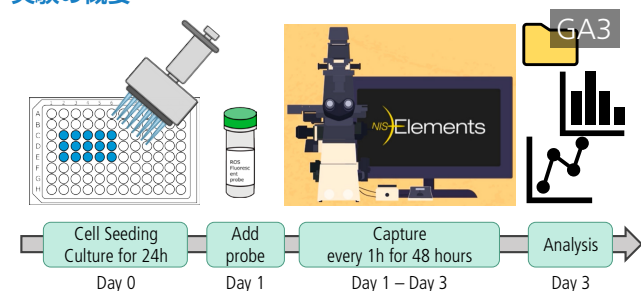


活性化マクロファージにおけるROS生産の ライブセルハイコンテンツイメージング

免疫細胞は、炎症反応により異物を排除して体を正常に保つ役割を果たしています。一方で、過剰な炎症は、自己免疫疾患、アレルギー、糖尿病、アルツハイマー病などの発症原因になります。異物によって刺激された単球は、ミトコンドリアでROS (Reactive oxygen species) を生産し、活性化マクロファージに分化して異物を分解します。ROSはシグナル伝達分子として重要な機能を持っていますが、細胞内のDNAを損傷する有毒な副産物にもなります。蛍光励起によってもROSが生成し、生細胞に損傷を与える光毒性の問題を引き起こします。本アプリケーションノートでは、微弱な励起光と高感度モノクロカメラを用いて活性化マクロファージのROSを検出し、視野内の細胞数をラベルフリーで計測することでROSを定量解析した、低光毒性のライブセルハイコンテンツイメージングを紹介します。

キーワード：炎症、ROS、マクロファージ、ラベルフリー、ライブセルハイコンテンツイメージング、画像解析

実験の概要



- 1) 96ウェルポリスチレン製マイクロプレート (TC処理) に J774.1細胞を 2×10^5 cells/mlの密度で播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター内で24時間培養。
- 2) 培地を取り除き、細胞を HBSS で 2 回洗浄し、Photo-oxidation Resistant DCFH-DA Dye Working Solution を加え、インキュベーター内で 30 分間インキュベート。
- 3) Working solutionを除去し、HBSSを用いて細胞を1回洗浄。
- 4) フェノールレッドフリーのDMEM培地で希釈したLPSを 0 ng, 125 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng/mLの濃度で各3ウェルに添加。
- 5) ステージトップインキュベーターを備えた倒立顕微鏡 Ti2-E にウェルプレートを設置し、NIS-Elements HCのHCA Live テンプレートを用いてタイムラプス画像を取得 (表1)。
- 6) General Analysis 3で画像解析レシピを作成し、解析データをCSVに出力。Microsoft Excel®でデータを分析。

表1. 撮像と解析の条件

	明視野	ROS (蛍光：緑)
光源	透過LED	D-LEDI (パワー10%)
Ex/Em (nm)	—	475/535 nm
Exposure time	800 μ s	80 ms
Mag, FOV	Mag: 20X, FOV: 0.89 x 0.89 mm	
Zスタック	3枚 (0.8 μ m x 3 steps)	
マルチポイント	3ポイント/well	
タイムラプス	Interval 1時間, Duration 48時間	
マスク	VC細胞マスク	ROSマスク

◆ 観察装置

- ・倒立顕微鏡：Ti2-E
- ・モノクロカメラ：DS-Qi2
- ・蛍光LED照明システム：D-LEDI
- ・対物レンズ：CFI プランアポク ロマート Lambda D 20X (NA 0.8)
- ・ステージトップインキュベーター

◆ 画像解析ソフトウェア・オプションモジュール

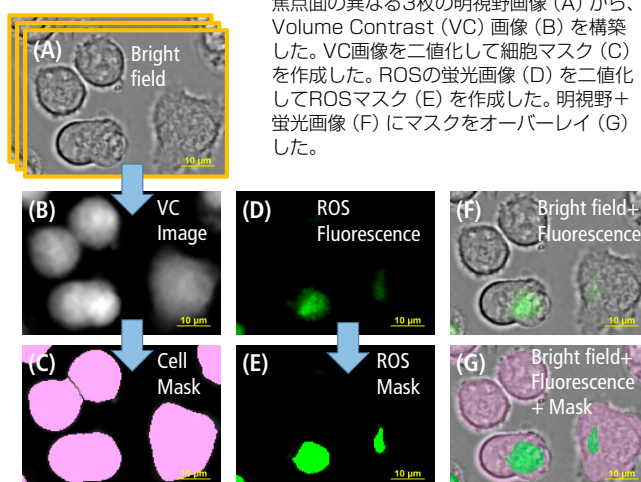
- ・NIS-Elements HC
- ・General Analysis 3 (GA3)
- ・NIS-A EDF module
- ・Volume Contrast (VC)

◆ 細胞・試薬・材料

- ・マウスマクロファージ様細胞株 (JCRB, J774.1細胞)
- ・ROS Assay Kit -Photo-oxidation Resistant DCFH-DA- (株式会社 同仁化学研究所, R253)
- ・Lipopolysaccharide, from E.coli O111 (LPS) (富士フイルム和光純薬株式会社, Cat# 125-05181)
- ・CELL CULTURE MICROPLATE, 96WELL (Greiner Bio-One, 655090)

図1. 細胞マスクとROSマスクの作成

焦点面の異なる3枚の明視野画像 (A) から、Volume Contrast (VC) 画像 (B) を構築した。VC画像を二値化して細胞マスク (C) を作成した。ROSの蛍光画像 (D) を二値化してROSマスク (E) を作成した。明視野+蛍光画像 (F) にマスクをオーバーレイ (G) した。



VC画像を使用したラベルフリーセルカウント

Hoechstで核を染色して細胞数をカウントする方法は、ライブセルイメージングでは、色素の毒性や蛍光励起による光毒性により、細胞が損傷する原因になります。透過光で明視野画像を撮影する方法は、生細胞への光毒性が生じないため、優れています(図2 (A))。しかし、明視野画像は背景と細胞領域のコントラストが低く、細胞領域を二値化して細胞数を計測することは困難です(図2 (B))。一方、VC画像は焦点面の異なる3枚の明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築できるため、背景と細胞領域の識別が容易です(図2 (C))。これにより、VC画像から細胞領域を二値化して細胞マスクを作成し、視野内の細胞数を計測できます(図2 (D))。

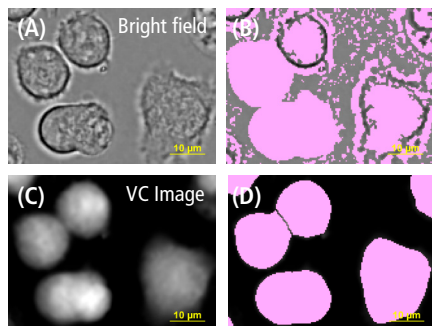


図2. 二値化
(A): 明視野画像
(B): 明視野画像を輝度値で二値化して作成したマスク画像
(C): Volume Contrast (VC) 画像
(D): VC画像を輝度値で二値化して作成したマスク画像

結果

LPSによるマクロファージの活性化

バクテリアの細胞壁多糖であるリポ多糖 (LPS) は、マクロファージの細胞表面にあるToll様受容体4に結合し、マクロファージを活性化して炎症性サイトカインIL-6およびTNF- α を生成させ、炎症反応を引き起こします。さらに、LPSによって刺激されたマクロファージは、炎症誘発性の形態 (M1 マクロファージ) を示し、ミトコンドリアで ROS を生産して、病原体や死細胞を貪食して分解します。過剰な炎症反応は多くの病気の発症につながるため、ROSを指標に抗炎症薬のスクリーニングが行われています。この実験では、LPSによるマクロファージの刺激によって誘発される炎症反応を、ROSを指標として分析しました。

ライブセルハイコンテントイメージングの利点

LPS刺激により、細胞あたりの細胞面積が増加しました(図3 (D, F, H))。細胞数は、LPSを含まないコントロールウェルで増加しました(図3 (A, B, E, G))。一方、LPS濃度が500 ng/mL以上の高濃度ウェルでは、イメージング開始から24時間後まで細胞数が増加しませんでした(図3 (E))。タイムラプス画像を観察すると、細胞分裂による細胞数の増加と、マクロファージの死細胞貪食による細胞数の減少が明らかになりました(図4)。このように、タイムラプス画像は、数値データだけでは得られない、実際の細胞の変化に関する情報を提供します。ライブセルハイコンテントイメージングは、細胞の形態変化、挙動、細胞間コミュニケーションに関する豊富な情報を提供します。

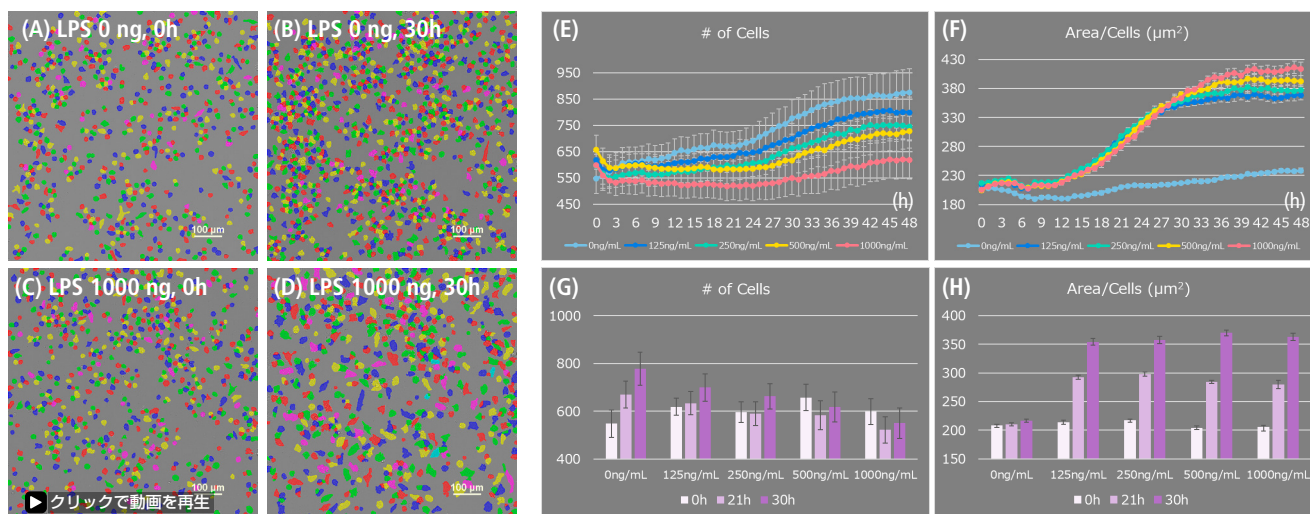


図3. LPS添加後の細胞数と細胞あたりの細胞面積の変化

(A) - (D): 明視野画像にオーバーレイした細胞マスク, Scale bar: 100 μ m, (A), (B): LPS 0 ng/mL, (C), (D): LPS 1000 ng/mL, 撮影開始後 0h (A), (C), 30h (B), (D), (E) - (F): 1時間間隔における細胞数と細胞あたりの細胞面積の変化, (G) - (H): 撮影開始後0h, 21h, 30hにおける細胞数と細胞あたりの細胞面積の変化

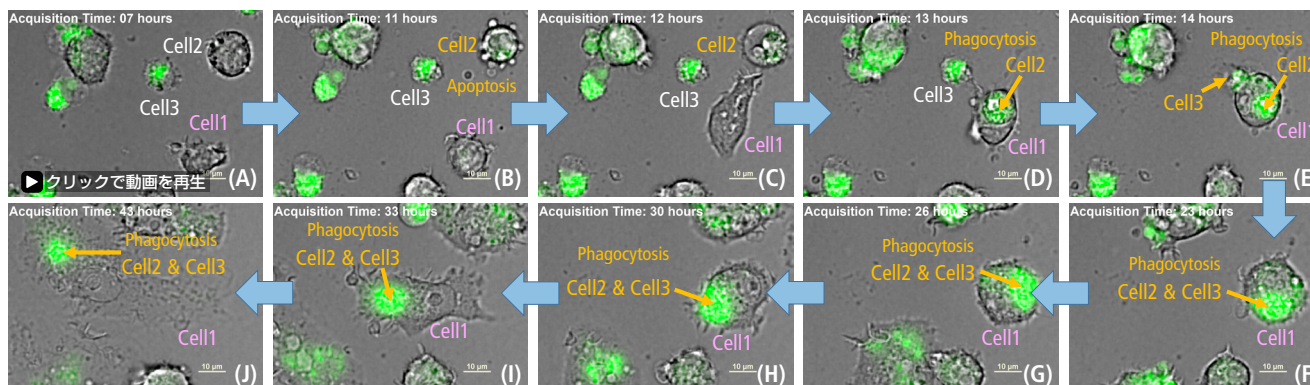


図4. 活性化マクロファージによる死細胞のファゴサイトーシス

(A) - (J): LPS 500 ng/mLを添加したウェルのタイムラプス画像 (明視野と蛍光のオーバーレイ画像), 緑: ROS, Scale bar: 10 μ m
Cell2はアポトーシスを起こし (B)、1時間後に死細胞の形態を示した (C)。Cell1は死んだCell2とCell3を貪食し、ROSを増加させた (C) - (F)。

結果

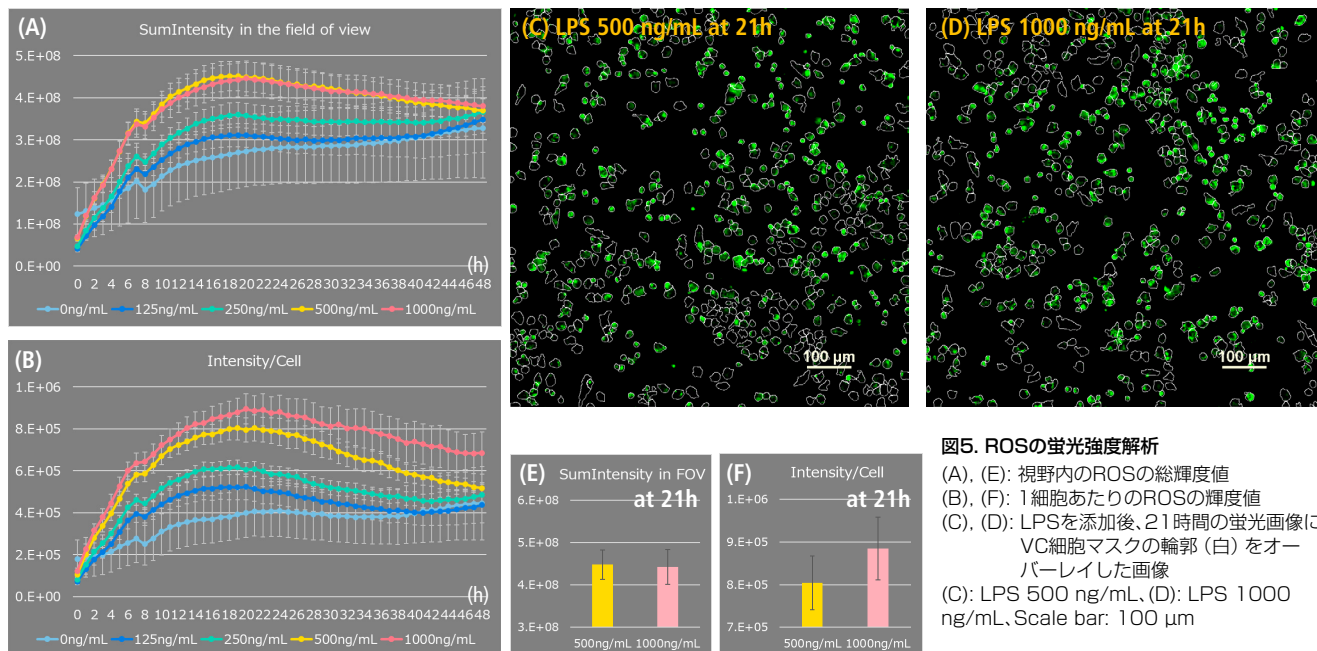


図5. ROSの蛍光強度解析

(A), (E): 視野内のROSの総輝度値
(B), (F): 1細胞あたりのROSの輝度値
(C), (D): LPSを添加後、21時間の蛍光画像にVC細胞マスクの輪郭(白)をオーバーレイした画像
(C): LPS 500 ng/mL, (D): LPS 1000 ng/mL, Scale bar: 100 μm

蛍光強度を細胞数でノーマライズ

細胞増殖はLPS濃度依存的に抑制されました(図3 (E))。視野全体の蛍光強度を解析すると、LPS 500 ng/mLと1000 ng/mLで同じ蛍光強度を示しましたが、細胞数が異なるため、視野全体の蛍光強度を解析するだけでは正確な比較はできません(図5 (A, E))。視野全体の細胞数を測定し、細胞あたりのROS蛍光強度を算出すると、撮影開始21時間後のLPS 1,000 ng/mLの蛍光強度は、500 ng/mLの約1.1倍を示しました(図5 (B, F))。Volume Contrast画像からのラベルフリー細胞数計測により、活性化されたマクロファージの、細胞あたりのROSの変化を経時的に定量できました。

微弱な蛍光励起による低光毒性

高NAのCFI Plan Apo Lambda D 20X対物レンズ(NA 0.8)と高感度モノクロCMOSカメラ DS-Qi2を使用して、微弱な励起光でROSを検出しました。この光毒性の低減により、細胞は撮影開始から30時間後でも増殖することができました(図3 (E, G))。また、1時間間隔で撮影した48時間のタイムポイントであっても、蛍光強度が低下することなくROSを検出できました(図5 (A, B))。

タイムラプスイメージングによる解析

薬剤による変化が生じるタイミングは事前に予測できません。自動タイムラプスイメージングでは、取得したタイムラプス画像を使用して、細胞にいつ変化が生じ、その時点で細胞がどのような挙動を示していたかを知ることができます。

耐光性ROS検出試薬

従来のROS検出試薬は、励起光による自動酸化により、再現性の高い実験は困難でした。今回の実験に使用した株式会社同仁化学研究所のROS検出試薬は、励起光による色素の自動酸化を低減した試薬です。細胞内のROSが産生された領域に特異的に蛍光が検出され、バックグラウンドが低く、精度の高い解析が可能でした。また、色素の細胞内滞留性が高く、撮影開始から48時間後の画像でも高い蛍光強度が検出され、長時間にわたるROSの解析が可能になりました。

まとめ

- ✓ Volume Contrast画像からラベルフリーで細胞数を計測することにより、光毒性を低減したライブセルの定量解析が可能です。
- ✓ 細胞あたりの蛍光強度を比較することにより、わずかな薬効の差を定量化し、精度の高い解析が可能です。
- ✓ 活性化マクロファージによるROSの経時的な分析により、炎症を定量できます。
- ✓ タイムラプス画像により、1枚のウェルプレートから複数の薬剤処理時間における変化を解析できます。
- ✓ 撮影開始後は離席可能なため、自動撮影によるライブセルアッセイは実験効率の向上とコスト削減が可能です。
- ✓ ライブセルハイコンテンツイメージングは、数値データだけでは得られない実際の細胞の変化や動態を含む、豊富な情報を提供できます。

謝辞

ROS解析による実験プロトコル確立にご協力をいただいた、株式会社同仁化学研究所の皆様へ心より感謝します。

製品情報



耐光性トータルROS検出キット

(株式会社 同仁化学研究所)

<https://www.dojindo.co.jp/>

既存のDCFH-DAより感度が高く、細胞内に取り込まれた後にタンパク質と共有結合するため細胞外に漏れ出ることはありません。また、励起光による自動酸化が抑えられているため経時的なROS検出が可能です。



顕微鏡アドオンモジュール Volume Contrast

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、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのアドオンモジュールです。特別な光学アクセサリーの追加は不要で、手軽にラベルフリーでの定量解析が行えます。