

In vitro培養ヒト間葉系幹細胞のCD抗原発現解析 CyFlow™抗体によるマルチカラー解析

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に対するCD抗原のマルチカラー発現解析例をご紹介します。

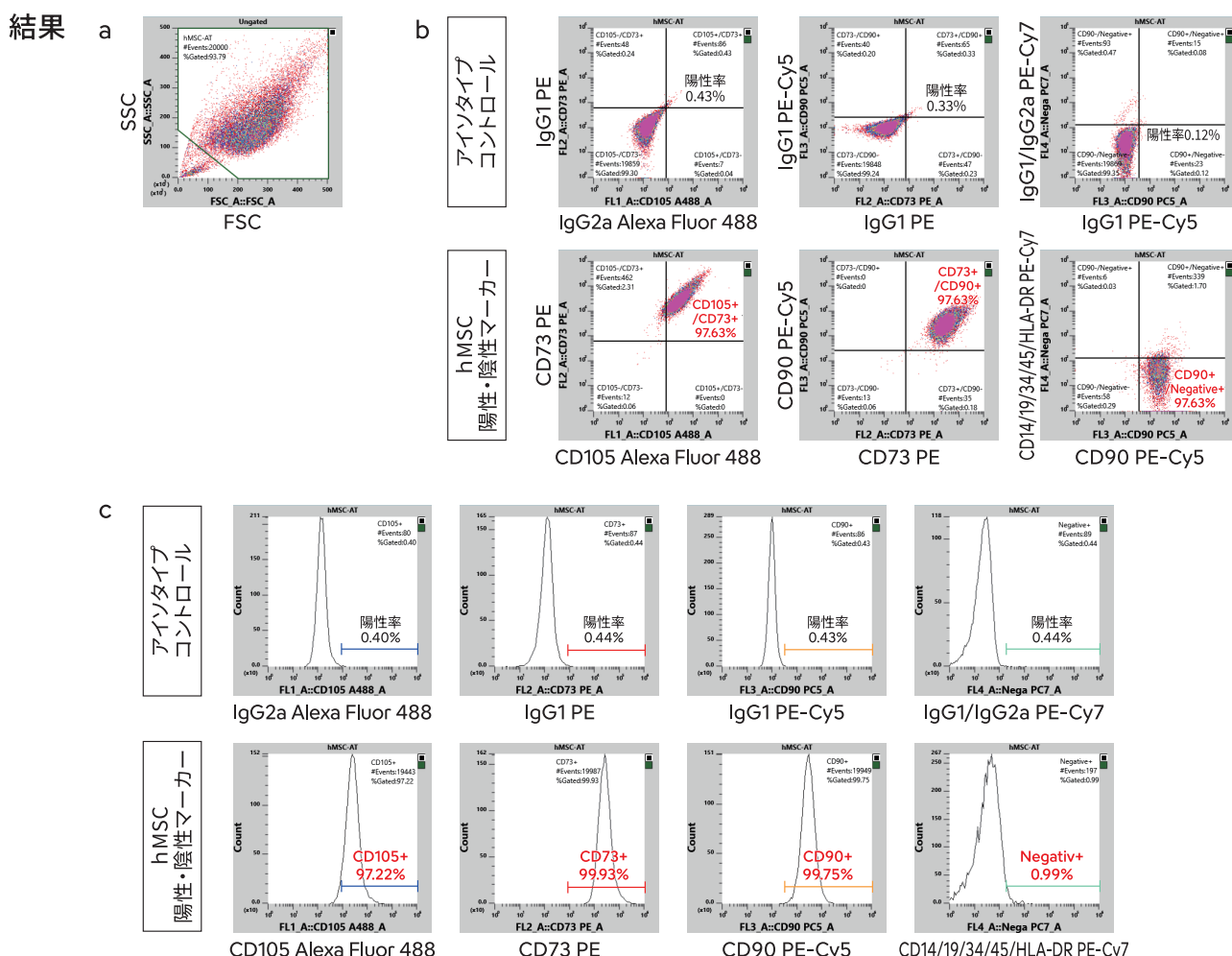


図1. RF-500とCyFlow抗体を用いたIn vitro培養脂肪組織由来間葉系幹細胞(hMSC from Adipose Tissue, hMSC-AT)のCD抗原発現解析

- 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
- アイソタイプコントロールの結果を基準に四分分割ゲートを設定し各マーカー抗体の陽性率を算出
- アイソタイプコントロールの結果を基準に陽性リージョンを設定し各マーカー抗体の陽性率を算出

サンプル調製・測定

1. 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 5×10^6 cells/mLに調整する。
2. 5本のチューブを用意し細胞懸濁液を50 μ Lずつ分注する。
3. 細胞懸濁液を分注したチューブに下表の通り推奨量(CD90 PE-Cy5、IgG1 PE-Cy5 Isotype Controlは50倍希釈して使用)の各抗体を加え、eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで総量100 μ Lに調製する。
Tube 2 – 4は蛍光補正に使用する単染色サンプル。

Tube 1.	• CyFlow™ IgG2a Alexa Fluor™ 488 Mouse Isotype Control (Sysmex, clone MOPC-173, cat# BF508817) • CyFlow™ IgG1 PE Mouse Isotype Control (Sysmex, clone MOPC-21, cat# BV655324) • CyFlow™ IgG1 PE-Cy5 Mouse Isotype Control (Sysmex, clone MOPC-21, cat# AJ384786) • CyFlow™ IgG1 PE-Cy7 Mouse Isotype Control (Sysmex, clone MOPC-21, cat# CF148611) • Mouse IgG2a Isotype Control PE-Cy7 (exbio, clone MOPC-173, cat# T7-724-C100)
Tube 2.	• CyFlow™ CD105 Alexa Fluor™ 488 Anti-Hu/Rt (Sysmex, clone MEM-226, cat# BM597424)
Tube 3.	• CyFlow™ CD73 PE Anti-Hu (Sysmex, clone AD2, cat# BY500144)
Tube 4.	• CyFlow™ CD90 PE-Cy5 Anti-Hu (Sysmex, clone 5E10, cat# AX443352)
Tube 5.	• CyFlow™ CD105 Alexa Fluor™ 488 Anti-Hu/Rt (Sysmex, clone MEM-226, cat# BM597424) • CyFlow™ CD73 PE Anti-Hu (Sysmex, clone AD2, cat# BY500144) • CyFlow™ CD90 PE-Cy5 Anti-Hu (Sysmex, clone 5E10, cat# AX443352) • CyFlow™ CD14 PE-Cy7 Anti-Hu (Sysmex, clone MEM-15, cat# AK184465) • CyFlow™ CD19 PE-Cy7 Anti-Hu (Sysmex, clone LT19, cat# CJ815828) • CyFlow™ CD34 PE-Cy7 Anti-Hu (Sysmex, clone 4H11[APG], cat# CU114497) • CyFlow™ CD45 PE-Cy7 Anti-Hu (Sysmex, clone MEM-28, cat# BG888853) • CyFlow™ HLA-DR PE-Cy7 Anti-Hu (Sysmex, clone L243, cat# CY019403)

4. 遮光条件下、4°Cで20分間静置する。
5. 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)
- 各抗体は上表参照
- 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