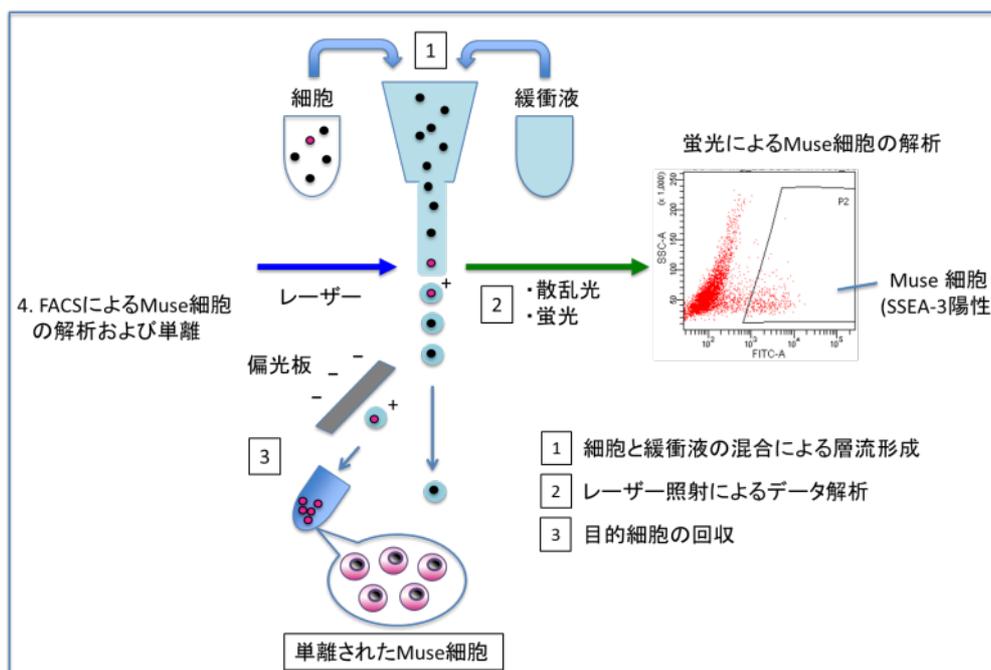
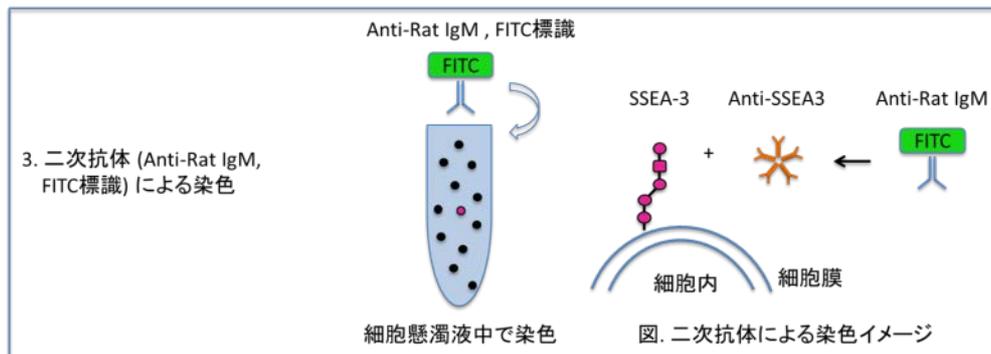
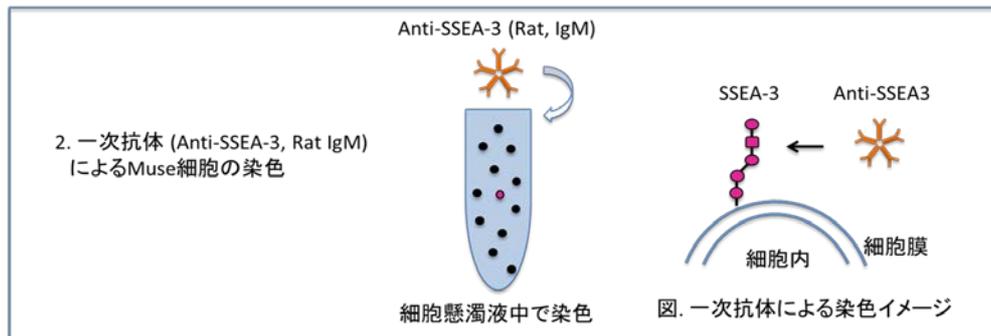
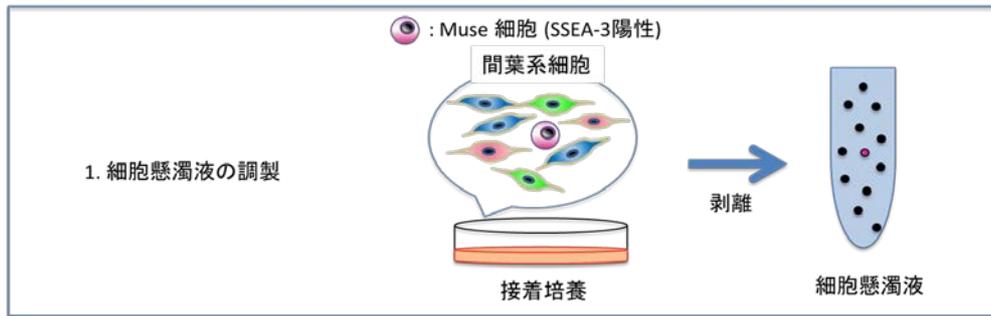


FACS による Muse 細胞の分離方法

目次

【1. 材料】	
1-1. Muse 細胞のソースとなる市販の培養細胞	3
1-2. 試薬・器具・機器	3
【2. 細胞培養の方法】	
2-1. 凍結保存された間葉系細胞を起こす場合 (凍結保存チューブ 1 本の場合)	4
2-2. 間葉系細胞の継代方法 (10 cm ディッシュの場合)	5
2-3. 間葉系細胞の凍結保存方法	6
【3. Muse 細胞に対する免疫染色手順】	
3-1. 二次抗体液の事前調製	7
3-2. FACS buffer の用事調製	7
3-3. 細胞懸濁液の調製	7
3-4. 一次抗体 (anti-SSEA-3, Rat IgM または Isotype Control, Rat IgM) による染色および洗浄	9
3-5. 二次抗体 (蛍光標識 anti-Rat IgM) による染色および洗浄	10
【4. FACS による SSEA-3 陽性細胞率の解析および Muse 細胞採取の手順】	
4-1. ゲーティングの設定およびデータ取得の流れ (FACS Aria II の場合)	11
4-2. Muse 細胞のソーティング	12
【5. <u>トラブルシューティング</u> 】 *Muse 細胞収率に影響を与える重要事項なので必ずお読みください	
<u>5-1. 抗体に関して</u>	
5-1-1. Muse 細胞を採取するための抗 SSEA-3 抗体はメーカーによって使えない場合があるので注意	13
5-1-2. FACS 上で SSEA-3 陽性細胞率を正確に判定するため Isotype Control のサンプルを調製する	14
5-1-3. 蛍光標識二次抗の使用前には必ず抗体溶液を遠心にかけて上清のみを使用する	14
<u>5-2. Muse 細胞のソースとなる間葉系細胞の培養に関して</u>	
5-2-1. 骨髄間葉系幹細胞の培養には FGF-2 (bFGF) を添加する	14
5-2-2. 細胞の種類によって Low-glucose DMEM と High-glucose DMEM を使い分ける	15
5-2-3. 血清はロットチェックを行い培養に適するものを使用する	15
5-2-4. 細胞培養時は常に confluency に注意し、継代は 90%コンフルエントの時に行う	16
5-2-5. Muse 細胞採取に使用する細胞は、若い継代数を推奨 (Muse 細胞収率に影響)	17
5-2-6. FACS 直前の細胞密度は、100%コンフルエントを推奨 (Muse 細胞収率に影響)	17
<u>5-3. FACS に向けた細胞調製に関して</u>	
5-3-1. 細胞凝集を防ぐために FACS buffer にはキレート剤を添加する	17
5-3-2. 抗体添加後はきちんと反応させるために、ゆっくりとしたピペッティングで攪拌を行う	17
5-3-3. 細胞懸濁液を遠心分離するときはスイングローター式の遠心機を使用する	18
5-3-4. 当研究室で使用している以外の細胞を用いる場合は FcR のブロッキングを行う	18
5-3-5. 死細胞を多く含むサンプルでは、SSEA-3 陽性細胞率の解析および Muse 細胞採取に適さない	18

【Muse 細胞採取のフローチャート】



【1. 材料】

1-1. Muse 細胞のソースとなる市販の培養細胞 (当研究室で使用している細胞)

- ・骨髄間葉系幹細胞 (Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; BM-MSC, Lonza, Cat#PT-2501)
- ・皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts-adult skin; NHDF, Lonza, Cat#CC-2511)
- ・皮膚線維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts-adult; HDFa, ScienCell research laboratories, Cat#2320)
- ・脂肪間葉系幹細胞 (Human Adipose Derived Stem Cells; ADSC, Lonza, Cat#PT-5006)

1-2. 試薬、器具、機器

- ・【重要】Human-FGF-2, premium grade (BM-MSC の培養に使用、Cat#130-093-840, Miltenyi)
- ・【重要】Rat anti-SSEA-3 抗体 (Cat#330302, BioLegend または Cat#MA1-020, Thermo)
- ・Rat IgM Isotype control (Cat#400801, BioLegend)
- ・Goat anti-Rat IgM 抗体 (FITC 標識) (Cat#112095-075, Jackson Immuno Research)
- ・HyClone-FBS (Fetal bovine serum) (細胞培養用として使用、Cat#SH30910.03, GE ヘルスケア)
- ・FBS (Fetal bovine serum) (トリプシン失活用として使用、メーカーの指定なし)
- ・【重要】Low-glucose DMEM (Cat#10567, Thermo) → BM-MSC、NHDF、HDFa の培養に使用
- ・【重要】High-glucose DMEM (Cat#11965, Thermo) → ADSC の培養に使用
- ・Kanamycin (100 X) (培地には 1X で使用する、Cat#15160-054, Thermo)
- ・PBS (10 X) (Cat#27575-31, nacalai tesque)
- ・滅菌水(1X PBS 調製用として使用) (Cat#06442-95, nacalai tesque)
- ・Trypsin (0.25 %)/EDTA (Cat#25200-072, Thermo)
- ・FluoroBrite DMEM (Cat#A18967-01, Thermo)
- ・BSA (Bovine serum albumin) (Cat#01860-65, nacalai tesque)
- ・EDTA (Cat#15111-45, nacalai tesque)
- ・CELLBANKER 1plus (細胞保存溶液、Cat#CB021, ZENOAQ)
- ・CryoTube vials (細胞凍結用チューブ、Cat#377267, Thermo)
- ・バイセル凍結処理容器 (細胞凍結用の容器、日本フリーザー)
- ・【推奨】10 cm デイッシュ (Cat#150464, Thermo)
- ・1.5 mL チューブ (Cat#BM-15, BMBio)
- ・15 mL チューブ (Cat#352096, Corning)
- ・50 mL チューブ (Cat#352070, Corning)
- ・40 μ m セルストレイナー (Cat#352346, Corning)
- ・0.22 μ m フィルター (Cat#SLGV033RS, Merck Millipore)
- ・遠心分離機 (15 mL、50 mL 用) (スイングローター式、メーカーの指定無し)
- ・遠心分離機 (1.5 mL 用) (スイングローター式、冷却機能付き、メーカーの指定無し)
- ・セルソーター (BD FACS Aria II) (当研究室で使用)
- ・FACS 解析ソフト (BD FACSDiva) (当研究室で使用)

【2. 細胞培養の方法】

それぞれの細胞の培養条件は異なるので注意する。培地の組成は以下の通りである。

- BM-MSC : **Low-glucose DMEM** *¹, 10%FBS *², **1 ng/ml FGF-2** *³, 0.1 mg/ml Kanamycin
- NHDF, HDFa : **Low-glucose DMEM**, 10%FBS, 0.1 mg/ml Kanamycin
- ADSC : **High-glucose DMEM** *⁴, **15%FBS**, 0.1 mg/ml Kanamycin

*¹*⁴ BM-MSC、NHDF および HDFa の培養には low-glucose DMEM を、ADSC の培養には High-glucose DMEM を使用するので混同しないように注意する (トラブルシューティング 5-2-2)【参照】。

*² 血清はロットチェックを行い培養に適するものを使用する (トラブルシューティング【5-2-3】参照)。

*³ BM-MSC の培養に関しては、FGF-2 (bFGF) を必ず添加すること (トラブルシューティング【5-2-1】参照)。

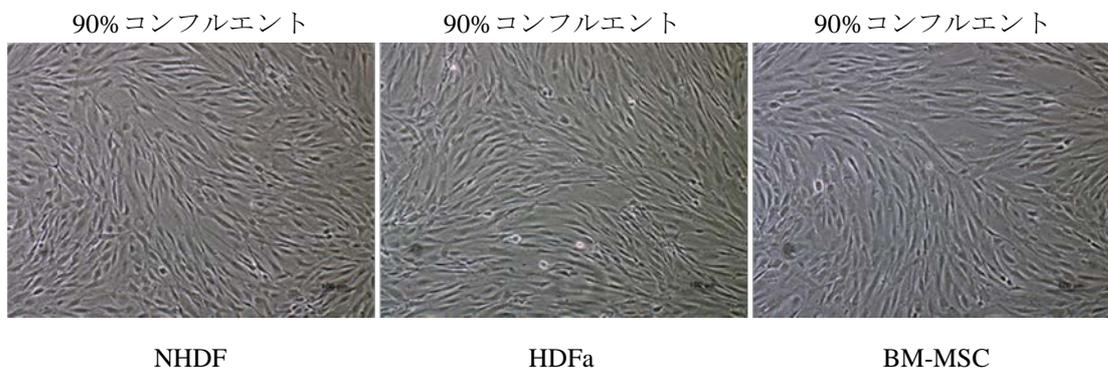
2-1. 凍結保存された間葉系細胞を起こす場合 (凍結保存チューブ 1 本の場合)

- 腕時計などは外して、しっかり手を洗い、70% エタノールで消毒する。必要であれば手袋をする。
- クリーンベンチ内を 70% エタノールで消毒する。凍結された細胞を溶かすため、37°Cの恒温槽を準備しておく。
- 冷蔵庫から培地などを取り出し、70% エタノールを吹きかけて消毒した後、クリーンベンチ内に入れる。
- 15 ml チューブに培地を 9 ml 入れる。
- 液体窒素から細胞の入ったバイアルを取り出し、蓋が液面に接触しないよう 37°Cの恒温槽に入れて溶解する。^{*4}
^{*4} 細胞の入った凍結保存溶液を溶解する場合は、氷が全て解けきらない状態で恒温槽より取り出すこと。そうしないと死細胞が多くなってしまう。
- 氷が少し残った状態のバイアルを恒温槽から取り出し、70% エタノールで消毒後、クリーンベンチ内に入れる。
- バイアルの蓋を開け、ゆっくりとしたピペッティングで氷を溶かすとともに、細胞を懸濁する。
- 懸濁した細胞を培地の入った 15 ml チューブに加え、最終的に 10 ml になるようにする。
- 遠心 (300 g, 5 分間, 常温) ^{*5}
^{*5} 遠心分離機はスイングローター式を使用すること。
- 上清を除去し、1 ml の培地で細胞ペレットを再懸濁した後、培地を必要量加える。
- 細胞をディッシュに均一に播種する。^{*6}^{*7}
^{*6} 購入した細胞の場合、説明書に沿ったサイズのディッシュに播種する。
^{*7} 培養後に凍結保存していた細胞の場合、基本的には保存した際の細胞のスケールと同じスケールに起こす。例えば 10 cm ディッシュ 1 枚を 1 本にして凍結保存したバイアルを起こすのであれば、10 ml の培地に懸濁し、10 cm ディッシュ 1 枚に細胞を播種する。
- 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養する。^{*8}^{*9}
^{*8} 購入した細胞を凍結保存から起こした場合、それを p=1 (passage=1) とする。その後、継代するにつれて、p=2、p=3 とカウントしていく。例えば p=4 で凍結保存した細胞を起こした場合は、これを p=4 とし、継代するにつれて、p=5、6 とカウントしていく。
^{*9} 自身の手で組織から単離した細胞は、その状態のものを p=1 とし、継代するにつれて、p=2、3 とカウントする。
- 翌日培地交換を行う。死細胞が多く浮いている場合は、1~2 回程培地で洗浄する。

2-2. 間葉系細胞の継代方法 (10 cm ディッシュの場合)

- 細胞が 90% コンフルエントに細胞密度が達したら継代作業を行う。^{*10}

^{*10} ここで使用している NHDF、HDFa、MSC は初代培養細胞であり、細胞密度が 100% コンフルエントに達してしまうと、細胞同士の **contact inhibition** が起こり、その後の細胞増殖が悪くなる。必ず 90% コンフルエントの細胞密度で継代を行うこと (以下の写真を参照。詳しくはトラブルシューティング【5-2-4】参照)。



- ディッシュの培養上清を除去し、血清不含の培地で細胞表面を洗浄し、除去する。
- 2 mL の Trypsin (0.25%) /EDTA を加え、37°C インキュベーターで細胞が剥がれるまで加温する (5~10 分間)。
- 5 分後、細胞をインキュベーターから取り出し、顕微鏡下でディッシュから細胞が剥がれていることを確認する。^{*11}
^{*11} 細胞がディッシュから剥がれていない場合は、もう少しインキュベートするか、もう 1 ml ほど Trypsin を追加してインキュベートする。5 分間で細胞が剥がれない場合は Trypsin が失活している可能性があるため、新しい Trypsin に交換した方が良い。
- 1 mL の FBS を加えて Trypsin の反応を停止させ、50 mL チューブに細胞浮遊液を回収する。
- 7 mL の血清不含の培地でディッシュ中の残りの細胞も回収し、先程と同じ 50 mL チューブへ移す (total:10 mL)。
- 遠心 (300 g, 5 分間, 常温)
- 上清を除去し、1 ml の培地でゆっくりとしたピペッティングにより細胞を再懸濁する。
- 19 ml の培地を加えて細胞を懸濁し、10 cm ディッシュ 2 枚に播種する。^{*12}
^{*12} 継代は必ず 1:2 で行う。例えば 10 cm ディッシュ 1 枚の細胞を継代する場合は、10 cm ディッシュ 2 枚にすること。これを守らないと、細胞の増殖が悪くなることもある。
- 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養する。
- 翌日培地交換を行う。
- 2~3 日に 1 回、培地交換を行う。

2-3. 間葉系細胞の凍結保存方法

- 90%コンフルエントの細胞密度に達した細胞の培地を除去し、血清不含の培地で細胞表面を洗浄し、除去する。
- 2 mL の Trypsin (0.25%) /EDTA を加え、37°Cインキュベーターで細胞が剥がれるまで加温する (5~10 分間)。
- 5 分後、細胞をインキュベーターから取り出し、顕微鏡下でディッシュから細胞が剥がれていることを確認する。
- 1 mL の FBS を加えて Trypsin の反応を停止させ、50 mL チューブに細胞浮遊液を回収する。
- 7 mL の血清不含の培地でディッシュ中の残りの細胞も回収し、先程と同じ 15 mL チューブへ移す (total:10 mL)。
- 遠心 (300 g, 5 分間, 常温)
- 細胞保存溶液の CELLBANKER 1plus を 10 cm ディッシュ 1 枚分の細胞に対し 1 ml 加えて、ゆっくりとしたピペッティングで細胞を懸濁する。
- 細胞保存溶液で懸濁した細胞を細胞凍結用チューブである CryoTube vials に入れて、蓋をする。
- 細胞の入った細胞凍結用チューブをバイセル凍結処理容器に入れて、-80°Cでゆっくりと凍結する。
- -80°Cで 24 時間凍結させた細胞を液体窒素の入った細胞保存用タンク に移動させて保存する。^{*13}
*13 -80°Cでも保存可能であるが、長期保存には向いていない。長くとも3ヶ月以内には液体窒素の入った細胞保存用タンクへと移すこと。

【3. Muse 細胞に対する免疫染色手順】

* Muse 細胞を採取後、クラスターを作成する場合には poly-HEMA コートのプレートを事前に準備する必要がある。
詳細は別紙【Muse 細胞の特性解析】を参照。

3-1. 二次抗体溶液の事前調製

FITC 標識 anti-rat IgM 抗体を付属の説明書に従い 1.0 mg/mL で調製し小分けにして-30℃で保管しておく。

3-2. FACS buffer の用時調製 (調製後は常に氷上で冷却しておく。作り置きはしない)

FACS buffer	
5 % BSA *1	5 mL
100 mM EDTA *2	1 mL
PBS または FluoroBrite DMEM *3	44 mL
<hr/>	
Total	50 mL / 50 mL チューブ

*1 5 % BSA 溶液: PBS または FluoroBrite DMEM で溶解し 0.22 μ m フィルターで濾過滅菌後、4℃保管。

*2 100mM EDTA 溶液: PBS または FluoroBrite DMEM で溶解し 0.22 μ m フィルターで濾過滅菌後、4℃保管。

なお、EDTA の添加は細胞の凝集を防ぐためであり必ず用いること (トラブルシューティング【5-3-1】を参照)。

*3 PBS で細胞の生存率が低下する場合は FluoroBrite DMEM の使用を推奨する。

3-3. 細胞懸濁液の調製

□ 10 cm ディッシュで培養した細胞*4を使用する (以下、10 cm ディッシュ x1 枚の場合)。

*4 若い継代数でかつ 100 %コンフルエントになった状態を推奨 (トラブルシューティング【5-2-3, 5-2-4】参照)。

□ ディッシュの培養上清を除去し、PBS または血清不含の培地で細胞表面を洗浄し、除去する。

□ 2 mL の Trypsin (0.25 %) /EDTA を加え、37℃インキュベーターで細胞が剥がれるまで加温する (5~10 分間)。

□ 1 mL の FBS を加えて Trypsin の反応を停止させ、15 mL チューブに細胞浮遊液を回収する。

□ 7 mL の血清不含の培地でディッシュ中の残りの細胞も回収し、先程と同じ 15 mL チューブへ移す (total:10 mL)。

□ 遠心 (400 g, 5 分間, 常温)*5

*5 遠心分離機はスイングローター式を使用すること (トラブルシューティング【5-3-3】参照)。

□ 上清を除去し、PBS または FluoroBrite DMEM で細胞ペレットを再懸濁する (total: 10 mL)。

□ 遠心 (400 g, 5 分間, 常温)

□ 上清を除去し、1 mL の FACS buffer で細胞ペレットを再懸濁し、カウント用に一部サンプリングする。

□ 9 mL の FACS buffer を追加する (total: 10 mL)。

□ 遠心 (400 g, 5 分間, 常温)・・・この間に細胞数をカウントする。

□ 上清除去し、 1×10^6 cells/100 μ L*6の細胞密度になるように FACS buffer でペレットを再懸濁する。

*6【重要】 1×10^6 cells/100 μ Lより細胞密度が高まると細胞が凝集しやすくなるので注意。また、1.5 mL チューブにおける細胞懸濁液量の上限は 1×10^7 cells/1mL まで。それ以上になる場合はチューブ本数を増やす。

サンプルの分注およびナンバリングの例

□ 1×10^6 cells/100 μ L の細胞懸濁液を下表のように 1.5 mL チューブへ分注する (表 3-1.参照)。

表 3-1. 分注およびナンバリングの例

#	サンプル名	分注量	細胞数	備考
1	染色無し	20 μ L \sim	2×10^5 cells \sim	FACS buffer で 100 μ L に up
2	二次抗体 (anti-Rat IgM, FITC) のみ	20 μ L \sim	2×10^5 cells \sim	FACS buffer で 100 μ L に up
3	Rat IgM Isotype Control + 二次抗体	100 μ L	1×10^6 cells	-
4	Rat anti-SSEA-3 + 二次抗体	100 μ L	1×10^6 cells	-

3-4. 一次抗体*7による染色および洗浄

*7 使用する一次抗体および Isotype Control に関してはトラブルシューティング【5-1-1, 5-1-2】を参照。また、当研究室で使用している細胞以外の細胞を用いる際は事前に FcR のブロッキングを行う (トラブルシューティング【5-3-4】)

- #1~4 を氷上に移す (以後、サンプルは解析直前まで氷上に置く)。
- #3 に対して Rat IgM Isotype Control を 0.5 µg/100 µL の濃度で添加し、ゆっくりとしたピペッティングで混合後、氷上で 1 時間インキュベート (10 分毎にゆっくりとしたピペッティングで撹拌する*8)。
- #4 に対して推奨メーカーの Rat anti-SSEA-3 抗体を 0.5 µg/100 µL の濃度で添加し、ゆっくりとしたピペッティングで混合後、氷上で 1 時間インキュベート (10 分毎にゆっくりとしたピペッティングで撹拌する*8)。

*8【重要】撹拌の際は、ゆっくりとしたピペッティングで沈んだ細胞が再浮遊するまで行う。また懸濁量が多い場合 (700~1000 µL/tube) は、ゆっくりとした転倒混和による撹拌でも構わない。ただし、激しいピペッティングあるいは激しいボルテックスによる撹拌は細胞死に繋がるので行わないこと。詳細はトラブルシューティング【5-3-2】を参照 (動画あり)。

表 3-2. 一次抗体添加表

#	サンプル名	Rat IgM Isotype Control	Rat anti-SSEA3-
1	染色無し	-	-
2	二次抗体のみ	-	-
3	Rat IgM Isotype Control + 二次抗体	+(0.5 µg/100 µL)	-
4	Rat anti-SSEA-3 + 二次抗体	-	+(0.5 µg/100 µL)

- 1 時間後洗浄を開始する。それぞれのサンプルに FACS buffer を total で 1 mL になるように入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4°C)*9
- *9 1.5 mL チューブの際にも、遠心分離機はスイングローター式を使用すること。
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去 (FACS buffer が 0.1 mL 残る状態)
- ペレットをゆっくりとしたピペッティングで再懸濁後、0.9 mL の FACS buffer を入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4°C)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- ペレットをゆっくりとしたピペッティングで再懸濁後、0.9 mL の FACS buffer を入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4°C)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- ペレットをゆっくりとしたピペッティングで再懸濁後、0.9 mL の FACS buffer を入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4°C)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- ペレットをゆっくりとしたピペッティングで再懸濁する。

3-5. 二次抗体*10による染色および洗浄

*10 使用する二次抗体に関してはトラブルシューティング【5-1-3】を参照

- 30℃で保存しておいた調製済みの二次抗体 (FITC 標識 anti-rat IgM 抗体) を氷上で解凍する。
- 解凍後の二次抗体溶液をピペティングで均一にした後、遠心 (10,000 g, 3 分間, 4℃) し、上清のみを細胞の染色に使用する。なお、余った二次抗体は 4℃で保管し、使用期限は 2 週間以内とする。
- #2, #3, #4 に対して二次抗体を 1 μg/100 μL の濃度で添加し、ゆっくりとしたピペティングで混合後、氷上で 1 時間インキュベート (10 分毎にゆっくりとしたピペティングで攪拌する)。

表 3-3. 二次抗体添加表

#	サンプル名	FITC 標識 anti-rat IgM 抗体
1	染色無し	-
2	二次抗体のみ	+(1 μg/100 μL)
3	Rat IgM Isotype Control + 二次抗体	+(1 μg/100 μL)
4	Rat anti-SSEA-3 + 二次抗体	+(1 μg/100 μL)

- 1 時間後洗浄を開始する。それぞれのサンプルに FACS buffer を total で 1 mL になるように入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4℃)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去 (FACS buffer が 0.1 mL 残る状態)。
- ペレットをゆっくりとしたピペティングで再懸濁後、0.9 mL の FACS buffer を入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4℃)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- ペレットをゆっくりとしたピペティングで再懸濁後、0.9 mL の FACS buffer を入れる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4℃)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- ペレットを FACS buffer で再懸濁し解析へ進む。

Option: 細胞数が多い (1×10⁷ cells 以上) 場合や FACS 直前の懸濁液中に凝集物が認められた場合

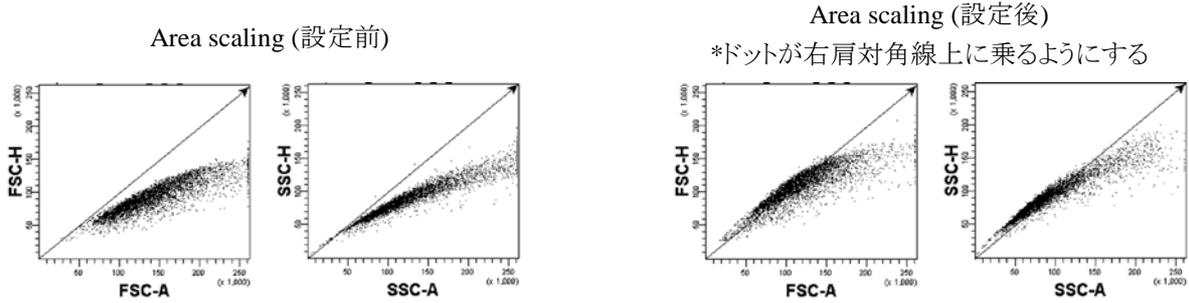
- ペレットを適当な容量の FACS buffer で再懸濁後、40 μm のセルストレイナーに通過させる。
- 遠心 (400 g, 5 分間, 4℃)
- 上清を 1.5 mL チューブの 0.1 mL のラインまで除去。
- FACS buffer で再懸濁し解析へ進む。

【4. FACS による SSEA-3 陽性細胞率の解析および Muse 細胞採取の手順】

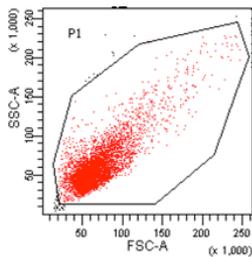
【重要】死細胞が多く含まれるサンプルは解析および採取に適さないので注意する。死細胞発生の状況は FACS 解析上で判定することが可能である。詳細はトラブルシューティング【5-3-5】を参照

4-1. ゲーティングの設定およびデータ取得の流れ (以下のデータは BD FACS Aria II の場合)

- 未染色サンプル (#1) をロードする
- まず、SSC (側方散乱光) および FSC (前方散乱光) の感度を調整し Area Scaling を行う (下図参照)。

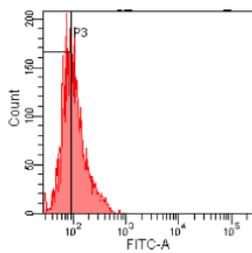


- 次に SSC-A vs. FSC-A のプロットを作成する (下図参照)。



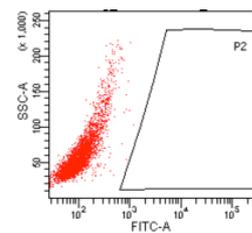
- P1 ゲートを描く。
- P1 の%Population が 95 以上になるように SSC と FSC の感度を設定する。
- プロットの[Show Populations]を All Events に設定する。

- 次に Count vs. FITC-A のヒストグラムを作成する (下図参照)。



- ヒストグラムの全体が入るように FITC の Voltage を調整する。
- プロットの[Show Populations]を All Events に設定する。
- 適当なツールでセンターバー*を描く。
(*ヒストグラムの中心を捉えるためのもので、無くても差し支えない)

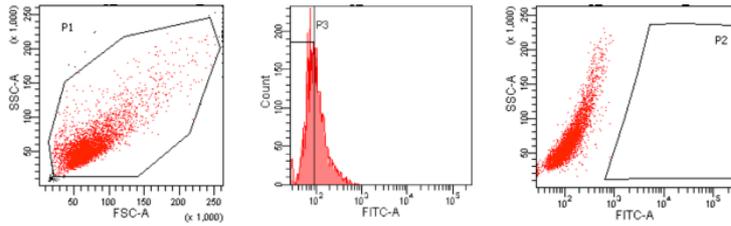
- 次に SSC-A vs. FITC-A のプロット (SSEA-3 陽性率を判定する画面) を作成する (下図参照)。



- P1 ゲート内のドットが P2 ゲートで解析されるようにゲーティングする。
- ドットが入らない領域まで P2 ゲートを左方向へシフトさせる。
- プロットの[Show Populations]を P1 に設定する。

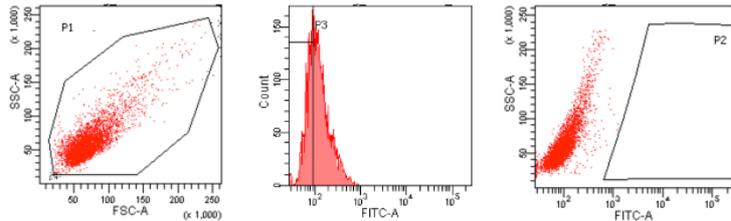
- 各種設定後、ロードしたままの未染色サンプル (#1) のデータを取得する。

- 二次抗体のみの染色サンプル (#2) をロードし、データを取得する。



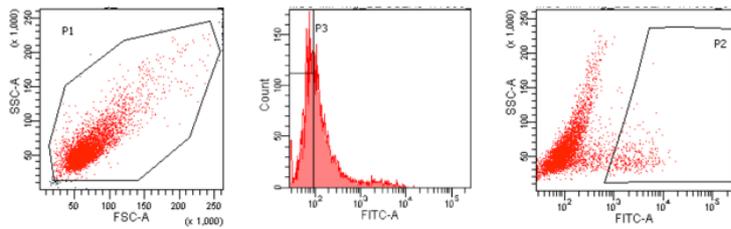
- P2 ゲートの位置をドットが入らないように調節する。
- P2 ゲート: 0 % (%SSEA-3)

- Rat IgM Isotype Control + 二次抗体の染色サンプル (#3) をロードし、データを取得する。



- P2 ゲートの位置をドットが入らないように調節する。
- P2 ゲート: 0 % (%SSEA-3)

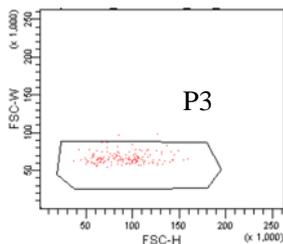
- Rat anti-SSEA-3 + 二次抗体の染色サンプル (#4) をロードし、データを取得する。



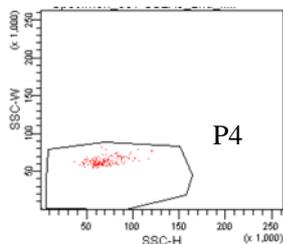
- Isotype control で設定した P2 ゲートの位置は変更せずに測定する。
- P2 ゲート: 5.2 % (例: BM-MSC 由来の SSEA-3 陽性細胞率)

4-2. Muse 細胞のソーティング

- ダブルレット除去のため FSC-W vs. FSC-H および SSC-W vs. SSC-H のプロットを作成する (下図参照)。



- SSEA-3 陽性集団 (サンプル#4 の P2 ゲート) が P3 ゲートで解析されるようにゲーティングする。
- プロットの[Show Populations]を P2 に設定する。
- FSC-W 側で逸脱した場所に出てくるドットに関してはゲートから外す。



- P3 ゲートのドットが P4 ゲートで解析されるようにゲーティングする。
- プロットの[Show Populations]を P2 に設定する。

- 細胞を受け取るための血清含有培地 (使用する細胞によって Low-glucos DMEM または High-glucose DMEM を選ぶ) が入ったチューブをソーティング先にセットする。

- Muse 細胞 (P4 ゲートの集団) のソーティングを開始する。

【5. トラブルシューティング】

5-1. 抗体に関して

5-1-1. 【重要】Muse 細胞を採取するための抗 SSEA-3 抗体はメーカーによって使えない場合があるので注意する

抗 SSEA-3 (Anti-Stage-Specific Embryonic Antigen-3, clone MC-631, Rat IgM) 抗体のメーカーは、BioLegend (Cat#330302) または Thermo (Cat#MA1-020) の使用を推奨する。また、clone MC-631 の抗 SSEA-3 抗体は、複数メーカーから入手可能であるが Muse 細胞が全く染色されない抗体もあるため十分に注意する (下図参照)。

さらに、メーカーによってはロットで検出される SSEA-3 の陽性率が大きく変動するため、最新の情報をお求めの方は出澤までご連絡ください。お返事いたします。連絡先:mdezawa*med.tohoku.ac.jp (*は@に変換してください)

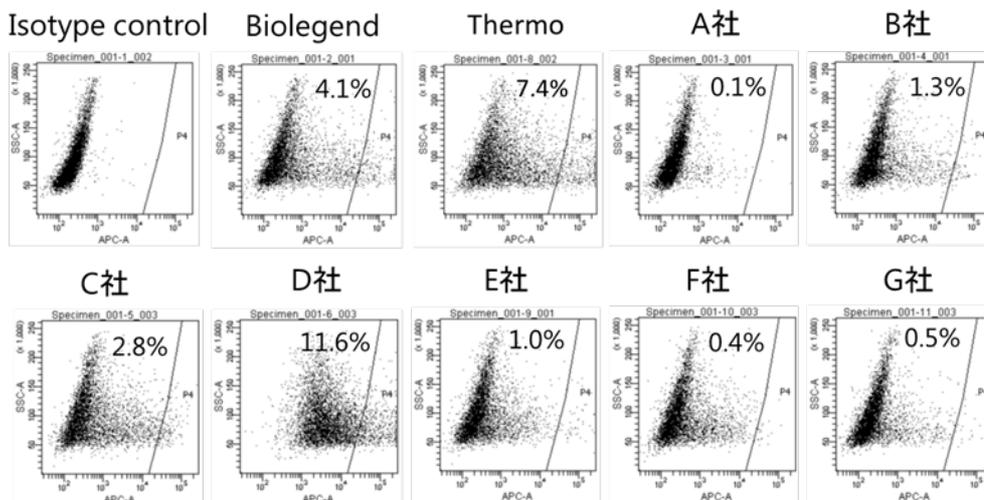
図. メーカー別による抗 SSEA-3 抗体の染色性の違い (2017 年時点)

SSEA-3抗体の染色性の違い (骨髄間葉系幹細胞)

Rat anti-SSEA-3 monoclonal antibody (MC-631) (0.5 μ g/100 μ l)

Isotype control: Purified Rat IgM, κ Isotype Ctrl (BioLegend, Cat#400801, 0.5 μ g/100 μ l)

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell (Passage 7)



D社のように陽性率が高いが、陰性の集団のバックグラウンドが上がる抗体は推奨しない

5-1-2. FACS 上で SSEA-3 陽性細胞率を正確に判定するため Isotype Control のサンプルを調製する

当研究室では、Rat IgM Isotype Control (Cat#400801, BioLegend) を使用しており、FACS 解析上では Isotype Control のゲーティングをもとに SSEA-3 陽性細胞率を評価している。

5-1-3. 蛍光標識二次抗体の使用前には必ず抗体溶液を遠心機にかけて上清のみを使用する

抗体溶液中に含まれる何らかの不純物の影響で非特異的染色が発生する可能性がある。それを回避するために、使用直前の二次抗体溶液を遠心 (10,000 g, 3 分間, 4 °C) して不純物を沈降させ、それを持ち込まないように上清のみを使用する。なお、余った二次抗体は 4°C で保管し使用期限は 2 週間以内とする。また当研究室では、Anti-rat IgM antibody, FITC conjugates (Cat#112-095-075, Jackson ImmunoResearch) を使用しており、別の標識では Anti-rat IgM antibody, APC conjugates (Cat#112-136-075) も使用可能で同メーカーより入手可能。

5-2. Muse 細胞のソースとなる間葉系細胞の培養に関して

5-2-1. 【重要】骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) の培養には FGF-2 (bFGF) を添加する

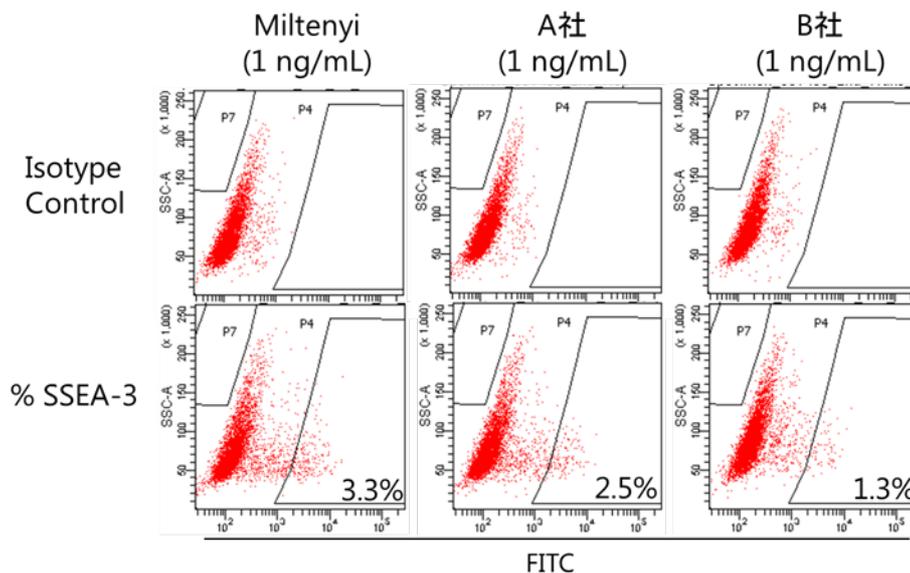
BM-MSC の培養に関しては、FGF-2 (濃度: 1 ng/mL, Cat#130-093-840, Miltenyi) を添加すること。また、メーカーによっては Muse 細胞収率が大きく変動するため注意する (下図参照)。

さらに、メーカーのロットによっても検出される SSEA-3 の陽性率が変動するため、最新の情報をお求めの方は出澤までご連絡ください。お返事いたします。連絡先: mdezawa*med.tohoku.ac.jp (*は@に変換してください)

図. メーカー別の FGF-2 による SSEA-3 陽性細胞率の違い (2017 年時点)

メーカー別の FGF-2 による SSEA-3 陽性細胞率の違い (骨髄間葉系幹細胞)

Rat anti-SSEA-3 monoclonal antibody (MC-631) (BioLegend, Cat#330302, 0.5 µg/100 µl)
Isotype control: Purified Rat IgM, κ Isotype Ctrl (BioLegend, Cat#400801, 0.5 µg/100 µl)
Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell (Passage 7)



5-2-2. 細胞の種類によって Low-glucose DMEM と High-glucose DMEM 使い分ける

BM-MSC, NHDF および HDFa の培養に関しては、必ず 10%FBS (HyClone) /Low-glucose DMEM (gibco) で培養し、High-glucose DMEM は使用しないこと。これらにおける High-glucose DMEM の使用は低増殖能や Muse 細胞収率を下げる要因になる。一方、ADSC の培養に関しては 15 %FBS (HyClone) /High-glucose DMEM (gibco) を使用する。

5-2-3. 血清はロットチェックを行い培養に適するものを使用する

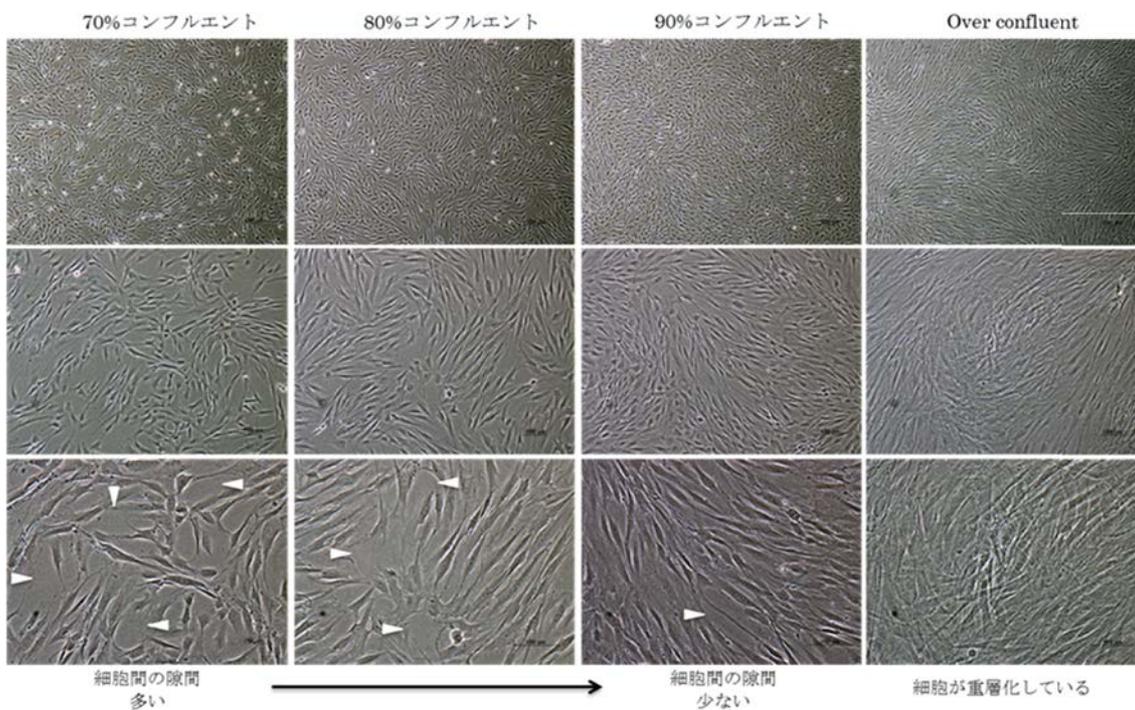
- ロットチェックに使用する細胞がある程度増えたら、継代する時と同様に Trypsin で剥がして、細胞を回収する。
- 回収した細胞をカウントし、 1×10^4 cells/500 μ l になるよう細胞を準備する。
- ロットチェックをする血清の濃度が 10% になるよう、血清と培地を加えて細胞懸濁液を用意する。
- これらの細胞を 24 well plate にまき、37°C、5%CO₂ インキュベーターに入れて、一晩培養する。
- 翌日培地交換を行う。以降、2~3 日置きに培地交換を行う。
- 細胞密度が 90% コンフルエントになったら、継代を行う。
- それぞれ回収した細胞の半分を 24 well plate にまき直す。
- 37°C、5%CO₂ インキュベーターに入れて、一晩培養し、翌日培地交換を行う。

【注意点】

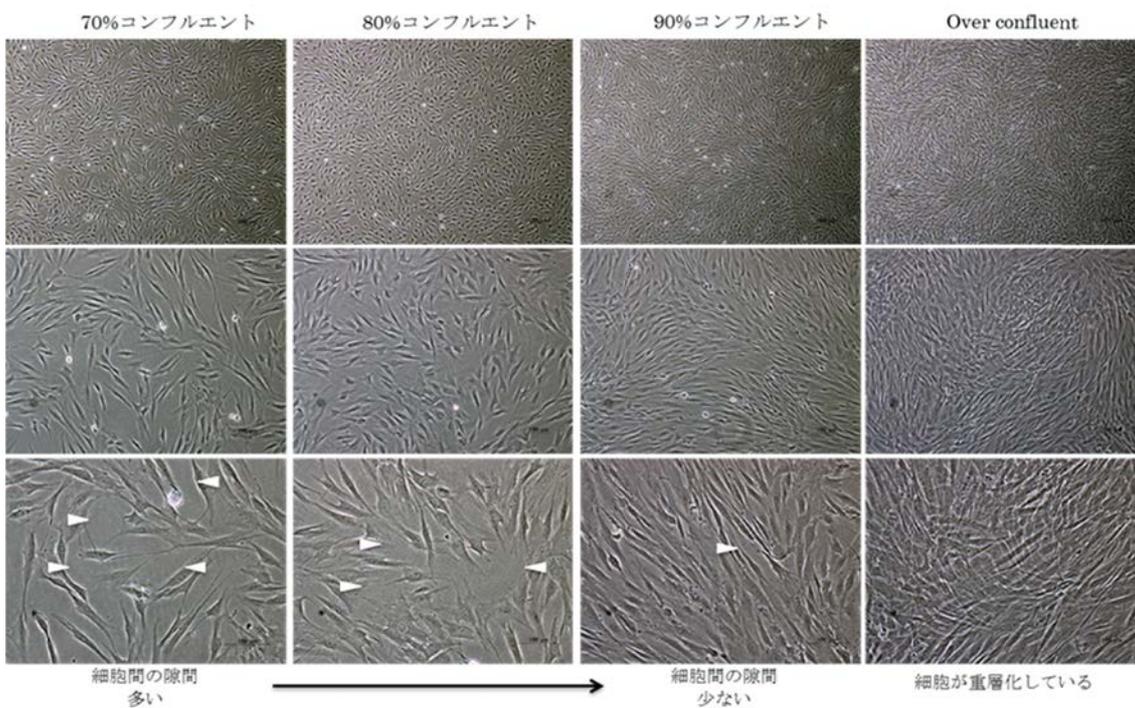
- ロットチェックでは、細胞の増殖、形態変化、使用する細胞の能力の変化を見極めるために行い、最良の結果が得られる血清を購入する。血清のロットチェックでは、チェック用の血清に代えてから 1 回目の培養では以前使用していた血清の影響を受けるため、少なくとも 2~3 回継代した後の細胞増殖、細胞形態で判断する。
- 余裕があれば血清濃度を 5~20% の間で条件を振り、それぞれの細胞増殖、細胞形態で判断するとなお良い血清が得られる。
- 当研究室では HyClone の血清を使用しているが、ロットによって悪いものもあるので、あらゆるメーカーのあらゆるロットを 10~20 種類集めてロットチェックを行うと良い。
- 使用する血清は必ずしも非働化する必要はない。

5-2-4. 細胞培養時は常に confluency に注意し、継代は 90%コンフルエントの時に行う (下図参照)

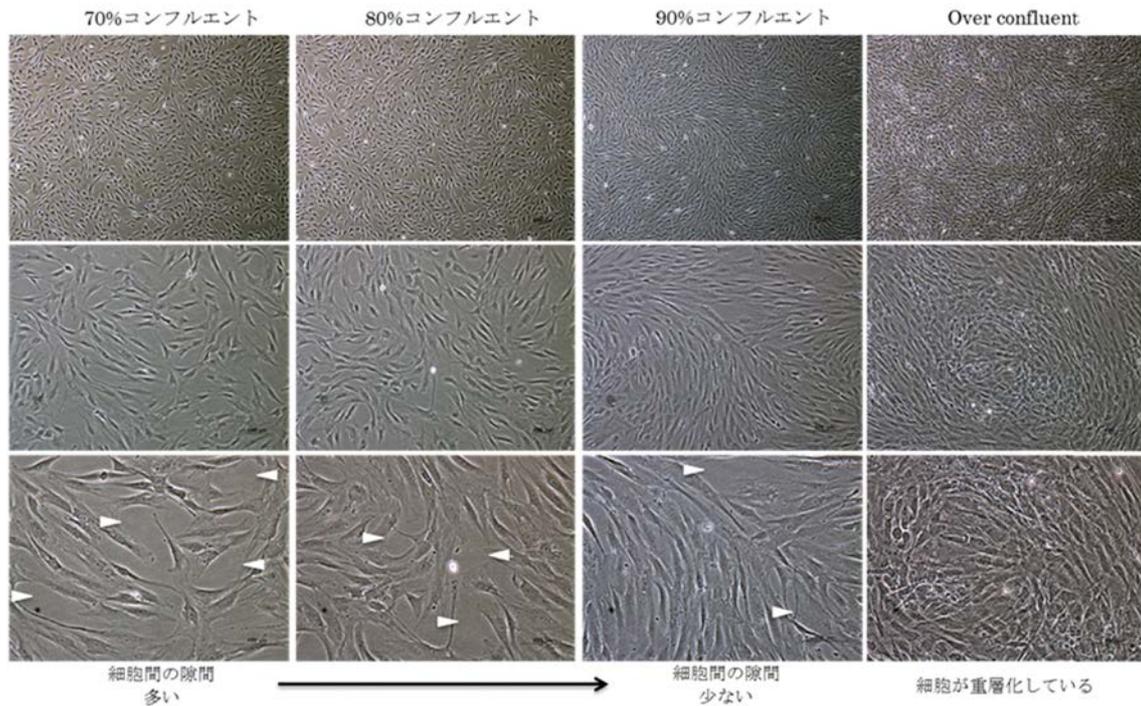
・NHDF



・HDFa



・BM-MSC



5-2-5. Muse 細胞採取に使用する細胞は、若い継代数を推奨

細胞の継代数は Muse 細胞収率に大きく左右する。市販品を解凍後、継代培養してから 10 継代 (P=10) 以内の細胞の使用を推奨する。

5-2-6. FACS 直前の培養密度は、100%コンフルエントを推奨

ディッシュで培養中の細胞密度は Muse 細胞収率に大きく左右する。収率を高めるためには 100%コンフルエントまで培養した細胞を推奨する。

5-3. FACS に向けた細胞調製に関して

5-3-1. 細胞凝集を防ぐために FACS buffer にはキレート剤を添加する

間葉系細胞は接着性が高い細胞であるため、FACS buffer にはキレート剤である EDTA を必ず加える。

5-3-2. 抗体添加後はきちんと反応させるために、ゆっくりとしたピペッティングで攪拌を行う (動画あり)

細胞懸濁液の攪拌に関する動画は別途資料【細胞懸濁液の攪拌に関する動画】を参照してください。

細胞懸濁液に抗体 (一次抗体・二次抗体共に) を入れて反応させるときは、ゆっくりとしたピペッティングによる攪拌を行うこと。具体的には、沈んだ細胞が再浮遊するまで行う。また懸濁量が多い場合 (700~1000 μ L/tube) は、ゆっくりとした転倒混和による攪拌でも構わない。ただし、激しいピペッティングあるいは激しいボルテックスによる攪拌は細胞が傷つき細胞死につながるので行わないこと。

5-3-3. 細胞懸濁液を遠心分離するときはスイングローター式の遠心機を使用する

細胞の遠心にはスイングローター式の遠心分離機を使用すること。アングルローター式での遠心では細胞のロスにつながり、最終的に得られる細胞数が減少する。

5-3-4. 当研究室で使用している以外の細胞を用いる場合は FcR のブロッキングを行う

BM-MSC, ADSC, NHDF および HDFa 以外の細胞を用いる場合には、一次抗体染色前に 10 % normal human serum にて 4°C で 20 分間のブロッキングを行う。

5-3-5. 死細胞を多く含むサンプルでは、SSEA-3 陽性細胞率の解析および Muse 細胞採取に適さない

死細胞が多く発生したサンプルでは死細胞に対する非特異的染色が発生しやすくなり正確な Muse 細胞率が得られない。また、強引に採取したとしても細胞の生存率が低下している場合が多い。なお FACS 解析時の FSC-A vs. SSC-A のプロットにおいて死細胞を評価することができる (下図参照)。

