

APPLICATION NOTE

サーカディアンリズム評価細胞性能試験：カゼインキナーゼ1δ阻害剤添加実験

1. はじめに

サーカディアンリズムは、睡眠や代謝などの様々な生理現象に関与することが知られています。サーカディアンリズムは、時計遺伝子による調節機構が提唱されており、とくにPER2及びBMAL1を中心とした負のフィードバックループによりリズムが形成されています。

本稿では、サーカディアンリズム評価細胞 (Bmal1-ELuc MEF) に、PERの細胞質内分解を抑制するカゼインキナーゼ1δ (CK1δ) 阻害剤を添加し、その影響を評価した例をご紹介します。

2. サーカディアンリズム測定プロトコル

【細胞】

- サーカディアンリズム評価細胞 (LOT#170331F23007)

【試薬】

- DMEM, high glucose (Wako, CAT#044-29765)
- FBS (Sigma, CAT#172012)
- Penicillin/Streptomycin (GIBCO, CAT#15140-122)
- D-PBS (-) (Wako, CAT#045-29795)
- 0.25% Trypsin/EDTA (Wako, CAT#201-16945)
- Dexamethasone (Sigma, CAT#D4902)
- D-Luciferin (カリウム塩) (TOYOBO, MRL-101)
- CK1δ阻害剤 (PF-670462)

【機器】

- Kronos Dio (ATTO, CAT#AB-2550)

【培地】

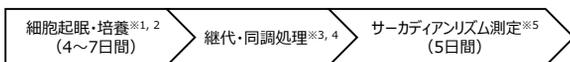
▶ 基本培地組成

DMEM, high glucose	445 mL
FBS	50 mL
Penicillin/Streptomycin	5 mL

【試薬調製方法】

- ▶ Dexamethasone :
エタノールで10 mMに調製し、-20℃で保存。10 mM DexをPBSで1 μMに希釈し、最終濃度100 nMになるよう培地に添加。
- ▶ D-Luciferin :
PBSで50 mMに調製し、-20℃で保存。50 mM D-ルシフェリンを最終濃度100 μMになるよう培地に添加。
- ▶ CK1δ阻害剤 :
DMSOで50 mMに調製し、4℃で保存。50 mM CK1δ阻害剤を最終濃度×1000倍に調製し、0.3 μM、1.0 μMになるよう培地に添加。

【試験スケジュール】



- ※1：細胞の増殖速度はFBSのロット等によって前後することがあります。
- ※2：4日以上培養する場合は、培地交換を行うことを推奨します。
- ※3：10cm dish 80%コンフルで測定用35mm dish約8枚に播種できます。
- ※4：測定2時間前にDex 添加による同調処理を行い、その後ルシフェリン培地に置換して測定を開始します。
- ※5：CK1δ阻害剤は、測定開始24時間後に添加しております。

【試験内容】

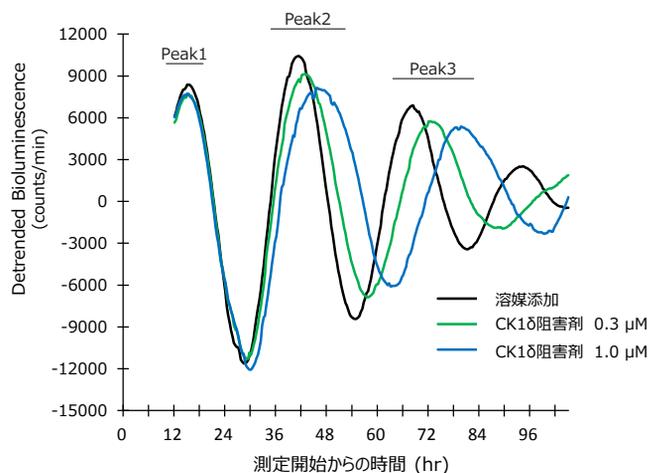
- ▶ 細胞起眠・培養 ⇒プロダクトシート参照
- ▶ 継代・同調処理 ⇒プロダクトシート参照
- ▶ サーカディアンリズム測定・薬剤添加
 - 測定に用いる機器のセットアップ (庫内温度37℃, 5%CO₂, 乾燥防止のための含水スポンジを設置)。
 - Dex培地で2時間処理した後、培地をルシフェリン培地に置換。
 - ルシフェリン培地に置換後、速やかに測定機器内に細胞を移動し、測定を開始。
 - 発光測定開始24時間後、CK1δ 阻害剤をD-ルシフェリン培地に添加。添加後、速やかに発光測定機器に戻し、測定を再開。

【測定条件】

測定時間 : 1分間
 測定間隔 : 20分間
 フィルター : F0 (フィルターなし, 全光)
 デイトレンド処理 : 測定データの前後12時間の移動平均値でトレンド除去
 平滑化処理 : 測定データの前後2時間の移動平均値で平滑化

【測定結果】

サーカディアンリズムの測定は、Dex培地による同調処理後より5日間行いました。CK1δ阻害剤及び溶媒 (DMSO) は、測定開始24時間後に培地に添加しました。CK1δ阻害剤は、最終濃度0.3 μM、1.0 μMで評価しました (下図、代表的データのグラフ)。



CK1δ阻害剤がサーカディアンリズムに与える影響を、各群のピーク間の長さ (周期) で評価しました。その結果、CK1δ阻害剤の濃度依存的な周期の延長が認められました (下表参照)。

	Peak1-Peak2 平均 (hr)	Peak2-Peak3 平均 (hr)
溶媒添加群 (n=2)	24.83	27.00
CK1δ阻害剤 0.3 μM (n=3)	26.67	29.44
CK1δ阻害剤 1.0 μM (n=3)	29.44	32.78