

【RF-500】*In vitro* 培養ヒト間葉系幹細胞のCD抗原発現解析

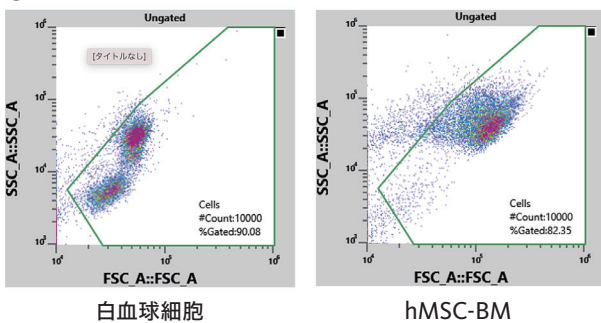
アプリケーションレポート Vol.23

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells, MSC)は様々な細胞への分化能を有し、再生医療の細胞ソースとして注目されています。国際細胞治療学会(International Society for CellularTherapy, ISCT)は、*in vitro* 培養ヒトMSC(human MSC, hMSC)の評価基準として、細胞表面抗原CD73、CD90、CD105が陽性(陽性率95%以上)、CD11bまたはCD14、CD19またはCD79 α 、CD34、CD45、HLA-DRが陰性(陽性率2%以下)であることなどを提案しています[1]。本アプリケーションレポートでは、フローサイトメーター RF-500を用いた*in vitro* 培養hMSCの各CD抗原発現解析の例をご紹介します。

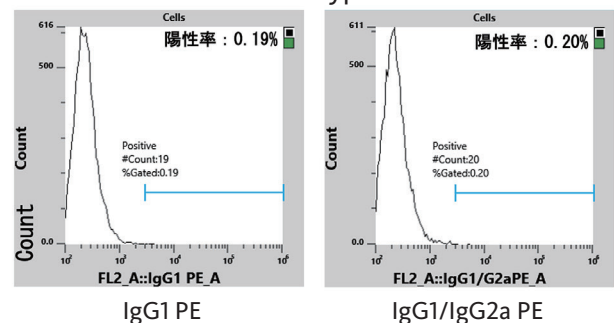
結果

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞(hMSC from Bone Marrow, hMSC-BM)継代細胞を細胞表面抗原(陽性マーカー:CD90, CD73, CD105、陰性マーカー:CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR)に対応する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーター RF-500で測定しました。

① 細胞ゲート設定



② 陽性リージョン設定 (Isotype control)



③ CD抗原発現

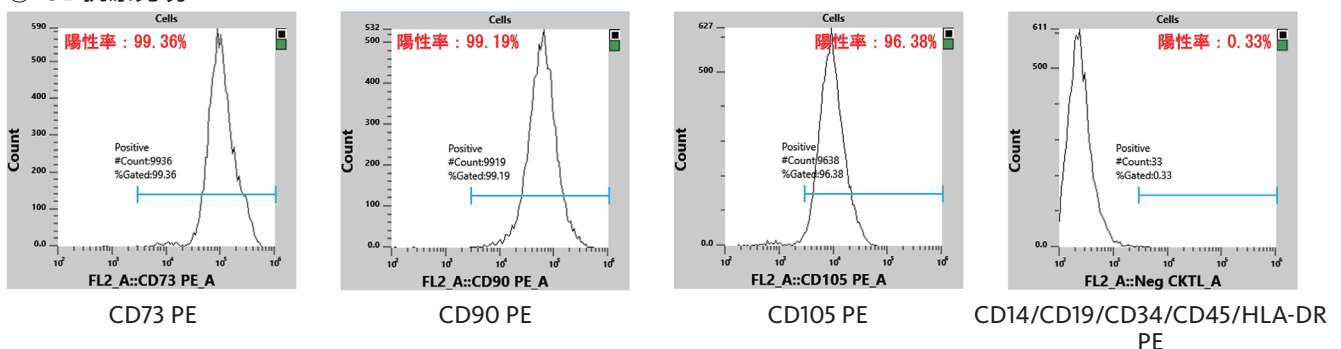


図1. RF-500を用いた*In vitro* 培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞における各CD抗原の発現解析

- ① 白血球細胞が混入していないことも確認するために、散乱光特性に基づき白血球細胞とhMSC-BMを含む領域にゲートを設定
- ② 各CD抗体に対応するIsotype controlの結果を基準に陽性リージョンを設定
- ③ 各CD抗体に対する陽性率を算出

サンプル調製・測定

1. hMSC-BM継代細胞をAccutase-Solution処理により剥離・回収し、eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで 2×10^6 cells/mLに調製する。
2. 下表の通りチューブを用意し推奨量の各抗体を加え、eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで50 μ Lに調製する。

Tube 1.	PE Mouse IgG1, K Isotype Ctrl (FC) Antibody (BioLegend, clone MOPC-21, cat# 400114)
Tube 2.	PE anti-human CD73 Antibody (BioLegend, clone AD2, cat# 344004)
Tube 3.	PE anti-human CD90 Antibody (BioLegend, clone 5E10, cat# 328110)
Tube 4.	PE anti-human CD105 Antibody (BioLegend, clone 43A3, cat# 323206)
Tube 5.	PE Mouse IgG1, K Isotype Ctrl (FC) Antibody (BioLegend, clone MOPC-21, cat# 400114) PE Mouse IgG2a, K Isotype Ctrl antibody (BioLegend, clone MOPC-173, cat# 400212)
Tube 6.	PE anti-human CD11b Antibody (BioLegend, clone ICRF44, cat# 301306) PE anti-human CD19 Antibody (BioLegend, clone HIB19, cat#302208) PE anti-human CD34 Antibody (BioLegend, clone 581, cat# 343506) PE-anti-human CD45 Antibody (BioLegend, clone HI30, cat# 304008) PE anti-human HLA-DR Antibody (BioLegend, clone L243, cat# 307606)

3. 各チューブに50 μ Lの細胞懸濁液を加え、遮光条件下、4°Cで20分間静置する。
4. eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで洗浄・再懸濁し、CellTrics 30 μ mフィルターでろ過後、フローサイトメーター RF-500で測定する。

試薬・機器

- eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer (Invitrogen, cat# 00-4222-26)
- CellTrics 30 μ m (Sysmex, cat# BP486257)
- フローサイトメーター RF-500 (Sysmex, cat# BF209548)

参考文献

- [1] Dominici M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317, 2006.

※ すべて研究用機器・試薬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営業推進部

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032