Live imaging by time-lapse microscopy can more clearly evaluate the anti-apoptotic state of primary hepatocytes isolated from the drs knockout mouse

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福本, 和彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/787

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　５２５号	学位授与年月日	平成２１年　３月１８日
氏　　名	福　本　和　彦		
論文題目	Live imaging by time-lapse microscopy can more clearly evaluate the anti-apoptotic state of primary hepatocytes isolated from the *drs* knockout mouse （タイムラプス顕微鏡による生体イメージ法は *drs* ノックアウトマウスから分離した初代肝細胞のアポトーシス抵抗性をより明確に評価できる）		

博士（医学） 福 本 和 彦

論文題目

Live imaging by time-lapse microscopy can more clearly evaluate the anti-apoptotic state of primary hepatocytes isolated from the *drs* knockout mouse

（タイムラプス顕微鏡による生体イメージ法は *drs* ノックアウトマウスから分離した初代肝細胞のアポトーシス抵抗性をより明確に評価できる）

論文内容の要旨

［はじめに］

アポトーシス機構の異常はがんと関連が深く、ヒトやマウスのがんにアポトーシス関連遺伝子異常が認められていることが分かっている。アポトーシスの解析を行う場合はセルラインとなった培養細胞を使用することが多いが、株化細胞での観察では繰り返す培養により本来の細胞や組織とは別の性質を獲得してしまっていることを注意すべきである。この点から遺伝子改変マウスから直接採取した初代細胞培養の観察の方が生体での細胞活動をより反映していると考えられる。しかし、初代細胞は種々の影響を受けやすい弱点も持っており、評価法の選択に注意を要する。

タイムラプス顕微鏡は、染色や固定を行わずに付属のチャンバー内で細胞を培養しながら観察ができる新しい機器である。アポトーシスに陥った細胞の判定法のスタンダードは核濃縮や細胞質の変形など、形態学的変化の観察であるが、この新しい機器をアポトーシス評価に使用したという報告はない。肝臓に自然発がんを示し、アポトーシス抵抗性を示すことが予想される *drs* 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、これまで報告されているアポトーシス評価法と比較検討した。

［材料ならびに方法］

全ての実験は浜松医科大学動物保護委員会の承認を得て施設の倫理規程を遵守した。7－9 週齢の CB57BL/ 6CR（B6）雄マウスと同マウスの *drs* 遺伝子をノックアウトした(*drs* KO)雄マウスを使用した。

実験 1）アポトーシス導入プロトコールの決定

B6 マウスよりコラゲナーゼ還流法によって採取された初代肝細胞に対し抗 Fas 抗体と actinomycin D 及び cycloheximide を組み合わせ、アネキシン V 染色法で 24 時間後に観察細胞中の 50％以上の細胞にアポトーシスが誘導される薬剤の適正投与量を決定した。観察細胞中にアネキシン V 染色が陽性となった細胞の割合をアポトーシスインデックスとした。

実験 2）フローサイトメトリーによる SubG1 分画の評価

決定したアポトーシス誘導プロトコールを用いて B6 マウスと *drs* KO マウスからそれぞれ採取した初代肝細胞における SubG1 分画を誘導後 4－24 時間に 4 時間毎に評価し、比較した。

実験 3）タイムラプス顕微鏡を用いたアポトーシス細胞の比較

同一の誘導刺激によってそれぞれの初代肝細胞におけるアポトーシスインデックスを比較した。

実験 4）肝細胞中 cleaved caspase 3 の測定

アポトーシス誘導開始後 8 時間における肝細胞を溶解し cleaved caspase 3 をウェスタンブロット法で比較し、アポトーシスが誘導されているかどうかを確認した。

［結果と考察］

実験 1） アポトーシスインデックスが 50%以上となる刺激濃度は抗 Fas 抗体が 0.75 mg/ml＋actinomycin D 0.05 mg/ml または抗 Fas 抗体が 0.75 mg/ ml＋cycloheximide 0.05 mg/ml であった。

実験 2） フローサイトメトリーを使用した SubG1 分画による判定では *drs* KO マウスは B6 マウスに比較してアポトーシス誘導後 24 時間になって有意に sub G1 分画が抑制されていた。

実験 3） タイムラプス顕微鏡による評価では *drs* KO マウスではアポトーシス誘導後 8 時間で初めてアポトーシスに陥った肝細胞が観察され、その後もアポトーシス誘導に対し抵抗性を示した。B6 マウスと比較すると 4 時間目から 24 時間のどの時点においても有意にアポトーシス抵抗性を認めた。実験 2、3 で得られた結果を比較すると実験 2 では 4 時間後よりすでに Sub G1 分画の増加が認められている点や 4 時間後の *drs* KO マウスでもアポトーシスが認められた点が矛盾点となった。その差が最も大きかったアポトーシス誘導 8 時間後の初代肝細胞を使用し、もう一つのアポトーシス指標となる cleaved caspase 3 の測定を行った。

実験 4） アポトーシス誘導 8 時間後ではコントロールマウスでは cleaved caspase 3 が検出されたが、*drs* KO マウスでは検出されなかった。

測定法による相違が生じる原因として、評価する項目が異なることに加えて、初代細胞培養の試薬による影響の受けやすさに起因していることが考察される。フローサイトメトリーを使って評価するためには非浮遊細胞である肝細胞はトリプシンやEDTA によって培養皿から剥離する必要がある。すでにアポトーシス刺激を受けている初代細胞がこの処理によって剥離から測定までの間に死に至った可能性が示唆される。タイムラプス顕微鏡では観察開始から終了まで生細胞は均一化された培養条件の下で観察されるため、測定に他の影響を受けにくい評価法であると考えられる。

［結論］

初代肝細胞培養のアポトーシス抵抗性を評価するためにはタイムラプス顕微鏡は従来の方法に比較してより優れた方法である。

論文審査の結果の要旨

［はじめに］

Drs という遺伝子は、10 年ほど前に *src* の作用に対抗する遺伝子として、阪大微研で単離されたものであったが、その生物学的性格についての研究論文は非常に少なく、2004 年にアポトーシスとの関連が記載されたくらいであった。2007 年になり、ノックアウトマウスが作成され、興味深いことに、そのマウスは 6 ヵ月以内に種々の腫瘍を自然発生する。この遺伝子はさらに、ヒトでも齧歯類でも性染色体の X に位置することが分かっており性差と発がん感受性などを研究する場合の有力な手がかりを与える可能性がある。申請者は、がん感受性が高く、さらに発生率に性差があるということから、この *drs* 遺伝子ノックアウトマウスの肝細胞を対象とし、腫瘍発生素因上昇の一側面である、アポトーシス抵抗性を検出しようと試みたものである。申請者は特にタイムラプス顕微鏡という新たな方法を応用した。タイムラプス顕微鏡は、染色や固定を行わずに付属のチャンバー内で細胞を培養しながら観察ができる新しい機器である。アポトーシスに陥った細胞の判定法のスタンダードは核濃縮や細胞質の変形などの形態学的変化の観察であるが、この新しい機器をアポトーシス評価に使用したという報告はない。従来の方法との比較も行った。

［材料ならびに方法］

7－9 週齢の CB57BL/ 6CR（B6）雄マウスと同マウスの *drs* 遺伝子をノックアウトした(*drs* KO)雄マウスを使用した。

実験 1） アポトーシス導入プロトコールの決定：B6 マウスよりコラゲナーゼ還流法によって採取された初代肝細胞に対し抗 Fas 抗体と actinomycin D 及び cycloheximide を組み合わせ、アネキシン V 染色法で 24 時間後に観察細胞中の 50％以上の細胞にアポトーシスが誘導される薬剤の適正投与量を決定した。観察細胞中にアネキシン V 染色が陽性となった細胞の割合をアポトーシスインデックスとした。

実験 2） フローサイトメトリーによる SubG1 分画の評価：決定したアポトーシス誘導プロトコールを用いて B6 マウスと *drs* KO マウスからそれぞれ採取した初代肝細胞における SubG1 分画を誘導後 4－24 時間に 4 時間毎に評価し、比較した。

実験 3） タイムラプス顕微鏡を用いたアポトーシス細胞の比較：同一の誘導刺激によってそれぞれの初代肝細胞におけるアポトーシスインデックスを比較した。

実験 4） 肝細胞中 cleaved caspase 3 の測定：アポトーシス誘導開始後 8 時間における肝細胞を溶解し cleaved caspase 3 をウェスタンブロット法で比較し、アポトーシスが誘導されているかどうかを確認した。

［結果と考察］

実験 1） アポトーシスインデックスが 50%以上となる刺激濃度は抗 Fas 抗体 0.75 mg/ml＋actinomycin D 0.05 mg/ml または抗 Fas 抗体 0.75 mg/ ml＋cycloheximide 0.05 mg/ml であった。

実験 2） フローサイトメトリーを使用した SubG1 分画による判定では *drs* KO マウスは B6 マウスに比してアポトーシス誘導後 24 時間になって有意に sub G1 分画が抑制されていた。

実験 3） タイムラプス顕微鏡による評価では *drs* KO マウスではアポトーシス誘導後 8 時間で初めてアポトーシスに陥った肝細胞が観察され、その後もアポトーシス誘導に対し抵抗性を示した。B6 マウスと比較すると 4 時間目から 24 時間のどの時点においても有意にアポトーシス抵抗性を認めた。実験 2、3 で得られた結果を比較すると実験 2 では 4 時間後よりすでに Sub G1 分画の増加が認められている点や 4 時間後の *drs* KO マウスでもアポトーシスが認められた点が矛盾点となった。その差が最も大きかったアポトーシス誘導 8 時間後の初代肝細胞を使用し、もう一つのアポトーシス指標となる cleaved caspase 3 の測定を行った。

実験 4） アポトーシス誘導 8 時間後ではコントロールマウスでは cleaved caspase 3 が検出されたが、*drs* KO マウスでは検出されなかった。申請者はこれらから、測定法による相違が生じる原因は評価する項目の違いに加えて、初代細胞培養液内の試薬による影響の受けやすさもあるのではないかと考察した。つまり、フローサイトメトリーによる評価では非浮遊細胞である肝細胞のトリプシンや EDTA による培養皿からの剥離が必要で、すでにアポトーシス刺激を受けている初代肝細胞はこの影響で、剥離から測定までの間に死に至った可能性が示唆される。タイムラプス顕微鏡では観察開始から終了まで生細胞は均一化された培養条件の下で観察されるため、測定に他の影響を受けにくい評価法であると考えられる。

［結論］

申請者は、初代肝細胞培養のアポトーシス抵抗性を評価するためにはタイムラプス顕微鏡は従来の方法に比較してより優れた方法であると結論した。

審査委員会は申請者の画期的な方法論とユニークで発展性の高いモデルを高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

1) 何秒に一枚の画像を撮影し、どのくらいの期間追跡できるのか
2) 灌流時のコラーゲンの濃度と時間について
3) 雌マウスの *drs* のヘテロでの表現型について
4) ラットにおける急性腎不全の定義
5) 一次培養後の肝細胞は分裂をするのか
6) アポトーシス誘導モデルでの系統差について
7) SubG1 分画の定義について
8) Actinomycin D や cycloheximide の濃度を決めた理由について
9) アポトーシスのタイムラプス顕微鏡観察像の段階的変化の記述について
10) 運動性の高い細胞はアポトーシスがおこりやすいのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論 文 審 査 担 当 者　　主 査　梱村 春彦
副 査　浦野 哲盟　　竹原 康雄