

癌免疫研究における温度応答性細胞培養器材 UpCell[®]/RepCell[®]の利用

細胞シート回収のための細胞培養ディッシュとして利用されている UpCell[®] ですが、細胞シートの作製以外にも様々なアプリケーションで使用されています。トリプシンなどのタンパク質分解酵素フリーで細胞が回収可能なことから、細胞の生理活性を維持、細胞表面の受容体、フローサイトメーターの抗原タンパク質が高度に保持されるという特徴があります。

近年注目されている癌免疫療法では、樹状細胞やマクロファージなど種々の免疫細胞が使用されています。これらの細胞の一部は培養容器に強く接着しているため、細胞を回収する際に長時間のトリプシン処理などで細胞がダメージを受けることが有ります。

本レポートでは、これらの免疫細胞の培養・回収に UpCell[®]/RepCell[®] を使用する事により、細胞の生理活性を高度に保持した状態での回収の実例を紹介します。

アプリケーション

1

成熟樹状細胞の回収における

温度応答性細胞培養器材 UpCell[®]/RepCell[®] の有効性

癌免疫療法において、生理活性の高い成熟樹状細胞を効率よく回収する事が重要である。しかしながら、OK-432（ピシバニール）等により成熟した樹状細胞は、種々の接着因子が発現しており、培養皿からの剥離が困難だった。RepCell[®]により回収した成熟樹状細胞は、細胞表面抗原である CD86 および CD83 を高度に保持しており、また高い IL-12 産生能を保持していることがわかった。細胞表面抗原 CD86 は、活性化 T 細胞や B 細胞と抗原提示細胞との相互作用における必須因子であることが報告されている。これらの結果から、RepCell[®] により回収された樹状細胞は、細胞治療において高い効果を持つことが期待される。

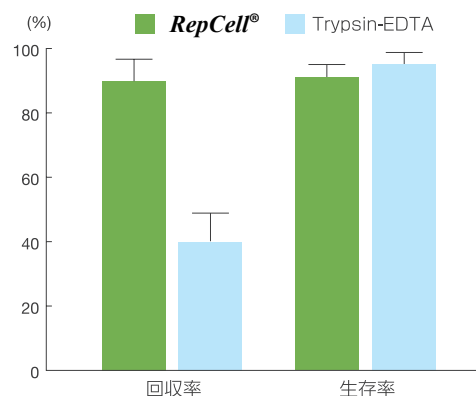
RepCell[®] およびトリプシン処理による成熟樹状細胞の回収率

方法

1. ヒトバフィーコート層を PBS により希釈し、リンホセパール I（免疫生物学研究所）に重層させた後、400xg、30 分間遠心。中間層の PBMC 画分を分取し、PBS を加えて、同様の条件で 3 回遠心。
2. 分離した PBMC を 24 時間培養し、浮遊細胞を吸引除去。GM-CSF および IL-4 を加えて、5 日間培養し、未熟樹状細胞へ誘導。
3. 回収した未熟樹状細胞を RepCell[®] (a) または一般の培養容器 (b、ここではファルコン プライマリアカルチャーウェアを使用) に播種。OK-432（ピシバニール）を加え、48 時間培養し、成熟化。
4. a. RepCell[®] : RepCell[®] 上で培養した細胞は、4°C の PBS を加え、室温（25°C）で 5 分静置後、ピペッティングにより浮遊細胞を回収。
b. トリプシン処理 : 0.25% トリプシン -1mM EDTA を加え、37°C で 5 分静置後、ピペッティングにより浮遊細胞を回収。
5. 細胞数および生存率を計測。

結果

RepCell[®] およびトリプシン処理により回収した樹状細胞の存率はいずれも同等だったが、回収率については RepCell[®] では約 90% だったが、トリプシン処理では 40% 程度であった。このことから RepCell[®] により高い回収率が得られることがわかった。



ウェスタンブロッティングおよびフローサイトメトリー解析による CD86 および CD83 のタンパク質量の比較

方法

ウェスタンブロッティング

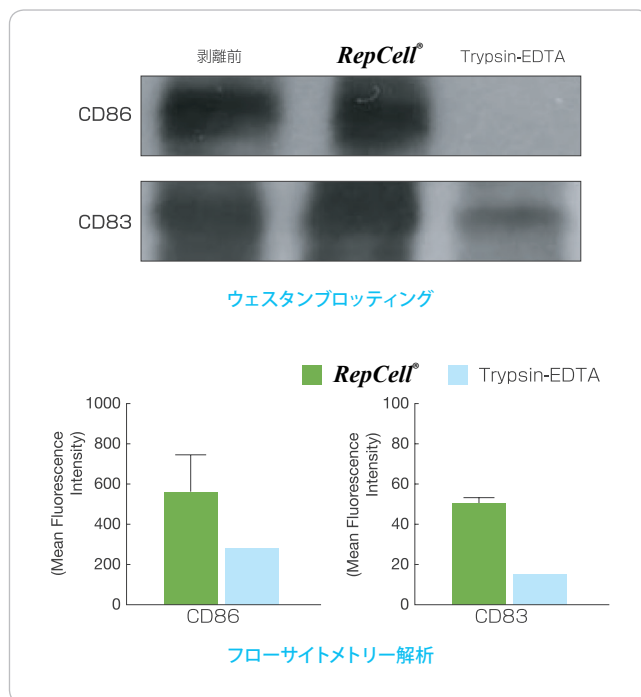
1. 細胞溶解液によりサンプル調製を行い、SDS電気泳動によりタンパク質を分離し、ブロッティング。
2. 抗ヒト CD83 抗体 (R&D systems) および抗ヒト CD86 抗体 (SantaCruz Biotechnology) を使用し、検出。

フローサイトメトリー解析

1. 1% FBS を含む PBS に抗ヒト CD83 抗体 (BD Biosciences)、抗ヒト CD86 抗体 (eBiosciences) またはアインタイプコントロール抗体を加え30 分インキュベート
2. 1% FBS を含む PBS で 3 回遠心、洗浄後、フローサイトメトリーにより解析

結果

ウェスタンブロッティングおよびフローサイトメトリー解析のいずれにおいても、**RepCell®**により回収した細胞ではトリプシン処理と比較して CD83 および CD86 が高度に保存されていることが分かった。



RepCell® およびトリプシン処理で回収した細胞の IL-12 産生能の比較

方法

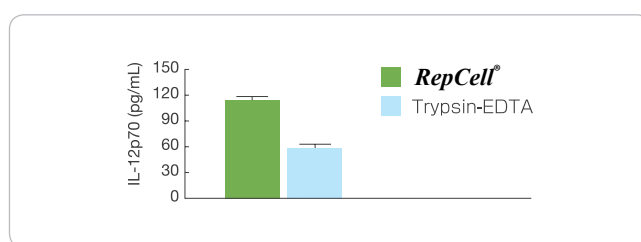
1. 0.1KE/mL OK-432 を含む培地で 48 時間培養。
2. ヒト IL-12 (p70) ELISA キット (ENDOGEN) を用いて、培地中の IL-12濃度を測定。

結果

OK-432により成熟化された樹状細胞は、IL-12を発現しており、その量は**RepCell®**で回収した樹状細胞では、トリプシン処理して回収した細胞と比較しておよそ2倍であった。

樹状細胞に関する参考文献

1. 三好信寛, 澤口和弘, 増田彰, 横見瀬裕保, 粕谷桂一, 温度応答性培養皿を用いた OK-432 誘導成熟樹状細胞培養法の確立, *Biotherapy*, 2008. 22(5): p.339-343.
2. Butts, C.L., et al., Effects of dexamethasone on rat dendritic cell function. *Horm Metab Res*, 2007. 39(6): p. 404-12.
3. 1. Butts, C.L., et al., Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol*, 2007. 19(3): p. 287-96.



アプリケーション

2

マクロファージの回収における
温度応答性細胞培養器材 UpCell®/RepCell® の有効性

マクロファージは、樹状細胞と同様、接着が強く培養容器からの回収に長時間のトリプシン処理やスクレーパーによる剥離が行われているが、これらの処理により細胞がダメージを受けてしまうことがある。マクロファージの回収において、温度応答性細胞培養容器 UpCell®/RepCell® を使用する事により、効率よく回収できることを示す。

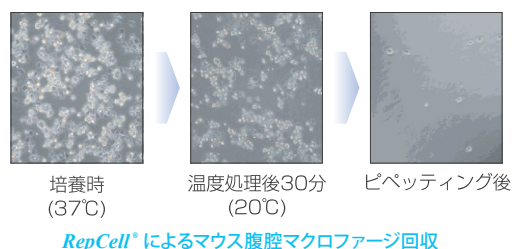
マウス腹腔マクロファージの RepCell® による回収

方法

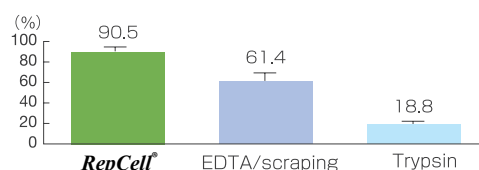
1. マウス腹腔マクロファージを RepCell® または通常の細胞培養用ディッシュに 2.4×10^5 cells/cm² で播種。
2. 2 時間培養後、PBS で洗浄し、浮遊細胞を除去。
3. a. RepCell® : 細胞の回収は、室温 (20°C) で 30 分静置後、ピペッティングにより浮遊細胞を回収。
b. トリプシン処理 : 通常の細胞培養ディッシュ上の細胞を 0.25% トリプシン -1mM EDTA を加え、37°C で 5 分静置後、ピペッティングにより浮遊細胞を回収。
c. EDTA/scraping : 培地を取り除き、2.5mM EDTA を加え、20 分氷冷後、スクレーピングにより回収。
4. 細胞数を計測し、回収率を算定。

結果

RepCell® で培養したマウス腹腔マクロファージは、20°C、30 分の温度処理により、ピペッティングにより容易に浮遊状態にすることが出来た。また、回収率は、90% 以上で、トリプシン処理や EDTA/scraping と比較して有意に高かった。



RepCell® によるマウス腹腔マクロファージ回収



マウス腹腔マクロファージ回収率

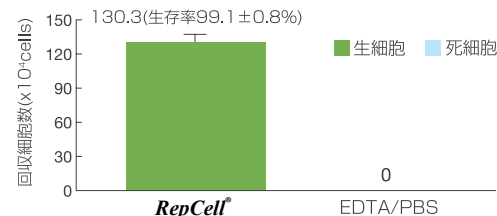
PMA 処理により分化誘導された HL-60 細胞株由来のマクロファージの回収

方法

1. HL-60 細胞株を RepCell® および通常の細胞培養用ディッシュ 10cm に 1.7×10^3 cells/cm² で播種。
2. 100nM phorbol myristate acetate (PMA) を添加した培地で 3 日間分化誘導。
3. PMA を除去した培地に交換し、2 日間培養。
4. PBS で洗浄して浮遊細胞を除去後、細胞を回収。
a. RepCell® : RepCell® 上の細胞は氷冷、5 分静置後、ピペッティングにより回収。
b. EDTA/PBS : 通常の細胞培養用ディッシュ上の細胞は、培地を除去し、0.25mM EDTA に置き換えて、氷冷、5 分静置後、ピペッティングにより回収。
5. 細胞数を計測し、回収率を算定。

結果

RepCell® 上で培養し、温度処理による回収では、ほぼ100%の回収率および生存率だったのに対し、EDTA/PBS処理での回収率はほぼ0%だった。このことからHL-60細胞株から分化誘導したマクロファージの回収にはRepCell® が有効であった。



(東邦大学理学院・小林芳郎教授ご提供)

マクロファージ回収に関する参考文献

1. Alabraba, E.B., et al., A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J Immunol Methods*, 2007. 326(1-2): p. 139-44.
2. Gordon, I.O. and R.S. Freedman, Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(5): p. 1515-24.

RepCell® の3mm × 3mm の
グリッド・ウォール



UpCell®とRepCell®は、どちらも同じ温度応答性の細胞培養器材ですが、RepCell®は表面のグリッド・ウォールにより、シングルセルや小コロニー状での細胞の回収に適しています。樹状細胞やマクロファージなどの細胞間接着がほとんど見られない細胞腫では、UpCell®とRepCell®のどちらでも使用可能です。

UpCell® 細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材

品名	サイズ (mm)	表面積	容量	品番	包装	希望販売価格 (税込)
96 穴マルチウェル	86 (L) × 128 (W)	0.33cm ² /well	0.4mL/well	CS1001	20 枚	¥63,800
				CS1002	5 枚	¥17,600
48 穴マルチウェル		1.1cm ² /well	0.5mL/well	CS3001	20 枚	¥63,800
				CS3011	5 枚	¥17,600
24 穴マルチウェル		1.9cm ² /well	1mL/well	CS3002	20 枚	¥63,800
				CS3012	5 枚	¥17,600
12 穴マルチウェル		3.5cm ² /well	2mL/well	CS3003	20 枚	¥63,800
				CS3013	5 枚	¥17,600
6 穴マルチウェル		9.6cm ² /well	3mL/well	CS3004	20 枚	¥63,800
				CS3014	5 枚	¥17,600
10cm ディッシュ	92 (D) × 17 (H)	56.7cm ²	12.5mL	CS3005	20 枚	¥105,600
				CS3015	5 枚	¥28,600
6cm ディッシュ	60 (D) × 15 (H)	21.5cm ²	5mL	CS3006	20 枚	¥52,800
				CS3016	5 枚	¥15,400
3.5cm ディッシュ	40 (D) × 12 (H)	8.8cm ²	3mL	CS3007	20 枚	¥42,900
				CS3017	5 枚	¥12,100

RepCell® 細胞回収用温度応答性細胞培養器材

品名	サイズ (mm)	表面積	容量	品番	包装	希望販売価格 (税込)
10cm ディッシュ	92 (D) × 17 (H)	56.7cm ²	12.5mL	CS1005	20 枚	¥105,600
				CS1015	5 枚	¥28,600
6cm ディッシュ	60 (D) × 15 (H)	21.5cm ²	5mL	CS1004	20 枚	¥52,800
				CS1014	5 枚	¥15,400
3.5cm ディッシュ	40 (D) × 12 (H)	8.8cm ²	3mL	CS1003	20 枚	¥42,900
				CS1013	5 枚	¥12,100

※仕様は改良のため、予告なく変更する事があります。

※本製品は、医療機器ではなく、研究用に限定しております。医薬品の製造、品質管理、各種診断および研究などその使用目的にかかわらず、人体には使用しないでください。

サンプルのご依頼、記載された情報についてのご質問は下記までご連絡ください。

販売代理店

販売代理店