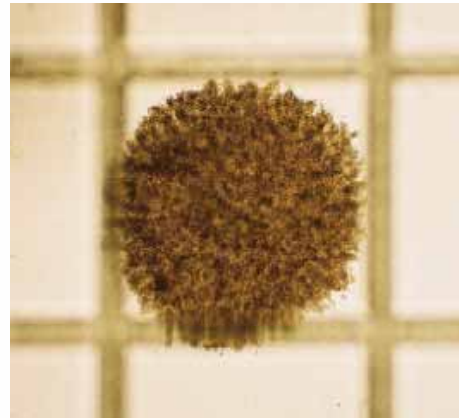


Neurosphere Assayにかわる新しいアッセイ法

# NeuroCult<sup>®</sup> NCFC Assayのご紹介

～ 神経幹細胞と前駆細胞の識別と定量～



StemCell Technologies Inc  
The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)

神経幹細胞 (NSC) が長期に渡る自己複製能、多分化能を保持しながら Neurosphere を形成し、多数の子孫を残す能力を見るためのアッセイとして、従来から液体培地を用いた Neurosphere Assay と呼ばれる試験が行われています。

しかし目的によっては、このアッセイ系には次に示すようないくつかの Limitation があります。



# Neurosphere Assay

## Limitations

NSCの頻度を調べるためにアッセイが使われてきましたが、Neurosphereを形成することのできるすべての細胞がNSCとしての条件を満たすわけではないことが分かっています。

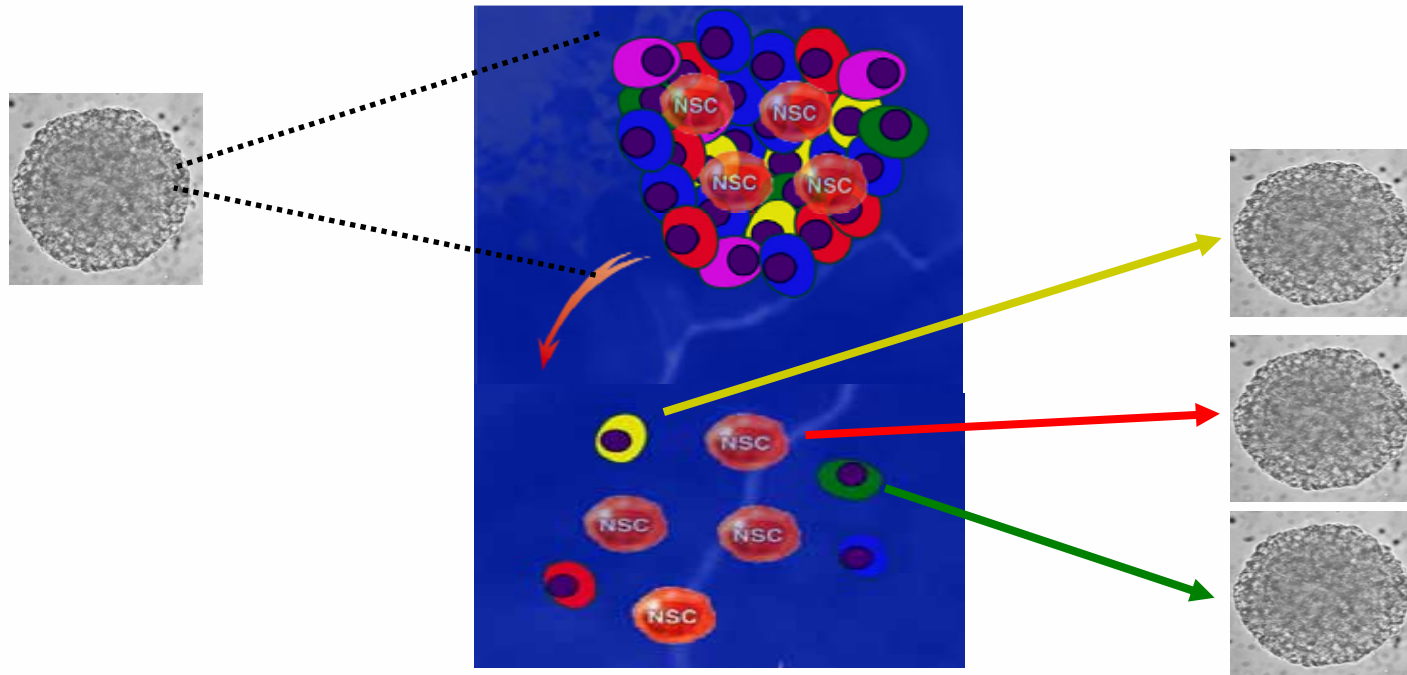
### < 条件 >

- 自己複製能
- 多分化能
- たくさんの子孫を増やすことができる



# Neurosphere Assay

## Limitations (つづき)



NSC以外にもSphere形成能を持つ細胞があり (ex. Progenitor cell)

その結果NSCの数を過大評価してしまう傾向にある

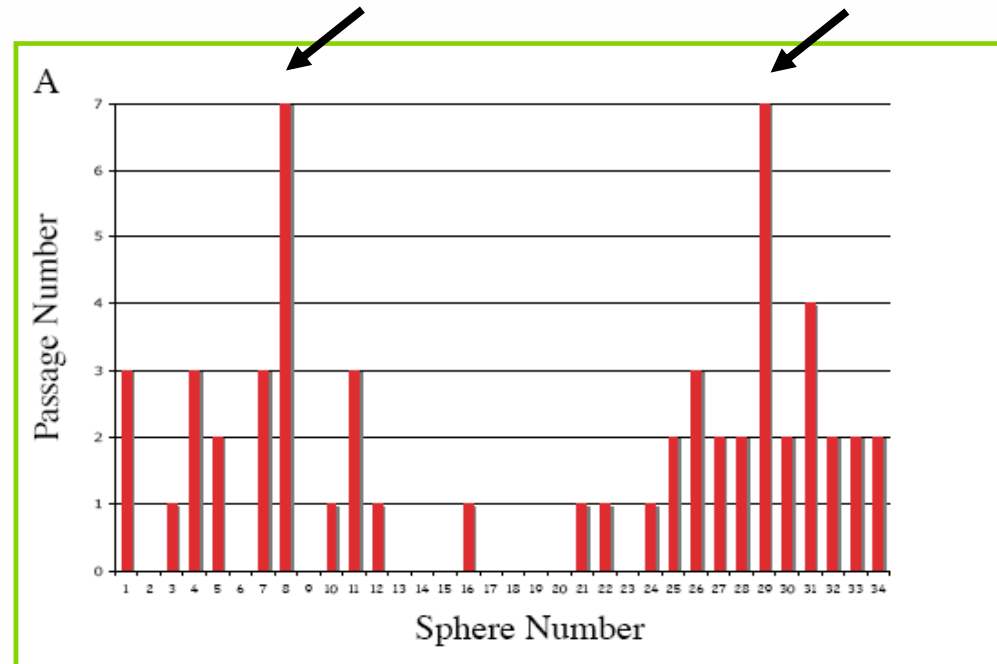
→ Neurosphereの数 ~~×~~ Neural stem cellの数



StemCell Technologies Inc

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)

# Neurosphere Assay Limitations (つづき)



上の結果では、Neurosphere Assayで得られたNeurosphereのうち実際に長期に渡って継代できたのは34個中2個であった



# Neurosphere Assay

## Limitations (つづき)

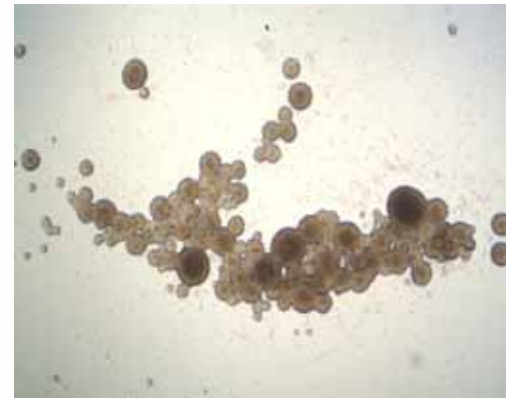
### VERY LOW

- 190 cells/24-well
- ウェルの淵



### VERY LOW

- 190 cells/24-well
- ウェルの中央



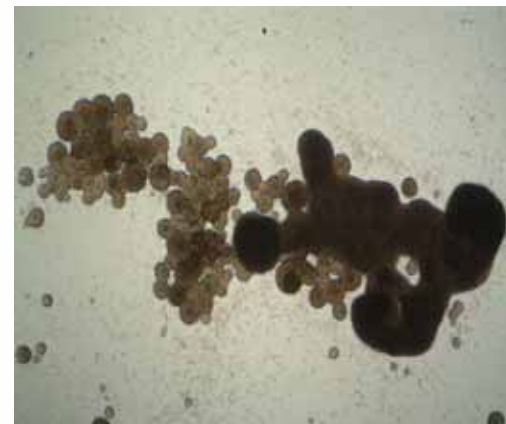
### LOW

- $1.9 \times 10^3$  cells/24-well
- ウェルの淵



### LOW

- $1.9 \times 10^3$  cells/24-well
- ウェルの中央



ウェルの中央付近で特に、Neurosphereがお互にくっつきあったり、融合したりして正確に数を数えるのが難しい



StemCell Technologies Inc

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



# NCFC (Neural Colony-Forming Cell) Assayとは？

Neural stem cellとProgenitor cellを識別することができるアッセイのニーズから、StemCell Technologies社ではNCFC Assayと呼ばれる新しいアッセイを開発しました。キットには必要な器具・試薬がすべて含まれています。

- 対象は、Primary CNS tissueまたはNeurosphereです。
- アッセイ培地には、コラーゲンベースのセミソリッド培地を使用しています。
- シンプルなシングルステップアッセイです。
- コロニーの直径により、コロニーを分類します。
- Neural stem cellとprogenitor cellの数を定量できます。
- Sphere(colony)形成能を持つ細胞の数を定量できます。



## < キット開発およびアッセイ評価・データ提供施設 >

### **StemCell Technologies Inc.**

- **Ravenska Wagey**
- **Carmen Mak**
- **Terry Thomas**
- **Allen Eaves**

### **Queensland Brain Inst. (Australia)**

- **Brent A. Reynolds**
- **Rodney Rietze**

### **University of Calgary**

- **Leo Behie**
- **Arin Sen**

### **University of Milan, San Raphael Hosp. DIBIT**

- **Angelo L. Vescovi**

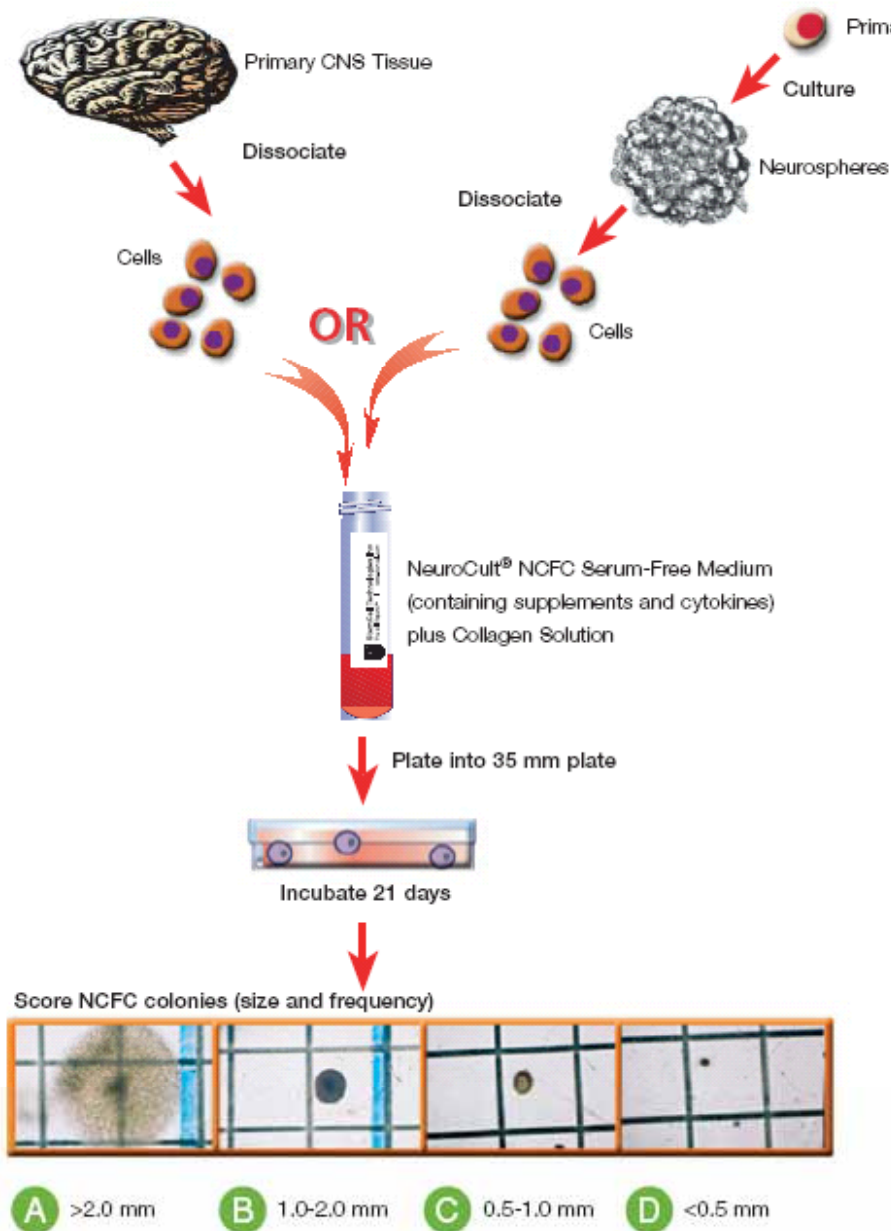


**StemCell Technologies Inc**

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



# NCFC Assayの流れ



Primary CNS Tissue  
またはNeurosphere

細胞の解離

培地と混合

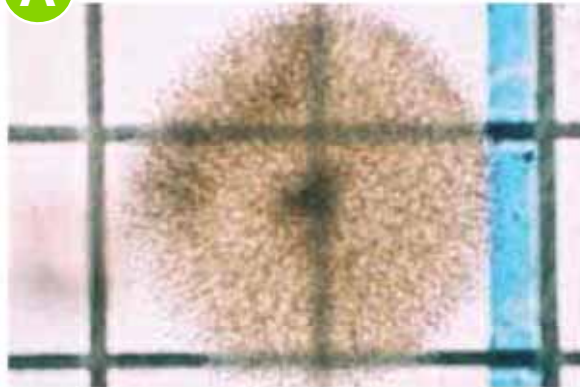
コラーゲン培地で  
21日間培養

コロニーのサイズ分類に  
従って、コロニー数をカウント

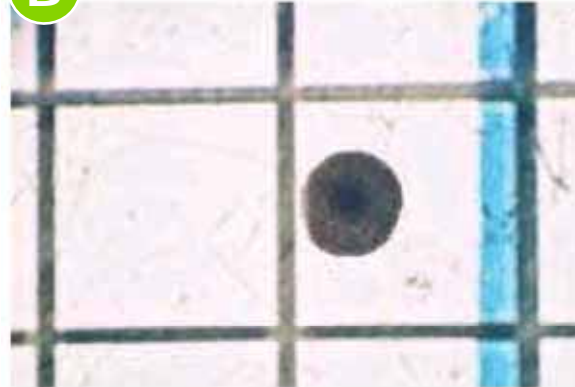


## NCFC Assay におけるコロニーのサイズ分類

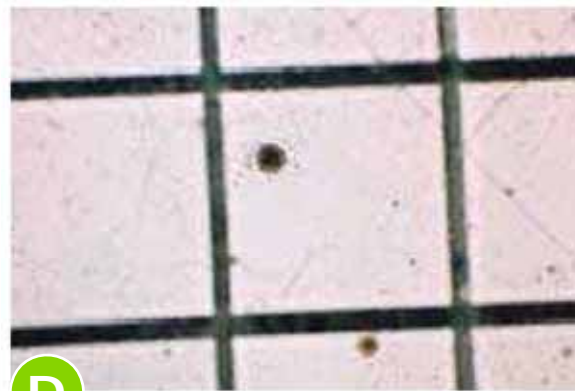
**A** > 2.0 mm



**B** 1.0 - 2.0 mm



**C** 0.5 - 1.0 mm



**D** < 0.5 mm



# NCFC Assay 判定

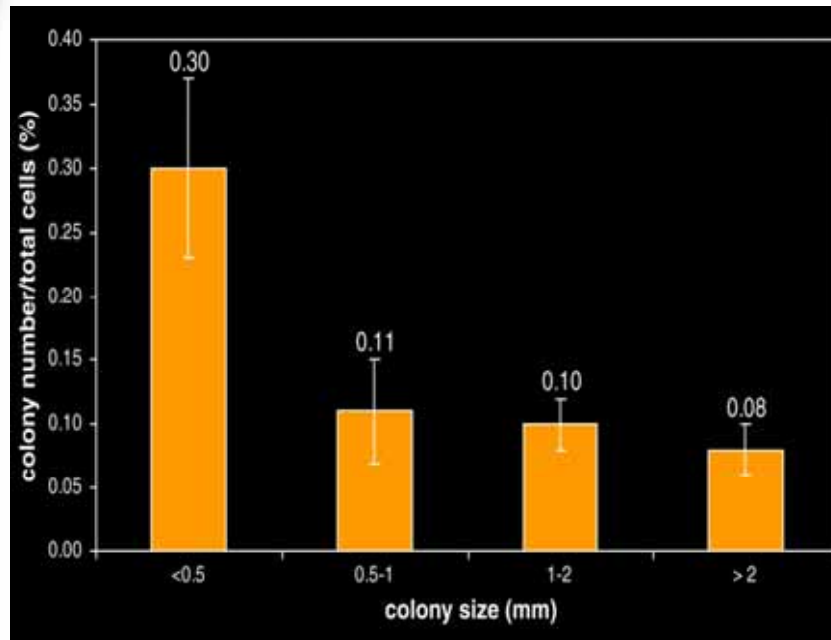
- 直径2 mm以上のコロニーは、その元の細胞が Neural stem cellの機能的条件を備えていたと考えられ、これをNCFC-NSCと呼びます
- 直径2 mm以下の増殖能の弱かったコロニーは Progenitor由来と考えられます





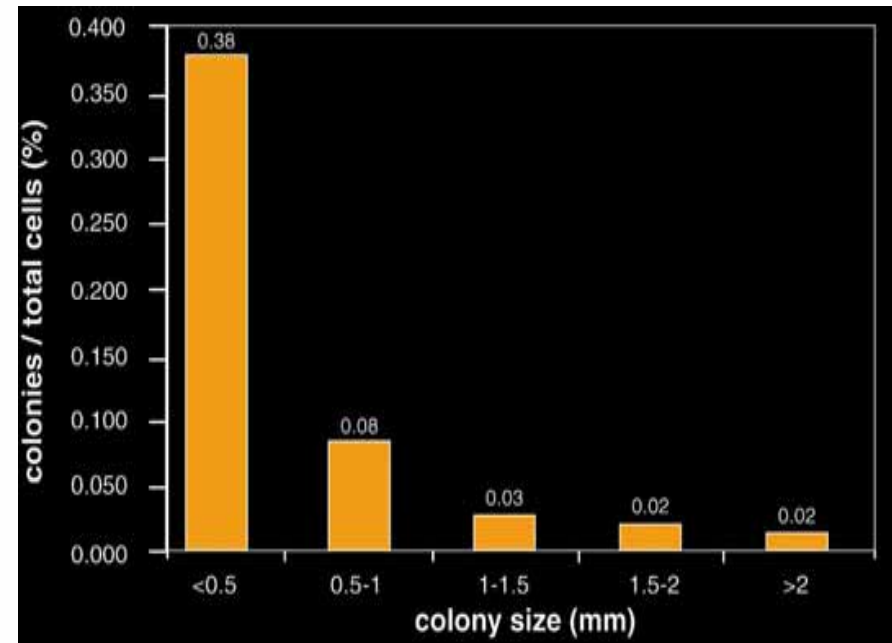
# データ例

Embryonic Mouse Striata  
におけるNSCの頻度



NSCの頻度はわずか0.08%

Adult Mouse Sub-Ventricular Zone(SVZ)  
におけるNSCの頻度



NSCの頻度はわずか0.02%



# NCFC Assay の応用例



VERITAS NEWS No. 13

## ***In vivo* における成体マウス脳室下帯への EGF直接投与が神経幹細胞や神経前駆細胞に 及ぼす影響**

S.A. Louis<sup>1</sup>, R.E. Wagey<sup>1</sup>, R.L. Rietze<sup>3</sup>, T.E. Thomas<sup>1</sup>, A.C. Eaves<sup>2</sup> and B.A. Reynolds<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> StemCell Technologies Inc., <sup>2</sup> Terry Fox Laboratory, BC Cancer Agency, Vancouver, Canada and  
<sup>3</sup> University of Queensland, Queensland Brain Institute, Brisbane, Australia

### ●序文

最近報告された、神経コロニー形成細胞 (Neural Colony Forming Cell, NCFC) 法と呼ばれるシングルステップの培養アッセイ (Louis et al., 2004, abstract Soc. for Neuroscience) では、神経前駆細胞と神経幹細胞 (NSC) との区別が可能であるため、ニューロスフェア法 (NA) よりも正確にNSCの存在比率を計測することができます。NCFC法では、コロニーの大きさが増殖能の指標となっています。直径が2mmを超えるコロニーの細胞は、長期間にわたる自己複製能を有し、多数の前駆細胞を生みだし、多分化能を維持しています。このことから、直径2mmを超えるコロニーを形成する細胞はNCFC-NSCと呼ばれます。直径が2mm以下のコロニーの細胞には、長期的な自己複製能がなく、前駆細胞から生じたものと考えられます。NCFC法では、成体マウス脳室下帯 (SVZ) におけるNCFC-NSCの存在比率は $0.016 \pm 0.01\%$  (平均±標準誤差) と見積もられています。

SVZにはNSCが存在することはすでに知られています。しかし、この領域内に存在する複数の異なる細胞種のうち、どの細胞種が *in vitro* でニューロスフェアを形成して幹細胞として機能するかに関しては議論の余地があります。私たちは以前、現在利用されているニューロスフェア法 (NA) では、NSCと前駆細胞を区別できないことが原因で成体脳におけるNSCの存在比率が1桁過大評価されると報告しました (Adams et al., 2004 abstract Soc. for Neuroscience)。そこで本研究では、NCFC法を利用してNSCの存在比率を正確に計測し、*in vivo* におけるEGF (Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002) および有糸分裂阻害剤Ara-C (Doetsch et al. 1999) の投与が成体SVZ領域のNSCに及ぼす影響を明らかにしました。

**「VERITAS NEWS No.13」  
ぜひご覧下さい！**

ご希望の方は、弊社技術サポート  
までご連絡ください。



StemCell Technologies Inc

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



参 考:

## NCFC Assay 判定の評価

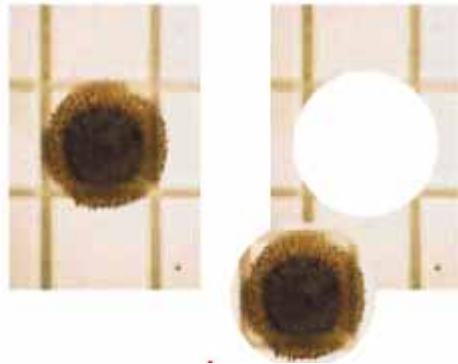
- 自己複製能および増殖能の評価  
→ Neurosphereの連続的な継代培養
- 多分化能の評価  
→ 分化培養



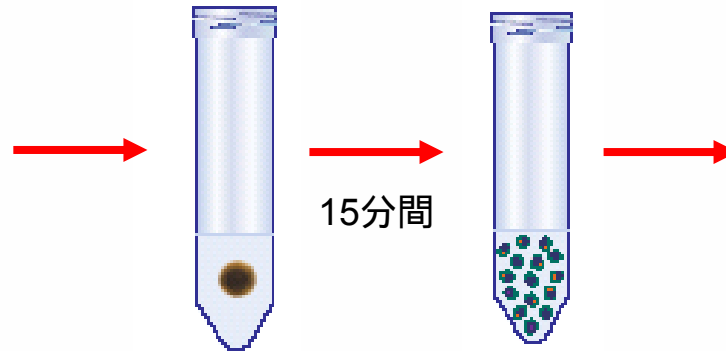




# NCFC Assay 判定の評価 方法



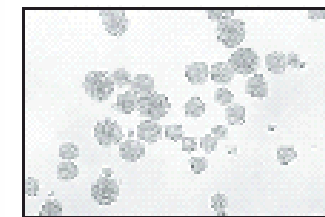
NCFC Assayの  
直径2mm以上のコロニーを  
コラーゲンゲルから切り出す



コラゲナーゼで処理し、  
Single cell を調整する



24または96穴プレートに  
プレーティングし、7-10日間  
培養する



Neurosphereが得られる

**Long-term cultures**

**Differentiation cultures**



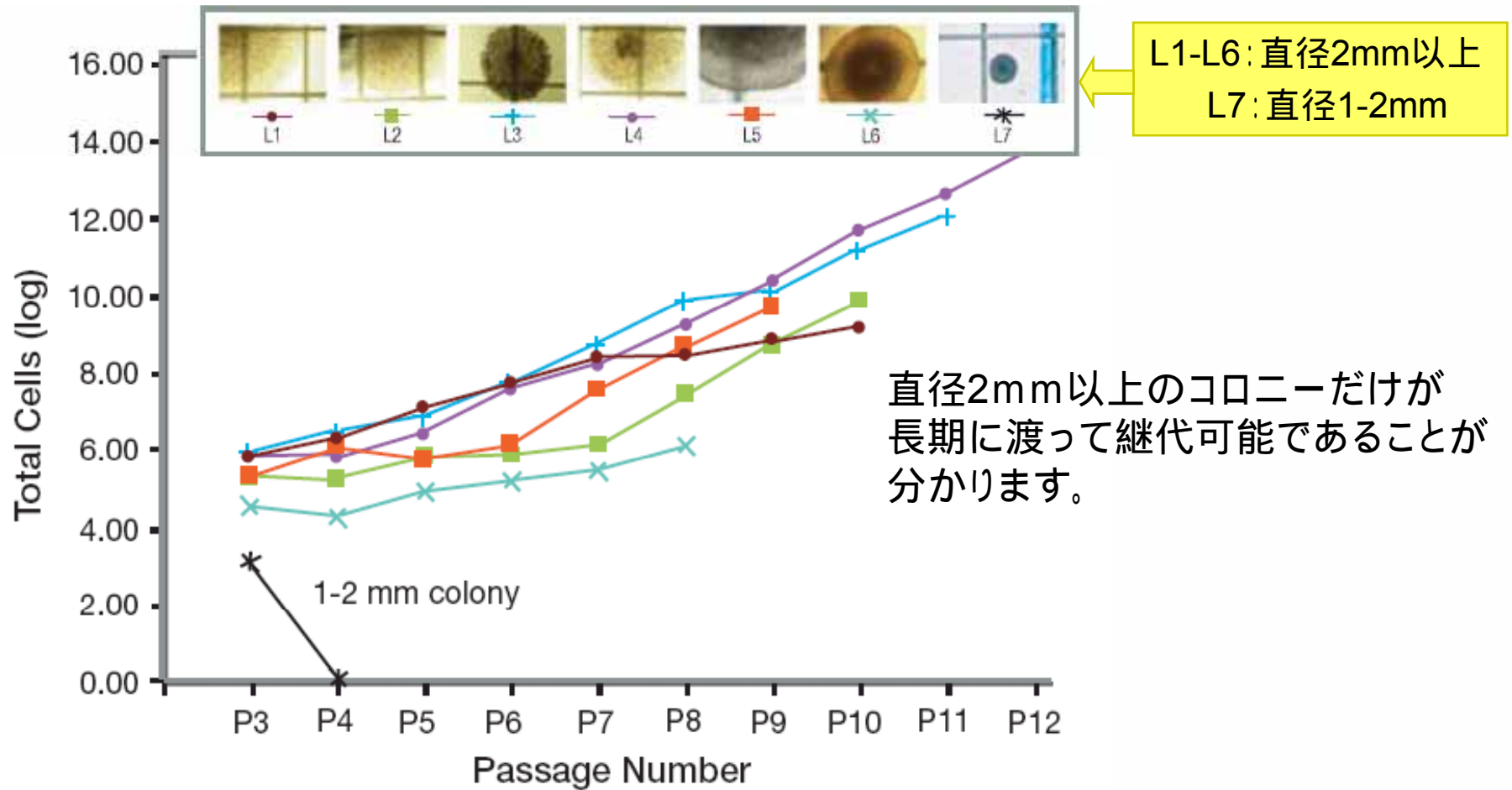
StemCell Technologies Inc

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



## NCFC Assay 判定の評価 - 継代培養

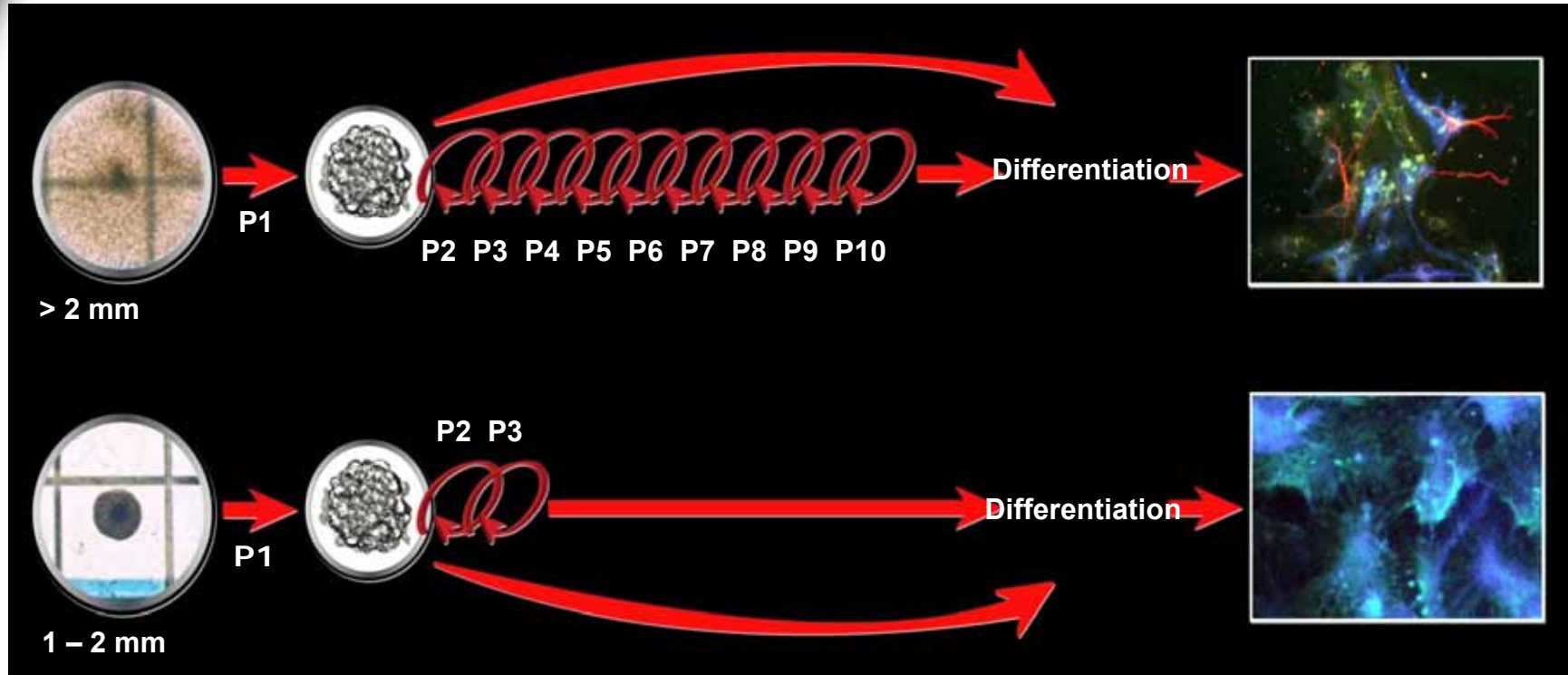
# 直径2 mm以上のコロニーのLong-term Expansion





# NCFC Assay 判定の評価 - 分化培養

## 直径2 mm以上のコロニーの多分化能



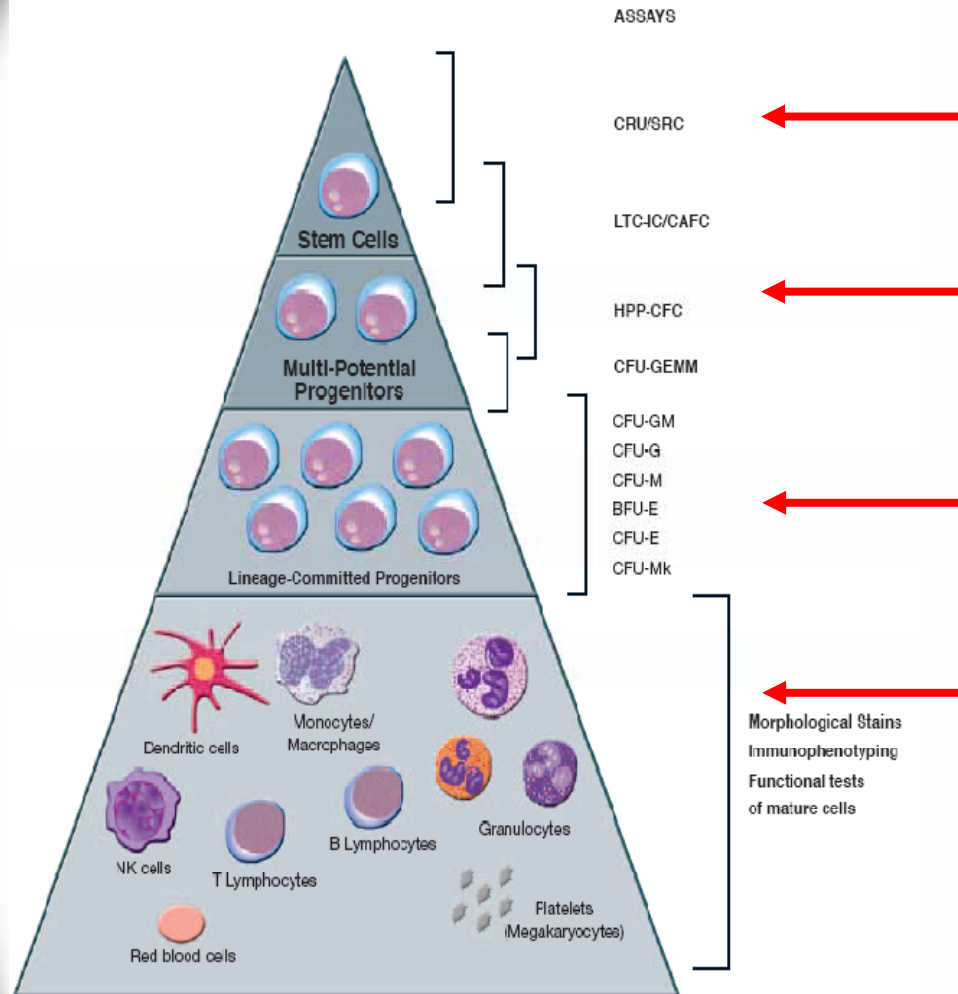
直径2mm以上のコロニーから得られた細胞は、10回以上継代することができ、かつNeuron, Astrocyte, Oligodendrocyteへの分化能を維持しています。



# 幹細胞アッセイにおける NCFC Assayの位置づけ

造血系

神経系



- ? *In utero* transplantation ?
- ? Transplantation in adult ?
- ? Organotypic cultures ?



- **NCFC Assay**
- Long term neurosphere Cultures

- Neurosphere assay

- Morphology
- Immunophenotyping
- Functional assays  
– neurite outgrowth



## NeuroCult® NCFC Assay kit 製品一覧

コードNO	商品名	梱包単位
ST-05740	NCFC Assay kit (Mouse) 	1キット
ST-05742	NCFC Assay kit (Rat) 	1キット
ST-02633	rhEGF 共通	200μg



StemCell Technologies Inc

The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



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](mailto:techservice@veritastk.co.jp)



StemCell Technologies Inc  
The Cell Experts™ | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)