

マウスCD4細胞のTh17極性化

イントロダクション

Tヘルパー17(Th17)細胞は、IL-17(特にIL-17AとIL-17F)を産生することが特徴的なCD4 Tヘルパー細胞のサブセットです。それらは、多発性硬化症、乾癬、自己免疫性のぶどう膜炎、関節リウマチ、若年性糖尿病のような自己免疫疾患に関与していますが、上皮/粘膜障害、特にカンジダ、ブドウ球菌に対する抗菌の生体防御に重要です。IL-17、Th17細胞に加えて、炎症促進性の応答に寄与するIL-21とIL-22を産生します。転写制御因子ROR α とROR γ は、それらの細胞の分化における重要な因子を同定します。Th17細胞は、TGF- β 、IL-6、IL-21、IL-23を含む種々のサイトカインをin vitroで誘発することができます。ここに、in vitroでマウスIL-17産生細胞の産生のための効果的なプロトコルを提供します。

リンパ節からのCD4細胞の単離

1. マウスのリンパ節(表在性の頸部、下顎、腋、鼠径部、腸間膜)を手に入れます。
2. 10%FCSを含むRPMI1640(完全培地)中に単一細胞の懸濁液を作るために、無菌の70- μ mナイロンのセルストレーナーを通してリンパ節を濾します。
3. 完全培地中で細胞を再懸濁し、CD4細胞の単離のための好みの方法を使用してください。Webサイト Biocompare.com で便利なキットを確認してください。

CD4細胞のTh17 極性化

1. 抗マウスCD3 ϵ (クローン145-2C11 (2 μ g/mL))で、プラスチックペトリ皿60 \times 15mmをコーディングします。そして、37°C2時間、もしくは4°Cで一晩インキュベートしてください。その後、無菌操作で、プレートを傾け、抗体溶液の上清を移します(デカントします)。滅菌PBSで3回プレートを洗浄し、液体を捨てます。
2. 1 \times 10⁶/mLでCD4細胞をプレートに蒔きます。抗マウスCD28(クローン37.51、5 μ g/mL)、IL-6(50ng/mL)、TGF- β 1(1ng/mL)、抗マウスIL-4(10 μ g/mL)、抗マウスIFN- γ (10 μ g/mL)、300nM FICZの存在下で、3日間細胞培養します。あるいは、マウスIL-23(5ng/mL)を、FICZの代わりに使います。
3. 3日目に、細胞を一度洗います。その後、ブレフェルジンAの存在下で、500 ng/mLのPdBUと500 ng/mLイオノマイシンの入った完全培地で、4~5時間再刺激します。
4. 回収後、細胞は染色の準備が整います。

トミーデジタルバイオロジー株式会社
カスタマーサポート

〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1

TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813

mail : Biolegend@digital-biology.co.jp

Materials

- Sterile PBS
- Cell culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FBS)
- Sterile plastic petri dishes
- RBC Lysis Buffer (cat. # 420301)
- Anti-mouse CD3 ϵ , clone 145-2C11 (LEAF™ format, cat. # 100314)
- Anti-mouse CD28, clone 37.51, (LEAF™ format, cat. # 102112)
- Anti-mouse IL-4 (LEAF™ format, cat # 504108)
- Anti-mouse IFN- γ (LEAF™ format, cat. # 505812)
- Recombinant mouse IL-6 (carrier-free) (cat. # 575702)
- Recombinant human TGF- β 1 (carrier-free) (cat. # 580702)
- Recombinant mouse IL-23 (carrier-free) (cat. # 589002)
- Brefeldin A (cat. # 420601)
- PdBu (Phorbol 12,13-dibutyrate) (cat. # P1269 from Sigma)
- FICZ (6-formylindolo [3,2-b]carbazole) (cat. # BML-GR206-0100 from Enzo Life Sciences)

References

1. Cua DJ, et al. 2010. *Nat Rev Immunol.* 10: 479.
2. Pappu R, et al. 2010. *J Clin Immunol.* 30:185.
3. Kennedy, J., et al., 1996. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 611.
4. Schubert, D., et al., 2004. *J. Immunol.* 172: 4503.
5. Infante-Duarte, C., et al., 2000. *J. Immunol.* 165: 6107.
6. Harrington, L. E., et al., 2005. *Nature Immunol.* 6:1123.
7. Nekrasova, T., et al., 2005. *J. Immunol.* 175: 2734.
8. Yen, D., et al., 2006. *J. Clin. Invest.* 116: 1310.
9. Ehrchiou, D., et al., 2007. *J. Exp. Med.* 204:1519.
10. Kang, S. G., et al., 2007. *J. Immunol.* 179:3724.
11. Harrington, L. E., et al., 2005. *Nature Immunol.* 6:1123.

トミーデジタルバイオロジー株式会社
カスタマーサポート
〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1
TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813
mail : Biolegend@digital-biology.co.jp