

In vitro 培養ヒト間葉系幹細胞のCD抗原発現解析 CyFlow抗体によるシングルカラー解析

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, 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 Cellular Therapy, 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CD79α、CD34、CD45、HLA-DRが陰性(陽性率2%以下)であることを提案しています[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とCyFlow抗体を用いた *in vitro* 培養hMSC陽性マーカーのシングルカラー解析例をご紹介します。

結果

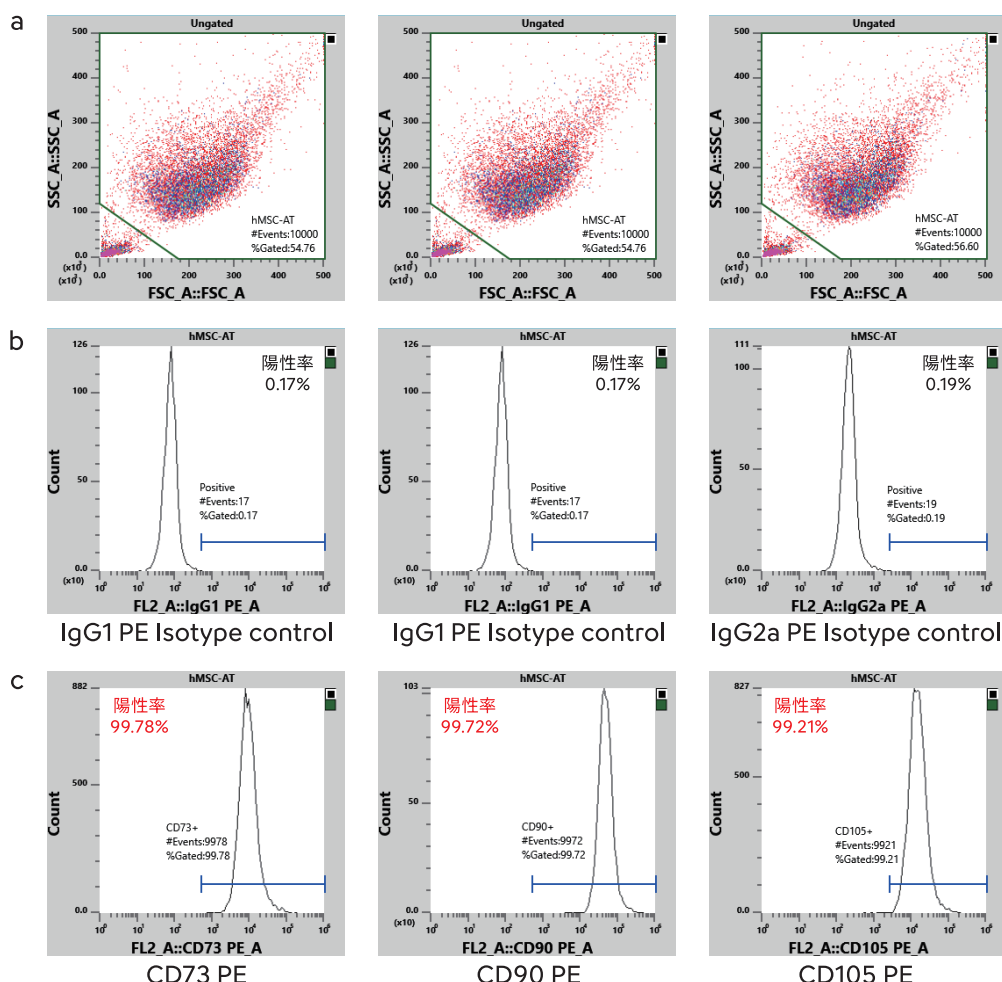


図1. RF-500とCyFlow抗体を用いた *in vitro* 培養脂肪組織由来hMSC(hMSC from Adipose Tissue, hMSC-AT) に対する陽性マーカー(CD73、CD90、CD105)のシングルカラー解析

- 前方散乱光(Forward scatter, FSC)と側方散乱光(Side scatter, SSC)で展開し、バックグラウンドノイズを除いた領域にhMSC-ATゲートを設定
- 各マーカー抗体のIsotype control(陰性コントロール)の結果を基準にPositive(陽性)ゲートを設定
- 各マーカー抗体に対する陽性率を算出

サンプル調製・測定

- hMSC-AT継代細胞をAccutase-Solution処理により剥離・回収し、eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで $2 \times 10^6 - 10^7$ cells/mLに調整する。
- 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.	CyFlow™ IgG1 PE Mouse Isotype Control
Tube 2.	CyFlow™ CD73 PE Anti-Hu; Clone AD2
Tube 3.	CyFlow™ CD90 PE Anti-Hu; Clone 5E10
Tube 4.	CyFlow™ IgG2a PE Mouse Isotype Control
Tube 5.	CyFlow™ CD105 PE Anti-Hu/Rt; Clone MEM-226

- 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。
- 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

- Accutase-Solution, primary human cell culture tested (PromoCell, cat# C-41310)
- eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific, cat# 00-4222-57)
- CyFlow™ IgG1 PE Mouse Isotype Control (Sysmex, cat# BV655324)
- CyFlow™ CD73 PE Anti-Hu; Clone AD2 (Sysmex, cat# BY500144)
- CyFlow™ CD90 PE Anti-Hu; Clone 5E10 (Sysmex, cat# AF411705)
- CyFlow™ IgG2a PE Mouse Isotype Control (Sysmex, clone cat# BY503796)
- CyFlow™ CD105 PE Anti-Hu/Rt; Clone MEM-226 (Sysmex, cat# AL561662)
- 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.

※ 本製品は研究用であり、診断には使用できません。

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

神戸 神戸市西区室谷 1-3-2 〒651-2241

東京 東京都品川区大崎 1-2-2 〒141-0032

sysmex-fcm.jp