (蛍光：赤)
光源	透過LEDランプ	D-LED1 (パワー10%)	D-LED1 (パワー10%)
Ex/Em (nm)	—	502/530 nm	528/617 nm
Exposure time	35 ms	200 ms	200 ms

得られた明視野画像をNIS-Elementsの画像解析モジュールGeneral Analysis 3を用いてVC画像に変換し、二値化して細胞マスクを生成しました。蛍光像とオーバーラップしている細胞をマスクで分類し、アポトーシスアッセイ解析レシピを作成しました。

NIS-ElementsのBatchGA3を用いて全画像にアポトーシスアッセイ解析レシピを実行し、計測数値をCSV形式で出力しました。その後、データ可視化ツールMicrosoft Power BI® にインポートしてグラフを作成し、計測結果を分析しました。

スタウロスポリンの用量反応曲線を、オンラインツール“Quest Graph™ EC50 Calculator.” AAT Bioquest, Inc, 31 Jul. 2021, <https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator> で作成し、EC₅₀値を求めました。

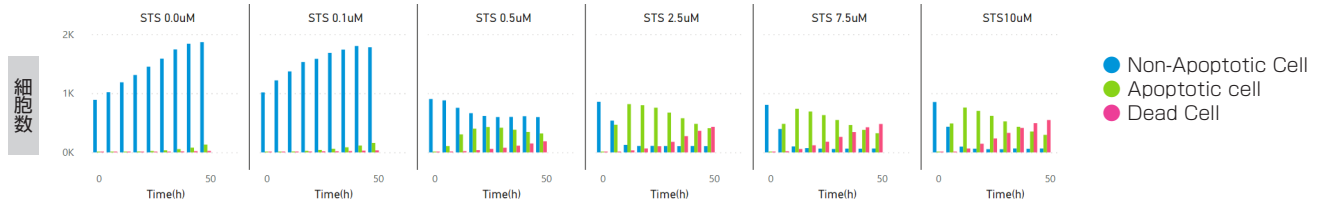


図10. スタウロスポリン (STS) 添加後、6時間毎の細胞数の推移 (0hから48h)

STS濃度: 左から0 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM, 7.5 μM, 10 μM
 X軸: 時間、Y軸: 細胞数 青: 非アポトーシス生細胞、緑: アポトーシス細胞、赤: 死細胞

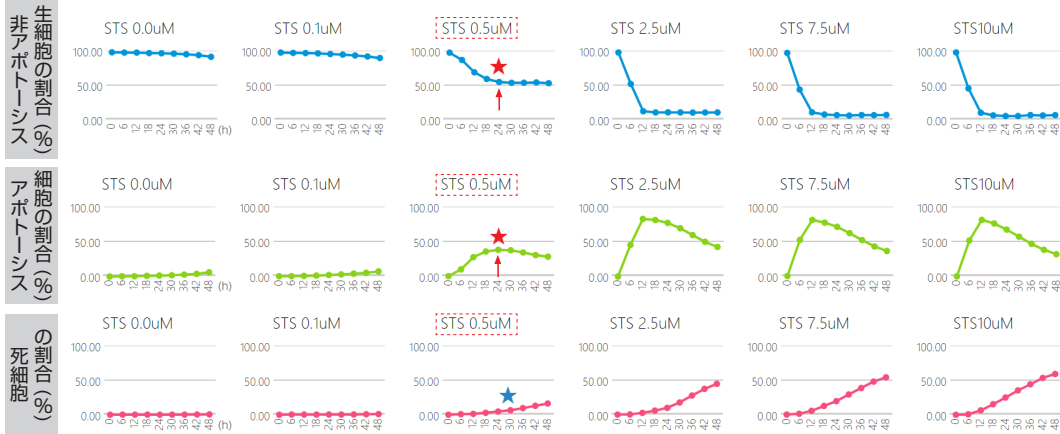


図11. スタウロスポリン (STS) 添加後、6時間毎の非アポトーシス生細胞、アポトーシス細胞、死細胞の割合の推移 (0hから48h)

STS濃度: 左から0 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM, 7.5 μM, 10 μM
 X軸: 時間、Y軸: 細胞数の割合 上段: 非アポトーシス生細胞、中段: アポトーシス細胞、下段: 死細胞

★スタウロスポリン0.5 μMの条件では、薬剤処理24時間のタイムポイントで非アポトーシス生細胞の割合(青)とアポトーシス細胞の割合(緑)がプラトーに達しました。

★スタウロスポリン0.5 μMの条件では、薬剤処理30時間以降に死細胞の割合(赤)が徐々に増加しました。

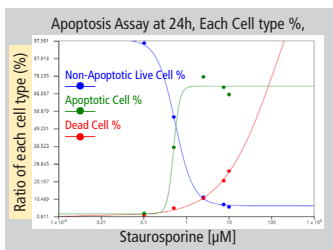


図12. 薬剤処理24時間におけるスタウロスポリンの用量反応曲線

青: 非アポトーシス生細胞の割合
 緑: アポトーシス細胞の割合
 赤: 死細胞の割合

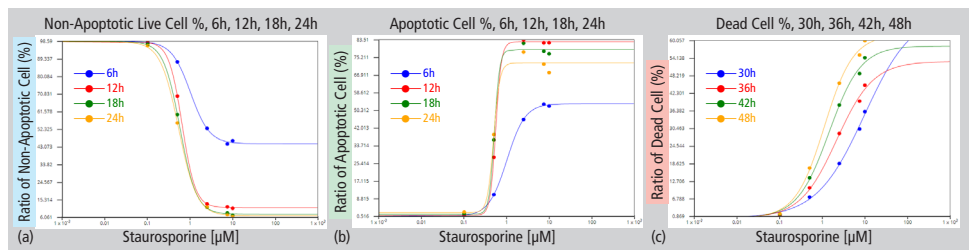


図13. 薬剤処理時間ごとのスタウロスポリンの用量反応曲線とEC₅₀値

(a) 非アポトーシス生細胞の割合: 薬剤処理24時間のEC₅₀は0.537 μM
 (b) アポトーシス細胞の割合: 薬剤処理24時間のEC₅₀は0.493 μM
 (c) 死細胞の割合: 薬剤処理48時間のEC₅₀は1.116 μM
 薬剤反応時間: (a, b) 6h, 12h, 18h, 24h, (c) 30h, 36h, 42h, 48h

VC画像を二値化し、核周辺領域を含む細胞マスクを生成することで、核が断片化していても1つの細胞として認識し、細胞数を計測できました(図5、図7)。スタウロスポリンの用量依存的な、非アポトーシス生細胞数の減少が確認できました(図9)。

コントロールウェル (STS 0.0 μM) では、撮影開始後48時間で細胞数が約2倍に増加した一方、0.5 μM以上の濃度のスタウロスポリンを添加したウェルでは細胞は増殖せず、アポトーシスが誘導されました(図10)。

スタウロスポリン 0.5 μMの条件では、薬剤処理後約24時間でアポトーシス細胞の割合が最大となり、30時間以降に死細胞の割合が徐々に増加しました。2.5 μM以上の条件では、薬剤処理後48時間で死細胞の割合が50%に達しました(図11)。

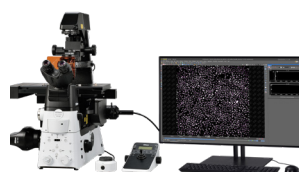
オンラインツール“Quest Graph™ EC50 Calculator.” AAT Bioquest, Inc. を用いて用量反応曲線を作成し、EC₅₀値を求めました。スタウロスポリンの用量および時間依存的にアポトーシスが誘導されることを定量評価できました(図12、図13)。薬剤処理後24時間におけるEC₅₀値は、非アポトーシス生細胞(%)は0.537 μMで、アポトーシス細胞(%)は0.493 μMでした(図12、図13(a,b))。一方、死細胞(%)は薬剤処理後24時間ではプラトーに達していませんでした(図12)。死細胞の割合は薬剤処理後36時間以降においてシグモイド型の用量反応曲線を示しました。(図13(c))

まとめ

- ラベルフリーのVC画像から細胞マスクを生成し、アポトーシス/死細胞検出用の蛍光プローブ画像と併用することで、生細胞への光毒性を低減した長期ライブセルアポトーシスアッセイを実施できました。
- 複数の薬剤処理時間における薬効を、1枚のウェルプレートを用いて1回の実験で評価でき、効率化が図れました。
- タイムラプス撮影とVC画像を活用した長期ライブセルアポトーシスアッセイは、新薬の開発に有効なツールです。
- アポトーシスの起こるタイミングは個々の細胞で異なりますが、25mm FOVのDS-Qi2カメラにより広視野をワンショットで取得し、セルカウントを行うことによって、撮影視野による細胞数の偏りを抑えて再現性の高い結果を得ることができます。

製品情報

ハイコンテンツアナリシス (HCA) 顕微鏡システム



Ti2-E顕微鏡とカメラに、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのハイコンテンツアナリシス(HC)オプションを搭載。画像取得から解析まで、1つのソフトウェアで高速かつ容易に実行できます。