



Application

バンバンカーhRMを用いたがん幹細胞スフェアの凍結保存

製品名

バンバンカーhRM (Cat.No.CS-11-001)

メーカー名

株式会社GCリンフォテック



下記データは、関西医科大学 附属生命医学研究所 細胞機能部門 林 美樹夫様のご厚意により掲載させていただきました。

概要

細胞塊（スフェア）は、薬物の有効性のスクリーニング評価など、2次元培養の状態よりも生態内で近いモデルとして近年有用性が増しており、様々な研究において、使用される事例が増えております。

一方、細胞凍結保管液は、細胞を最適状態で保管し、必要な時に使用するために重要であり、再生医療などでその重要性が増してきています。弊社取り扱い製品である、バンバンカーは血清を含まないため、血清に由来する分化の可能性を気にされる方も、使用できる試薬です。特に、今回紹介させていただくバンバンカー hRMは、ヒト以外の動物由来物も含まず、ヒト細胞を扱う際に、不要なリスクを抑えることができます。

本アプリケーションノートでは、ヒト由来のがん幹細胞のスフェアをバンバンカー hRMを用いて凍結・解凍したプロトコルをご紹介します。

評価方法

使用した細胞：転移性脳腫瘍由来がん幹細胞スフェア

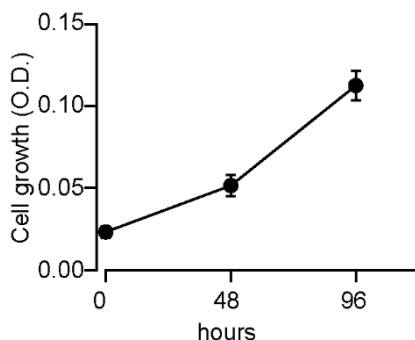
細胞凍結保管液：バンバンカー hRM

方法：転移性脳腫瘍由来がん幹細胞スフェアをバンバンカー hRMにて凍結した。凍結・2年間-80℃で保管・解凍後、生細胞数測定試薬SF（ナカライテスク株式会社、07553-15）と細胞培養像から、解凍後の増殖能を評価した。

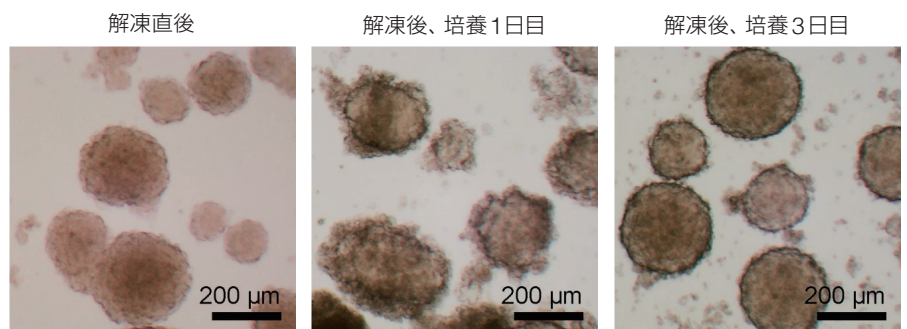
*詳細な手順については、2ページ目の「参照資料：スフェア凍結評価プロトコル」の項をご確認ください。

結果

凍結保管 / 解凍の細胞増殖曲線 (結果1)



細胞培養像 (結果2)



結果：

凍結保管 / 解凍後も細胞増殖しており、細胞を生きのまま保存できていることが確認できる (結果1)。

解凍後の細胞スフェアの形態を観察すると、培養1日目に形態 (辺縁) が崩れたが、3日後には辺縁が元に戻った (結果2)。

以上の結果より、バンバンカー hRMにて、転移性腫瘍由来がん幹細胞スフェアの状態での凍結保管できると判断した。

血清由来の細胞分化リスクを避けるため、血清を含まない凍結保護液を探していました。検討の結果、バンバンカー hRMの以下の点を高く評価しました。

- 凍結に弱いがん幹細胞の凍結解凍後の生存率が非常に高いようです。
- 他社製品より安価で、コストパフォーマンスに優れていると思います。

また、今後、「凍結保存した」がん幹細胞スフェアを以下の実験に使用したいと考えています。

- ① スフェアの分散した後に行う、がん細胞の細胞増殖アッセイ
- ② がん細胞に有効な薬剤のスクリーニング
- ③ スフェアをヌードマウス脳内に接種する脳腫瘍モデル動物の構築。および、このマウスを使用した薬物の有効性を、生存期間で評価



お客様のコメント

**参照資料：スフェア凍結評価プロトコル****〈細胞培養に用いた試薬類〉**

D-MEM/Ham's F-12：富士フィルム和光純薬株式会社, 048-29785
NaHCO₃：Sigma-Aldrich, S8761
グルコース：Sigma-Aldrich, G8769
L-グルタミン：Sigma-Aldrich, G7513
MACS NeuroBrew-21：Miltenyi Biotec, 130-097-263
上皮成長因子 (EGF)：PeproTech, AF-100-15
線維芽細胞増殖因子 (bFGF)：PeproTech, 100-18B
ペニシリン/ストレプトマイシン：Sigma-Aldrich, P4333
超低接着表面ディッシュ：Corning, 3262

〈細胞数測定に用いた試薬類〉

トリプシン-EDTA 溶液：Sigma-Aldrich, T4049
96ウェル超低接着表面プレート：Corning, 3474
生細胞数測定試薬 SF：ナカライテスク株式会社, 07553-15

① 細胞培養液の調製

培養液は、D-MEM/Ham's F-12に下記の試薬を添加して使用する。

- NaHCO₃ (49 mM)、
- グルコース (26 mM)、
- L-グルタミン (3 mM)、
- MACS NeuroBrew-21 (5 mL)、
- 上皮成長因子 (EGF, 20 ng/mL)、
- 線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 20 ng/mL)、
- 抗生剤：ペニシリン (100 U/mL) とストレプトマイシン (0.1 mg/mL)

② 細胞培養方法

超低接着表面ディッシュ (100 mm) で5% CO₂ / 95% 空気、37℃の湿潤な環境で培養を行う。

③ 転移性脳腫瘍由来がん幹細胞の単離法について

1. 手術で切除された転移性脳腫瘍組織、0.1 ~ 1.0 g をハサミにより、細かく刻む。
2. 細切された組織は、Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc./フナコシ株式会社, AM105) を2 mL入れた試験管に移す。
3. 37℃の恒温槽で、5分間振盪 (20回/分) させる。
4. 細胞培養液を8 mL添加し、混和後、40×gにて5分間遠心する。
5. 遠心後、上清を捨て、細胞培養液10 mL混和する。
6. 超低接着表面ディッシュ (100 mm) に播種を行う。

④ スフェアの凍結、保管方法

1. 培養したスフェアを遠心管に移し、40×gにて5分間遠心する。
2. 上清を捨てた後、パンパンカー hRM を1 mL添加し、混和する。
3. クライオチューブに移し、-80℃のディープフリーザーに入れて凍結保管する。
4. その後、-80℃のディープフリーザーにて、2年間凍結保管を行った。

⑤ スフェアの解凍方法

1. 凍結したクライオチューブを37℃に設定した恒温槽で解凍する。
2. 解凍した懸濁液に細胞培養液を9 mL添加し、40×gにて5分間遠心する。
3. 上清を取り除いた後、新しい細胞培養液を10 mL添加し、懸濁する。
4. 超低接着表面ディッシュ (100 mm) に播種する。

⑥ 生細胞数の測定方法

1. がん幹細胞を試験管に移し、40×gにて5分間遠心する。
2. 上清を捨て、トリプシン-EDTA 溶液を2 mL添加し、37℃に設定した恒温槽で5分間インキュベートする。
3. 細胞培養液を加え懸濁し、40×gにて5分間遠心する。
4. 上清を捨て、細胞培養液を加える。
5. 細胞数を計測し、2,000個の細胞を96ウェル超低接着表面プレートに移す。
6. 細胞培養液0.1 mLで4日間培養する。
7. 生細胞数測定試薬 SFを用いて、生細胞数を計測する。