

APPLICATION NOTE

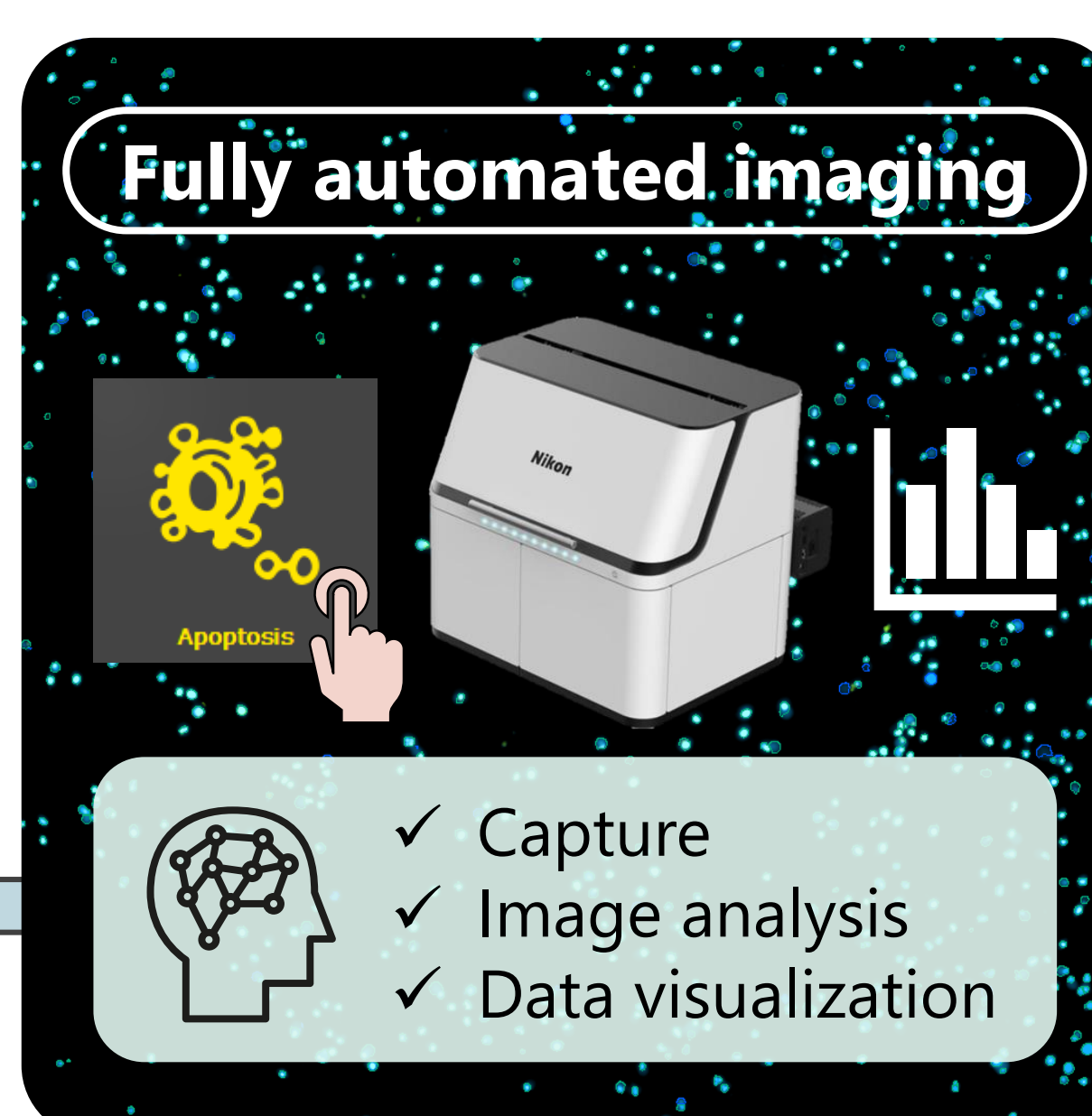
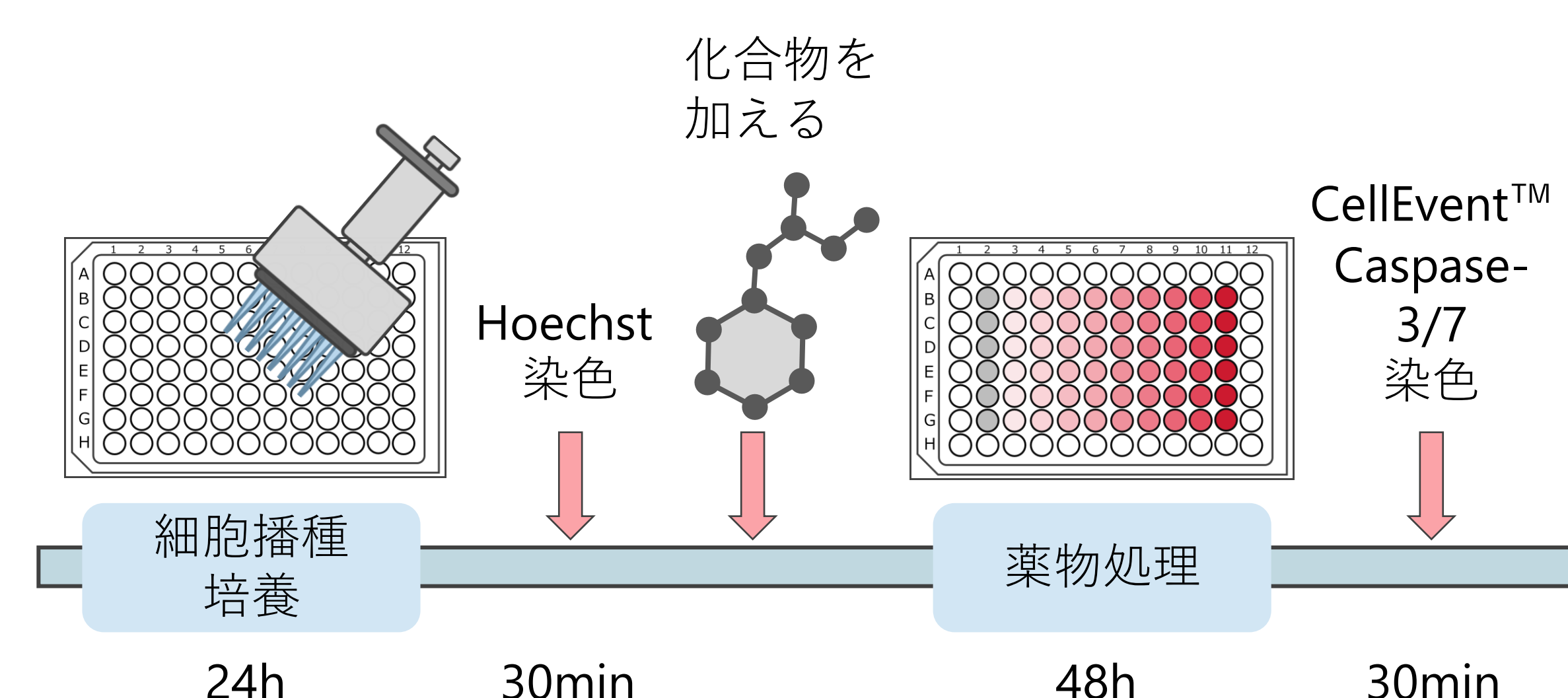
Smart Imaging System ECLIPSE Ji
画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
Apoptosis (Option)

AI-Driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いたアポトーシスの解析

ECLIPSE Ji は、画像統合ソフトウェアNIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得から解析、グラフ作成まで自動で実行できるSmart Experimentを搭載しています。事前に学習させたArtificial Intelligence (AI) と事前に定義されたイメージングプロセスが画像取得と解析条件の設定を自動的に最適化するため、簡単な操作で可視化されたデータやEC₅₀の情報が得られます。アポトーシスは細胞死の一種であり、プログラムされた細胞死です。アポトーシスの異常は、がんや自己免疫疾患、神経疾患などの様々な疾患を引き起こします。多くのがん細胞は細胞死を回避するアポトーシス耐性を獲得し、異常ながん細胞は増殖を続けることが知られています。アポトーシスマーカーの1つであるCaspase-3/7の活性を指標にしてアポトーシス細胞を蛍光で検出できます。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのApoptosisモジュールを使用して、がん細胞におけるスタウロスポリンによる用量依存的なアポトーシスの誘導を可視化し、EC₅₀を算出して薬物の効果を定量化する例を紹介します。

キーワード：アポトーシス、カスパーゼ活性、抗がん剤の研究、薬理試験、自動設定、EC₅₀、用量反応曲線

実験の概要



● Key features

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成まで自動で実行
- ✓ アポトーシス細胞数の割合を計測
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ 用量反応曲線を自動で作成
- ✓ EC₅₀/IC₅₀を自動で算出
- ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 96ウェルプレートにHeLa細胞を播種し、24時間培養。
(2) Hoechst 33342を含む培地に交換し、30分間インキュベート。
(3) スタウロスポリンを10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して48時間、細胞を処理。
(4) CellEvent™ Caspase-3/7を各ウェルに添加し、30分間染色。
(5) 培地を交換せずに、ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Apoptosisアイコンを選択して自動で画像取得と解析を実施した。

Detection region	Fluorescence label	Ex/Em (nm)
Nucleus of all cells	Hoechst 33342	352/461
Nucleus of Apoptotic cells	CellEvent™ Caspase-3/7	502/530
Magnification	Field of view	
10X	1.76 x 1.76 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

結果

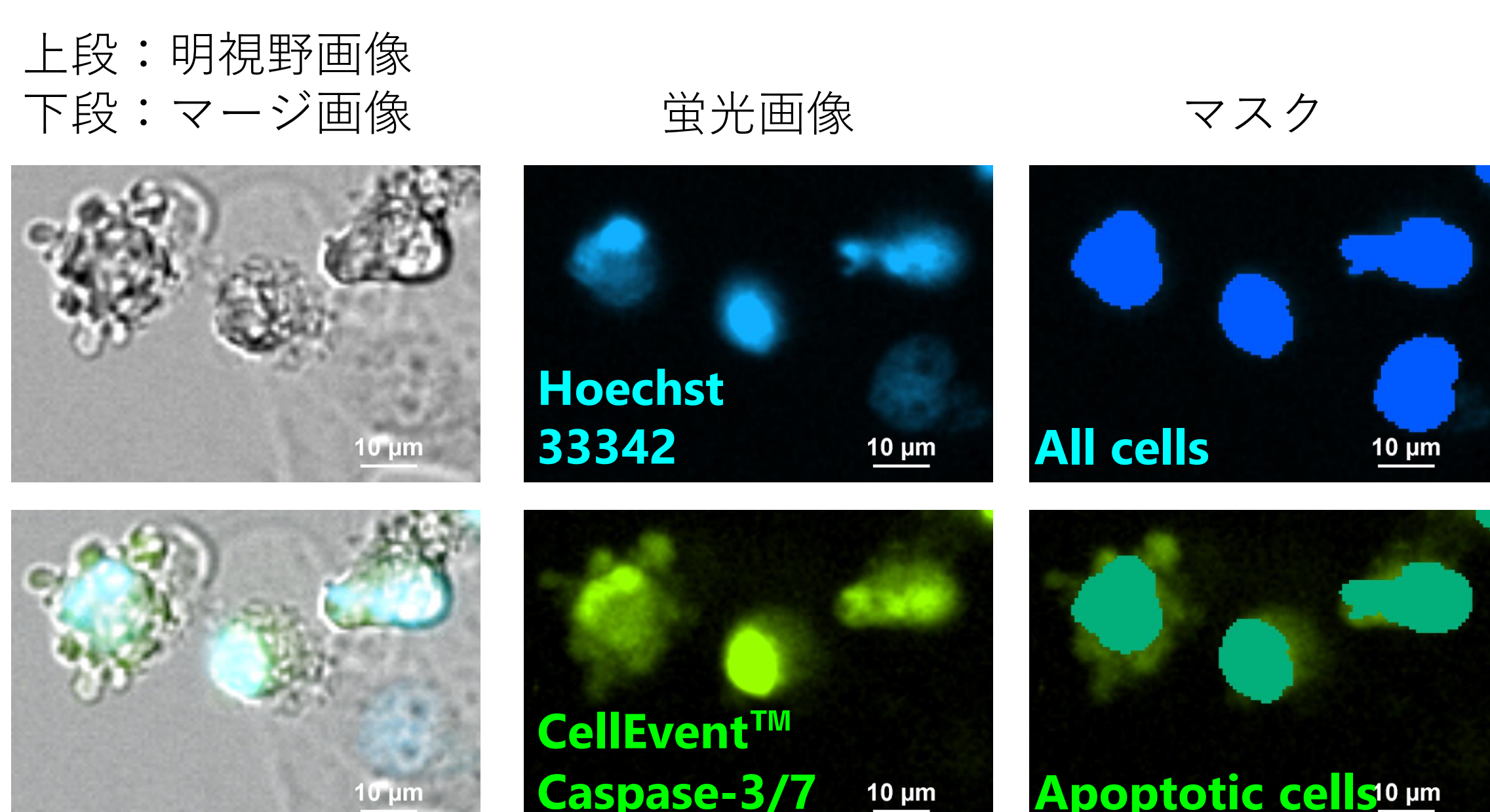


図1. HeLa細胞の画像とマスク

左上：明視野画像、左下：明視野と蛍光のマージ画像、中央：蛍光画像（上段：Hoechst 33342（青：全ての細胞の核）、下段：CellEvent™ Caspase-3/7（緑：アポトーシス細胞の核））、右：マスク（青マスク：全ての細胞の核、緑マスク：アポトーシス細胞の核）

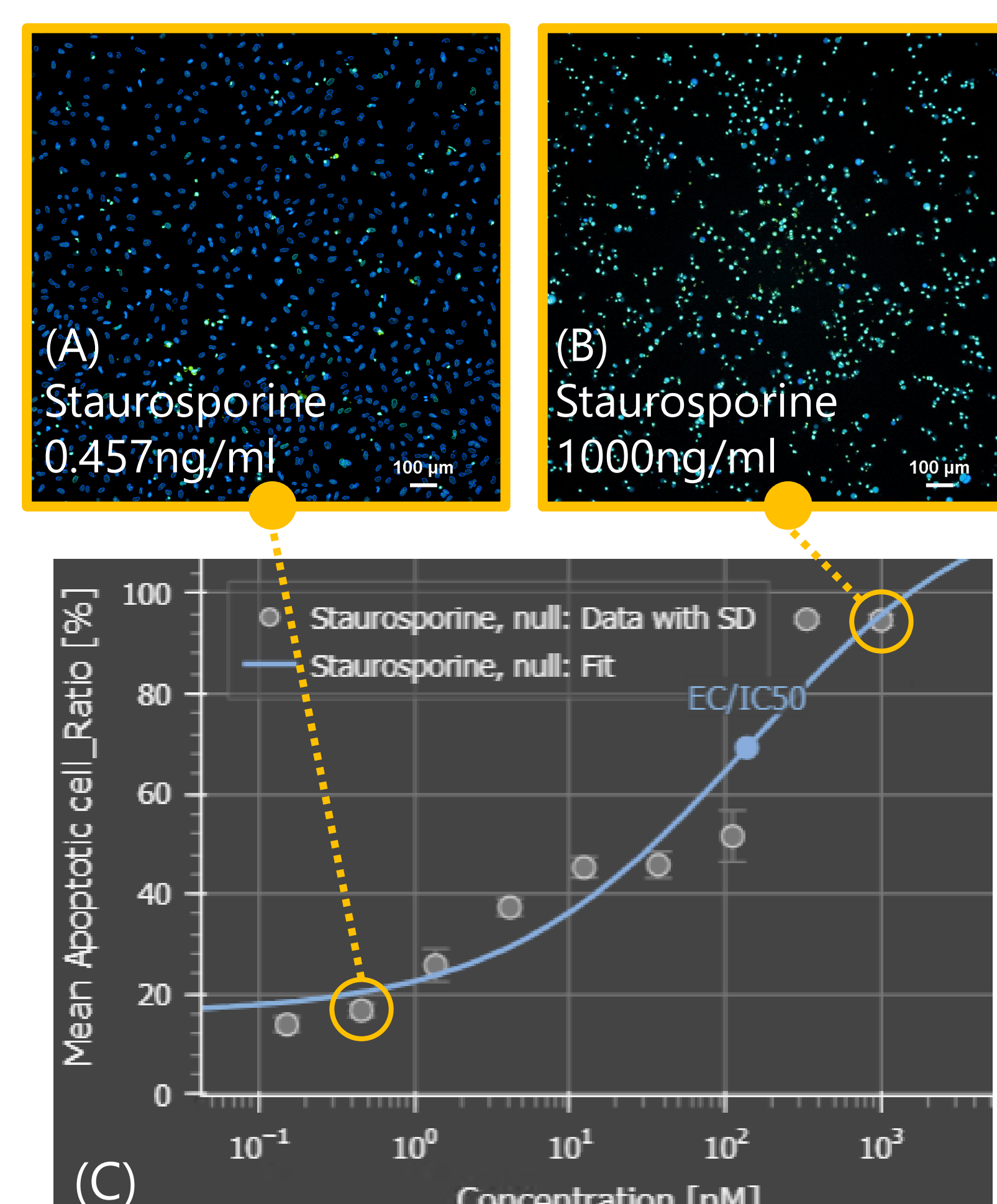
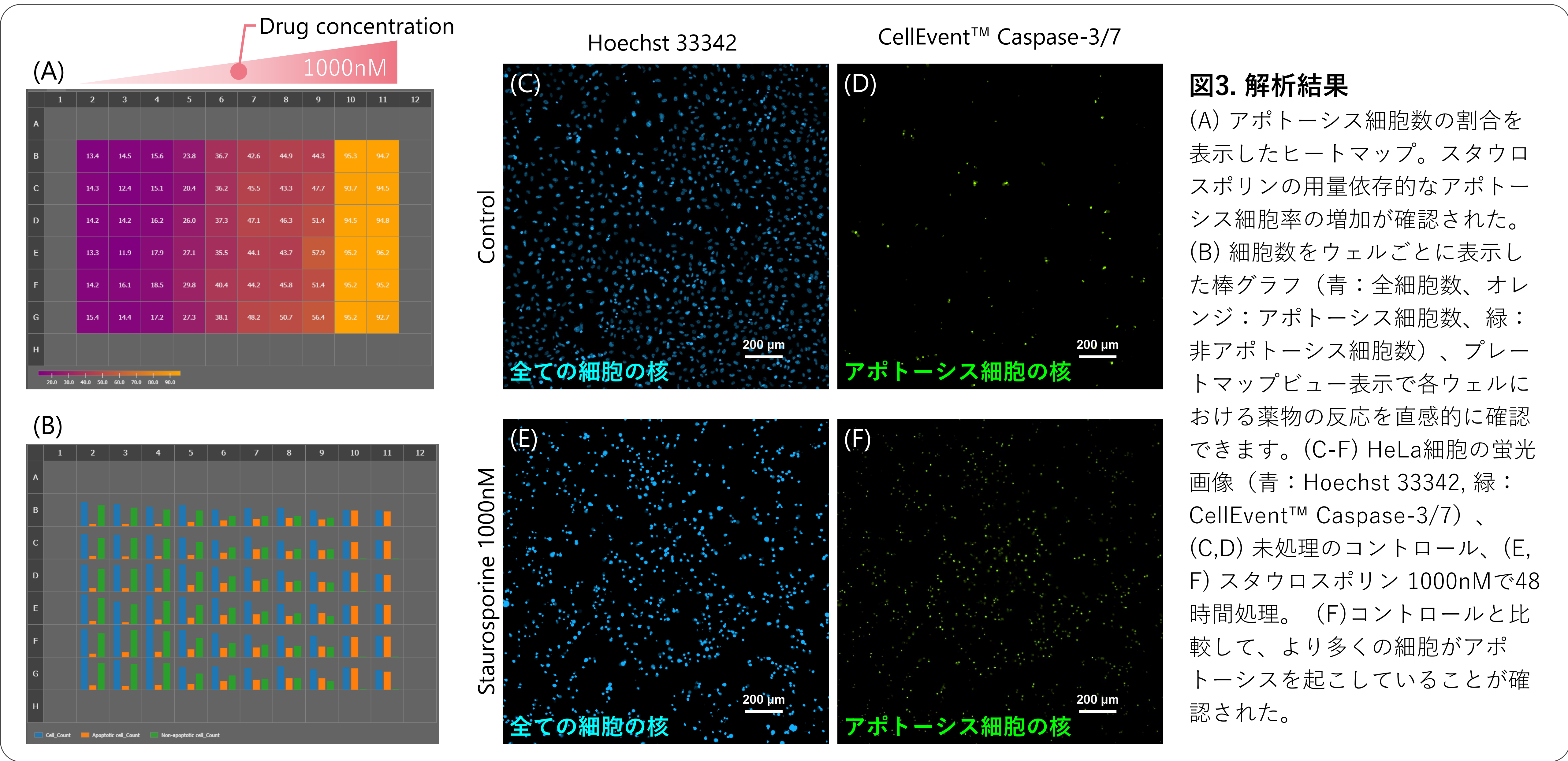


図2. アポトーシスを起こしたHeLa細胞の画像とスタウロスポリンの用量反応曲線

(A、B) 蛍光画像にマスクの輪郭をオーバーレイした画像、（青マスク：全ての細胞の核、緑マスク：アポトーシス細胞の核）、スケールバー：100 μm
(C)スタウロスポリンによるアポトーシス細胞の割合の用量依存的な増加を示した用量反応曲線（X軸：薬物濃度（対数）、Y軸：アポトーシス細胞数の割合）、EC₅₀ = 137.182nM, Z'-factor = 0.95

結果



サンプル作成のプロトコル

HeLa細胞を96ウェルプレートに6x10e3 cells/wellのの密度で播種し、 37℃、5% CO₂インキュベーター内で24時間培養。Hoechst 33342 (2 μg/ml) を含む培地に交換し、 37℃、5% CO₂インキュベーター内で30分間染色。Staurosporinを観察用培地（10%FBS, 4mM L-Glutamine, 1%Pc/Sm in FluoroBright DMEM）で0 nM, 0.152 nM, 0.457 nM, 1.41 nM, 4.11 nM, 12.3 nM, 37 nM, 111 nM, 333nM, 1000 nMの濃度に希釈し、各6ウェルに加える。細胞をスタウロスポリンで48時間、37℃、5% CO₂インキュベーター内で処理する。観察用培地で40倍に希釈したCellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagentsを10 μlずつ各ウェルに添加し、室温で30分間静置する。

材料と試薬

Cell Culture																																																																																																																																	
Cell Line	HeLa (RIKEN RCB0007)																																																																																																																																
Growth medium	MEM + 10%FBS + 1%Pc/Sm																																																																																																																																
Culture vessel	EZVIEW® Culture Plate B (Glass Bottom Plate) Microplate 96 well (AGC techno glass (IWAKI), 5866-096)																																																																																																																																
Test substance																																																																																																																																	
Compound	Staurosporin																																																																																																																																
Test concentration	Negative control: 0 nM, Positive control: 333 nM To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: (0) 0 nM, (1) 0.152 nM, (2) 0.457 nM, (3) 1.41 nM, (4) 4.11 nM, (5) 12.3 nM, (6) 37 nM, (7) 111 nM, (8) 333 nM, (9) 1000 nM																																																																																																																																
Plate map example	<table><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr><tr><td>A</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td></tr><tr><td>B</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>C</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>D</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>E</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>F</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>G</td><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><td>H</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td></tr></table> “b” : blank well													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																					
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																																					
B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																																					
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																																					

死細胞の剥離を防ぐため、培地を交換せずにウェルプレートをECLIPSE Jiに設置して画像取得と解析を実行。

Tips

Apoptosis assayは、全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を計測するアッセイです。一般にDAPIはライブセルの核染色を染色できません。DAPIではなく、Hoechst 33342で全ての細胞の核を染色してください。また、薬物処理後に洗浄を実施すると死細胞がウェルプレートの底面から剥離して、定量解析の精度が低下します。そのため、薬物処理後は細胞を洗浄や固定をせずに画像取得を行ってください。

Reagents		
Product name	Product number	Supplier
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Thermo Fisher Scientific
FluoroBrite™ DMEM	A1896701	Thermo Fisher Scientific
Staurosporine from Streptomyces sp.	S5921	Sigma-Aldrich
-Cellstain® - Hoechst 33342 solution	H342	Dojindo Laboratories
CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagents	L3224	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich

□ 対応容器*

- ・ 24, 48, 96-well plate

* ガラスおよびポリスチレン底のウェルプレートに対応しています。画質よりも底面への細胞の接着を優先する場合は、ポリスチレン底のウェルプレートを使用してください。

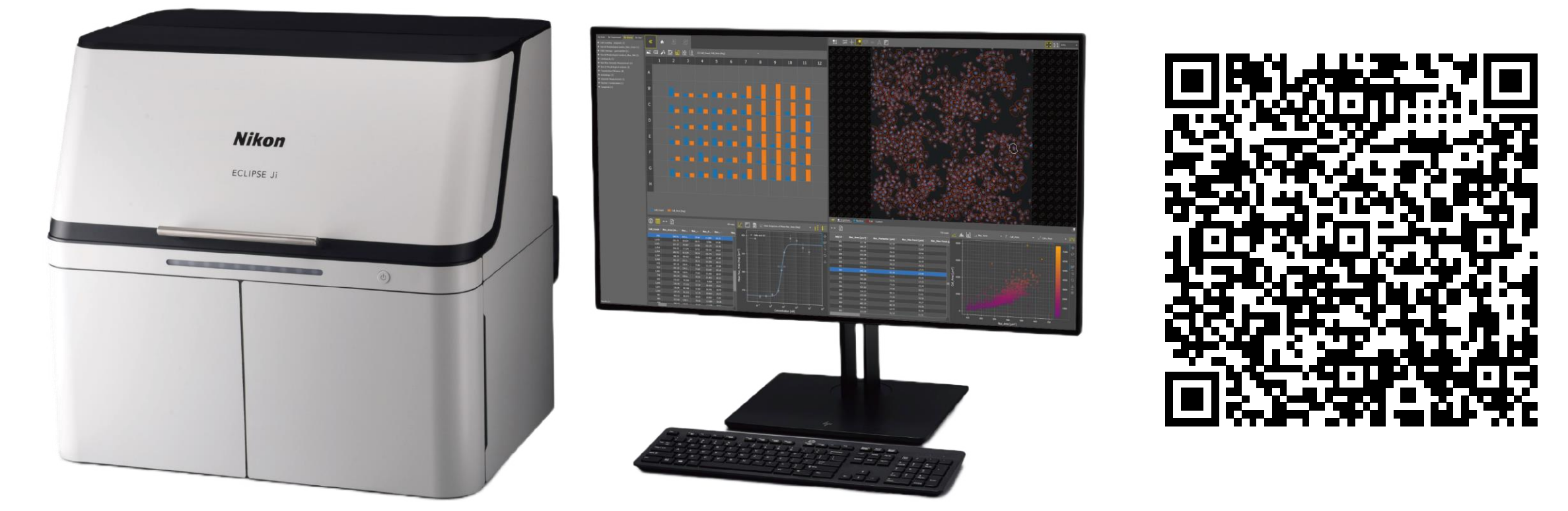
参考文献

Chae, HJ, *et al.*, Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* 42 (4):373-81 (2000).

Product information

Smart Imaging System ECLIPSE Ji

ECLIPSE Jiは、AI-Driven全自動イメージングシステムです。NIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得・解析・グラフ作成をシームレスに自動で実行できます。人による高度な判断が必要なオートフォーカスの設定にはAIが最適な焦点面を見つけるCellFinder.aiを搭載。画像取得や解析のプロセスに多くの学習済みAIを実装。これにより、設定や最適化の工程数が大幅に削減され、誰もが簡単に結果を得ることができます。



Imaging Software NIS-Elements SE Apoptosis (Option)

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ アポトーシス細胞数の割合を計測できます。
- ✓ ワンクリックでレポートを作成し、画像、解析結果、用量反応曲線、EC₅₀/IC₅₀の算出結果をPDFで出力できます。
- ✓ 細胞イメージングと解析をより簡単に、より快適に

