

製品コード 3673

研究用

Takara

**Human iPS Cell Generation™
Episomal Vector Mix**

説明書

v201509Da

本製品は、核初期化因子 (*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *L-MYC*, *LIN28*) と p53 機能阻害因子 (mouse p53DD: ドミナントネガティブ変異を導入したマウス p53)、エピソームの複製にかかわる *EBNA-1* をコードする核酸などを搭載した複数のエピソーマルベクターの混合物です。染色体外で安定的に自立複製し、かつ短時間で速やかに細胞から脱落する早期自己消失型ベクターであり、従来のレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いた iPS 細胞誘導における染色体への挿入リスクや、ウイルスベクター使用による作業者に対する安全性の問題を克服しています。本製品をヒト末梢血単核球やヒト線維芽細胞に遺伝子導入することにより、高効率にヒト iPS 細胞を誘導することが出来ます。

搭載遺伝子	遺伝子名	GenBank Accession No.
	<i>OCT3/4</i>	NM_002701
	<i>KLF4</i>	NM_004235
	<i>SOX2</i>	NM_003106
	<i>L-MYC</i>	NM_001033081
	<i>LIN28</i>	NM_024674
	mouse p53DD	NM_011640

I. 内容

Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix 105 μ l

【形状】 10 mM Tris-HCl, pH8.0、1 mM EDTA

II. 保存

-20°C

※ 適切に保存し、受け取り後 2 年を目途にご使用ください。

III. キット以外に必要な器具、試薬類 (主なもの)

III-1. 器具・装置

- CO₂ インキュベーター
- クリーンベンチ
- 恒温水槽
- 細胞観察用顕微鏡
- 超低温フリーザー (-80°C)
- 電動ピペッター
- プラスチックピペット
- ピペットマン
- フィルター付滅菌済みチップ
- 細胞培養用容器 (6 well tissue culture plate、100 mm tissue culture plate)
- Nucleofactor II Device (Lonza 社)
- DynaMag-2 Magnet (Life Technologies)

III-2. 試薬類

各プロトコール 共通試薬

- 0.1% ゼラチン水溶液
- Feeder 細胞 (マイトマイシン C 処理を行った MEF、SNL 細胞、STO 細胞など)
- DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- Penicillin/Streptomycin
- 0.25% Trypsin/1 mM EDTA solution
- ヒト iPS 細胞用培地
 - 霊長類 ES/iPS 細胞用培地 Primate ES Cell Medium (Repro CELL, Cat. #RCHEMD001) など
- Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

[ヒト末梢血単核球 (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) からの iPS 細胞樹立の場合]

ヒト末梢血単核球は Ficoll-Paque PREMIUM (GE healthcare、Cat. #17-5442-02) *1 を用いて分離することが可能です。分離した細胞の凍結保存には、細胞凍結保存液 STEM-CELLBANKER (製品コード CB041) を使用することができます。

ヒト末梢血単核球は市販されており、PromoCell 社の Human Mononuclear Cells from Peripheral Blood (hMNC-PB), single donor, ultra-pure (製品コード C-12907) などが利用可能です。

* 1 : Ficoll-Paque PREMIUM に関する詳細は GE healthcare のウェブサイトをご確認ください。

幹細胞／前駆細胞を標的とした iPS 細胞樹立の場合

- StemSpan H3000 (STEMCELL Technologies 社、Cat. #ST-09800)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- IL-3 (Interleukin 3)
- IL-6 (Interleukin 6)
- Flt3 ligand (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)
- SCF (Stem Cell Factor)
- TPO (Thrombopoietin)
- Human CD34⁺ Cell Nucleofactor Kit (Lonza 社、Cat. #VAPA-1003)

T 細胞を標的とした iPS 細胞樹立の場合

- X-VIVO 15 (Lonza 社、Cat. #04-418Q)
- IL-2 (Interleukin 2)
- Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies、Cat. #DB11131)
- Human T cell Nucleofactor Kit (Lonza 社、Cat. #VAPA-1002)

[ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) からの iPS 細胞樹立の場合]

ヒト線維芽細胞は市販されており、PromoCell 社の Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), adult donor (製品コード C-12302) などが利用可能です。

- Human Dermal Fibroblast Nucleofactor Kit (Lonza 社、Cat. #VPD-1001)

注意：ヒト細胞を使用するので、施設での取扱いルールに従い、作業者の安全を考慮した上で実験を行ってください。

III-3. 試薬の調製

各プロトコール共通試薬

- 10% FBS/DMEM 培地
50 ml の FBS、50 U/ml のペニシリン、50 μ g/ml のストレプトマイシンを DMEM 450 ml に添加する。
- ヒト iPS 細胞培養用培地
ヒト iPS 細胞用培地に bFGF を添加して調製する。
※ 培地の取扱説明書に従って調製してください。

幹細胞／前駆細胞を標的とした iPS 細胞樹立の場合

- 幹細胞／前駆細胞用培地 (6 well plate 1 条件での必要量)
 - 表 1 に従い、サイトカイン溶液を作製する。
 1. で作製したサイトカイン溶液を使用し、表 2 に従って前駆細胞用培地を作製する。

表 1

サイトカイン溶液 (終濃度)	サイトカイン	0.1% BSA/PBS
IL-3 溶液 (10 μ g/ml)	0.044 μ g	4.4 μ l
IL-6 溶液 (100 μ g/ml)	0.44 μ g	4.4 μ l
Fit3 Ligand 溶液 (300 μ g/ml)	1.32 μ g	4.4 μ l
SCF 溶液 (300 μ g/ml)	1.32 μ g	4.4 μ l
TPO 溶液 (300 μ g/ml)	1.32 μ g	4.4 μ l

※ 作製後、 -20°C 以下で保存可能です。

表 2

幹細胞／前駆細胞用培地		(Day -6) 必要培地量：2 ml	(Day 0) 必要培地量：2.4 ml
サイトカイン溶液 (終濃度)	IL-3 溶液 (10 μ g/ml)	2 μ l	2.4 μ l
	IL-6 溶液 (100 μ g/ml)	2 μ l	2.4 μ l
	Flit3 Ligand 溶液 (300 μ g/ml)	2 μ l	2.4 μ l
	SCF 溶液 (300 μ g/ml)	2 μ l	2.4 μ l
	TPO 溶液 (300 μ g/ml)	2 μ l	2.4 μ l
培地	StemSpan H3000	2 ml	2.4 ml

T 細胞を標的とした iPS 細胞樹立の場合

- 単核球用培地 (6 well plate 1 条件での必要量)
 - 2.9 ml の X-VIVO 15 に対して、2.9 μ l の IL-2 (10 μ g/ml) を加える。
 - 1.5 ml チューブに 1 ml の X-VIVO 15 (IL-2 不含) 培地を入れる。
 2. のチューブによく混和した Dynabeads を 10 μ l 加える。
 - ボルテックスで 5 秒間懸濁し、蓋についた液を軽くスピンドアウンする。
 - チューブを DynaMag-2 にセットし、1 分間静置する。
 - マグネットに引き付けられたビーズに触れないように培地を吸引除去し、チューブを DynaMag-2 よりはずし、1. の培地に懸濁する。

IV. 実施例

IV-1. ヒト末梢血単核球からの幹細胞／前駆細胞を標的としたiPS細胞の樹立(6 well plateの場合)

(Day -6) 幹細胞／前駆細胞の培養

凍結単核球の解凍

1. 15 ml チューブに幹細胞／前駆細胞用培地を 2 ml 分注し、37°Cの湯浴槽にて加温する。
2. 9 ml の StemSpan H3000 (サイトカイン不含) を 15 ml チューブに分注する。
3. 凍結単核球のバイアルを 37°Cの湯浴槽にて融解する。
4. 少し氷が残るくらいで湯浴槽から引き上げ、2. のチューブに融解後の細胞懸濁液を入れる。
5. $200 \times g$ 、18°Cで 10 分間遠心する。
6. 上清を吸引除去する。
7. 5 ml の StemSpan H3000 (サイトカイン不含) を加えて懸濁する。
8. 細胞数を計測する。
9. 3×10^6 個を 15 ml チューブに分注する。
10. $200 \times g$ 、18°Cで 10 分間遠心する。
11. 上清を吸引除去する。
12. 加温済みの幹細胞／前駆細胞用培地に再懸濁し、6 well plate の 1 well に播種する。
13. インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 6 日間培養する。

※ 培地交換は不要です。

※ 6 日目の培養細胞数は 1×10^6 個程度になります。

(Day -1) Feeder 細胞の準備

1. 6 well tissue culture plate に 0.1% ゼラチン水溶液を添加し、37°Cで 30 分間インキュベートする。
2. 6 well tissue culture plate から 0.1% ゼラチン水溶液を吸引除去する。
3. 2. のゼラチンコート済み 6 well tissue culture plate に、10% FBS/DMEM 培地を用いて Feeder 細胞を 3×10^5 個 /well で播種する。
4. インキュベーター (37°C、5% CO₂) で一晩培養し、細胞を容器底面に接着させる。

(Day 0) エレクトロポレーションによる Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix の導入

1. 15 ml チューブに幹細胞／前駆細胞用培地を 0.9 ml 分注し、37℃の湯浴槽にて加温する。
2. Day -1 で準備した Feeder 細胞より培地を吸引除去し、幹細胞／前駆細胞培地を 1.5 ml 添加する。
3. 培養した幹細胞／前駆細胞を回収し、細胞数を計測する。
4. 15 ml チューブに、3. の細胞を 1×10^6 個分注する。
5. 200 × g、室温で 10 分間遠心する。
この間に、以下のエレクトロポレーション液（幹細胞／前駆細胞用）を作製する。

Human CD34 ⁺ Cell Nucleofactor Solution*2	82 μl
Supplement*2	18 μl
Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix	3.5 μl

6. 遠心終了後、上清を完全に取り除く。
7. エレクトロポレーション液（幹細胞／前駆細胞用）に細胞を懸濁し、キュベット*2に移す。
8. Nucleofector II Device にキュベットを差し込み、プログラム U-008 でエレクトロポレーションを実施する。
9. 1. の幹細胞／前駆細胞用培地に、エレクトロポレーション後の細胞を素早く懸濁する。
10. 2. で準備した Feeder 細胞上に細胞を播種し、インキュベーター（37℃、5% CO₂）で培養する。
※ 細胞は $5 \sim 20 \times 10^4$ 個 /well を目安に播種してください。

*2: Human CD34⁺ Cell Nucleofactor Kit には、Human CD34⁺ Cell Nucleofactor Solution、Supplement、キュベットが含まれています。

(Day 2、4、6) ヒト iPS 細胞培養用培地の追加

ヒト iPS 細胞培養用培地 1.5 ml を静かに添加する。

(Day 8) ヒト iPS 細胞培養用培地での培養

培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞培養用培地 2 ml を添加する。

※ 以降、培地の交換は 2 日に 1 回行う。

※ 培養開始後 20 ~ 30 日目に iPS コロニーが認められる。

IV-2. ヒト末梢血単核球からの T 細胞を標的とした iPS 細胞の樹立 (6 well plate の場合)

(Day -1) Feeder 細胞の準備

1. 6 well tissue culture plate に 0.1% ゼラチン水溶液を添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
2. 6 well tissue culture plate から 0.1% ゼラチン水溶液を吸引除去する。
3. 2. のゼラチンコート済み 6 well tissue culture plate に、10% FBS/DMEM 培地を用いて Feeder 細胞を 3×10^5 個 /well で播種する。
4. インキュベーター (37°C、5% CO₂) で一晩培養し、細胞を容器底面に接着させる。

(Day 0) エレクトロポレーションによる Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix の導入

凍結単核球の解凍

1. 9 ml の X-VIVO 15 (IL-2、CD3/CD28 beads 不含) を 15 ml チューブに分注する。
2. 凍結単核球のバイアルを 37°C の湯浴槽で融解する。
3. 少し氷が残るくらいで湯浴槽から引き上げ、1. の培地に融解済みの細胞懸濁液を加える。
4. 200 × g、18°C で 10 分間遠心する。
5. 上清を吸引除去する。
6. 5 ml の X-VIVO 15 (IL-2、CD3/CD28 beads 不含) に懸濁する。
7. 細胞数を計測する。

エレクトロポレーションによる Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix の導入

1. 15 ml チューブに単核球用培地を 0.9 ml 分注し、37°C の湯浴槽にて加温する。
2. Day -1 で準備した Feeder 細胞より培地を吸引除去し、単核球用培地を 2 ml 添加する。
3. 15 ml チューブに単核球 3×10^6 個を分注する。
4. 200 × g、室温で 10 分間遠心する。

この間にエレクトロポレーション液 (T 細胞用) を作製する。

Human T cell Nucleofactor solution *3	82 μl
Supplement *3	18 μl
Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix	3.5 μl

5. 遠心終了後、上清を完全に取り除く。
6. 3. のエレクトロポレーション液 (T 細胞用) に細胞を懸濁して、キュベット *3 に移す。
7. Nucleofactor II Device にキュベットを差し込み、プログラム V-024 にてエレクトロポレーションを実施する。
8. 1. の単核球用培地に、エレクトロポレーション後の細胞を素早く懸濁する。
9. 2. で準備した Feeder 細胞上に細胞を播種し、インキュベーター (37°C、5% CO₂) で培養する。

※ 1 ~ 30 × 10⁴ 個 /well を目安に播種してください。

*3: Human T cell Nucleofactor Kit には、Human T cell Nucleofactor solution、Supplement、キュベットが含まれています。

(Day 2、4、6) ヒト iPS 細胞培養用培地の追加

ヒト iPS 細胞培養用培地 1.5 ml を静かに添加する。

(Day 8) ヒト iPS 細胞培養用培地への交換

培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞培養用培地 2 ml を添加する。

※ 以降、培地の交換は 2 日に 1 回行う。

※ 培養開始後 20 ~ 30 日目に iPS コロニーが認められる。

IV-3. ヒト線維芽細胞を標的とした iPS 細胞の樹立 (6 well plate の場合)

(~ Day -2) 線維芽細胞の拡大培養

1. 9 ml の 10% FBS/DMEM 培地を 15 ml チューブに分注する。
2. 凍結線維芽細胞のバイアルを 37°C の湯浴槽にて融解する。
3. 少し氷が残るくらいで湯浴槽から引き上げ、1. の培地に融解後の細胞懸濁液を加える。
4. 200 × g、18°C で 10 分間遠心する。
5. 100 mm tissue culture plate に播種し、拡大培養を行う。
※細胞の取扱説明書に従って培養してください。
※ 100 mm tissue culture plate 1 枚から 1 ~ 2 × 10⁶ 個程度回収できます。

(Day 0) エレクトロポレーションによる Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix の導入

1. 15 ml チューブに 10% FBS/DMEM 培地を 3 ml 分注し、湯浴槽にて 37°C で加温する。
2. 80 ~ 90% コンフルエントになったヒト線維芽細胞の培養上清を吸引除去し、PBS を 10 ml 加える。
3. PBS を吸引除去し、1 ml の 0.25% Trypsin/1 mM EDTA solution を加える。
4. 37°C で 3 分間インキュベートする。
5. 10% FBS/DMEM 培地を 4 ml 加え、ピペッティングによりシングルセルにする。
6. 細胞数を計測する。
7. 5 × 10⁵ 個を 15 ml チューブに入れ、PBS を加えて 10 ml にする。
8. 200 × g、室温で 10 分間遠心する。
この間に、以下のエレクトロポレーション溶液 (線維芽細胞用) を作製する。

Human Dermal Fibroblast Nucleofactor Solution*4	82 μl
Supplement*4	18 μl
Human iPS Cell Generation Episomal Vector Mix	3.5 μl
9. 遠心終了後、上清を完全に取り除く。
10. 8. のエレクトロポレーション溶液 (線維芽細胞用) に細胞を懸濁し、キュベット*4 に移す。
11. Nucleofector II Device にキュベットを差し込み、プログラム U-023 でエレクトロポレーションを実施する。
12. 1. の DMEM/10%FBS 培地に、エレクトロポレーション後の細胞を素早く懸濁する。
13. 6 well tissue culture plate の 1 well に細胞を播種し、インキュベーター (37°C、5% CO₂) で培養する。

*4: Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit には、Human Dermal Fibroblast Nucleofector solution、Supplement、キュベットが含まれています。

(Day 2) 培地交換

- 培地を吸引除去し、2 ml の 10% FBS/DMEM 培地を添加する。
※以降、培地の交換は 2 日に 1 回行う。

(Day 6) Feeder 細胞の準備

1. 6 well tissue culture plate に 0.1% ゼラチン水溶液を添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
2. 6 well tissue culture plate から 0.1% ゼラチン水溶液を吸引除去する。
3. ゼラチンコート済みの 6 well tissue culture plate に、10% FBS/DMEM 培地にて Feeder 細胞を 3×10^5 個 /well で播種する。
4. インキュベーター (37°C、5% CO₂) で一晩培養し、細胞を容器底面に接着させる。

(Day 7) Feeder 細胞上への継代

1. Day 0 で培養開始した 6 well tissue culture plate から培地を吸引除去し、PBS を 2 ml 加える
2. PBS を吸引除去し、0.5 ml/well の 0.25% Trypsin/1 mM EDTA solution を加える。
3. 37°C で 3 分間インキュベートする。
4. 10% FBS/DMEM 培地を 2 ml 加え、ピペッティングによりシングルセルにする。
5. 細胞数を計測する。
6. Day 6 に準備した Feeder 細胞上に、10% FBS/DMEM 培地にて 1.5×10^4 個 /well を播種する。
7. インキュベーター (37°C、5% CO₂) で培養を開始する。

(Day 8) 培地交換

培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞培養用培地を 2 ml 添加する。

※ 以降 2 日に 1 回培地を交換する。

※ 培養開始後 20 ~ 30 日目に iPS コロニーが認められる。

V. 参考文献

- 1) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, *et al.* (2011) A more efficient method to generate integration free human iPS cells. *Nature Methods*. **8**:409-412.
- 2) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, and Yamanaka S. (2013) A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. **4**:3594.

VI. 関連製品

ヒト iPS 細胞 / ES 細胞用培地

- DEF-CS™ 500 (製品コード Y30010)

ヒト iPS / ヒト ES 細胞関連抗体

- hES-Collect™ (製品コード Y20010 ほか)

フィーダーフリー培養に効果的な培養基質

- iMatrix-511 (製品コード 892001) *

細胞凍結保存液

- STEM-CELLBANKER (製品コード CB041)

* : フィーダーフリー培養での iPS 細胞の樹立も可能です (参考文献もご参照ください)。

VII. 注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cell Generation はタカラバイオ株式会社の商標です。DEF-CS、hES-Collect は Cellartis の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社