YOKOGAWA

Application Note

細胞周期インジケーターFucciを用いた2D/3D培養の抗がん剤スクリーニング

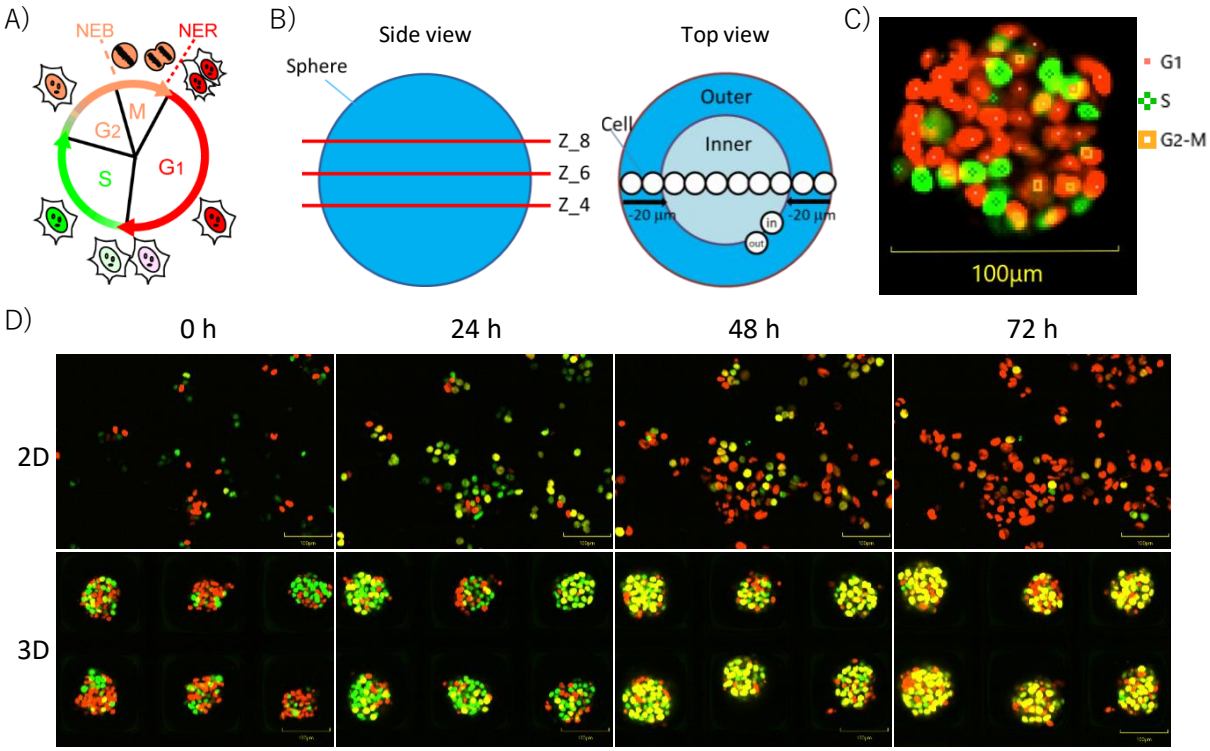
はじめに

細胞周期インジケーターFucci(CA)5は、細胞周期の進行をライブおよび固定サンプルで観察することが出来る蛍光プローブです[1)2)]。細胞周期のG2/M/G1期に蓄積するCdt1の断片に赤色の蛍光タンパク質（AzaleaB5）を、S/G2/M期に蓄積するGeminの断片に緑色の蛍光タンパク質（h2-3）を融合し、それぞれ細胞周期特異的に起こるユビキチン化ープロテアソーム分解機構を利用して細胞周期をリアルタイムで可視化します。（G1期の細胞核は赤、S期の細胞核は緑、 G2/M期の細胞核は黄色（赤色+緑色）の蛍光が観察されます。（図1A） NEB : 核膜の崩壊, NER : 核膜の新生）

当アプリケーションノートでは、Fucci(CA)5を恒常的に発現するHepG2細胞を使用し、抗がん剤など薬剤の効果を経時的に観察した実験例を紹介致します。通常の2D培養および3D培養（スフィア）における位置情報込みのデータから得られる新しい知見にご注目下さい。

実験手順

- Fucci(CA)5を安定発現するHepG2細胞を96-wellプレート（Corning, #3882）で2D培養、Elplasia Plate（Kuraray, SQ 200 100 96）で3D培養
- 抗がん剤などの薬剤：Etoposide（Etp）, Doxorubicin（DXR）, Bleomycin（BLM）, MEK-inhibitor（MEKi）を段階的に希釈し各ウェルに添加（図1E）
- CQ1で撮像。励起波長：488 nm, 561 nm, 対物レンズ：20倍, タイムラプス：1時間間隔で72 h
  スフィアはZ軸方向に7.8 µm間隔で10 slicesを撮影
- ハイコンテント解析ソフトウェアCellPathfinderで各細胞核を認識
  スフィアはZ-slice 4, 6, 8 枚目を対象に、各sliceで内外の細胞を分けて認識（図1B）
  各細胞をG1期、S期、G2/M期の3群に分類し（図1C）、それぞれ細胞数、割合等を算出



E)

	0	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100	(µM) *1
	0	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	(µM) *2
Etp *1											
DXR *2											
BLM *1											
MEKi *2											

図1
A) Fucci(CA)5が示す細胞周期情報
B) スフィアの内部・外部の認識方法
C) CellPathfinderによるFucci(CA)5スフィアの細胞周期解析画像（Etp 0 µM, 0 h, Z_6）
D) 2D, 3Dそれぞれの Fucci(CA)5蛍光の経時変化（Etp 0.03 µM）
E) 用いた薬剤の添加濃度

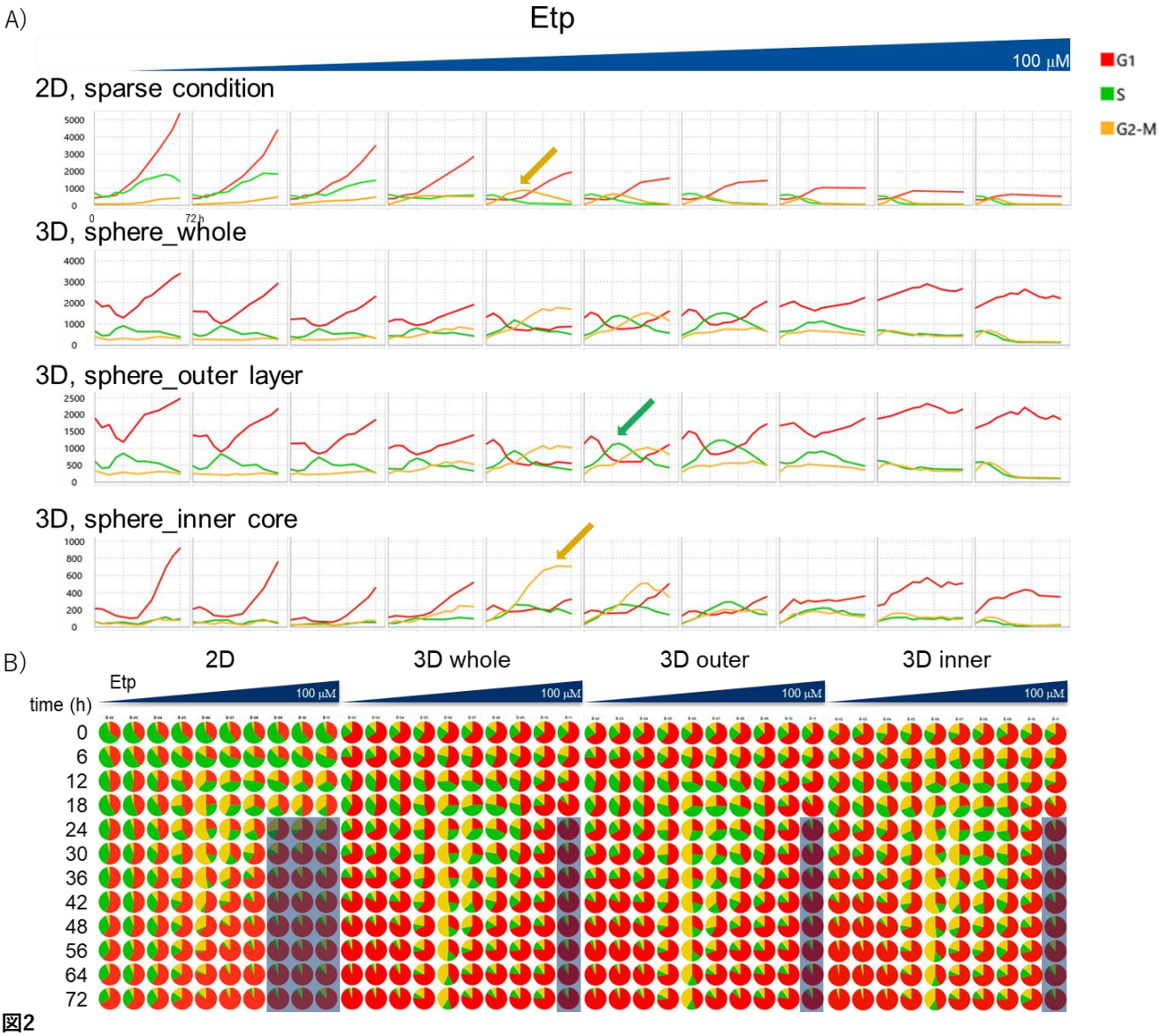


図2

A） 2D、3D、3Dスフィア周囲（20 μm）、3Dスフィア内部、での細胞数の経時変化（Etp各濃度条件下、黄矢印はG2 arrest、緑矢印はS arrestを示す）

B） 図2Aと同様のデータについて、各細胞周期の構成比の経時変化（網掛け部は細胞死の発生を示す）

結果と考察

細胞周期インジケーターFucci(CA)5をCQ1でのハイコンテントイメージング解析に適用し、72時間にわたる細胞周期進行を観察することができました。CellPathfinderを用いた画像解析の結果、抗がん剤によるG2 arrest、S arrestが特定の添加濃度条件下でのみ観察され、またそのタイミングが２Dと３D,さらに３D内部と周囲の細胞で異なること（図2A）（図2B）が確認されました。個体（ヒトやマウス）への薬剤投与において薬効が時空間的に異なる可能性が示唆されます。
CQ1とCellPathfinderを用いれば、様々な環境を考慮にいれながら、薬効の時空間的な変化を網羅的に解析するスクリーニング実験が可能になります。

1) Sakaue-Sawano A et al., Mol Cell. 2017. DOI:10.1016/j.molcel.2017.10.001
2) Ando R et al., BioRxiv 2020. DOI:10.1101/2020.03.30.015156

YOKOGAWA

横河電機株式会社　ライフ事業本部
営業・ソリューションセンター

Web site：
https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-platforms/life-science/
E-mail ： CSU@CSV.yokogawa.co.jp
TEL(076) 258-7028 FAX (076) 258-7029
〒920-0177 石川県金沢市北陽台2-3

お問い合わせ

記載内容はお断りなく変更することがありますのでご了承下さい。
All Rights Reserved, Copyright ⓒ 2021, Yokogawa Electric Corporation.

Printed in Japan,104