

BD FACSAria™ セルソーター

「BD FACSAriaセルソーターによるマウス成体造血幹細胞の多重染色解析」

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 幹細胞研究グループ 大沢匡毅

Keyword : 34KSL、マウス造血幹細胞、高速ソーティング、マルチカラー解析

概要

幹細胞とは、胚または成体の組織に僅かに存在する未分化な細胞のことであり、増殖分化することで組織や臓器を構成する細胞を作り出す能力を持った細胞のことをいう。組織の中では、幹細胞は、必要に応じて増殖分化を行い、組織の恒常性を維持するとともに、組織の損傷の際には組織の修復や再生を引き起こすことができる。このようにして組織全体に柔軟性をもたらすことが幹細胞システムの最大の目的であり、それは、多細胞生物が多様な外的刺激に対し適応し生存していく中で獲得された最も重要な生体システムの1つであるといえる。近年、注目を集めている再生医療は、このような幹細胞システムの特性を医療的に応用しようとするものである。このような新しい医療をより確実なものにするためには、幹細胞の基礎的な特性を明らかにし、幹細胞の増殖分化を主体的に制御できるような技術を開発することが重要になる。人間のような高等生物では、個体発生過程で約200種類以上の細胞系列が生じる。それらの多くは各組織固有の幹細胞により生み出されるものと考えられているが、実際に、幹細胞そのものが厳密に同定されている組織はあまり多くはない。一般的に、幹細胞はごく僅かしか存在しないため、組織の幹細胞を見つけ出すことは極めて難しいのである。幹細胞研究の中でも、最も研究が進んでいるのは造血幹細胞についてであろう。造血幹細胞の研究は、1980年代に入りFACSが

導入され、劇的な進歩を遂げた。特に、1988年、Spangrudeらにより報告されたマウス造血幹細胞の純化法により、それまで、おぼろげにしか判らなかつた多能性造血幹細胞が現実的に純化することができることが明らかになった。我々も独自に造血幹細胞の純化を目指し、 $CD34^{low}, c\text{-Kit}^+, Sca\text{-}1^+, Lin^-$ (34KSL) 細胞画分中に造血幹細胞が高頻度に純化されることを見いだした。この画分法は現在でも、抗体を用いた方法としては、最も純度の高い造血幹細胞が得られる方法である。34KSL細胞はマウス骨髄細胞の0.004%を占めるにすぎず、僅か1個の細胞を致死量放射線照射されたマウスに移植するだけで、約20%以上の確率で1年以上に渡ってマウスの造血系を維持できることが分かった。現在では、この方法とHoechst 33342によるSP (Side Population) 分画とを組み合わせることにより、ほぼ100%の純度で造血幹細胞を単離できるようになっている。

このオリジナルの方法ではBD FACSVantageを用いて幹細胞の純化を行っていた。しかし、BD FACSAriaが発表された後は、この方法をBD FACSAria用に改変し、従来よりも効率よく短時間で造血幹細胞を純化することが可能になった。ここでは、BD FACSAriaによるマウス造血幹細胞の純化法について解説するとともに、従来機種との比較検討の結果と、さらなる多重染色の可能性について紹介したい。



解析方法の概要

マウス骨髄細胞を比重遠心した後、単核球分画を抗CD34抗体、抗Sca-1抗体、抗c-Kit抗体、および、抗Lineage Cocktail抗体 (B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119) で染色し、BD FACSAriaで解析する。このとき、どの蛍光色素を使ってそれぞれの抗体を検出するかが、最も重要なファクターである。我々はさまざまな組み合わせを検討した結果、FITC-抗CD34抗体、PE-抗Sca-1抗体、APC-抗c-Kit抗体を使用し、Lineage陽性細胞の分画にはBiotin-抗Lineage抗体をStreptavidin-PE-Cy7で使用している。死細胞の除去にはPropidium Iodide (PI) を使用し、をまた、抗CD34抗体については、Alexa 405標識した抗体に変えることも可能である。この場合はFL1 (FITC) チャンネルが空くので、さらにFITC化抗体を追加し解析することが可能になる。また、後に詳しく紹介するが、フィルターを追加することで、He-Neレーザー励起によってAlexa660または、Alexa680を使用することが可能になり、これにより、最大で8色の同時解析が可能であることを確認している。

試薬

実験に使用したマウスは全て日本チャールスリバーから購入し、10週齢以上のC57BL/6N雄マウスを用いた。各ブリーダーではC57BL/6Nのリタイヤマウス (6ヶ月齢程度) を販売しているので、実験の内容に応じて使用すればコストを削減できる。ブリーダーはどこでも良いと思うが、移植をするのであれば、日本チャールスリバーのC57BL/6Nはファイティングが少ないので都合がよい。FITC-抗CD34抗体、PE-抗Sca-1抗体、Biotin-抗Lineage抗体 (B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119) はBD Pharmingenより購入した。また、抗c-Kit抗体は当研究室で純化したものをAPCで標識し使用した。抗CD34抗体についても、一部、当研究室においてAlexa405により標識し使用した。

マウス骨髄細胞の免疫染色

頸椎脱臼または二酸化炭素吸飲により安楽死させたマウスより大腿骨を単離し、PBSを使い25Gの注射針により骨髄をフラッシュすることにより骨髄細胞を回収した。骨髄細胞をPBS (Sigma) により二回洗浄した後、PBSに懸濁し、Histopaque-1083 (Sigma) を用いて比重遠心法により単核球分画を得た。骨髄細胞を6mlのPBSに懸濁し、6mlのHistopaque-1083の上に細胞を重層し、15,000回転で15分間遠心することにより、界面に集まった細胞を回収した。この細胞をPBS, 20% FCS, 2mM EDTA, 0.01%NaN₃ (Staining Solution) で洗浄した後に、FITC-抗CD34抗体、PE-抗Sca-1抗体、Biotin化抗Lineage抗体 (B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119) をそれぞれ加え、氷上で30分以上反応させた。これをStaining Solutionで一回洗浄した後に、Streptavidin-PE-Cy7 (BD-pharmingen) を加え、氷上で15分以上反応させた。Staining Solutionで二回洗浄した後に、Staining Solution中に細胞を $2 \sim 5 \times 10^7$ 個/mlになるように懸濁し、BD FACSAriaにより細胞を分離した。

マグネットビーズによるマウス骨髄細胞からのLineage陽性細胞の除去

比重遠心によって得たマウス骨髄の単核球分画に、Biotin化抗Lineage抗体をそれぞれ加え、氷上で30分以上反応させた。Staining Solutionで二回洗浄した後に、マウス4匹に対し0.6mlのBioMag Streptavidin (Qiagen) を細胞に加え、氷上で30分反応させた後、6mlのPBSに懸濁しマグネットによりLineage陽性細胞の除去を行った。

蛍光補正用の脾臓細胞の調整

各チャンネル間での蛍光の漏れ込みを補正するために、我々は便宜上、マウス脾臓のリンパ球を使用している。リンパ球は、造血幹細胞と大きさが似ており、前方散乱と側方散乱を調べると同じゲート (リンパ球ゲート) に入る。よって散乱の特性はお互いに似ているものと予想している。骨髄細胞と同様に脾臓細胞を比重遠心し、リンパ球分画を集め、Staining Solutionで2度洗浄する。10°のリンパ球を必要な蛍光数とネガティブコントロール (通常6サンプル) を分注し、FITC、PE、APC、および、PE-Cy7でラベルしたB220抗体を加え30分反応させる。同時に、PIを加えたサンプルと何も加えないネガティブコントロールを用意する。反応終了後、Staining Solutionで2度洗浄した後に、0.5mlのStaining Solutionに懸濁し、BD FACSAriaにて蛍光補正を行う。

データの収集と解析

1. 蛍光補正用の脾臓リンパ球を用いて、各チャンネルの電圧を調整し、ネガティブ・ポジティブ領域を決定すると共に、蛍光間補正 (Compensation) を行う。
2. 染色した骨髄サンプルを用意し、500,000イベント程度のデータを収集する。
3. 前方散乱 (FSC) と側方散乱 (SSC) のプロットを表示させる。我々は、通常、側方散乱をlogスケールに表示している。これにより、リンパ球画分が強調されると共に、単球・顆粒球の広がりが増大され1つの画分として同定できる (図1B)。ThresholdをFSCに設定し、赤血球およびDebrisを除く。リンパ球画分にゲートをかけP1ゲートを定義する。
4. FSCとPIのプロットを表示させる。PI陰性の細胞にゲートをかけP2ゲートを定義する。
5. P1 and P2ゲートをかけ、APC (c-Kit) とPE-Cy7 (Lineage) のプロットを表示させる (図1C)。Compensationが正しければ、図1Cのようなパターンが得られる。Lineage陰性部分にゲートをかけP3ゲートを定義する。
6. P1 and P2 and P3ゲートの細胞について、FITC (CD34) のヒストグラム表示させる (図1D)。CD34陰性~弱陽性のピークに対しP4ゲートを定義する。
7. P1 and P2 and P3 and P4ゲートの細胞について、APC (c-Kit) とPE (Sca-1) のプロットを表示させる (図1E)。Compensationが正しければ、図1Eのような典型的なパターンが得られる。34KSL細胞は、図1Eで示したように、c-Kit陽性、Sca-1強陽性部位に均一な集団として同定できる。この細胞集団にP5ゲートを定義する。
8. P1 and P2 and P3 and P4 and P5ゲートの細胞をソーティングする。収量を上げたければイベント数は毎秒10,000~15,000個程度が妥当である。この場合、回収率が85%以上、純度が98.5%以上になる。毎秒25,000個でソーティングした場合は、回収率が70%以上、純度が97.5%以上になる。通常、4匹のマウス骨髄を使用した場合、1,500個程度の34KSL細胞が得られるはずである。

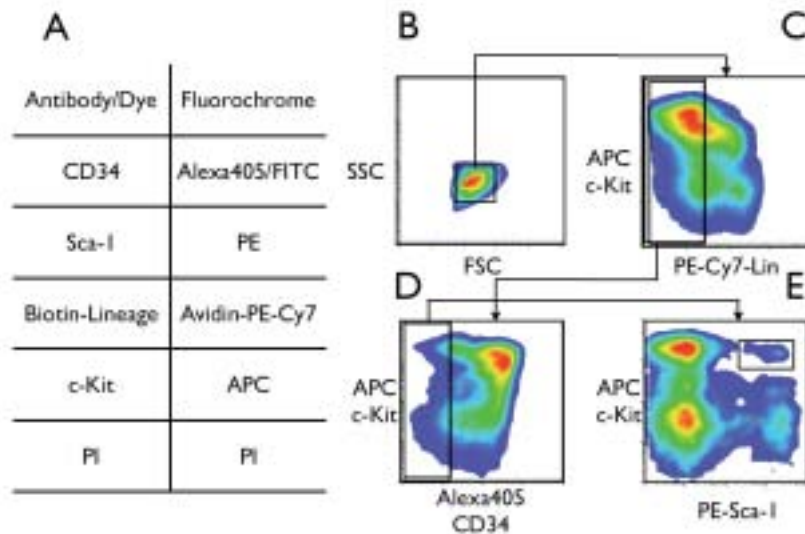


図1

検討結果

1. 34KSL細胞分離のための蛍光色素の検討

BD FACSVantageと比較し BD FACSAriaでは光学系が大きく変更されたので、どの蛍光色素を組み合わせるべきか予め検討する必要があった。そこで、それぞれの色素のBD FACSAriaにおける感度を調べた。マウス脾臓よりリンパ球を分取し、さまざまな蛍光色素で標識したB220/CD45R抗体で細胞を染色し、BD FACSAriaで解析を行った。図2に示したようにAlexa430およびAPC-Cy7についての蛍光強度はあ

まり強くはないものの、その他の蛍光色素については概ね良好な染色パターンを示した。特に、従来から使用している色素 (FITC, PE, APC) に加え、Alexa405, PE-Cy7, Alexa680といった新しい蛍光色素でも非常に良い分離能を示していた。そこで、CD34、Sca-1、および、c-Kitについては従来通りそれぞれ、FITC、PE、APCを使用し、Lineageに関してはPE-Cy7を使用することにした (表1)。

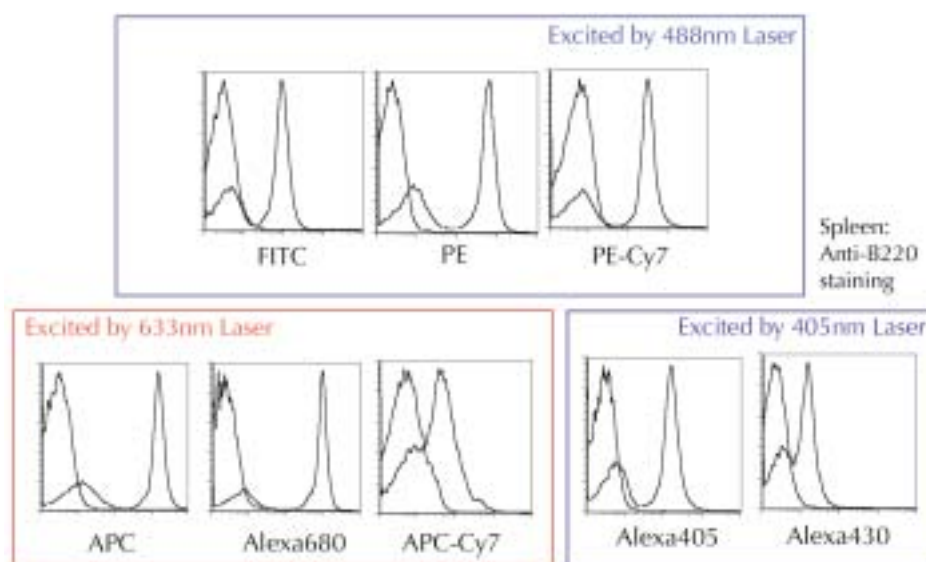


図2

BD FACSVantage SE		BD FACSAria	
Antibody/Dye	Fluorochrome	Antibody/Dye	Fluorochrome
CD34	FITC	CD34	FITC
Sca-1	PE	Sca-1	PE
Dead cell	PI	Dead cell	PI
Lineage	Avidin-Texas Red	Lineage	Avidin-PE-Cy7
c-Kit	APC	c-Kit	APC

表1 BD FACSVantage およびBD FACSAriaにおける蛍光色素の組み合わせ

2. 全骨髄単核細胞からの34KSL細胞分離

従来、BD FACSVantageにより34KSL細胞を分離する場合には、Streptavidin-Magnetic Beadsを使って予めLineage陽性細胞の除去を行って造血幹細胞を濃縮する必要があった。この理由として以下の2点があげられる。BD FACSVantageによるソーティングスピードが1,500個/秒程度が限度であったため全骨髄単核細胞を使用するとソーティング時間が長時間になってしまうため。全骨髄細胞に占める34KSL細胞の頻度が0.004%と極めて低いために、全骨髄単核細胞を用いて解析を行うとノイズにより34KSL細胞集団を同定することが困難になること。これに対し、BD FACSAriaでは、ソーティングスピードが25,000個/秒程度まで上げることができ、また、蛍光の検出が従来のJet-in-air方式からSense-in-quartz方式に変更になりノズルや水流の振動に由来するノイズの低減が期待できることなど、ソーティングの性能上の大幅な向

上が図られた。このような点から、BD FACSAriaを用いれば、Lineage陽性細胞を除去すること無しに、全骨髄単核細胞から34KSL細胞を分離できる可能性があることが考えられた。そこで、上記の方法に従って全骨髄単核細胞を染色し、BD FACSVantageとBD FACSAriaの間で34KSL細胞の染色性の比較を行った。図3に示したように、BD FACSAriaで解析した場合は34KSL細胞画分が明瞭に認められたのに対し、BD FACSVantageでは34KSL細胞画分が不明瞭になった。現在、我々は、Lineage陽性細胞を除去すること無しに全骨髄単核細胞を染色し、BD FACSAriaにより34KSL細胞を分離している。これにより、表2にあるように調整時間を従来と比べ約2時間短縮できたと共に、高価で煩雑なLineage細胞除去処理を省くことができるようになった。

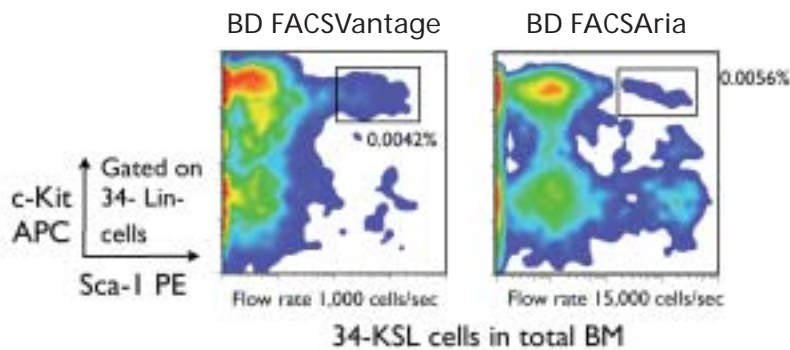
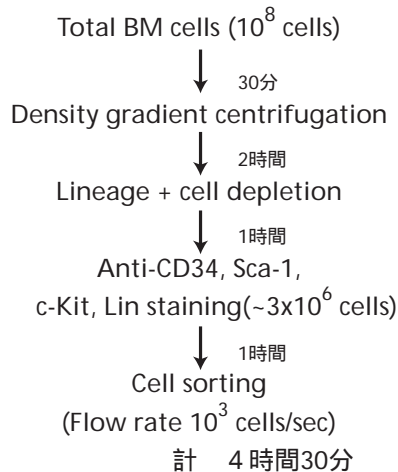


図3

BD FACSVantage SEを使用する場合



BD FACSAriaを使用する場合

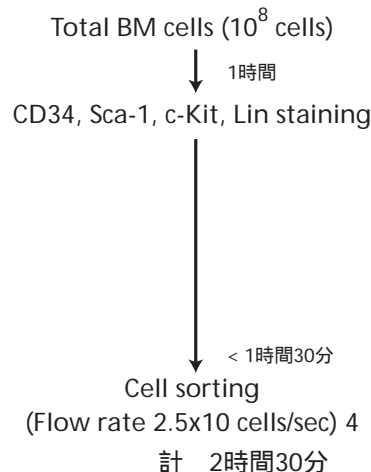


表2 マウス造血幹細胞の分離法（従来法との比較）

回収率および純度の検定

BD FACS Ariaでは、ソーティングの理論が大幅に改良され、高い純度を保ちながら高速ソーティングを行うことが可能になった。ここでは、BD FACS Ariaソーティングの性能を実際に調べるために、ソーティングスピードを5,000個/秒～25,000個/秒まで変えて全骨髄単核細胞から34-KSL細胞分離し、再解析することで純度と回収率を検定した。図4に示したように5,000個/秒でソーティングを行った場合は、純度98.6%であり、回収率95%以上であった。この場合、34-KSL画分に入らなかった細胞の多くは、ソーティングの過程でダメージを受け死んだ細胞に由来し、生存している細胞にゲートをかけ純度を検定すると、99.5%になった。これに対し、25,000個/秒でソーティングを行った場合は、純度95.9%（生細胞中の純度は98.5%）であり、回収率は70%以上になった。回収率の低下は理論的に算出される値とほぼ同等であった。（ウェブサイトより理論値の算出が可能：<http://facs.scripps.edu/recovery.html>）

以上の結果より、BD FACS Ariaでは、25,000個/秒までの高速ソーティングが可能であり、高い純度と回収率を期待できることが分かった。

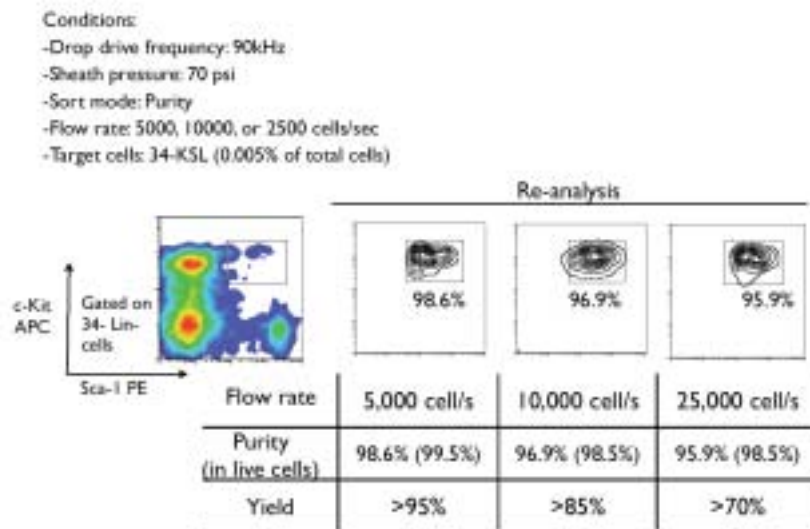


図4

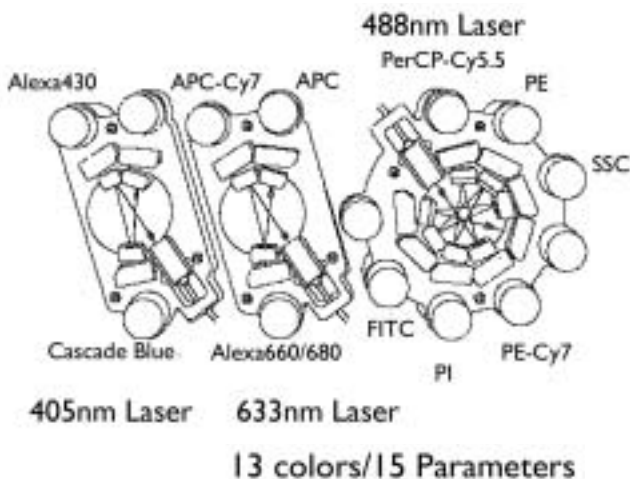


図5

多重染色の検討

図5にBD FACS Ariaの蛍光検出器の構成を示した。BD FACS Aria示したように、最高で13カラー/15パラメーターの解析が可能である。しかし、実際に使用できる蛍光色素に限度があることから、我々の研究室では図5のような構成になっている。我々は、633nmのレーザー励起光の検出系に、690nmのLPミラーと710/20のダイクロイックミラーを独自に導入し、633nmのレーザー励起により3カラーの解析ができるようにしている。これにより、図2に示したように、FITC、PE、APCに加え、Alexa405、PE-Cy7、Alexa660/680、APC-Cy7といった新しい蛍光色素が使用可能になった。表3に我々の研究室の検出器の構成と使用可能な蛍光色素をまとめたので参考にさせていただきたい。

我々は、このような検出器の構成を元に、34-KSL細胞のさらなる多重染色を試みた。まず始めに、CD34抗体をAlexa405でラベルし、Violetレーザーで検出するように変更した。これにより、FITCチャンネルで別の抗体を検出できるようになる。FITC化した抗体は容易に入手できるのでこのメリットは大きい。図7にCD34抗体をAlexa405で検出した際の34-KSL細胞の染色パターンを示した。このパターンはFITC-CD34抗体を使用した際に得られるパターンと同一であり、CD34抗体をAlexa405で検出しても問題がないと考えられた。

Laser	LP mirror	BP Filter	Fluorochromes
488nm	502	488/10	Side scatter
	556	530/30	FITC, GFP, Rhodamin123
	595	575/25	PE
	655	610/20	PI
	735	695/40	PerCP-Cy5.5
633nm		780/60	PE-Cy7
	690	660/20	APC
	760	710/20	Alexa660 or 680
405nm		780/60	APC-Cy7
	502	450/40	Alexa405, Pacific Blue, Cascade Blue, Alexa430, Cascade Yellow, Lucifer Yellow

表3 当研究室におけるBD FACS Ariaの光学系の構成と使用できる蛍光色素

次に、前述のように633nmのレーザー励起光の検出系を変更し、APCとAPC-Cy7の間で、Alexa660/680を検出できるようにした。この3色の色素の間で蛍光補正が可能かどうかを調べる目的で、脾臓細胞を、APC-CD8抗体、Alexa680-CD45R (B220) 抗体、APC-Cy7-CD4抗体で染色し、それぞれ陽性細胞を分離することが可能かどうかを調べた。その結果、図6に示したように、これらの3色素間でのCompensationは可能であり、633nmのレーザー励起により、3色同時に解析できることがわかった。

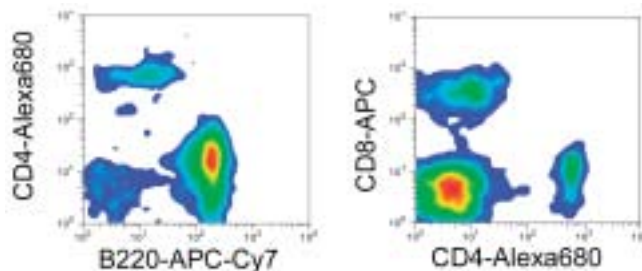


図6

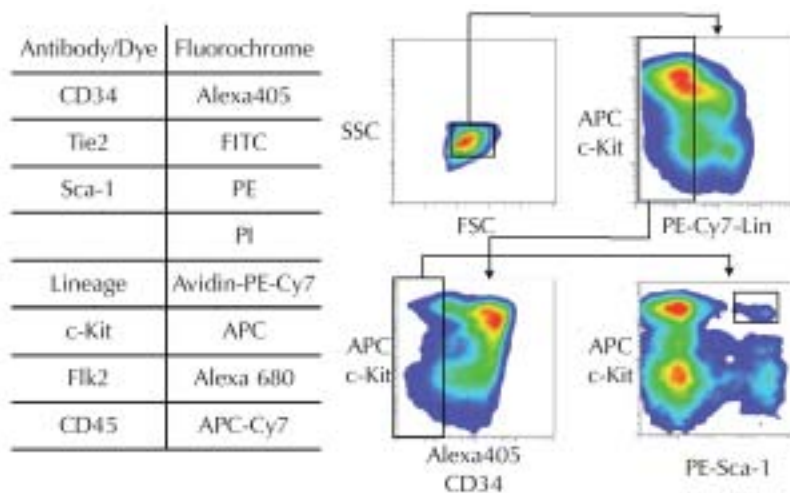


図7

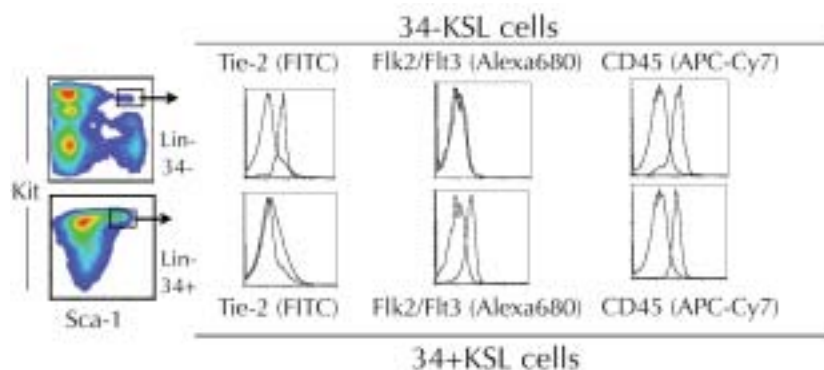


図8

- High resolution: able to analyze 0.005% population
- Sorting performance: purity >97% yeild >70% @ 25k/s
purity >99% yeild >90% @ 5k/s
- Multi-color analysis: 8 colors/10 parameter

結論

以上まとめると、BD FACSAriaでは従来機と比べ、光学系/検出系の大幅な改良が図られ、より高感度で分解能が高い解析が可能になった。同時に、ソーティング理論の改良やソーティングスピードの向上が図られ、より正確にかつ高速にソーティングを行うことが可能になった。これらの改良により、マウス全骨髄単核細胞からでも、0.005%しか存在しない造血幹細胞（34-KSL細胞）を同定し、それを高い純度（>97%）を保ちながらソーティングすることが可能になった。また、我々は、検出器のフィルターを変更することで、合計8色10パラメータの解析が可能であることを確認した。現在、色々な抗体が入手可能になっており、これらの抗体を組み合わせ、多重染色を行い、厳密に細胞を分離することが可能になった。今後、多重染色の技術は、血液学や免疫学の分野だけではなく、様々な組織より特定の細胞を分離しようとする時にも、1つの有用な手段になると思われる。

PROFILE

氏名：大沢 匡毅（おおさわ まさたけ）
医学博士

所属：理化学研究所
発生再生総合研究センター
幹細胞研究グループ 研究員



経歴：

- ・昭和61年 千葉大学大学院理学研究科修士課程入学
- ・昭和63年 千葉大学大学院理学研究科修士課程終了
- ・平成6年 筑波大学医学研究科博士課程入学
- ・平成9年 筑波大学医学研究科博士課程終了、
医学博士号取得

研究テーマ：

体内の幹細胞がどのような仕組みで制御され、維持されているのかを明らかにすることを目的に研究。幹細胞の持つ制御機構を総合的に理解するため、幹細胞自体と、その周囲の環境の2つを同時に解析することで研究を進めている。



輸入販売元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052

ホームページアドレス：<http://www.bd.com/jp/>

製造元

BD Biosciences

製品関連・資料請求 ☎ : 0120-8555-90
(お客様情報センター) Fax : 024-593-5761

機器・メンテナンス ☎ : 0120-7099-12

アプリケーション : 03-5805-9960
(技術研修室ホットライン)