

マウス iPS 細胞の改良型樹立方法

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

マウス iPS 細胞が 2006 年に樹立されて以来、レトロウイルスの感染法や薬剤選択の有無などが検討され、樹立方法の改良が行われてきた。従来に比して、Nanog-GFP 陽性のマウス iPS 細胞では、キメラマウスの生殖系列に寄与する程度の多能性を示した。また、細胞の播種密度などを工夫することにより、薬剤選択を行わずに野生型のマウス細胞からの、また c-Myc を含まない 3 因子による iPS 細胞の誘導が可能となった。本プロトコルは、マウス線維芽細胞から遺伝子導入により多能性幹細胞を得る方法について、文献 1 に記載された手法をもとに、主に新たな改良点 (赤字で記載) について示したものである。

1. 準備するもの

OPTI-MEMI (Invitrogen社 31985-062)

その他必要な細胞、ベクター、試薬および試薬の調製方法、器具、機材は文献1を参照すること。

2. 細胞の培養

MEF、TTF、SNL細胞およびPLAT-Eパッケージング細胞の培養方法は文献1を参照すること。

3. マウス iPS 細胞の樹立

3.1.1. レトロウイルスの作製; PLAT-E 細胞の準備 (1 日目)

- 文献1を参照すること。ただし、播種するPLAT-Eの細胞数は以下の通りとする。

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

また、3.1.2.で一種類のプラスミドを一枚のPLAT-E細胞に導入するため、4遺伝子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) とDsRedを用いる場合は5枚のPLAT-Eを必要とする。

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

以下に示すプロトコールは 100mm ディッシュに播種した PLAT-E に対するものである。60mm、35mm 径のディッシュに播種した場合は用いる試薬の量をそれぞれ 1/3、1/6 にスケールダウンする。

- 導入したい遺伝子の種類と同数の 1.5 ml チューブに、それぞれ 0.3 ml の OPTI-MEMI を分注する。
- 27 μ l の Fugene 6 transfection reagent を加えタッピングにより穏やかに混合し、室温で 5 分間インキュベートする。
- 9 μ g の pMXs プラスミド DNA (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* および DsRed などのネガティブコントロール) をそれぞれ別の Fugene 6/ OPTI-MEMI 溶液に滴下し、指で軽くタッピングして混合する。室温で 15 分間インキュベートする。
- DNA/Fugene 6 複合体溶液をそれぞれ別の PLAT-E 細胞に滴下し、37°C、5% CO₂ で一晩培養する。

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 80% 以上の効率が得ている。高効率の遺伝子導入は iPS 細胞の誘導に不可欠である。

- 翌日 (3日目)、Fugene 6 transfection reagent を含んだ培地を吸引除去し、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。

3.2 MEF、TTF の準備 (3日目)

- 文献 1 を参照すること。

3.3 レトロウイルスの感染 (4日目)

- 文献 1 を参照すること。各ウイルス液は最終的に等量ずつ混合する。なお、薬剤選択なしで樹立しようとする場合は、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、DsRed を 1:1:1:3 の比で混合する。これを線維芽細胞の培地と置換し、37 °C、5% CO₂ で一晩培養する。
- 24 時間後 (5日目)、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。
- さらに 2 日後 (7日目)、培地を除去し、10 ml の新鮮な 10% FBS 培地と交換する。

3.4. 線維芽細胞を mitomycin C 処理した SNL フィーダー細胞上にまきなおす (8 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、以下の細胞数を目安に 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。

	4 因子	3 因子(Myc-)
細胞数	0.5~5 x 10 ⁴	3.5 x 10 ⁵
薬剤選択	11 日目から	18 日目から

重要ポイント!! iPS 細胞のコロニー出現頻度は実験回により異なる。まきなおす線維芽細胞の数が少なすぎるとコロニーが 1 つも得られない恐れがある。しかし線維芽細胞の数が多すぎると、iPS 細胞の生育が阻害され、Nanog-GFP 陽性コロニーの単離が困難になる。一枚あたりにまきなおす細胞数を何段階かに振り分け、最適な細胞数を検討すること。なお、c-Myc を除いた 3 因子レトロウイルスを感染させた場合は、Myc を加えた場合と比べて出現コロニー数が ~10% に減るので、ほぼ全量をまきなおしても問題ない。

- 翌日 (9 日目)、培地を 10 ml のマウス ES 培地に置換する。以後 1 日おきに培地を新鮮なものとの交換する。

3.5. 薬剤選択 (11、18 日目~)

- 文献 1 を参照すること。ただし、4 因子を感染させた場合は 11 日目より、3 因子 (Myc-) の場合は 18 日目より薬剤選択を開始する。

重要ポイント!! 薬剤選択の開始時期を遅らせると、得られる GFP 陽性コロニーの数は増加する。3 因子の導入でコロニーがあまり出現しない場合、25 日目から Puromycin 選択を始めることでより多くのコロニーを得ることができる。

3.6. マウス iPS コロニーの単離 (25 日目 ~)

- 文献 1 を参照すること。ただし、**選択なしで樹立しようとする場合、導入した DsRed の発現がサイレンシングされているものを選んでピックする。**

重要ポイント!! 多能性の程度（質）の高い iPS 細胞の指標としてレトロウイルスのサイレンシングが挙げられる。DsRed など発現が視認できる遺伝子を初期化因子と同時に導入しておくとう便利である。DsRed 陰性のコロニーは質の高い iPS 細胞である可能性が高い。

3.7. iPS 細胞の培養、継代、凍結および解凍

- 文献 1 を参照すること。基本的にマウス ES 細胞と同じである。

4. 参考文献

1. Takahashi, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2, 3081-9 (2007)
2. Nakagawa, M., Koyanagi, M., et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 10.1038/nbt1374 (2007)

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 大貫菜里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