

## APPLICATION NOTE

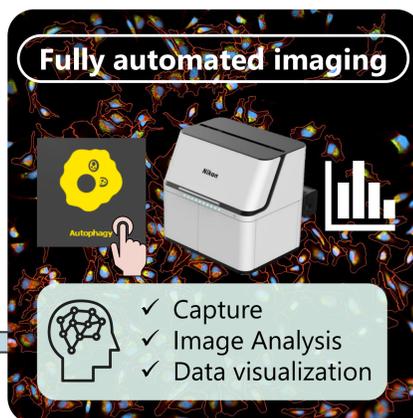
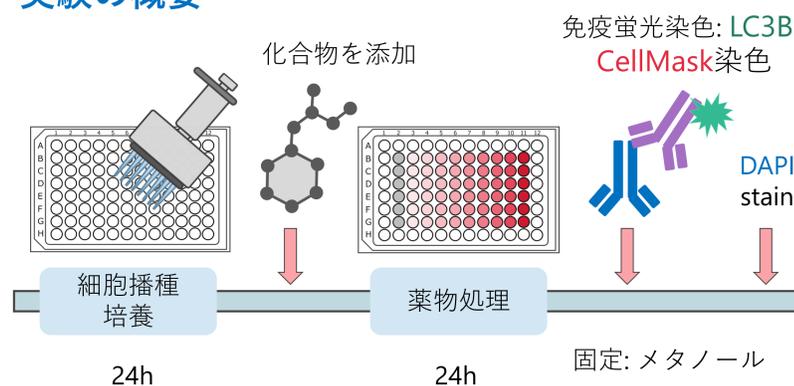
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji  
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE  
 Autophagy (Option)

# AI-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いたオートファジー活性の定量解析

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、グラフ作成までシームレスに実行できる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EC<sub>50</sub>の情報が得られます。オートファジーは、細胞内のタンパク質や細胞内小器官をリソソームによって分解することで、細胞を正常な状態に保つシステムです。オートファジーによる恒常性の維持は、がん、神経疾患、糖尿病、心不全、老化など様々な疾患の予防や制御に関与していることが明らかになっており、医薬品や化粧品業界においても注目されている研究分野です。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのAutophagyモジュールを使用して、細胞内に蓄積したオートファゴソームを免疫蛍光染色したLC3B由来の蛍光強度を測定することで、薬物によるオートファジーの活性を定量する例を紹介します。

キーワード：オートファジー、オートファゴソーム、創薬、化粧品の開発、自動設定、EC<sub>50</sub>、用量反応曲線

## 実験の概要



### Key features

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成までシームレスに実行
- ✓ オートファゴソームを定量化
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ 用量反応曲線を自動で作成
- ✓ EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>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) 被験物質のクロロキンに10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して24時間インキュベート。(3) メタノールで細胞を固定。0.1% Triton X-100で膜透過処理。(4) Anti-LC3B antibody (一次抗体) と Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (二次抗体) で免疫蛍光染、CellMask™ Deep Redで細胞膜を染色、DAPIで核を染色。(5) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Autophagy アイコンを選択し、画像取得と解析を実施した。

検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)
全ての細胞の核	DAPI	345/455
細胞領域	CellMask™ Deep Red	649/666
オートファゴソーム (LC3B)	Anti-LC3B antibody (primary), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (secondary)	495/519
倍率	視野 (FOV)	
20X	0.88 x 0.88 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

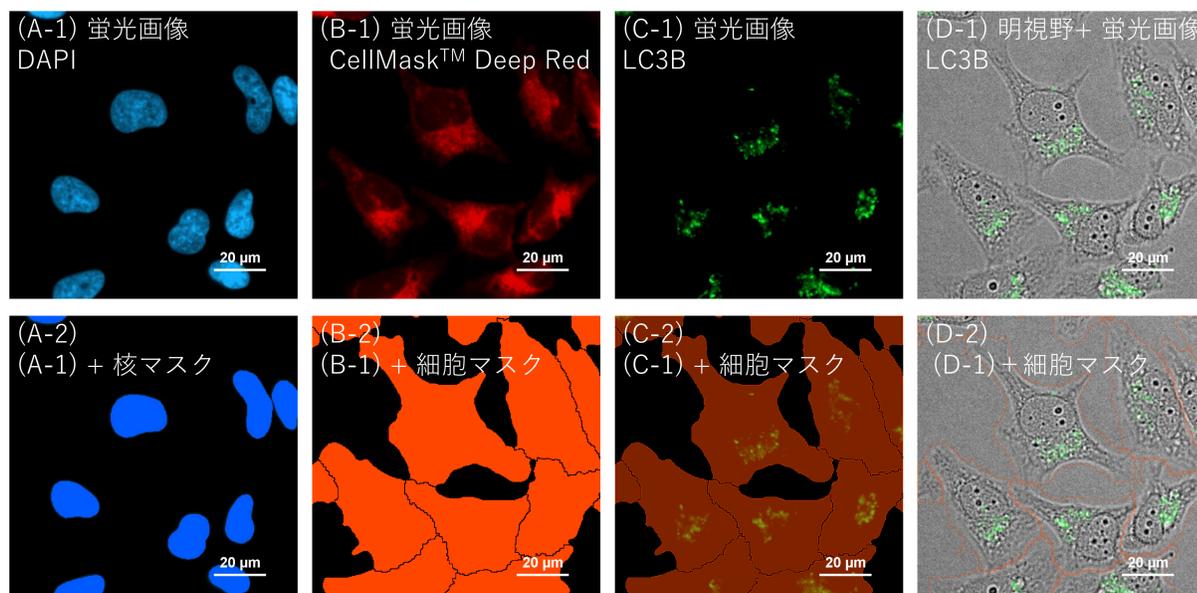


図1. 二値化とオートファゴソームの蛍光強度測定

DAPIで検出した核領域 (A-1) を二値化して核マスク (A-2) を作成。CellMask™ Deep Red染色した蛍光画像 (B-1) を用いて細胞マスクを作成 (B-2)。細胞マスク(C-1)の領域における免疫蛍光染色したLC3B由来の蛍光強度を測定し、オートファゴソームを定量する。  
スケールバー：20 μm

## 結果

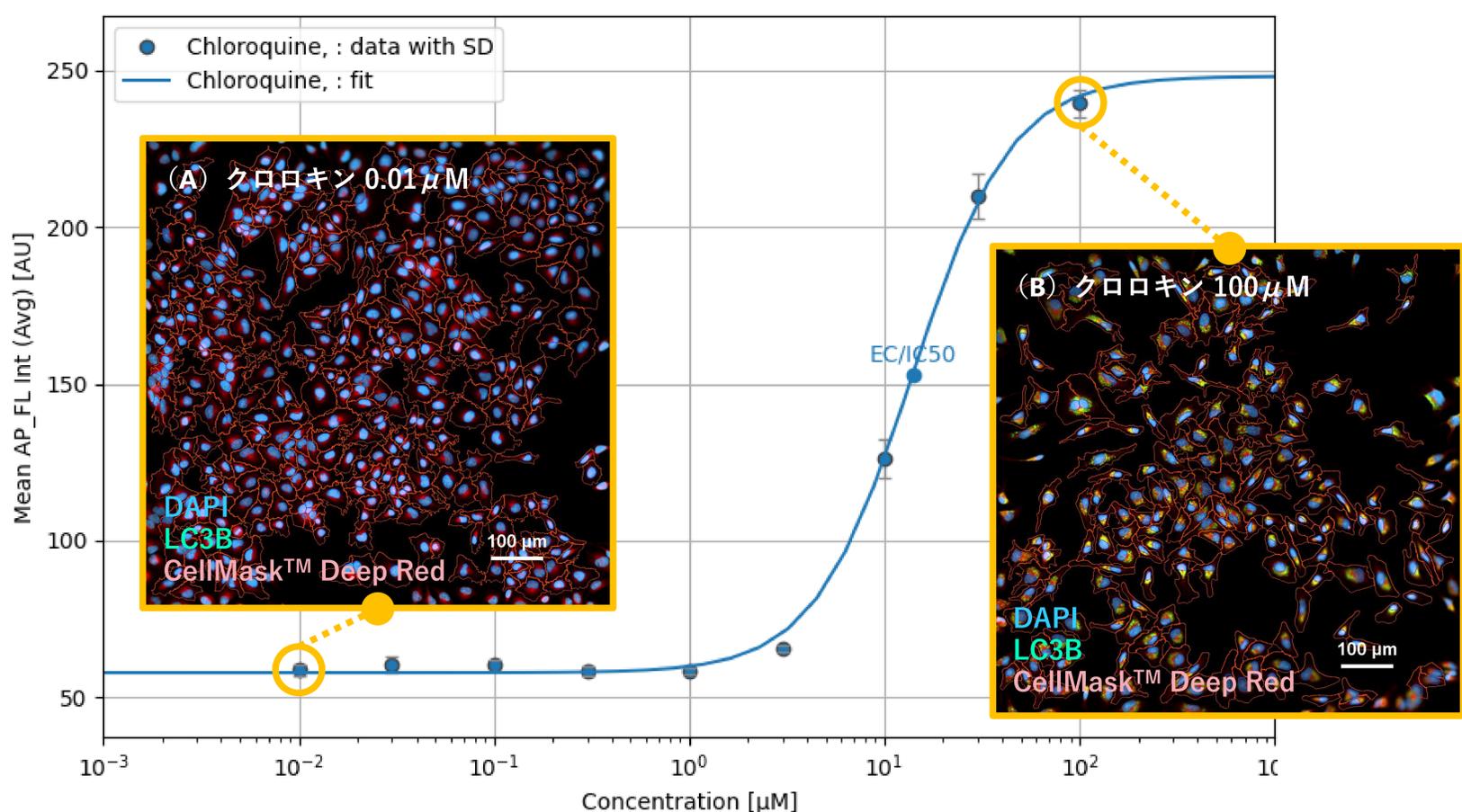


図2. クロロキンで24時間処理したHeLa細胞の画像と用量反応曲線

(A) クロロキン $0.01\mu\text{M}$ 、(B) クロロキン $100\mu\text{M}$ 、(A、B) 蛍光画像にマスクの輪郭を重ねた画像、蛍光画像：DAPI（青）、LC3Bの免疫蛍光染色（緑）、CellMask™ Deep Red（赤）、マスク：核マスク（青）、細胞マスク（赤）、スケールバー： $100\mu\text{m}$ 。クロロキンの用量依存的にLC3B（オートファゴソーム）の平均蛍光強度が増加した結果を示した用量反応曲線。X軸：薬物濃度（対数）、Y軸：細胞マスク領域におけるオートファゴソームの蛍光強度（平均）、 $\text{EC}_{50} = 13.958\mu\text{M}$ 、 $Z'$ -factor = 0.5347

## まとめ

- ✓ 蛍光により検出される細胞マスク領域のLC3B（オートファゴソーム）に由来する平均蛍光強度を測定できました。
- ✓ クロロキンの用量依存的なLC3B由来の蛍光強度の増加を確認することができました。
- ✓ Smart Experimentは、画像の取得から解析、グラフ作成まで全自動で実施できます。
- ✓ 用量反応曲線が自動で作成され、 $\text{EC}_{50}$ を算出できます。
- ✓ ウェルプレートにJiを設置して、Autophagyのアイコンを選択し、サンプルの情報を入力するシンプルな操作です。今回の実験条件では、撮影開始からグラフ表示まで約20分で実施できました。
- ✓ CellFinder.aiが最適な焦点面を見つけるため、面倒なオートフォーカスの設定は必要ありません。
- ✓ 面倒な設定は、AIに任せて研究者はより創造的な研究活動に専念できます。

## サンプル作成のプロトコル

- 1) HeLa細胞を96ウェルプレートに $4.5 \times 10^3$  cells/wellの密度で播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ インキュベーター内で24時間培養する。
- 2) Chloroquineを0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、および $100\mu\text{M}$ の濃度に培地で希釈し、各濃度の培地を各6ウェルに添加する。細胞をChloroquineで24時間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ インキュベーター内で処理する。
- 3) 細胞をPBSで1回洗浄する。
- 4) 氷冷したメタノールをウェルに添加し、 $4^\circ\text{C}$ で5分間静置して細胞を固定する。
- 5) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 6) 0.1% Triton X-100 in PBSをウェルに添加し、室温で5分間静置して膜透過処理をする。
- 7) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 8) ブロッキング液 (1% BSA, 10% normal goat serum, 0.3 M glycine, 0.1% Tween-20 in PBS)をウェルに添加し、室温で1時間静置する。
- 9) 細胞をPBSで洗浄する。
- 10) ブロッキング液で希釈した一次抗体 (1:1000) をウェルに添加し、室温で1時間静置する。
- 11) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 12) ブロッキング液で希釈した二次抗体 (1:1000)、および CellMask™ Deep Red ( $5\mu\text{g/ml}$ ) をウェルに添加し、室温で1時間静置する。
- 13) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 14) DAPI ( $2\mu\text{g/ml}$ )をウェルに添加し、室温で5分間静置する。
- 15) 細胞をPBSで3回洗浄する。

## 材料と試薬

細胞培養																																																																																																																						
細胞	HeLa (RIKEN RCB0007)																																																																																																																					
増殖培地	MEM + 10%FBS + 1%Pc/Sm																																																																																																																					
培養容器	EZVIEW® Culture Plate B (Glass Bottom Plate) Microplate 96 well (AGC techno glass (IWAKI), 5866-096)																																																																																																																					
被験物質																																																																																																																						
化合物	Chloroquine																																																																																																																					
試験濃度	Negative control: 0 $\mu$ M Positive control (1): 10 $\mu$ M Positive control (2): 30 $\mu$ M To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: Ex: (0) 0 $\mu$ M, (1) 0.01 $\mu$ M, (2) 0.03 $\mu$ M, (3) 0.1 $\mu$ M, (4) 0.3 $\mu$ M, (5) 1 $\mu$ M, (6) 3 $\mu$ M, (7) 10 $\mu$ M, (8) 30 $\mu$ M, (9) 100 $\mu$ M																																																																																																																					
プレートマップの例	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td>b</td> </tr> <tr> <th>B</th> <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> <th>C</th> <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> <th>D</th> <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> <th>E</th> <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> <th>F</th> <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> <th>G</th> <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> <th>H</th> <td>b</td> </tr> </tbody> </table> <p>"b" : blank well</p>		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																																																																																																										

### □ 対応容器\*

- ・ 24-well plate
- ・ 96-well plate \*ガラス底のウェルプレートにのみ対応しています。

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
Chloroquine	QJ-5953	Combi-Blocks
Anti-LC3B antibody [EPR18709] - Autophagosome Marker (primary antibody)	ab192890	Abcam
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (secondary antibody)	ab150077	Abcam
DAPI Solution	62248	Thermo Fisher Scientific
CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain	C10046	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Thermo Fisher Scientific
Fetal bovine serum (FBS)	10437028	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (Pc/Sm) (10,000 U/ml)	15140122	Thermo Fisher Scientific
Methanol	134-01833	Fujifilm-Wako
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich

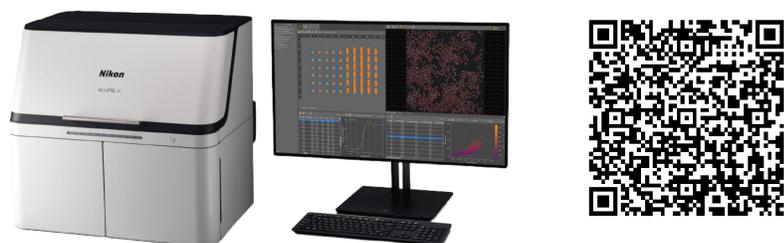
### 参考文献

Ferreira, PMP, et al., Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy-related mechanisms. *Pharmacol Res* (2021)

## 製品情報

### 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。



### 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE Autophagy (Option)

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 蛍光により検出された細胞領域におけるオートファゴソームの蛍光強度を全自動で簡単に解析できます。
- ✓ 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、EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>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