

## プロトコール

### フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立・維持培養

## 目次

<b>血球細胞の培養</b> .....	<b>4</b>
(1) Non-T Cell 用単核球培養培地の調製.....	4
(2) 新鮮単核球を受け入れる場合 .....	5
(3) 凍結単核球を受け入れる場合 .....	5
<b>iPS 細胞の樹立：遺伝子導入～培地交換</b> .....	<b>6</b>
(1) 遺伝子導入試薬の準備 (pCXLE セット) .....	6
(2) 遺伝子導入試薬の準備 (pCE セット) .....	7
(3) プレートのコーティング .....	7
(4) 遺伝子導入 .....	7
(5) 培地添加.....	8
(6) 培地交換.....	8
<b>コロニーピックアップ</b> .....	<b>9</b>
(1) 培地の準備 .....	9
(2) プレートのコーティング .....	9
(3) コロニーピックアップ .....	9
<b>iPS 細胞の継代 (6-well から 6-well へ)</b> .....	<b>11</b>
(1) 培地の準備 .....	11
(2) プレートのコーティング .....	11
(3) 継代.....	11
(4) 細胞継代後の培地交換 .....	13
<b>iPS 細胞の凍結</b> .....	<b>14</b>
<b>凍結ストックの解凍</b> .....	<b>16</b>
(1) 培地の準備 .....	16
(2) プレートのコーティング .....	16
(3) 融解.....	16
(4) 細胞融解後の培地交換 【融解後 1 日目】 .....	18

<b>On-feeder iPSC 細胞を feeder-free 条件にて継代する方法.....</b>	<b>19</b>
(1) 培地の準備 .....	19
(2) プレートのコーティング .....	19
(3) 継代 (6-well から 6-well の場合) .....	20
<b>参考資料 .....</b>	<b>22</b>
(1) 維持培養培地 StemFit の調製 .....	22
(2) 0.5X TrypLE Select 溶液の調製 .....	23
(3) 培養スケールに応じた試薬量一覧 .....	24
(4) iPSC 細胞の樹立 : CytoTune-iPS (センダイウイルス) を使った遺伝子導入 .....	25

## 血球細胞の培養

### 【準備するもの】

- 細胞：末梢血または臍帯血由来単核球細胞 ( $1.2 \times 10^7$  cells)
- 試薬：StemFit without C 培地\* (C液を含まない StemFit 培地、味の素)
- IL-6 (20 µg、098-06041、和光純薬)
  - SCF (10 µg、197-15511、和光純薬)
  - TPO (10 µg、207-17581、和光純薬)
  - Flt-3L (10 µg、061-05391、和光純薬)
  - IL-3 (10 µg、090-05761、和光純薬)
  - G-CSF (10 µg、072-06101、和光純薬)
- カウンテス自動セルカウンター付属トリパンプブルー溶液 (ライフテクノロジーズ、T10282)
- 物品：24-well プレート
- 15/50 mL コニカルチューブ
  - ピペット
  - カウンテス自動セルカウンター (ライフテクノロジーズ、C10227)
  - カウンテス自動セルカウンター付属スライド (ライフテクノロジーズ、C10228)

### 【手順】

#### (1) Non-T cell 用単核球培養培地の調製

1. StemFit without C 培地に以下の最終濃度になるようにサイトカインを加えよく混ぜる。
  - IL-6 : 50 ng/mL
  - SCF : 50 ng/mL
  - TPO : 10 ng/mL
  - Flt-3L : 20 ng/mL
  - IL-3 : 20 ng/mL
  - G-CSF : 10 ng/mL

\* 単核球培養培地として StemFit without C 培地の代わりに以下の培地を使うことも可能である。

- StemSpan-ACF (STEMCELL Technologies、ST-09805/09855)
- X-VIVO 10 (Lonza、04-743Q)

**(2) 新鮮単核球を受け入れる場合**

1. 単核球培養培地を調製する。
2. 15 mL チューブなどに入った分離調製済み新鮮単核球を受け入れる。
3. 200 x g、18°C、10 min で遠心する（停止時の設定：slow）。
4. 遠心終了後チューブを回収し上清を取り除く。
5. ペレットをタッピングで崩し、4 mL の単核球培養培地を加え、そのままピペッティング（6回）で懸濁する。
6. 24-well plate の中央の 4 wells に 1 mL ずつ分注する。
7. 使わない well には蒸留水または PBS(-)を 1 mL ずつ入れて蒸発を防止する。
8. インキュベーター（37°C、CO<sub>2</sub> 5%）で 7 日間培養する。

**(3) 凍結単核球を受け入れる場合**

1. 単核球培養培地を調製する。
2. StemFit without C 培地を室温に戻しておく。
3. 2.0 mL チューブ用アルミブロックをセットした恒温槽（ウォーターバスでも可）の電源を入れて 37°C に温めておく。
4. 新しい 15 mL チューブに 10 mL の StemFit without C 培地を入れておく。
5. 凍結単核球の入ったチューブを恒温槽にて少し氷の塊が残る程度まで溶かす。
6. 溶けたストック溶液を StemFit without C 培地の入った 15 mL チューブに移しよく混ぜる。
7. 細胞懸濁液の一部をトリパンブルー染色し、Countess で生細胞数をカウントする。
8. 新しい 15 mL チューブに  $1.2 \times 10^7$  cells を含む懸濁液を移す。
9. 200 x g、18°C、10 min で遠心する（停止時の設定：slow）。
10. 遠心終了後チューブを回収し上清を取り除く。
11. ペレットをタッピングで崩し、4 mL の単核球培養培地を加え、そのままピペッティング（6回）で懸濁する。
12. 24-well plate の中央の 4 wells に 1 mL ずつ分注する。
13. 使わない well には蒸留水または PBS(-)を 1 mL ずつ入れ蒸発を防止する。
14. インキュベーター（37°C、CO<sub>2</sub> 5%）で 7 日間培養する。

iPS 細胞の樹立：遺伝子導入～培地交換

**【準備するもの】**

細胞：培養した血球細胞

試薬：エピソードプラスミドセット（pCXLE セットまたは pCE セット）

P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L（キュベット、P3 溶液、サプリメント溶液含む、Lonza、V4XP-3012）

単核球培養培地（StemFit without C+サイトカイン）

iMatrix-511（Laminin-511 E8）（ニッピ、892001/892002）

維持培養培地 StemFit（味の素）

カウンテス自動セルカウンター付属トリパンプルー溶液（ライフテクノロジーズ、T10282）

物品：6-well プレート

15/50 mL コニカルチューブ

セルスクレーパー

ピペット

カウンテス自動セルカウンター（ライフテクノロジーズ、C10227）

カウンテス自動セルカウンター付属スライド（ライフテクノロジーズ、C10228）

Nucleofector 4D Core unit（Lonza、AAF-1001B）

Nucleofector 4D X unit（Lonza、AAF-1001X）

**【手順】**

**（1）遺伝子導入試薬の準備（pCXLE セット）**

1. プラスミド溶液（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1）を以下のように混合する。

• pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (1 mg/mL)	2.76 $\mu$ L
• pCXLE-hSK (1 mg/mL)	2.76 $\mu$ L
• pCXLE-hUL (1 mg/mL)	2.76 $\mu$ L
• pCXWB-EBNA1 (1 mg/mL)	1.72 $\mu$ L

2. 以下のように遺伝子導入試薬を調製する。

• P3 溶液	164 $\mu$ L
• サプリメント溶液	36 $\mu$ L
• pCXLE プラスミド溶液	10 $\mu$ L

**(2) 遺伝子導入試薬の準備 (pCE セット)**

3. プラスミド溶液 (pCE-hOCT3/4、pCE-mp53DD、pCE-hSK、pCE-hUL、pCXB-EBNA1) を以下のように混合する。

• pCE-hOCT3/4 (1 mg/mL)	2.1 $\mu$ L
• pCE-mp53DD (1 mg/mL)	2.1 $\mu$ L
• pCE-hSK (1 mg/mL)	2.1 $\mu$ L
• pCE-hUL (1 mg/mL)	2.1 $\mu$ L
• pCXB-EBNA1 (1 mg/mL)	1.6 $\mu$ L

4. 以下のように遺伝子導入試薬を調製する。

• P3 溶液	164 $\mu$ L
• サプリメント溶液	36 $\mu$ L
• pCXLE プラスミド溶液	10 $\mu$ L

**(3) プレートのコーティング**

1. 6-well プレートに PBS (-) を 1.5 mL/well 入れる。
2. Laminin-511 E8 (コート量 : 0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) を 4.8  $\mu$ g/well 加えすぐによく混ぜる。
3. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
4. 60 min 後インキュベーターから取り出す。
5. StemFit without C 培地を 0.75 mL/well ずつ加え良くなじませる。
6. 上清を除去する。
7. 単核球培養培地を 1.5 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

**(4) 遺伝子導入**

1. 1 mL の単核球培養培地を 1.5 mL チューブに分注しインキュベーター (37°C、CO<sub>2</sub> 5%) に入れて加温しておく。
2. Nucleofector 4D の電源を ON にし、セルフチェックが異常なく完了したことを確認する。
3. X ユニットを選択し、100  $\mu$ L キュベットでの遺伝子導入モードを選択する。
4. 2つの 100  $\mu$ L キュベットの遺伝子導入プログラムを EO-117 に設定する。
5. 単核球を増殖培養させたプレートをインキュベーターから取り出す。
6. すべての well の細胞を 1本の 15 mL チューブに回収する。
7. 細胞懸濁液をトリパンブルー染色し、Countess で生細胞数をカウントする。
8. 2本の新しい 15 mL チューブを準備し、2.5 x 10<sup>6</sup> cells の生細胞をそれぞれのチューブに取り分ける。
9. 200 x g、18°C、10 min で遠心する。

10. 遠心中にラミニンコーティングプレートと加温してあった単核球増殖培養用培地をインキュベーターから取り出す。
11. 遠心終了後チューブを回収しすべてのチューブの上清をできる限り取り除く。
12. ペレットをタッピングで崩し、15 mL チューブ 1 本当たり手順 1 または 2 で調製した遺伝子導入試薬 100  $\mu$ L で細胞を懸濁し、専用キュベットに空気が入らないように入れる。
13. もう 1 本の 15 mL チューブも同様の作業を行う。
14. 2 つのキュベットを Nucleofector 4D にセットし、プログラムをスタートさせる。
15. Nucleofector 4D による遺伝子導入に問題がなかったこと（緑色の十字マークの点灯）を確認後、キュベットを回収し、加温してあった単核球培養培地 450  $\mu$ L をそれぞれのキュベットに加える（赤い横線の点灯のエラーが出た場合はエラー番号を確認する）。
16. 2 つのキュベットに入っている遺伝子導入後の細胞を専用のスポイトで回収し、1 本の 1.5 mL チューブに回収する。
17. 細胞懸濁液を 35  $\mu$ L ずつ各 well に添加する。
18. 細胞が均一になるようにプレートを揺らしインキュベーターに入れて培養を開始する。

#### （5）培地添加

1. 遺伝子導入した細胞を播種後 3,5,7 日目に各 well に 1 mL の StemFit を加える。

#### （6）培地交換

1. 遺伝子導入した細胞を播種後 9 日目に各 well あたり 2 mL の StemFit で培地交換を行う。
2. 以降、2 日おきに培地交換を行い、iPS 細胞のコロニーが 1 mm を超える程度まで続ける。



## コロニーピックアップ

### 【準備するもの】

細胞：誘導した iPS 細胞コロニー

試薬：iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)

10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)

PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)

TrypLE Select (ライフテクノロジーズ、A12859-01)

維持培養培地 StemFit (味の素)

T10282)

物品：12-well プレート

15/50 mL コニカルチューブ

ピペット

### 【手順】

#### (1) 培地の準備

必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10 mM Y-27632 を加えてよく混合しておく (最終濃度 10  $\mu$ M) (=StemFit+Y)。

#### (2) プレートのコーティング

1. 12-well プレートに PBS (-) を 0.6 mL/well 入れる。
2. Laminin-511 E8 (コート量：0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) を 1.9  $\mu$ g/well 加えすぐによく混ぜる。
3. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
4. 60 min 後インキュベーターから取り出す。
5. 維持培養培地を 0.3 mL/well ずつ加え良くなじませる。
6. 上清を除去する。
7. 維持培養培地 (StemFit+Y) を 0.6 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

#### (3) コロニーピックアップ

1. カメラ付き実体顕微鏡システムなどコロニーピックアップに使う機器を準備する。
2. コロニーを拾う well の培地を新しい培地に交換する。
3. モニタでコロニーを見ながら P10 ピペットマン (10  $\mu$ L チップ、目盛りを 10  $\mu$ L に合わせておく) でコロニーをピックアップし、96-well プレートに入れる。
4. 手順 3 を繰り返し 20~30 個のコロニーをピックアップする。
5. コロニーの入った各 well に 10  $\mu$ L の TrypLE Select を加える。

6. インキュベーター（37°C、CO<sub>2</sub> 5%）に入れて 10 分間反応させる（開始から 3、6、10 分過ぎた時にプレートを軽く振って溶液中のコロニーを動かす）。
  7. インキュベーターから取り出し、それぞれの well に 180 μL の StemFit+Y 培地を加える。
  8. 各 well のコロニーを P200 ピペットマン（目盛りを 180 μL に合わせておく）で強めに 10 回ピペッティングしてバラバラにする。
  9. 1 本のチューブ内のすべての細胞懸濁液をラミネンコーティングした 12-well plate の 1 well に播種する。
  10. 細胞が均一になるように速やかにプレートを揺らす。
  11. すべてのコロニーについて手順 9～10 を行う。
  12. インキュベーター（37°C、CO<sub>2</sub> 5%）に入れて培養する。
- \* コロニーの周辺部や中心部が分化している場合は取り除いてから未分化状態と思われる部分をピックアップする。

iPS 細胞の継代 (6-well から 6-well へ)

【準備するもの】

- 細胞： 80%コンフルエントのヒト iPS 細胞
- 試薬： iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)  
10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)  
PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)  
0.5X TrypLE Select (ライフテクノロジーズ、A12859-01) (0.5 mM EDTA/PBS  
で 1/2 希釈→ 最終濃度 0.75 mM EDTA、参考資料あり)  
維持培養培地 StemFit (味の素)  
カウンテス自動セルカウンター付属トリパンブルー溶液 (ライフテクノロジーズ、  
T10282)
- 物品： 6-well プレート  
15/50 mL コニカルチューブ  
セルスクレーパー  
ピペット  
カウンテス自動セルカウンター (ライフテクノロジーズ、C10227)  
カウンテス自動セルカウンター付属スライド (ライフテクノロジーズ、C10228)

【手順】

(1) 培地の準備

必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10 mM Y-27632 を加えてよく混合しておく (最終濃度 10  $\mu$ M) (=StemFit+Y)。

(2) プレートのコーティング

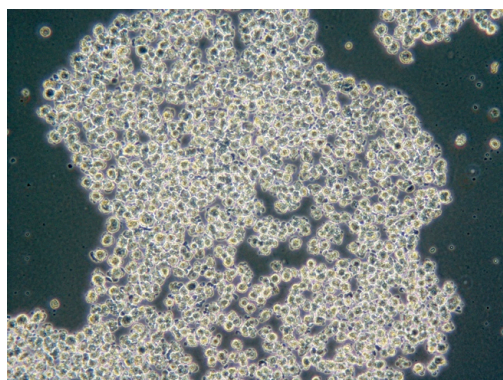
1. 6-well プレートに PBS (-) を 1.5 mL/well 入れる。
2. Laminin-511 E8 (コート量 : 0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) を 4.8  $\mu$ g/well 加えすぐによく混ぜる。
3. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
4. 60 min 後インキュベーターから取り出す。
5. 維持培養培地を 0.75 mL/well ずつ加え良くなじませる。
6. 上清を除去する。
7. StemFit+Y 培地を 1.5 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

(3) 継代

1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し、写真撮影を行い継代に使用する (死細胞が多く細胞が観察しにくい場合には、新しい培地に交換して写真撮影を行う。PBS では細胞が剥がれる

可能性があるので培地の方が好ましい)

2. 培地を除去する。
3. PBS 1 mL を加えて洗浄し、PBS を除去する。
4. 0.5X TrypLE Select を 300  $\mu$ L/well ずつ加えよくなじませる。
5. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで 1 min 反応させる。
6. 1 min 後インキュベーターから取り出し、再び well 全体によく行き渡らせる。
7. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターでさらに 3 min 反応させる ((3)-5 でインキュベーターに入れてから合計 4 min)。
8. インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する(細胞間接着が破壊され細胞1個1個が丸くなっている様子を確認する。4 min の処理時間では細胞基質間接着は剥がれないため plate に接着したままである。写真の通り。)
9. 0.5X TrypLE Select を除去する。
10. 2 mL/well の PBS(-)で洗浄し、PBS(-)を除去する(細胞が剥がれやすいので静かに加える)。
11. 維持培養培地を 1 mL/well 加える。
12. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
13. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
14. 10 回ピペッティングを行い新しいチューブに回収する(培地を加えて総量を 1.5 mL にする(総量は適宜変更可能)) \*ピペッティングが弱すぎるとシングルセルになりきらない場合もあるので注意。強めでも問題ないが、チップなどの先端を plate の底面に押し付けないようにする。
15. トリパンブルー染色を行いカウンテス自動セルカウンターにてセルカウントを行う(カウンテスの設定: Sensitivity: 5, Min size: 8, Max size: 30, Circularity: 75)。
16. 13,000 個の生細胞を laminin コーティングした 6-well プレート 1 well に播種する(細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる)。
17. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
18. 翌日、Y-27632 の入っていない維持培養培地に交換する。



\* 培地交換は継代翌日、その後 1 日おきに行い、継代後 7、8 日目頃から毎日交換する(培地の色が 1 日でオレンジ~黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする)。細胞の継代は 8 日±1 日をメドに行う。

(4) 細胞継代後の培地交換

【準備するもの】

- 細胞：細胞を播種した 6-well plate
- 試薬：維持培養培地 StemFit (味の素)
- 物品：ピペット

【手順】

1. 培地を室温に戻しておく。
  2. 位相差顕微鏡で観察し、写真を撮る。
  3. 培養培地を除去する。
  4. 維持培養培地を 1.5 mL/well 加える。
  5. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
- \* 培地交換は継代翌日、その後 1 日おきに行い、継代後 7、8 日目頃から毎日交換する (培地の色が 1 日でオレンジ~黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする)。

## iPS 細胞の凍結

## 【準備するもの】

**細胞**：80%コンフルエントのヒト iPS 細胞

**試薬**：STEM-CELLBANKER（日本全薬工業、CB041/043）

PBS(-)（ナカライテスク、14249-24）

維持培養培地 StemFit（味の素）

0.5X TrypLE Select (0.5 mM EDTA/PBS(-) 最終濃度 0.75 mM)

カウンテス自動セルカウンター付属トリパンブルー溶液（ライフテクノロジーズ、T10282）

**物品**：クライオチューブ（2.0 mL）

セルスクレーパー

ピペット

カウンテス自動セルカウンター（ライフテクノロジーズ、C10227）

カウンテス自動セルカウンター付属スライド（ライフテクノロジーズ、C10228）

プログラムフリーザーPDF-150/250（ストレックス）（バイセル（日本フリーザー、BICELL）、ミスターフロスティ（サーモ、51000001）でも可）

## 【手順】（6-well の場合）

1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し写真撮影を行う（死細胞が多く細胞が観察しにくい場合には、新しい培地に交換して写真撮影を行う。PBS(-)では細胞が剥がれる可能性があるので培地の方が好ましい）。
2. 培地を除去する。
3. PBS(-) 1 mL を加えて洗浄し、PBS(-)を除去する。
4. 0.5X TrypLE Select を 300  $\mu$ L/well ずつ加えよくなじませる。
5. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで 1 min 反応させる。
6. 1 min 後インキュベーターから取り出し、再び well 全体によく行き渡らせる。
7. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターでさらに 3 min 反応させる（合計 4 min）。
8. インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する。
9. 0.5X TrypLE Select を除去する。
10. 2 mL/well の PBS(-)で wash する。
11. 維持培養培地を 1 mL/well 加える。
12. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
13. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
14. 10 回ピペッティングを行う。
15. トリパンブルー染色を行いカウンテス自動セルカウンターにてセルカウントを行う

(Sensitivity: 5, Min size: 8, Max size: 30, Circularity: 75)。

16. 必要細胞懸濁液量（ロスが多いため作製ストック数+ $\alpha$ 分の細胞をチューブに分注してその後の操作を行う）をチューブに移し、800 rpm, 22°C, 5 min 遠心を行う。
17. 上清を除き、ペレットをタッピングで崩す。
18.  $1 \times 10^6$  cells/mL となるように STEM-CELLBANKER で懸濁する。
19. 200  $\mu$ L (=  $2 \times 10^5$  cells)を 1 本のクライオチューブに分注する。
20. プログラムフリーザー (-1°C/min) にて凍結を行う（またはバイセルなどに入れて-80°C、3 時間以上）。
21. 数日中に液体窒素に移して保存する。

## 凍結ストックの解凍

### 【準備するもの】

細胞：iPS 細胞の凍結バイアル

試薬：iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)

10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)

PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)

維持培養培地 StemFit (味の素)

カウンテス自動セルカウンター付属トリパンプブルー溶液 (ライフテクノロジーズ、T10282)

物品：6-well プレート

15/50 mL コニカルチューブ

ピペット

カウンテス自動セルカウンター (ライフテクノロジーズ、C10227)

カウンテス自動セルカウンター付属スライド (ライフテクノロジーズ、C10228)

### 【手順】

#### (1) 培地の準備

必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10 mM Y-27632 を加えておく (最終濃度 10  $\mu$ M)。

#### (2) プレートのコーティング

1. 6-well プレートに PBS(-) を 1.5 mL/well 入れる。
2. iMatrix-511 (コート量：0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) を 4.8  $\mu$ g/well 加えすぐによく混ぜる。
3. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
4. 60 min 後インキュベーターから取り出す。
5. 維持培養培地を 0.75 mL/well 加え培地を良くなじませる。
6. 上清を除去する。
7. 維持培養培地 (Y-27632 入り) を 1.5 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

#### (3) 融解

1. ウォーターバスを 37°C に温めておき、培地を室温に戻しておく。
2. 15/50 mL コニカルチューブに 5 mL の維持培養培地を入れる。
3. 液体窒素タンクから iPS 細胞の凍結バイアルを取り出し、ウォーターバスで素早く解凍する。(細胞の塊が少し残っている程度の状態で)。



4. ステップ 3 の細胞懸濁液を 15/50 mL コニカルチューブに移す（ピペッティングは 1, 2 回程度）。
5. 800 rpm (160 x g)、22°C、5 min で遠心する。
6. 上清を取り除く。
7. ペレットをタッピングで崩し、0.5 mL の維持培養培地を加える。
8. トリパンブルー染色を行いカウンテス自動セルカウンターにてセルカウントを行う（Sensitivity: 5, Min size: 8, Max size: 30, Circularity: 75）。
9. Laminin コーティングした 6-well プレート 1 well に 65,000 個の生細胞を播種する。
10. 細胞が均一になるようにプレートを揺らす（細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる）。
11. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで培養する。
12. 翌日、Y-27632 を加えていない維持培養培地に交換する。

\* 培地交換は融解翌日、その後 1 日おきに行う（交換翌日の培地の色がオレンジ～黄色になり死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする）。

(4) 細胞融解後の培地交換 【融解後 1 日目】

**\* 培地から Y-27632 を除くため翌日に必ず培地交換を行う**

【準備するもの】

- 細胞：細胞を播種した 6-well plate
- 試薬：維持培養培地 StemFit (味の素)
- 物品：ピペット

【手順】

1. 培地を室温に戻しておく。
  2. 位相差顕微鏡で観察し、写真を撮る。
  3. 培養培地を除去する。
  4. 維持培養培地を 1.5 mL/well 加える。
  5. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
- \* 培地交換は融解翌日、その後 1 日おきに行う。(培地の色が 1 日でオレンジ～黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする)。

## On-feeder iPS 細胞を feeder-free 条件にて継代する方法

### 【準備するもの】

- 細胞： 80%コンフルエントの on-feeder ヒト iPS 細胞
- 試薬： iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)
- 10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)
- PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)
- 0.5X TrypLE Select (ライフテクノロジーズ、A12859-01) (0.5 mM EDTA/PBS  
で 1/2 希釈→ 最終濃度 0.75 mM EDTA)
- CTK 溶液
- 維持培養培地 StemFit (味の素)
- カウンテス自動セルカウンター付属トリパンブルー溶液 (ライフテクノロジーズ、  
T10282)
- 物品： 6-well プレート
- 15/50 mL コニカルチューブ
- セルスクレーパー
- ピペット
- カウンテス自動セルカウンター (ライフテクノロジーズ、C10227)
- カウンテス自動セルカウンター付属スライド (ライフテクノロジーズ、C10228)

### 【手順】

#### (1) 培地の準備

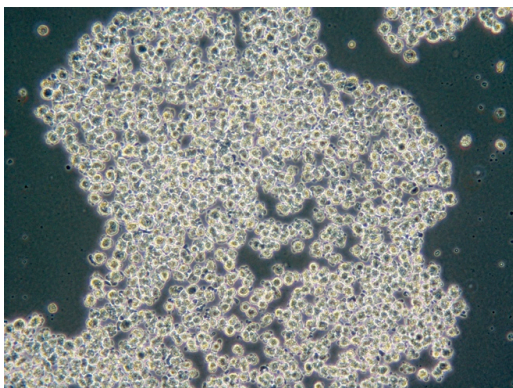
必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10 mM Y-27632 を加えてよく混合しておく (最終濃度 10  $\mu$ M)。

#### (2) プレートのコーティング

1. 6-well プレートに PBS (-) を 1.5 mL/well 入れる。
2. Laminin-511 E8 (コート量 : 0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) を 4.8  $\mu$ g/well 加えすぐによく混ぜる。
3. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
4. 60 min 後インキュベーターから取り出す。
5. 維持培養用培地を 0.75 mL/well ずつ加え良くなじませる。
6. 上清を除去する。
7. 維持培養培地 (Y-27632 入り) を 1.5 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

## (3) 継代 (6-well から 6-well の場合)

1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し、写真撮影を行い継代に使用する (死細胞が多く細胞が観察しにくい場合には、新しい培地に交換して写真撮影を行う。ただし PBS では細胞が剥がれる可能性があるため培地の方が好ましい)。
2. 培地を除去する。
3. PBS 1 mL を加えて洗浄し、PBS を除去する。
4. CTK 溶液を 600  $\mu$ L/well ずつ加えよくなじませる。
5. 室温で 1-2 min 反応させ feeder 細胞を plate から剥がす。
6. PBS 1 mL を加えて洗浄し、PBS を除去する。
7. 0.5X TrypLE Select を 300  $\mu$ L/well ずつ加えよくなじませる。
8. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターでさらに 1 min 反応させる。
9. Plate を揺すって 0.5X TrypLE Select を well 全体に行き渡らせる。
10. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターでさらに反応させる (合計 4 min)。
11. インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する (細胞間接着が破壊され細胞 1 個 1 個が丸くなっている様子を確認する。4 min の処理時間では細胞基質間接着は剥がれないため plate に接着したままである。下の写真の通り)。



12. 0.5X TrypLE Select を除去する (この時点で細胞が剥がれていることが多いのでその場合は 22 に進む)。
13. 2 mL/well の PBS(-) で洗浄し、PBS(-) を除去する (細胞が剥がれやすいので静かに加える)。
14. 維持培養培地を 1 mL/well 加える。
15. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
16. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
17. 10 回ピペティングを行い新しいチューブに回収する (培地を加えて総量を 1.5 mL にする (総量は適宜変更可能))。
18. トリパンプルー染色を行いカウンス自動セルカウンターにてセルカウントを行う (Sensitivity: 5, Min size: 8, Max size: 30, Circularity: 75)。
19. 13,000 個の生細胞を laminin コーティングした 6-well プレート 1 well に播種する (細

胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる)。

20. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
21. 翌日、Y-27632 の入っていない維持培養培地に交換する。

【途中で細胞が剥がれてしまった場合の続き (12 より)】

22. StemFit を 700 μL 加え (合計 1000 μL)、ピペッティングを 10 回行い細胞をバラバラにする。
23. 800 rpm (160 x g)、22°C、5 min で遠心し、上清を除去してペレットをタッピングで崩す。
24. 維持培養培地を 1 mL/well 加え、6 回ピペッティングを行い細胞をバラバラにする。
25. トリパンブルー染色を行いカウンテス自動セルカウンターにてセルカウントを行う (Sensitivity: 5, Min size: 8, Max size: 30, Circularity: 75)。
26. 13,000 個の生細胞を laminin コーティングした 6-well プレート 1 well に播種する (細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる)。
27. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
28. 翌日、Y-27632 の入っていない維持培養培地に交換する。

- \* 培地交換は継代翌日、その後 1 日おきに行い、継代後 7、8 日目頃から毎日交換する (培地の色が 1 日でオレンジ~黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする)。
- \* 細胞の継代は 8 日 ± 1 日をメドに行う。

参考資料

(1) 維持培養培地 StemFit の調製

【準備するもの】

- 試薬： StemFit 用 A 液 400 mL (4°C 保管)  
StemFit 用 B 液 100 mL (-30°C 保管)  
StemFit 用 C 液 2 mL (-30°C 保管)
- 物品： ピペット

【手順】

1. B 液と C 液を 4°C または室温で溶解する (8 時間以上、o/n)。
2. 溶解した B 液 100 mL を A 液に添加する。
3. 溶解した C 液 2 mL を A 液に添加する。
4. 蓋をしっかりと閉めてよく混ぜる。
5. 50 mL チューブに 45 mL ずつ分注する。
6. -80°C フリーザーで保管する。

- \* StemFit without C 培地の作製には手順 3 を飛ばす。
- \* 使用期限は-80°C で 6 ヶ月、**4°C 保管で 2 週間**とする。
- \* 分注量は適宜変更可能。
- \* 使用時は室温か 4°C で溶かす (37°C での加温は行わない)。

(2) 0.5X TrypLE Select 溶液の調製

【準備するもの】

- 試薬： TrypLE Select (ライフテクノロジーズ、A12859-01)  
0.5 M EDTA 溶液 (ナカライテスク、689414)  
PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)
- 物品： ピペット  
250 mL フィルターシステム (0.2 um filter)

【手順】

1. PBS(-) 250 mL をフィルターシステムに分取する。
2. 250  $\mu$ L の 0.5 M EDTA 溶液を加える。
3. バキュームを引き吸引ろ過滅菌を行う (=0.5 mM EDTA/PBS(-)溶液)。
4. 15 mL チューブに 7 mL の 0.5 mM EDTA/PBS(-) を分取する。
5. 同じチューブに 7 mL の TrypLE Select を分取する。
6. 蓋を閉めてよく混ぜる。

\* 使用期限は室温保管で 4 週間とする。

## (3) 培養スケールに応じた試薬量一覧

**ラミネンコーティング**

12-well	6-well	60-mm	100-mm	
3.8	9.6	21.29	58.95	cm <sup>2</sup>
1.9	4.8	10.6	29.5	µg

コーティング濃度 : 0.5 µg/cm<sup>2</sup>

複数 well/dish をまとめてコーティングする場合はマスターミックスとしてまとめてラミネン溶液を調整し、それを分注することも可能。

**0.5X TrypLE Select**

12-well	6-well	60-mm	100-mm	
200	300	600	1,800	µL

**iPSCs の播種細胞数**

12-well	6-well	60-mm	100-mm	
-	13,000	29,000	80,000	cells

**培地量**

12-well	6-well	60-mm	100-mm	
0.6	1.5	3.0	9.0	mL



## (4) iPS 細胞の樹立 : CytoTune-iPS (センダイウイルス) を使った遺伝子導入

## 【準備するもの】

- 細胞 : 培養した血球細胞 ( $1 \times 10^5$  cells)
- 試薬 : CytoTune-iPS 2.0 (国内 ; MBL、DV-0304A (アカデミア), DV-0304 (営利機関  
1)、海外 ; ライフテクノロジーズ、A16517)
- 単核球培養培地 (StemFit without C+サイトカイン)
- iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)
- StemFit (味の素)
- カウンテス自動セルカウンター付属トリパンブルー溶液 (ライフテクノロジーズ、  
T10282)
- 物品 : 24-well プレート
- 6-well プレート
- 15/50 mL コニカルチューブ
- セルスクレーパー
- ピペット
- カウンテス自動セルカウンター (ライフテクノロジーズ、C10227)
- カウンテス自動セルカウンター付属スライド (ライフテクノロジーズ、C10228)

## 【手順】

## (1) 遺伝子導入試薬の準備

1. センダイウイルス溶液 (CytoTune 2.0 KOS、CytoTune 2.0 hc-Myc、CytoTune 2.0 hKlf4) を以下のように混合する。
  - CytoTune 2.0 KOS                    MOI=5
  - CytoTune 2.0 hc-Myc                MOI=5
  - CytoTune 2.0 hKlf4                 MOI=5

➤ 総容量を単核球培養培地で 1 mL に合わせる。

## (2) 遺伝子導入

1. 単核球を増殖培養させたプレートをインキュベーターから取り出す。
2. すべての well の細胞を 1 本の 15 mL チューブに回収する。
3. 細胞懸濁液をトリパンブルー染色し、Countess で生細胞数をカウントする。
4.  $1.0 \times 10^5$  cells の生細胞をチューブに取り分ける。
5. 200 x g、18°C、10 min で遠心する。
6. 遠心終了後チューブを回収しすべてのチューブの上清を限り取り除く。
7. ペレットをタッピングで崩し、準備しておいた遺伝子導入試薬 1 mL で再懸濁する。

- 24-well plate の中央の well に移し入れる。
- 使わない well には蒸留水を 1 mL ずつ入れて蒸発を防止する。
- インキュベーター (37°C、CO<sub>2</sub> 5%) で 24 時間培養する。

(3) プレートのコーティング (遺伝子導入の翌日)

- 6-well プレートに PBS (-) を 1.5 mL/well 入れる。
- Laminin-511 E8 (コート量 : 0.5 µg/cm<sup>2</sup>) を 4.8 µg/well 加えすぐによく混ぜる。
- 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 60 min 以上反応させる。
- 60 min 後インキュベーターから取り出す。
- StemFit without C 培地を 0.75 mL/well ずつ加え良くなじませる。
- 上清を除去する。
- 単核球培養培地を 1.5 mL/well 加えインキュベーターに入れておく。

(4) 遺伝子導入した細胞のプレーティング

- 遺伝子導入した細胞の入ったプレートをインキュベーターから取り出し、細胞をチューブに回収する。
- 細胞懸濁液を 35 µL ずつ各 well に添加する。
- 細胞が均一になるようにプレートを揺らしインキュベーターに入れて培養を開始する。

\* 以降の培地添加、培地交換、コロニーピックアップなどの操作はプラスミドを用いた場合と同じ。

その他情報：

作成：

京都大学 iPS 細胞研究所 初期化機構研究部門

講師 中川 誠人 (nakagawa-g@cira.kyoto-u.ac.jp)

参考文献：

A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells

M. Nakagawa et al., *Scientific Reports*, 4:3594 (2014) DOI: 10.1038/srep03594

An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells

K. Okita et al., *Stem Cells*, 31(3):458-66 (2013) DOI: 10.1002/stem.1293