

FCMによるアポトーシスの検出

ミトコンドリア膜電位変化およびAnnexinVによる解析

アポトーシスは薬剤開発や発生・再生などの研究分野において広く解析されており、様々な評価法が開発されています。ミトコンドリアはカスパーゼ活性化物質であるシトクロムc(Cytochrome c)の放出を介して、アポトーシスに重要な役割を果たしています。シトクロムcの放出により電子伝達系が変化し、膜電位差が消失することが知られており、膜電位変化の測定によりアポトーシスを評価することが可能です。また、細胞外膜へ露出したホスファチジルセリンをAnnexin Vを用いて検出することで、アポトーシス初期状態を評価することが可能です。本アプリケーションノートでは、フローサイトメーター(FCM) RF-500を用いて、ミトコンドリア膜電位変化および細胞外膜に露出したホスファチジルセリンを検出することによるアポトーシス解析例についてご紹介します。

結果

アポトーシスが誘導され、ミトコンドリア膜電位が消失するとMitoProbe DiOC₂(3) のミトコンドリアへの集合が抑制され、細胞の蛍光シグナルが低下します。また、アポトーシスの進行に伴ってホスファチジルセリンが細胞表面へ露出し、Annexin Vの反応性が増加(PerCP-eFluor™ 710蛍光強度が増加)します。このため、ミトコンドリア膜電位の減少または細胞表面に露出したホスファチジルセリンを検出することで、FCMにより細胞のアポトーシスを評価することが可能です。

スタウロスポリン刺激3時間後にはミトコンドリア膜電位の低下およびアポトーシス初期細胞の増加がJurkat細胞(ヒト急性T細胞性白血病細胞由来細胞株)で確認されました。それらの細胞の割合は刺激6時間後にさらに増加し、細胞のアポトーシスの進行が明確に示されました。

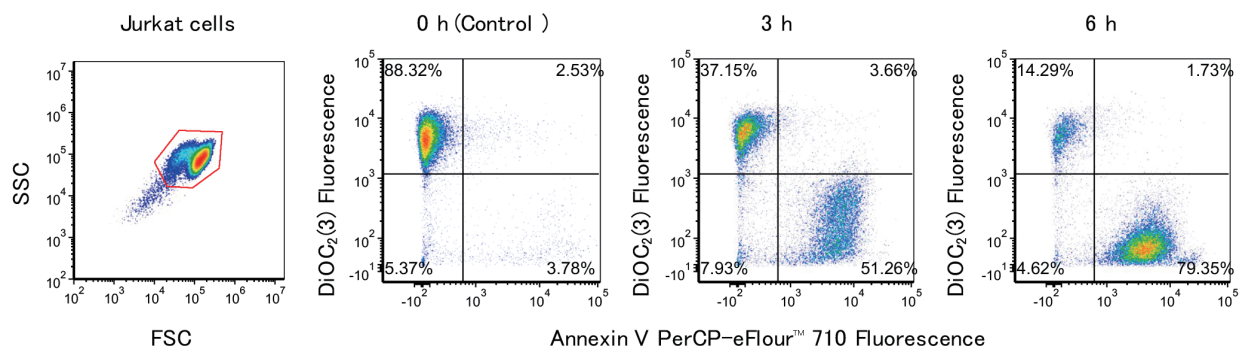


図1 ミトコンドリア膜電位変化とAnnexin V反応性を示したスキャターグラム
(スタウロスポリン刺激後の時間経過)

Jurkat細胞を様々なアポトーシス誘導試薬で刺激して18時間培養した結果、各刺激に応じてアポトーシスが進行していることが示されました。

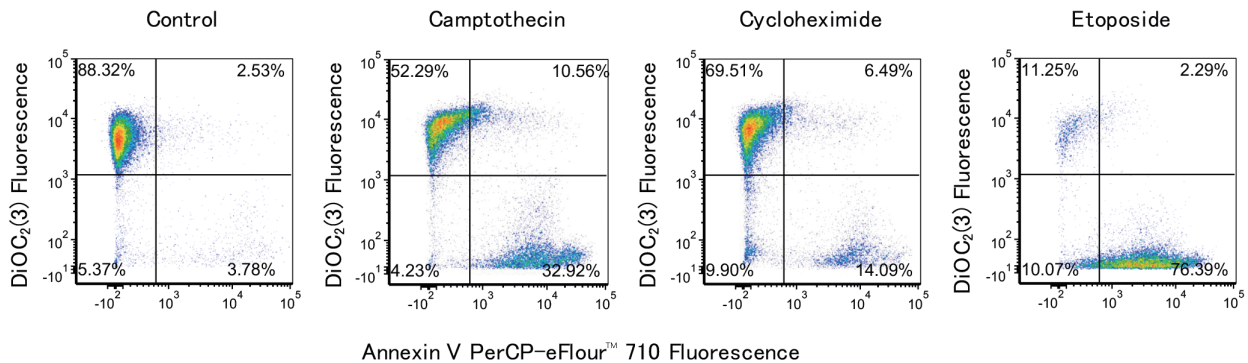


図2 ミトコンドリア膜電位変化とAnnexin V反応性を示したスキャッターグラム
(多様なアポトーシス誘導試薬によるアポトーシス誘導)

サンプル調製

Jurkat細胞を10% FBS含有RPMI1640に播種し、その後アポトーシス誘導試薬 (スタウロスポリン: プロテインキナーゼC阻害剤、Camptothecin: トポイソメラーゼII阻害剤、Cycloheximide: タンパク質合成阻害剤、Etoposide: トポイソメラーゼII阻害剤) を添加し、3~18時間培養しました。

刺激後の細胞をトリプシン処理により回収し、MitoProbe DiOC₂(3) (3-ethyl-2-[3-(3-ethyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]-benzoxazolium iodide、FITC対応フィルターで検出可能) を添加してミトコンドリア膜電位を測定しました。その後、Annexin V- PerCP-eFlour™ 710により細胞を染色し、フローサイトメーター RF-500により測定を行いました。

試薬・装置

- ・ MitoProbe DiOC₂(3) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, cat# M34150)
- ・ Annexin V Apoptosis Detection Kit PerCP-eFlour™ 710 (eBioscience, cat# 88-8008-72)
- ・ スタウロスポリン (和光純薬工業, cat# 197-10251)
- ・ Camptothecin, Cycloheximide - Apoptosis Inducer Set (TaKaRa, cat# PK-CA577-K121-5)
- ・ Etoposide (和光純薬工業, cat# 055-08431)
- ・ フローサイトメーター (対応可能機種) : RF-500, CyFlow Cube 6/8, CyFlow Space
(すべて研究用機器のため診断には使用できません。)

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。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

リサーチセンター 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