

フローサイトメトリーによるアポトーシス解析の改良法

緒方 進・武内昌代・奥村克純・田口 寛

三重大学生物資源学部

Improved Methods for Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry

Shin OGATA, Masayo TAKEUCHI, Katsuzumi OKUMURA and Hiroshi TAGUCHI

Faculty of Bioresources, Mie University, Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

In cells undergoing apoptosis, the characteristic “ladder” pattern of DNA fragments is observed on agarose gel electrophoresis. Such a pattern of DNA degradation generally serves as a criterion for the apoptosis. However, on agarose gel electrophoresis it is difficult to accurately quantify DNA fragmentation. Therefore, quantification of DNA fragmentation is determined by flow cytometry, DNA fragmentation assay *etc.* In this paper we improved the methods for the analysis of apoptosis by flow cytometry. As a result, we can obtain much information (quantification of apoptosis and cell cycle analysis *etc.*) from a single sample ($1\sim3\times10^6$ cells) with the improved methods. The sample is treated with phosphate-citrate buffer. These methods are very simple and convenient.

Key Words : flow cytometry • apoptosis • cell cycle • DNA fragmentation • hydrogen peroxide

緒 言

アポトーシス (apoptosis) は、1972年に病理学者である Kerr らにより、それまで細胞死の代表であったネクローシス (necrosis) とは形態学的に異なる細胞死として初めて紹介された¹⁾。アポトーシスが一般に認識されるに至ったのは、分子生物学の発展に伴って、アポトーシスに関与する遺伝子が解明されはじめた1990年代に入ってからのものであるが、積極的な検討が成されている現在に至っても、いまだその機構などについては不明な点が多い。

アポトーシスは、個体の発生などに代表される生理的細胞死のみならず、制がん剤や放射線による病理的な細胞死の一部についても関与していることが知られており、特に制がん剤や放射線によるがん細胞のアポトーシスは、その医学的応用面から注目され、細胞周期への影響を中心に広く研究されている。アポトーシスの特徴としては、ヌクレオソーム単位 (180bp の整数倍) の DNA フラグメンテーション、核クロマチンの凝縮、細胞の断片化、アポトーシス小体の出現、マクロファージによる貪食などの現象が挙げられる。従って、アポトーシスの判定は、顕微鏡による形態変化の観察とアガロースゲル電気泳動

法によるヌクレオソーム単位の DNA 断片化, すなわち DNA ladder の検出の 2 点によることが多い。

一方, フローサイトメトリー (flow cytometry : FCM) は, 蛍光染色した細胞を細い流路に通し, レーザー光を照射して, 細胞 1 個ごとの散乱光や蛍光の強さを測定するものであり, これにより細胞の大きさや細胞中の特定物質の量を細胞単位で測定することができ, 異なる波長の蛍光色素で細胞を染色すれば, 多重解析も可能である。また特定集団のみを回収 (ソート) することも可能であり, それが可能な機種を特に FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) と呼ぶ。この技術の前身は, 1960 年代の Kamentsky らの研究²⁾に端を発するが, その後様々な改良が重ねられた結果, 現在では, FCM は一般的に普及し, ルーチン分析に利用されるまでに至っている。FCM は主に細胞表面マーカーの解析, DNA 量および細胞周期の解析に用いられ, 特に臨床医学の分野における活用が目立つ。

近年, アポトーシスの研究が盛んになるに従い, 簡便にアポトーシスを検出する手段として, この FCM が利用されるようになってきた。散乱光の変化で細胞の形態変化を観察しようとする方法, そして DNA に定量的に結合して蛍光を発する蛍光色素 PI (propidium iodide) を用い, アポトーシスに伴って観察される現象である DNA フラグメンテーションを同定しようとする方法であるが, 我々は, 現在よく用いられている後者の方法に改良を加えることにより, アポトーシスの割合や正常集団の細胞周期を解析するのに, より簡便で実用的な方法を考案したので報告する。

実験方法

1. 細胞培養およびアポトーシス誘導

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 は, 10% ウシ胎児血清 (Gibco BRL Co. lot 38N9543), 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 100U/ml ペニシリン, 2mM グルタミンを含有する RPMI1640 (Gibco BRL Co.) 中, CO₂ インキュベーターにて培養した。またアポトーシスに関しては, HL-60 が 5×10^5 cells/ml の細胞密度の状態にて, 終濃度が 0.05~0.1mM になるように過酸化水素を添加し, 2~4 時間 CO₂ インキュベーター中で培養し, 誘導した。

2. FCM 解析

アポトーシスを誘導した細胞 ($1 \sim 3 \times 10^6$ cells) を回収し, 氷冷した Ca²⁺, Mg²⁺ を含有しない PBS (以下, PBS (-) と略す) にて 2 回洗浄した。続いて, 細胞を PBS (-) に懸濁し, 終濃度 70% になるように氷冷したエタノールを添加し, 4°C にて最低 4 時間固定した。固定後, 細胞を遠心回収し, PBS (-) にて洗浄した。続いて, 固定した細胞を PBS (-) に再懸濁し, 終濃度 0.1mg/ml になるように RNase (Sigma 社) を添加し, 37°C で 30 分インキュベートした。氷冷した後, PI (Sigma 社) を終濃度 50 μ g/ml になるように添加し, 暗所にて水中 10 分間静置した。

リン酸クエン酸緩衝液処理は, Darzynkiewicz らの方法³⁾に従った。すなわち RNase 処理の前に, 固定した細胞をリン酸クエン酸緩衝液 (pH7.8; PC buffer; 0.2M Na₂HPO₄; 0.1M citric acid=192:8) 50 μ l に浮遊させ, 室温にて 30 分, 時々振とうさせつつ, 断片化した DNA を溶出させた。その後の操作は前述した方法に従った。

細胞をエタノール固定せずに, 直接 PI にて染色する方法は, Nicoletti らの方法⁴⁾に従った。アポトーシスを誘導した細胞 (2.5×10^5 cells) を回収し, 冷 PBS (-) にて洗浄した後, 0.1% クエン酸, 0.1% Triton X-100 を含有する 50 μ g/ml PI 溶液に再浮遊させ, DNA を染色した。

FCM 解析には, Becton Dickinson 社の FACS Calibur を用いた。調製したサンプルを流速 12 μ l/min にて流し, それに 488nm のアルゴンレーザー光を照射した。この時サンプルが発する散乱光や蛍光のデータをリストモード形式にて保存した。なお細胞周期の解析は, ModFiT LT (Verity 社) を用いて行った。

3. アガロース電気泳動を用いた DNA ladder の検出

アポトーシスを誘導した細胞 (5.0×10^5 cells) を遠心回収し, PBS (-) にて洗浄した。細胞を Lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM EDTA, 0.5% sodium-N-lauroylsarcosinate) 20 μ l に浮遊させ, 細胞を溶解させた。続いて, RNase 処理 (50°C, 30 分), プロテイナーゼ K 処理 (50°C, 60 分) を順次施した後, それぞれのサンプルを 2% のアガロースゲルにて電気泳動を行った。なお分子量マーカーは,

123bp DNA ラダーを Gibco BRL 社より購入して用いた。

4. 蛍光顕微鏡による形態変化の観察

アポトーシスを誘導した細胞を遠心回収し、PBS (−) にて洗浄後、1%グルタルアルデヒドにて、室温で 30 分間細胞を固定した。そして、固定した細胞をヘキスト 33342 (Calbiochem 社) にて染色し、蛍光顕微鏡にて形態変化を観察した。

5. DNA 断片化の定量⁵⁾

アポトーシスの進行に伴って遊離する低分子 DNA の総 DNA に対する割合を求め、DNA 断片化率とした。DNA の定量はジフェニルアミンとの呈色反応により生ずる生成物を、600nm の吸光度を測定することにより行った。

なお、本文中に特に記載のない試薬については、入手可能な限り最高純度のものをナカライテスクと和光純薬より購入した。

結果と考察

1. 過酸化水素による HL-60 のアポトーシス誘導

今回、サンプルとして HL-60 を用いた理由としては、比較的容易にアポトーシスを誘導でき、この分野において良く用いられる細胞株である点、また一般的に浮遊系細胞のほうが細胞周期の解析には理想的な結果が得られる点が挙げられる。まず過酸化水素による HL-60 のアポトーシス誘導の条件について、詳細に検討する必要がある。従って、HL-60 を 0.01, 0.05, 0.1mM の過酸化水素にて、各濃度につき 2, 3, 4 時間処理した場合について、DNA の断片化をアガロースゲル電気泳動

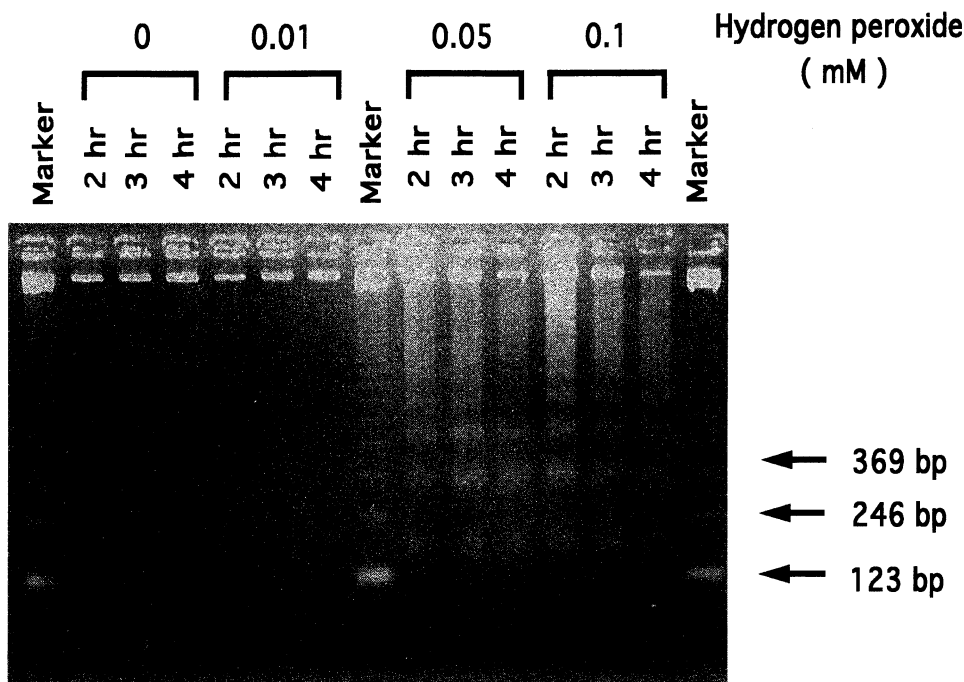


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL-60 cells treated with various concentrations of hydrogen peroxide.

HL-60 cells were incubated with various concentrations of hydrogen peroxide for the time indicated. DNA was isolated and subjected to electrophoresis on 2% agarose gel as described in Materials and Methods.

により調べた。その結果、Fig. 1 に示すように 0.05 mM 以上の条件で、処理後 2 時間で DNA の断片化が観察された。またこれらの条件下において、アポトーシスに特徴的な形態変化についても観察された (Fig. 2)。また、0.1mM より高濃度の条件においては、逆にネクロシスの割合が高まることを見いだした (data not shown)。よって今後は、主に過酸化水素 0.05mM、3 時間の条件で HL-60 にアポトーシスを誘導することにした。

2. FCM 解析—細胞周期

a. エタノール固定した細胞の PBS (-) 洗浄について

従来のプロトコールにおいて、エタノール固定後の PBS (-) 洗浄について特に具体的な条件の記述はない。

そこで PBS (-) 洗浄が DNA ヒストグラムに及ぼす影響について検討した。FCM 解析において、通常、エタノール固定した HL-60 を PI 染色した場合、得られる典型的な DNA のチャートを Fig. 3 に示す。縦軸が細胞数 (細胞頻度) で、横軸は PI の蛍光強度、すなわち相対的な DNA 量を表す。このような表示形式をヒストグラムといい、FCM 解析においては基本的な測定結果の表示方式の 1 つである。横軸は 1024 チャンネルのリニアスケールで表示されており、本研究においては、 G_0/G_1 期細胞に相当する DNA 量のピークが、200 チャンネル付近になるように検出電圧の調節を行った。よって、2 倍の DNA 量を有する G_2/M 期細胞の DNA 量のピークは 400 チャンネル付近に位置することになり、その間の DNA 量の集団が S 期細胞に相当する。また

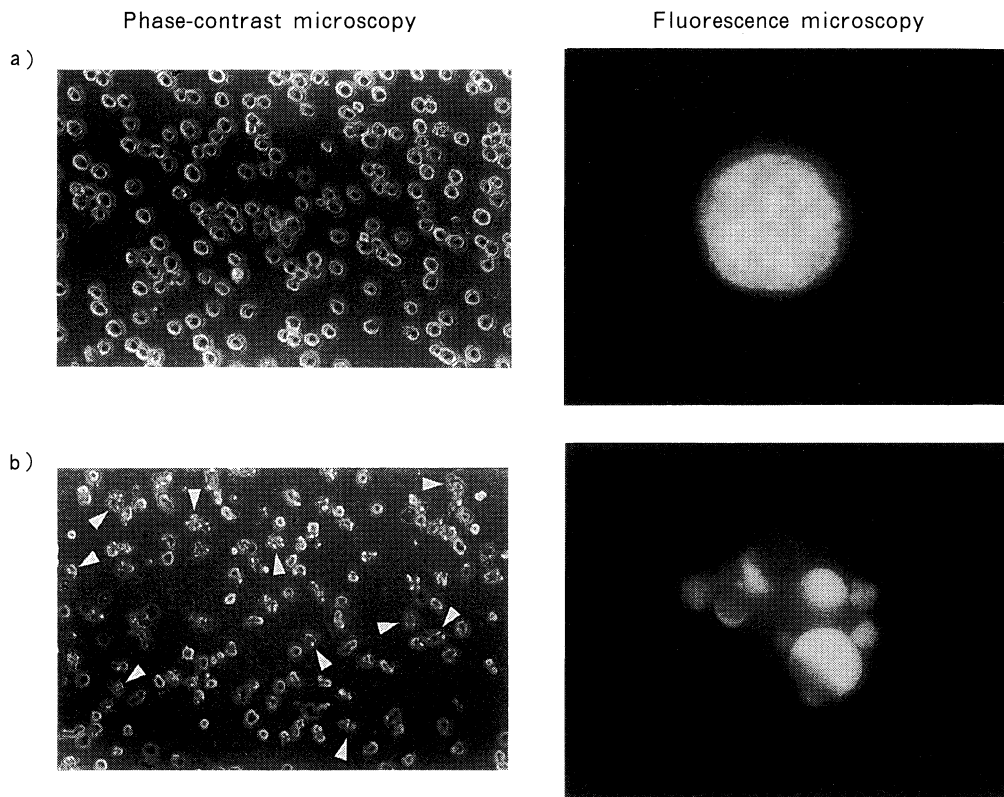


Fig. 2. Typical morphological changes of HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with 0.05mM hydrogen peroxide for 3 h. Morphological changes were determined by phase-contrast microscopy and fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. a) : no treatment, b) : 0.05mM hydrogen peroxide.

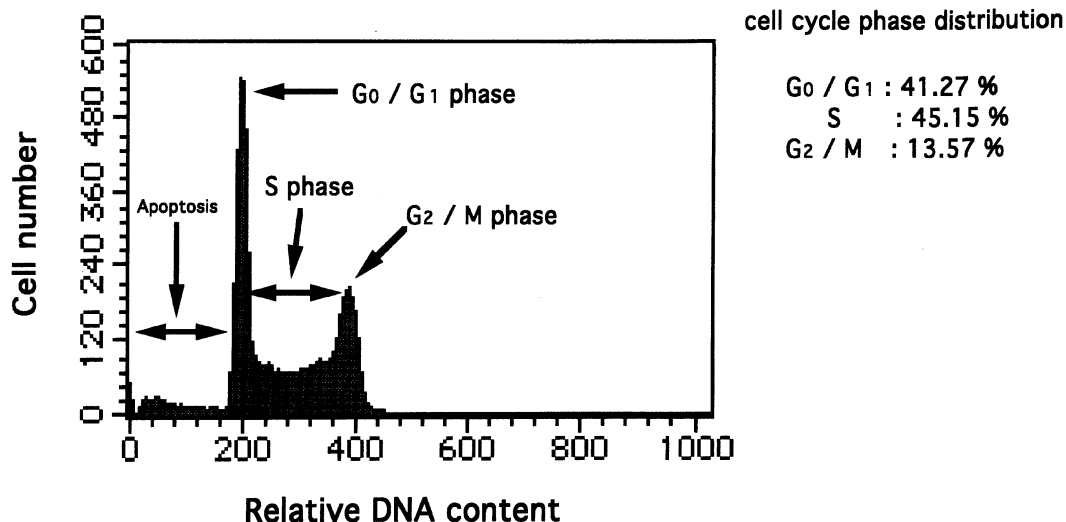


Fig. 3. Typical DNA fluorescence flow cytometric profiles.

DNA content was determined by FACS Calibur as described in Materials and Methods.

アポトーシスを起こして DNA 量が減少した集団は、 G_0/G_1 期集団より下のチャンネルに位置することになる。アポトーシス誘導処理と非処理の HL-60 において、PBS (-) 洗浄の影響を DNA ヒストグラムから見た場合、図中には示さなかったが、興味深いことに非処理群においては、PBS (-) 洗浄の影響はほとんど無く同じような結果を示したが、アポトーシスを誘導した場合は、洗浄の影響が顕著に見られた (Fig. 4)。同じ誘導処理を施した場合においても、洗浄の有無、回数によってチャートの形が大きく異なり、洗浄の回数が多いほど、FCM 解析には理想的なシャープなチャートが得られた。これは残留したエタノールが、PI の染色になんらかの影響を及ぼしたと予想されるが、なぜアポトーシス誘導時に影響が出たのか詳細は不明である。これと同等の現象が HL-60 を他の誘導条件 (例えば、紫外線やアクチノマイシン D) にてアポトーシスを誘導した場合においても観察されたが (data not shown)、とくに過酸化水素誘導アポトーシスにおいて影響が顕著であった。

b. リン酸クエン酸緩衝液処理について

先に得られた結果より、アポトーシスの割合や正常集団の細胞周期を解析することは、アポトーシス集団と正

常集団の分離が明瞭でないことから困難である。そこでリン酸クエン酸緩衝液を用いて、エタノール固定した細胞より断片化した DNA を漏出させ、DNA 量の減少した G_0/G_1 期以下の集団をアポトーシス細胞とし、正常細胞との区別を明瞭にした (Fig. 5)。これにより正常集団の割合が高まり、アポトーシス集団との区別が明瞭となったので、細胞周期解析ソフト ModFit LT を用いて、正常細胞の細胞周期の割合を算出することが可能となった。しかし、PC buffer 処理によって、正常集団の割合が増加した結果、正確なアポトーシスの割合を FACS Calibur 本機にて求めることは、機械の検出器の問題から困難であると考えられる。実際 ModFit LT を用いてアポトーシスの割合を算出したところ、DNA 断片化率定量法⁵⁾で得られた値と大きく異なっていた (data not shown)。

3. FCM 解析—アポトーシスの定量について

FCM を用いてアポトーシスを定量する方法として、よく用いられるのは Nicoletti らの方法⁴⁾である。彼らは横軸の蛍光強度のパラメータを、従来細胞周期で用いられるリニアスケールではなく、より検出範囲の広いログスケールに変更して取り込むことにより、アポトーシ

スの割合を DNA 断片化率として表している。我々の実験系を彼らのプロトコールに従って行った結果が Fig. 6 である。このようにマーカーを設定することにより、容易にマーカー内の集団の割合を算出することができる。しかし、本法は細胞を固定する必要もなく、非常に簡便かつ迅速なアッセイ法であるが、固定できないということはサンプルの保存ができないことになり、実験を進行していくうえで問題となる場合がある。またサンプルが貴重で細胞数が多く得られない場合など、細胞周期解析、アポトーシス定量のそれぞれについてサンプルを調製することが困難であることもある。我々はこのような条件を満たす方法として、先に述べてきた方法を基に、以下のように改良した。

4. FCM 解析—改良点

エタノール固定した細胞を PC buffer 処理し、続いて RNase, PI 処理をし、測定サンプルを調製した。そして、PI の蛍光強度をリニアスケールにして、まず細胞周期解析用のデータを取り込み、ついでログスケールにして、アポトーシス定量用のデータを取り込み、1 サンプルから両者の解析を行った。その結果、Fig. 7 に示すように、PC buffer 処理によりアポトーシス集団と正常集団の区別が明瞭なために、アポトーシスの割合、細胞周期の解析の両者の測定が1サンプルにつき $1 \sim 3 \times 10^6$ cells 程度で可能となった。これにより1回の測定で得られる情報量は多くなった。またアポトーシスの割合に関しては Nicoletti らの方法⁴⁾で得られた値に近い

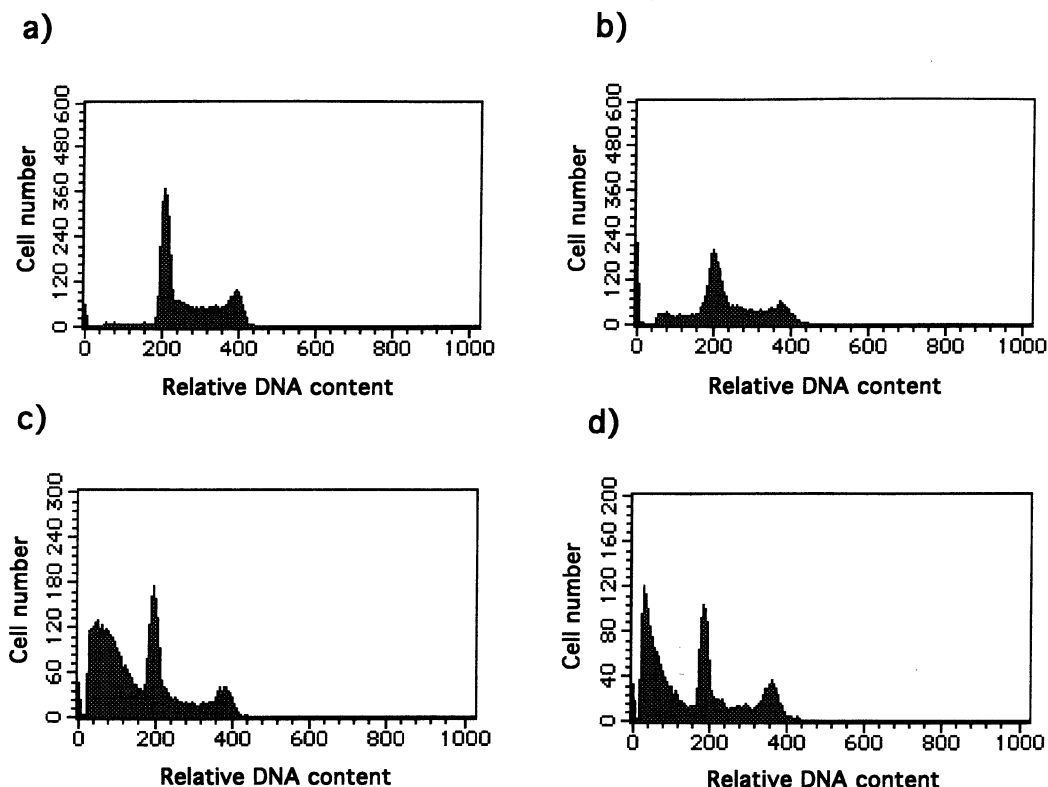


Fig. 4. The effect of PBS (—) treatment after fixation of cells with ethanol on DNA histogram.

HL-60 cells were treated with 0.05mM hydrogen peroxide for 3 h. DNA content was determined by FACS Calibur as described in Materials and Methods. a) : no treatment, no PBS (—) wash, b) : 0.05mM hydrogen peroxide, no PBS (—) wash, c) : 0.05mM hydrogen peroxide, PBS (—) wash $\times 1$, d) : 0.05mM hydrogen peroxide, PBS (—) wash $\times 2$.

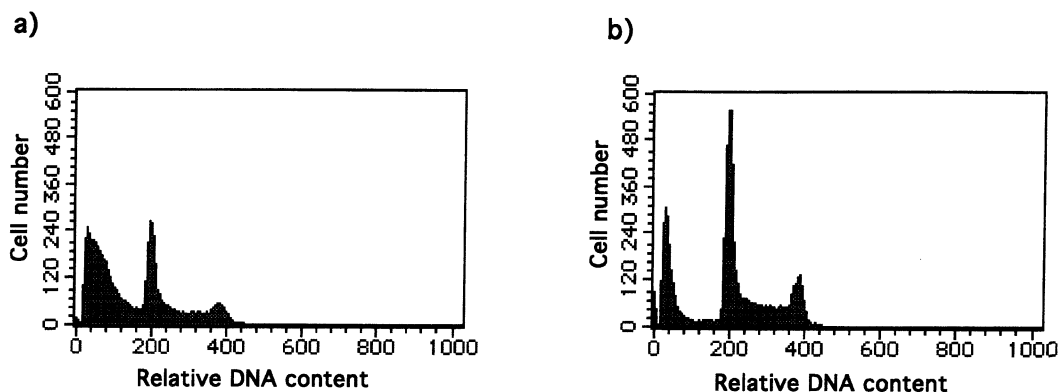


Fig. 5. The effect of PC buffer on DNA histogram.

HL-60 cells were treated with 0.05mM hydrogen peroxide for 3h. DNA content was determined by FACS Calibur as described in Materials and Methods. a) : no treatment, b) : PC buffer treatment.

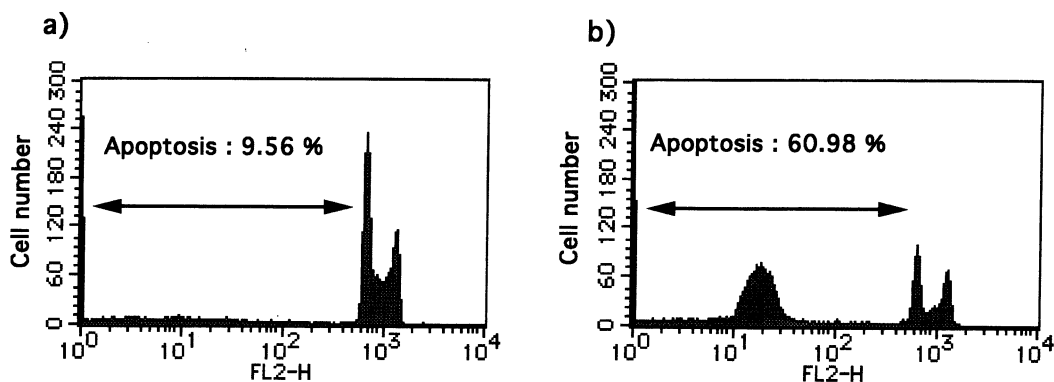


Fig. 6. Flow cytometric DNA fluorescence of PI-stained HL-60

HL-60 cells were treated with 0.05mM hydrogen peroxide for 3h. DNA content was determined by FACS Calibur as described in Materials and Methods. a) : no treatment, b) : 0.05mM hydrogen peroxide.

ものであり、また DNA 断片化定量法⁵⁾で得た結果とよく似た傾向が得られた (Fig. 8)。また細胞周期の解析も特に問題はなく、HL-60 の過酸化水素誘導アポトーシスにおいて、細胞周期特異性は見られないことが推察された。本法は習熟すれば、 1×10^6 cells 程度の細胞数があれば測定が可能であり、迅速、簡便さ、得られる情報量の多さでは他のアポトーシス同定法より有効な点が多いと考えられる。しかし、FCM 解析がアポトーシス研究において有効なのは、アポトーシスが確実に起こるとわかっているような現象についてであり、細胞がアポ

トーシスで死んでいるのかどうか判明していない系においては、FCM 解析の結果のみでアポトーシスと断定することはできないので、様々な方法を併用してそれを検定する必要がある。ある細胞がアポトーシスを起こしているという最終的な判断は、Kerr ら¹⁾が最初に見出したように、形態変化をみる必要がある。すでにアポトーシスを起こしている細胞において、その割合をある程度定量的に解析したい場合、FCM 解析はアポトーシス研究において強力なツールとなるのは間違いないと考えられる。アポトーシスを FCM を用いて解析する方

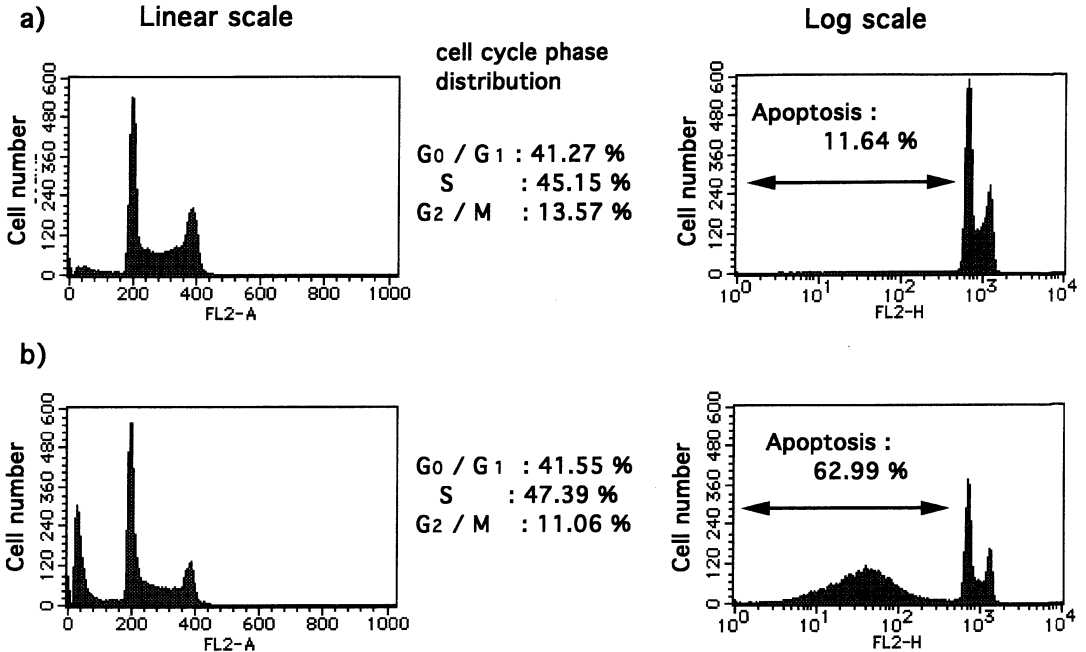


Fig. 7. Improved method for analysis of apoptosis by flow cytometry.

HL-60 cells were treated with 0.05mM hydrogen peroxide for 3 h. DNA content was determined by FACS Calibur as described in Materials and Methods. a) : no treatment, b) : 0.05mM hydrogen peroxide.

法は、今回述べた DNA 断片化を同定する方法のみならず、様々な方法が考案されて用いられている。同じく DNA 断片化を検出する TUNEL 法⁶⁾ やアポトーシスの初期において、本来なら細胞膜の内層に存在するホスファチジルセリンが細胞外にも局在することを利用して、それと親和性の高いアネキシン V を FITC で標識して、アポトーシスに伴う細胞表面の変化を解析する方法⁷⁾ があるが、これらについては、キットとして商品化されている。また最近ではアポトーシスに伴うミトコンドリアの膜電位変化を、ローダミン 123 にて検出する方法⁸⁾ など、アポトーシス研究における FCM の利用は今後ますます一般的なものとなり、さらにはより優れたアッセイ法が開発されていくことであろう。我々も今後そのような方向性をもって、FCM をアポトーシス研究に利用していきたいと考えている。

引用文献

- 1) KERR, J.F., A.H. WYLLIE and A.R. CURRIE. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26** : 239-257 (1972).
- 2) KAMENTSKY, L.A., M.R. MELAMED and H. DERMAN. Spectrophotometer: new instrument for ultra-rapid cell analysis, *Science* **150** : 630-631 (1965).
- 3) GONG, J., F. TRAGANOS and Z. DARZYNKIEWICZ. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry, *Anal. Biochem.* **218** : 314-319 (1994).
- 4) NICOLETTI, I., G. MIGLIORATI, M.C. PAGLIACCI, F. GRIGNANI, and C. RICCARDI. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* **139** : 271-279 (1991).

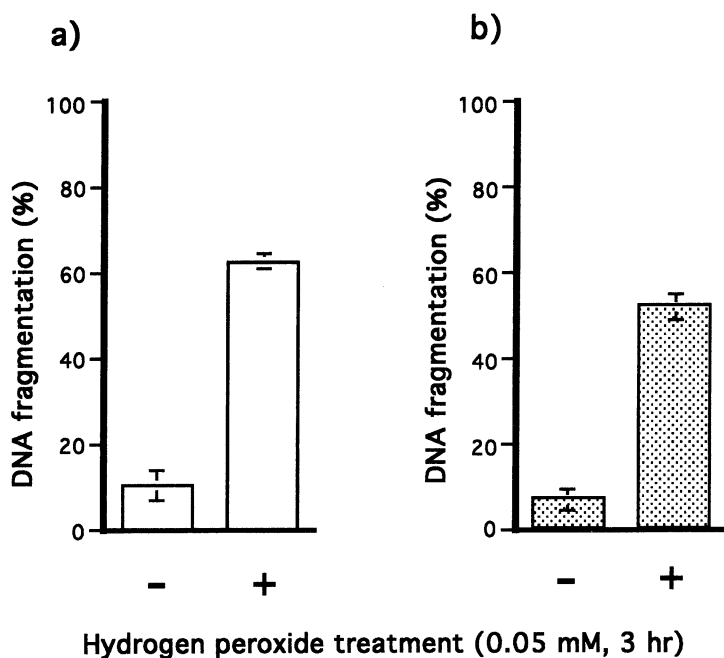


Fig.8. Quantification of DNA fragmentation in HL-60 cells treated with 0.05mM hydrogen peroxide.

Quantification of DNA fragmentation was determined by flow cytometry (a), and DNA fragmentation assay (b) as described in Materials and Methods.

- 5) SELINS, K.S. and J.J.COHEN. Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes, *J. Immunol.* **139** : 3199-3206 (1987).
- 6) GORCZYCA, W., J. GONG and Z. DARZYNKIEWICZ. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays, *Cancer Res.* **53** : 1945-1951 (1993).
- 7) MANON van ENGELAND, HELMA J. H. KUIJPERS, FRANS C. S. RAMAEKERS, CHRIS P. M. REUTELING-SPERGER and Bert SCHUTTE. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis, *Exp. Cell Res.* **235** : 421-430 (1997).
- 8) DARZYNKIEWICZ, Z., S.BRUNO, G. DEL BINO, W. GORCZYCA, M. HOTZ, P. LASSOTA and F. TRAGANOS. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry* **13** : 795-808 (1992).