

細胞治療におけるフローサイトメトリ(FCM)の有用性 ～ 高速ソーティングによる細胞機能への影響～

廣瀬弥保¹・小林民代¹・田中聡¹・生井吉郎¹・
Dennis Sasaki²・豊田裕夫¹

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社バイオサイエンス¹
BD Biosciences Pharmingen²

1. 概要

【目的】

再生・細胞治療において、目的とする特異的細胞集団を迅速にソーティングすることは重要な課題とされてきた。近年のFCM技術の発達により、特異的細胞集団の高速ソーティングは可能となってきた。しかしながら、回収された細胞の機能に関する検証は、ほとんど行われていない。そこで本研究では、2種類の性状の異なる培養細胞（HL-60、HAEC）を用いて増殖能およびPMA誘導時におけるサイトカイン産生、ヒト末梢血単球を用いて樹状細胞への分化誘導に対する高速ソーティングの影響を検討した。

【結果及び考察】

シース圧の違いによる細胞生存率への影響は認められなかった。また、PMA誘導時のサイトカイン産生及び表面抗原発現へのシース圧の影響も認められなかった。単球から樹状細胞への分化に関しては、いずれのシース圧でソーティングした場合にもDCマーカーの発現が見られた。以上のことから、FCMを用いた高速ソーティングによる細胞機能への影響は少なく、再生・細胞治療においてFCMは細胞を分取するうえで有用な手段であることが明らかになった。

2. 高速ソーティングの検証

<目的>

フローサイトメトリにおいて高速ソーティングは、Dead timeとElectronic Abort、FrequencyとPressure、ドロップの形成数とSort Conflictsの3種類の関係によって規定されている。

現在、多くの液滴を形成し、細胞を速く流すことにより、高速ソーティングが可能と認識されているが、その詳細な解析はなされていない。本実験では、標準ビーズと細胞を用いて、高速ソーティングの最適条件の検討を行った。

<方法>

6 μ m YGビーズ、6 μ m 633ビーズによる光軸調整



AccuDropビーズによるDelay Timeの設定



CaliBRITE Beads、または溶血細胞中の目的集団を解析



絶対数測定用Tru Countチューブに直接ソーティング



ソートサンプルの絶対数と純度をFACSCaliburを用いて解析

< 結果及び考察 >

Fig. 1 FACS Vantage SEによる20% Beads ソーティング結果

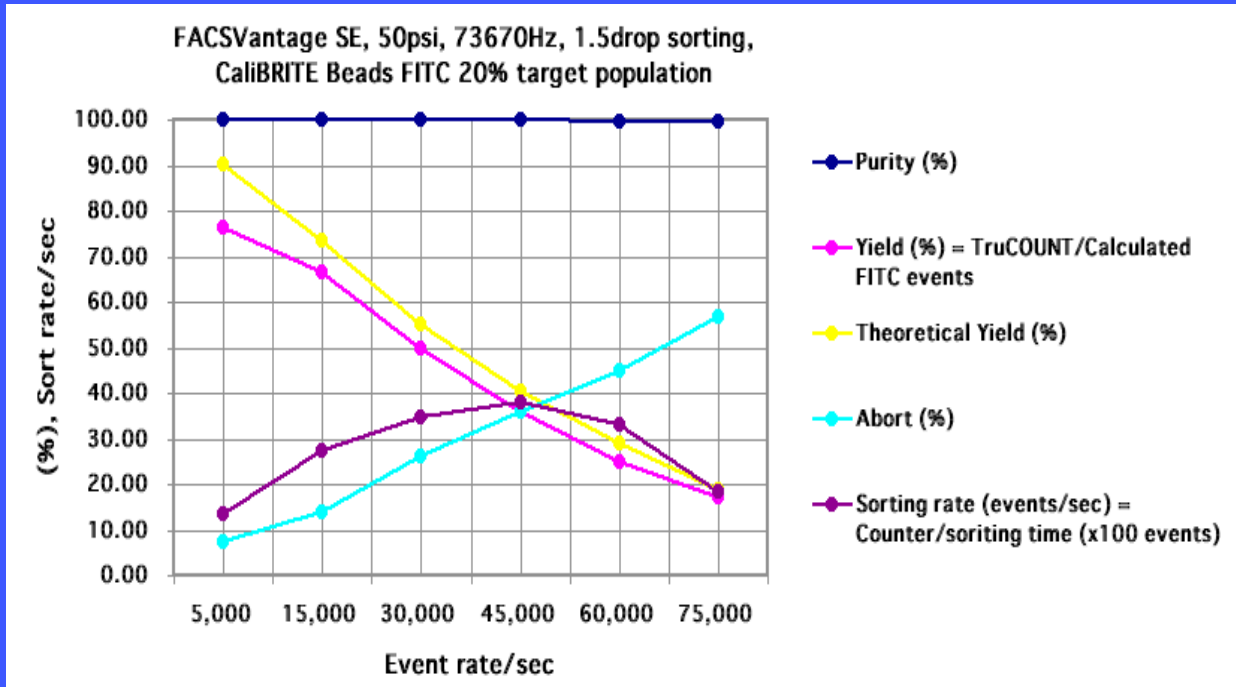
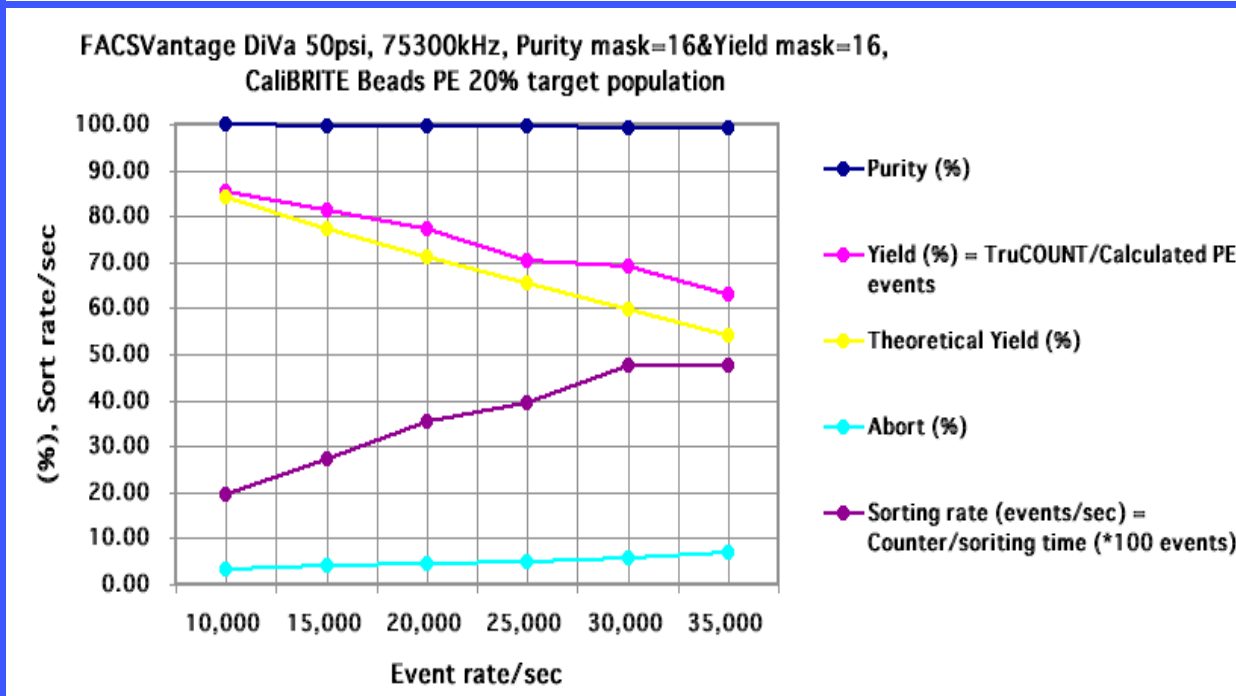


Fig. 2 FACS Vantage DiVaによる20% Beads ソーティング結果



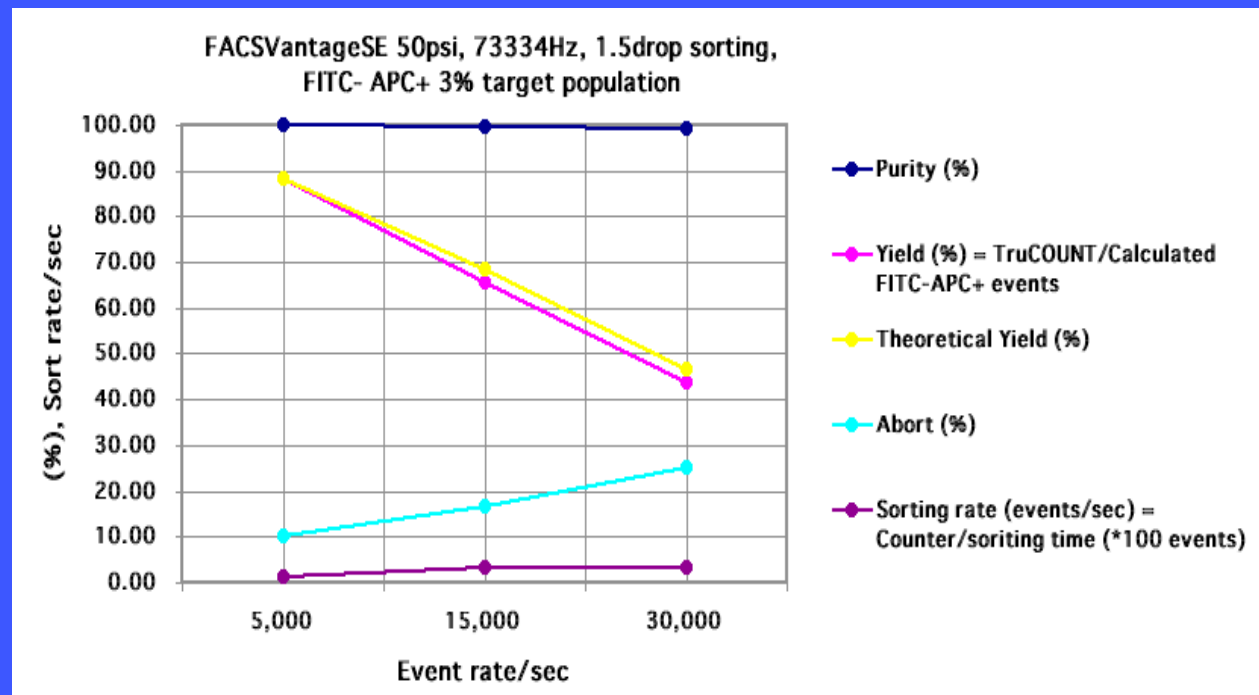


Fig. 3 FACSVantageSEによる3% WBC ソーティング結果

FACSVantageSEを用いて測定した場合、75,000 Event rate/sec以上においてもPurityを99%以上に保つことが可能であった。また、この条件下ではYieldが著しく低下することも明らかになった。したがって、最も効率良く高速ソーティングを行うには30,000 events/sec前後であると考えられる (Fig. 1)。一方、FACSVantageDivaでは、YieldがFACSVantageSEに比べ10%以上前後向上した。この傾向は、Event rateが高くなるにつれて強くなり、最大で約20%向上することが明らかになった (Fig. 2)。これら、全ての実験値は理論値による計算結果と一致していた。

また、細胞を用いてソーティングした場合でも、ビーズの場合と同様の結果を得ることができた。(Fig. 3)。

以上のことから、高速ソーティングは非常に有用な手段であることが明らかになった。実際に細胞をソーティングする場合は、実験目的を考慮し、条件設定を行うことが重要である。

3. 細胞機能への影響

<目的>

高速ソーティングを行うためには、流速と振動数を上げ、より多くの液滴を形成する必要がある（別紙参照）。その際、細胞は通常よりも高いシース圧の中を流れるため、高圧下における何らかの影響を受けている可能性も考えられるが、その影響は十分に検証されていない。

そこで、本研究では、高速ソーティング時における細胞機能への影響として、細胞生存率、PMA誘導時におけるサイトカインの発現などを指標として検証した。

3-1. 生存率の検証

<方法>

HL60及びHAECをPBSで洗浄



10%FBS/PBS(-)に添加後、HL60はCD13、HAECはPECAM-1で標識



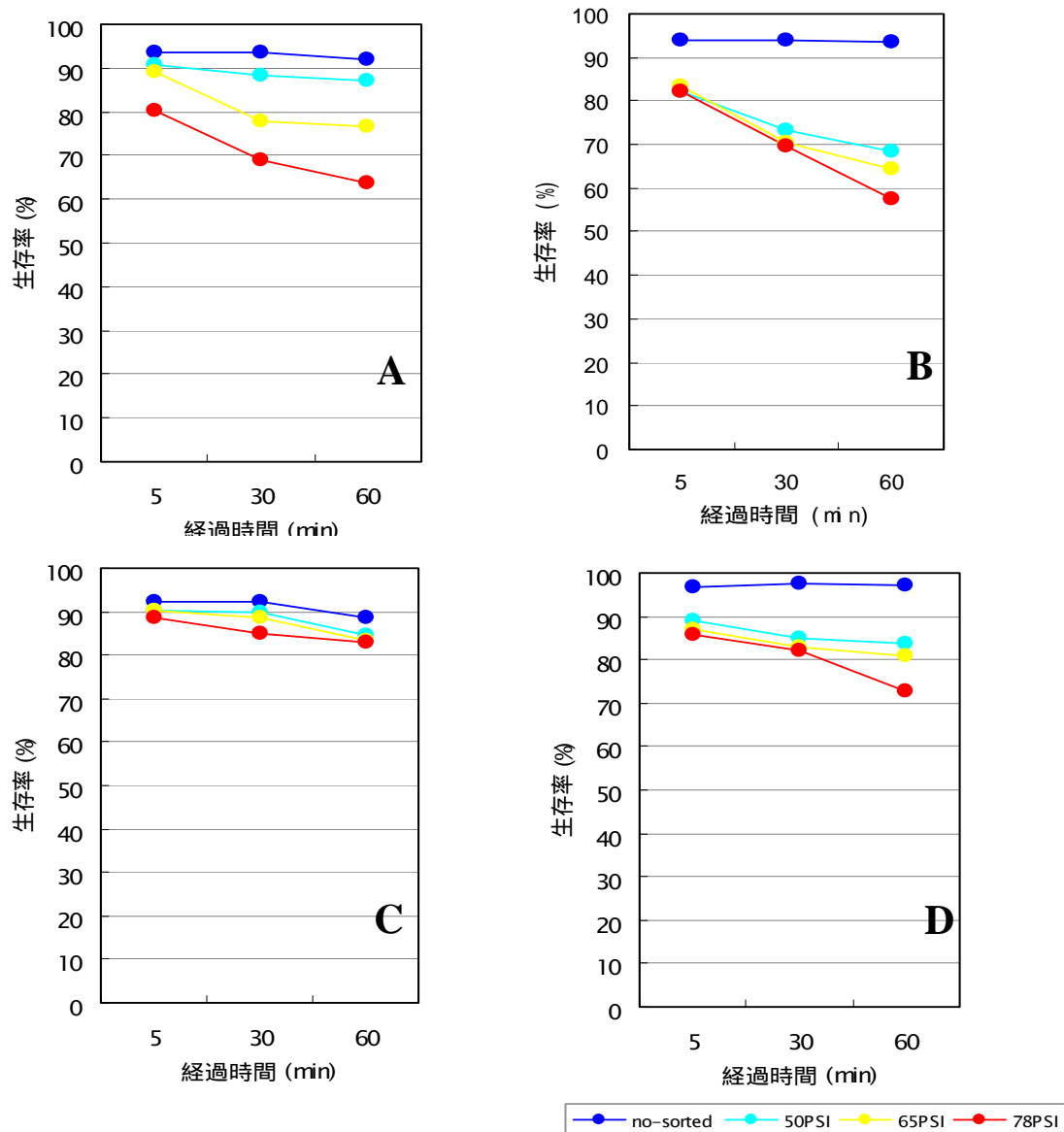
1ml 10%FBS/PBSを添加した試験管に、FACSVantageSEを用いて50, 65, 78PSIでソーティング



遠心後、HL60及びHAECを各培養液に懸濁



ソーティング直後、30、60分後、PI（最終添加濃度5 μ g/ml）で標識し、FACSを用いて生存率を求めた



<結果>

- ・ Fig. 4すべてにおいて、シース圧が上がるにつれ、生存率は低下した。
- ・ 時間が経過するにつれ、生存率の低下は氷上でインキュベートした場合に強く見られた。また、その傾向は、浮遊細胞のHL60より付着細胞のHAECで強く見られた。

<考察>

浮遊細胞のHL60より付着細胞のHAECの方がシース圧に弱いことが明らかになった。また、細胞の生存率へは、シース圧よりも保存状態の方が強く影響を及ぼすことも明らかになった。

Fig. 4 高速ソーティング後の時間経過に伴う細胞生存率の変動

A; HL60を氷上でインキュベート B; HAECを氷上でインキュベート
C; HL60を37°Cでインキュベート D; HAECを37°Cでインキュベート

3-2. サイトカイン産生、表面抗原発現の検証

<方法>

浮遊細胞HL60について

HL60をCD13で染色し、50, 65, 78 PSIでSorting

↓
PMAで刺激

↓
24時間培養後、細胞を採集し、表面抗原 (CD14/CD11b)をFACS解析

↓
72時間培養後細胞を採集し、表面抗原 (CD14/CD11b) をFACS解析

↓
24, 72時間培養後、上清を採集し、ELISAkitを用いサイトカイン(IL-8, TNF- α , MCP-1)を Microplate Readerを用いて測定

付着細胞HAECについて

HAVEをPECAM-1 / ICAM-1で染色し、50, 65, 78 PSIでSorting

↓
24時間培養

↓
TNFで細胞を刺激

↓
24時間培養後、細胞を採集し、表面抗原 (PECAM-1 / ICAM-1, VCAM-1 / CD34) をFACS解析

HAVEをPECAM-1で染色し、50, 65, 78 PSIでSorting

↓
24時間培養

↓
PMAで細胞を刺激

↓
24時間培養後、上清を採集し、ELISAkitを用いサイトカイン(IL-8)をMicroplate Readerを用いて測定

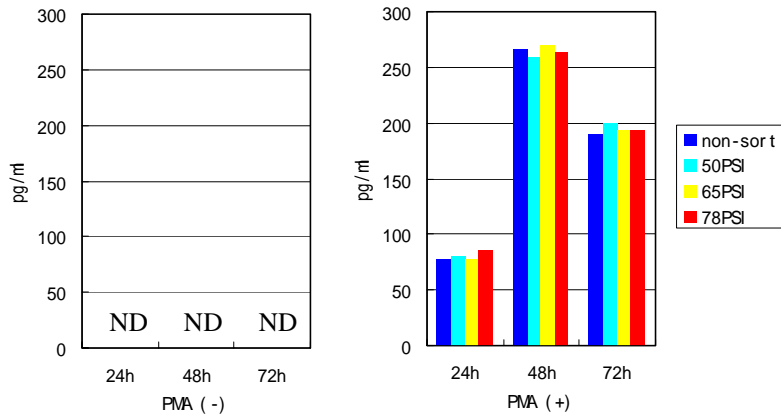


Fig. 5-A HL60におけるPMA刺激によるIL-8産生能

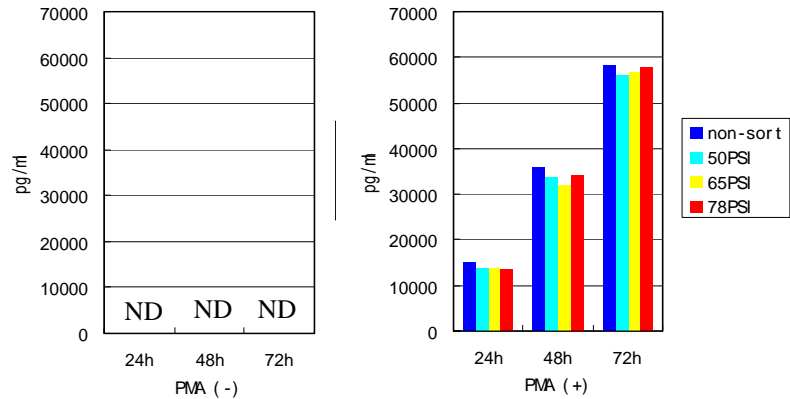


Fig. 5-B HL60におけるPMA刺激によるTNF-α産生能

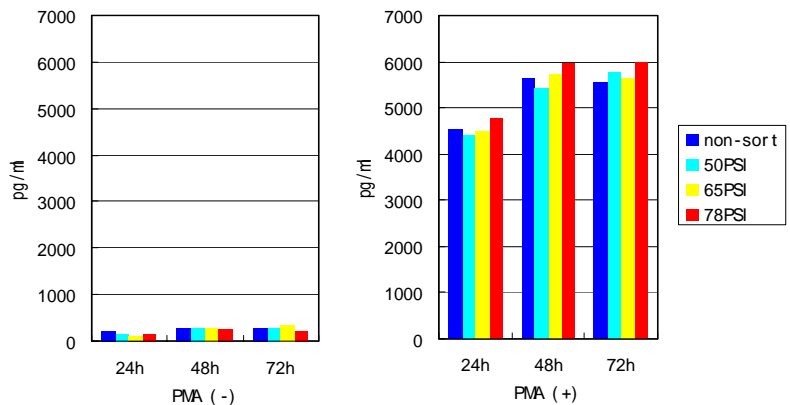


Fig. 5-C HL60におけるPMA刺激によるMCP-1産生能

<結果及び考察>

シース圧による浮遊細胞HL60のIL-8, TNF-α, MCP-1産生能への影響は見られなかった(Fig. 5)。同様に、付着細胞HAECのIL-8産生能へのシース圧の影響も確認されなかった(Fig. 6)。

また、表面抗原の発現においてもHL60, HAECともにシース圧による影響は見られなかった(data not shown)。

以上のことから、細胞のサイトカイン産生及び表面抗原発現へのシース圧の影響はほとんどないと考えられる。

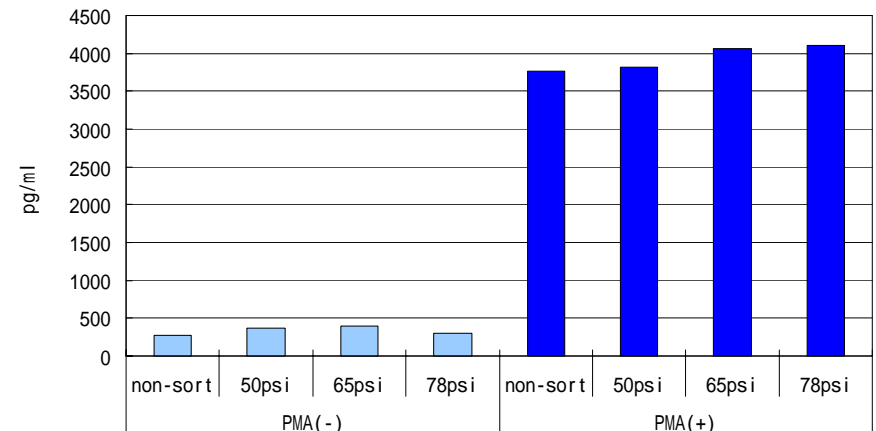


Fig. 6 HAECにおけるPMA刺激によるIL-8産生能

3-3. 単球から樹状細胞への分化への影響

<方法>

Lymphoprepで白血球画分を抽出



PBSで洗浄後、CD14/FITCで染色し、50, 65, 78PSIでソーティング



ソーティング後、PBSで洗浄し、RPMI1640+10%FBSの培地で培養。この際、IL-4(50ng/ml), GM-CSF(100ng/ml)を添加



2日後、TNF- α (10ng/ml)を添加し、さらに4日間培養



回収し、FACSで解析

<結果及び考察>

いずれのシース圧においてソーティングした細胞であっても、同様のDCマーカー(HLA-DR, CD86, CD80, CD14, CD11c, CD11b)の発現がみられた(data not shown)。また、いずれのシース圧でもCD14の発現が0%になっていたが、これはソーティングした細胞すべてがDCに分化したためと考えられる(Fig. 7)。

以上のことから、シース圧は細胞機能へ影響を及ぼさないと考えられる。

<まとめ>

以上、全ての結果より、高速ソーティング時には、ただ液滴を増やすのみで無く、実験目的に合わせた条件設定が必要であることが明らかになった。また、細胞を用いた実験においても、ソーティング時の保存条件が細胞の生存率に影響を及ぼすものの、シース圧による生存率、サイトカイン産生能への影響は、78PSIまでほとんど無いことが明らかになった。

以上のことから、**高速ソーティングは、目的細胞を迅速に分取するための有効な手段であることが証明された。**



Fig. 7 ソーティング6日目の樹状細胞