

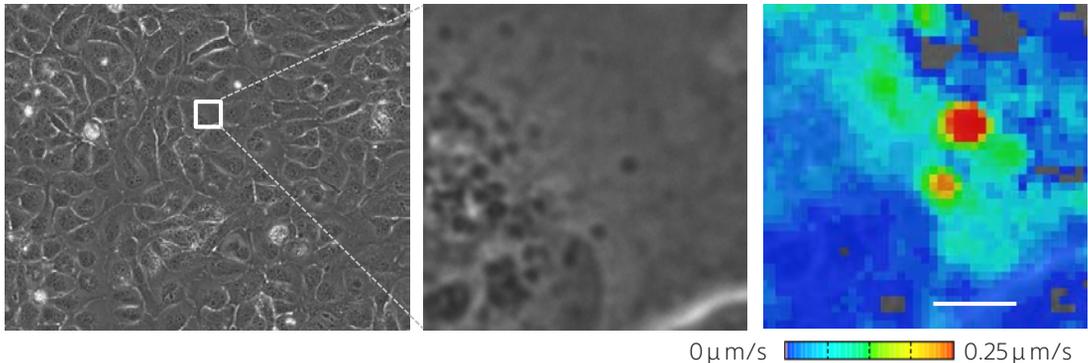
動画を撮るだけで細胞のviabilityが分かる新たな手法の提案

背景

細胞治療や再生医療などの分野を中心に、細胞の状態をモニターする技術の需要が高まっている。これは単に生細胞と死細胞の割合を判定することだけではなく、cell viability(細胞の活性度)やcell health(細胞の健康状態)と呼ばれるような、多くの複雑な細胞機能の総合的な評価が求められており、それらは細胞のメンテナンスや品質管理に利用することが想定されている。従来は、例えば細胞内酵素によるテトラゾリウム塩の変換反応利用する手法や、細胞から溶出したATPを酵素反応に使用することで発光物質を生じさせ、それらをマイクロプレートリーダー等で検出する手法などが利用されてきた。

しかしこれらの方法は、マルチタイタープレートのウェル内で起こる一定数の細胞集団の平均値を見ることになるため、cell viabilityやcell healthをシングルセルレベルで見ることができない。一方でフローサイトメーターなどのハイスループットな細胞分析装置を用いて、細胞の生死判定をシングルセルレベルで実施することが可能である。一般的に行われている細胞の生死判定では、DNA結合性の色素による細胞核の染色性や、細胞膜非透過性の色素の細胞内流入と蓄積を指標とした評価方法が利用されている。しかし最近では創薬スクリーニングの分野においてはスフェロイドやオルガノイド、再生医療の分野では分化誘導後のiPSCなどといったヘテロな細胞集団を使用することが多くなっており、細胞内への色素の蓄積や流入が細胞毎に異なる可能性のある集団に対しては、これらの手法は不向きであると言える。またこれらは、一定時間細胞を化学物質に晒した後に回収し染色を行うエンドポイントでの評価である。特定の細胞の経時変化を追うことは困難であり、より詳細な細胞評価を必要とする最近の新たなニーズに対応できない。また、そもそも細胞を染色することや接着細胞を酵素にて基材から引き剥がすことを必要とするこれらの手法は、多かれ少なかれ細胞が本来の状態を失う可能性のある、侵襲的な手法であると言える。ライブセルイメージングシステムSI8000の新たなアプリケーションとして、ここに紹介するイメージングベースの細胞評価手法は接着細胞を基材から引き剥がすことなく非染色の細胞で継続的にcell viabilityやcell healthの観点から細胞評価を実施したいという多くの研究者に、全く新しい手段を提供することになる。

A



B

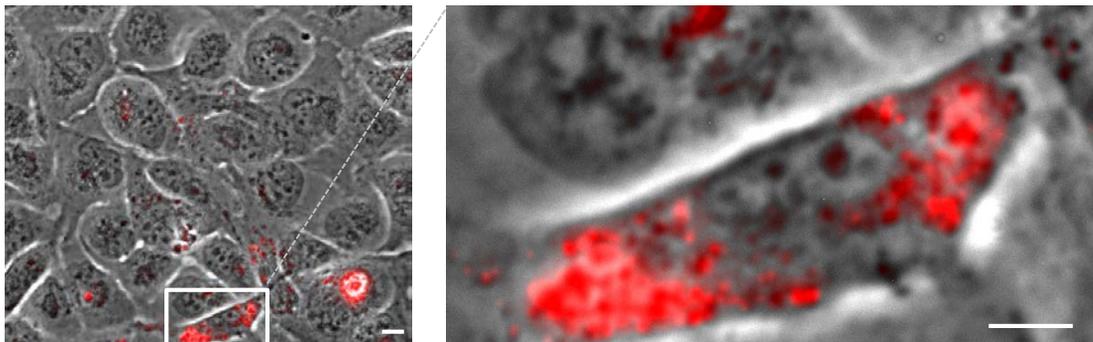


Figure 1. Motion Vector Analysis (MVA)による細胞内顆粒の動き解析

A. 左・中央図はU2OS細胞の位相差画像と、右図は同領域の1秒間の平均動き速度のカラーマップ表示。左図は20x対物レンズ、2050 x 2448 pixelの解像度、5fpsで50frameの画像を取得し、MVAによる解析を行った。

B. U2OS細胞の位相差画像とLysoTrackerによる蛍光画像の重ね合わせ画像。細胞内で活発に動く比較的大型の顆粒と、LysoTrackerによって染色されるリソソームなどの酸性の細胞小器官が共局在していた。スケールバー：10 μm。

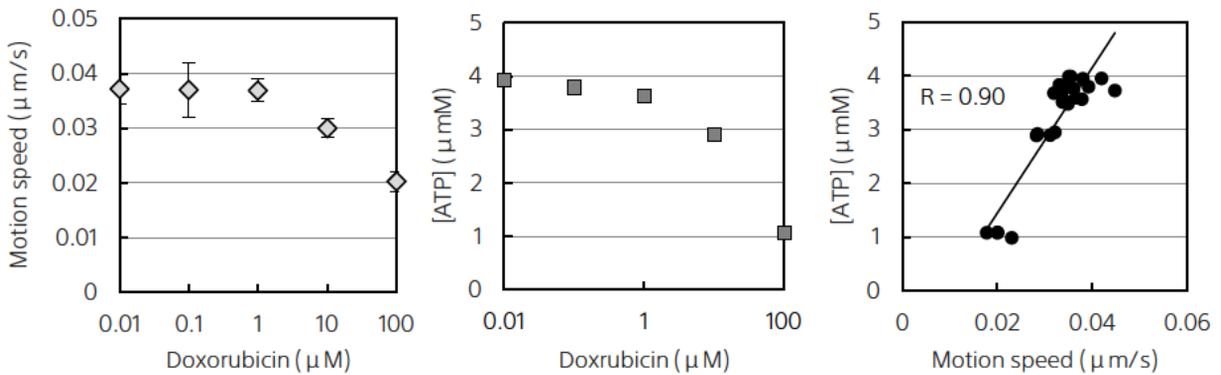
方法

- ・動画撮影：ライブセルイメージングシステムSI8000 (Research Model)を使用して20×対物レンズにて位相差観察を行い、フレームレート5 fpsにて10秒間(合計50フレーム)の動画を撮影し解析を行った。また、解像度は2448×2050ピクセル、ビット深度は8 bitに設定した。
- ・Motion vector analysis (MVA法)：2448×2050ピクセル画像を16×16ピクセルのブロックに分割、前後のフレームの各ブロックを比較・照合(ブロックマッチング)を行い、4×4ピクセル毎の動きのベクトル(Motion Vector)を計算する。5フレーム毎に全体(あるいは特定のROI)のベクター長の平均値を算出、最終的に50フレーム分の平均速度を計算した。
- ・細胞株：今回の評価では3種のがん細胞由来の接着性細胞株を用いた。U2OS cells (human osteosarcoma;骨肉腫)、Caco-2 cells (human colon carcinoma;結腸がん)、HepG2 (human hepatoma;肝細胞がん)。

結果

「MVA法による細胞内の動き速度解析という新しい手法(Fig.1より)」
U2OS細胞を20倍の対物レンズにて、位相差観察を行い、ライブセルイメージングシステムSI8000 (Research Model)の高解像カメラにて10秒間の動画を撮影した。動画解析は、各フレームの画像をブロックマッチングと呼ばれるアルゴリズムによって比較し、前後のフレームで対象となるブロックがどこに移動しているかを判定、その動きを速度ベクトル(Motion vector)として単位ピクセル毎に算出する方法で実施した(MVA法)。
Fig.1Aの明視野観察像は、取得した画像の全体像と、その一部をデジタルズームした画像である。この時、核の近傍で活発に動いている比較的大型の顆粒が観察された。また、同画像の50フレーム(10秒間)の速度ベクトルの平均値をカラーマップ表示したところ、顆粒付近で平均速度が高いことを示す赤色が表示された。

A



B

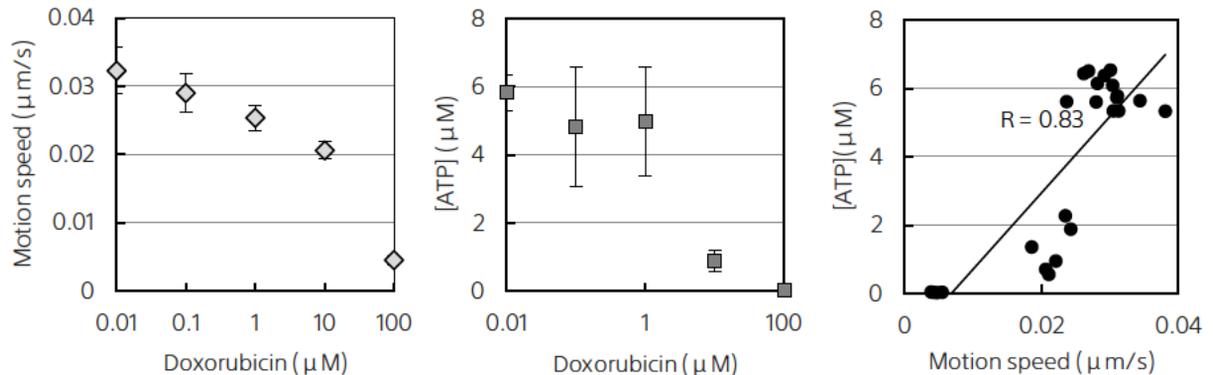


Figure 2. Doxorubicinによる細胞内顆粒の動き速度とATP濃度への影響
Caco-2細胞(A)とHepG2細胞(B)に、抗がん剤Doxorubicinを添加後20時間後に細胞内顆粒の動き速度を測定、その1時間後に細胞を回収し細胞内ATP濃度を測定した。実験はそれぞれ4回行いmean±SDを表示している。
両細胞においてDoxorubicin添加量依存的な顆粒の動き速度とATP濃度の低下が確認され、それらの間には強い相関があった。尚、U2OS細胞に関しては典拠論文参照のこと。

「非染色で細胞のviabilityが評価できる(Fig.2より)」

次に、種々のがん細胞株に対する抗がん剤の影響を、MVA法にて評価可能かどうか検討した。Caco-2細胞、HepG2細胞に抗がん剤であるDoxorubicinを処理し、20時間後の細胞内の動きをMVA法にて解析した結果、Doxorubicinの濃度依存的に細胞内の動きの平均速度が低下することが分かった(Fig.2 A, B左側グラフ)。

また、MVA法による評価と従来のViability評価法を比較するため、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega)によるATP量の定量を行った(Fig.2 A, B中央グラフ)。これらの解析方法の結果を比較したところ、MVA法による細胞内の動き速度とATP量との間には、高い相関があることが明らかとなった(Fig.2 A, B右側グラフ)。このことは、MVA法による細胞内の動き速度の解析というこの新しい手法を導入することにより、細胞のviability評価を非染色で実施可能であること強く示唆している。

「ATP合成阻害剤や解糖系の阻害剤も細胞内の動き速度を低下させる(Fig.3より)」

細胞のATP合成はミトコンドリアにおける呼吸の活性や、細胞質における解糖系の活性に依存している。細胞内顆粒の動きもこれらのエネルギー代謝活性に依存しているかどうかを検討するために、ミトコンドリアの脱共役剤であるCCCPや、ATP合成酵素の阻害剤であるoligomycin A、更に解糖系の阻害剤である2-Deoxy-D-glucose (2DG)などの薬剤の影響を調べた(Fig.3)。

その結果、CCCPの添加量依存的に細胞内顆粒の動き速度は低下し、またその程度は細胞内ATP濃度と高い相関があった(Fig.3A)。oligomycin Aによって直接的にATP合成酵素を阻害した場合も、細胞内顆粒の動き速度の低下が観察された(Fig.3B)。更に、2DGによって解糖系を阻害することでも細胞内顆粒の動き速度が低下することが分かった(Fig.3C)。

これらのことから、MVA法による細胞内顆粒の動き速度は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化でのATP合成や、細胞質での解糖系による糖代謝の活性といった、エネルギー代謝系の活性を複合的に評価できることが示唆された。

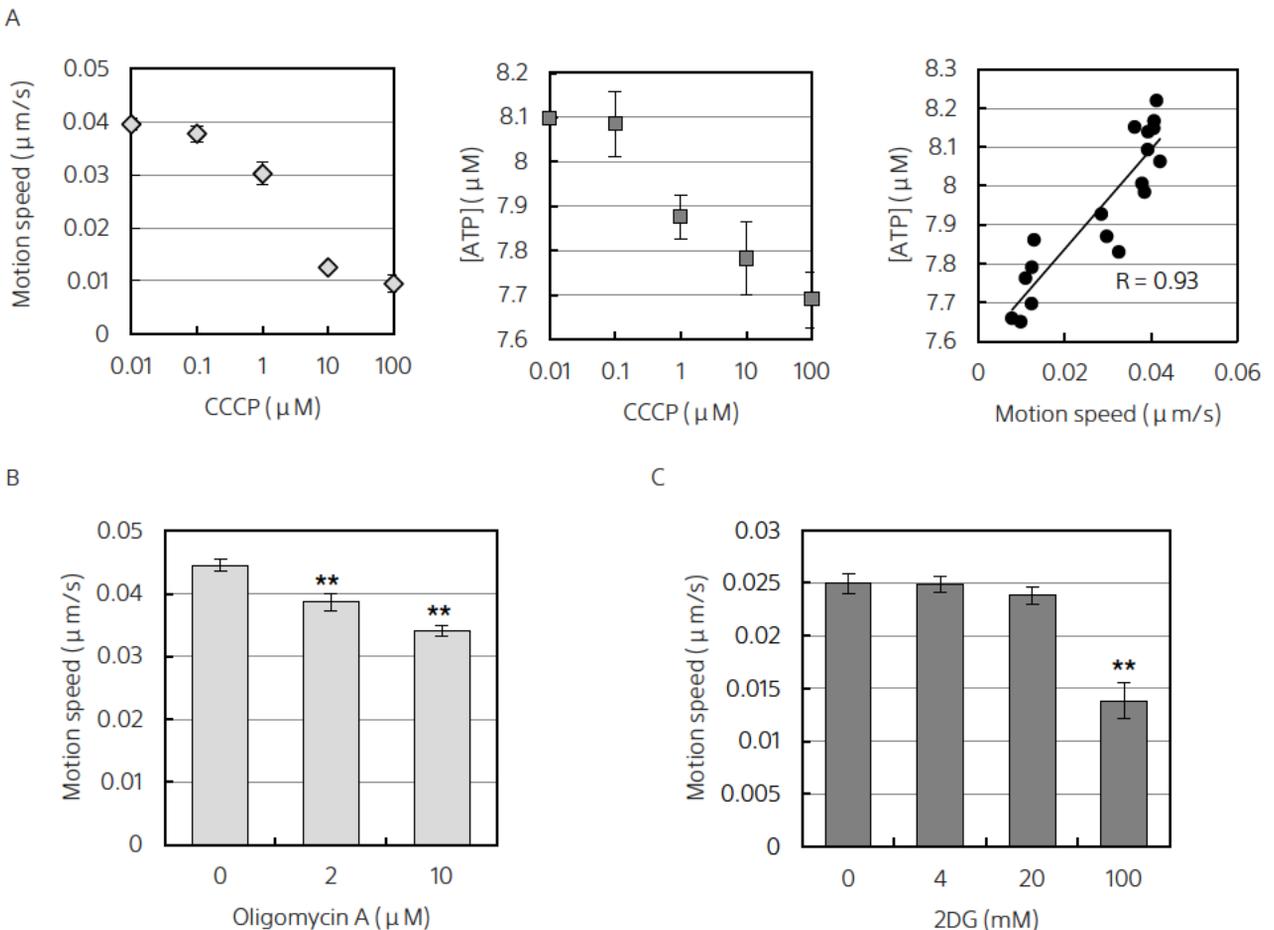


Figure 3. ATP合成阻害剤や解糖系の阻害剤の細胞内顆粒の動き速度への影響

A. U2OS細胞にCCCPを添加後、1時間後に細胞内顆粒の動き速度を測定、更にその1時間後に細胞を回収し細胞内ATP濃度を測定した。実験はそれぞれ3回行いmean±SDを表示している。

B. BではU2OS細胞にoligomycin Aを添加し1時間後に細胞内顆粒の動き速度を測定。

C. CではU2OS細胞に2DGを添加し2時間後に細胞内顆粒の動き速度を測定した。実験は独立に3回行いmean±SDを表示している。(**p<0.01)

「スフェロイドでの薬剤評価もできる(Fig.4より)」

近年、薬剤の効果や毒性を予測するための新たな*in vitro*のシステムとして、細胞株の3D培養を行ったスフェロイドなどを利用する試みが、多くの施設で実施されている。スフェロイドは細胞数や細胞密度を制御することが困難であり、不均一で大きな塊として薬剤のアッセイに使用されることになる。当然、評価対象である薬剤の培地中での濃度勾配に加え、染色試薬や各種アッセイ用の試薬の空間的な不均一性が重なることになる。このことがスフェロイドを利用した薬剤評価方法におけるバラツキの原因であり、評価系の構築を困難にしている原因であると考えられる。この点MVA法は、染色試薬を用いない評価方法であることに加え各細胞の反応の不均一性をそれぞれの細胞単位で評価できる。このことからライブセルイメージングシステムSI8000を使ったこの手法は、スフェロイドを用いる薬剤評価をより詳細に実施することが可能であると考えられる。U2OS細胞とHepG2細胞をそれぞれElplasia™ mirco-spece multiplate (Kuraray)にて培養してスフェロイドを形成し、Doxorubicin処理後に細胞内動き速度を測定、それぞれカラーマップにて表示した。その結果、薬剤の濃度や薬剤処理後の時間経過に伴って、細胞内動き速度が低下しており、また、単一スフェロイド内でも部位によって動き速度に差異があることが可視化された。また、薬剤添加後の各時間における動き速度の平均値や分散を評価したところ、薬剤の影響がスフェロイド間で大きな差異があること、全体の平均値としては細胞内動き速度が低下していることが示された(Fig.4 A, B)。これらのことからこの手法は、スフェロイドを用いた薬剤評価にも利用可能であり、各スフェロイド内での薬剤応答性の差異も検討可能であると考えられる。

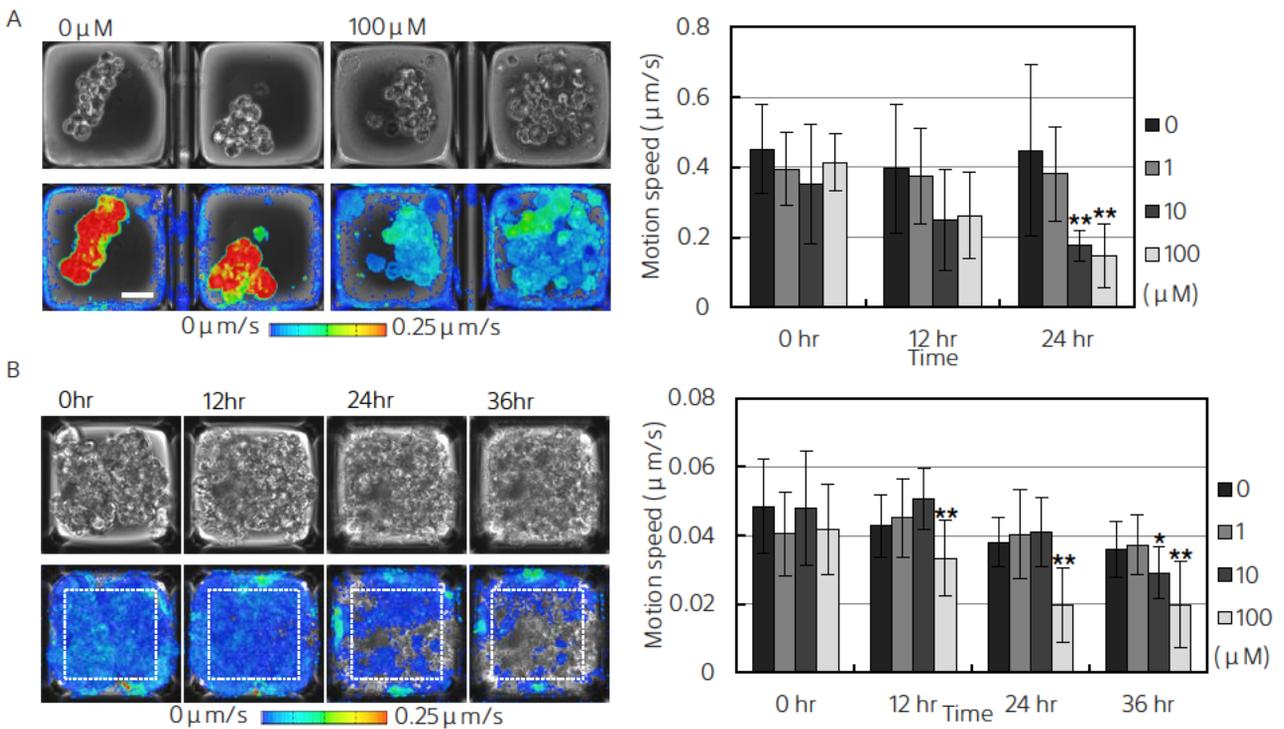


Figure4. スフェロイド培養での細胞毒性評価

A. スフェロイド培養したU2OS細胞に doxorubicin 添加後、24時間での細胞内の動き速度を解析し、カラーマップ表示した。(スケールバー：50 μm) また、添加後12時間、24時間後における細胞内動き速度の平均値を示した。それぞれの濃度において8~14個のスフェロイドを測定し mean±SD を示した。(**p<0.01)

B. スフェロイド培養したHepG2細胞に doxorubicin 添加後、各細胞内の動き速度を解析し、カラーマップ表示した。(スケールバー：50 μm) また、添加後各時間における細胞内動き速度の平均値を示した。それぞれの濃度において13~24個のスフェロイドを測定し mean±SD を示した。(*p<0.05, **p<0.01)

ライブセルイメージングシステムSI8000

鍛え抜かれた画像解析技術が生んだ先進のライブセルイメージングシステム

- ・最新の画像解析技術で細胞の動きを定量
- ・ラベルフリー・細胞本来の状態での評価が可能に
- ・形態解析やタイムラプス、蛍光画像を利用する解析も可能



参考文献

このアプリケーションノートは、Nakagawa K. *et al.*, *Niotechniques* 66 (3) : 128-133 March 2019の内容を抜粋し編集したものです。詳しくは原著論文をご参照ください。

発行元

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部
〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1
Tel: 0120-667-010
Fax: 0120-388-060
E-mail: cytometry@sony.com
URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

