

平成30年 2月

宇野勝洋 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之

副主査 岡 田 太

同 初 沢 清 隆

主論文

Bioluminescence-based cytotoxicity assay for simultaneous evaluation of cell viability and membrane damage in human hepatoma HepG2 cells

(ヒト肝癌HepG2細胞における細胞生存率と細胞膜損傷の同時評価のための生物発光に基づく細胞毒性アッセイ)

(著者：宇野勝洋、室富和俊、香月康宏、押村光雄、中島芳浩)

平成30年 Luminescence 掲載予定

参考論文

1. Retargeting of microcell fusion towards recipient cell-oriented transfer of human artificial chromosome

(ヒト人工染色体の受容細胞指向的導入に向けたマイクロセル融合の再標的化)

(著者：平塚正治、上田佳奈、宇野愛海、宇野勝洋、福原早也佳、黒崎創、嵩原昇子、尾崎充彦、香月康宏、黒澤良和、中村貴史、加藤基伸、押村光雄)

平成27年 BMC Biotechnology DOI:10.1186/s12896-015-0142-z

2. Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors

(微小管阻害剤の存在下での細胞周期進行による反復小核形成)

(著者：中山祐二、宇野愛海、宇野勝洋、溝口大和、古本真也、香月康宏、難波栄二、井上敏昭、押村光雄)

平成27年 Cell Structure and Function 40巻 51頁～59頁

3. Development of a safeguard system using an episomal mammalian artificial chromosome for gene and cell therapy

(エピソーム哺乳動物人工染色体を用いた遺伝子治療と細胞治療のためのセーフガードシステムの開発)

(著者：宇野愛海、宇野勝洋、古本真也、鈴木輝彦、平塚正治、尾崎充彦、香月康宏、押村光雄)

平成27年 Molecular Therapy-Nucleic Acids DOI:10.1038/mtna.2015.45

学 位 論 文 要 旨

Bioluminescence-based cytotoxicity assay for simultaneous evaluation of cell viability and membrane damage in human hepatoma HepG2 cells

(ヒト肝癌HepG2細胞における細胞生存率と細胞膜損傷の同時評価のための生物発光に基づく細胞毒性アッセイ)

細胞毒性試験は、培養細胞を用いた実験においては再現性と信頼性を担保するのに必要な試験である。細胞の代謝活性、膜漏出、周期、老化などを解析し、細胞の生存率や増殖率、アポトーシス細胞の有無などによって判断される。従来の細胞毒性試験法には代謝活性を調べるWST-1アッセイやMTTアッセイ、膜漏出を調べるLDHアッセイ、周期を調べる細胞周期アッセイ、老化を調べる酸性 β ガラクトシダーゼアッセイなどが知られている。これらの試験ではテトラゾリウム塩を用い、比色反応によって生成したホルマザンの測定、もしくは直接細胞を染色することで解析している。これらは細胞を破碎し、あるポイントで解析しているに過ぎない。医薬品、化学物質などの毒性データでは、毒性の強弱を含む有無だけでなく、用量依存反応、経時的变化、回復性などのリスク評価に係る情報が重要視されており、これらのデータを取得しようとする多大な労力が必要になる。そこで本研究では同一細胞における経時的变化を解析可能な毒性試験法の開発を行った。

方 法

長期間安定した発現を可能にする人工染色体ベクターを用い、細胞の有無を判断する細胞毒性をモニター用のELucと、細胞膜漏出を判断する膜障害をモニターできるGLuc-KDELの異なる2種類のルシフェラーゼ遺伝子を導入したHepG2細胞を作製した。ルシフェラーゼ導入HepG2細胞を用い、異なる細胞数を播種した培養皿を一日培養し、ELucとGLuc-KDELそれぞれの発光量を測定後、従来法であるWST-1アッセイとLDHアッセイの吸光度の測定を行い、感度の比較を行った。また、毒性が知られている医薬品、化学物質を添加することで故意に細胞毒性を誘導した。細胞毒性と膜障害の経時的变化をELucとGLuc-KDELの発光量で確認すると同時にWST-1アッセイとLDHアッセイを実施し、結果を比較した。

膜障害をモニターすることで、細胞死に至る主要なプロセスであるアポトーシスとネクローシスを区別できるかを確認するため、アミオダロンを添加し細胞死を誘導した上で、エチジウムホモダイマーIII (EthD-III) とアネキシンV-FITCを用いたFACS解析を行った。

また、細胞への直接的な毒性の有無だけでなく、周囲、時間差で与える影響としてダメ

ージ関連分子パターン (DAMPs) の測定を行った。DAMPsは損傷組織、壊死細胞から放出され、免疫、炎症反応などを誘導する危険信号であり、その中でも代表的タンパク質の一つであるHMGB1の測定を行った。

結 果

ELucとGLuc-KDELの発光量は細胞数依存的に上昇した。これは従来法での吸光度の感度と比べても遜色ない結果であった。一方で、少数細胞では発光量はバラつきが小さいのに対し、吸光度のバラつきは大きくなっていった。細胞毒性試験では濃度依存的にELucの発光量が減少、逆にGLuc-KDELの発光量は増大した。同時に行ったWST-1アッセイの吸光度は濃度依存的に減少、LDHアッセイの吸光度は濃度依存的に増大していることが確認できた。

FACS解析の結果、GLuc-KDELの発光量と膜の緩んだ状態の細胞割合は濃度依存的に上昇した。一方で、細胞生存率は濃度依存的、時間依存的に減少した。細胞死に至るプロセスごとに分類して解析を行うと、早期アポトーシス細胞の割合は75 μ Mで時間依存的に減少し、後期アポトーシス細胞の割合は時間依存的に増加、ネクローシス細胞の割合も時間依存的に増加した。発光量とそれぞれのプロセスでの細胞割合との相関関係を求めてみると、ネクローシス細胞との間に強い相関関係にあることが確認できた。アミオダロン処理後GLuc-KDELの発光量とHMGB1のタンパク量を測定すると、どちらも濃度依存的に増大し、強い相関関係があることが確認できた。

考 察

ELucとGLuc-KDELの発光によるアッセイは従来法と同程度の感度で、より安定したアッセイが行えることが確認できたことから、従来法の代替が可能であると考えられる。ELucに関しては基質を培地中に入れておくことで常時発光することからリアルタイムでの測定が、GLuc-KDELは培地上清を少量用いることで測定可能であることから、同一細胞で繰り返し測定が可能であり、経時的变化を観察可能にした。また、GLuc-KDELの発光量はネクローシス細胞と強い相関関係が示せ、HMGB1とも強い相関関係が示せたことから、細胞への直接的な毒性だけでなく、その後の影響までもモニターできると考えられる。

結 論

目的である同一細胞における経時的变化を観察可能な試験法の開発ができた。さらに、膜障害モニターが、DAMPsと関連があることを示せたことから、直接的な細胞へのダメージだけでなく、周辺細胞への影響をも観察できる試験法が開発できた。