

Reference Data

マイクロパターンスライドを使用したT細胞によるがん細胞攻撃の定量化

評価製品

シングルセルアレイ用マイクロパターンスライド
μ-Slide VI 0.4 (Cat.No. ib83601)

目的

マイクロパターニングの使用一例紹介：T細胞がん細胞攻撃能の定量化

本データは、ibidi社から提供されたデータを元に作成しています。¹

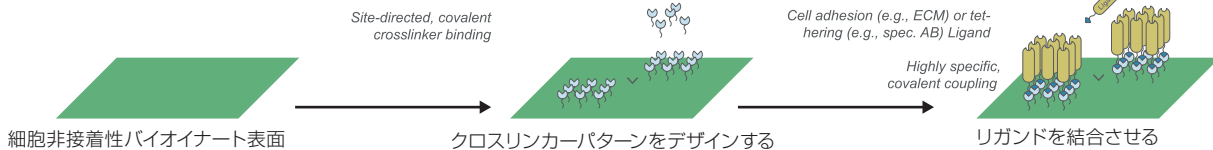
1. Balles, M. et al. A Micropatterning Supported High Throughput CAR T Cell Potency Assay With Single Cell Resolution. Presented at the ASCB|EMBO Meeting 2019, Washington DC, USA.(2019).

概要

ibidi社マイクロパターニングは基盤の特定位置に細胞を配置する技術です。2021年より本技術が採用された製品が販売開始され、現在、「ibidi社マイクロパターンスライド」として入手できるようになりました。今回、このスライドの使用例として、シングルセルアレイ用マイクロパターンスライド(μ-Slide VI 0.4)を使用し、CAR-T細胞のがん細胞攻撃能定量化に応用した事例を紹介します。

マイクロパターニングとは

マイクロパターニングは、細胞接着できる領域(細胞接着パターン)を培養面上にデザインする技術である。細胞接着パターンは、バイオナート加工された細胞非接着性表面に対し、フィブロネクチンの結合モチーフであるトリペプチドArg-Gly-Asp(Arginine, Glycine, Aspartate/RGD)を共有結合させることにより作られる。これにより、平面上のパターンに沿った特定位置に細胞を配置することを可能にしている。



方法

試薬:

- マイクロパターンスライド(μ-Slide VI 0.4 パイロット版)
RGD pattern (35/170 μm hexagonal grid; large spots : 300/1300 μm round pattern)
- 標的細胞懸濁液 (2×10⁵ cells/mL, 完全培養液)
- 細胞障害性細胞の懸濁液 (6倍濃縮, 例: CAR-T細胞: ゲル中の最終濃度 2~3×10⁶ cells/mL)
- PBS, 完全培地 (例: LCL培地, RPMI+10%FCS)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液
- コラーゲンタイプ I (ラット尾由来), 5 mg/mL (ib50201, ibidi)
- NaHCO₃
- 10×RPMI
- 蒸発防止用オイル

プロトコル:

<実験2日前>

- マイクロパターンスライドのチャンネルを2xPBSで洗浄する。洗浄後、洗浄液は取り除く。
- 攻撃ターゲットとなる(がん)細胞を播種する(2×10⁵ cells/mLを1チャンネルあたり30 μL)。
- 各チャンネルのリザーバーに50 μLの培地を加え、スライドの蓋を閉じる。
- 恒温槽で24時間インキュベーションを行い、細胞を定着させる。

<実験1日前>

- チャンネル内の培地を交換する(総量 130 μL)

<実験当日>

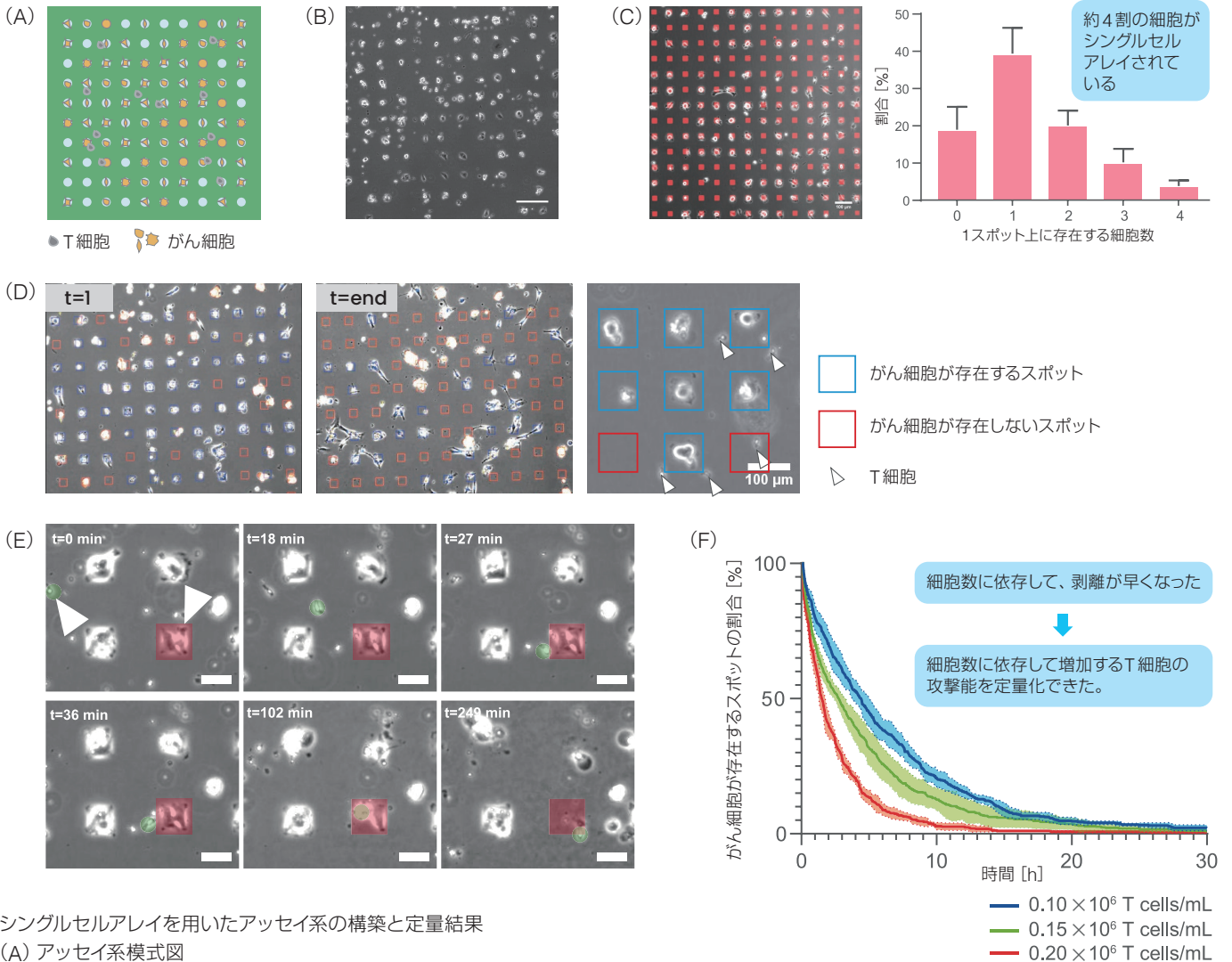
- コラーゲンを氷上で解凍する。
- CAR-T細胞懸濁液を6x濃度で準備する(12×10⁶ cells/mLの細胞懸濁液に対し、25 μL NucBlueを添加)。
- CAR-T細胞入りコラーゲン I (eg., 1.5 mg/mL gel, 表1)を用意する(1チャンネルあたり120 μL、細胞に余裕のない場合には最小30 μL以上準備)。

表1: Collagen I matrix, 1.5 mg/mLの調製例

10× RPMI	40 μL
H ₂ O	158 μL
NaHCO ₃	22 μL
1× RPMI	100 μL
rat tail collagen (5 mg/mL)	180 μL
cell suspension (6×)	100 μL
total volume	600 μL

- 細胞を播種したスライドのリザーバーの培地を取り除く。(この際、チャンネル部分は取り除かないこと。)
- チャンネルに、50-120 μL の CAR-T 細胞入りコラーゲン I 50-120 μL を流し、反対側より等量抜き出し、細胞上の培地を CAR-T 細胞入りコラーゲン I に置換する。※この作業により、チャンネルにおよそ 30 μL のコラーゲン I が存在することになる。
- 37°C、加湿条件で 10 ~ 30 分インキュベーションを行い、ゲルを重合させる。
- チャンネルの両リザーバーに培地を 50 μL ずつ加える。
- 各リザーバーに蒸発防止用オイルを 10 μL 重層し、速やかに顕微鏡観察を開始する。
(Nikon, 位相差顕微鏡 対物レンズ 10 \times , 3-4 分 間隔で 20-24 時間撮影)

結果



シングルセルアレイを用いたアッセイ系の構築と定量結果

- (A) アッセイ系模式図
 (B) 実際にアレイされたがん細胞 (RCC-26) および T 細胞 (JB4T cell) の画像
 (C) 1スポットあたりの細胞数分布。(画像解析: MetaVi Labs 社提供技術使用)
 (D) 評価方法詳細。画像解析プログラムで認識したポジションの細胞有無を経時観察した。
 (E) T細胞 (green) に攻撃されるがん細胞 (red) のタイムラプスイメージング画像
 (F) T細胞の攻撃により、スポットから剥離していくがん細胞の時間変化

結論

ibidi 社マイクロパターンスライドで、がん細胞 (RCC-26) をシングルセルアレイすることができ、T細胞に攻撃されたがん細胞は剥離していく様子を観察することができた。この特徴を利用し、T細胞数に依存するがん細胞攻撃能を定量化することができた。