

***研究用臍帯血テクニカルシリーズ**

研究用ヒト臍帯血単核細胞 (CBF) から 樹状細胞 (DC1) への誘導



単核細胞(CBF) (大容量)
1×10⁸個以上/バッグ



単核細胞(CBF) (小容量)
1×10⁷個/チューブ



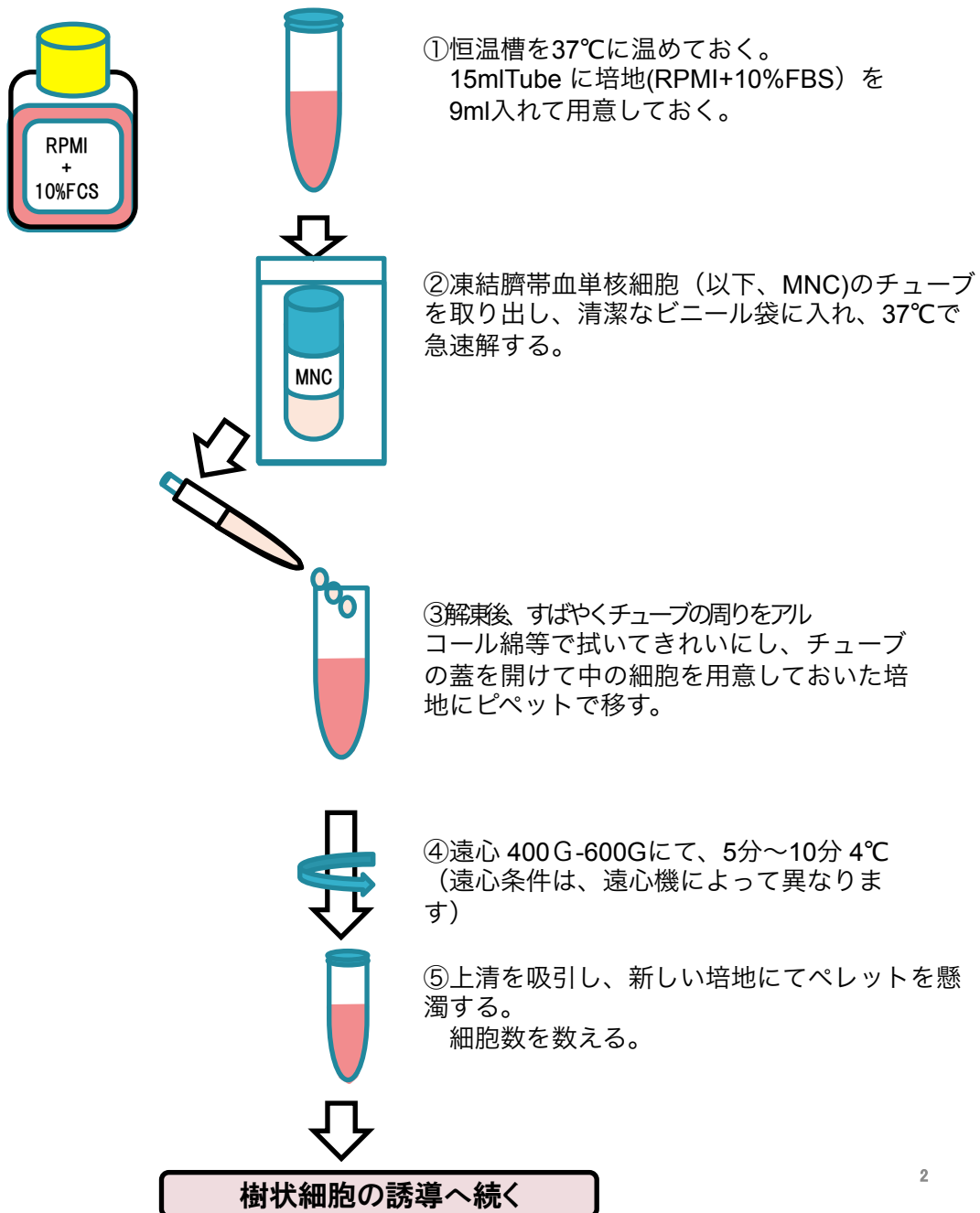
AMED NBRP

研究用ヒト臍帯血幹細胞バンク事業
(代表機関 東京大学医科学研究所)

理化学研究所バイオリソースセンター
<http://cell.brc.riken.jp/hcb>



凍結臍帯血単核細胞(CBF)試料 (1×10^7 /tube)の解凍・洗浄 (例)

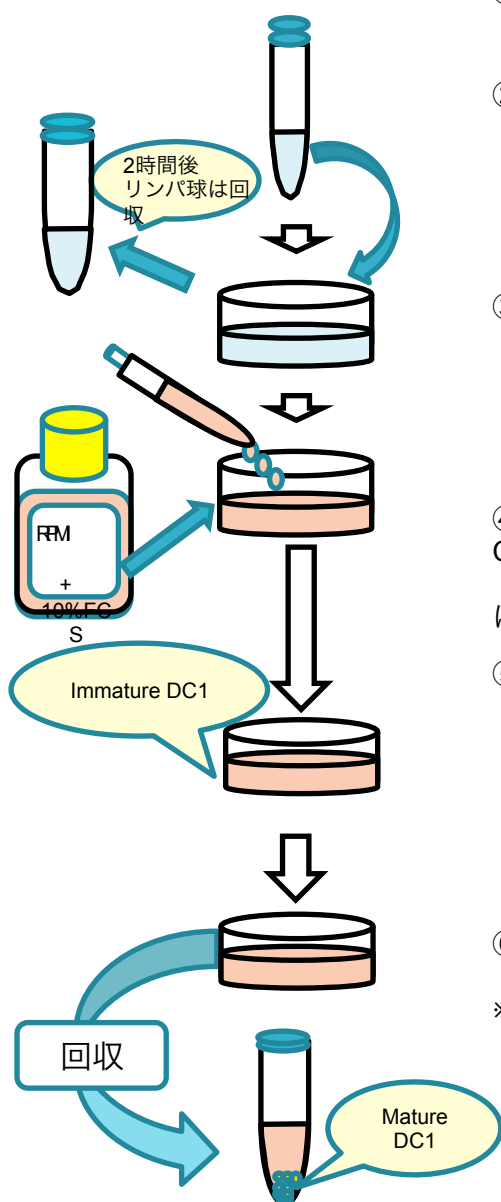


樹状細胞 (Dendritic cell 1 : DC1)への誘導

【試薬の準備】

1. 培地 (RPMI+10%FBS)
2. サイトカイン
 - ①GM-CSF, ②IL-4, ③TNF- α

【細胞調製について】



①準備した単核球(MNC) をPBS(-)で約 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 10ml に浮遊する。

②Dish (付着細胞用) にMNCを入れる (10cm Dishに 1×10^7 が適量)。
 37°C $5\%\text{CO}_2$ で2時間PBSにて、培養する。

③2時間後、上清を回収 (リンパ球) し、1度緩やかにPBS(-)でリンスした後、等量 (10ml)の培地 (RPMI+10%FBS) に置換する。

※この間に、単球(Monocyte)がDishに付着している。リンパ球が必要な場合、回収し

④培地にIL-4 ($250\text{ng}/\text{ml}$)、GM-CSF ($10\text{ng}/\text{ml}$) を加える。

※Dishに付着した単球を樹状細胞 (DC1) に誘導する。

⑤5日後、樹状突起を出している細胞を確認して、培地を新しい培地に置換し、TNF- α ($10\text{ng}/\text{ml}$)を加える。

※この時点で突起が出ていて、Dishに付着していれば、OK (=Immature DC)。

⑥2日後 (培養開始から7日後) に細胞を回収する。

※これでMature DCが完成する。

回収は、セルスクレーパーやリフターを用いて、剥ぎ取って回収する (トリプシンは不要)。Mature DCは やや浮遊傾向があるので、回収時注意する。

もし、特異的ペプチドで パルスする場合には、⑤の段階で添加すること。

【DCの解析と実験例】

1) フローサイトメトリー(FCM)解析

樹状細胞 (DC1)は、CD33+ ILT3(CD85k)陽性、単球のマーカーであるCD14/CD16は陰性です。

2) Mature DC1を用いた同種リンパ球刺激試験の例 (CFSE染色法)

原理：Responder(R)であるリンパ球をCFSEという分裂の度に輝度が半減する蛍光色素で染色し、Stimulator(S)同種リンパ球や樹状細胞を加えると反応して増殖し、フローサイトメトリーのFITC linear modeで解析する方法である。この系に種々の増殖抑制細胞や試薬の効果をフローサイトメトリーで可視できる。

Responder cell(R)の準備：臍帯血単核球試料(CBF：ここでは、以下一般名MNCという)を解凍し、細胞数 1×10^7 個をCFSE染色する。

Stimulator cell(S)の準備：誘導した樹状細胞：DCを 1×10^6 個用意し放射線照射する。

Option(O)：臍帯由来間葉系細胞または制御性T細胞を1日前に事前に播種しておく。

R：S = 10:1の割合で混合し、4日間培養後にフローサイトメトリーでCFSEを検出する。

* Oの混合割合は、細胞種によって異なります。

2)-1. Responder (R) (臍帯血単核球試料(MNC))の準備 (CFSE染色)

- ① 恒温槽を37°Cにする。
- ② PBS 4mlを15mlTubeに取り37°Cで温めておく。2本準備する。
- ③ 15mlTubeに培地を9ml入れてクリーンベンチの中に準備しておく。
- ④ **凍結臍帯血単核細胞(MNC)** (1×10^7 /tube)1本を、準備しておいた培地 (10%FBS +RPMI)を使って解凍する。一部未染色用にMNCsを別のTubeに取っておく。
- ⑤ 解凍したMNCをPBS(-)で2回洗浄する。
- ⑥ 洗浄後のMNCペレットに37°Cで温めておいたPBS2mlにて懸濁する。
- ⑦ 温めておいたもう1本のPBS 4mlに10mM-CFSEを1 μ l加え、よく混和する。
2.5 μ M-CFSE(X2conc. CFSE)
懸濁したMNC2mlに2.5 μ M-CFSEを2ml加え混和する。
- ⑧ 37°C (CO₂ インキュベーター)で4.5min 温めた後よく混和して37°Cに入れる。
- ⑨ 再び4.5分温めた後よく混和する。
- ⑩ FBSを4ml加えよく混和し、室温で1分静置する。
- ⑪ 遠心し、上清を除去する。
- ⑫ 1mlの培地に懸濁後、細胞数を数えて、 2×10^6 /mlに調製する。

2)-2. Stimulator(S) (誘導した樹状細胞：DC)の準備

- ① Mature DCを回収し、 2×10^5 /mlに調製する。

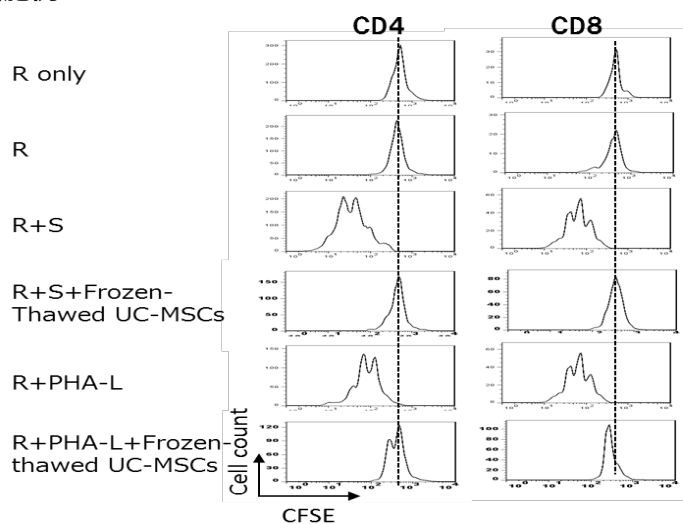
2)-3.細胞の混合

- ① 丸底またはV型96 well-plateにR+S+(O)を混合する。全体の培養液の量は200 μ lに調製するように適宜培養液を追加調製する。オプション細胞によっては24 well-plateを用いる場合等がある。反応をより強調するために抗CD3抗体を 0.75ng/ml(最終) になるように添加する。その場合には、抗CD3抗体無添加分も陰性コントロールとして必要。
- ② 37°C5%CO₂Incubatorで4日間培養する。
- ③ 陽性コントロールとして、PHA-L添加 (Positive control) 、CFSE無染色を作っておく。

2)-4. 回収および免疫染色

- ① CFSEは、FITCと同じ蛍光波長なので、フローサイトメトリーでリンパ球を染色する場合には、CD4-PE-Cy7, CD8-APCなどを用いて染色する。
- ② 測定直前に、Propidium Iodine (PI) 2 μ lを入れる。
- ③ フローサイトメーターで測定する。

実施例



Shimazu T, et al, *Cytotherapy*. 2015;17(5):593-600より一部改変

CFSEの輝度は、分裂の度に半減するため、同種DCに反応してリンパ球 (CD4+, CD8+)が増殖すると、左にシフトする。(東京大学医科学研究所 セルプロセッシング・輸血部 資料提供)



AMED NBRP

研究用ヒト臍帯血幹細胞バンク事業
(代表機関 東京大学医科学研究所)

理化学研究所バイオリソースセンター
<http://cell.brc.riken.jp/hcb>

