

エピソーマルベクターを用いた末梢血からの iPS 細胞樹立方法

京都大学 iPS 細胞研究所

本プロトコールは、ヒト末梢血単核球にエピソーマルベクターを用いて初期化因子を導入し、ゲノムへの挿入なく iPS 細胞を作製する手順を示したものである。実験の実施に当たっては、ヒト細胞を扱うため、必要な法規制の順守と感染症対策等を行うことが求められる。

末梢血には赤血球や顆粒球、血小板などが含まれているので、始めに末梢血から単核球の精製を行う。このプロトコールでは Ficoll を用いた方法と、バキュテイナを用いた方法の 2 つの分離方法を記載する。いずれの方法でも iPS 細胞の樹立は可能である。また、凍結保存した末梢血単核球からの樹立も可能である。

単核球から iPS 細胞の樹立方法については以下の 3 種類の方法を記載する。

- A) 単核球の大半を占める T 細胞を標的として iPS 細胞を誘導する方法
 - B) 単核球中に僅かに存在する CD34 陽性細胞を分離し、培養後に iPS 細胞を誘導する方法
 - C) 単核球中の幹・前駆細胞を *in vitro* で増幅培養したのちに iPS 細胞を誘導する方法
- 実験の目的により、使い分けてほしい。

1. 準備するもの

1.1. 細胞およびベクター

OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA、EBNA1 発現用ベクター

米国非営利団体 Addgene (http://www.addgene.org/Shinya_Yamanaka) より入手できる。pCXLE-hOCT3/4-shp53-F と pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1 の 4 種類を混ぜて使用する。また、これらのプラスミドから WPRE 配列を取り除き、p53 に対する shRNA をドミナントネガティブ変異体に変更したプラスミドも同団体より入手可能となる予定である(2012 年 12 月、寄託手続き中)。こちらは pCE-hOCT3/4 と pCE-hSK、pCE-hUL、pCE-mp53DD、pCXB-EBNA1 の 5 種類を混ぜて使用する。遺伝子導入効率の評価には Amaxa kit に付属の pmaxGFP 等を利用すると良い。

MEF フィーダー細胞

マウス胎生 13.5 日胚より作製する。作製方法は文献(Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Press, New York, 1994 等)に詳しく記載されている。ReproCell 社(RCHEFC003)や Lonza 社(M-FB-481)など、幾つかの会社から市販もされている。マイトマイシン C 処理等で細胞分裂を止めた後、フィーダーとして使用する。

SNL フィーダー細胞

サンガー研究所 (<http://www.sanger.ac.uk/Terms/Term82/>) の Dr. Allan Bradley、または European Collection of Cell Cultures; ECACC (<http://www.ecacc.org.uk/>) より入手可能。

ヒト血液

適切な抗凝固剤 (EDTA やヘパリン、ACD-A 液等) を用いて採血する。ヒト単核球については Cellular Technology Limited 社 (CTL-UP1 等) や Sanguine Biosciences 社 (PBMC-001) などから市販もされている。

1.2. 必要な試薬

- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Nacalai tesque 社 14247-15)
- Phosphate buffered saline Ca, Mg free (PBS; Nacalai tesque 社 14249-95)
- Fetal bovine serum (FBS)
- Penicillin/streptomycin (Life Technologies社 15140-122)
- Recombinant basic fibroblast growth factor, human (bFGF; WAKO社 064-04541)
- Bovine serum albumin (BSA; ICN社 810-661)
- 0.25% Trypsin/1 mM EDTA solution (Life Technologies社 25200-056)
- Ficoll-Paque PREMIUM (GE healthcare, 17-5442-02) (室温保存)
- BD バキュテイナ CPT クエン酸 Na (ベクトンディッキンソン社, 362761)
- BD Pharm Lyse (ベクトンディッキンソン社, 555899)
- X-VIVO 10 (Lonza 社, 04-743Q)
- 0.5%-トリパンプルー染色液 (Nacalai tesque, 29853-34)
- セルバンカー3 (日本全薬工業, BLC-3S)
- Primate ES培地 (Primate ES medium; ReproCELL社, RCHEMD001)
- Amaxa® Human T Cell Nucleofector® Kit (Lonza社, VAPA-1002)
- Amaxa® Human CD34 Cell Nucleofector® Kit (Lonza社, VAPA-1003)
- α MEM (Nacalai社, 21444-05)
- StemSpan H3000 (StemCell Technologies 社, 09800)
- 500 mM EDTA Solution(pH 8.0) (Nacalai, 06894-14)
- Recombinant human IL-3 (PeproTech社, 200-03, 2 ug)
- Recombinant human IL-6 (PeproTech社, 200-06, 5 ug)
- Recombinant human G-CSF(PeproTech社, 300-23, 2 ug)
- Recombinant human GM-CSF (PeproTech社, 300-03, 5 ug)
- Recombinant human IL-2 (PeproTech社, 200-02, 10 ug)
- Recombinant human TPO (PeproTech社, 300-18, 10 ug)
- Recombinant human Flt3-Ligand (PeproTech社, 300-19, 10 ug)
- Recombinant human SCF (PeproTech社, 300-07, 10 ug)
- Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies社, 111-31D)
- CD34 MicroBead Kit, human (Miltenyi Biotec社, 130-046-702)

2. 試薬の調整

bFGF 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。50 μg の bFGF を 5 ml の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

IL-3 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。2 μg の IL-3 を 200 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

IL-6 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。5 μg の IL-6 を 500 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

IL-6 溶液 (100 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。5 μg の IL-6 を 50 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

G-CSF 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。2 μg の G-CSF を 200 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

GM-CSF 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。5 μg の GM-CSF を 500 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

IL-2 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。10 μg の IL-2 を 1 ml の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

TPO 溶液 (300 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。10 μg の TPO を 33.3 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

Flt3-Ligand 溶液 (300 $\mu\text{g/ml}$)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。10 μg の Flt3-Ligand を 33.3 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

SCF 溶液 (300 μ g/ml)

4.95 ml の PBS に 50 μ l の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。10 μ g の SCF を 33.3 μ l の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して -20°C で保存する。

10% FBS 培地 (MEFフィーダー用)

50ml のFBS、2.5ml のpenicillin/streptomycin を加え、DMEM で500 ml までメスアップし、0.22 μ m フィルターを通して滅菌する。 4°C で1 週間保存可能。

ヒトiPS用培地

0.2 ml の 10 μ g/ml bFGF を 500ml の Primate ES 培地に加えて使用する。

血球培地 1

- 15 ml の X vivo-10 に対し、15 μ l の IL-2 (10 μ g/ml)を加える。
- 1.5 ml チューブに 1 ml の X vivo-10 を入れる。Dynabeads CD3/CD28 をよく混和した後、このチューブに 50 μ l を加える。ボルテックスで 5 秒間懸濁し、蓋についた液を軽くスピンドウンする。チューブを DynaMag-2 に静置し、1 分以上待つ。マグネットに引きつけられたビーズに触れないように上清を取り除く。チューブを DynaMag-2 よりはずし、a. の培地に懸濁して、ひとつにまとめる。

血球培地 2

9 ml の α MEM に FBS を 1 ml および、IL-3 と IL-6、G-CSF、GM-CSF (各 10 μ g/ml)を 10 μ l ずつ加える。

血球培地 3

10 ml の StemSpan H3000 に IL-6 (100 μ g/ml)と SCF (300 μ g/ml)、TPO (300 μ g/ml)、Flt3 ligand (300 μ g/ml)、IL-3 (10 μ g/ml)を各 10 μ l加える。

カラムバッファー

20 ml の PBS に対し、500 mM EDTA を 80 μ l と FBS を 200 μ l加える。

3. 器具・機材

器具・機材は他メーカーから販売されている同等品でも代用できる。

- 6-, 24-, 96-ウェル培養プレート (FALCON 社 353046、353047、351172 など)
- 15、50 ml チューブ (FALCON 社 352196、352070 など)
- 1、5、10、25 ml プラスチックピペット(FALCON 社 357520、357543、357551、357525 など)
- Pipette aid (FALCON 社など)
- ピペットマン、チップ (GILSON 社など)
- 1.5 ml チューブ (WATSON 社など)
- CO₂ インキュベーター (Thermo 社など)

- Nucleofector II Device (Lonza 社)
- バイセル (日本フリーザー, BICELL)
- DynaMag-2 (Life Technologies 社, 12321D)
- MS Columns (Miltenyi Biotec 社, 130-042-201)
- MiniMACS Separation Unit (Miltenyi Biotec 社, 130-042-102)
- MACS MultiStand (Miltenyi Biotec 社, 130-042-102)

4. 実験方法

本実験方法は、従来のレトロウィルスベクターを用いた樹立方法を改良したものであり、ゲノム挿入がなく安全かつ効率的に iPS 細胞を樹立できることが特徴となっている。因子導入方法以外に必要な操作である、線維芽細胞の準備や継代、播種、フィーダー細胞の調整に関しては、既にホームページに公開されている「ヒト iPS 細胞の樹立方法」

http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hiPS_Protocol_080703a.pdf を参照のこと。

実験の実施に当たっては、ヒト細胞を扱うため、必要な法規制の順守と感染症対策等を行うこと。

4.1. 単核球の準備

ここではヒト末梢血単核球の分離方法について 2 つの方法を記載する。いずれの方法でも iPS 細胞の樹立は可能である。誘導に用いなかった単核球はセルバンカー3 等を用いて凍結保存できる。また、凍結保存してある末梢血単核球からの樹立も可能である。解凍方法についても記載した。ヒト単核球については Cellular Technology Limited 社 (CTL-UP1 等) や Sanguine Biosciences 社 (PBMC-001) などから市販もされている。

効率は低下するが採血後に抗凝固剤を入れて室温で一晩放置していた血液からも、単核球の分離および iPS 細胞の樹立は可能であった。

4.1.1. Ficoll を用いた末梢血単核球の分離法

- 遠心機を 18°C に設定する。* 低温だと単核球の分離が悪くなる。
- 5 ml 採血し、血が固まらないように EDTA を加えて優しく混ぜる。
- Ficoll-Paque PREMIUM を 5 ml ずつ 15 ml チューブ 2 本に分注する。
- PBS 5 ml を血液に加えて希釈し、Ficoll の上に 5 ml ずつ重層する。この時、界面を乱さないように管壁を伝わらせてゆっくりと加えること。
- 400 x g, 18°C で 30 分間遠心する。加速、減速ともゆっくり行う。
- 遠心後、白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい 15 ml チューブに移す。1 本より 1 ml 程度回収できる。2 本分をまとめて 1 本にする。下層は吸い取らないようにする。
- 回収した単核球に対し、PBS 12 ml を加えて、今度は 200 x g, 18°C, 10 分間遠心する。(400 x g ではない、減速はゆっくりで)

- 上清をアスピレートして除く。
- X-VIVO 10 を 3 ml 加えて懸濁する。
- 細胞懸濁液 10 μ l を取り、トリパンブルーで染めて、血球計算盤でカウントする。

4.1.2. バキュテイナを用いた末梢血単核球の分離法

- 遠心機を 18°C に設定する。* 低温だと単核球の分離が悪くなる。
- BD バキュテイナを用いて 8 ml 採血し、転倒混和して抗凝固剤と混和する。
- バランスを調整し、18°C、1500–1800 x g、20 min、スイングローターで遠心する。減速はゆっくりで。
 - * 取扱説明書には採血後 2 時間以内の遠心操作が推奨されている。チューブが長いのでバケットの外側に入れること、また遠心機の蓋やローターに当たらないことを確認しておくこと。
- 上層の血漿層を大まかに (3 ml くらい) 取り除く。
- ピペティングして、単核球層とゲルに張り付いている血球を懸濁する。
- 懸濁液を別の 15 ml チューブに移す。1 本より 2–3 ml 程度回収できる。
- PBS 12 ml を加えて、今度は 200 x g、18°C、5 分間遠心する。(1500 x g ではない、減速はゆっくりで)
- 上清をアスピレートして除く。
- BD Pharm Lyse (10x) を滅菌水で 1 x に希釈する。
- ペレットをタッピングでほぐし、1 x Pharm Lyse 1 ml を加える。
- 室温、遮光して 1 分間静置する。
- PBS 12 ml を加えて、室温、200 x g、5 min 遠心する。(減速はゆっくりで)
- 上清をアスピレートして除く。
- X-VIVO 10 を 3 ml 加えて再懸濁する。
- 10 μ l をトリパンブルーで染めて、血球計算盤でカウントする。

4.1.3. 凍結単核球の解凍

- 15 ml チューブに X-VIVO 10 を 8 ml を入れておく。
- 凍結した単核球の入ったチューブを 37°C の温浴槽で溶かす。
- 少し氷が残るくらいで、温浴槽から引き上げ、細胞を X-VIVO 10 へ移す。
- 10 μ l をトリパンブルーで染めて、血球計算盤でカウントする。

4.2. iPS 細胞の誘導方法

iPS 細胞の誘導方法については 3 種類の方法を記載する。誘導効率や、iPS 細胞のもととなる細胞種等がそれぞれ異なる。目的とする実験に合ったものを選択してほしい。

・ 誘導法 A

主に $\alpha\beta$ T 細胞から iPS 細胞が誘導される。誘導効率は非常に高いが、iPS 細胞は T-cell receptor (TCR) の組換えを持つ。培地を変えることで組換えの無い iPS 細胞も同時に樹立が可能だが、誘導効率は低い。

- ・ 誘導法 B

CD34 陽性細胞を分離後に、iPS 細胞の誘導に用いる。血液当たりの誘導効率 は方法 A よりも低下する。

- ・ 誘導法 C

サイトカインを加えることにより単核球のうちの幹・前駆細胞を増殖させて、そこから iPS 細胞誘導を行う。方法 B よりも誘導効率は高い。一部のクローンは TCR の組み換えを持つが、多くのクローンには組換えは認められない。

プラスミドは以下の 2 セットから選んで使う。それぞれのプラスミドを $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ で用意し、4 もしくは 5 個のプラスミドを混ぜて細胞に導入する。セット 1 の方が誘導効率は高い。セット 2 ではセット 1 が持つ WPRE 配列を取り除き、p53 に対する shRNA をドミナントネガティブ変異体に変更してある。

プラスミドセット 1	pCXLE-hOCT3/4-shp53-F	0.83 μg
	pCXLE-hSK	0.83 μg
	pCXLE-hUL	0.83 μg
	pCXWB-EBNA1	0.5 μg
プラスミドセット 2	pCE-hOCT3/4	0.63 μg
	pCE-hSK	0.63 μg
	pCE-hUL	0.63 μg
	pCE-mp53DD	0.63 μg
	pCXB-EBNA1	0.5 μg

4.2.1. 誘導法 A

遺伝子導入後に用いる培地により、iPS 細胞のもとになる細胞をある程度選択できる。血球培地 1 を用いた場合には TCR の組換えを持つ iPS 細胞が、血球培地 2 を用いた場合には TCR および immunoglobulin の組換えを持たない iPS 細胞が得られやすい。血球培地 1 は誘導効率が高い(数百コロニー/ml 血液)が、血球培地 2 では樹立効率が低い(数コロニー/ml 血液)。

<-1 日目>

- ・ 6 ウェルプレートでグラチンコートし、MEF フィーダー細胞(マイトマイシン C 処理したもの)を 3×10^5 cell/well で播く。

<0 日目> Electroporation によるプラスミド導入

- ・ 血球培地 1 もしくは 2 を必要量作製しておく。目的とする血球細胞によって培地を選択する。
- ・ 単核球 3×10^6 を 15 ml チューブに分注する。
- ・ $200 \times \text{g}$, 18°C で 10 分間遠心する。(減速はゆっくりで)
- ・ この間に、以下の Elepo 液を作製。

Human T Cell Nucleofector® Solution :	81.8 μ l
Supplement :	18.2 μ l
Plasmid :	3 μ g

- 遠心終了後、細胞の上清をしっかりと取り除く。
- Elepo 液に細胞を懸濁して、キュベットに移す。(泡を入れないこと)
- Nucleofector II Device にキュベットを差し込み、プログラム V-024 で電圧ポレーションを実施する。
- 用意しておいた血球培地にすばやく移す。
- MEF フィーダー細胞を播種した 6 ウェルプレートに 1.5 ml/well でまく。
* 血球培地 1 の場合は 1 ウェル当たり $1-30 \times 10^4$ 細胞、血球培地 2 の場合は $3-10 \times 10^5$ 細胞くらいを目安に。
- 37°C、5% CO₂ で培養する。

<2、4、6 日目> 培地の追加

- ヒト iPS 細胞用培地 1.5 ml をディッシュの壁面に添わせるように、それぞれのウェルに追加する。

<8 日目> ヒト iPS 細胞用培地への交換

- 培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地 1.5 ml をそれぞれのウェルに加える。
* 以降、培地の交換は 2 日に 1 回行う。

<20-25 日目> iPS コロニーの単離

- コロニーが成長し、肉眼で確認できるようになってきたら、分化が始まる前に拾う。(～2mm)
- 96 ウェルプレートに1 ウェルあたり200 μ l のヒトiPS細胞用培地を分注しておく。
- P10 のピペットマンを用い、実体顕微鏡下でコロニーをはがす。
- 拾ったコロニーを、96 ウェルプレートに移す。
- ピペッティングによってコロニーが小塊となるまで崩す。
* 重要ポイント!! コロニーはシングルセルの状態までバラバラにしないこと。
- 24 ウェルプレートのSNLフィーダー細胞(マイトマイシンC処理したもの)上にまき、300 μ l のヒト iPS細胞用培地を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターで80-90%コンフルエントとなるまで培養する。

4.2.2. 誘導法 B

末梢血中の CD34 陽性細胞数は非常に少なく、 2×10^7 の単核球(全血約 20ml に相当)から 10^4 程度の細胞が回収される。新鮮分離した単核球を使用することを勧める。分離には CD34 MicroBead Kit を使用する。10 コロニー/ml 血液程度。

<0 日目> CD34 陽性細胞の分離と培養

- 6 ウェルプレートの 1 ウェルに血球培地 3 を 2 ml 入れる。

- 培地の蒸発防止用に、他の 5 ウェルには PBS を 2 ml ずつ加える。プレートは 37°C のインキュベーターに入れて温めておく。
- 単核球 2×10^7 を 15 ml チューブに分注する。
- 300 x g, 4°C, 10 分間遠心する。ブレーキはゆっくりで。
- 上清を除き、カラムバッファー 300 μ l に懸濁する。
- FcR Blocking Reagent を 100 μ l、さらに CD34 MicroBeads を 100 μ l 加える。
- 混和して、4°C で 30min 静置する。
- カラムバッファーを 10 ml 加えて、希釈する。
- 300 x g, 4°C, 10 分間遠心する。ブレーキはゆっくりで。
- 上清をアスピレートして除く。ピペットを使って、きっちりと取り除く。
- カラムバッファーを 500 μ l 加えて再懸濁する。
- MS カラムを MiniMACS Separation Unit に取り付け、流出液を受けるための 15ml チューブを下に置く。
- MS カラムにカラムバッファーを 500 μ l 入れ、洗浄する。
- 流出液が止まったら、カラムの下に新しい 15 ml チューブを置く。
- 細胞をカラムにアプライする。流出液にはラベルされていない細胞が含まれるので必要なら回収する。
- MS カラムにカラムバッファーを 500 μ l 入れ、洗浄する。流出液が止まったら再度、カラムバッファーを添加する。この洗浄は合計 3 回繰り返す。
- カラムを磁石からはずし、新しい 15ml チューブに移す。
- MS カラムにカラムバッファーを 1000 μ l 入れ、速やかにシリンジを押して細胞を流出させる。
- 10 μ l をトリパンブルーで染めて、血球計算版でカウントする。
- 300 x g, 4°C, 10 分間遠心する。
- 上清をアスピレートして除く。
- 温めておいた血球培地 3 で再懸濁し、培養プレートに戻す。
- 37°C、5% CO₂ で 6 日間培養する。この間、培地交換はしない。

<5 日目> フィーダー細胞の準備

- 6 ウェルプレートをゲラチンコートし、MEF フィーダー細胞(マイトマイシン C 処理をしたもの)を 3×10^5 cell/well で播く。

<6 日目> Electroporation によるプラスミド導入

- 血球培地 3 を必要量作製しておく。
- 培養単核球を 15 ml チューブに回収する。
- 10 μ l をトリパンブルーで染めて、血球計算版でカウントする。
- 200 x g, 18°C で 10 分間遠心する。(減速はゆっくりで)
- この間に、以下の Elepo 液を作製。

Human CD34 Cell Nucleofector® Solution :	81.8 μ l
Supplement :	18.2 μ l
Plasmid :	3 μ g

- 遠心終了後、上清を 100 μ l ほど残してアスピレートする。
- その後、ピペットマンを使って、上清をしっかりと取り除く。
- Elepo 液に細胞を懸濁して、キュベットに移す。(泡を入れないこと)
- Nucleofector II Device にキュベットを差し込み、プログラム U-008 でエレクトロポレーションを実施する。
- 作製しておいた血球培地 3 にすばやく移す。
- MEF フィーダー細胞を播種した 6 ウェルプレートに 1.5 ml/well でまく。
* 1 ウェル当たり $1-5 \times 10^4$ 細胞くらいを目安に。
- 37°C、5% CO₂ で培養する。

<8、10、12 日目> 培地の追加

- ヒト iPS 細胞用培地 1.5 ml をディッシュの壁面に添わせるように、それぞれのウェルに追加する。

<14 日目> ヒト iPS 細胞用培地への交換

- 培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地 1.5 ml をそれぞれのウェルに加える。
* 以降、培地の交換は 2 日に 1 回行う。

<20-30 日目> iPS コロニーの単離

- コロニーが成長し、肉眼で確認できるようになってきたら、分化が始まる前に拾う。(～2mm)
- 96 ウェルプレートに1 ウェルあたり 200 μ l のヒト iPS 細胞用培地を分注しておく。
- P10 のピペットマンを用い、実体顕微鏡下でコロニーをはがす。
- 拾ったコロニーを、96 ウェルプレートに移す。
- ピペッティングによってコロニーが小塊となるまで崩す。
* 重要ポイント!! コロニーはシングルセルの状態までバラバラにしないこと。
- 24 ウェルプレートの SNL フィーダー細胞 (マイトマイシン C 処理したもの) 上にまき、300 μ l のヒト iPS 細胞用培地を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターで 80-90% コンフルエントとなるまで培養する。

* 効率は低下するが、20 μ g/ml RetroNectin (Takara, T100A) や 0.5 μ g/cm² Vitronectin (Life Technologies 社, A14701SA) でディッシュをコートして、TeSR2 (Stemcell Technologies 社, ST-05860) や Essential8 (Life Technologies 社, A14666SA) を培地として用いることでフィーダーフリーでの樹立も可能である。

4.2.3. 誘導法 C

単核球中の幹・前駆細胞の増殖を促すようなサイトカインを入れ、*in vitro* で増幅培養したのちに iPS 細胞を誘導する。樹立された iPS 細胞は大半が TCR および immunoglobulin の組換えを持たない。数十コロニー/ml 血液程度。

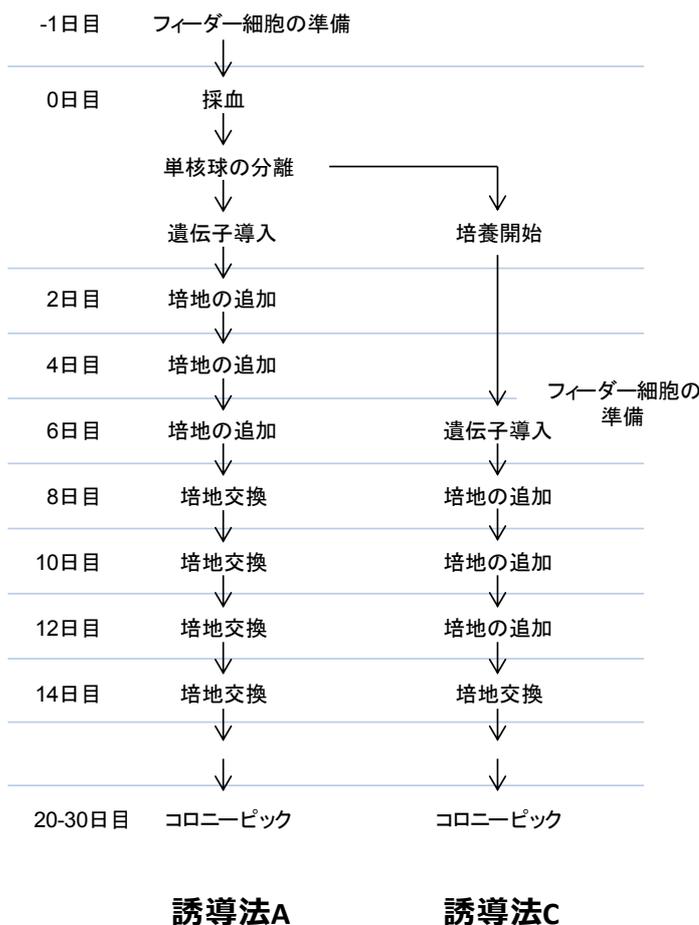
<0 日目> 単核球の培養

- 6 ウェルプレートの 1 ウェルに血球培地 3 を 2 ml 入れる。
- 培地の蒸発防止用に、他の 5 ウェルには PBS を 2 ml ずつ入れて、37°C に温めておく。
- 単核球 3×10^6 を 15 ml チューブに分注する。
- $300 \times g$, 4°C, 10 分間遠心する。ブレーキはゆっくりで。
- 上清をアスピレートする。
- 温めておいた血球培地 3 に再懸濁して培養プレートに戻す。
- 37°C、5% CO₂ で 6 日間培養する。この間、培地交換はしない。
 - * 5 日目以降は誘導法 B と同様に行う。6 日目の細胞数は 1×10^6 程度になる。遺伝子導入後は 1 ウェル当たり $5-20 \times 10^4$ 細胞くらいを目安に播く。

* 効率は低下するが、20 $\mu\text{g/ml}$ RetroNectin (Takara, T100A) や 0.5 $\mu\text{g/cm}^2$ Vitronectin (Life Technologies 社, A14701SA) でディッシュをコートして、TeSR2 (Stemcell Technologies 社, ST-05860) や Essential8 (Life Technologies 社, A14666SA) を培地として用いることでフィーダーフリーでの樹立も可能である。

4.3. 実際の誘導スケジュール

例えば、Ficoll による単核球分離後に、誘導法 A および C で iPS 誘導を行う時のスケジュールは以下のようなになる。



4.4. iPS 細胞の培養、継代および凍結

ヒトiPS 細胞の培養、継代および凍結方法はこれまでにヒトES細胞で開発されてきた方法が適用できる。iPS 細胞研究所では、京都大学 幹細胞医学研究センター 霊長類胚性幹細胞研究分野の末盛博文博士らによって開発された方法にのっとり培養を行っている（文献3 を参照）。

4.5. ゲノム integration の解析

導入した episomal vector は iPS 細胞の継代により、やがて失われていくが、まれにゲノム内に挿入されていることがある。のちの解析に支障をきたす恐れがあるため、ゲノム PCRによりゲノム挿入の有無を検出する。プライマー、PCR 条件などは以下の通り。（文献 4 を参照）

pEP4-SF1 : TTC CAC GAG GGT AGT GAA CC

pEP4-SR1 : TCG GGG GTG TTA GAG ACA AC

94°C	2 min	30 cycle
94°C	20 sec	
64°C	20 sec	
72°C	40 sec	
72°C	3 min	

5. 参考文献

1. Okita, K., et al. An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *Stem Cells*. 2012 Nov 29
2. Okita, K., et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 8, 409-12 (2011).
3. Fujioka, T., et al. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 48, 1149-54 (2004).
4. Yu, J., et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 324, 797-801 (2009).
5. Mack, AA., et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from CD34+ Cells across Blood Drawn from Multiple Donors with Non-Integrating Episomal Vectors. *PLoS One*. 6, e27956 (2011).