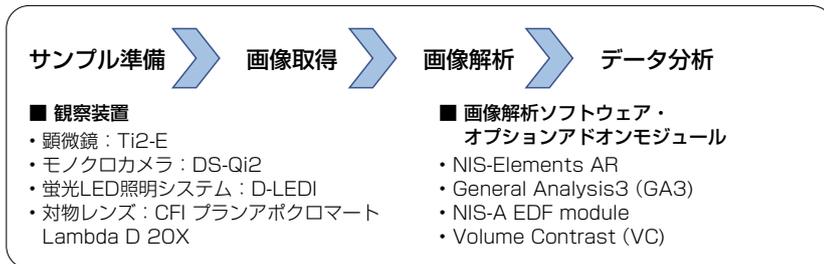


ケラチノサイトの細胞周期解析と、Volume Contrastを用いた有糸分裂細胞のラベルフリー細胞数計測

ケラチノサイトは、化粧品開発、創薬、再生医療などさまざまな研究で用いられる表皮細胞です。ケラチノサイトでは、オートファジー誘導がメラノソーム分解を調節することが知られており、化粧品開発において美白成分の研究に使用されています。自己免疫疾患である乾癬は、ケラチノサイトの異常な細胞増殖によって引き起こされる皮膚病として知られています。細胞周期と細胞増殖の解析は、異常な細胞増殖を抑制する新薬の開発に用いられています。細胞周期は、核内のDNAをHoechst33342またはPIで蛍光染色し、その蛍光強度を計測することによって、DNAの量から推定できます。本アプリケーションノートでは、画像統合ソフトウェアNIS-ElementsのGeneral Analysis 3モジュールのBinning機能を使用して、核の総輝度値から細胞周期を解析した例を紹介しします。また、間期と有糸分裂の細胞は厚みが異なるため、Volume Contrastモジュールを使用して厚みの異なる細胞を分類することにより、間期および有糸分裂の細胞数をラベルフリーで計測した例も紹介しします。

イメージングフロー



実験内容

- ①ケラチノサイトを固定し、核をHoechst33342で染色し、Tubulinを免疫染色
- ②蛍光顕微鏡で画像を取得 (図1、図2、図4)
- ③GA3を用いてHoechst33342の蛍光強度を計測し、核のDNA含量を定量化
- ④Microsoft Excel®でヒストグラムを作成し、核の総蛍光輝度値から個々の核の細胞周期を、G0/G1期、S期、G2/M期の3つの輝度しきい値に分類 (図3-A)
- ⑤分類したHoechst Sum Intensityのしきい値をGA3のBinning Functionに入力し、G0/G1期、S期、G2/M期の細胞数の割合を分析 (図3-B、図3-C)
- ⑥GA3のColorByValue Functionを用いて、細胞周期ごとにマスクを色分け表示 (図4)

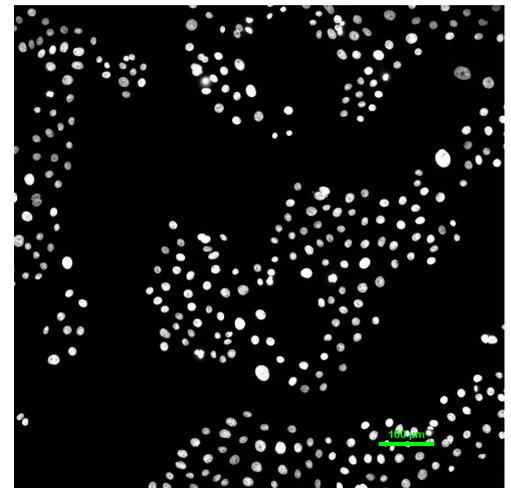
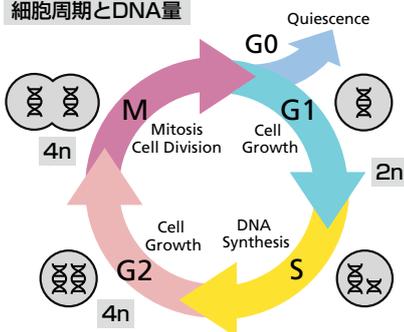


図1. 核染色 (Hoechst33342) 画像
DNA量が異なるため、個々の核の核の蛍光輝度強度が異なる。
対物レンズ：20倍、Scale bar: 100 μm

細胞周期とDNA量



S 期に DNA 合成が開始されて DNA 量が増加するため、Hoechst 33342 の輝度値が上昇する。G2 期では、DNA 量が G0/G1 期の約 2 倍になる (左図)。細胞の成長に伴い、核の面積も徐々に増加する (図 2 左)。この輝度値 (DNA 量) と面積の違いにより、核の総輝度値から細胞周期を推定できる。

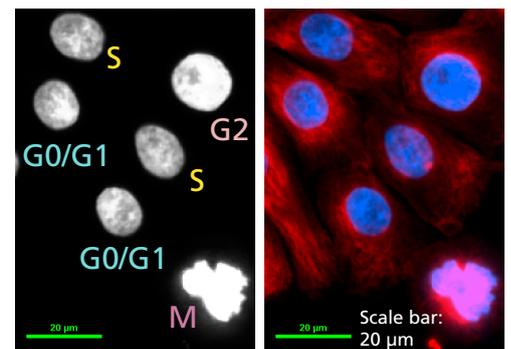


図2. 核とTubulinの蛍光画像
左：Hoechst33342 (核) の蛍光画像
右：Hoechst33342とTubulinの蛍光マージ画像

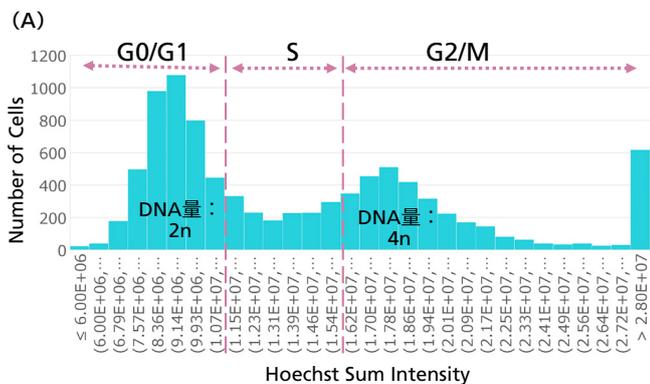


図3. 核染色によるDNA含量の定量化と細胞周期解析

- (A) 核 (Hoechst33342) の総輝度値のヒストグラム。G0/G1期の総輝度値は約9e6であるのに対し、G2/M期の総輝度値は約1.8e7で、G0/G1期の約2倍である。
 (B) Binning Functionに総輝度しきい値を入力し、細胞周期を分類
 (C) 細胞周期ごとの細胞数の割合 (合計6,157個の細胞を計測)

(B)

From (ind.)	To (excl.)	Cell Cycle
0	1.15E+07	G0/G1
1.15E+07	1.62E+07	S
1.62E+07	1E+08	G2/M

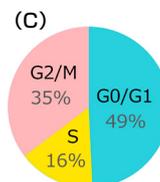


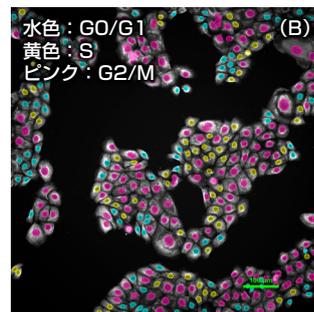
図4. 細胞周期分類マスクの作成方法

- (A) ColorByValue Functionを用いてマスクの色を指定
 (B) 核の細胞周期解析マスクをTubulin蛍光画像に重ね合わせ表示

(A)

Value	Color
0	水色
1	黄色
2	ピンク

水色 : G0/G1、黄色 : S
 ピンク : G2/M



対物レンズ : 20倍、Scale bar: 100 μm

Volume Contrastを使用し、細胞の厚みから間期および有糸分裂の細胞数をラベルフリーで計測

Volume Contrast (VC) は、複数のZ深度で撮影した明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築可能な、NIS-Elementsソフトウェアのアドオンモジュールです。間期および有糸分裂の細胞では細胞の厚みが異なるため、Volume Contrast画像の輝度値の違いを活用して、厚みの異なる細胞を間期と有糸分裂の細胞に分類し、それぞれの細胞数を計測できます。

実験内容

- ①焦点面の異なる3枚の明視野画像を取得 (図5 左)
- ②Volume Contrast機能により、明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築 (図5 右)
- ③VC画像の輝度値を元に、厚みの異なる細胞を間期と有糸分裂の細胞に分類し、細胞カウントマスクを作成 (図5 右下)
- ④間期と有糸分裂の細胞数を計測し、有糸分裂細胞の割合を算出 (図6)

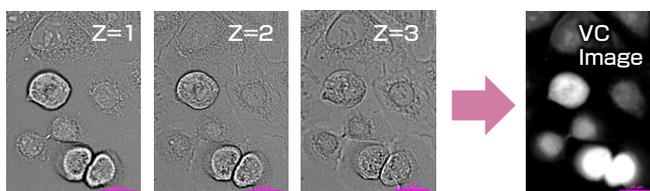


図5. 明視野画像からVC画像を構築

左 : 3枚の明視野Zスタック画像 (Z範囲 : 3.25 μm)
 右 : VC画像、右下 : VC画像に細胞カウントマスク画像を重ね合わせ表示



Scale bar: 20 μm

まとめ

- ・核 (Hoechst33342) の総輝度値から細胞周期の解析が可能である。
- ・General Analysis 3のBinning Functionは、計測結果を任意の数値で分類して集計できる。
- ・ColorByValue Functionは、指定した計測数値に基づきマスクを色分け表示することが可能。
- ・厚みの異なる細胞を、Volume Contrast画像の輝度値により分類できる。
- ・明視野画像からVolume Contrast画像を構築し、間期と有糸分裂の細胞数をラベルフリーで計測可能である。

謝辞

ケラチノサイトの提供にご協力を頂いた倉敷紡績株式会社 環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部の皆様に心から感謝します。

製品情報

画像統合ソフトウェアNIS-Elements

オプション画像解析モジュールGeneral Analysis 3

解析ブロックを組み合わせるだけで、簡単に細胞領域の二値化や計測が行え、目的に応じて柔軟に画像解析が実施できます。

顕微鏡アドオンモジュールVolume Contrast

手軽にラベルフリーでの定量解析が行えます。

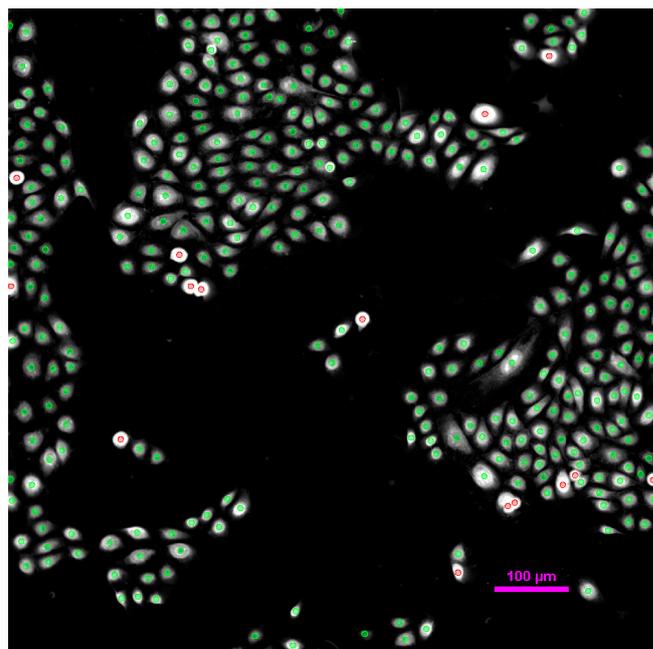


図6. VC画像に細胞カウントマスク画像を重ね合わせ表示

赤色マスク : 有糸分裂の細胞、緑色マスク : 間期の細胞
 有糸分裂の細胞数 : 15個、間期の細胞数 : 321個
 有糸分裂の細胞の割合 : 4.5%
 対物レンズ : 20倍、Scale bar: 100 μm