

ハイスピードフローサイトメーター MoFloを用いた 幹細胞分取

はじめに

機能的幹細胞集団の単離は、幹細胞の生態理解、臨床的な移植のどちらにおいても、生物学、医学にとって非常に興味深い事柄です。造血系・非造血系幹細胞の双方について、表現型マーカー、機能的特性および *in vivo* での再構成能を同定する研究が行われています。歴史的には、これらの多能性幹細胞を捉えることが実験を行ううえでの大きな課題でした。例えば移植プログラムにおいては、通常、刺激したドナー由来の末梢血幹細胞は白血球の0.01~0.1%、骨髄の幹細胞は0.5~5%です¹。これらの細胞の純化には、マルチパラメータ イムノフェノタイピングや、機能特性とイムノフェノタイピングの組み合わせによるハイスループットフローサイトメトリーなど、多くの方法が行われてきました。ハイスピードフローサイトメーター MoFloは、このような実験系で非常に有用であることが示されています。以下に、MoFloで骨髄SP細胞 (side population) を純化した例を示します。

材料と方法

染色

5~8週齢C57BL/6マウスの脛骨および大腿より採取した骨髄をHBSSに懸濁しました(ポリプロピレン製遠心チューブに分注)。この懸濁液に含まれる有核細胞の数を計数しました。このサンプルを遠沈し、あらかじめ温めておいたDMEMで 1×10^6 cells/mLになるよう再懸濁しました。最終濃度が5 μ g/mLとなるようHoechst33342を添加後、サンプルをよく混和し、ウォーターバスで37°Cにて正確に90分間インキュベーションしました。インキュベーション後、すぐに4°Cで遠心し、ペレットを冷HBSSに再懸濁して4°Cで保存しました(追加で表面抗体標識を行う場合には、細胞懸濁液が4°Cに保った状態であることを確認してください。必要に応じて、ヨウ化プロピジウム2 μ g/mLを加えて、ソートから非生存細胞を除外します²)。

機器のセットアップ

351nm UVレーザー搭載MoFloを用いて、青色蛍光を450/20バンドパスで、赤色蛍光を675 LPフィルターで検出しました。

結果

前方散乱光と側方散乱光のドットプロットで、細胞集団をゲーティングしました(図1a)。目的の前駆細胞は、Hoechst BlueとHoechst Redのドットプロットで主な細胞集団の左方にあたる特徴的な位置、すなわちside populationの位置に認められます(図1b)。これらの希少なSP細胞(Hoechst流出能を有する造血幹細胞のタイプ)を、詳細に調べるために分取しました。

考察

SP細胞を含む^{16~27}造血幹細胞および非造血幹細胞集団の純化は^{3~15}、MoFloでルーチン化することができます。MoFloの革新的な電気・光学・流体学的な技術は、これらの希少なイベントを捉えるのに必要な正確性および回収率を提供します。さらにMoFloは、特許技術であるノズルデザインにより、細胞の乱れを抑え、細胞への加速の影響を最小化します。これにより、純化後もこれらの細胞の機能は保たれ、*in vivo*での再構成、移植後生着及び長期培養が可能になります^{28~34}。

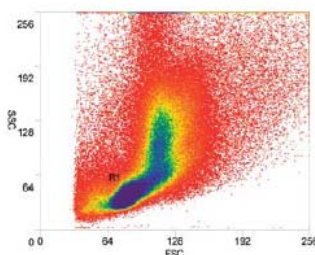


図1a
前方散乱光 vs 側方散乱光のドットプロット図により、目的の細胞集団を確認します

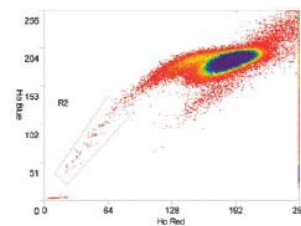


図1b
ゲーティング後、目的の前駆細胞は主な細胞集団の左方に認められます

参考文献

1. Ashcroft RG and Lopez PA. Commercial high-speed machines open new opportunities in high-throughput flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243:13-24.
2. Goodell MA. Hoechst 33342 HSC staining and stem cell purification protocol. Available at: http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/index2.html
3. Akashi KX, He J, Chen H, Iwasaki C, Niu B, Steenhard J et al. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 2003; 101:383.
4. Goan SR, Junghahn I, Wissler M, Becker M, Aumann J, Just U et al. Donor stromal cells from human blood engraft in NOD/SCID mice. *Blood* 2002; 96:3971.
5. Habibian HK, Peters SO, Hsieh CC, Wu J, Vergilis K, Grimaldi CI et al. The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J Exp Med* 1998; 188:393.
6. Henckaerts E, Geiger H, Langer JC, Rebollo P, Van Zant G, Snoeck HW. Genetically determined variation in the number of phenotypically defined hematopoietic progenitor and stem cells and in their response to early-acting cytokines. *Blood* 2002; 99:3947.
7. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999; 96:14482.
8. Kirby S, Walton W, Smithies O. Hematopoietic stem cells with controllable tEpoR transgenes have a competitive advantage in bone marrow transplantation. *Blood* 2000; 95: 3710.
9. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2000; 95:1502.
10. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *PNAS* 2002; 99:11872.
11. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *PNAS* 2002; 99:1341.
12. Okuno Y, Huettner CS, Radomska HS, Petkova V, Iwasaki H, Akashi K et al. Distal elements are critical for human CD34 expression in vivo. *Blood* 2002; 100:4420.
13. Schaniel C, Bruno L, Melchers F, Rolink AG. Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* 2002; 99:472.
14. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* 2002; 195:1145.
15. Zhong JF, Zhan Y, Anderson WF, Zhao Y. Murine hematopoietic stem cell distribution and proliferation in ablated and nonablated bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100:3521.
16. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159:123-134.
17. Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L et al. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J* 2003; The FASEB Journal Express Article doi:10.1096/fj.03-0744fje; Published online December 19, 2003.
18. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-402.
19. Klarman K, Ortiz M, Davies M, Keller JR. Identification of in vitro growth conditions for c-Kit-negative hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102: 3120-3128.
20. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS* 2003; 21: 12313-12318.
21. Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS, Radomska HS, Gonzalez DA, Tenen DG et al. Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *PNAS* 2002; 99: 6246-51.
22. Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* 2003; 111: 71-79.
23. Mogi M, Yang J, Lambert JF, Colvin GA, Shiojima I, Skurk C et al. Akt Signaling Regulates Side Population Cell Phenotype via Bcrp1 Translocation. *J Biol Chem* 2003; 278: 39068-39075.
24. Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multi-parameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood* 2003; *Blood First Edition Paper*, prepublished online Nov 26 2003, DOI 10.1182/Blood-2003-09-3281.
25. Radomska HS, Gonzalez DS, Okuno Y, Iwasaki H, Nagy A, Akashi K et al. Transgenic targeting with regulatory elements of the human CD34 gene. *Blood* 2002; 100: 4410-4419.
26. Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; 285: 97-104.
27. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1166-73.
28. Chatterjee S et al. Transduction of primitive human marrow and cord blood-derived hematopoietic progenitor cells with adenoassociated virus vectors. *Blood* 1999; 93(6): 1882-1894.
29. Hulspsas R et al. Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 2000; 40: 245-250.
30. Shih C et al. Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94(5): 1623-1636.
31. Shih CC, Hu MC, Hu J, Weng Y, Yazaki PJ, Medeiros J et al. A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000; 95:1957.
32. Shih CC, Weng Y, Mamelak A, LeBon T, Hu MC, Forman SJ. Identification of a candidate human neurohematopoietic stemcell population. *Blood* 2001; 98:2412.
33. Spyridonidis A et al. Purging of mammary carcinoma cells during ex vivo culture of CD34+ hematopoietic progenitor cells with recombinant immunotoxins. *Blood* 1998; 91(5): 1820-1827.
34. Stewart FM et al. Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts. *Blood* 1998; 91(10): 3681-3687.

謝辞

本稿に使用したデータおよびプロトコルをご提供いただいた、Karen Helm先生(コロラド大学ヘルスサイエンスセンター所属)、Margaret Goodell博士(バイラー医科大学細胞・遺伝子治療センター所属)に御礼申し上げます。