

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerを用いたアポトーシス研究: フローサイトメトリーへの応用



By ¹Matt Sylte, DVM, M.S., ²Martha O'Brien, Ph.D., ³Thomas J. Inzana, Ph.D., and ¹Chuck Czuprynski, Ph.D.

¹Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, WI, ²Promega Corporation, ³Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

細胞は環境の変化や脅威に対して多くの場合アポトーシスにより応答します。アポトーシスは、発生の過程における遺伝子プログラムによって誘発される場合でも、また外的因子によって誘導される場合でも、生物の細胞単位での応答能力のひとつとして必須のものです。多検体(ITS)で細胞ベースのアッセイを行なう研究者にはアポトーシスによる応答に興味を持たれる方も多く見受けられます。抗がん剤研究における細胞ベースのアッセイでは、アポトーシス誘導が目的となっているかもしれませんが、反対に、様々な変性疾患などの治療薬開発を目的としたスクリーニングでは、アポトーシスを阻止する効力が望まれるでしょう。アポトーシス検出に用いられるアッセイの多くは、すぐにITSに適用できる訳ではありません。しかし、プロメガでは培養中の細胞に直接加えられるアポトーシス検出マーカーを開発しました。このアポトーシス検出マーカーは、簡単な添加、洗浄、および分析のフォーマットにより多検体システムで簡単に適用することができます。

はじめに

アポトーシスによる細胞死には細胞の制御された分解が必要です。このプログラムされた細胞死ではプロテアーゼが重要な役割を果たします。アポトーシスの進行中には、システイン・アスパルチル・プロテアーゼ・ファミリー(またはカスパーゼ)の活性化により、多数の基質が蛋白質分解を受けて切断されます。プロメガでは、カスパーゼ活性化を *situ* でモニターするために fluorescein isothiocyanate (FITC) が結合したカスパーゼ共通阻害剤 Z-VAD-FMK を開発しました。Z-VAD-FMK (carbobenzoxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone) は、細胞透過性のカスパーゼに対する不可逆的阻害剤です。末端の carbobenzoxycarbonyl

を FITC ラベルに置き換えることで、活性化したカスパーゼの *in situ* におけるラベリングが可能になりました。CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker (カタログ番号 G7461, G7462) は、培養中の生細胞に直接加えることができます。本稿では、ヒトリンパ球細胞である Jurkat 細胞と初代培養ウシ肺動脈内皮細胞(BPAE)細胞における CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker の有用性を示しました。Fas 受容体を介した経路によるアポトーシスを誘導するために Jurkat 細胞を抗 Fas 抗体で処理しました。また BPAE 細胞を、アポトーシス誘導物質であるスタウロスポリンまたはグラム陰性のウシ病原体、*Haemophilus somnus* から単離した lipooligosaccharide (LOS) で処理しました。

H. somnus は、牧牛の肺炎、流産、血栓性髄膜炎(TME)、心筋炎、関節炎などを含む様々な病気の原因となります(1)。*H. somnus* の全身性感染により、敗血症、血栓症、および脈管炎が引き起こされます。*H. somnus* の表現型は 2 つに分けられ、敗血症を起こすかどうかの違いで病原性と無症候性キャリアがあります(1)。多種のグラム陰性腸性病原体からの lipopolysaccharide (LPS) により処理された BPAE 細胞がアポトーシスを起こすことから、LOS は *in vitro* における内皮細胞アポトーシスを促進する可能性のある毒性因子の候補とされています(2)。LPS には、LOS に無い長い炭化水素ポリマー(O chain)があります。*H. somnus* の病原性 LOS と無症候性キャリア分離菌 LOS との構造には違いがありますが、主要なコア成分である lipid A は同じです(3)。私達の実験室で以前に行なった実験で、病原性分離菌と無症候性キャリア分離菌から精製された LOS はともに BPAE 細胞でアポトーシスを誘導することが示されました。

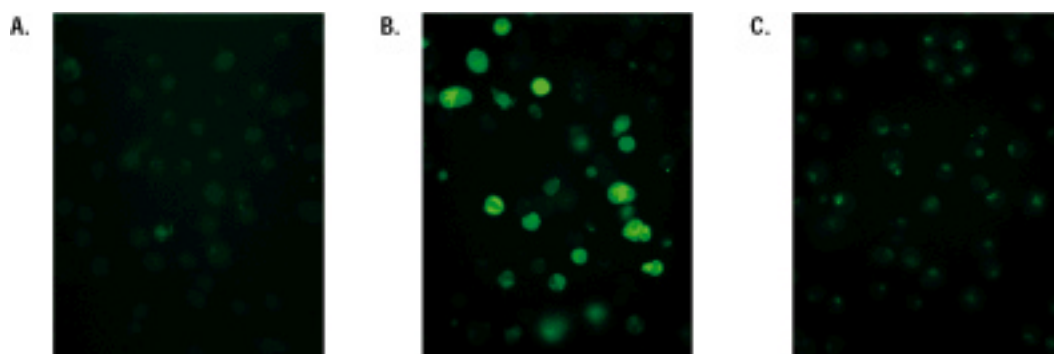


図1. CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker は、活性化型カスパーゼの細胞透過性のマーカーである

Jurkat 細胞は Fas 受容体を介するアポトーシスを誘導するため、Fas 受容体に対するモノクローナル抗体(human anti-Fas, Clone CH11, PanVera Corporation)で処理された。Jurkat 細胞(5×10^5 cells/ml)は抗 Fas 抗体(100ng/ml)で 2.5 時間処理された。コントロール細胞では無処理、またはアポトーシスの誘導の前に CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker (最終濃度 10 μ M DMSO に溶解)で 20 分間処理された。アポトーシスの誘導後、CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker を直接培養細胞に加え、最低 20 分間インキュベートした(長時間のインキュベーションによりシグナル強度を改善できます)。細胞は 250 $\times$ 350 μ m で 5 分間遠心し、PBS で一度洗浄した後、細胞数が 1.5×10^6 cells/ml になるように PBS に再懸濁した。次に、*in situ* 分析のために細胞を poly-L-lysine コートされたスライドに載せた。シグナルを長時間維持する場合は、細胞を 4% パラホルムアルデヒドまたは 1.0% のバッファーホルマリンで短時間(10 ~ 30 分)固定することができる。スライドは Vectashield® plus DAPI (Vector Labs) に載せ、Zeiss® 蛍光顕微鏡で観察した。写真は Spot™ II デジタルカメラを用いて撮影した。パネル A : 未処理のヒト Jurkat 細胞。パネル B : 抗 Fas 抗体で処理された Jurkat 細胞。パネル C : 抗 Fas 抗体で処理する前に FITC-VAD-FMK でインキュベートした細胞。

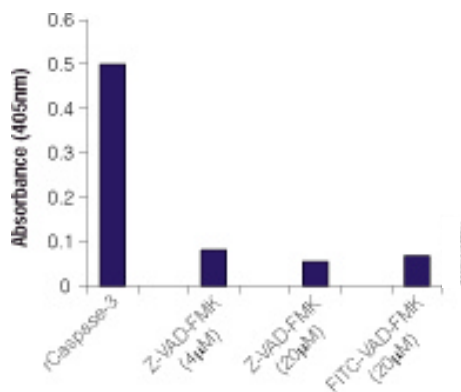


図2. CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerは活性型カスパーゼに不可逆的に結合し、caspaseの活性化を阻害する

Z-VAD-FMK(4μMおよび20μM)とFITC-VAD-FMK(20μM)の標識ペプチド基質、Ac-DEVD-pNAの組換え体caspase-3による切断阻害能力の測定には、CaspACE™ Assay System, Colorimetric (カタログ番号 G7220)を使用した。組換え体caspase-3(Pharmingen)は、200ng/mlで使用した。アッセイはCaspACE™ Assay System, ColorimetricのTechnical Bulletin (4)にしたがって実施した。

この実験は、*H. somnus*無症候性キャリア分離菌127Pから単離されたLOSがBPAE細胞でカスパーゼの活性化を誘導するかどうかを評価することを目的としています。CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerによるラベリング法は簡単であるため、特にアポトーシスを起こしている細胞の蛍光フローサイトメトリーによる解析に適します。CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerをフローサイトメトリーと組み合わせて使うことで、アポトーシスを迅速にモニター・定量化できます。

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerは細胞透過性がありCaspase-3を阻害する

私達は最初にCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerに細胞透過性があり、Z-VAD-FMKと同様にカスパーゼの阻害剤として機能することを示しました。FITC-VAD-FMKが、Jurkat細胞において*in situ*でアポトーシスを阻害する能力(図1)と、*in vitro*においてカスパーゼ3の基質であるAc-DEVD-pNAの切断を阻害する能力(図2)について試験しました。抗Fas抗体処理によるアポトーシス誘導に先だって、FITC-VAD-FMKをJurkat細胞に添加しました。抗Fas抗体で処理後、アポトーシスを起こしている細胞をラベルするために再度FITC-VAD-FMKを加えました。細胞をFITC-VAD-FMKで前処理した場合、アポトーシスは効果的に阻害され(ラベリングは最低レベルに抑えられました)、細胞はFITC-VAD-FMKと再度インキュベートしてもラベルされませんでした。FITC-VAD-FMKで前処理されていない細胞は抗Fas抗体処理後にアポトーシスを起こし、FITC-VAD-FMKにより強度のラベリングが確認されました(図1)。同様に、*in vitro*のカスパーゼ活性アッセイにおいてもFITC-VAD-FMKはAc-DEVD-pNAの切断を効果的に阻害しました(図2)。これらの*in situ*および*in vitro*の結果は、CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerが、カスパーゼ阻害剤のZ-VAD-FMKと同じように活性化されたカスパーゼに不可逆的に結合することを示します。

フローサイトメトリーによる解析

次に、CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerを用いたフローサイトメトリー解析によってアポトーシスを起こしている細胞とそうでない細胞を比較しました。未処理の細胞と抗Fas抗体で処理されたJurkat細胞を、FITC-VAD-FMKでラベルし、Coulter EPICS®フローサイトメーターを用いてカウントしました(図3)。陽性(蛍光ラベルされた)細胞はグ

ラフのM2領域で、陰性(未処理の)細胞はM1領域で表されます。結果は、抗Fas抗体で処理された細胞の53%がラベルされ(緑色の線)、未処理の細胞の5%がラベルされていること(黒色の線)を示しています。赤い線はFITC-VAD-FMK処理されていない細胞を表し、最低量の自発性蛍光量を示しています(0.4%)。フローサイトメトリー解析に用いられたものと同じ細胞を*in situ*分析にも用いました(図4)。CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerで処理後、抗Fas抗体処理細胞および未処理細胞をpoly-L-lysineコートしたスライドに載せ、蛍光顕微鏡で観察しました(図4)。抗Fas抗体処理した細胞のDAPI染色により明かにされた、凝縮および断片化した核を持つ多くの細胞が、FITC-VAD-FMKでもラベルされていることが示されました。フローサイトメトリー解析によりFITC陽性となった抗Fas抗体処理した細胞のパーセントは*in situ*解析によりFITCでラベルされた細胞の数とよく対応しました(図4)。この写真では、未処理の細胞の中でラベルされた細胞は見られませんが、視野を広げると少数の細胞がDAPIによる染色でアポトーシスを起こしていることが観察され、それらの細胞はFITC-VAD-FMKでもラベルされていました。

*H. somnus*のLOSで処理されたBPAE細胞におけるアポトーシス検出

フローサイトメトリーを用いたアポトーシス検出におけるCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerの有用性は、ウシ肺動脈内皮細胞(BPAE)でも示されました。細胞はアポトーシスを誘導するために200nMのスタウロsporinで6時間インキュベートした後、FITC-VAD-FMK(20μM)を加えインキュベートしました。スタウロsporinで処理した細胞は、未処理の細胞と比べてラベルされた細胞数にかなりの増加(2.5倍)が見られました(未処理の細胞の0.5%に対して、処理した細胞では1.5%) (図5)。また、BPAE細胞は*H. somnus*無症候性キャリア分離菌127Pから単離されたLOS(500ng/ml)でも処理し、未処理およびスタウロsporinで処理された細胞と並行してCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerを加えインキュベートしました。127P株からのLOS(500ng/ml)で処理した細胞のフローサイトメトリーでも検出されたように、FITCラベルされた細胞数にかなりの増加(2倍)が見られました(図5)。BPAE細胞を無症候性キャリア分離菌127PからのLOS(500ng/ml)で処理すると、アポトーシスを起こしている細胞を多数(12%)誘導することも示されました。これらの結果は、*H. somnus*無症候性キャリア分離菌127PからのLOSがBPAE細胞中のカスパーゼを活性化することを示します。

まとめ

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerは、細胞透過性の不可逆的なカスパーゼ共通阻害剤、Z-VAD-FMKの標識誘導体です。FITC-VAD-FMKは、Z-VAD-FMKと同じようにカスパーゼ活性を*in vitro*および*in situ*で阻害します。FITC標識により、活性化したカスパーゼの*in situ*におけるラベリングが可能になり、その結果、アポトーシスを評価する有用な定性ツール、およびアポトーシスのフローサイトメトリーによる解析のための定量ツールとして使えます。アポトーシスを起こしている細胞の標識は、浮遊系のリンパ球細胞と接着性内皮細胞の初代培養の両方で示されました。アッセイ手順の簡便性やフローサイトメトリーにおける汎用性により、本製品は多検体スクリーニングにもご利用いただけます。

参考文献

1. Corbeil, L.B. (1990) *Can. J. Vet. Res.* **54**, S57.
2. Frey, E.A. and Finlay, B.B. (1998) *Microbial Pathogen*. **24**, 101.
3. Inzana, T.J., Gogolewski, R.P. and Corbeil, L.B. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 2943.
4. CaspACE™ Assay System, Colorimetric, Technical Bulletin #TB270, Promega Corporation.

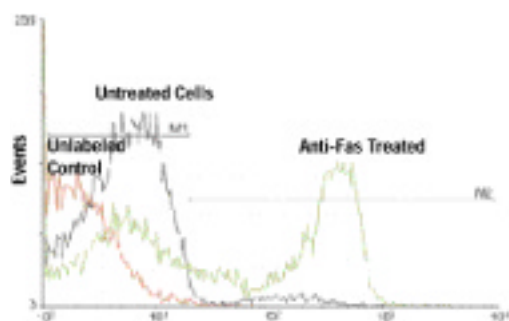


図3. CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerでラベルしたアポトーシスを起こしているJurkat細胞の蛍光フローサイトメトリー解析
ヒトJurkat細胞は、100ng/mlの抗Fas抗体(+または-)で4時間処理した後、10μM CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerでインキュベートした。フローサイトメトリーはCoulter EPICS®フローサイトメーターを使って実施した。サンプルあたり約10,000-gated eventsを解析した。結果はWindows® Multiple Document Interface (WinMDI)フローサイトメトリー・アプリケーション・ソフトウェアを使って解析した。蛍光は対数プロットした。M1は標識されていない細胞、M2は標識されている細胞を表す。抗Fas抗体で処理された細胞と処理されていない細胞はほとんど重なることなく、すぐれたシグナルノイズ比を持つことが示された。

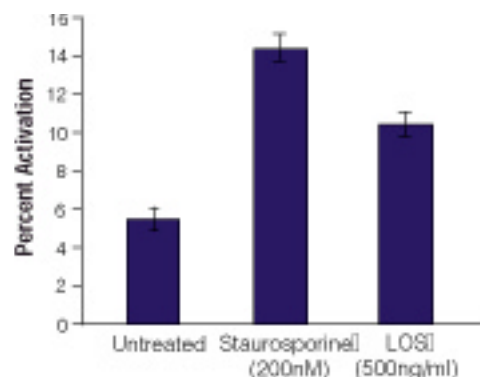


図5. CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerで、アポトーシスを起こしているウシ肺動脈内皮(BPAE)細胞をラベルした
BPAE初代培養細胞は、スタウロスポリン(200nM)または*H. somnus*無症候性キャリア分離菌127PからのLOS(500ng/ml)で6時間処理した後、CaspACE™-FITC-VAD-FMK In Situ Marker (最終濃度20μM)を直接培養液に加えた。細胞はPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、再度洗浄した。図3の説明にあるように細胞数はフローサイトメトリーによりカウントした。データは3回の実験の代表的なものである。

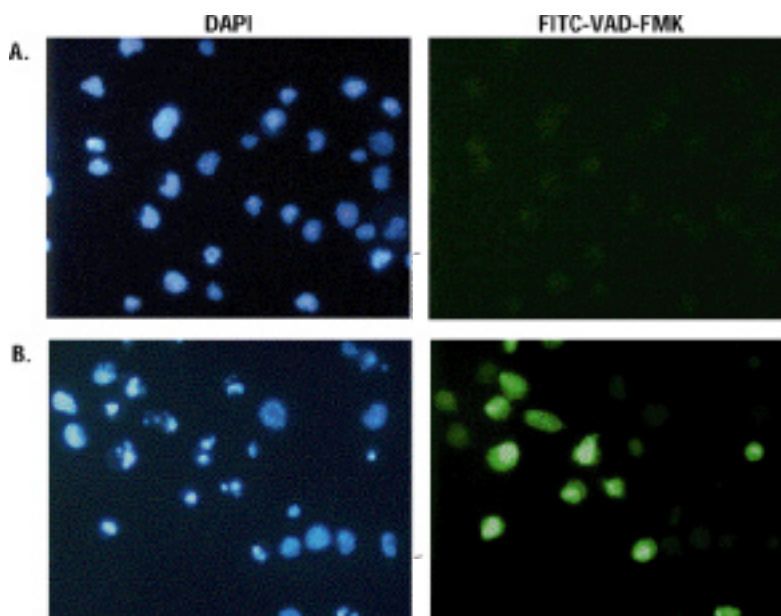


図4. CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerによる*in situ*ラベリングは、フローサイトメトリー解析の結果に一致する
Jurkat細胞はフローサイトメトリーと同じバッチのものを使った。細胞は図3の説明と同じ方法で準備し、蛍光顕微鏡により解析した。パネルA: 未処理細胞。
パネルB: 抗Fas抗体処理細胞。DAPI核染色により、FITC標識された細胞が形態的にアポトーシスを起こしていることが確認された(クロマチン凝集と核の断片化)。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CaspACE™ FITC-VAD-FMK	50μl	G7461	33,000
In Situ Marker (5mM)	125μl	G7462	70,000
Caspase Inhibitor	50μl	G7231	35,000
Z-VAD-FMK (20mM)	125μl	G7232	59,000
CaspACE™ Assay System, Colorimetric	100回分 50回分	G7220 G7351	65,000 47,000
CaspACE™ Assay System, Fluorometric	160回分	G3540	83,000

CaspACE is a trademark of Promega Corporation.
EPICS is a registered trademark of Coulter Corporation. Spot is a trademark of Diagnostic Instruments, Inc. Vectashield is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc. Windows is a registered trademark of Microsoft Corporation. Zeiss is a registered trademark of Carl-Zeiss-Stifting.