

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

Cutaneous Biology Research Center/Center for Regenerative Medicine,
Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School

大沢 匡毅

Key words 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

1 はじめに

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、個体発生の過程で約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年代に入りフローサイトメーターが導入され、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った多能性造血幹細胞が現実に純化することができる事が明らかになった。我々も独自に造血幹細胞の純化を目指し、CD34^{lo/-}、c-Kit⁺、Sca-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%を占めるにしかすぎず、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™ セルソーターを用いて幹細胞の純化を行っていた。しかし、BD FACSAria セルソーターが発表された後は、この方法を BD FACSAria セルソーター用に改変し、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 セルソーター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。

BD FACSAria™ セルソーター



Helping all people
live healthy lives

2 解析方法の概要

マウス骨髓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 セルソーターで解析する。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-CyTM7 で使用している。死細胞の除去には Propidium Iodide (PI) を使用し、また、抗 CD34 抗体については、Alexa Fluor[®] 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 標識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 Alexa Fluor 660 または、Alexa Fluor 680 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。

3 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 PharmingenTM 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 Alexa Fluor 405 により標識し使用した。

4 マウス骨髓細胞の免疫染色

頸椎脱臼または二酸化炭素吸飲により安樂死させたマウスより大腿骨を単離し、PBS を使い 25G の注射針により骨髓をフラッシュすることにより骨髓細胞を回収した。骨髓細胞を PBS (Sigma-Aldrich) により二回洗浄した後、PBS に懸濁し、Histopaque[®]-1083 (Sigma-Aldrich) を用いて比重遠心法により単球画分を得た。骨髓細胞を 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 $2\sim5\times10^7$ 個 /ml になるように懸濁し、BD FACSAria セルソーターにより細胞を分離した。

5 マグネットビーズによるマウス骨髓細胞からの Lineage 陽性細胞の除去

比重遠心によって得たマウス骨髓の単球画分に、Biotin 標識抗 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。

6 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。骨髓細胞と同様に脾臓細胞を比重遠心し、リンパ球画分を集め、Staining Solution で 2 度洗浄する。10⁶ 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 セルソーターにて蛍光補正を行う。

7 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・顆粒球の広がりが縮小され 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。

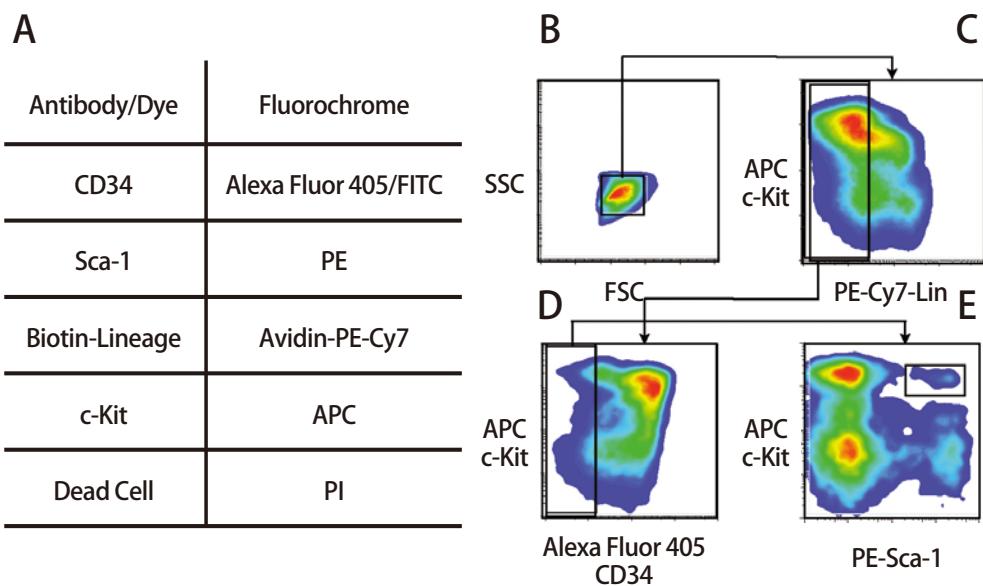


図 1

3 検討結果

1. 34KSL 細胞分離のための蛍光色素の検討

BD FACS Vantage セルソーターと比較し BD FACS Aria セルソーター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て使う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 FACS Aria セルソーター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 FACS Aria セルソーターで解析を行った。図 2 に示したように Alexa Fluor 430 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、Alexa Fluor 405、PE-Cy7、Alexa Fluor 680 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 については PE-Cy7 を使用することにした (表 1)。

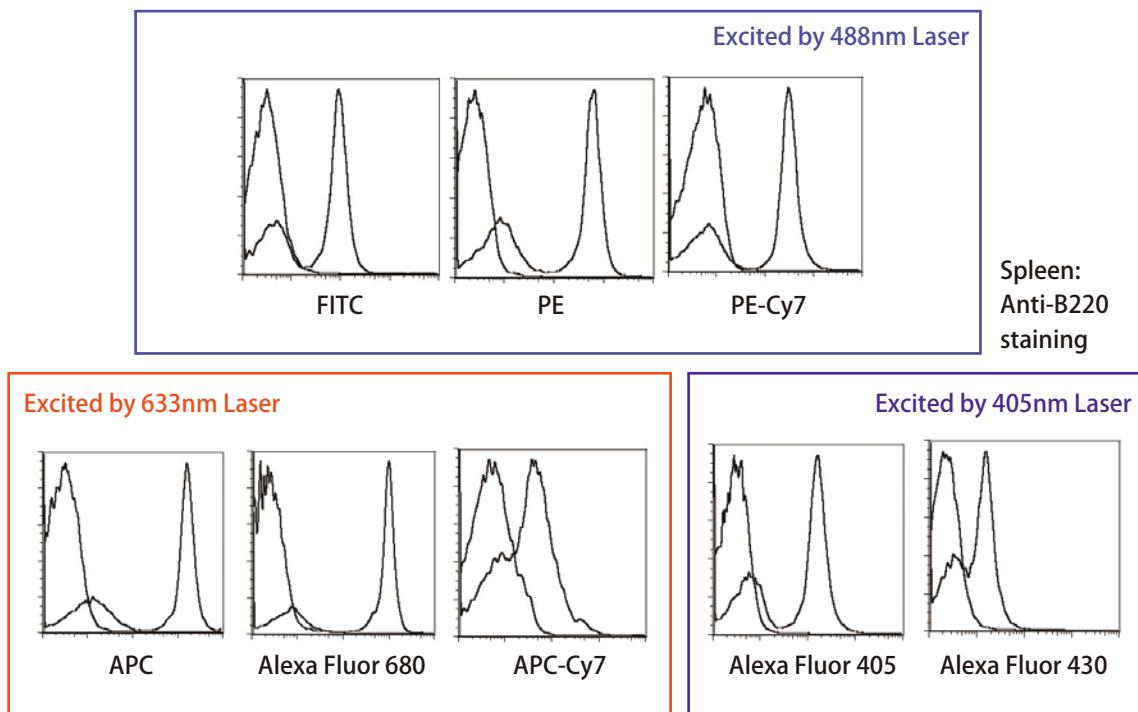


図 2

BD FACS Vantage セルソーターの場合

Antibody/Dye	Fluorochrome
CD34	FITC
Sca-1	PE
Dead cell	PI
Lineage	Avidin-Texas Red®
c-Kit	APC

BD FACS Aria セルソーターの場合

Antibody/Dye	Fluorochrome
CD34	FITC
Sca-1	PE
Dead cell	PI
Lineage	Avidin-PE-Cy7
c-Kit	APC

表 1 BD FACS Vantage セルソーター および BD FACS Aria セルソーターにおける蛍光色素の組み合わせ

2. 全骨髓単核細胞からの 34KSL 細胞分離

従来、BD FACS Vantage セルソーターにより 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。① BD FACS Vantage セルソーター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髓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ったため。② 全骨髓細胞に占める 34KSL 細胞の頻度が 0.004% と極めて低いために、全骨髓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 FACS Aria セルソーターでは、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変な向上が図られた。このような点から、BD FACS Aria

セルソーターを用いれば、Lineage 陽性細胞を除去すること無しに、全骨髓単核細胞から 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髓単核細胞を染色し、BD FACS Vantage セルソーターと BD FACS Aria セルソーターの間で 34KSL 細胞の染色性の比較を行った。図 3 に示したように、BD FACS Aria セルソーターで解析した場合は 34KSL 細胞画分が明瞭に認められたのに対し、BD FACS Vantage セルソーターでは 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髓単核細胞を染色し、BD FACS Aria セルソーターにより 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。

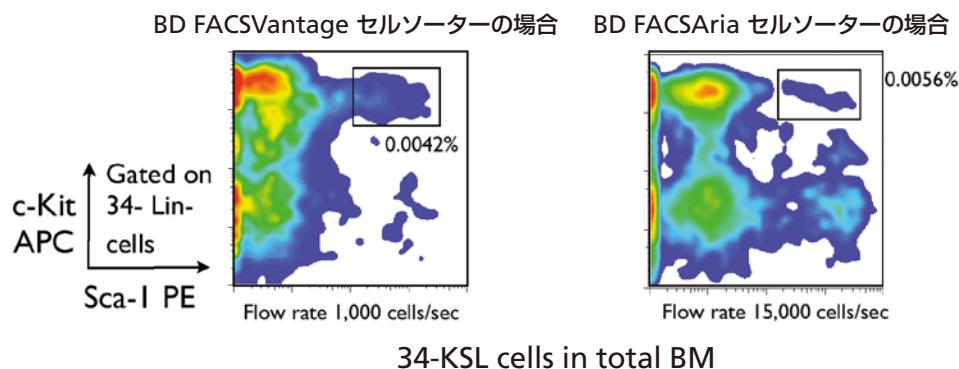
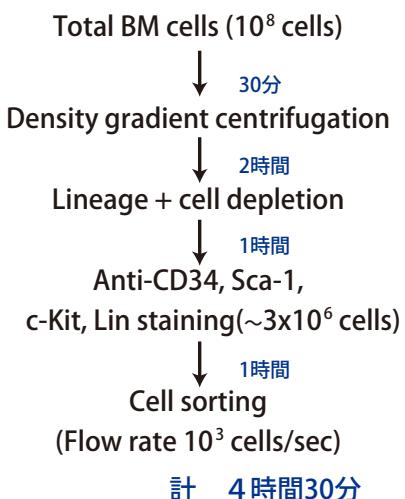


図 3

BD FACS Vantage セルソーターを使用する場合



BD FACS Aria セルソーターを使用する場合

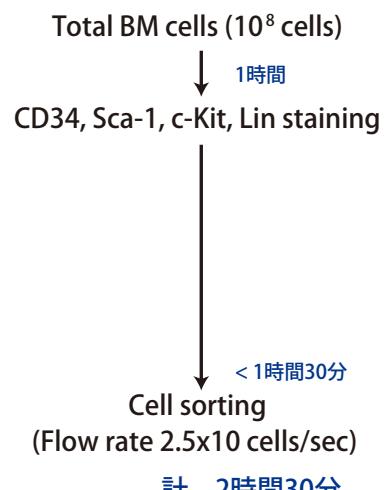


表 2 マウス造血幹細胞の分離法（従来法との比較）

9 回収率および純度の検定

BD FACSaria セルソーターでは、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 FACSaria セルソーターによる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 FACSaria セルソーターでは、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。

10 多重染色の検討

BD FACSaria セルソーターは図 5 の蛍光検出器の構成に示したように、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事から、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している。これにより、図 2 に示したように、FITC、PE、APC に加え、Alexa Fluor 405、PE-Cy7、Alexa Fluor 660/680、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していただきたい。

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 Alexa Fluor 405 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 Alexa Fluor 405 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 Alexa Fluor 405 で検出しても問題がないと考えられた。

Conditions:

- Drop drive frequency: 90kHz
- Sheath pressure: 70 psi
- Sort mode: Purity
- Flow rate: 5000, 10000, or 2500 cells/sec
- Target cells: 34-KSL (0.005% of total cells)

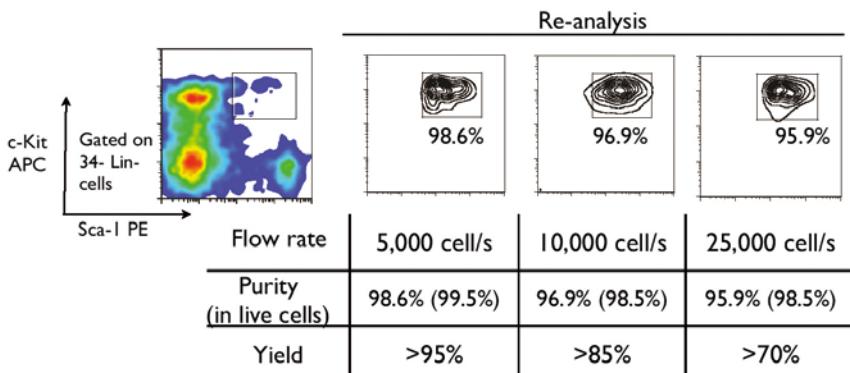


図 4

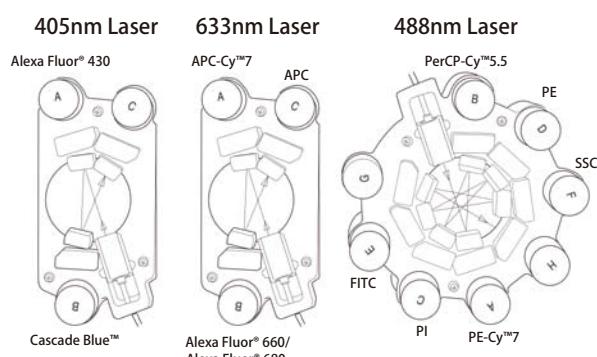


図 5

Laser	LP mirror	BP Filter	Fluorochromes
488nm	488/10		Side scatter
	502		FITC, GFP, Rhodamin123
	556		PE
	595		PI
	655		PerCP-Cy5.5
	735		PE-Cy7
633nm	660/20		APC
	690	710/20	Alexa Fluor 660 or 680
	760	780/60	APC-Cy7
405nm	450/40		Alexa Fluor 405, Pacific Blue™, Cascade Blue™
	502	530/30	Alexa Fluor 430, Cascade Yellow™, Lucifer Yellow

表 3 当研究室における BD FACSaria セルソーター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、Alexa Fluor 660/680 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、Alexa Fluor 680-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。

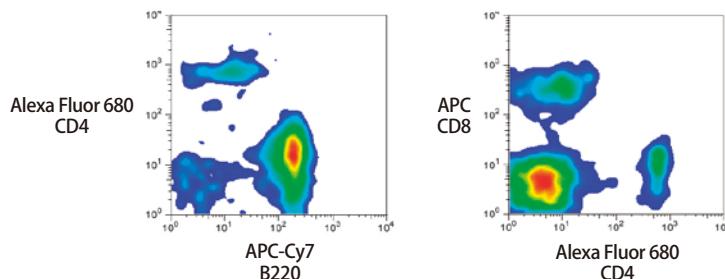


図 6

Antibody/Dye	Fluorochrome
CD34	Alexa Fluor 405
Tie2	FITC
Sca-1	PE
Dead cell	PI
Lineage	Avidin-PE-Cy7
c-Kit	APC
Flk2	Alexa Fluor 680
CD45	APC-Cy7

図 7

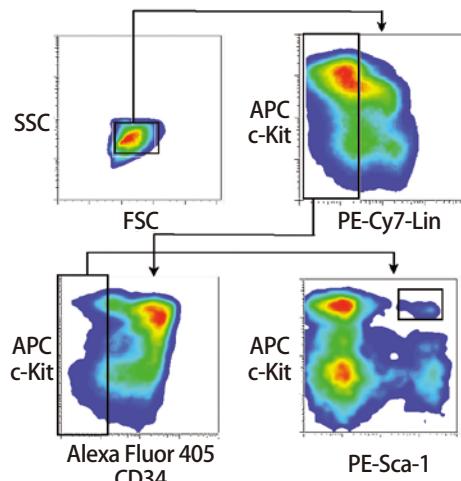


図 7

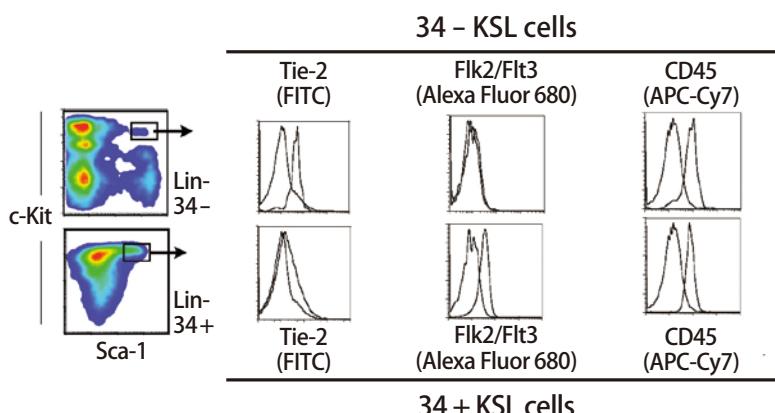


図 8

これらの結果をもとに、通常の 34-KSL 細胞の染色に、さらに 3 つの抗体を加え、合計 8 色 10 パラメータの解析を行った。図 7 に示したように、34-KSL 細胞は Tie2 陽性で、Flk2 陰性、CD45 陽性であった。これに対し、34+KSL 細胞は Tie2 陰性で、Flk2 陽性、CD45 陽性であった。これらの結果は、これまでに報告されている結果と同じであり、8 色の同時解析が有効であることを示している。

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

11 結論

以上まとめると、BD FACS Aria セルソーターでは従来機と比べ、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、マウス全骨髓単核細胞からでも、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。

註：

本文中の「当研究室」は、筆者が執筆時に在籍していた理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 幹細胞研究グループを指す。

PROFILE

大沢 匠毅 (おおさわ まさたけ)
医学博士



所属：

Cutaneous Biology Research Center/
Center for Regenerative Medicine,
Massachusetts General Hospital/
Harvard Medical School, Assistant Professor

経歴：

昭和 63 年 千葉大学理学研究科修士課程終了
昭和 63 年～平成 12 年 キリンピール医薬研究所研究員
平成 9 年 筑波大学医学研究科博士課程終了、医学博士
平成 12 年 京都大学客員研究員
平成 12 年～平成 19 年 理化学研究所発生再生研究センター研究員
平成 19 年～現在 Harvard Medical School Assistant Professor

研究テーマ：

体内的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。

*Cy™はAmersham Biosciences社の商標です。
*Pacific Blue™, Cascade Blue™, Cascade Yellow™ および Alexa Fluor® は Molecular Probes 社の商標です。
*Histopaque® はSigma-Aldrich 社の登録商標です。
*BioMag® はQiagen 社の登録商標です。
*BD、BDロゴおよびその他の商標はBecton, Dickinson and Companyが保有します。©2010 BD
*本著作物に関する権利は全て日本ベクトン・ディッキンソン（株）が保有します。
本著作物の一部または全部を無断で複写、複製、転載、改変または流布することを禁じます。
©2010 Nippon Becton Dickinson Co.,Ltd.



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

お客様情報センター

製品問連・資料請求／納期・在庫

0120-8555-90
Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
セルアナリシス学術カスタマーサポート

0120-4890-77

E-Mail: tech_cell@bd.com

インスツルメンツサポートホットライン

0120-7099-12