

フローサイトメトリーを用いたアポトーシス細胞の検出に対するプロブとしてのCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker



By Francis Belloc, Ph.D., Olivier Garnier, Catherine Boyer and Francis Lacombe, M.D., Ph.D.

Laboratoire d'Hématologie, Hôpital du Haut Lévêque, F-33604 Pessac, France

VAD-FMKの蛍光性の誘導体であるCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerが、フローサイトメトリー分析による白血病細胞集団中のアポトーシス細胞を標識するために使われました。このマーカーにより、Jurkat T細胞で初期と後期のFas誘導性アポトーシスを区別することができました。フローサイトメトリーの前にアポトーシス細胞をラベルするために、CaspACE™ FITC-VAD-FMKは信頼性の高いマーカーであることがわかりました。

はじめに

酵素前駆体の切断とカスパーゼと呼ばれる特定のプロテアーゼの生成を介した、いくつかの経路によりアポトーシスによる細胞死が起こります。カスパーゼファミリーは3つのクラスに分けることができます（初発変化、増幅と死刑執行）。これらのクラスは一般的に次のように定義されます。i）死のレセプターによって活性化される初発変化カスパーゼ（例えば、カスパーゼ-8）。ii）初発変化カスパーゼあるいはミトコンドリア分子によって活性化される増幅カスパーゼ（例えば、カスパーゼ-9）。iii）上流のカスパーゼによって活性化された死刑執行カスパーゼ（例えば、カスパーゼ-3）。すべてのカスパーゼはシステインプロテアーゼで、アスパラギン酸残基のすぐ後でそれらの基質を切断します。

死刑執行カスパーゼの活性化は、フローサイトメトリーによる研究のための初期アポトーシスマーカーとなります(1)。しかしながら、これらの酵素を分析するために必要な蛍光基質は細胞透過性ではありません。カスパーゼ-3の切断された形態を特異的に標識することができる抗体があり、それらは白血病細胞で早期のアポトーシスを明らかにするために多変量解析に使うことができます(2)。この手法は細胞固定と透過処理を必要とし、時間がかかります。

阻害剤ペプチド、CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker（カタログ番号 G7461、G7462）は、ほとんどのカスパーゼにさまざまな親和性と結合します。そのため、細胞透過性であるVAD-FMKの蛍光誘導体は、カスパーゼ経路における包括的な活性化状態をフローサイトメトリーで分析する上で興味深いツールとなっています。

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker による標識

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerは、最終濃度5 μM（培地1mlに1μlストック溶液）になるよう直接細胞培養培地（10%のウシ胎児血清を含む HEPES緩衝RPMI 1640）に加えました。20 で20分間のインキュベーション後、細胞を遠心し、1ml PBSで洗浄しました。それから、20 で30分間、0.5%のホルムアルデヒド1ml中で固定しました。細胞は再び遠心して、フローサイトメトリー分析の前に0.5ml PBSに懸濁しました。

フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析は、EPICS® XL Cytometer（Beckman-Coulter）を使って行いました。蛍光発光は、530nm（488nmの励起）において測定しました。固定は、蛍光集団とネガティブ集団の識別を容

易にすることがわかりました。ネガティブな集団は処理されていないサンプルのより多い集団と定義されました。しかし、目的が集団全体の平均蛍光発光を測ることであり、陽性と陰性の細胞を区別することではなかったため、図1で記述された実験は固定せずに行いました。細胞選別実験は、Elite Cell Sorter（Beckman-Coulter）を使って行いました。

Annexin V標識

FITC-annexin Vキット（Immunotech、Beckman-Coulter）は、アポトーシスを検出するために供給元によって指定される方法で使用しました。簡単に言うと、Jurkat T細胞をCa²⁺ リッチ結合バッファーに懸濁し、5μlのFITC-annexin Vを加え、4 で10分間インキュベートした後、EPICS® XL Cytometerを使って細胞を分析しました。上記の方法で、蛍光を測定しました。

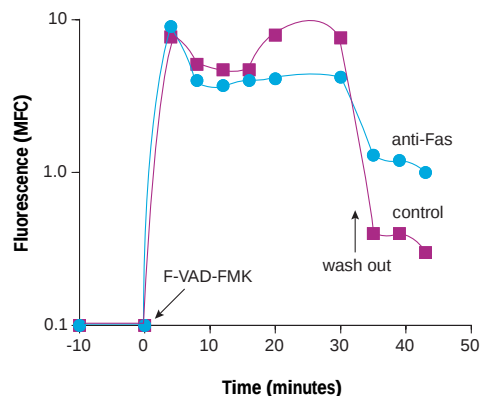


図1 . Jurkat T細胞のCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerによるラベリング Jurkat T細胞（3×10⁵ cells/ml）は、抗 Fas IgM（Immunotech）の存在下または非存在下（コントロール）で3時間インキュベートした。1μl/ml FITC-VAD-FMK（最終濃度5μM）を付加した後、細胞を20 でインキュベートし、4分ごとにフローサイトメトリーによって蛍光を測定した。30分後に、細胞はベレットにして、1mlのPBSに懸濁した。4分ごとの蛍光発光の測定を再び行った。値は時間の関数として表した平均蛍光発光チャンネル値を表す。

アポトーシス細胞の蛍光顕微鏡分析

細胞は1μg/mlのアクリジンオレンジ、または0.5μg/mlのHoechst 33342（Molecular Probes）を加えた培養液でインキュベートしました。蛍光顕微鏡検査法によって、凝縮クロマチンあるいは断片化した核を持つ細胞がアポトーシスを起こしていると判定されました。各サンプルにつき、最低100個の細胞がカウントされました。

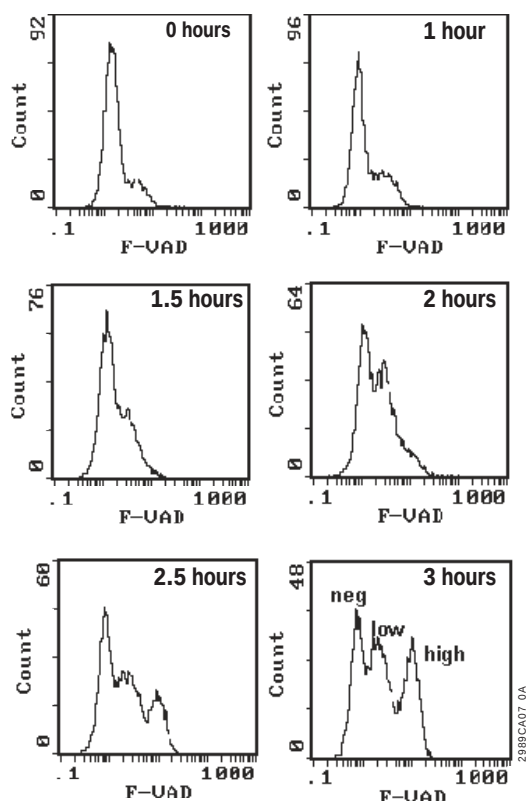


図2. 抗Fas IgM処理に対するJurkat T細胞の応答

Jurkat T細胞は、アポトーシスを誘導するために0.1μg/mlの抗Fas IgMで処理した。0、1、1.5、2、2.5と3時間の時点で分画を取り、5μMのCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerで20分間インキュベートした。細胞はそれから0.5%のホルムアルデヒドで固定され、フローサイトメトリーによって分析した。処理2時間後に、異なる蛍光強度を持つ3つの集団(ネガティブ、低い、高い)が判定された。

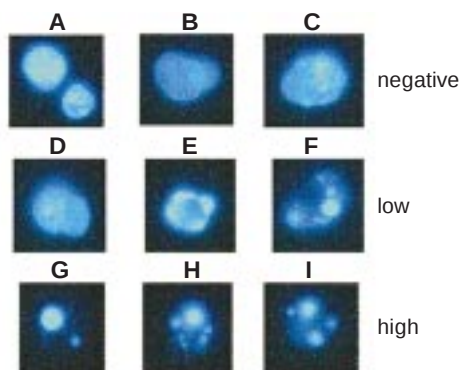


図3. 抗Fas IgMによって処理されCaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerでラベルされた細胞の蛍光顕微鏡検査

ネガティブ(A-C)、低い(D-F)、および高い(G-I)蛍光強度集団の蛍光顕微鏡検査の結果。図2に説明があるように細胞は分析され、3時間の処理後にフローサイトメトリーで選別された。選別された細胞は0.5μg/mlのHoechst 33342で染色され、UV励起下で青い蛍光を観察した。

結果

アポトーシスの適切なマーカーとして、FITC-VAD-FMKは健康な細胞では内外へと容易に移動でき、アポトーシス細胞の中ではアンカーされたままではなくてはなりません。図1に記述した実験は、この特性を実証するために行われました。FITC-VAD-FMK(5μM)を、Jurkat T細胞に加え、細胞蛍光発光をフローサイトメトリーによって4分ごとにモニターしました。細胞による蛍光性標識の取り入れは4分未満で達成され、その後蛍光は30分間安定なままでした(図1)。細胞をPBSで洗浄し、遠心してからPBSに懸濁した場合、蛍光発光の急激な減少が観察されました。これは、FITC-VAD-FMKの90%以上がコントロール細胞から洗い流されてしまったことを示唆します。しかし、アポトーシスを誘導するために細胞をFas-アゴニスト抗体で前もって処理したとき、蛍光発光はコントロール発光値の3倍に保たれました(図1)。これらの結果により、CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerが細胞透過性であり、健康な細胞に比べてアポトーシス細胞でよりよく維持されることが確認されました。

フローサイトメトリーで可能となる細胞単位の分析の利点として、集団分析を行うことにより、サンプルの異質性を明らかにできることが挙げられます。図2は、Fas-アゴニストに対するJurkat細胞の反応が2段階で起こったことを示します。FITC-VAD-FMK付加に続いて、低い蛍光強度を持つ細胞の小さい集団が観察されました。この低い蛍光強度はアポトーシスが誘導されなかったサンプルでも観察されました(図2、0時間)。この集団はFas-アゴニスト抗体による2時間の処理の間に次第に増加しました。処理2時間後に高い蛍光強度を持つ集団が現われ、この集団は次の1時間に増加しました。

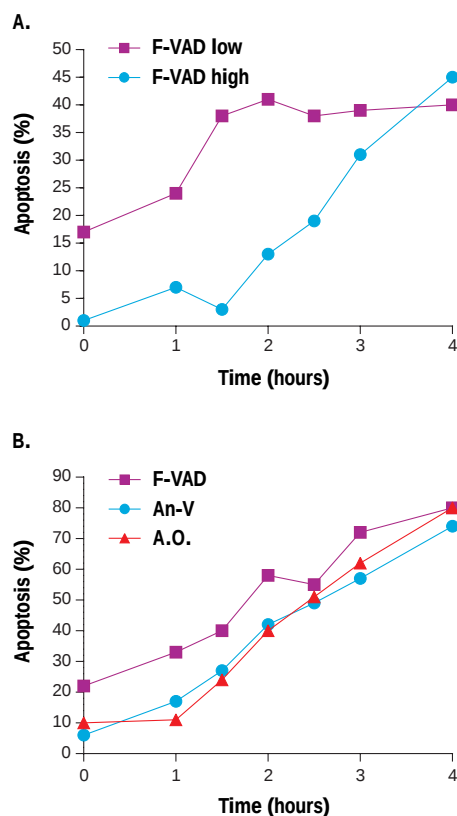


図4. Jurkat T細胞におけるFas誘導性アポトーシスのタイムコース分析。

パネルA: FITC-VAD-FMK標識後、抗Fas抗体処理したJurkat細胞における高低蛍光強度集団のパーセンテージの経時変化。パネルB: 抗Fasによって処理されたJurkat細胞においてFITC-VAD-FMK(F-VAD)あるいはFITC-annexin V(An-V)染色した後にフローサイトメトリーによって決定した、あるいはアクリジンオレンジ(A.O.)染色後の蛍光顕微鏡検査法によって決定したアポトーシス細胞のパーセンテージの経時変化。



Fas-アゴニストで処理した後に、ゼロ、低い、および高い蛍光発光集団をDNA結合蛍光色素、Hoechst 33342で染色し、フローサイトメトリーでソートし、蛍光顕微鏡検査法により観察しました(図3)。FITC-VAD-FMKネガティブな細胞は、明かにインタクトであると確認されました(パネルA-C)。強い蛍光を発する細胞は凝縮クロマチンと断片化した核を持つ後期のアポトーシス細胞と同定されました(パネルG-I)。蛍光の弱い細胞集団は混成した細胞種からなり、インタクトな細胞(パネルD)、初期のアポトーシス細胞(パネルE)、そして後期のアポトーシス細胞(パネルF)が含まれました。

高低のFITC-VAD-FMKラベルされた細胞のパーセンテージの経時変化はフローサイトメトリーによってモニターされました(図4、パネルA)。最初は蛍光の低い細胞の率が増加しました(図4、パネルA)。次の段階では低い蛍光の細胞集団が一定レベルを保つようになる一方、高い蛍光を発する細胞が増加し始めました(図4、パネルA)。この段階で、アポトーシス細胞の総数は連続的に増加しました(図4、パネルB)。これらの実験の結果は、高い蛍光を発する細胞がアポトーシス後期であるのに対して、低いFITC-VAD-FMKラベルの細胞はアポトーシス初期であることを示唆します。

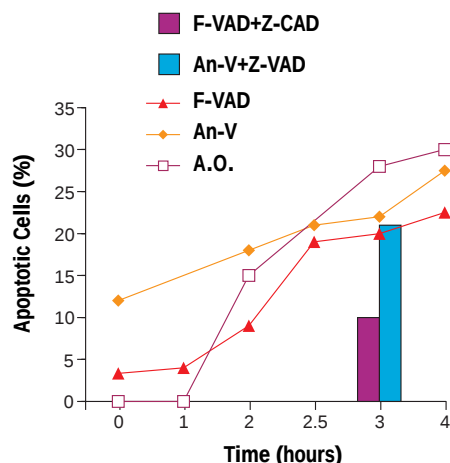


図5. U937細胞におけるFas誘導性アポトーシスのタイムコース分析

U937細胞は、抗Fas IgMで処理され、サンプルはFITC-VAD-FMK (F-VAD)、FITC-annexin V (An-V) あるいはアクリジンオレンジ (A.O.) で異なる時点において染色・分析された。3時間後に、FITC-VAD-FMK (赤いバー) あるいはFITC-annexin V (青いバー) 標識における20μM Z-VAD-FMK (Z-VAD) による15分間のインキュベーションの影響が決定されました。

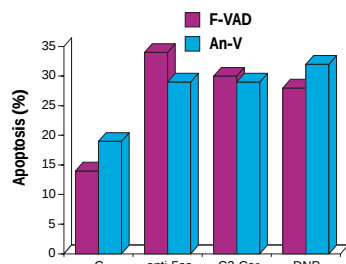


図6. U937細胞のFITC-annexin VとCaspACE™ FITC-VAD-FMKラベリングにおける3つのアポトーシス誘導物質の比較

U937細胞は、未処理(C)、または0.1μg/mlの抗Fas IgMで6時間処理、50μM C2-セラミド(C2-C)で6時間処理、あるいは1μM ダウノルビシン(DNR)で1時間処理し、洗浄した後、薬剤が付加されていない培地で5時間インキュベートした。細胞は、FITC-annexin V(青いバー)あるいはFITC-VAD-FMK(赤いバー)でラベルされ、フローサイトメトリーによって分析した。陽性の細胞のパーセンテージをそれぞれの処理ごとにプロットした。

FITC-VAD-FMKによってラベルされた細胞集団全体のタイムコース分析と、フローサイトメトリーによって膜レベルで、あるいは顕微鏡を用いて核レベルで測定されたアポトーシス細胞の数とを比較しました(図4、パネルB)。両方の実験方法でアポトーシスの割合と陽性細胞のパーセンテージの間に互いに相関性が見られ、FITC-VAD-FMKによってラベルされた細胞がアポトーシスを起こしていることが確認されました。もう1つの細胞系、U937におけるFas誘導性アポトーシスにおいても同様の結果が得られました(図5)。3時間のFas-アゴニスト処理の後に、不可逆的カスパーゼ阻害因子を過剰量に加え、15分間インキュベートしました。その後、FITC-VAD-FMKあるいはannexin Vによって細胞をラベルしました。カスパーゼ阻害因子の付加は、annexin Vによってラベルされた細胞のパーセンテージに影響を与えることなく、FITC-VAD-FMKによってラベルされた細胞のパーセンテージを減少させました(図5、赤いバー)。これはアポトーシス細胞がFITC-VAD-FMKでラベルされるには活性化型カスパーゼが必要であることを示唆します。

最後に、異なったアポトーシス誘引物質による処理の後、FITC-VAD-FMKによるU937細胞のラベリングがannexin Vラベルの割合と比較されました(図6)。2種類のラベルについて6時間後、自然発生的なアポトーシス(C)、Fas誘導性アポトーシス(Anti-Fas)、C2-セラミド誘導性アポトーシス(C2-Cer)と、ダウノルビシン (DNR) 誘導性アポトーシスのすべてにおいて同様の蛍光細胞レベルを示しました。これは、アポトーシスの誘導方法が何であれ、FITC-VAD-FMKをフローサイトメトリーでアポトーシスのマーカーとして用いることができることを証明します。

考察

ここで示されるように、FITC-VAD-FMKはアポトーシスを起こしている白血病細胞をラベルし、フローサイトメトリー分析するために使うことができます。この手法により検出されたアポトーシス細胞のパーセンテージは、他の手法の結果と一致します。興味深い事に、FITC-VAD-FMK標識では蛍光強度により初期と後期のアポトーシスを区別することが可能でした(図2-4)。これらの強度の変化は初発変化カスパーゼ(初期)または死刑執行カスパーゼ(後期)の活性化と関係があるかもしれませんが、FITC-VAD-FMKマーカーは、セラミドを含む、いくつかの分子によって誘発されるアポトーシスを検出することができましたが、その一方でカスパーゼ-3の活性化はこの経路では検出されませんでした(3)。FITC-VAD-FMKは、多変量フローサイトメトリー分析によってカスパーゼ依存性アポトーシスを明らかにするために有用なツールとなるでしょう。しかし、血液あるいは骨髄のような混成の細胞集団のサンプルを分析するには信頼性が高いネガティブコントロールが必要になります。現在、このようなサンプルに対する非アポトーシス・コントロールの入手は容易ではありません。最後に、FITC-VAD-FMKの結合はアポトーシスに対する優れたマーカーであると考えられますが、一般的なカスパーゼ活性化はアポトーシスに限らず、炎症や分化の過程でも起こりうる可能性があります(参考文献4の総説を参照)。

参考文献

1. Durrieu, F. et al. (1998) *Exp. Cell Res.* **240**, 165.
2. Belloc, F. et al. (2000) *Cytometry* **40**, 151.
3. Belaud-Rotureau, M.A. et al. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 788.
4. Zeuner, A. et al. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 1075.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50μl	G7461	33,000
	125μl	G7462	70,000
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb ^(a)	50μl	G7481	39,000

Anti-ACTIVE is a trademark of Promega Corporation and is registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

EPICS is a registered trademark of Beckman-Coulter, Inc.

^(a)Patent Pending.