

BD FACSria™ セルソーター

「BD FACSriaにおける細胞分離：マウス造血幹細胞のSP分離への応用」

財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 腫瘍生化学研究部門 原 孝彦、岡本 士毅

Keyword：マウス骨髄SP細胞、siRNA導入、マルチカラー解析

1. はじめに

壊れた臓器を再生するためには、幹細胞あるいはそれを分化させた細胞を移植する方法が有望視されている。近年の幹細胞生物学の目覚ましい発展と再生医学に対する期待とから、今では広範囲のフィールドの研究者が幹細胞を分離して移植する実験に取り組んでいる。歴史的にみて、幹細胞研究の基本的な方法論のほとんどはマウス骨髄中に存在する造血幹細胞を対象として確立されてきた。1000万以上の骨髄細胞の中から、複数の細胞表面抗原の発現パターンに基づいて、自己複製能と多分化能の両方を併せ持つ造血幹細胞だけをセルソーターを用いて分離することができるようになって、人々は幹細胞の実在を確信した。

1996年に米国のGoodellらは、造血幹細胞はHoechst33342のような蛍光化学物質を細胞の外へ排出する性質を持っていることを発見した⁽¹⁾。ヘキストの排出は、ATP依存的で複数種のMulti-drug transporterが介在して行われる。このヘキスト排出細胞からUV照射によって放出される蛍光は、二枚の光学フィルターで展開すると特定のポジションにいつも位置することから、そこに分布する細胞群はSide Population (SP)細胞と総称されるようになった。SP細胞は通常、350nm波長のUVレーザーを照射することによって検出可能となる。従ってUVレーザーを搭載していないBD FACSriaの現行モデルでは、SP細胞の分離は不可能であると思われていた。

しかし我々は、BD FACSriaに装備されているVioletレーザー（407nm）を利用することによっても、SP細胞を分離することができるを見出した。BD FACSriaは、分離操作の簡便性において卓越したセルソーターであり、国内のユーザー数も増えている。本稿では、BD FACSriaを使ってSP細胞を分離するプロトコルを記す。また我々は、RNA interferenceを利用して、取り出したSP細胞に発現する特定の遺伝子をロックダウンする実験を行っているので、あわせて紹介する。幹細胞の遺伝子研究を計画されているユーザーの参考にしていただければ幸いである。



II. 準備

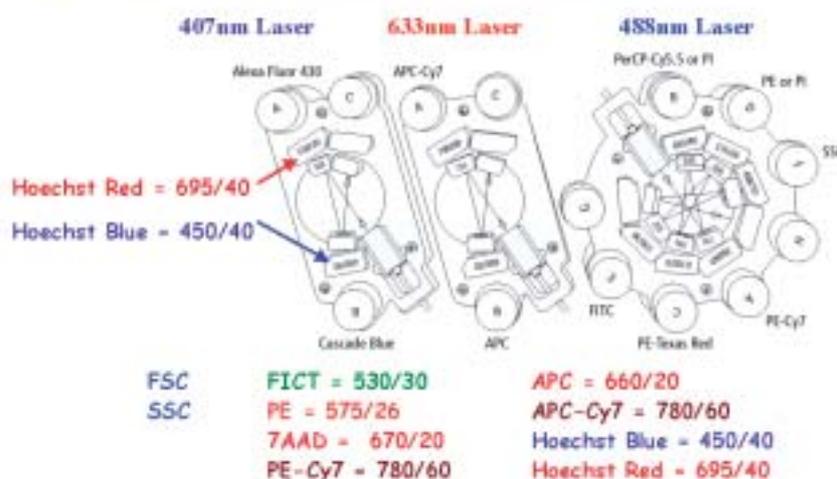
< 器具・装置 >

- ディスポの50ml用ポリプロピレン遠心チューブ
- BD FACSAriaサンプル用5mlチューブ (BD社、352058) と細胞受け用の5mlチューブ (BD社、352063)
- 70 μ mのCell Strainer (BD社、REF352350および352235)
- 37 の循環式ウォーターバス
- 冷却付き低速遠心器
- BD FACSAriaのSPソーティング用のセッティング：BD FACSAriaのRedレーザー位置に挿入されている675nmのフィルターをBlueレーザー位置に、Blueレーザー位置に挿入されている695nmのフィルターをVioletレーザー位置にそれぞれ移し変える。Violetレーザー位置の530nmフィルターは空いている場所へ移しておく。また、ソーティング用ソフトFACS-DiVaのInstrument/Laser/Area Scalingの値をBlue: 0.35 (通常1.15), Violet: 0.55 (通常1.2) にそれぞれ変更する。Redは0.9のまま変えない。(BD FACSAria ユーザーズガイド P112 ~ 114参照)

< 試薬 >

- **Hoechst 33342** : Bis-Benzimide (Sigma社) の粉末を購入し、純水にて1mg/mlとなるように溶かす。これをフィルター滅菌し、小分けして-20 にて凍結保存する。
- **染色培地** : 市販のダルベッコ改変基本培地 (高濃度グルコース) DMEMにウシ胎児血清を2%、1M HEPES pH7.5を終濃度10mMになるようにそれぞれ添加する。用事調製し、37 で保温しておく。
- **Propidium Iodide (PI)** : Sigma社より粉末を購入し、PBSにて200 μ g/mlとなるように溶かす。これをフィルター滅菌し、小分けして-20 にて凍結保存する。PBSに上記の保存液を100分の1量ずつ加えて使用する。
- **溶血バッファー** : 100mM NH₄Cl-17mM Tris-HCl pH7.2
- **洗浄バッファー** : PBSにウシ胎児血清を終濃度5%になるように加え、冷蔵しておく。
- **造血幹細胞培地** : StemPro-34 SFM (Invitrogen社) に、SCF (終濃度100ng/ml), TPO (終濃度10ng/ml), Flt3 ligand (終濃度10ng/ml) をそれぞれ添加する。

BD FACSAria : 3 Lasers/SP analysis Configuration



BD FACSAriaでの8color光学系
Hoechst BlueとHoechst Redは、Violetレーザーを用いて解析している。
Ariaでは最大13カラーの解析も可能。

III. 方法

- i) マウス骨髄SP細胞の調製とBD FACSAriaによるソーティング
- 3ヶ月齢以上の成獣C57BL/6マウスの大腿骨と腓骨を取出し、筋肉をきれいにはぎ取って骨両端を切断する。25G針を骨内に刺し、冷PBS約20mLを使ってすべての骨片に含まれる骨髄細胞をペトリ皿に押し出す。
 - 細胞塊をCell Strainerにて除き、5分間の低速遠心（1200 rpm, 4 ）にて沈殿させる。冷した溶血バッファー10mlにて細胞沈殿を懸濁し氷上に8分間置く。洗浄バッファー30mlを徐々に添加して、浸透圧をもとに戻す。5分間、低速冷却遠心する。
 - 細胞沈殿を洗浄バッファー20mlにて再懸濁し、細胞数を計測する。5分間、低速冷却遠心する。
 - 細胞沈殿を10⁶細胞/mlになるように温めた染色培地にて再懸濁し、10mlずつを50mlチューブに分注する。それぞれのチューブにHoechst 33342保存液を50μlずつ添加（最終濃度：5μg/ml）し、37 のウォーターバスにて90分間保温する。このときチューブは上から重しをのせて湯中に沈めるようにし、30分に一度は手でチューブを攪拌する。
 - 冷やした洗浄バッファー40mlをデカントにてそれぞれの50mlチューブに一気に注入して、反応を止める。5分間、低速冷却遠心する。
 - 細胞をさらにCD34などの蛍光抗体で多重染色する場合には、細胞沈殿を10⁶/100μlになるように洗浄バッファーで懸濁し、抗体を1μg相当添加する。氷中で30分置いた後、20倍量の洗浄バッファーを加えて5分間、低速冷却遠心する。二次抗体染色も同様にしておこなう。
 - PIを添加した冷PBSにて細胞沈殿を5 × 10⁶細胞/ml程度に再懸濁し、もう一度Cell Strainerを通す。1mlずつ352058チューブに分注して、氷中に置く。
 - ソート後の細胞を受ける352063チューブに造血幹細胞培地を4mlずつ入れ、これを数本用意しておく。
 - BD FACSAriaを立ち上げ、mediumの流速ですべてのレーザーのdelay timeを最適化しておく。FSC/SSC, Hoechst Red/Hoechst Blue, EGFP/PIなどの二次元ドットプロット画面を作図し、またinstrument settingの各パラメーターを入力する。我々の実験例では、以下の様に設定した。

Flow rateを1.0～1.2くらいの低速で細胞を流し、Violetレーザー様のパラメーターの最適化を行う。その値は、BD FACSAria各マシンの特性やフローセルの汚れなどによっても異なってくる。その上で、SP細胞分画にゲートをかけてソーティングする。

（BD FACSAria ユーザーズガイド P59、P118参照）

ii) 造血幹細胞の体外培養と放射線照射マウスへの移植

EGFPトランスジェニックマウスからBD FACSAriaを使って分離したSP細胞を、サイトカインを含む造血幹細胞培地に懸濁し、AGM領域ストロマ細胞を敷きつめた培養プレートにまく。AGM領域ストロマ細胞は、胎生11.5日マウス胚のAGM領域を初代培養⁽²⁾した際に形成される接着性細胞を、マイトマイシン処理したものであるが、MS5株のような骨髄由来の各種ストロマ細胞株でもある程度の代替は可能である。通常、約1000個のSP細胞を9-10日間培養すると、10⁷個のCD45陽性細胞が得られる。それらがEGFP陽性であることを確認した上で、10⁶細胞ずつをレスキュー用の全骨髄細胞（2 × 10⁶細胞）とともにX線（9Gy）照射した10-14週齢のC57BL/6マウスの尾静脈に注入する。1,2,4,6ヶ月後にそれぞれ採血し、ドナー由来のEGFP陽性血液細胞の存在をファックスにて解析する。

iii) SP細胞へのsiRNA発現ベクターの導入

BD FACSAriaを用いてC57BL/6マウス骨髄より分離したSP細胞を、AGM領域ストロマ細胞と一晩共培養する。翌日から、各種のsiRNAを安定発現させるレトロウイルスベクターを24時間 × 2回感染させる。我々が作製したsiRNA発現用レトロウイルスベクターpReGSは、Dr. Agamiらが開発したpRETRO-SUPER⁽³⁾とほぼ同じもので、さらに感染細胞をEGFPを指標にして分離できるようにしたものである。ウイルス産生には北村俊雄博士（東京大学医学研究所）らが開発した高力価のレトロウイルスパッケージング細胞PLAT-E⁽⁴⁾を用い、ウイルス液を高速冷却遠心機で15,000 rpm, 18時間遠心して、沈殿を造血幹細胞培地にて再懸濁した後に用いる。ウイルス感染後のSP細胞は、再びAGM領域ストロマ細胞の上でさらに7-9日間培養し、EGFP陽性細胞をコロニーアッセイや骨髄移植系にて検定する。

Parameter	Voltage	Log	A	H	W
FSC	155	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
SSC	222	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EGFP	522	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PE	452	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI	489	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
APC	561	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hoechst Red	959	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hoechst Blue	484	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

IV. 結果

i) BD FACS AriaによるマウスSP細胞の分離

一匹の成獣マウスの両肢から約 2×10^7 個の骨髓細胞が得られる。これをHoechst33342で染色し、BD FACS VantageあるいはBD FACS Ariaにて解析した(図1)。BD FACS Vantageでは、UVレーザー(350nm)で照射し、450/20nmのバンドパスフィルター(Hoechst Blue)および670/40nmのバンドパスフィルター(Hoechst Red)を通した二次元ドットプロットをとることで、典型的なSP細胞を検出できた。一方、同時に調製した細胞をBD FACS Ariaにて解析した。BD FACS AriaではVioletレーザー(407nm)で細胞を照射し、

放出される蛍光を450/40nmのバンドパスフィルター(Hoechst Blue)および695/40nmのバンドパスフィルター(Hoechst Red)を通して展開した。VioletレーザーではHoechst33342の励起は部分的であると予想されるが、SP細胞に相当する位置に細胞群を検出することができた。実験ごとの多少のばらつきは観察されたが、BD FACS Vantage(UV 350nm)とBD FACS Aria(Violet 407nm)ともに全骨髓中の生細胞の約0.04%~0.07%がSP細胞であった。何度かの実験をおこなったが、平均して一匹のマウスから得られたSP/CD45⁺CD34⁻細胞は約2000個未満であった。

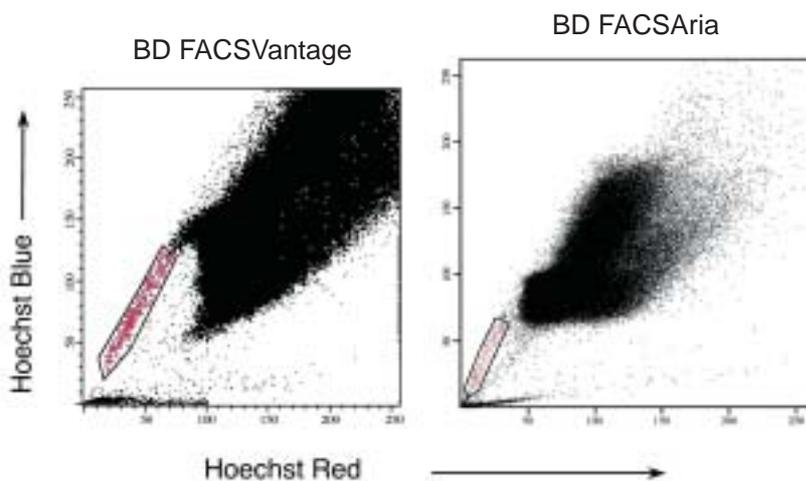


図1 マウス骨髓SP細胞の分離パターン：BD FACS VantageとBD FACS Ariaとの比較

ヘキスト染色の展開パターンは両者で異なるが、ヘキスト排出分画の上端部にSP細胞と予想される細胞集団(赤のドットで表示)が検出された。

ii) 造血幹細胞活性の追跡

BD FACSAriaにて分離したSP細胞の中に長期骨髄再建能を持つ造血幹細胞が回収されているかどうかを知る目的で、SP細胞の体外培養と移植実験をおこなった。BD FACSVantageあるいはBD FACSAriaを用いて、SP/CD45⁺CD34⁻細胞を約1000個ずつソーティングし、AGM領域ストロマ細胞との共培養によって血液細胞を増幅させた。本実験に用いた造血幹細胞培地は、造血幹細胞の生

存をサポートし分化を抑制するため、10日間の培養後もSP由来細胞群中に骨髄再建活性が残存した(図2)。BD FACSAriaにより得たSP由来細胞を同じ数だけ移植した放射線照射マウスでも、同程度のドナー由来血液細胞が観察された。この結果は、BD FACSAriaのSP細胞分画は、BD FACSVantageのSP細胞と同等の造血幹細胞・前駆細胞を含むことを示唆する。

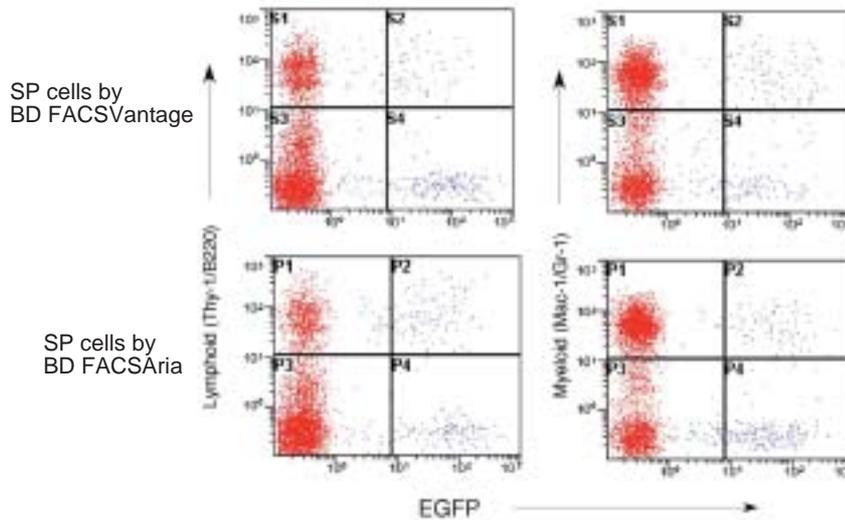


図2 培養SP細胞による造血系再建

BD FACSVantageあるいはBD FACSAriaを用いて分離したEGFPトランスジェニックマウス由来のSP/CD45⁺CD34⁻細胞をAGMストロマ細胞上で10日間培養して増やした後、それぞれ同数ずつ放射線照射マウスに移植した。4ヶ月後の末梢血キメリズムを、リンパ球系・骨髄球系それぞれについて測定した。BD FACSAriaにより分離したSP細胞にも、骨髄再建能があることがわかる。

iii) siRNA導入による遺伝子発現の抑制

造血幹細胞の自己複製と多分化能を支配する遺伝子プログラムの解明は、幹細胞の再生医療への応用と並んで、世界的に関心を集めている研究課題である。我々は、BD FACSriaにより分離したSP細胞にsiRNA発現レトロウイルスベクターpReGS (図4左)を感染させることで、造血幹細胞遺伝子の機能解析を行っている。SP細胞へのレトロウイルスの感染から遺伝子導入細胞の骨髄移植までの実験手順を図3に示した。この目的では、pReGSベクター感染細胞がEGFP陽性となるため(図4中央)に、普通のC57BL/6マウス(できればCD45.1⁺系統)をドナーに選んだ。実験ではまず、pReGSベクターのBglII-HindIIIクローニングサイトに、機能未知の造

血幹細胞遺伝子Xに特異的な19塩基をループヘアピン状に含む二重鎖オリゴDNAを挿入した。このDNAを運ぶ組換えレトロウイルスを、遺伝子Xを発現する適当なテスト細胞株に感染させ、EGFP陽性細胞分画をソーティングした。RT-PCRにより遺伝子XのmRNAは完全にノックダウンされていることがわかる(図4右)。このように抑制効果の優れたsiRNA発現ベクターを用いて、骨髄SP細胞への感染実験へと進む。造血幹細胞の増殖や分化に關与するユニークな遺伝子の場合には、siRNA発現レトロウイルス感染後のサブカルチャーにおいてEGFP陽性血液細胞の比率が激減している場合が多かった。

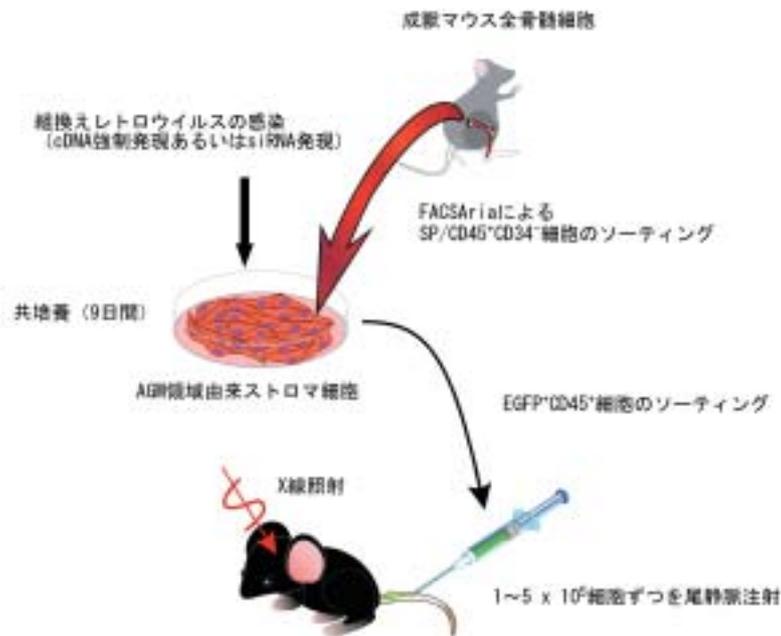


図3 SP細胞への遺伝子導入と骨髄再建アッセイ
BD FACSriaを用いて分離した造血幹細胞を用いて、特定の遺伝子の発現を高進あるいは抑制させ、その効果をin vivoで確かめるアッセイ系の概略を示した。移植後2~6ヶ月後の末梢血に含まれるEGFP陽性細胞の比率を比較することにより、遺伝子の機能を予測することができる。

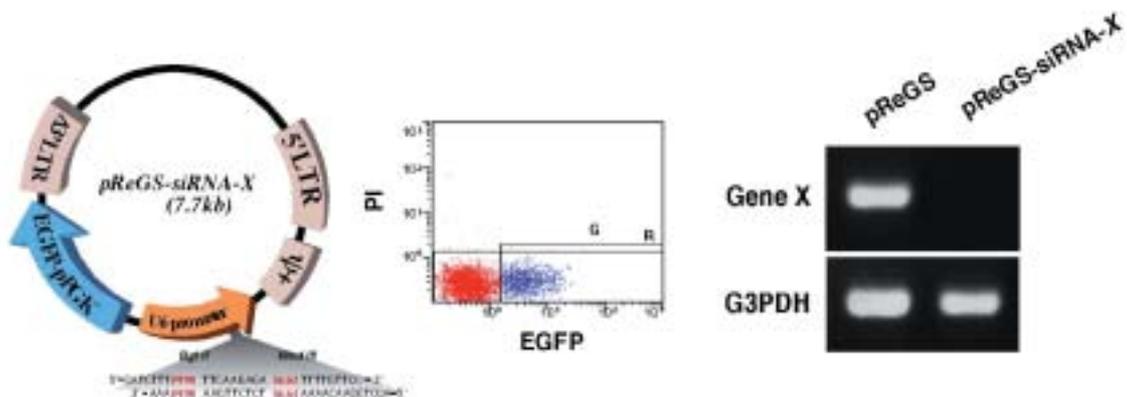


図4 siRNA発現レトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現の抑制
ある遺伝子XのmRNAを抑制する効果のあるsiRNA配列をレトロウイルス発現ベクターpReGS (左図)に組み込み、細胞に感染させた。EGFP陽性細胞分画(中央図)をソートして遺伝子XのmRNA発現量をRT-PCRにて検定した。BD FACSriaを用いると多検体の処理をより簡単におこなうことができる。

V. 注意事項、その他

BD FACSAriaは光軸調製が不要なセルソーターである。しかし、SP細胞のソーティングでは、ヘキスト本来の励起波長とずれたVioletレーザーを照射させるため、機械のチューニング不良やフローセルの汚れによる感度低下がすぐにSP細胞の回収率低下につながる。特にVioletレーザーのdelay timeを正確にあわせておくことが極めて重要である。なお、SP細胞と周囲の細胞との分離距離が比較的近いため、SP細胞の存在比率を定量的に決定する実験には適していない。むしろBD FACSAriaは、本稿で紹介したように造血幹細胞への遺伝子導入実験に用いる上でのメリットが大きい。なぜならば、ソーティング手順が極めて簡便で、SP細胞分離に要する時間が短い。さらに、ウォーミングアップや洗浄操作に時間をとらないので、同日に複数のユーザーが多検体を処理できるキャパシティーがある。SP細胞のソーティングでは使用しなかったが、4つの分画を同時にソートする4-way sortingは、多色解析に力を発揮した。

次に、造血幹細胞へのsiRNA発現ベクター導入実験についてであるが、この実験はSP細胞の代わりに、c-Kit⁺/Sca-1⁺/Lin⁻/CD34⁻細胞を用いてもできる。陽性ゲートの絞り方にも依存するが、後者の方が得られる細胞総数は多かった。なお、遺伝子によっては効率的なsiRNAがデザインしにくいケースがあったので、3カ所くらいの独立した配列をテストするようにしている。また、まれなケースかも知れないがsiRNAがほとんど効かない細胞株があったので、テスト用の細胞株の選別は慎重におこなった方がよい。

<参考文献>

- (1) Goodell, M.A., *et al.* J.Exp.Med., 183: 1797-1806, 1996.
- (2) Mukoyama, Y., *et al.* Immunity, 8:105-114, 1998.
- (3) Brummelkamp, T.R., *et al.* Cancer Cell, 2: 243-247, 2002.
- (4) Morita, S., *et al.* Gene Ther., 7: 1063-1066, 2000.

PROFILE

氏名：原 孝彦（はら たかひこ）



所属：財団法人東京都医学研究機構
東京都臨床医学総合研究所
腫瘍生化学研究部門・室長

経歴：

- ・昭和60年3月 筑波大学第二学群生物学類卒業
- ・平成2年3月 東京大学理学系大学院相関理化学専攻。博士課程修了。理学博士。
- ・平成2年～7年 米国DNAX研究所
ポスドク、
シニアリサーチアソシエート
- ・平成7年～11年 東京大学分子細胞生物学研究所
助手、助教授
- ・平成11年10月より 現職

研究テーマ：

造血幹細胞の発生、分化、増殖にどのような遺伝子が関与しているかを研究。造血幹細胞を体外増幅させる技術の開発がひとつの重要な目標である。東京都臨床医学総合研究所ではアカデミックな研究を推進する一方、その技術を 研究成果に基づいた最先端医療技術の開発と臨床応用、 産業シーズの創出、という観点で都民へ還元することを目指す。



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)