

APPLICATION NOTE

サーカディアンリズム評価細胞性能試験：カフェイン添加実験

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、カフェインを添加し、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)
- カフェイン (Sigma, CAT#C0750)

【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。

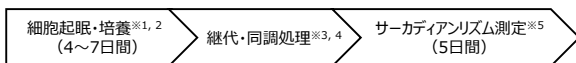
▶ D-Luciferin :

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。

▶ カフェイン :

滅菌水で900 mMに調製し、-20℃で保存。900 mM カフェインをさらに希釈し30×希釈液を調製。最終濃度0.3 mM、1.0 mM、3 mM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：カフェインは、ルシフェリン培地に置換すると同時に添加しております。

【試験内容】

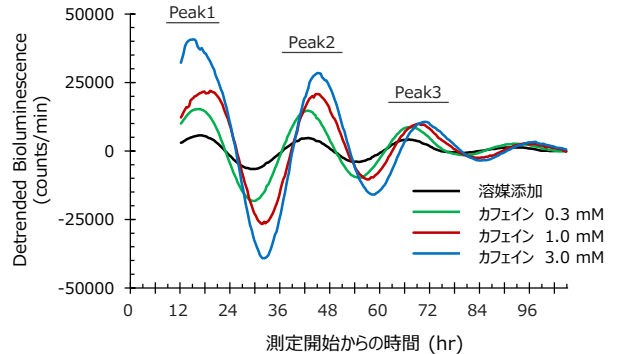
- ▶ 細胞起眠・培養 ⇒プロダクトシート参照
- ▶ 継代・同調処理 ⇒プロダクトシート参照
- ▶ サーカディアンリズム測定・薬剤添加
 - 測定に用いる機器のセットアップ (庫内温度37℃, 5%CO₂, 乾燥防止のための含水スポンジを設置)。
 - Dex培地で2時間処理した後、培地をルシフェリン+カフェイン含有培地に置換。
 - 培地置換後、速やかに測定機器内に細胞を移動し、測定を開始。

【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処理による同調処理後より5日間行いました。カフェイン及び溶媒 (dH₂O) は、ルシフェリンと同時に培地に添加しました。カフェインは、最終濃度0.3 mM、1.0 mM、3.0 mMで評価しました (下図、代表的データのグラフ)。



カフェイン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) と、各ピークの発光活性 (振幅) で評価しました。その結果、3.0 mMのカフェイン添加での周期延長 (Peak1-Peak2平均, n=2, 溶媒群26.17h: 3.0 mMカフェイン群30.33h) とカフェイン添加による濃度依存的な振幅の増加が認められました (下図参照)。

