

ヒト iPS 細胞の樹立方法

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター

本プロトコールはヒト線維芽細胞に 4 種の初期化因子を導入して多能性幹細胞を作製する手順を示したものである。

1. 準備するもの

1.1. 細胞およびベクター

pMXs レトロウイルスベクターおよび PLAT-E パッケージング細胞

東京大学医科学研究所 北村俊雄教授 (kitamura@ims.u-tokyo.ac.jp) より入手可能。
Cell Biolabs 社 (<http://www.cellbiolabs.com/>) より購入することもできる。GFP 遺伝子をコードする pMXs ベクターも同社より購入できる。

OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 発現用レトロウイルスベクター

米国非営利団体 Addgene (http://www.addgene.org/Shinya_Yamanaka) より入手できる。
pMXsレトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトにヒト OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子をそれぞれクローニングしたもの。

マウス *Slc7a1* 発現用レンチウイルスベクター

Addgene (http://www.addgene.org/Shinya_Yamanaka) より入手できる pLenti6/UbC/V5-DEST (Invitrogen 社) にマウスエコトロピックレセプターをコードする *Slc7a1* (Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1) 遺伝子をクローニングしたもの。

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/>) より入手できる。

293FT 細胞

Invitrogen 社より購入できる。

線維芽細胞

ヒト皮膚線維芽細胞を用意する。下記の会社および機関などから細胞を入手することが可能。

Cell applications Inc. (<http://www.cellapplications.com/>)

Lonza (<http://www.lonza.com/group/en.html>)

American Type Culture Collection; ATCC (<http://www.atcc.org/>)

理研バイオリソースセンター (<http://www.brc.riken.jp/>)

医薬基盤研究所 (<http://www.nibio.go.jp/index.shtml>)

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; マウス ES 細胞培養用にロットチェックしたもの)
- L-glutamine (Invitrogen 社 25030-081)
- Non-essential amino acids solution (Invitrogen 社 11140-050)
- Sodium pyruvate (Sigma 社 S8636)
- Penicillin/streptomycin (Invitrogen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 (Invitrogen社 25200-056)
- 0.5% Trypsin/5.3 mM EDTA solution (Invitrogen社 25300-054)
- Mitomycin C (協和発酵)
- ゲラチン(Gelatin; Sigma社 G1890)
- G418 (G418 sulfite; Invitrogen社 10131-035)
- Puromycin (Sigma社 P7255)
- Blastidicin S hydrochloride (Funakoshi社 KK-400)
- Virapower Lentiviral expression system (Invitrogen社 K4990-00)
- Eugene 6 transfection reagent (Roche社 1 814 443)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen社 11668-019)
- OPTI-MEMI (Invitrogen社 31985-062)
- ポリブレン(Hexadimethrine Bromide; Nacalai tesque社 17736-44)
- Primate ES培地 (Primate ES medium; ReproCELL社 RCHEMD001)

2. 試薬の調製

Puromycin 溶液 (10 mg/ml)

10 mgのPuromycinを1mlのオートクレーブ処理超純水に溶解し、0.22 µmフィルターを通して滅菌する。分注して-20℃で保存する。

Blasticidin S溶液 (10 mg/ml)

10 mgのBlasticidin Sを1mlのオートクレーブ処理超純水に溶解し、0.22 µmフィルターを通して滅菌する。分注して-20℃で保存する。

bFGF溶液 (10 µg/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。

0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA溶液

10 mlの0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA溶液を90mlのPBSで希釈し、分注して-20°Cで保存する。

ゲラチンストック溶液 (1%)

5 gのゲラチンを500 mlの超純水で溶解し、オートクレーブで滅菌する。4°Cで保存する。

ゲラチンワーキング溶液 (0.1%)

50 mlのゲラチンストック溶液に450 mlのオートクレーブ処理超純水を加えて希釈する。0.22 µmフィルターに通して4°Cで保存する。

ポリブレン溶液 (8 mg/ml)

80 mgのポリブレンを10 mlのオートクレーブ処理超純水に溶解し、0.22 µmフィルターを通して滅菌する。4°Cで保存する。

SNL培地

35mlのFBS、5 mlのL-glutamine、2.5mlのpenicillin/streptomycinを加え、DMEMで500 mlまでメスアップし、0.22 µmフィルターを通して滅菌する。4°Cで1週間保存可能。

293FT培地

75 mlのFBS、5 mlのL-glutamine、5 mlのnon essential amino acids、5 mlのsodium pyruvate、

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。293FT培地10mlあたり0.1 mlの50 mg/ml G418を加えて使用する。

10% FBS 培地 (線維芽細胞、PLAT-E 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。PLAT-E の培養に用いる際は 10% FBS 培地 10ml あたり 1 μ l の 10 mg/ml puromycin と 10 μ l の 10 mg/ml Blastidicin S を加えて使用する。

Primate ES培地 (ヒトiPS細胞用)

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

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。

- 100 mm培養ディッシュ (FALCON社 353003など)
- 6-, 24-, 96-well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)
- 0.22 μ mフィルター (Millipore社 SLGP033RSなど)
- 0.45 μ mセルロースアセテートフィルター (Schleicher & Schuell社 FP30/0.45 CA-Sなど)
- 10 mlシリンジ (Terumo社 SS-10ESZなど)
- Coulter counter (Beckman Coulter社 Z2)
- Pippette 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)

4. 実験方法

本実験方法はマウスiPS細胞の作製法をヒトに応用するために、部分的に改変、改良を行ったものである。大きな特徴として、マウスエクトロピックレセプターをあらかじめレンチウイルスを用いて導入し、そこにレトロウイルスで初期化因子を導入する点が挙げられる。これは遺伝子の導入効率と実験者の安全性を同時に高めるための工夫である。

一般にマウスと比較して、ヒトiPS細胞は樹立効率が低いと考えられるので、各ステップを遵守して行うことが重要である。

4-1. 線維芽細胞の準備

4-1-1. 線維芽細胞の解凍

- 9 mlの10% FBS培地を15 mlチューブに用意する。
- 凍結させた線維芽細胞のバイアルを液体窒素から出し、37°Cの恒温槽で解凍する (少し氷が残る程度まで、完全には解かさない)。
- バイアルを70%エタノールで拭き、キャップを開けて中の細胞懸濁液を15 mlチューブに準備しておいた培地に懸濁する。
- 160 x gで5分間遠心し、培地を除去する。
- 新たな10 mlの10% FBS培地に再懸濁し、100 mmディッシュにまく。ストックの細胞数が少ない場合は指定されたサイズのでディッシュにまくこと。37°C、5% CO₂インキュベーターで80~90%コンフルエントに達するまで培養する。線維芽細胞をまく数の目安は以下の通りである。

培養皿のサイズ	細胞数
100 mm ディッシュ	5×10^5
60 mm ディッシュ	2×10^5
35 mm (6-well plate)	1×10^5

4-1-2. 線維芽細胞の継代

- 培地を吸引除去し、細胞はPBSで一度洗う。
- PBSを吸引除去し、ディッシュあたり1 mlの0.05% Trypsin/0.53 mM EDTAを加える。37°Cで10分インキュベートする。
- 9 mlの10% FBS培地を加え、ピペッティングによりシングルセルの状態になるまでバラバラにする。
- 40 mlとなるよう10% FBS培地で希釈し、100mmディッシュあたり10mlの懸濁液をまく。37°C、5% CO₂インキュベーターで80~90%コンフルエントに達するまで培養する。次の継代まで通常4~5日かかる。

重要ポイント!! 細胞は低密度でまかないこと。低密度培養は細胞の老化を促進し、結果としてレトロウイルスの感染効率を著しく下げる。高効率の遺伝子導入がiPS細胞の誘導には必須であるため、増殖能の低下した細胞から作製するのは困難である。

4-2. レンチウイルスの作製

4-2-1. 293FT 細胞の継代

- 培地を吸引除去し、細胞はPBSで洗う。
- 1 mlの0.25% Trypsin/1 mM EDTAを加え室温で2分間インキュベートする。
- 10 mlの培地を加え、ピペッティングによりバラバラにする(10回程度)。
- 細胞懸濁液を15 mlチューブに回収し、細胞数を計測する。

- 4×10^5 個/ml となるよう、G418 を含んでいない 293FT 培地で希釈する。100 mm ディッシュあたり 4×10^6 個 (10 ml) となるようにまき、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

4-2-2. 293FT 細胞への遺伝子導入

- 1.5 ml の OPTI-MEMI 培地で 9 µg の Virapower packaging mix (pLP1, pLP2 及び pLP/VSVG) と 3 µg の pLenti6/UbC/mSlc7a1 を希釈し穏やかに混合する。
- 別のチューブで、1.5ml の OPTI-MEM I 培地と 36 µl の Lipofectamine 2000 を穏やかに混合し、室温で 5 分間静置する。
- 希釈した DNA と Lipofectamine 2000 を穏やかに混合し、室温で 20 分間静置する。
- 293FT 細胞のディッシュから培地を除去し、9 ml の新鮮な 10% FBS 培地と交換する。
- 3 ml の DNA-Lipofectamine 2000 複合体溶液をディッシュに加える。ディッシュを前後にゆすって穏やかに混合し、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。
- 遺伝子導入の 24 時間後に培地を除去し、新鮮な 10 ml の 10% FBS 培地と交換する。37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

重要ポイント!! 安全性確保のため、以降のレンチウイルスを扱う作業は手袋を着用し安全キャビネット内で行う。

4-3. レンチウイルスの感染

4-3-1. レンチウイルスの回収

- 293FT の培養上清を 10ml のシリンジで回収し、0.45 µm セルロースアセテートフィルターで濾過する。得られたウイルス液は直ちに使用するか、分注して-80°Cで保存する。

4-3-2. 線維芽細胞の播種

- 線維芽細胞は培地を吸引除去し、PBS で洗う。

- 1 ml の 0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA を加え 37°C で 10 分間インキュベートする。
- 9 ml の 10% FBS 培地を加え、ピペッティングにより細胞をバラバラにする。
- 細胞懸濁液をコニカルチューブに回収し、細胞数を計測する。
- 100 mm ディッシュあたり 8×10^5 個となるようにまき、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

4-3-3. 線維芽細胞への感染

- ウイルス液に 4 µg/ml のポリブレンを加えたものを線維芽細胞の培地と交換する。37°C、5% CO₂ で 5 時間~一晩培養する。

重要ポイント!! 細胞によっては一晩の感染に耐えられない (細胞死を起こす) 場合がある。その場合はウイルスを 2 倍程度に希釈する、または感染時間を 5 時間程度に短縮する。

- 感染の 24 時間後、ウイルス液の培養上清を除去し、10 ml の新鮮な培地と交換する。

重要ポイント!! ここでレンチウイルスが正しく感染し、線維芽細胞がマウス *Slc7a1* 遺伝子を発現することが今後の実験の鍵となる。EGFP または DsRed などの可視化できるコントロールとして用いると便利である。

また、pLenti6/UbC/mSlc7a1 には Blasticidin S 耐性遺伝子が含まれているので、Blasticidin S を含む培地で培養し、レンチウイルスが導入されていることを確認することもできる。

4.4. SNL 細胞 (フィーダー細胞) の調製

- SNL フィーダー細胞の調製方法は文献 2 を参照。ただし、若干細胞数が異なるので注意する。目安となる細胞数は以下の表の通りである。マウス iPS 細胞の場合より 1.5 倍の細胞を使用する。

培養皿のサイズ	細胞数
100 mm ディッシュ	1.5×10^6
60 mm ディッシュ	5×10^5
35 mm (6-well plate)	2.5×10^5
24-well plate	6.3×10^4

重要ポイント!! mitomycin C 処理より4日以上たったSNLフィーダー細胞は、ヒト iPS 細胞用培地に含まれる bFGF の影響で剥がれてしまう恐れがあるので使用しないこと。

4.5. PLAT-E パッケージング細胞の調製

- PLAT-E 細胞の培養法は文献 2 を参照。

4.6. iPS 細胞の樹立

4.6.1. レトロウイルス作製; PLAT-E 細胞の準備 (1 日目)

- 文献 2 を参照。ただし、播種する細胞数は以下の表の通りとする。

培養皿のサイズ	細胞数
100 mm ディッシュ	3.6×10^6
60 mm ディッシュ	1.5×10^6
35 mm (6-well plate)	6×10^5

4.6.2. レトロウイルス作製; PLAT-E 細胞への遺伝子導入 (2 日目)

- 文献2を参照。一種類のプラスミドを一枚の PLAT-E 細胞に導入する。4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) と EGFP を行う場合は 5 枚の PLAT-E を必要とする。

重要ポイント!! 適切なコントロールを用いること。iPS 細胞研究センターでは遺伝子導入効率を検証するために EGFP または DsRed をコードするベクターを用いており、常に 60%以上の効率が得られている。高い遺伝子導入効率は iPS 細胞の誘導に不可欠である。

4.6.3. レトロウイルス作製の続き (3 日目)

- トランスフェクション試薬を含んだ培地を吸引除去する。10 ml の新鮮な 10% FBS 培地に交換し、インキュベーターに戻す。

4.6.4. 線維芽細胞の準備 (3 日目)

増殖能力のある線維芽細胞 (マウス *Slc7a1* 遺伝子を発現しているもの) を準備する。

- 培養上清を吸引除去し、10 ml の PBS で洗う。
- PBS を除去し、1 ml の 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA を加え 37°C で 10 分間インキュベートする。
- 9 ml の培地を加え、シングルセルの状態となるよう懸濁し、50 ml チューブに回収する。
- 細胞数を計測し、 8×10^4 個/ml となるよう調整する。10 ml の細胞懸濁液 (8×10^5 個) を 100mm ディッシュにまき、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

4.6.5. レトロウイルスの感染 (4 日目)

- PLAT-E の培養上清を 10ml のシリンジで回収し、0.45 μ m セルロースアセテートフィルターに通す。
- 5 μ l の 8 mg/ml ポリブレン溶液をウイルス液に加え、穏やかなピペティングにより混合する。ポリブレンの最終濃度は 4 μ g/ml となる。

- OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC のウイルス液を等量ずつ混合する。

重要ポイント!! レトロウイルスは新鮮なものを用いること！凍結させたウイルス液を用いると iPS 細胞の作製効率は著しく低下し、場合によっては全くできないこともある。レトロウイルスの力価は iPS 細胞の誘導において常に重要であるが、凍結融解の工程により力価は低下する。

- 線維芽細胞の培地を吸引除去し、10 ml の混合ウイルス液と交換する。37°C、5% CO₂ で 4 時間～一晩培養する。

4.6.6. レトロウイルス感染後 (5 日目)

- 24 時間後、線維芽細胞の培養上清を吸引除去し、10 ml の新鮮な 10% FBS 培地と交換する。

4.6.7. レトロウイルス感染後 (6~9 日目)

- 培地を除去し、10 ml の新鮮な 10% FBS 培地と交換する。

4.6.8. 線維芽細胞を mitomycin C 処理した SNL 細胞上にまきなおす (10 日目)

- 培地を除去し、10 ml の PBS で洗う。
- PBS を除去し、1 ml の 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA を加え、37°C で 10 分間インキュベートする。
- 9 ml の培地を加え、シングルセルの状態となるよう懸濁し、50 ml チューブに回収する。
- 細胞数を計測し、 5×10^3 もしくは 5×10^4 個/ml となるよう調整する。10 ml の細胞懸濁液 (5×10^4 もしくは 5×10^5 個) を 100mm ディッシュの SNL フィーダー細胞上にまき、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

重要ポイント!! 同じ皮膚由来の線維芽細胞であっても iPS 細胞のコロニーが出現する頻度は異なる。線維芽細胞の数が少なすぎると 1 個もコロニーが得られ

ない恐れがある。一方で、線維芽細胞の数が多すぎると、iPS 細胞の生育が阻害され、結果としてコロニーが得られにくい状況に陥る。最適な細胞数はやってみないことにはわからないので、必ず複数の細胞数ポイントで検討すること。

4.6.9. iPS 細胞のコロニーができるまで (11 日目~)

- 培地を 10 ml の primate ES 培地に置換し、以後 2 日に一度培地を交換する。レトロウイルスの感染からおよそ 2、3 週間でコロニーが見えてくる。コロニーが単離できる大きさになるまでは 30 日ほどかかる。

重要ポイント!! 同じ皮膚由来の線維芽細胞であっても iPS 細胞のコロニーが出現するタイミングは異なる。培地交換のたびに細胞をよく観察すること。

4.6.10. iPS コロニーの単離 (約 25~30 日目)

- 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 20 μ l の primate ES 培地を分注しておく。
- PBS を除去し、5 ml の PBS を加える。
- 2 μ l にセットした P2 もしくは P10 のピペットマンを用い、コロニーをはがして培地を入れて準備しておいた 96 ウェルプレートに移す。
- 180 μ l の ES 培地を加え、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 (mitomycin C 処理したもの) 上にまき、300 μ l の ES 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。次に継代する際は 6 ウェルプレートに移す。

4.6.11. 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 細胞研究センターでは、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)。

5. 参考文献

1. Takahashi, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72 (2007)
2. Takahashi, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2, 3081-9 (2007)
3. Fujioka, T. et al. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1149-54 (2004)

謝辞

本プロトコールは、京都大学再生医科学研究所 山中研究室 修士課程2年 大貫茉莉氏の多大なる協力を得て作成しました。ここに深く御礼申し上げます。



CiRA