

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. 3×10^6 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%CO₂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°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 0.4mL 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°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 1.5mL 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 1mm 程度になるまで 1.5mL 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°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°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°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°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 1×10^5 cells を播種し 37°C 、5% 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 5×10^5 cells/300 μ 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 μ L
pCXLE-hSK (1mg/mL)	1.38 μ L
pCXLE-hUL (1mg/mL)	1.38 μ L
pCXWB-EBNA1 (1mg/mL)	0.86 μ L

◆ 遺伝子導入試薬 (105 μ L/ 1donor)：要時調整

P3 Primary Cell Solution	82 μ L
Supplement1	18 μ L
pCXLE プラスミド溶液	5 μ 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)