

- cellular imaging system to apply to regenerative medicine, SPIE Proceedings 7566: p.---, 2010.01
- 2) 石原美弥, 菊地眞, ハイパースペクトルセンサを用いた細胞イメージング, 第 48 回日本生体医工学会大会, 東京, 2009.04.23 – 2009.04.25, 生体医工学第 47 (特別) : p.259, 2009.04
- 3) 石原美弥, 菊地眞, ハイパースペクトルセンサを用いた細胞イメージング, 第 48 回日本生体医工学会大会 プログラム・論文集 (CD-ROM) : p.24, pmP5-2-17-24pmP5-2-17, 2009.04
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムの性能を評価するための研究

基準サンプルの作製 I：細胞周期の同調

研究協力者 谷川 待子 防衛医科大学校 医用工学講座 研究員
研究分担者 石原 美弥 防衛医科大学校 医用工学講座 準教授

研究要旨：本研究では、開発しているハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムの対象サンプルに関して実施した。

対象サンプルに関する実験は構築中のハイパースペクトル顕微鏡で獲得したスペクトルが、細胞の状態（細胞の周期）によらない、すなわち細胞シート固有のスペクトルを得るためには、周期を同調させた細胞群が必要となる。そこで、細胞周期の基本的な考えにそって、培養細胞の細胞周期を同調させた。今回は、G0 期と S 期について実施した。また、最終的な評価には FACS を用いた。その結果、細胞周期に同調した培養細胞が得られた。

A. 研究目的

通常、いろいろな状態の細胞が混在している細胞集団の中からハイパースペクトルセンサで目的の細胞を検出するためには、まず細胞周期を揃えたデータを取得する必要がある。

細胞が分裂を繰り返すためには DNA 複製と染色体分配を繰り返す必要があり、その過程は大きく分けて細胞分裂期の M 期と分裂間期に分けられる。分裂間期は、さらに細胞分裂を終了してから DNA 合成が始まる間の G1 期と DNA 合成期の S 期、DNA 合成を

終了してから細胞分裂を開始するまでの間の G2 期に分けられる。つまり、細胞増殖している細胞は、M, G1, S, G2 期を繰り返し増殖しており、このことを細胞周期という。また、正常な体細胞の多くは増殖できる能力を持ちながら増殖停止しているが、これは細胞周期の途中で停止しているわけではなく、細胞周期からはずれた状態で停止している。この状態を G0 期と呼ぶ。

まず、細胞の状態を均一化するために NIH/3T3 (Embryo, mouse) で細胞周期を揃えることを試みた。

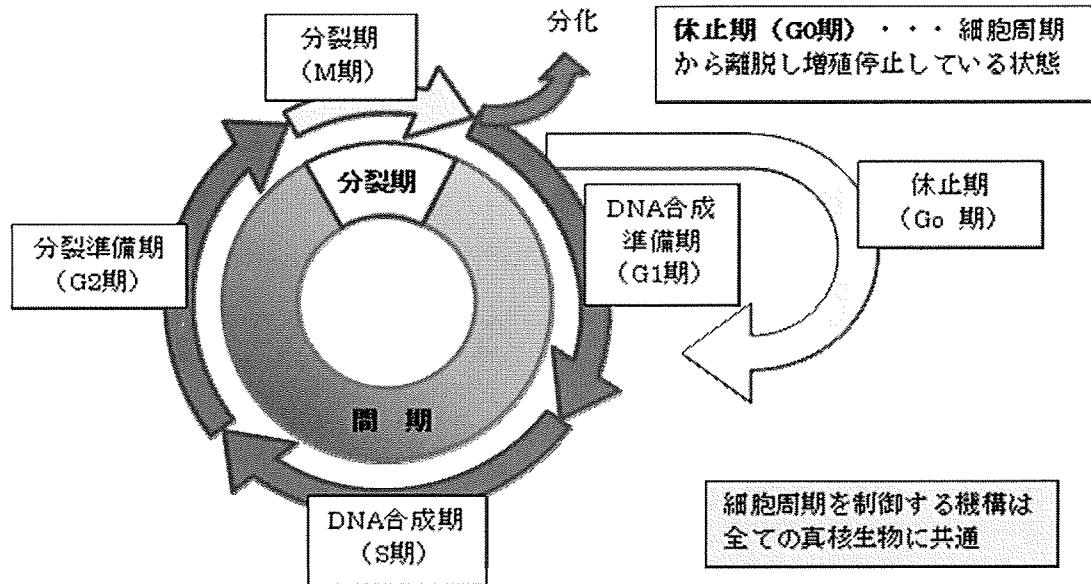


図1 細胞周期

A-1. 原理

A-1-1. G0期

細胞は増殖するためには増殖因子などの栄養素が必要であるが、それらが不足すると細胞増殖停止を引き起こすことが知られている。細胞増殖に必要な増殖因子は細胞によって異なるが、一般的に用いられているものは血清である。そこで血清飢餓にすることで細胞増殖を停止する。そうすると細胞周期を逸脱したG0期に同調される。

A-1-2. S期

ヒドロキシウレアはリボヌクレオチドレ

ダクターゼ阻害剤で、細胞内 dNTP 含量を急激に低下させ DNA 合成を阻害し細胞増殖を抑制する。ヒドロキシウレア存在下で細胞を培養することにより S 期直前に同調させる。

B. 研究方法

B-1. G0期

NIH/3T3 をサブコンフルエントになるまで培養し血清飢餓培地に置換した。血清飢餓培地で数日間培養後エタノール固定し、FACS (Fluorescence activated cell sorting) を用いて細胞周期の解析を行った。

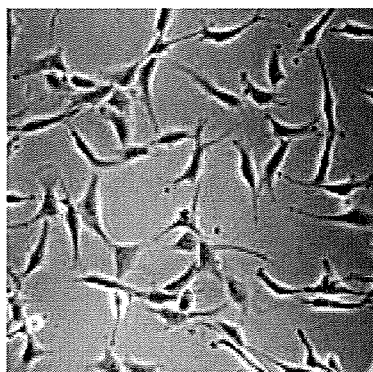


図2 NIH/3T3 (DS ファーマバイオメディカル株式会社より引用)

表1 サンプル

サンプルNo.	血清濃度 (%)	飢餓期間 (日間)
① (コントロール)	10	3
②	0	3
③	0.5	3
④	1	3
⑤	3	3
⑥	0.5	2
⑦	0.5	3
⑧	0.5	4
⑨	0.5	5

サンプルはPI (Propidium iodide) 染色し FACS を用いて DNA 量解析を行った。PI は死細胞の核酸と融合して蛍光を発するため、裸核法やエタノール固定法を用いて染色する必要がある。裸核法はサンプル回収後 TritonX-100 で処理し PI 染色する。染色後、直ちに FACS で測定しないとサンプルが

悪化してしまう。それに比べてエタノール固定は、固定後-20°Cで長期保存可能なので複数のサンプルが揃ってから FACS で測定できるという利点がある。

そこで、今回は以下に示すエタノール固定法を用いた。

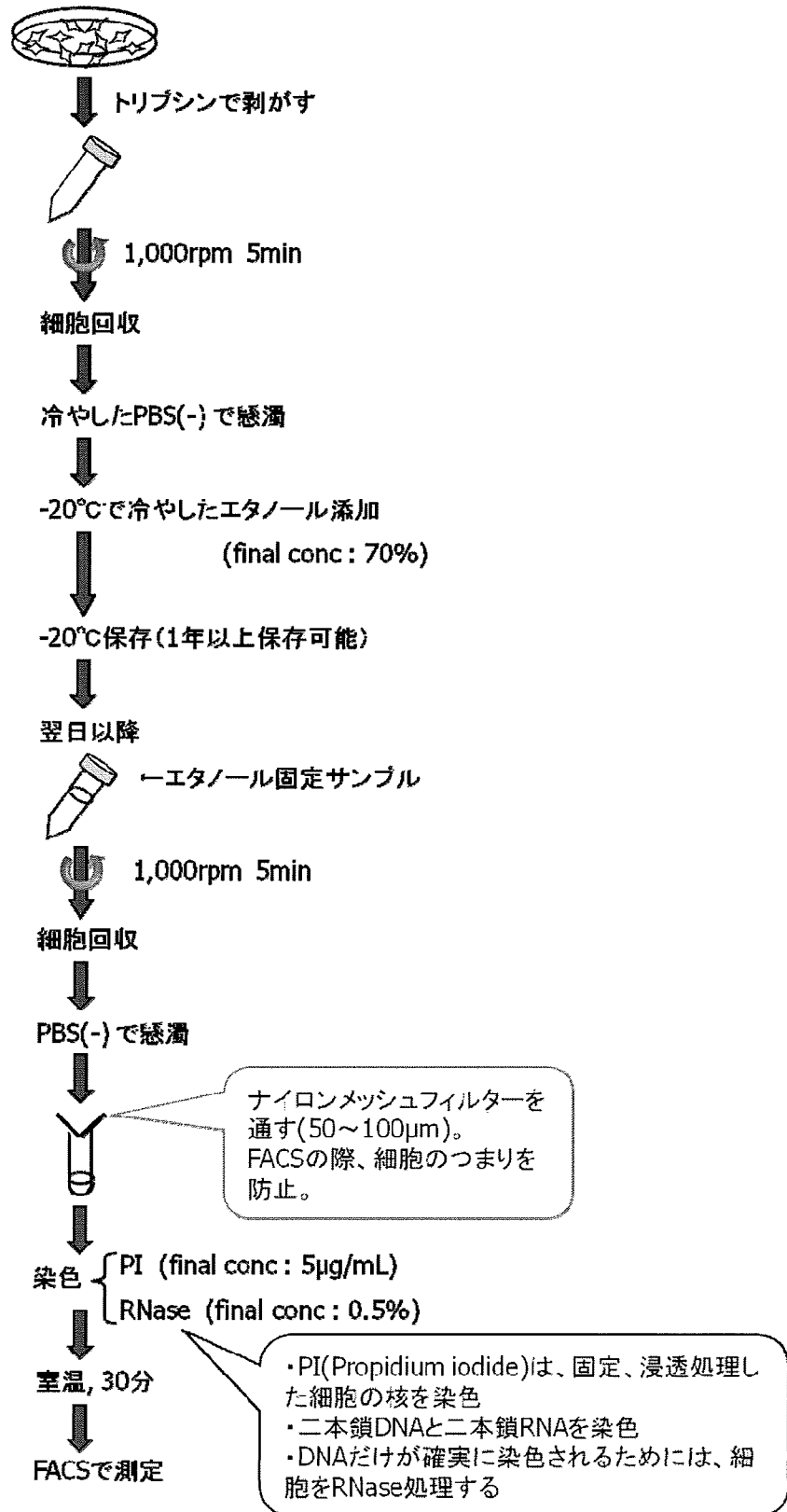


図3 エタノール固定方法

FACS は、蛍光物質、蛍光抗体により染色された細胞の浮遊液を高精度に制御された水流として流し、側面よりレーザー励起光を照射することにより蛍光を発光させ、細胞の情報を記録集積する装置である。最大の特徴は①各種の細胞からの情報をすべて電気信号として記録すること、②蛍光波長の違いなどによりいくつかの情報を同時に

測定できるためそれらを組合わせて解析できることである。サンプルの調製さえうまくできれば精度、再現性に優れたきわめて客観性の高い解析を行うことができる。

今回は、CELLQuest, ModFIT などの解析ソフトを用いれば各々の細胞周期の割合が解析できる FACS Calibur (BD 社) で行った。

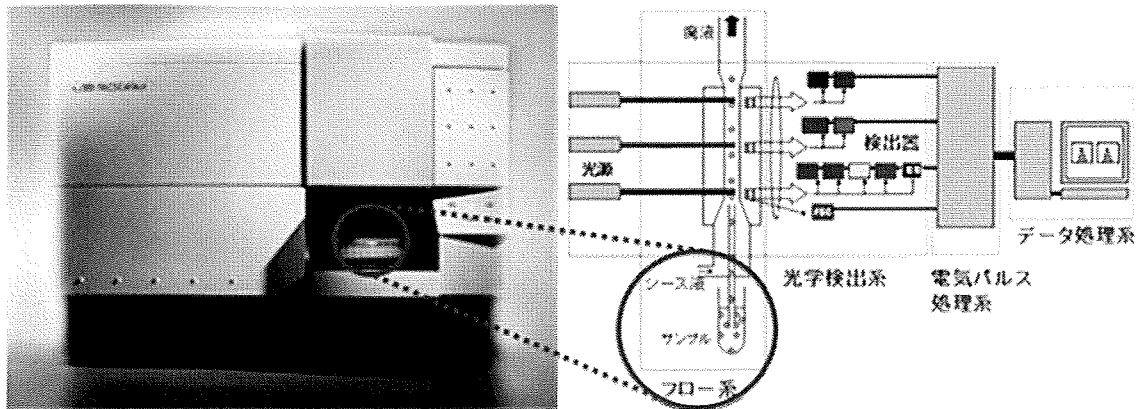


図4 FACS Calibur (BD社)

B-2. S期

培養条件：血清濃度 0.5%、血清飢餓期間 3 日間で G0 期に同調させた。

飢餓後、通常培地に置換し培養した。5 時間後、ヒドロキシウレアを 1mM となるように添加した。19 時間後、ヒドロキシウ

レアを除去し通常培地で培養した。5.5 時間後、G0 期同調法と同様にエタノール固定をし FACS を用いて細胞周期の解析を行った。

表2 サンプル

サンプルNo.	条件
①	コントロール
⑪	G0 期同調
⑫	ヒドロキシウレア除去
⑬	ヒドロキシウレア除去し通常培地で 5.5 時間培養

C. 結果

C-1. G0期

細胞の様子

条件を変化させた細胞の顕微鏡写真を以下に示す。

顕微鏡：Nikon ECLIPSE Ti

レンズ：位相差 10x

光源：ハロゲンランプ

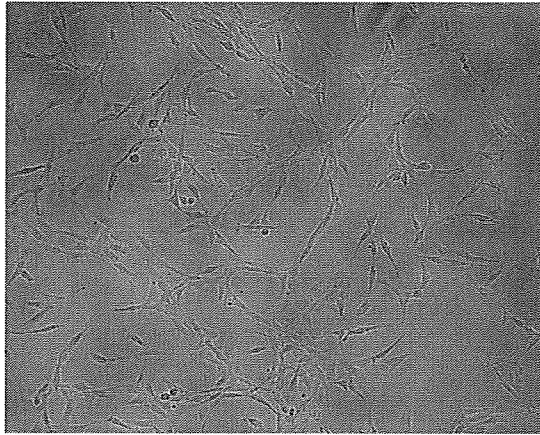


図5 通常の状態

サンプルNo. ①（コントロール）血清濃度 10% 飢餓期間 3日

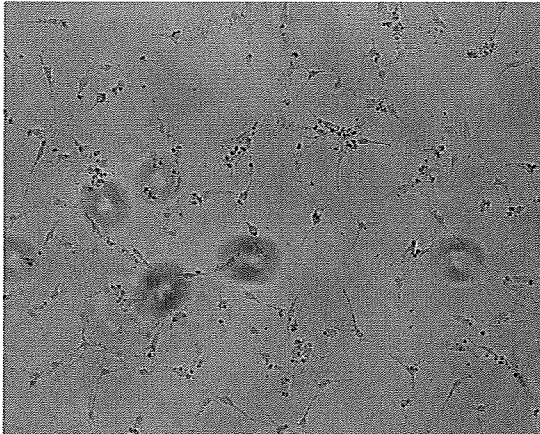


図6 大部分が弱って死に至った

サンプルNo. ② 血清濃度 0% 飢餓期間 3日

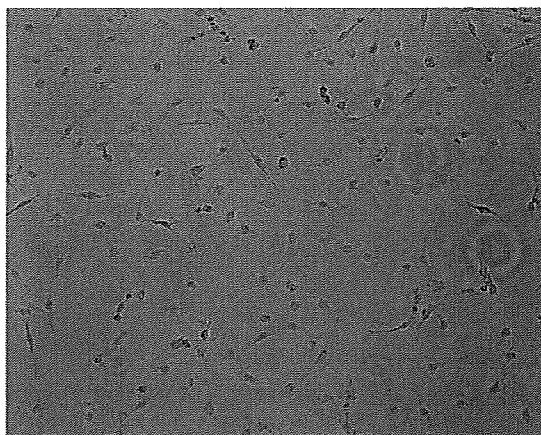


図7 血清濃度 0%ほど弱っていない
サンプル No. ③ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 3 日

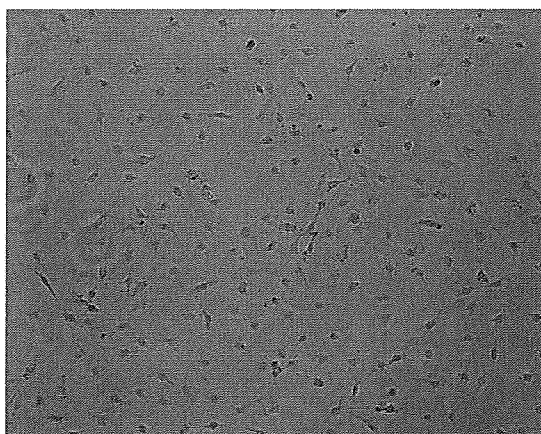


図8 血清濃度 0.5%より細胞が増えている
サンプル No. ④ 血清濃度 1% 飢餓期間 3 日

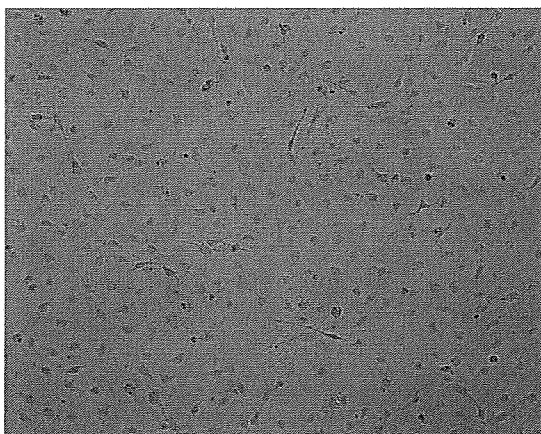


図9 血清濃度 1.0%より細胞が増えている
サンプル No. ⑤ 血清濃度 3% 飢餓期間 3 日

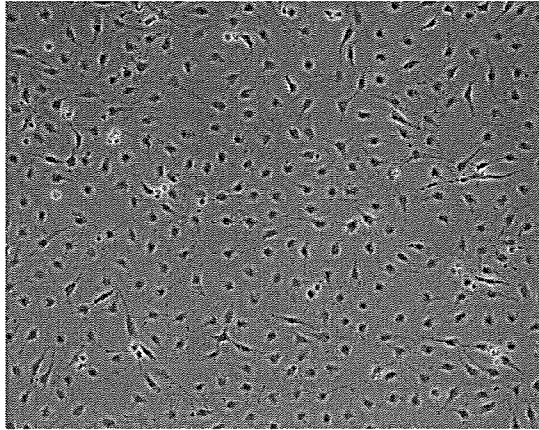


図10 分裂中のような球状の細胞が少し見られた
サンプルNo. ⑥ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 2日

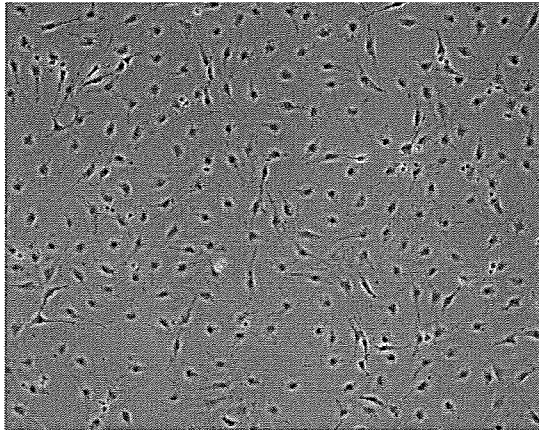


図11 球状の細胞はほとんど見られない
サンプルNo. ⑦ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 3日

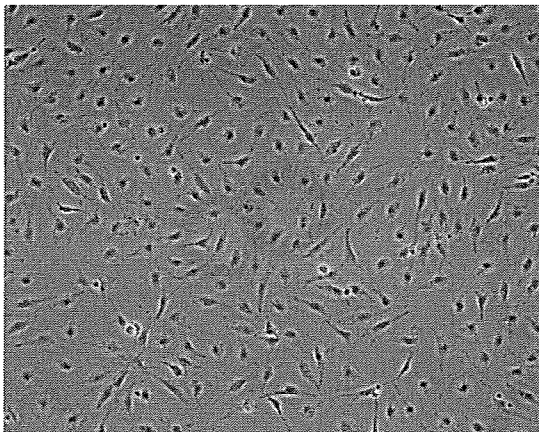


図12 飢餓期間 3日間同様
サンプルNo. ⑧ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 4日

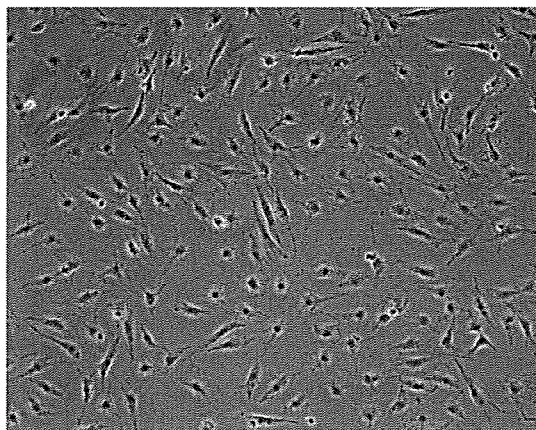


図13 飢餓期間4日間同様

サンプルNo. ⑨ 血清濃度0.5% 飢餓期間5日

C-2. S期

細胞の様子

条件を変化させた細胞の顕微鏡写真を以下に示す。

顕微鏡：Nikon ECLIPSE Ti

レンズ：位相差 10x

光源：ハロゲンランプ

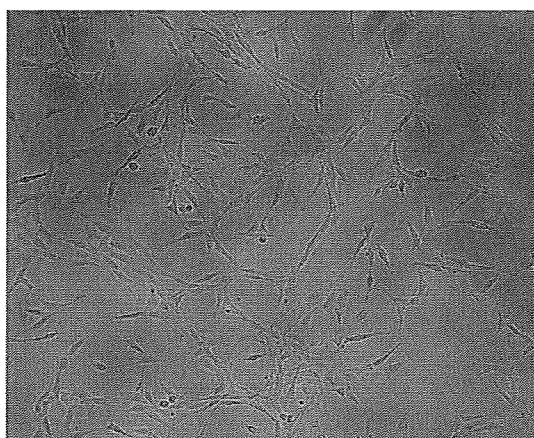


図14 サンプルNo. ①（コントロール）血清濃度10% 飢餓期間3日
（図5を比較のため再表示）

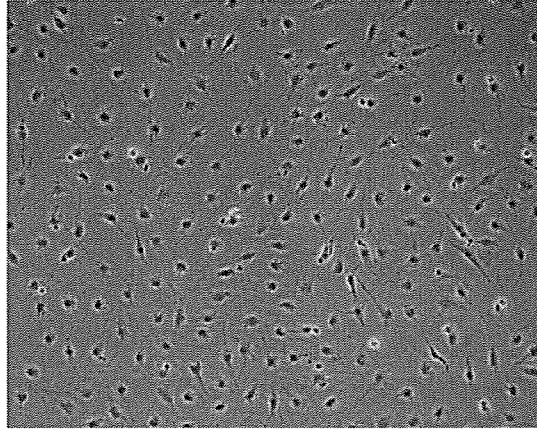


図15 サンプルNo. ⑪ G0期同調

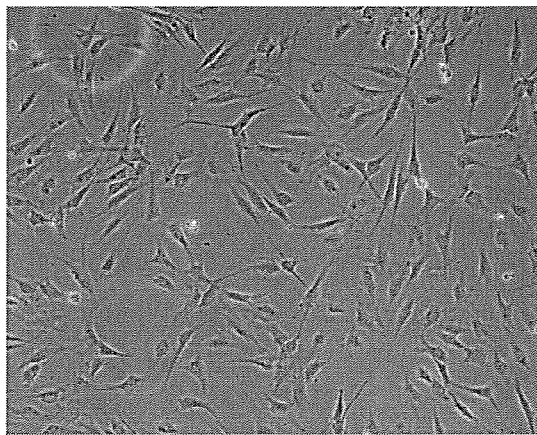


図16 サンプルNo. ⑫ ヒドロキシウレア除去

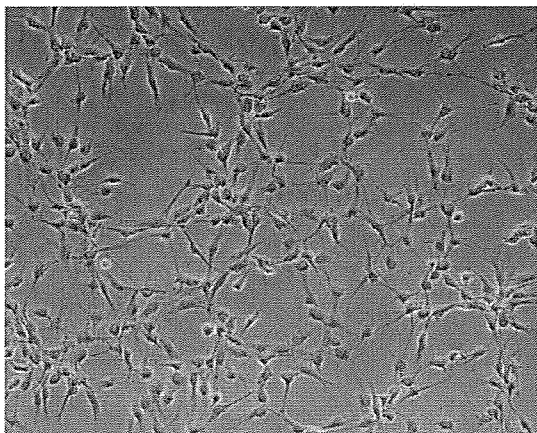


図17 サンプルNo. ⑬ ヒドロキシウレア除去し通常培養地で5.5時間培養

以下に FACS 解析の結果を示す。

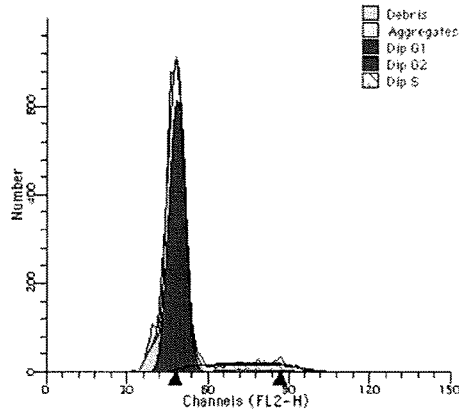


図 1 8 サンプル No. ① (コントロール) 血清濃度 10% 飢餓期間 3 日

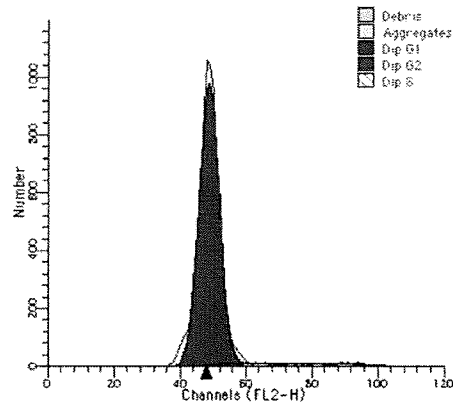


図 1 9 サンプル No. ① G0 期同調

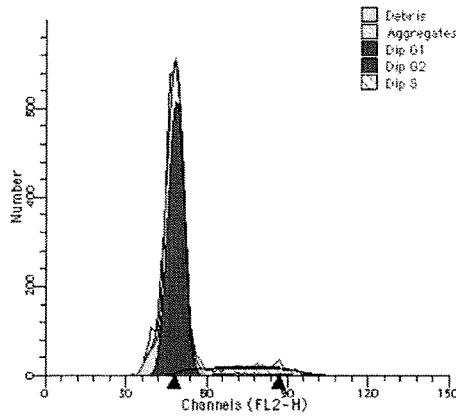


図 2 0 サンプル No. ② ヒドロキシウレア除去

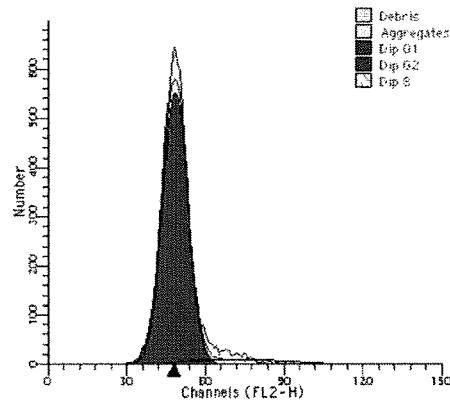


図 2 1 サンプル No. ⑬ ヒドロキシウレア除去し通常培養地で 5.5 時間培養

表 3 解析結果より S 期の細胞の割合を示す。

サンプル No.	⑩	⑪	⑫	⑬
S 期の割合 (%)	14.36	5.71	1.32	5.94

D. 考察

D-1. G0 期

細胞は細胞周期により DNA 量が異なり、PI のような蛍光核酸色素を用いて細胞の全 DNA を染色すると、FACS を用いた DNA 量解析により図 2 2 に示すような特徴的な DNA 相対量を示す。これらヒストグラムは、細

胞周期の G0/G1 期、S 期および G2/M 期にある細胞を表す領域に分けることができる。G0/G1 期の細胞は定量（1 倍）の DNA、S 期の細胞は 1~2 倍量の DNA、G2/M 期の細胞では 2 倍量の DNA を含んでいる。このことからそれぞれの細胞の割合を測定することができる。

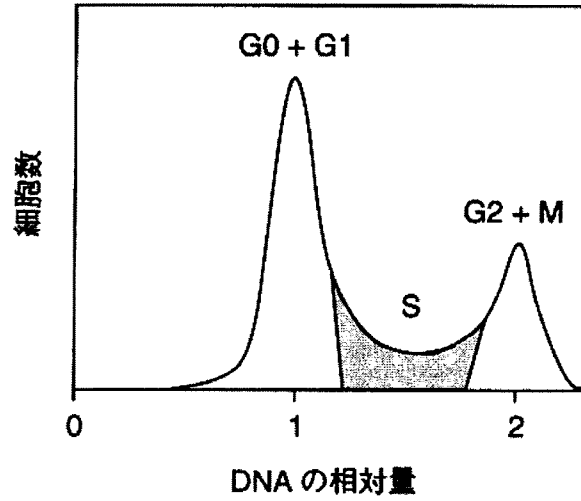


図 2 2 細胞周期を通じて DNA 量が増加（「細胞周期の分子生物学」MEDSi より引用）

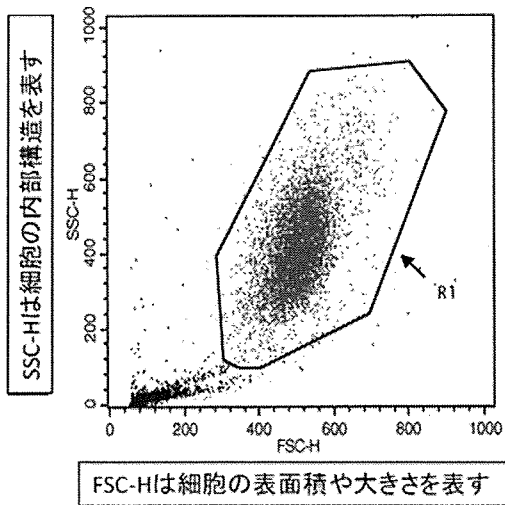


図 2 3-1 a

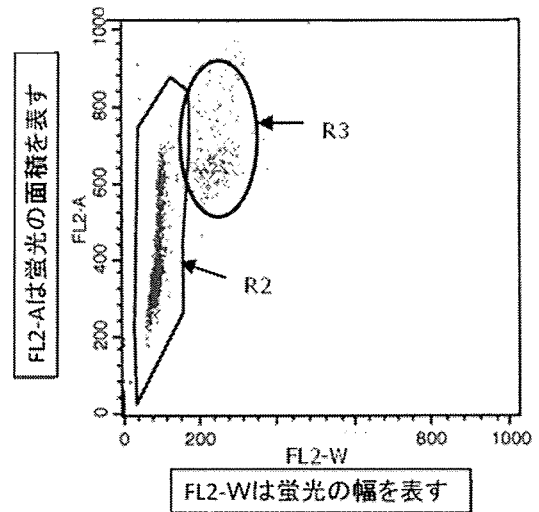


図 2 3-1 b

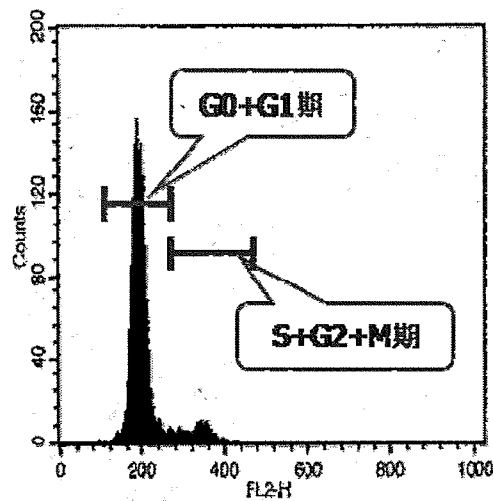


図 2 3-2 FACS を用いた細胞周期解析 (R1 & R2 ゲートをヒストグラム解析)

- ◆ 細胞周期解析においては、G0, G1 期のダブルットと G2, M 期との区別がポイント
- ◆ R3 ゲート内の細胞の核は、R2 ゲート内の細胞の核より蛍光強度が倍あるため幅が倍近くある。これは R2 がシングルットで、R3 がダブルットを意味する。
- ※ ゲートとは Dot Plot 内の黒枠で囲まれた範囲

同様に①（コントロール）および②～⑤（飢餓培養期間一定）を行った。
以下に解析結果を示す。

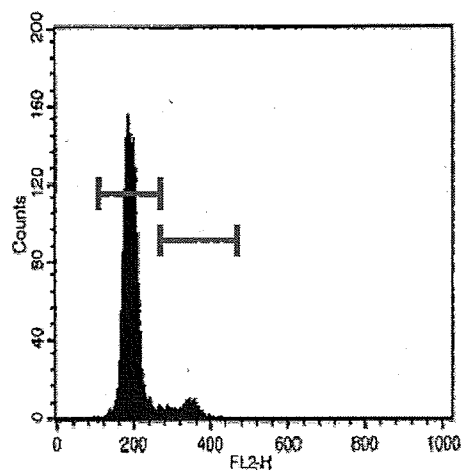


図 2 4 サンプル No. ①（コントロール）血清濃度 10% 飢餓期間 3 日

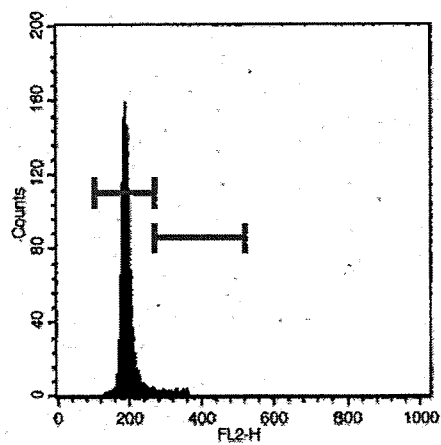


図 2 5 サンプル No. ② 血清濃度 0. % 飢餓期間 3 日

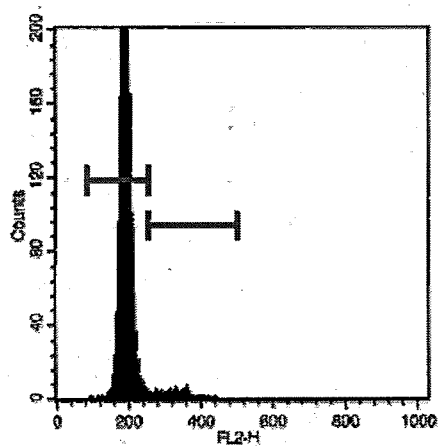


図 2 6 サンプル No. ③ 血清濃度 0. 5% 飢餓期間 3 日

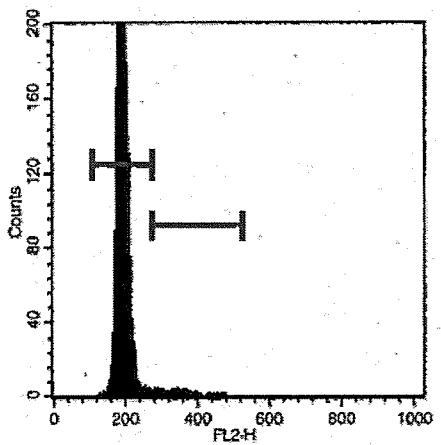


図 2 7 サンプル No. ④ 血清濃度 1% 飢餓期間 3 日

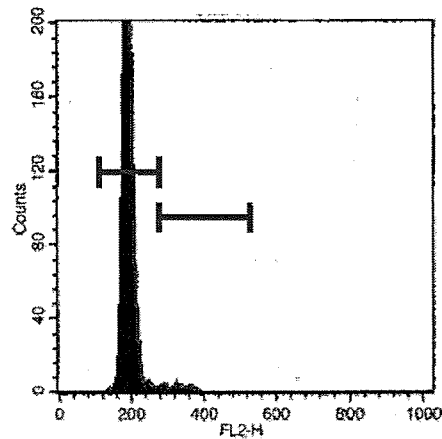


図28 サンプルNo. ⑤ 血清濃度 3% 飢餓期間 3日

表4 解析結果より各々の周期の細胞の割合を表にした。

	①NIH3T3 通常培養 (n=3)	②NIH3T3 0%血清 (n=3)	③NIH3T3 0.5%血清 (n=3)	④NIH3T3 1.0%血清 (n=3)	⑤NIH3T3 3.0%血清 (n=3)
G0+G1 期 (%)	90.26	95.92	97.46	97.74	97.43
S+G2+M 期 (%)	9.16	3.81	2.37	2.10	2.40

次に⑥～⑨（血清濃度一定）も同様に行った。
以下に解析結果を示す。

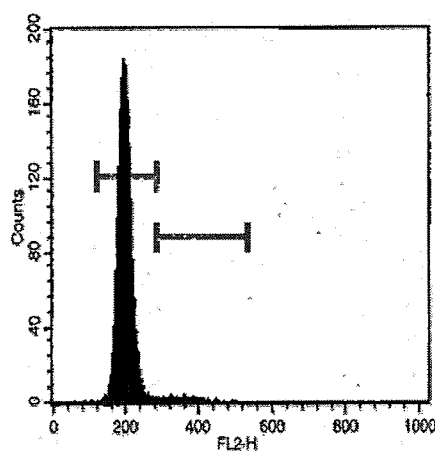


図29 サンプルNo. ⑥ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 2日

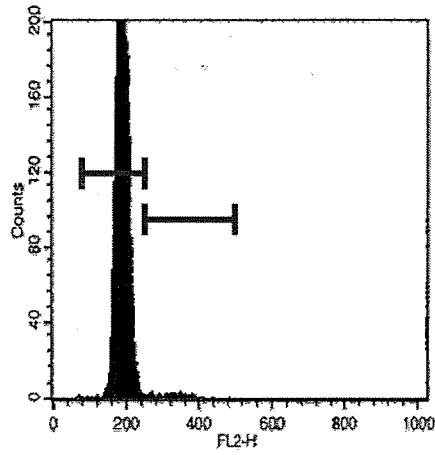


図30 サンプルNo. ⑦ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 3日

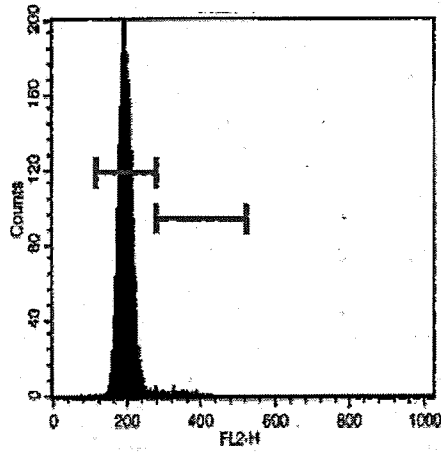


図31 サンプルNo. ⑧ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 4日

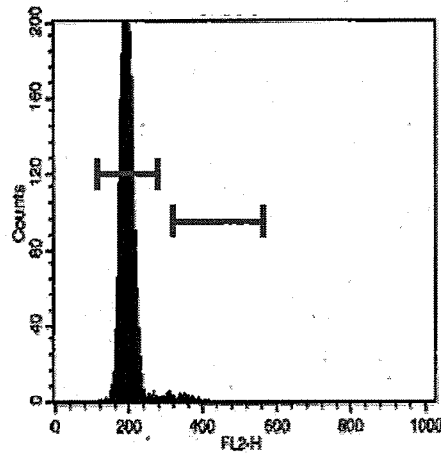


図32 サンプルNo. ⑨ 血清濃度 0.5% 飢餓期間 5日

表5 解析結果より各々の周期の細胞の割合を表にした。

	①NIH3T3 通常培養 (n=3)	⑥NIH3T3 2日間培養 (n=3)	⑦NIH3T3 3日間培養 (n=3)	⑧NIH3T3 4日間培養 (n=3)	⑨NIH3T3 5日間培養 (n=3)
G0+G1 期 (%)	90.26	96.92	97.43	97.35	97.23
S+G2+M 期 (%)	9.16	2.91	2.50	2.43	2.55

血清飢餓期間3日間において血清濃度をふると、顕微鏡観察下では血清濃度0%の細胞が弱っていた。0.5%, 1.0%, 3.0%においては、血清濃度が濃くなるに従い細胞が増殖していた。またFACSを用いたDNA量解析によるとG0+G1期の割合は、通常培養においては90%程度なのに対し血清濃度0.5%, 1.0%, 3.0%においては97%とより高くなって安定している。

次に血清濃度0.5%で血清飢餓日数をふると、顕微鏡観察下では血清飢餓日数2日間で分裂途中のような球状の細胞が少し見られたが3日間以降はほとんど見られなかった。またFACSを用いたDNA量解析によるとG0+G1期の割合は、血清飢餓期間3日間、4日間、5日間においては97%と通常培養と比較してもより高くなっている。

D-2. S期

S期に同調させる過程で顕微鏡観察を行ったが、細胞の様子が各ポイントで異なった。FACSを用いたDNA量解析では、S期の割合はヒドロキシウレア除去後が一番少ないことがわかる。これはヒドロキシウレアによるS期同調法は、S期直前に同調されるからである。図22からもわかるように

S期直前のDNA量はG0, G1期と同じである。その後、ヒドロキシウレアを除去し通常培養5.5時間するとS期の割合が増えた。さらに培養時間を長くするとS期の割合がさらに高くなると判断した。

E. 結論

E-1. G0期

このことよりG0期同調の条件は、血清濃度0.5%で血清飢餓期間3日間が適正であると判断した。

E-2. S期

構築中のハイパースペクトル顕微鏡で獲得したスペクトルが、細胞の状態（細胞の周期）によらない、すなわち細胞固有のスペクトル、細胞内小器官固有のスペクトルを得るためには、周期を同調させた細胞群が必要となる。今回は、G0期、S期に同調する手段を検証した。これにより、細胞周期によらない細胞シート特有のスペクトル情報を獲得する手段を確保した。一方で、検証過程でいくつかの課題が挙げられた。これについては、次年度以降にも引き続き検討する。

IV. 研究成果の刊行（平成21年度）
に関する一覧表