

# 研究用 iPS 細胞の樹立プロトコル

ver.1.3

## 末梢単核球細胞（PBMC）の前培養

1. 凍結末梢血単核球バイアルを恒温槽にて溶解する。
2. 全量を 5 mL StemSpan-AOF にて懸濁し、遠心（440 x g、5 min）。
3. 上清を除去し、1mL 顆粒球系細胞培地にて懸濁してセルカウント。
4.  $3 \times 10^6$  cells/mL 前後となるよう顆粒球系細胞培地にて調整。
5. 24well plate に 1mL/well ずつ播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>にて5日間培養。

## 遺伝子導入

1. 顆粒球系細胞培地 10mL と遺伝子導入試薬を調製しておく。
2. 9mL 顆粒球系細胞培地に iMatrix-511 を  $57.6\mu\text{L}$  加え、6well plate に  $1.5\text{mL}/\text{well}$  ずつ素早く加えて  $37^\circ\text{C}$  で静置。
3. 前培養を行った単核球細胞を回収し、セルカウント。
4. 遠心 ( $440 \times g$ , 5 min) して上清を除去し、調製しておいた遺伝子導入試薬  $100\mu\text{L}$  と混合。
5. 細胞混合液をキュベットに移し、4D-Nucleofector 装置にて遺伝子導入（プログラム：EO-117）。
6. キュベットに  $0.4\text{mL}$  顆粒球系細胞培地を加え、スポイトで穏やかに混ぜる。
7. ステップ 2 で用意した 6well plate に播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  にて培養開始。
8. 遺伝子導入後 1 週間はおおよそ 2 日に 1 回  $1.5\text{mL}$  StemFit を各 well に添加。
9. 遺伝子導入後 8 日目以降はおおよそ 2 日に 1 回、iPS 細胞のコロニーが  $1\text{mm}$  程度になるまで  $1.5\text{mL}$  StemFit にて培地交換。

## iPS 細胞コロニーのピックアップ

1. StemFit に Y-27632 が  $10\mu\text{M}$ 、iMatrix-511 が  $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  となるよう調整し、12well plate に  $0.6\text{mL}/\text{well}$  ずつ 素早く加えて  $37^\circ\text{C}$  で静置。
2. 実体顕微鏡でコロニーを見ながらピペットマンにてピックアップ。
3.  $1.5\text{mL}$  チューブに入れ、ピペッティングにてコロニーを適当な大きさに破碎。
4. ステップ 1 で用意した 12well plate x 1well に全量を播種。
5. コロニーごとにステップ 3~5 までの操作を繰り返し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  にて培養開始。
6. 翌日、StemFit  $0.6\text{mL}/\text{well}$  に置換。
7. 以降、 $80\%$ コンフルエントに達するまで 1 日おきに StemFit にて培地交換。

## iPS 細胞の継代（12well plate から 100mm dish へ）

1. StemFit に Y-27632 が  $10\mu\text{M}$ 、iMatrix-511 が  $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  となるよう調整し、10mL を 100mm dish に素早く加えて  $37^\circ\text{C}$  で静置。
2. 80%コンフルエントに達した細胞の培地を除去し、0.5 mL PBS(-) にて洗浄。
3. 0.3 mL 0.5x TrypLE Select を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間静置。
4. 上清を除去し、0.5 mL PBS(-) を加えてピペッティングにより細胞を回収。
5. セルカウント後、ステップ 1 で用意した 100mm dish に  $1 \times 10^5$  cells を播種し  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  にて培養。
6. 翌日、StemFit 10mL に置換。
7. 以降、80%コンフルエントに達するまで 1 日おきに StemFit にて培地交換。

## iPS 細胞の凍結

1. 80%コンフルエントに達した細胞の培地を除去し、5 mL PBS(-) にて洗浄。
2. 3 mL 0.5x TrypLE Select を加え、37°Cで 10 分間静置。
3. 上清を除去し、3 mL PBS(-) を加えてピペッティングにより細胞をバラバラにして回収。
4. セルカウントし、必要量を分取して遠心 ( 160 x g、5 min ) 。
5. 上清を除去し、STEM-CELLBANKER に  $5 \times 10^5$  cells/300  $\mu$  L/vial となるように懸濁。
6. マイクロチューブへ分注し、凍結保存。

## 試薬調整

### ◆ 顆粒球系細胞培地：要時調整

StemSpan-AOF に下記サイトカインを添加。

SCF (最終濃度 50ng /mL)

TPO (最終濃度 10 ng/mL)

Flt3L (最終濃度 20 ng/mL)

IL-6 (最終濃度 50 ng/mL)

IL-3 (最終濃度 20 ng/mL)

G-CSF (最終濃度 10 ng/mL)

### ◆ pCXLE プラスミド溶液：要時調整

pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (1mg/mL)	1.38 $\mu$ L
pCXLE-hSK (1mg/mL)	1.38 $\mu$ L
pCXLE-hUL (1mg/mL)	1.38 $\mu$ L
pCXWB-EBNA1 (1mg/mL)	0.86 $\mu$ L

### ◆ 遺伝子導入試薬 ( 105 $\mu$ L/ 1donor )：要時調整

P3 Primary Cell Solution	82 $\mu$ L
Supplement1	18 $\mu$ L
pCXLE プラスミド溶液	5 $\mu$ L

◆ 0.5x TrypLE Select

0.5mM EDTA/PBS と TrypLE Select を等量で混合。



## 原材料一覧

StemSpan-AOF (STEMCELL Techno、ST-100-0130)

Recombinant human SCF (富士フイルム和光純薬、197-15511)

Recombinant human TPO (富士フイルム和光純薬、207-17581)

Recombinant human Flt3L (富士フイルム和光純薬、061-05391)

Recombinant human IL-6 (富士フイルム和光純薬、098-06041)

Recombinant human IL-3 (富士フイルム和光純薬、090-05761)

Recombinant human G-CSF (富士フイルム和光純薬、072-06101)

StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ株式会社)

CultureSure Y-27632 (富士フイルム和光純薬、034-24024)

iMatrix-511 (株式会社ニッピ、892012)

PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)

TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific、12563011)

0.5mM EDTA/PBS (ナカライテスク、13567-84)

P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit (Lonza、V4XP-3012)

STEM-CELLBANKER (タカラバイオ、CB061)

エピソーマルプラスミドセット (pCXLE セット)