

幹細胞 / 前駆細胞の新しい同定試薬 ALDEFLUOR[®] のご紹介



従来の幹細胞の同定

◆ Immunophenotyping

表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いる方法

自己複製能・多分化能に乏しい細胞も含む場合があるため、
目的によってはより精度の高い細胞の絞込みが必要

* 例えば、弱った細胞においても表面抗原は有効



ALDEFLUORでは・・・

「Primitiveな細胞」 「Matureな細胞」

「生きている細胞」 「死んでいる or 弱っている細胞」

ALDEFLUORではこの両方を見分け、幹細胞・前駆細胞としての能力がより高い、かつ生きている細胞のみを同定します。



新たな指標“ALDH”

- ◆ Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)は、アルデヒドをカルボン酸へ代謝する酵素ファミリーに属する酵素
- ◆ ALDHは、造血過程において“Stemness”(幹細胞性)を特徴づける遺伝子の制御に関わっている
- ◆ 造血系においてALDHは、生きているPrimitiveな細胞で活性が高く、血球系へと分化が進んだMatureな細胞では活性が低いことが知られている



ALDEFLUOR 原理

◆ Intracellular enzymatic assay

ALDEFLUOR試薬すなわち基質のBAAAは、細胞内に取り込まれて、ALDHによってBAAに変換され、ALDH活性の高い細胞は強い緑色の蛍光を発します。このとき、細胞膜の状態が悪い死んだ細胞や死にかけた細胞では、産生したBAAを細胞内に保持できないため、生細胞のみが同定されます。

BAAA (基質、BodipyTM-aminoacetaldehyde)

+

細胞内のALDH (酵素)

BAA⁻ (BodipyTM-aminoacetate、**蛍光発光**)

フローサイト
メーターで検出

ALDH活性の高いPrimitiveな生細胞のみが同定されます

(ALDH^{br}の細胞集団は、CD34 + cells, CD133+ cells, c-Kit+ cells, Lin- cells, Colony forming cells, LTC-IC, NOD/SCID repopulating cellsを含みます)

ALDEFUOR プロトコール

1 × 10⁶ cells/mLに調整したサンプルに
ALDEFUOR試薬を加える



37 °C、30分間インキュベート



(オプション：細胞表面抗原に対する抗体染色)



フローサイトメーターで測定

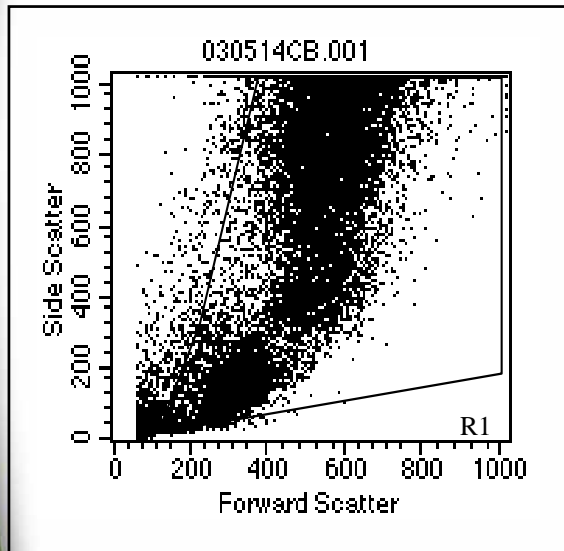
約1時間
で完了！



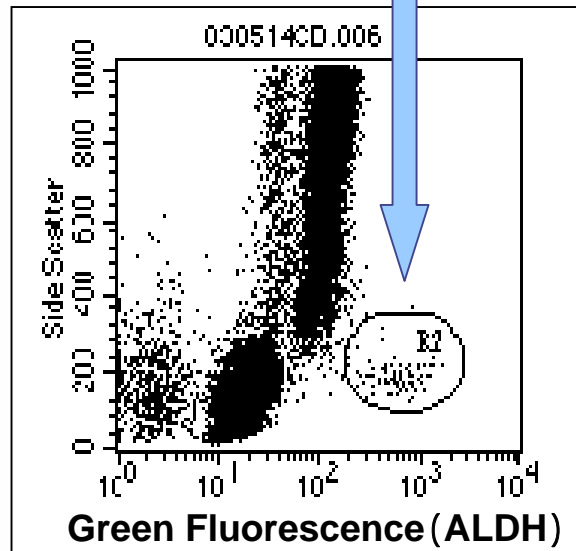
フローサイトメーターによる解析例

ALDH^{br}
SSC^{low}

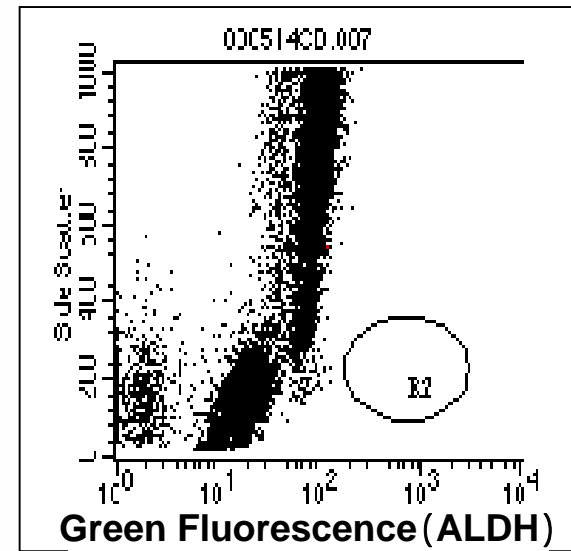
FSC/SSC



FL1/SSC



FL1/SSC



生細胞をゲーティング

ALDEFLUOR

ALDEFLUOR
+ DEAB (Inhibitor)



アプリケーション

◆ 再生医療の研究分野

ALDH^{br}SSC^{lo}分画をセルソーターで分取し、

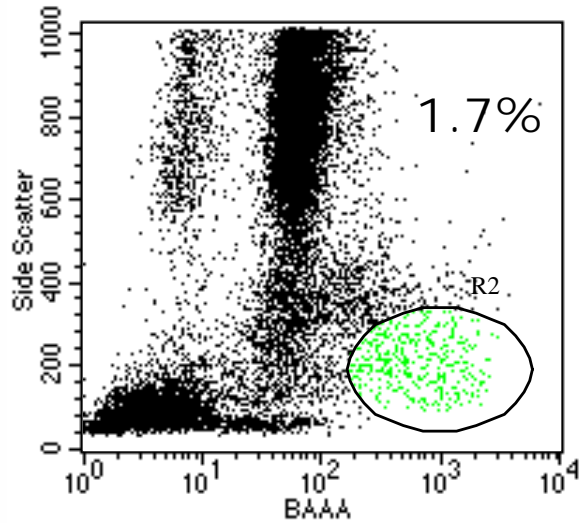
In vitro culture assay

Animal study (マウスへの移植など)

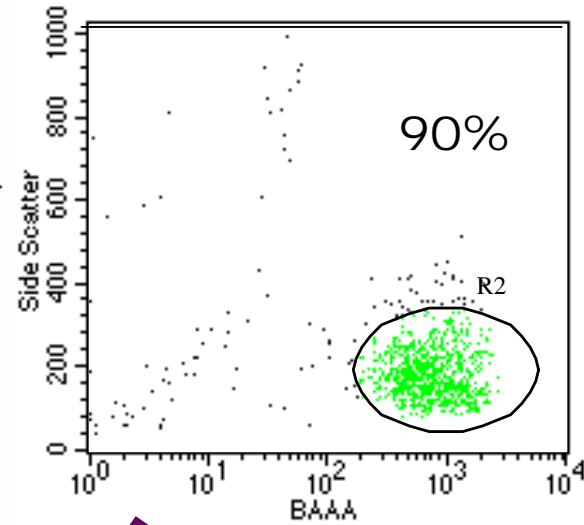
◆ 造血幹細胞移植におけるドナー細胞の品質評価



Stem / Progenitor cell の同定とカウント



セルソーターで ソーティング



ALDH^{br} と ALDH^{dim}
の各集団

Immunophenotyping



In vitro culture assays



Animal models

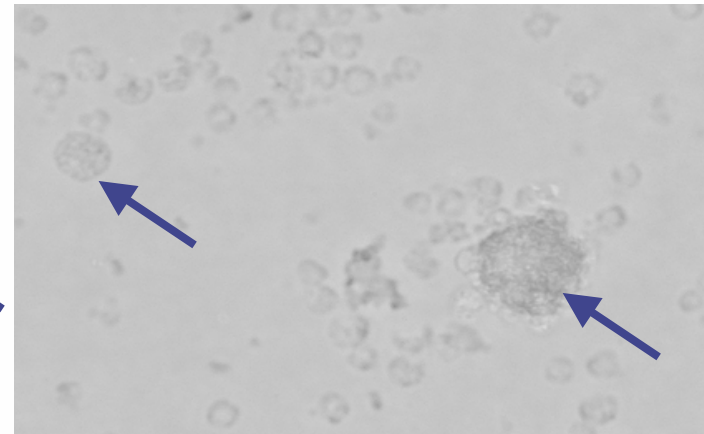
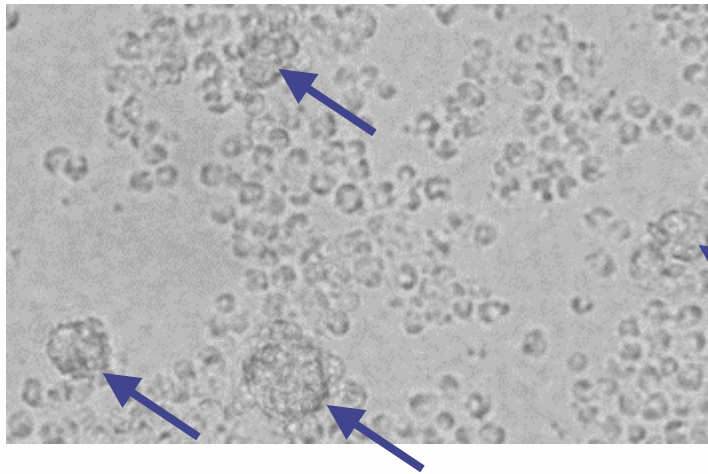
ALDEFLUOR 特長

- ◆ 従来の抗体染色法とは異なる幹細胞 / 前駆細胞の新しい同定法 (Intracellular enzymatic assay) です
- ◆ 自己複製能・多分化能の高い Primitive な生細胞を正確に同定します
- ◆ 一般的なフローサイトメーターで手軽に測定できます (試薬の反応と測定で、約1時間)
- ◆ *In vivo*, *In vitro* 共にノントキシックです
- ◆ 細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体と併用可能です



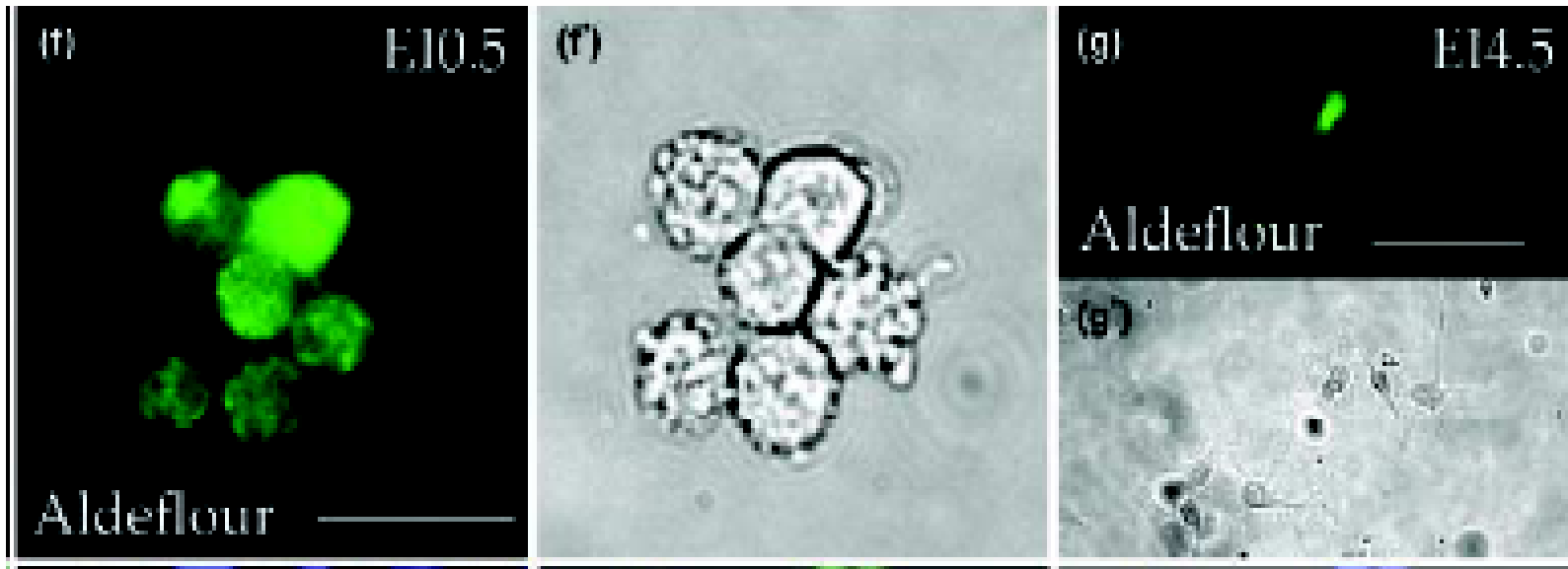
神経分野での使用例

ヒト骨髄由来のALDH^{br}培養細胞がNeurosphereを形成した



神経分野での使用例

ALDEFLUORを使用して、ラット胚性Neural stem cells (NSC)を同定することができた。



Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells

Cai J, et al., J. Neurochem. 2004;88:212-226.

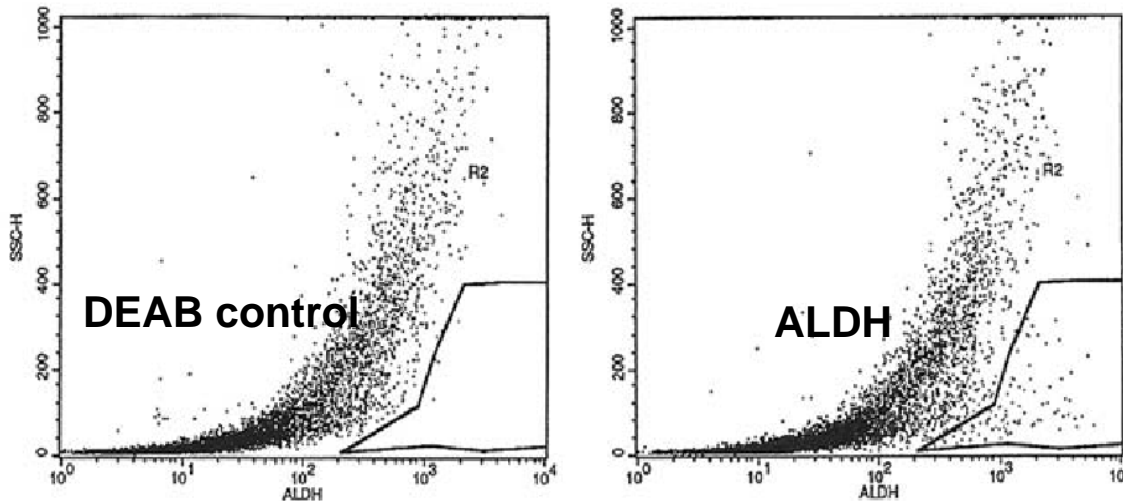


StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com

神経分野での使用例

ALDEFLUORを使用して、マウスNeural stem cells (NSC)を同定することができた。

- 【NSCの頻度】
- ▶ 新鮮前脳組織 0.2-0.4%
 - ▶ Embryo由来のNeurosphere 4.2%
 - ▶ Adult由来のNeurosphere 2.8%



Identification of a Primitive Brain-derived Neural Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity

Corti S, et al. Stem Cells 2006;24:975-985.

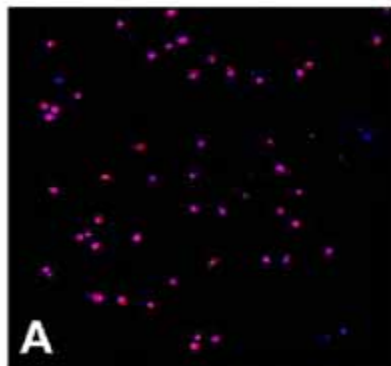


StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com

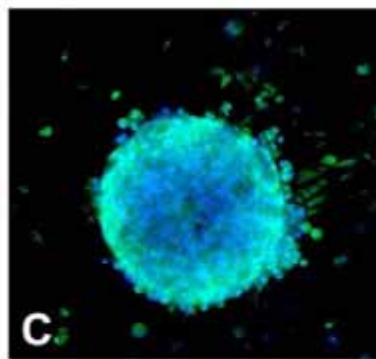
神経分野での使用例

ALDEFLUORを使用して、マウスNeural stem cells (NSC)を同定することができた。

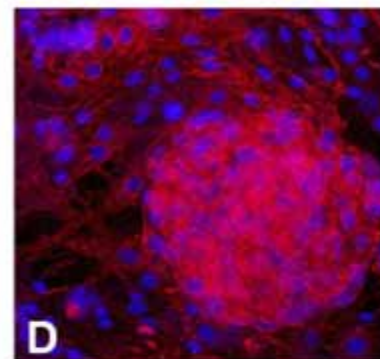
- ◆ ALDH^{br}集団は一律にNeural stem cell マーカーを発現していた
- ◆ 培養により、自己複製能およびNeuron, Astrocyte, Oligodendrocyte への分化能を確認することができた
- ◆ マウス脳での生着と分化がみられた



SOX2



Musashi



Nestin

Identification of a Primitive Brain-derived Neural Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity

Corti S, et al. Stem Cells 2006;24:975-985.

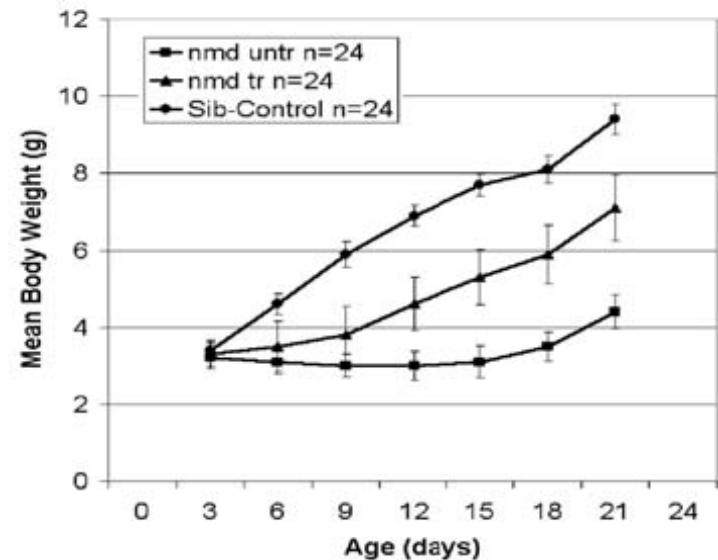


StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com

神経分野での使用例

マウス脳由来のALDH^{br}SSC^{lo}細胞の *in vivo*での活性を確認した。

▶ALDH^{br}SSC^{lo}細胞はマウス脊髄に散在的に生着し、NeuronおよびMotor neuronに分化して 2-3ヶ月間に渡り持続した。



Transplanted ALDH^{hi}SSC^{lo} neural stem cells generate motor neurons and delay disease progress of nmd mice, an animal model of SMARD1.

Corti S, et al., Hum Mol Genet. 2006;15:167-187



StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com

神経分野での使用例

ALDH活性を利用して、ホヤのStem cellを同定することができた。

◆ モデル:

- 互換性を持つが異なるBotryllisのコロニーは、接近するとキメラ形成のために融合することができる
- ドナーとレシピエントの色素の違いは、キメラ化したあるいは競合する表現型によりおこる

◆ 結果:

- ALDH活性を利用して分取したBotryllisのstem cellは、キメラ形成の活性が10倍以上高い
- ALDH^{br} stem cellは、多能性であった

Stem Cells are Units of Natural Selection in a Colonial Ascidian

Laird DJ, Tomaso AW, Weissman IL. Cell 2005;123:1351-1360.



StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com

「神経分野」 ALDEFLUOR 参考文献リスト

Identification of Neural Stem and Progenitor Cells

Journal Articles:

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Transplanted ALDHhiSSC^{lo} Neural Stem Cells Generate Motor Neurons and Delay Disease Progression of nmd Mice, an Animal Model of SMARD1. Hum Mol Genet. 2006 Jan 15;15(2):167-87. Epub 2005 Dec 8.

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. Stem Cells. 2006 Apr;24(4):975-85. Epub 2005 Nov 17.

Cai J, Cheng A, Luo Y, Mattson MP, Rao MS, Furukawa K. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. Journal of Neurochemistry. 2004;88:212-226.



「神経分野」ALDEFLUOR参考文献リスト

Identification of Neural Stem and Progenitor Cells (つづき)

Conference Abstracts:

SA Louis, CKH Mak, BA Reynolds, TE Thomas & AE Eaves. Correlation between ALDH expression and in vitro function of adult and embryonic mouse CNS cells. International Society for Stem Cell Research (ISSCR). 2006; 250.

Gentry T, Ford D, Balber A, Trisler D. Human Aldehyde Dehydrogenase Bright Bone Marrow Cells: Expression of Neural Markers and Growth Characteristics in a Culture System that Supports Expansion of Murine Bone Marrow Neural Progenitors. International Society for Cellular Therapy (ISCT). 2005;159.

Desjarlais T, Sanberg PR, Willing AE, et al. Human Umbilical Cord Blood Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis after Cerebral Intraventricular Transplantation. American Society for Neural Transplantation and Repair (ASNTR). 2004.

Garbuzova-Davis SN, Willing AE, Saporta S, et al. Human Umbilical Cord Blood Cells as a Potential Cell Source for Treatment of ALS. American Society for Neural Transplantation and Repair (ASNTR). 2004.



ALDEFLUORは、神経系以外にも様々な組織に由来する stem cell の同定や分離に使用されています。

◆ Stem and progenitor lineages

- Hematopoietic
- Mesenchymal
- Endothelial
- Neural

◆ Tissue Sources

- Human blood products
- Human adipose tissue
- Rat embryonic neural tube
- Mouse forebrain and spinal cord
- Tunicate



キット



ST-01700 ALDEFLUOR (40 tests)

< キット構成 >

試薬名称	容量	役割
Dry ALDEFLUOR reagent	50 μ g	酵素基質
Diethylaminobenzaldehyde (DEAB), 1.5 mM in 95% ethanol	200 μ L	Inhibitor
2N HCl	50 μ L	基質活性化用
Dimethylsulphoxide (DMSO)	50 μ L	基質活性化用
ALDEFLUOR Assay Buffer	25 mL \times 4本	細胞および試薬調整用



カタログ、マニュアルなど、各種資料をご用意いたしております。
弊社技術サポートまでお問い合わせください。

株式会社ベリタス 技術サポート
TEL 03-3593-3216
E-mail techservice@veritastk.co.jp



StemCell Technologies Inc
The Cell Experts™ | www.stemcell.com