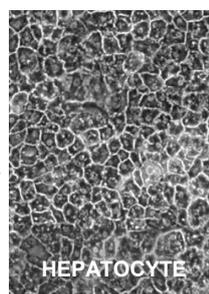
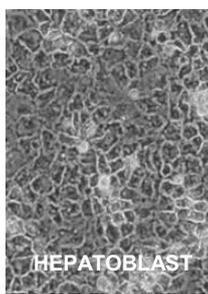
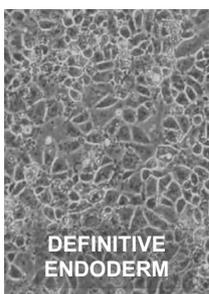
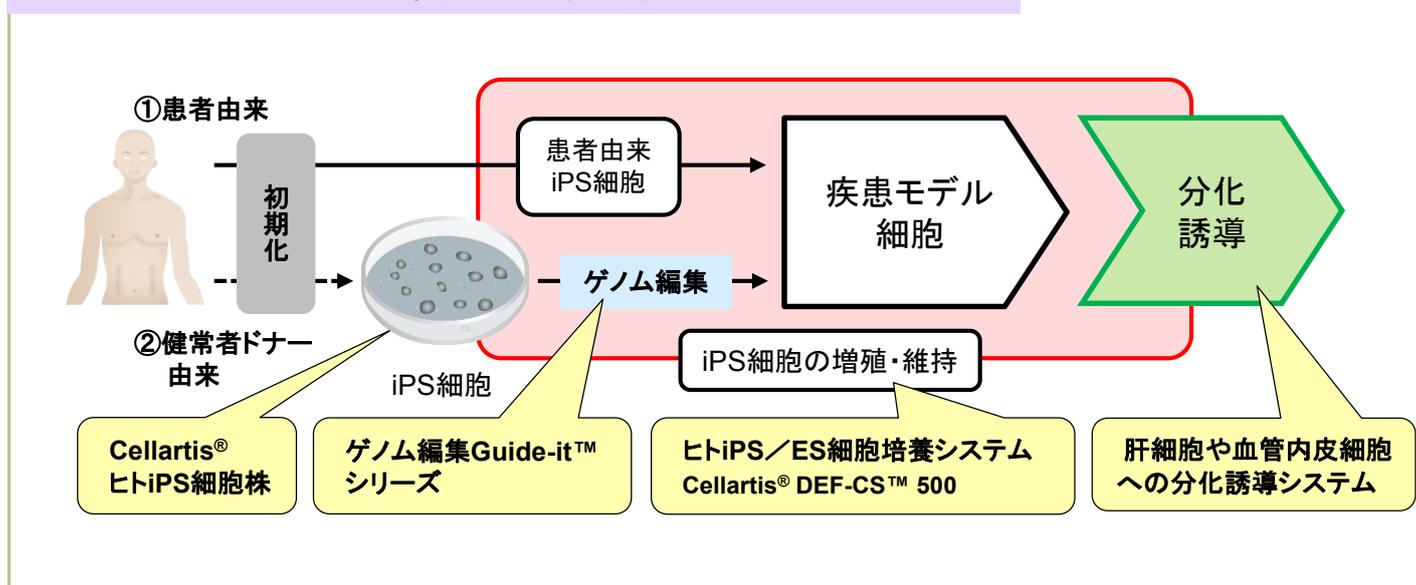


# ユーザー様研究紹介・製品使用例

## Cellartis® DEF-CS Culture System & Differentiation System

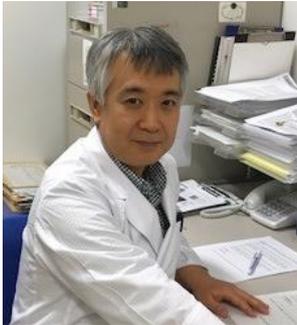
タカラバイオの幹細胞研究製品をご利用いただいているお客様の論文が続々と公開されています。ご研究の内容と結果や本製品についてのインタビューにお答えいただきましたので、是非ご覧ください。

### Cellartis®ブランドがご提案する”iPS細胞を用いた疾患モデリング”



## ヒトiPS細胞のテラトーマ形成を抑える研究

自治医科大学 幹細胞制御研究部 准教授 菊池次郎 先生



Cellartis DEF-CS 500 Culture System (製品コード Y30010)とCellartis iPS細胞株 (製品コード Y00305)のユーザー様である自治医科大学 幹細胞制御研究部 菊池 次郎 先生らによる本製品を用いたiPS細胞のテラトーマ形成を抑える研究成果が*Oncotarget*に掲載されました。

## 【論文名】

Lysine-specific demethylase 1 inhibitors prevent teratoma development from human induced pluripotent stem cells

Osada N, Kikuchi J, Umehara T, Sato S, Urabe M, Abe T, Hayashi N, Sugitani M, Hanazono Y, and Furukawa Y. (2018) *Oncotarget*. **9**, 6450-6462

## ■ 研究内容と結果

iPS細胞やES細胞など多能性幹細胞を用いた再生医療は、難治性疾患に対する画期的治療法として期待されています。しかしながら、臨床応用に向けて、移植した細胞に含まれる未分化な細胞を起源とする腫瘍(テラトーマ)の形成が、安全性の点で解決すべき大きな課題として残されていました。

私たちは、iPS細胞とiPS細胞から形成したテラトーマとの間で、エピゲノム制御に関わる分子の発現を網羅的に解析、テラトーマ形成に伴いリジン特異的脱メチル化酵素(LSD1)が強発現することを発見しました。そこで、iPS細胞を移植したマウスにLSD1阻害剤を投与の結果、テラトーマ形成を抑制できることを明らかにしました。

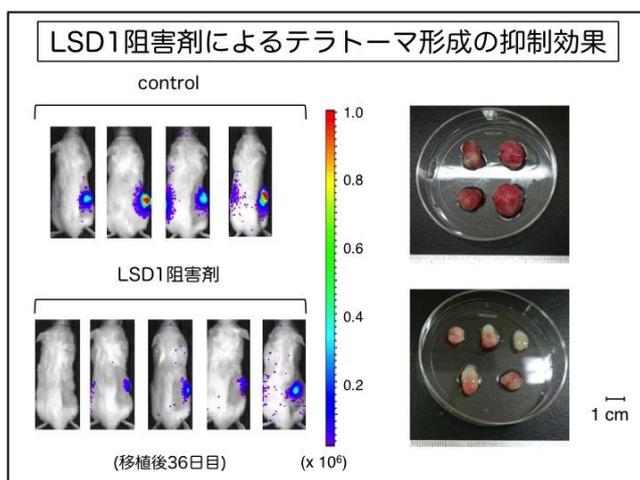


図1. LSD1阻害剤によるテラトーマ形成の抑制効果

レンチウイルスにてルシフェラーゼ遺伝子を導入したChiPSC18細胞株から、シングルセルクローニングによりルシフェラーゼ遺伝子を持つChiPSC18細胞垂株を樹立、これを免疫不全マウスに移植し、LSD1阻害剤投与群と溶媒(コントロール)投与群の間で、テラトーマ形成能を比較した。

LSD1阻害剤投与群ではコントロール群に比べて有意にルシフェラーゼ活性が低く、テラトーマ形成が抑制された。

(*Oncotarget*. **9**, 6450-6462, 2018より引用)

[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=24030&path\[\]=75555](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=24030&path[]=75555)

## ■ 製品についてのインタビュー

## 質問1. Cellartis DEF-CS 500 Culture Systemを使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

タカラバイオの営業担当者の紹介で、細胞の維持が容易で初心者にも扱い易いことがわかったため。遺伝子導入垂株樹立のためのシングルセルクローニングも容易なため。

## 質問2. 実際に使ってみた感想はいかがでしたか？

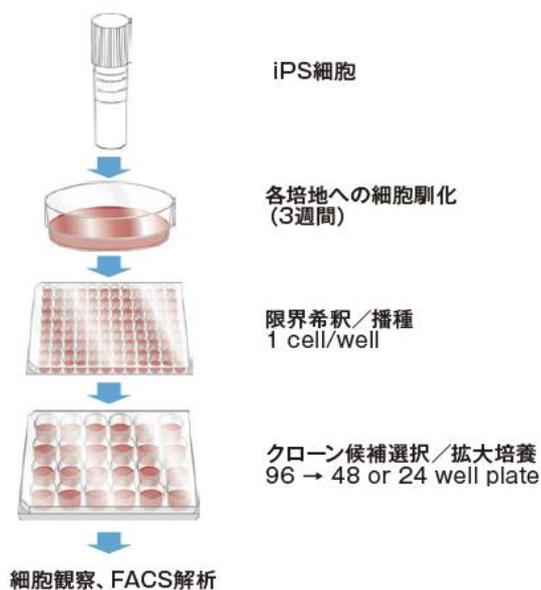
維持培養がHEK293などの付着系細胞株と同様なため、iPS細胞にも関わらず培養が容易だった。初心者にも安心して培養を任せられた。シングルセルクローニングからの垂株樹立も付着系細胞と同等あるいはそれ以上の効率で可能だった。就職活動中の修士課程大学院生が3つの垂株の樹立に成功した。

## 質問3. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

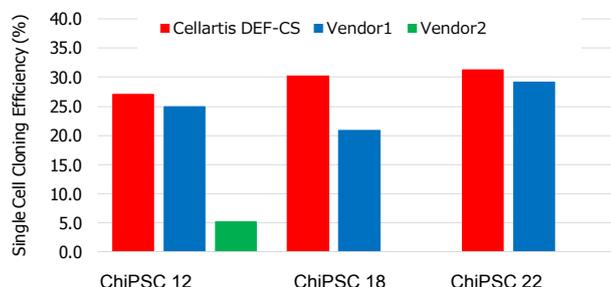
iPS細胞の培養経験の乏しい方でも安心して維持培養が可能です。フィーダーも必要なく安定しており、シングルセルクローニングの効率も高いので、培地購入のコストも相殺されると思います。

# Cellartis DEF-CS 500 Culture System による高効率なシングルセルクローニングとは？

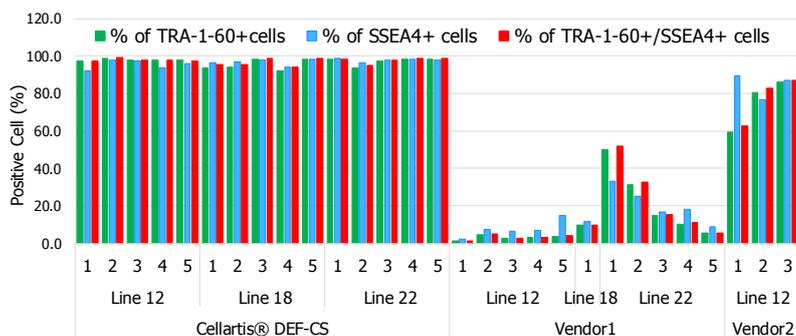
## A) 実験フロー



## B) シングルセルクローニング効率の比較



## C) 取得したhiPSCクローンの未分化マーカー発現状態の比較



(弊社取得データ)

### DEF-CS培養システムと他社hiPSC用培養システムによる3種のhiPSC株を用いたシングルセルクローニング結果の比較

DEF-CS培養システムおよび他社フィーダーフリー培地 (Vendor 1, 2) の推奨プロトコールに従って、3種類のhiPSC株を用いてシングルセルクローニングを行い(A)、シングルセルクローニング効率と得られたクローン化細胞の未分化マーカー (SSEA4, TRA1-60) の発現状態を比較したところ、DEF-CS培養システムで最も良好な結果が得られた(B, C)。

## PRODUCTS



製品コード	製品名	容量	価格 (税別)
Y00305	Cellartis® human iPS cell line 18 (ChiPSC18) Kit	1 Kit	¥ 350,000
Y30010	Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System	1 Kit	¥ 59,800
Y50101	Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System	3 Kit	¥ 161,400

### <キット内容 (製品コード Y30010)>

Cellartis DEF-CS 500 Basal Medium	500 ml	...	基本培地
Cellartis DEF-CS 500 COAT-1	4 ml	...	プレートコーティング剤 (製品コード Y30012)
Cellartis DEF-CS 500 Additives	1 Set	...	培地添加剤 3種 (製品コード Y30016)

## プラダーウィリー症候群患者由来iPS細胞から神経細胞への分化誘導

立命館大学 薬学部薬学科 助教 添田 修平 先生



Cellartis DEF-CS 500 Culture System(製品コード Y30010)のユーザー様である立命館大学 薬学部薬学科 添田 修平先生らによるプラダーウィリー症候群患者由来iPS細胞から神経細胞への分化誘導の研究結果が*Neuroscience Letters*に掲載されました。

### 【論文名】

Neuronal differentiation defects in induced pluripotent stem cells derived from a Prader-Willi syndrome patient.

Shuhei Soeda, Ryo Saito, Norihisa Fujita, Katsuichiro Fukuta, Hideo Taniura.

*Neuroscience Letters* (2019) 703.162-167

### ■ 研究内容と結果

Prader-Willi syndrome (PWS)は第15番染色体の特定領域の遺伝子欠損によって突発的に生じる神経発達障害であり、稀少疾患である。視床下部からのホルモン分泌異常が起こることによって様々な症状を示すことが知られている。染色体を父親、母親の両親から受け継ぐのが正常であるが、母親のみの染色体を受け継ぐ片親ダイソミーやゲノムインプリンティングという遺伝子発現制御の異常によってもPWSは発症し、生まれた段階でPWSかどうかが決まる小児病である。低身長になるケースが多く、過食症による肥満になりその結果糖尿病を併発する場合もある。今までは、PWSの患者は脳室が拡大される等の報告はあるが、脳の構造上の健常者との違いはないため視床下部に異常があること以外は詳しく脳への影響がわかっていなかった。本研究室はPWS由来iPS細胞を用いて解析を行い、PWS由来細胞では神経幹細胞、ニューロンへの分化が進みにくいことを明らかにした。今後は、何故神経系の方に分化が進みにくいのか原因を解明することを目標に研究を進めている。

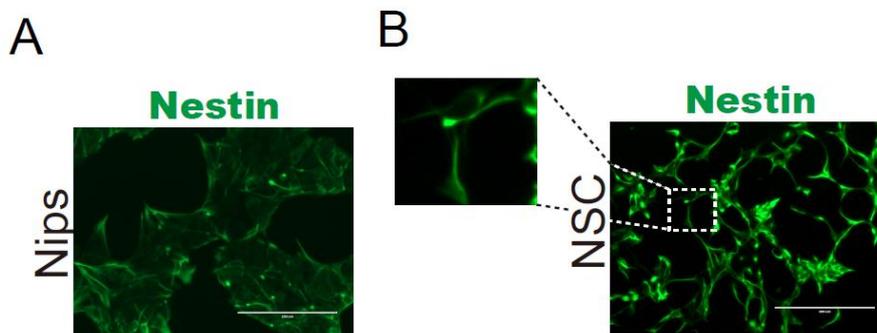


図1. 正常ヒトiPS細胞から分化誘導させた神経幹細胞

A: 正常ヒトiPS細胞(Nips)を神経幹細胞マーカーNestinで免疫染色した画像(ネガティブコントロール)。iPS細胞の培養にはCellartis DEF-CS 500 Culture System(製品コード Y30010)を用いた。

B: 正常ヒトiPS細胞を神経幹細胞(NSC)に分化誘導後、神経幹細胞マーカーNestinで免疫染色した画像。左上は細胞一つを拡大したもの。iPS細胞の状態から形が変形し、細胞一つ一つがNestinで強く染まっている。

(Shuhei Soeda *et al.*, *Neuroscience Letters* (2019) より引用)

[doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.029](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.029)

## ■ 製品についてのインタビュー

### 質問1. Cellartis DEF-CS 500 Culture Systemを使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

同僚の方に紹介され、使用することになった。iPS細胞を使用したことはなかったので不安はあったが、Cellartis DEF-CS 500 Culture Systemはフィーダーフリーで培養できると聞いて安心した。

### 質問2. 実際に使ってみた感想はいかがでしたか？

iPS細胞は培養が難しいと聞いていたのだが、今まで使用していた細胞に比較しディッシュのコートニングをするという手間のみで培養できるので、抵抗なくiPS細胞を使用できている。次はiPS細胞を用いたシングルセルクローニングを用いた細胞株樹立を行う予定なので、よりこのCulture Systemの強みが発揮されると考えている。

### 質問3. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

iPS細胞の使用経験が無くても実験を始めて一年半で論文のpublishまで持って行けたのは、この Culture Systemの培養精度が高いからだと考えています。iPS細胞培養維持のコストは決して安くはありませんが、コストパフォーマンスを考えると一考の価値はあると思います。

## ユーザーズ ボイスをご紹介

### ◆N大学 T様

#### Q1. 質問1. DEF-CS 500 Culture Systemを使ってみようと思ったきっかけは何ですか？

iPS細胞の初心者でしたが、iPS細胞導入の必要性が出てきたことから、素人でも扱いやすい簡便な培養システムを探していました。その中でタカラバイオ様主催のTGCAセミナーに参加し、DEF-CS systemの詳しい説明を受け、さらに研究室でのハンズオントレーニングも無償で行ってくれるなどの手厚いサポートを受けられることからDEF-CS systemの導入を決めました。

#### Q2. 実際に使ってみた感想はいかがでしたか？

CRISPR/Cas9システムによる変異ノックインiPS細胞を作製するためにDEF-CSを利用しました。DEF-CSはシングル・セルクローニングを可能とすることから単クローンの取得が容易であり、さらにシングル・セル培養後のiPS細胞の生存率が高いことから多種多様な変異体iPS細胞の作製に成功しました。またDEF-CSでiPS細胞をシングル・セル サスペンションにできることは正確な細胞数のカウントを可能とするため、遺伝子導入効率等をコントロールしやすくなるというメリットもあるように感じました。

#### Q3. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

培養操作はハンズオントレーニングをしてもらえます。トレーニングでは凍結保存バイアルからの培養開始をデモンストレーションとして行っていただけるため、初心者でも安心して導入ができると思います。継代操作に特殊な技術を要しないため学生でも使用が容易であり、ラボ内でiPS細胞の質の均一化を可能にできると思います。アプリケーションでは、DEF-CSはゲノム編集などの遺伝子導入実験と非常に相性が良いと感じました。iPS細胞の培養もゲノム編集も敷居が高い技術と思いがちかもしれませんが、DEF-CSは両方の敷居を下げる次世代型のiPS細胞培養システムだと感じました。

## 出張 ハンズオントレーニング 無料

Cellartis ヒトiPS細胞株のいずれかとCellartis DEF-CS 500 Culture System (製品コード: Y30010/Y50101)、およびSTEM-CELLBANKER GMP grade (製品コード: CB045/CB047) の3製品を同時にご購入いただいたお客様を対象に、弊社の細胞技術担当による**実地でのハンズオントレーニング(実技内容: 培地調製、凍結ヒトiPS細胞株の解凍/播種)**を実施中です。

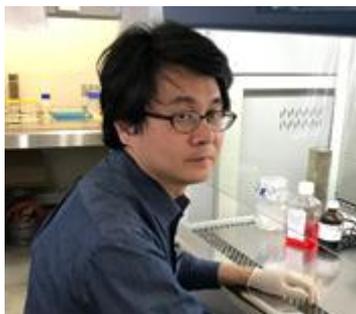
iPS細胞のハンドリングに不安がある方は、ぜひお気軽にお問い合わせください！



お問い合わせ先：タカラバイオ テクニカルサポートライン  
TEL 077-565-6999

ヒトiPS細胞を用いた多発肝のう胞症(Polycystic liver disease)の*in vitro*モデル作製

東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学 准教授 紙谷聡英 先生



Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System (製品コード Y30055) のユーザー様である東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学 紙谷聡英 先生らによる本製品を用いた肝疾患モデル作製の研究成果が*Stem Cell Research*に掲載されました。

## 【論文名】

An *in vitro* model of polycystic liver disease using genome-edited human inducible pluripotent stem cells  
Akihide Kamiya et al., (2018) *Stem Cell Research* 32,17-24.

## ■ 研究内容と結果

多発肝のう胞症(polycystic liver disease, PLD)は肝臓内に胆管細胞に由来するのう胞が多発する希少疾患であり、のう胞の巨大化による周囲の臓器の圧迫などが問題となる。変異胆管細胞の増殖などが原因とされ、Protein Kinase C substrate 80K-H(PRKCSH)などが病因遺伝子として報告された。しかし、ヒト細胞を用いた多発肝のう胞症のモデル系が存在しないことが病態解析を困難にしている。

本研究では、ヒトiPS細胞から肝前駆細胞、さらに胆管前駆細胞への分化誘導を行った。得られた細胞を細胞外マトリクスに包埋培養し、胆管マーカー(サイトケラチン7, 19)陽性で肝細胞マーカー( $\alpha$ フェトプロテイン)陰性の胆管様構造体を誘導できることを見出した。次にPRKCSH遺伝子座をゲノム編集酵素(CRISPR/Cas9)で変異させたヒトiPS細胞を作製し、*in vitro*で病態解析可能なモデル構築を行った。PRKCSH変異iPS細胞からは野生型と比べて多数の胆管様構造を誘導できることがわかり、PRKCSH変異が胆管系への分化促進等に関わる可能性を示した。以上の結果から、ヒトiPS細胞とゲノム編集技術を用いることで難治性胆管疾患の*in vitro*モデルが構築できることがわかった。

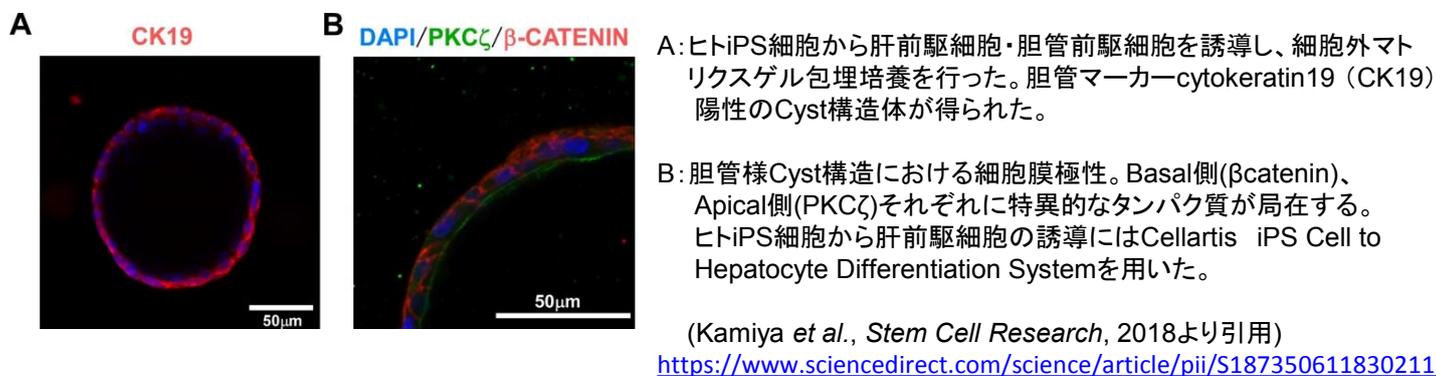


図 3. ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞から誘導した 胆管様Cyst構造

## ■ 製品についてのインタビュー

## 質問1. Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation Systemを使ってみようと思ったきっかけは？

ヒトiPS細胞から肝臓系の細胞への分化誘導には様々な手法が多くの研究グループから報告されており、我々も論文として報告しています。一方で細胞分化が不安定であったり、iPS細胞の培養に必要なフィーダー細胞が肝分化に影響するのではという懸念もあり、フィーダーフリーでiPS細胞が培養できるCellartisのSystemを試すことにしました。

## 質問2. 実際に使ってみた感想はいかがでしたか？

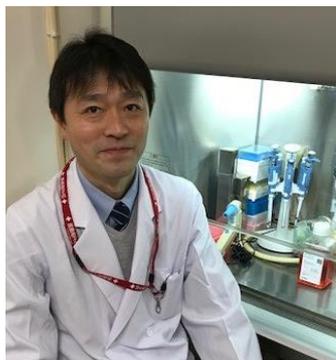
CellartisのフィーダーフリーのiPS細胞培地およびiPS Cell to Hepatocyte Differentiation Systemの両方を使用したのですが、それまでに使用していたフィーダー細胞を用いる培養法に比べて簡便に継代培養できる上に、Hepatocyte Differentiation Systemによる肝細胞分化が非常に安定しており、実験の効率が格段に上がりました。

## 質問3. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

ヒトiPS細胞から肝細胞分化の過程では、細胞密度などによって分化効率が大きく影響され、実験結果がそれに影響されることがよくあります。Cellartisのシステムの利点は、各実験試行でのぶれが少なく結果が安定していることにあり、実験の効率化を求める方にお勧めできると思います。

## 先天性肝線維症モデルの開発と病態解明の研究

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 肝臓病態制御学講座 准教授 柿沼 晴 先生



Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System (製品コード Y30055) のユーザー様である東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 柿沼晴先生らによる先天性肝線維症モデル作製と病態解明の研究結果が *Journal of Hepatology* に掲載されました。

## 【論文名】

Loss of Fibrocystin Promotes Interleukin-8-Dependent Proliferation and CTGF Production of Biliary Epithelium. Tomoyuki Tsunoda, et al., (2019) *Journal of Hepatology* Jul;71(1):143-152

## ■ 研究内容と結果

先天性肝線維症は、胎児期に始まる胆管形成の異常と進行性の肝線維化を生じる遺伝性の肝疾患です。しばしば小児期に肝移植を必要とする難治性の病気であり、新規治療法の開発にむけた病態の解明が必要でした。これまでは主に、この病気のマウスモデルを用いた研究がなされてきましたが、マウスモデルと実際の患者さんの病態には隔たりが大きいことが問題でした。我々は、ヒトiPS細胞から、この病気を再現して解析することができる疾患モデルを作成し、胆管細胞が産生するIL-8が本疾患で見られる胆管の異常と進行性の肝線維化に重要な役割を果たすことを見いだしました。さらに、ヒトiPS疾患モデルで得た結果は、この難治性疾患の実際の患者さんでも認められていました。本研究では、ヒトiPS細胞を用いた疾患モデルを開発することで初めて、遺伝性難病の病態について詳細な分子機構を明らかにできました。

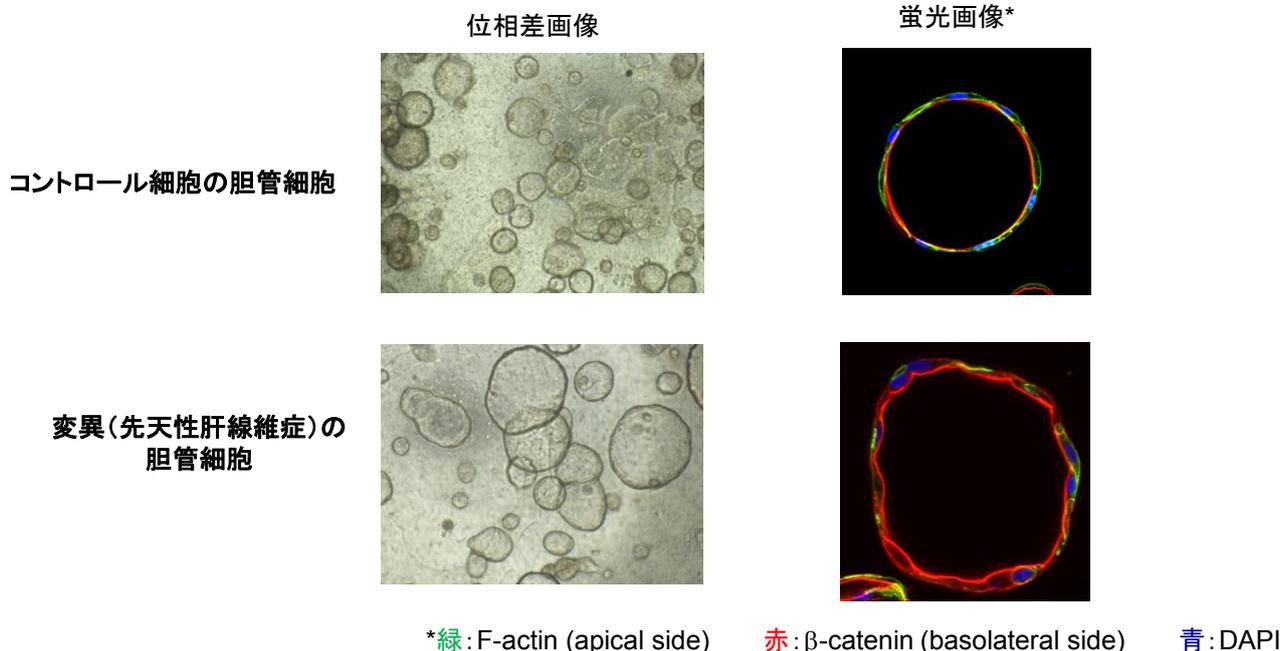


図 4. ヒトiPS細胞から分化させた胆管細胞

ヒトiPS細胞をDEF-CS 500 Culture System で維持培養した後に、Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System によりHepatoblast stageまで分化誘導した。培養12日目に誘導した細胞からクローン化した肝前駆細胞(iPS-HPCs)のコロニーを形成させ、この細胞を3次元培養系にて、さらに10日間培養すると、一層の胆管様上皮から構成される、嚢状(Cyst)形態に分化した。

先天性肝線維症モデルの変異細胞では自律的にIL-8を分泌し、IL-8依存的に胆管細胞が増殖して、Cystの大きさと数が増大する。このような形質は、本疾患で見られる胎生期の胆管形成異常を模倣していると考えられる。

(Tsunoda, et al., *Journal of Hepatology* (2019) より引用)

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.024>

■ 製品についてのインタビュー

質問1. Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation Systemを使ってみようと思ったきっかけは？

共同研究者の先生が使用されており、安定した培養が可能であると同いました。我々の研究室でも、ちょうどフィーダーフリーの培養系を利用したいと考えておりましたので、使い始めました。

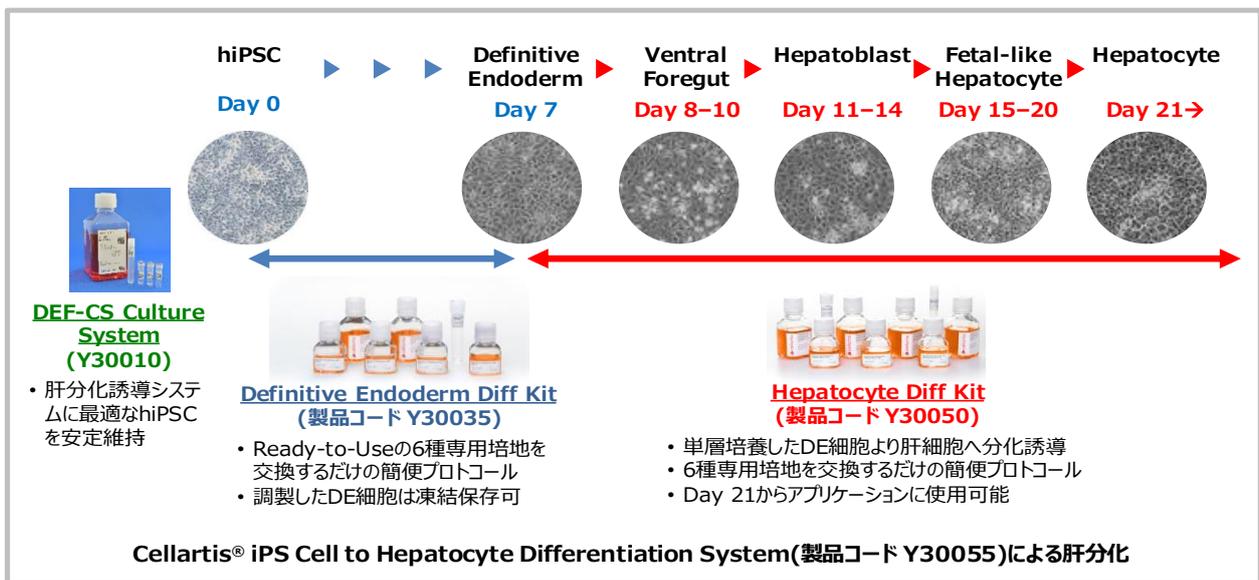
質問2. 実際に使ってみた感想はいかがでしたか？

フィーダーフリーの培養系として、比較的簡便であるとともに、ヒトiPS細胞を安定して培養することができました。この研究では、肝芽細胞まで分化させてからクローン化し、胆管細胞に分化させていますが、分化誘導の再現性は良いと思いました。肝細胞系譜に成熟化もさせましたが、従来の既報の方法よりも、再現性が安定していると思います。

質問3. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

ヒトiPS細胞の維持培養、肝細胞系譜への分化誘導の双方で、比較的ヒトiPS細胞の使用経験が浅い実験者であっても、培養と再現性が安定しているように思います。

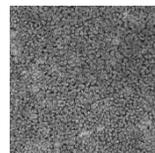
— ご協力有難うございました —



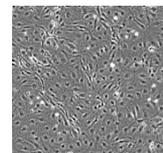
PRODUCTS

製品コード	製品名	容量	価格(税別)
Y30055	Cellartis® iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System	1 Kit	¥ 138,000
<b>NEW</b> Y50300	MiraCell® iPS Cell to Endothelial Cell Differentiation Kit	1 Kit	¥ 129,800

ヒトiPS細胞から血管内皮細胞への分化誘導におススメ！



ヒトiPS細胞



血管内皮細胞

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。  
 ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。  
 ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。  
 ・本パンフレット記載の価格は2019年6月20日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2019年6月作成N

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282  
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995  
 テクニカルサポートライン  
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995  
 Website <http://www.takara-bio.co.jp>  
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店