

## アポトーシスの検出

### アネキシンVによる細胞膜変化の検出とDNA断片化の解析

アポトーシスの検出は抗がん剤の開発や発生・再生分野など幅広い領域で行われています。放射線や薬剤によるDNA損傷、増殖因子の枯渇などの様々な要因によりアポトーシスは誘導されます。アポトーシスが誘導されると、初期ステージでは細胞膜の変化、中～後期ステージでは細胞質や核の凝縮、タンパク質の切断、DNAヌクレオソーム間の切断、最終ステージではアポトーシス小体への断片化、食細胞による除去が起こります。フローサイトメーターを用いて、細胞膜の変化、ミトコンドリアの変化、TUNEL法によるDNA断片化、DNA染色によるsubG1期を測定することにより、アポトーシスを検出することができます。ここでは図1に示すようなアポトーシス初期で起こる細胞膜の変化をフローサイトメトリーにより検出する例をご紹介します。また、後期にみられる核の断片化を、HCAといわれるイメージングサイトメーターにより測定・画像定量を行う例もあわせてご紹介します。

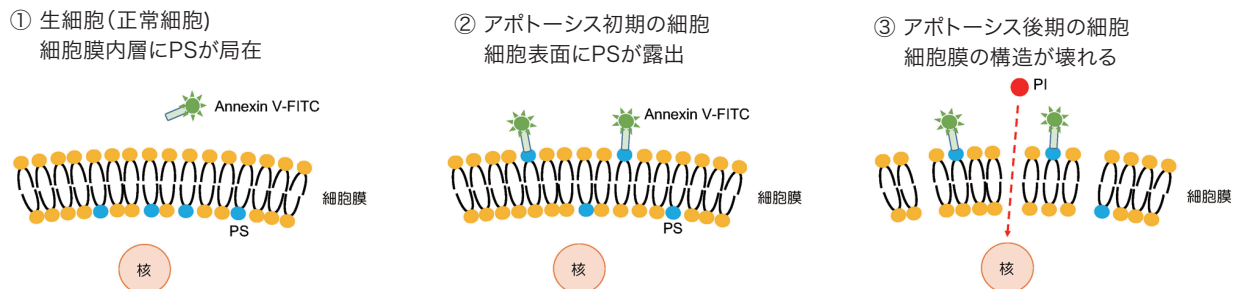


図1. Annexin VとPIによりアポトーシスを検出する原理

生細胞では膜の内側にホスファチジルセリン(PS)が局在するが、アポトーシスが起これるとPSは細胞表面に露出する。そのため、カルシウムイオン存在下でPSに結合するAnnexin Vにより初期のアポトーシス細胞が検出される。アポトーシスが後期まで進行し細胞膜の構造が壊れると、PIの細胞内流入が起こり、核が染色される。

#### 試薬・装置

- ・ ApoFlowEx<sup>®</sup> FITC Kit (EXBIO: cat# ED7044)
- ・ スタウロスポリン (和光純薬工業: cat# 197-10251)
- ・ 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (和光純薬工業: cat# 163-20145)
- ・ -Cellstain- DAPI solution (同仁化学研究所: cat# D523)
- ・ フローサイトメーター (対応可能機種): CyFlow Cube 6/Cube 8, Space
- ・ 共焦点定量イメージングサイトメーター: CQ1 (横河電機)

#### サンプル準備・測定

Jurkat細胞(ヒト急性T細胞性白血病細胞由来細胞株)を10% FBS含有RPMI1640に播種し、スタウロスポリン(プロテインキナーゼC阻害剤)を最終濃度1  $\mu$ Mとなるように添加し、2, 6, 18時間培養した。その後アポトーシスの検出を行なった。



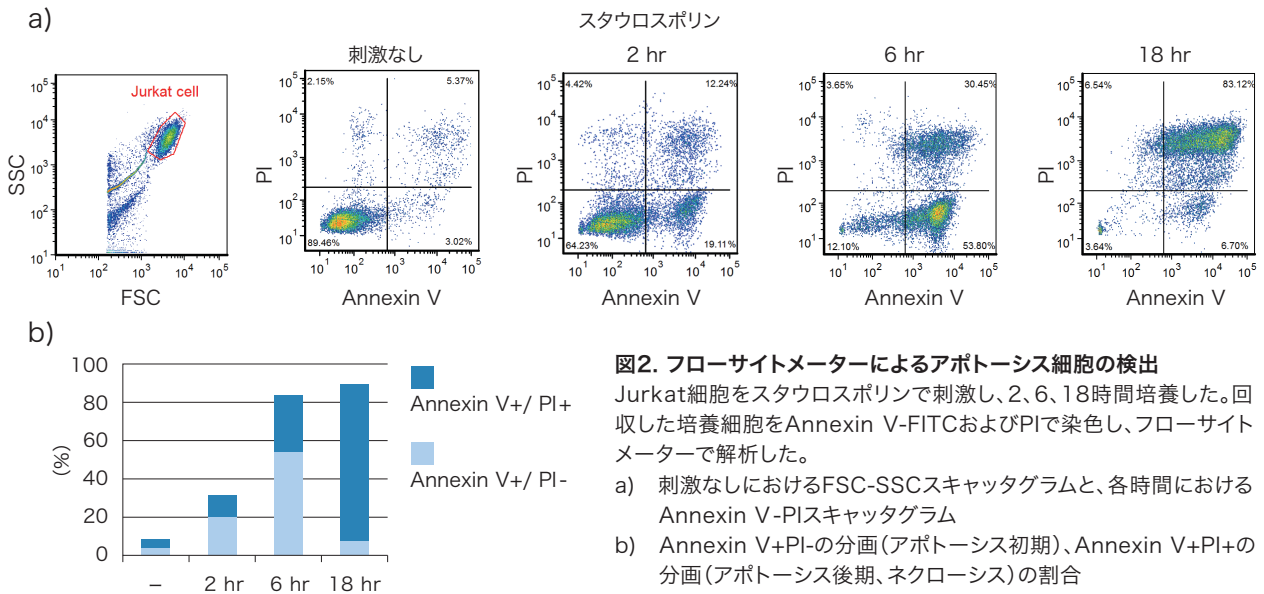
CyFlow Cube 8



CQ1

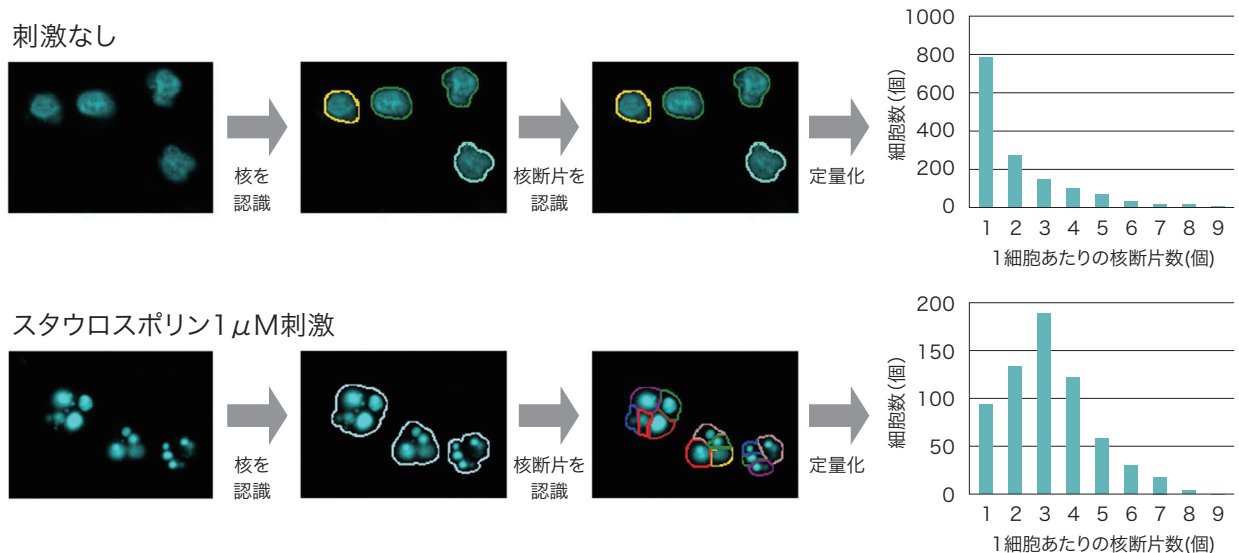
### フローサイトメーターによる検出

各時間刺激後、PBS(-)にて細胞の洗浄を行い、Annexin V Binding Buffer に再懸濁した。Annexin V-FITCを添加し、暗所、室温において15分間のインキュベーションを行った。Propidium Iodide (PI)を添加し、CyFlow Cube 8により測定した。刺激時間の経過とともに、Annexin Vが結合する細胞の割合、さらにPIに染色される細胞の割合が増加することを確認できた(図2)。



### イメージングサイトメーターによる検出

各条件下で培養を行った後、4%パラホルムアルデヒドによる固定を行った。固定した細胞にDAPI solutionを添加して核染色を行い、イメージングサイトメーターにて測定した。スタウロスポリン刺激により核の断片化が進行していることが確認できた(図3)。



発行：シスメックス株式会社 R&I事業本部 事業企画部 細胞計測事業推進課

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317  
 東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557

<http://www.sysmex-fcm.jp>

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。