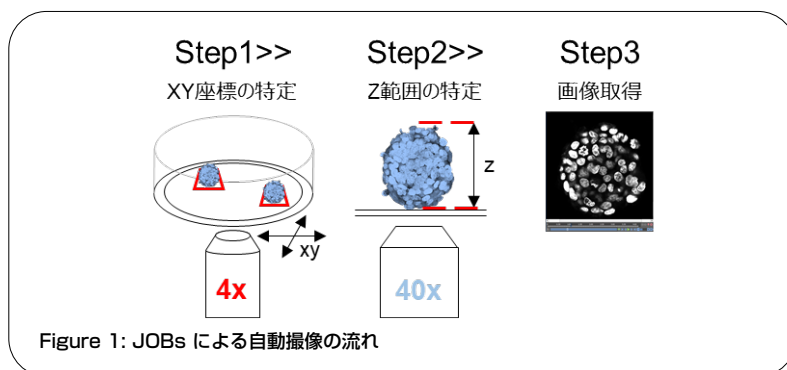


共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rによる スフェロイドの自動探索と薬効解析

従来、創薬開発において、細胞を用いた薬剤効果の評価や有効濃度の測定、作用機序の解析には二次元培養された単層の細胞が用いられてきた。しかし、これらの二次元細胞の使用には、生体とは異なる薬剤応答や抵抗性を示し、正確な評価が難しいという課題がある。一方、スフェロイドなどの細胞凝集体は、三次元構造を取ることでより生体に近い反応をすることが分かっている（文献1）。そのため、近年ではスフェロイドの薬理、毒性評価への利用が増加している。また、スフェロイドは、外層と内層などの形態や構造の差により、その性質や物理化学的な環境が異なるため（文献2）、薬剤効果を解析するには三次元構造内での位置関係の情報も重要である。従って、スフェロイドの顕微鏡による有効かつ効率的な解析には、鮮明な三次元画像の取得、多量のサンプルを撮影するための高いスループット、三次元画像解析が必要である。

共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rは、Zセクションングを持つ鮮明な三次元画像を取得可能である。また、画像統合ソフトウェアNIS-ElementsのJOBs機能を用いることでシームレスな撮影を、GA3機能を用いることで複雑な三次元定量解析までを実現できる。本アプリケーションノートでは、抗がん効果を持つことが知られているスタウロスポリンをスフェロイドへ添加し、その三次元画像の取得から解析までを実施した事例を紹介する。

キーワード: AX R, NIS-Elements, 3D analysis, spheroid, toxicity evaluation



材料と方法

50個のヒト結腸腺がん由来細胞株 (HT29) を丸底の96-well plateに播種し、3日間インキュベートすることでスフェロイドを形成した。形成したスフェロイドを平底の96-well plateに移し、スタウロスポリンを複数濃度条件で24時間曝露した。その後、核とアポトーシス細胞を染色して顕微鏡で撮影を行った。

撮影には、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを備えた倒立顕微鏡 Eclipse Ti2-Eを、顕微鏡の制御と解析にはNIS-Elements AR v5.42.00を使用した。撮影の効率化のため、NIS-ElementsのJOBs機能を用い、低倍 (4x) の対物レンズで各wellのスフェロイドのXY座標を特定した。その座標で撮影用 (40x) 対物レンズに切り替え、スフェロイド内の細胞核の蛍光シグナルが検出されるZ範囲を自動で特定した。これらのXY座標とZ範囲でスフェロイドの三次元画像を取得した。取得した画像を用い、NIS-ElementsのGA3機能でスフェロイド内の全細胞核オブジェクトの検出や蛍光強度の測定を行った。

結果

各wellで三次元スフェロイドの鮮明な細胞核画像が得られ、一つ一つの核をGA3で単離検出できた (Fig. 2)。

全細胞核 (赤) とアポトーシスが誘導された細胞 (緑) の蛍光画像を重ねた、スタウロスポリンの各濃度点で取得した画像 (Fig. 3) から、スタウロスポリン濃度の増加に伴うスフェロイド径の縮小や黄色で可視化されたアポトーシス細胞の増加が確認された。

また、GA3を用いた詳細な三次元定量解析により、0.25 μM 以上の濃度でアポトーシスが誘導される細胞が増加し、細胞密度も減少することが示された (Fig. 4 (A-C))。さらに、1 μM 以上の濃度では、アポトーシス細胞の割合が低下するとともに、細胞数の減少も見られた (Fig. 4 (D))。

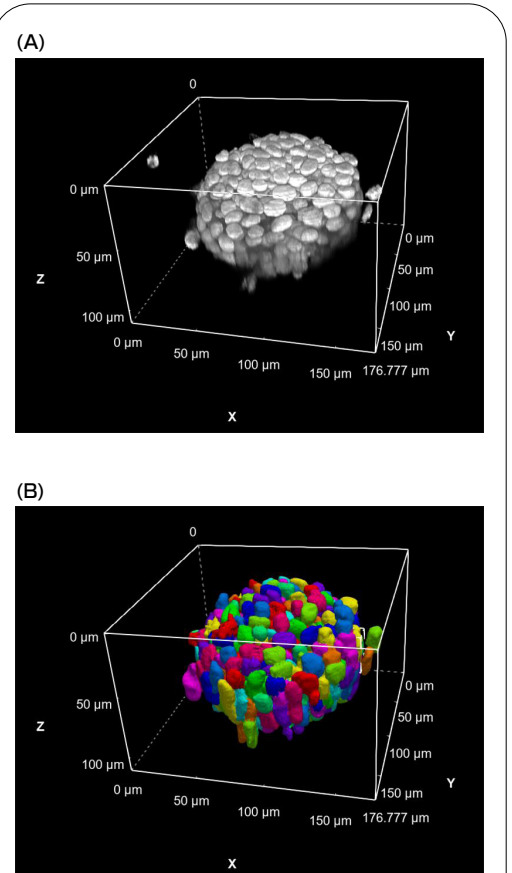


Figure 2: AX Rで取得したスフェロイドの細胞核画像
対物レンズはCFI Plan Apochromat Lambda 40XCを使用した。
(A) 三次元蛍光画像。
(B) NIS-ElementsのGA3機能を用いて検出した細胞核オブジェクト。

Staurosporine [μM]

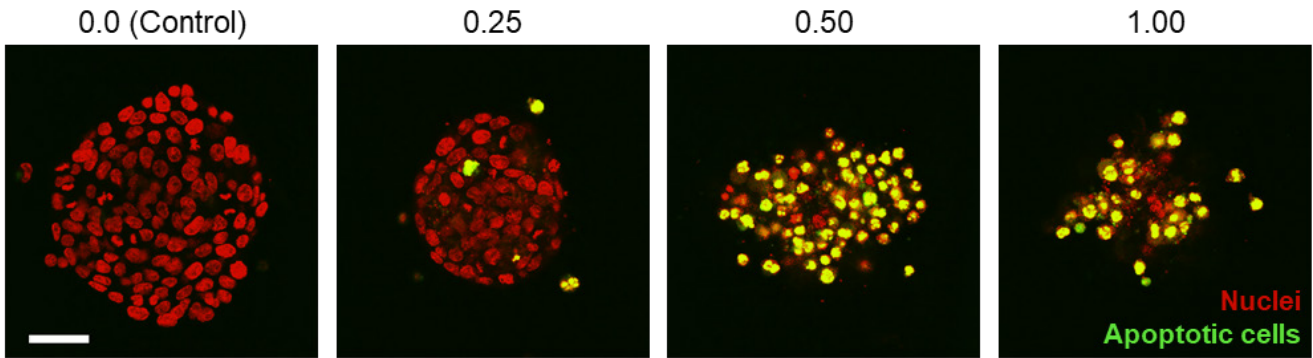


Figure 3: スタウロスポリンの各曝露条件におけるスフェロイドの共焦点画像
細胞核を赤で、アポトーシスが誘導された細胞を緑で標識。スケールバー：50 μm

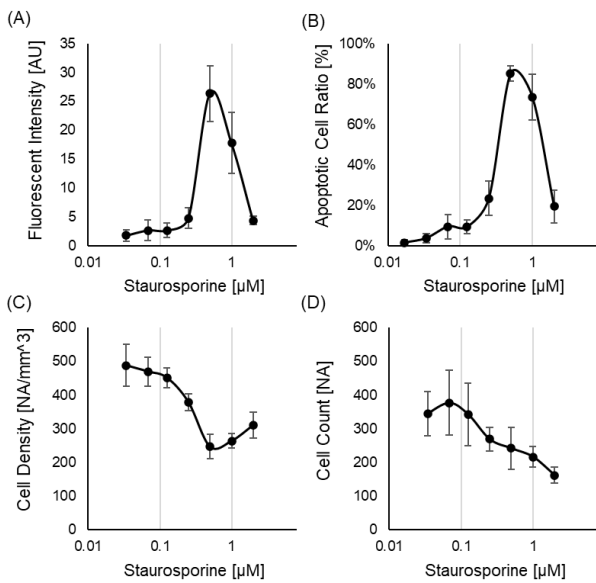


Figure 4: スタウロスポリンの各濃度点におけるスフェロイドの三次元定量解析結果

値はすべて平均±標準偏差。各濃度点でn=6

- (A) スフェロイド内のアポトーシスマーカー蛍光強度。
- (B) スフェロイド内の全細胞数に占めるアポトーシス細胞の割合。
- (C) 細胞核の蛍光を基に抽出したスフェロイド体積。
- (D) スフェロイドに含まれる細胞核数。

参考文献

1. B. Calpe and W. J. Kovacs, "High-throughput screening in multicellular spheroids for target discovery in the tumor microenvironment". *Expert Opinion on Drug Discovery*. Vol. 15(8). (2020).
2. Y. Feng and R. M. Eglén, "Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development". *SLAS Discovery*. vol. 22 (5). (2017).
3. V. Brancato *et al.*, "Could 3D models of cancer enhance drug screening?". *Biomaterials*. Vol. 232. (2020).

考察/まとめ

共焦点レーザー顕微鏡システム AX R で取得した画像を用いて、GA3によりスフェロイドの核一つ一つを明瞭に検出することができた。これにより、蛍光輝度や個数以外にも体積や短長径など、目的に応じてさまざまな定量解析が可能となる。AX R とJOBsの組み合わせにより、well plate全体の取得が撮影開始から完了まで自動的に可能となった。さらに、自動化によりwell内に複数のスフェロイドが存在する場合でも見落としを回避できる。従来は、目視での探索やタイリング撮影による全領域の画像取得が必要であったのに対して、大幅にスループットが向上する。

今回、スタウロスポリンによるアポトーシス誘導効果やそれに伴う細胞密度低下を定量的に示すことができた。Fig. 4 (A-B)において、濃度依存的な変化が見られたことから、多くの化合物と同様に正確な反応が得られたと言える。さらに、1 μM 以上の濃度では過剰なスタウロスポリンの曝露により、死細胞が多くなったことが、アポトーシス細胞と全細胞数の減少として確認されたと考えられる。一方で、スフェロイドの外層内層での効果差の傾向は見られなかった。0.25 μM と0.50 μM の濃度間で大きくアポトーシス細胞の割合が増加したことから、この間の濃度点における定量解析により、傾向が顕在化する可能性がある。詳細な定量結果が得られることで、このような次の実験に繋がる知見が得られることも利点の一つである。

二次元培養細胞での課題の解決や動物実験削減の観点から、がん治療薬を始めとした創薬研究では今後もスフェロイドやオルガノイドなどの三次元標本を用いる動きは広がると考えられる(文献3)。共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rと自由な撮像シーケンスを構築可能なJOBsを使用した高精細な三次元画像の効率的な取得、GA3を用いた多彩な画像解析は、このような創薬研究に大きく貢献することが期待される。

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート。

- ・高速：最速毎秒720フレーム(レゾナント 2048 × 16画素)
- ・高解像度：最高8K(ガルバノ)/2K(レゾナント)
- ・高スループット：視野数
25 mmの超広視野



画像統合ソフトウェアNIS-Elements

顕微鏡や周辺機器の制御と最大6次元までの画像取得、データ管理、画像処理・解析がまとめて行えるソフトウェアプラットフォームです。ワークフローの自動化をカスタマイズできるツールを搭載し、複雑な実験系や高度な解析にも対応します。

