

# 肝細胞分化プロトコル

ver.1.0

(2023.5.8)

## iPS 細胞の培養

1. 6-well plate を Matrigel (20  $\mu$ L/well) でコーティングする。
2. Matrigel コーティングした 6-well plate に  $2.5 \times 10^5$  cells/well の播種生細胞数で iPS 細胞を播種する。
3. CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) で培養する。
4. 翌日から StemFit AK02 で毎日培地交換を行う。
5. 80%コンフルの状態になったら、以降の手順に進む。

## 培地交換（0-3 日目）

1. Well 内のコロニーが 80%コンフルの状態になったことを確認し、Day0 とする。
2. 1 mL/well の Stage1 medium で培地交換する。
3. CO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）で培養する。
4. 以降 24 時間±1~2 時間で毎日培地交換する。

### 培地交換（4～8日目）

1. 1 mL/well の Stage2 medium で培地交換する。
2. CO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）で培養する。
3. 以降 24 時間±1～2 時間で毎日培地交換する。

### 培地交換（9～13 日目）

1. 1 mL/well の Stage3 medium で培地交換する。
2. CO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）で培養する。
3. 以降毎日培地交換する。

### 培地交換（14～24 日目）

1. 1 mL/well の Stage4 medium で培地交換する。
2. CO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）で培養する。
3. 以降 2-3 日おきに培地交換する。

## 測定用サンプルの回収（25日目）と評価

1. 培地交換後 24 時間の培地上清を回収し、ELISA 法で ALB 量を測定する。
2. 培地上清除去後の well に 5N NaOH 1mL/well 添加し、r.t, over night で溶解する。
3. 2-3 回ピペティングし、サンプルが溶解していることを確認後、回収する。
4. 1N HCl で中和し、タンパク定量サンプルを調製。BCA Protein Assay Kit でタンパク定量をする。

## ELISA 法による ALB 量測定

1. 検量線のための試薬を調製する。

standard	ng/ml	RS10-110-3 (25mg/ml Albumin)	sample Diluent
Initial	10,000	5ul	12.5ml
1	400	100ul from initial	2.4ml
2	200	500ul from std 1	500 ul
3	100	500ul from std 2	500 ul
4	50	500ul from std 3	500 ul
5	25	500ul from std 4	500 ul
6	12.5	500ul from std 5	500 ul
7	6.25	500ul from std 6	500 ul
8	0	blank	500 ul

2. 測定サンプルは培地上清を Sample buffer で適量(10~40 倍)に希釈する。
3. 96-well plate に Coating 液 100  $\mu$ L/well 添加し、室温、遮光で 1 時間静置する。
4. Wash buffer 150  $\mu$ L/well で 2 回洗浄する。
5. Post Coat Solution 200  $\mu$ L/well 添加し、室温、遮光で 30 分静置
6. Wash buffer 150  $\mu$ L/well で 2 回洗浄する。
7. サンプルを 100  $\mu$ L/well でアプライし、室温、遮光で 1 時間静置する。
8. Wash buffer 150  $\mu$ L/well で 2 回洗浄する。
9. 2<sup>nd</sup> Ab を 100  $\mu$ L/well でアプライし、室温、遮光で 1 時間静置する。
10. Wash buffer 150  $\mu$ L/well で 2 回洗浄する。
11. TMB 混合液を 95  $\mu$ L/well でアプライし、室温、遮光で 5 分間静置する。
12. Stop Solution 100  $\mu$ L/well 添加し、測定する。(ABS,450nm)



## BCA 法による総タンパク定量

1. 検量線のための試薬を調製する。

Standard	μg/mL		Sample Dilution
1	2000	500 μL from stock	-
2	1500	375 μL from stock	125 μL
3	1000	200 μL from stock	200 μL
4	750	200 μL from 2	200 μL
5	500	200 μL from 3	200 μL
6	250	200 μL from 5	200 μL
7	125	200 μL from 6	200 μL
8	0	Blank	200 μL

2. 96-well plate に CRS 10 μL/well 添加する。
3. 測定サンプル 10 μL/well 添加し、37℃、15 分間静置する。
4. BCA Working reagent 180 μL/well 添加し、37℃、30 分間静置する。
5. 室温にもどして、測定する。(ABS,562nm)

## 試薬と調整方法

試薬については SDS（安全性データシート）を入手し、試薬の取扱い方法を理解し使用する。

### 試薬一覧表

試薬名	メーカー	型番
RPMI1640 with L-Gln	Sigma	R8758
HCM	Lonza	CC-3198
GlutaMax	Thermo	35050061
B27 vitaminA free	Invitrogen	12587-010
Matrigel	BD	354230
Activin A	R&D	338-AC
BMP4	R&D	314-BP
FGF4	R&D	235-F4
HGF	R&D	294-HG
OsM	R&D	295-OM
NaOH	Nacalai tesque	95539-85
HCl	Nacalai tesque	18320-15
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Nacalai tesque	35401-25
NaCl	Nacalai tesque	31319-45
Tween20	Nacalai tesque	355624-02
BSA	Nacalai tesque	01859-76
NaHCO <sub>3</sub>	Nacalai tesque	31212-25
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Nacalai tesque	32519-95
Anti-Human Albumin Antibody	Thermo	A80-129A
HRP	Thermo	A80-129P
Substrate Reagent Pack	R&D	DY999

### Activin A

1. Activin A 粉末を 4mM HCl 1mg/mL BSA in PBS で 10 $\mu$ g /mL となるように調製する。

#### BMP4

1. BMP4 粉末を 4mM HCl 1mg/mL BSA in PBS で 10 $\mu$ g /mL となるように調製する。

#### FGF4

1. FGF4 粉末を 1mg/mL BSA in PBS で 10 $\mu$ g /mL となるように調製する。

#### HGF

1. HGF 粉末を 1mg/mL BSA in PBS で 10 $\mu$ g /mL となるように調製する。

#### OsM

1. OsM 粉末を 1mg/mL BSA in PBS で 10 $\mu$ g /mL となるように調製する。

#### HCM-EGF

1. HCM の kit に入っている HEGF 以外を全て混合する。

Stage1 medium	約 10 mL
RPMI1640	9.7 mL
GlutaMax	100 $\mu$ L
B27 supplement	100 $\mu$ L
Activin A	100 $\mu$ L

Stage2 medium	約 10 mL
RPMI1640	9.76 mL
GlutaMax	100 $\mu$ L
B27 supplement	100 $\mu$ L
BMP4	20 $\mu$ L
FGF4	20 $\mu$ L

Stage3 medium	約 10 mL
RPMI1640	9.78 mL
GlutaMax	100 $\mu$ L
B27 supplement	100 $\mu$ L
HGF	20 $\mu$ L

Stage4 medium	約 10 mL
HCM-EGF	9.88 mL
GlutaMax	100 $\mu$ L
OsM	20 $\mu$ L

Coating buffer	約 250 mL
NaHCO <sub>3</sub>	1.05 g
ミリQ	250 mL

※pH 9.6 に調整する。

Coating 液 (1st Ab)	約 10 mL
--------------------	---------

Anti-Human Albumin Antibody	100 $\mu$ L
-----------------------------	-------------

Coating buffer	10mL
----------------	------

Wash buffer	約 500 mL
-------------	----------

Tris	3.02 g
------	--------

NaCl	4.1 g
------	-------

Tween20	250 $\mu$ L
---------	-------------

≡J Q	500 mL
------	--------

Sample buffer	約 500 mL
---------------	----------

Tris	3.03 g
------	--------

NaCl	4.1 g
------	-------

Tween20	250 $\mu$ L
---------	-------------

BSA	5.01 g
-----	--------

≡J Q	500 mL
------	--------

Blocking buffer	約 500 mL
-----------------	----------

Tris	3.02 g
------	--------

NaCl	4.1 g
------	-------

BSA	5 g
-----	-----

≡J Q	500 mL
------	--------

HRP 混合液	約 1 mL
HRP	4 $\mu$ L
Sample buffer	1 mL

2nd Ab	約 10 mL
HRP 混合液	100 $\mu$ L
Sample buffer	10mL

#### TMB 混合液

1. Substrate Reagent Pack の COLOR REAGENT A と COLOR REAGENT B を等量で混合する。

Stop Solution	約 200 mL
H2SO4	1.97 mL
メソ Q	200 mL

## 参考文献

本プロトコルは、京都大学 iPS 細胞研究所 高山和雄先生のご指導に従い、下記論文を参照して作成しました。詳細については、下記をご確認下さい。

Karim Si-Tayeb, Fallon K. Noto, Masato Nagaoka, Jixuan Li, Michele A. Battle,  
Christine Duris, Paula E. North, Stephen Dalton, and Stephen A. Duncan

Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent  
Stem Cells. *Hepatology*. 2010 Jan; 51(1): 297–305.

<https://doi.org/10.1002/hep.23354>