

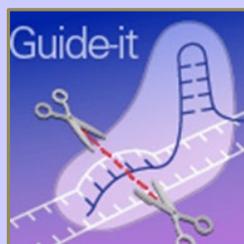
iPS細胞研究ガイド

DEF-CS培地で簡単に始められる！ ヒトiPS細胞実験



ヒトiPS細胞の培養法 p1 - 2

～ 培養法の課題とDEF-CS培養システムの特長～



ヒトiPS細胞のゲノム編集 p3 - 4

～ ゲノム編集実験の課題とDEF-CS培養システムによる高効率ゲノム編集クローンの取得～



ヒトiPS細胞の分化誘導 p5 - 6

～ 分化誘導実験の課題とDEF-CS培養システムに最適化されたRobustな肝分化誘導システム～



PRODUCTS



製品コード	製品名	容量	価格(税別)
Y30010	Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System	1 Kit	¥83,000
Y50101		3 Kit	¥227,000

3本セットがお得!

<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)

ヒトiPS細胞培養の課題

ヒトiPS細胞 (hiPSC : human induced pluripotent stem cells) は、初期化因子を導入して初期化 (リプログラミング) することでヒトの体細胞より人工的に作製された多能性幹細胞です。hiPSCは適切な分化条件下で様々な細胞に分化する能力 (多能性、または多分化能) を維持したまま無限に増殖する能力 (自己複製能) を有しています。一方、これら能力を安定して維持するためには、適切な培養方法の選択が極めて重要です。

フィーダー細胞を用いた従来のヒトiPS細胞培養の課題

従来のhiPSC培養法 (オンフィーダー培養) では、マウス線維芽細胞などがフィーダー細胞として用いられてきました。フィーダー細胞はhiPSCが培養器材に接着する足場として働くほか、細胞の増殖や未分化性の維持にも重要な役割を果たしていますが、フィーダー細胞を必要とする培養法では以下の課題が指摘されています。

課題1 手技の難易度

オンフィーダー培養法をはじめとする多くのhiPSC従来培養法では、細胞はコロニー (細胞塊) を形成しながら増殖します (図1、2)。こうしたhiPSCがコロニーを形成し増殖する培養法においては、hiPSCの未分化性や増殖能の維持のため、継代時や凍結保存時に細胞塊を適度なサイズにコントロールして再播種や凍結保存に用いる必要があります。そのため、安定した品質のhiPSCの培養維持には、熟練した技術の習得が非常に重要です。

課題2 フィーダー細胞の確保と培養前準備の必要性

hiPSCのオンフィーダー培養では、足場としての性能を確認済みのフィーダー細胞 (マイトマイシン処理済みマウス胎児由来線維芽細胞など) を別途準備し、予め培養器材に播種する作業が必要です。これらの工程が、フィーダー細胞を必要としない一般の細胞培養と比較してhiPSC培養をより複雑な作業としていることは勿論、培養のスケールアップや自動化を行う際の障害になることも危惧されます。

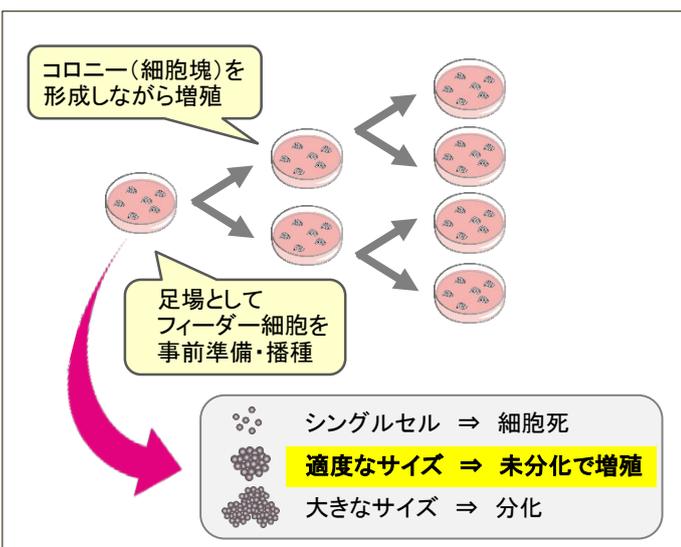


図1. hiPSC従来培養法 (オンフィーダー培養) の問題点

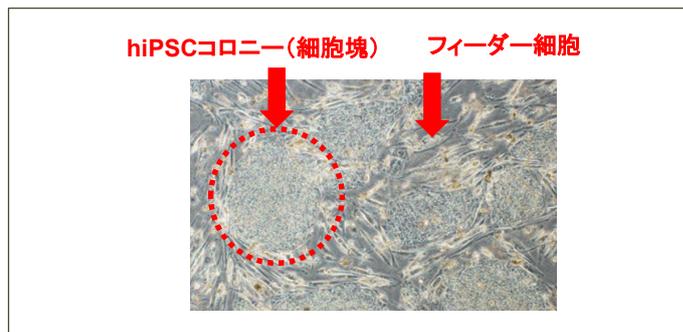


図2. オンフィーダー培養したhiPSCの細胞形態

課題3 培養環境のRobustness (頑健性) の不足

課題1、2に挙げたように、熟練した技術習得が必要となり、一定の品質確保が必ずしも容易とはいえないフィーダー細胞を必要とするオンフィーダー培養法では、これらによって生じる「作業員間差」や「実験間差」が与えるhiPSCの品質への影響が大きくなる傾向があります。そのため、分化誘導などの培養以降の実験で、再現性が低下するリスクが危惧されます。

課題4 異種動物由来成分の使用

より安全性の担保が重要となる再生医療分野では、異種動物由来のフィーダー細胞に起因する成分の持込みやウイルス感染の可能性が否定できず、これを必要としない培養法が好ましいとされています。

解決法 フィーダーフリー培養法

以上の課題を解決するため、近年、フィーダー細胞を必要としないフィーダーフリー培養法が開発されてきました。Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (DEF-CS培養システム; 図3の左) もこうした培養システムの一つで、フィーダー細胞の代わりにプレートコーティング剤を用いることで、hiPSCの能力を安定して維持します。



図3. DEF-CS培養システム (左) とDEF-CS培養システムを用いて培養したhiPSCの細胞形態 (右)

★ POINT !

- ☑ オンフィーダー培養に代表されるヒトiPS細胞の従来培養法では、「手技の難易度」、「操作の煩雑性」などに起因するヒトiPS細胞の品質のパラツキが懸念される。
- ☑ ヒトiPS細胞の従来培養法の問題点の改善には、「フィーダーフリー」、「シングルセル継代」などに対応した培養システムの利用が有効である。

DEF-CS培養システムの特長

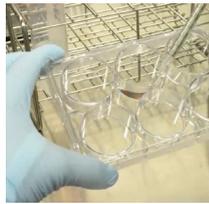
DEF-CS培養システムの次の2つの特長により、hiPSCをあたたかも一般的な株化接着細胞と同様に培養維持することができます。

これにより、従来培養法に比べてより簡便なhiPSCの培養維持が可能となるほか、従来培養法で危惧されていた実験者間や実験間の培養結果(hiPSCの品質)のパラツキが大幅に改善できます。

<特長1> フィーダーフリー培養

DEF-CS培養システムによるhiPSCの培養には、フィーダー細胞は不要です。システムにはタンパク質成分からなるコーティング剤(COAT-1)が含まれており、PBS(+/+)で希釈したCOAT-1で37°Cにて20分以上(または室温で3時間)培養プレートをコーティングするだけでhiPSCの足場の準備は完了します。

そのため、オンフィーダー培養に必要な性能が担保されたフィーダー細胞の確保や、hiPSCの継代や解凍時のフィーダー細胞の播種等は不要です。



<特長2> 2D培養によるシングルセル継代

DEF-CS培養システムを用いて培養したhiPSCはオンフィーダー培養に特徴的なコロニー(細胞塊)を形成せず、平面的で均一な細胞形態を示します(図3の右)。

そのため、実験者のスキルに大きく依存するhiPSCコロニー(細胞塊)の適度なサイズへの調整は不要であり、細胞剥離剤でシングルセルにまで分散した状態(図4)で継代や凍結保存が可能です。

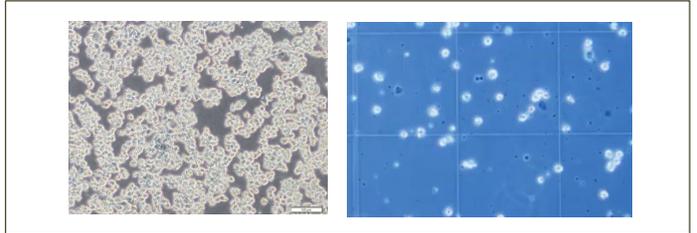
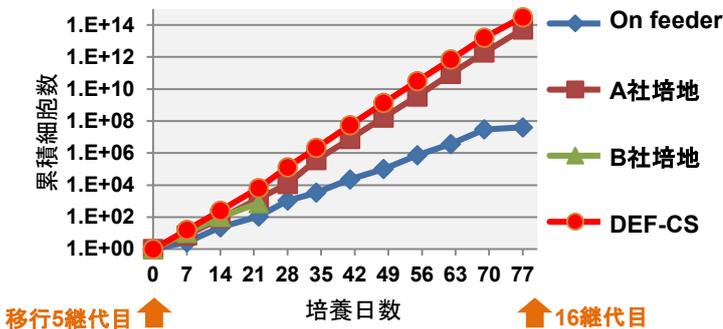


図4. DEF-CS培養システムで培養したhiPSCの剥離剤処理後(左)と細胞数計測時の顕微鏡像(右)

DEF-CS培養システムによる優れたhiPSC品質の維持

DEF-CS培養システムでは、hiPSCを簡便に扱えるだけでなく、「増殖能」、「未分化性」、「多分化能」をはじめとするhiPSCに求められる特長(品質)を安定に維持できることを確認しています(図5)。

A 長期培養における細胞増殖 (iPS細胞株: 253G1)



C 胚葉組織への分化能

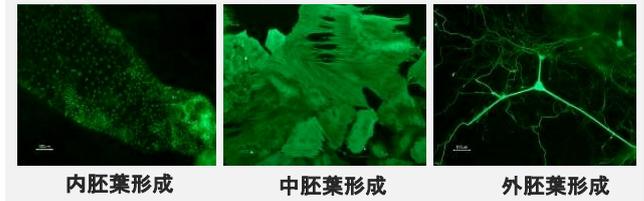
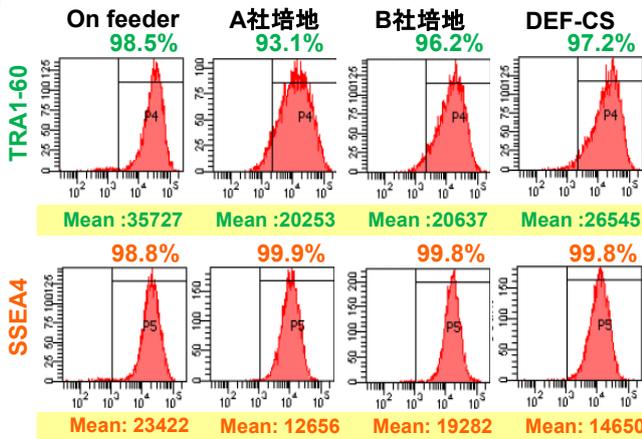


図5. DEF-CS培養システムによるhiPSCの安定維持(1)

B 安定した未分化維持培養



A 各種培地でフィーダーフリー培養へ移行したhiPSC株(253G1)について長期培養試験を実施したところ、DEF-CS培養システムを用いた場合に最も良好な増殖が確認された。

B 各条件で培養したhiPSC株(16継代後)を回収し、未分化マーカーとして知られているTRA1-60およびSSEA4についてフローサイトメーターで解析した。DEF-CS培養システムで培養したhiPSC株はオンフィーダー培養したhiPSC株と同様に、高いTRA1-60およびSSEA4の陽性率と発現強度を示し、極めて高いレベルで未分化性が維持されていることが確認された。

C DEF-CS培養システムで培養したhiPSC株は全胚葉組織(三胚葉)への分化能を保持していた。

★POINT !

- ☑ ヒトiPS細胞の「フィーダーフリー」、2D培養による「シングルセル継代」に対応したDEF-CS培養システムを用いることで、簡便かつ再現性の高いヒトiPS細胞の培養が可能
- ☑ DEF-CS培養システムでは、「増殖能」、「未分化性」、「多分化能」をはじめとするヒトiPS細胞に求められる特長(品質)を安定に維持できる。

ゲノム編集実験の課題

ゲノム編集は、人工的に設計・作製された配列特異的DNA分解酵素を用いてゲノムDNAを切断し、非同源末端結合 (NHEJ: Non-Homologous End Joining) や相同組換え (HR: Homologous Recombination) といった、細胞が本来有するDNA修復機構を巧みに利用してゲノム上の特定遺伝子を改変する技術です (図6)。

2013年にCRISPR/Cas9を利用した第三世代の人工エンドヌクレアーゼによるゲノム編集が報告されて以来、基礎研究をはじめ、創薬・再生医療、さらには農畜産物の育種まで幅広くゲノム編集技術の利用が検討されています。一方で、ゲノム編集をより効果的に行うためには、その実験ステップ毎に解決すべき様々な課題が存在しています (図7)。

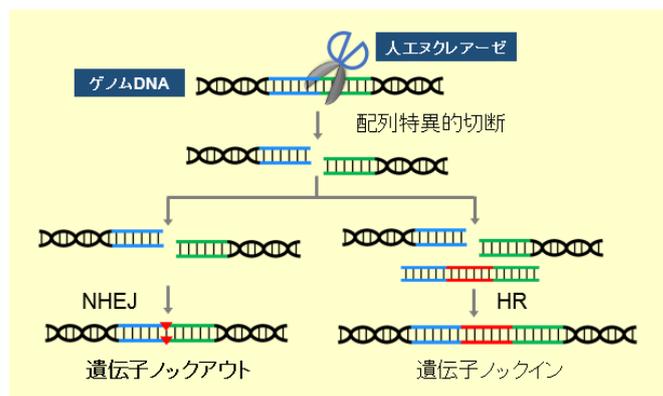


図6. ゲノム編集による遺伝子改変

ヒトiPS細胞をゲノム編集する上での課題

図7に挙げる様々な検討課題の中でも、特に次の2点については、hiPSCのゲノム編集に特化した最適化が必要です。

課題1 目的ゲノム編集細胞のクローニング

オンフィーダー培養に代表される従来のhiPSC培養法では、hiPSCはコロニーとよばれる細胞塊を形成した状態で安定に維持されます。そのため、こうした従来培養法では目的ゲノム編集クローンを選択する際に必要となるhiPSCを単一細胞 (シングルセル) 化し、未分化性などのhiPSCの特長を安定に保持したまま効率良く拡大培養すること (シングルセルクローニング) は容易ではありませんでした。

解決法

最近では、hiPSCのシングルセルクローニングに対応した培養システムの開発が進められおり、その中でも、DEF-CS培養システムについては、他の培養システムよりも高いクローニング効率と未分化性を保持した拡大培養が可能であることが確認されています (図8)。

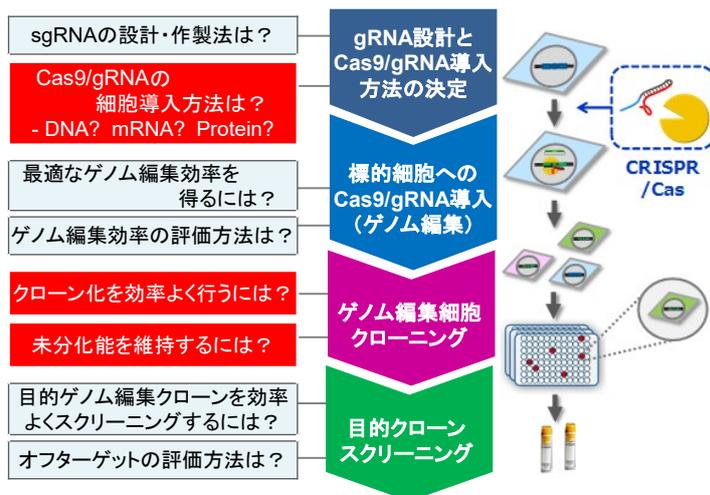


図7. ゲノム編集ワークフローと課題

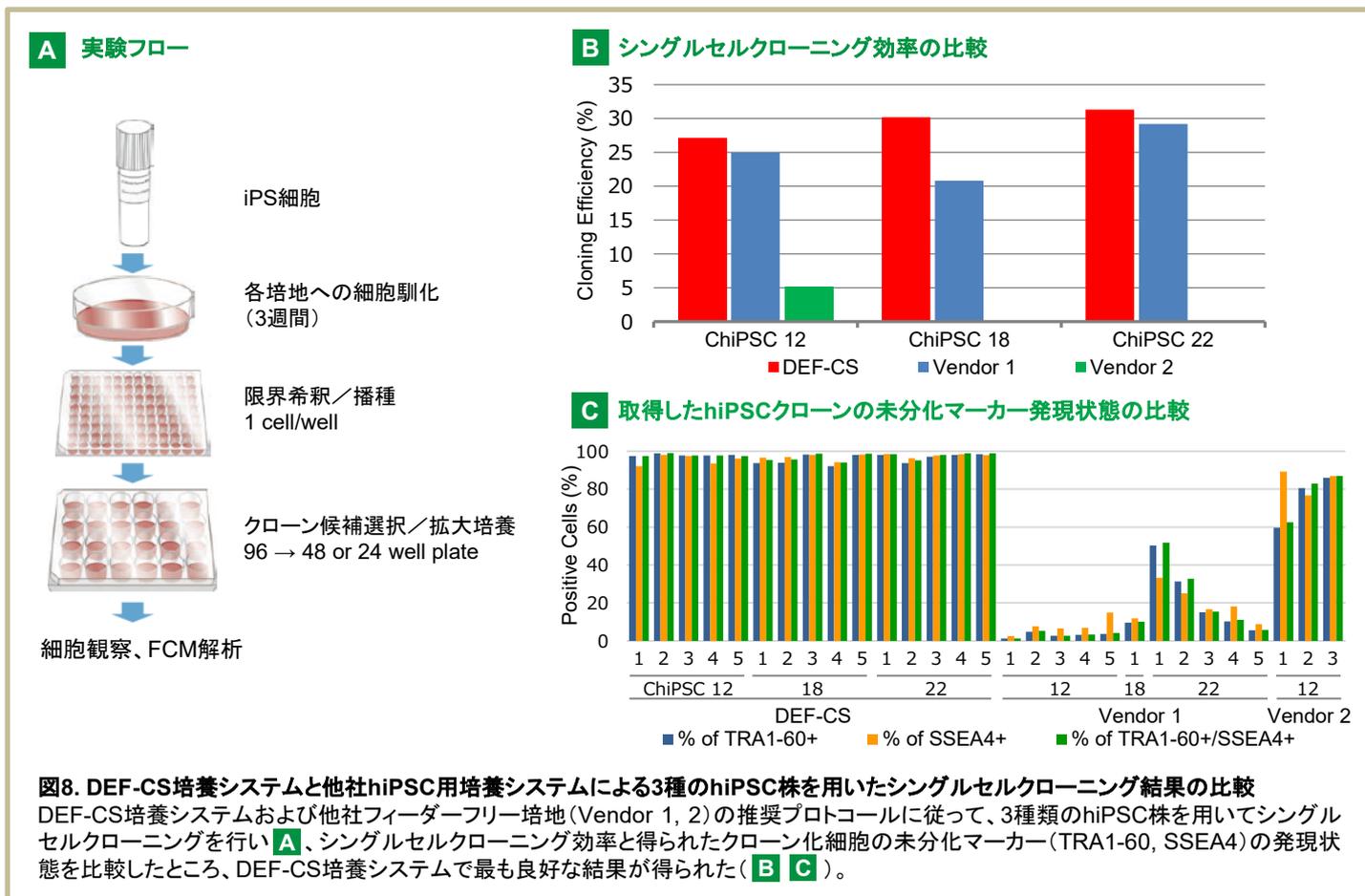


図8. DEF-CS培養システムと他社hiPSC用培養システムによる3種のhiPSC株を用いたシングルセルクローニング結果の比較
DEF-CS培養システムおよび他社フィーダーフリー培地 (Vendor 1, 2) の推奨プロトコールに従って、3種類のhiPSC株を用いてシングルセルクローニングを行い A、シングルセルクローニング効率と得られたクローニング細胞の未分化マーカー (TRA1-60, SSEA4) の発現状態を比較したところ、DEF-CS培養システムで最も良好な結果が得られた (B C)。

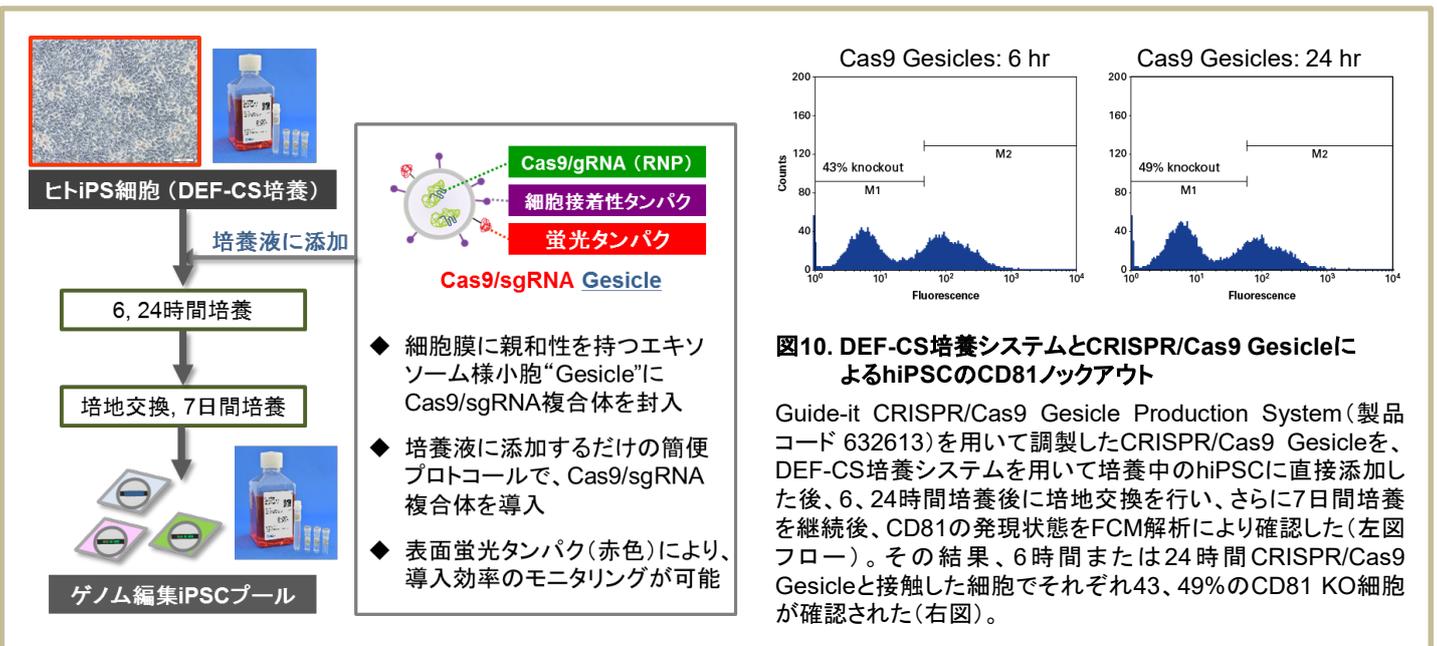
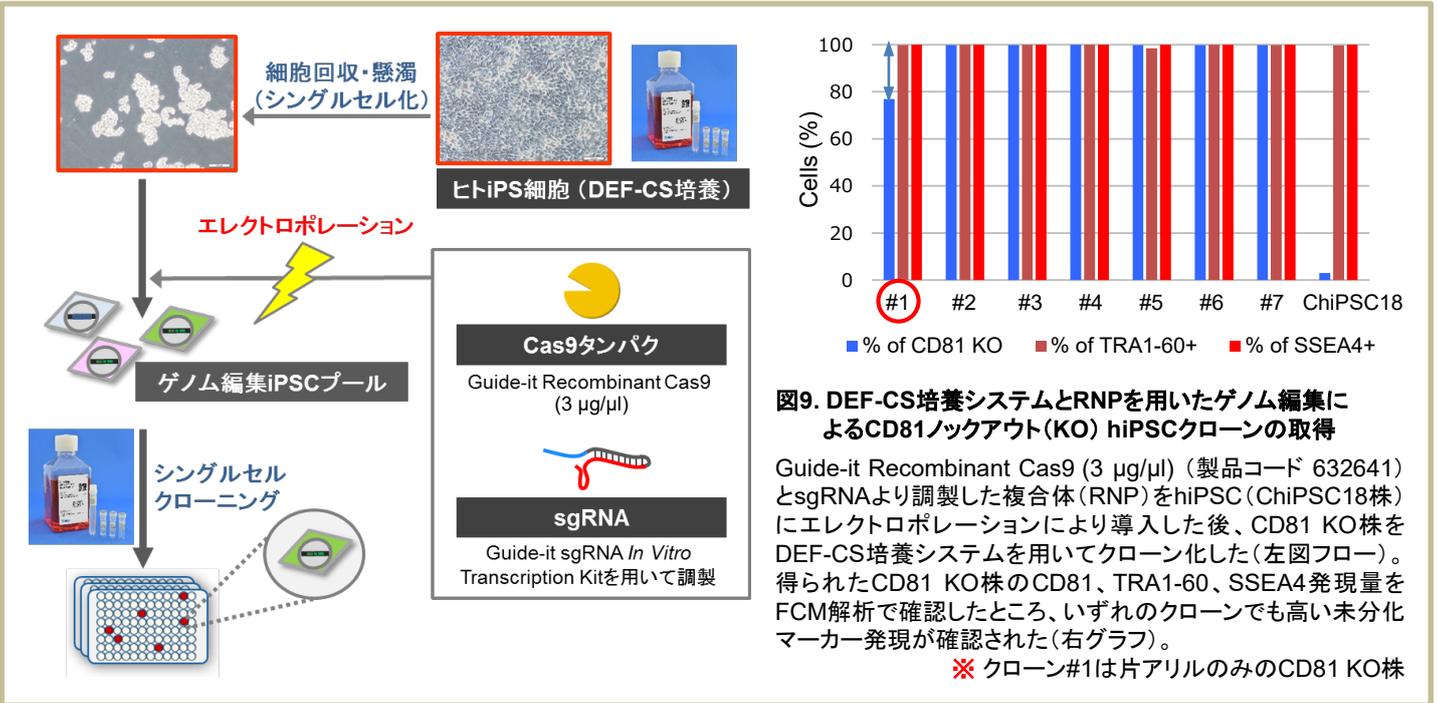
課題2 人工ヌクレアーゼ導入方法の最適化

目的のゲノム編集細胞を効率よく取得するためには、ターゲット細胞に応じた最適な人工ヌクレアーゼ導入方法の選択とその最適化が必要です。

解決法

hiPSCを対象としたゲノム編集においては、Zinc FingerヌクレアーゼやTALEヌクレアーゼなどの従来型の人工ヌクレアーゼの発現プラスミドDNAを電ポレーション等を用いて導入する方法が一般的に用いられてきました。一方、近年注目されているCRISPR/Cas9由来の人工ヌクレ

アーゼの場合には、その構造がターゲットに共通なDNA切断機能を有するタンパク質(Cas9タンパク質)とターゲット配列特異的な単鎖RNA(guide RNA:gRNA)から成る複合体(Ribonucleoprotein:RNP)であるという特徴を生かし、オフターゲット効果の低減が期待されるRNPそのものを直接細胞に導入する手法が注目を集めています。RNPのhiPSCへの導入方法としては、電ポレーション(図9)のほか、Gesicleと呼ばれるエキソソーム様小胞(図10)を用いても効果的に導入が可能です。

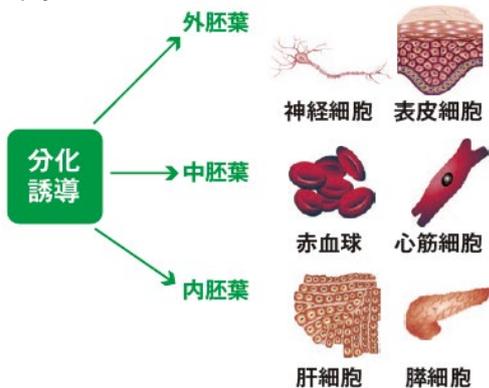


★POINT !

- ☑ ヒトiPSC細胞のゲノム編集を行う上での課題として、従来培養法による目的ゲノム編集クローンの単離(シングルセルクローニング)の効率の悪さが挙げられる。
- ☑ DEF-CS培養システムによる高効率な「シングルセルクローニング」と「Cas9タンパク質/sgRNA複合体(RNP)の直接導入」の組み合わせにより、効率的なヒトiPSC細胞のゲノム編集が可能となる。

分化誘導実験の課題

hiPSCは多分化能を有し、適切な分化誘導環境下で様々な体細胞へと分化することが可能です。一方、hiPSCの分化誘導実験を再現性良く高効率に行うためには、次のような課題が挙げられます。



課題1

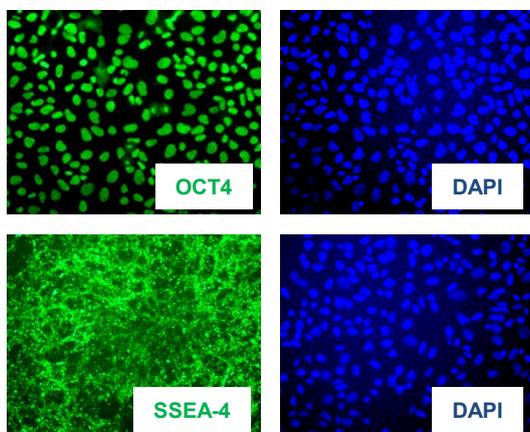
分化誘導実験の出発材料となるhiPSCの品質の安定確保

hiPSCの維持培養では、培養の手技や用いるhiPSC株の違いの影響を受け、培養実験間だけでは無く、同一培養液中の細胞間においても未分化性などの品質にバラツキが生じ易く、これらが分化誘導結果の再現性低下や分化誘導効率の低下に繋がることが危惧されます。

解決法

このようなhiPSCの培養に起因する問題点の解消には、①実験間や実験者間の手技のバラツキの低減だけでは無く、②同一培養液中の細胞間の品質のバラツキや③異なるhiPSC株毎の培養条件の最適化を最小限に抑えられる培養システムの選択が有効です。DEF-CS培養システムでは、「フィーダーフリー」、「単層培養によるシングルセル継代」による手技のバラツキの低減に加え、hiPSC株への依存が少ない均一な品質を維持したhiPSCの調製が可能です(図11)。

A 未分化マーカー免疫染色結果



B 異なるhiPSC株の倍化時間の比較

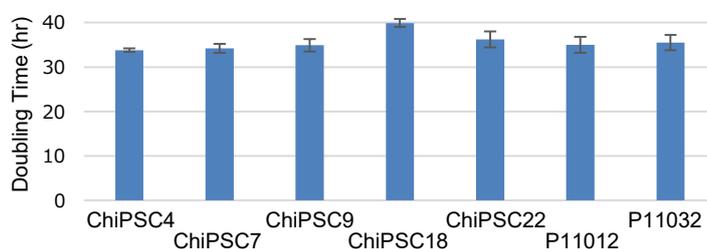


図11. DEF-CS培養システムによるhiPSCの安定維持(2)

A DEF-CS培養システムで培養したhiPSC (ChiPSC4) の未分化性を免疫染色で解析したところ約97%でOCT4とSSEA4の発現を確認した。

B 標準プロトコールに従い培養したドナーの異なる7種のhiPSC株の倍化速度を比較したところ、34~40時間の安定した値を得た。

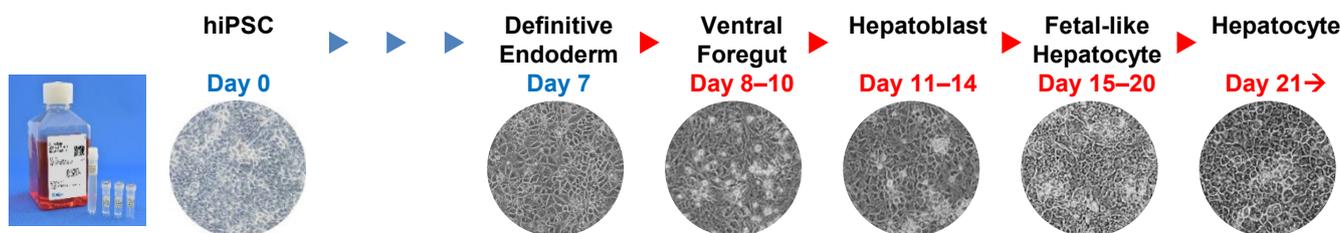
課題2 Robustな分化誘導法の確立

実験間やhiPSC株に依存しない安定した分化誘導結果を得るためには、課題1に挙げた出発材料となるhiPSC株の品質を安定に維持するだけでは無く、分化誘導に用いるプロトコールそのものにも頑健性(Robustness)が必要です。

解決法

目的的分化細胞毎に分化誘導プロトコールの最適化が必要であり、幾つかの分化細胞については市販の分化誘導シ

ステムの利用も可能です。Cellartis® iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System (製品コード Y30055)による肝分化(図12)では、25種類のhiPSC/hESCからの肝細胞調製が可能であることを確認しています(図13)。また、hiPSC株毎の性能の違いに起因する問題点を軽減するには、目的的分化能を確認した株を選択することも重要です(表1)。



DEF-CS 培養システム
肝分化誘導システムに最適なhiPSCを安定維持

Definitive Endoderm Diff. Kit

- Ready-to-Useの6種の専用培地を交換するだけの簡便プロトコール
- 調製したDE細胞は凍結保存可

Hepatocyte Differentiation Kit

- 単層培養したDE細胞より肝細胞へ分化誘導
- 3種の専用培地を交換するだけの簡便プロトコール
- Day 21から、各種アプリケーションに使用可能

図12. Cellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation Systemによる肝細胞への分化誘導

A 分化肝細胞の細胞形態

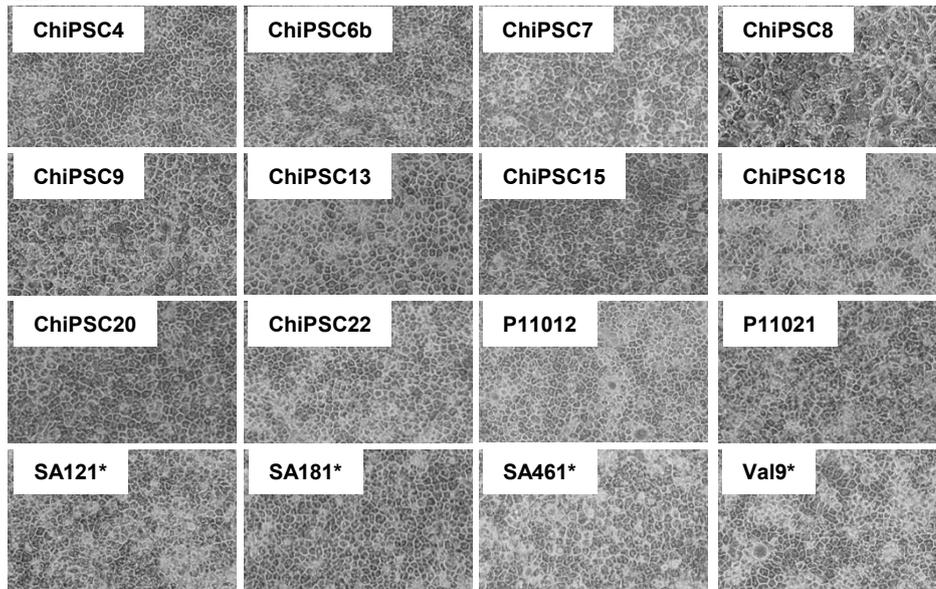


図13. hiPSC (12種)とhESC (4種)の肝分化誘導結果

12種のhiPSCと4種のhESC (*で示す)をCellartis iPS Cell to Hepatocyte Differentiation Systemを用いて肝細胞へ分化誘導したところ、全ての株で肝細胞様の形態を示す細胞が得られた **A**。また、これら分化細胞中のHNF4αの発現を免疫染色 (DAPIにより細胞核を染色)にて確認したところ、全ての細胞株で分化細胞の90%以上がHNF4α陽性であることを確認した **B**。

※本データは、下記参考文献より一部改訂して引用しました。

Annika Asplund *et al.*
One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells.
Stem Cell Rev. 2016 Feb; 12(1):90-104

B 肝細胞マーカー (HNF4α) の免疫染色解析結果

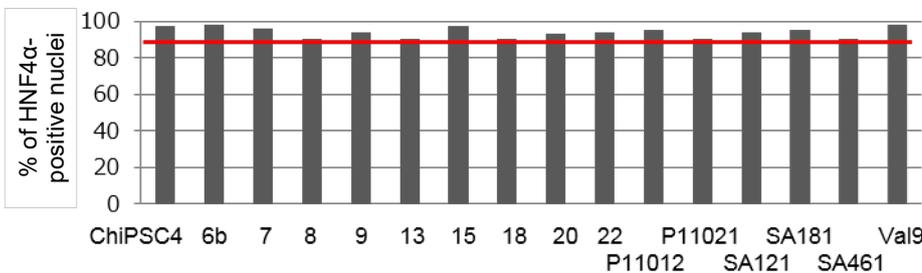


表1. Cellarits hiPSC株の分化誘導能

製品コード	製品名	初期化法	由来細胞	年齢	人種	性別	核型	分化誘導を確認※
Y00275	Cellartis human iPS cell line 7 (ChiPSC7) Kit	retroviral vectors	ヒト線維芽細胞	20	European / North African	Female	46, XX	Hepatocytes (内) Beta cells (内) Cardiomyocytes (中) Endothelial cells (中)
Y00285	Cellartis human iPS cell line 12 (ChiPSC12) Kit	retroviral vectors	ヒト線維芽細胞	24	European / North African	Male	46, XY	Hepatocytes (内) Beta cells (内) Cardiomyocytes (中) Endothelial cells (中) Neural progenitors (外)
Y00305	Cellartis human iPS cell line 18 (ChiPSC18) Kit	retroviral vectors	ヒト線維芽細胞	32.2	European / North African	Male	46, XY	Hepatocytes (内) Beta cells (内) Endothelial cells (中) Neural progenitors (外)
Y00325	Cellartis human iPS cell line 22 (ChiPSC22) Kit	retroviral vectors	ヒト線維芽細胞	32	European / North African	Male	46, XY	Hepatocytes (内) Beta cells (内) Cardiomyocytes (中) Endothelial cells (中) Neural progenitors (外)

※ ()内の文字はそれぞれ、内: 内胚葉、中: 中胚葉、外: 外胚葉の3種の胚葉系を表す。

※ 記載の無い細胞への分化能については未確認。ただし、いずれの株も*in vitro* 胚葉体 (EB) 形成による三胚葉分化については確認済み。

★POINT !

- ☑ 分化誘導実験の再現性向上には、手技のバラツキの低減だけではなく、**hiPSCの品質を均一かつ安定して維持できる培養システム**の選択とRobustな分化誘導プロトコールが有効
- ☑ DEF-CS培養システムでは、hiPSC株への依存が少ない均一な品質を維持したhiPSCの調製が可能
- ☑ DEF-CS培養システムと**Cellartis® iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System**との組み合わせにより、極めて頑健性の高い (Robust) な肝分化を実現可能

関連製品のご紹介

■ Cellartis® ヒトiPS細胞株

ほかにもドナーの異なる株を複数ラインナップ！（p6、表1を参照）

各iPS細胞株のドナー、核型、分化誘導能などの詳細情報をウェブサイトで公開中

製品名	製品説明	容量	製品コード	価格(税別)
Cellartis® human iPS cell line 18 (ChiPSC18) Kit	ヒトiPS細胞株と専用培地Cellartis DEF-CS 100 Culture Systemとのセット品	1 Kit	Y00305	¥397,000

ご購入に際してライセンス確認書が必要です。営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。詳細はお問い合わせください。

★Cellartis® human iPS cell lineの維持培養には、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System(製品コード Y30010)をおすすめします！

■ 幹細胞の保存に最適化した凍結保存液

製造元 日本全薬工業株式会社 発売元 ゼノジェンファーマ株式会社

製品名	製品説明	容量	製品コード	価格(税別)
STEM-CELLBANKER® GMP grade	ケミカリーディファインドで動物由来成分不含。GMPに準拠した製造および品質管理を実施。原薬等登録原簿(マスターファイル)に登録済み	100 ml	11924	¥28,000
※ DMSOフリーの製品もご用意！		20 ml × 4	CB047	¥28,000

■ ヒトiPS/ES細胞から肝細胞への分化誘導システム

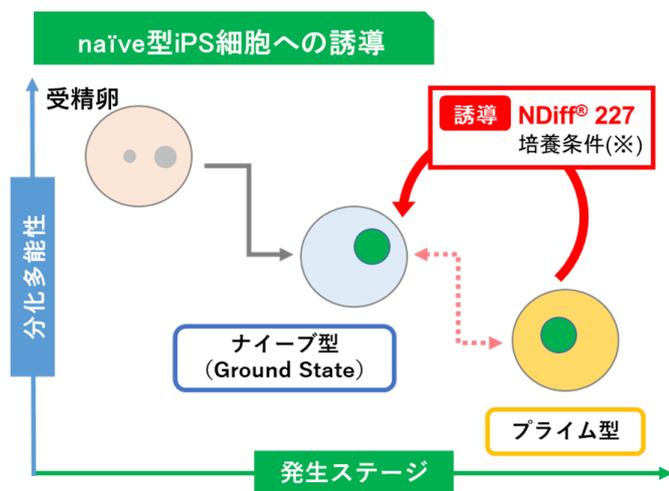
25種類以上の幹細胞株で分化誘導を確認済み！

製品名	製品説明	容量	製品コード	価格(税別)
Cellartis® iPS Cell to Hepatocyte Differentiation System	iPS細胞から肝細胞への分化誘導システム	1 Kit	Y30055	¥202,000
Cellartis® Definitive Endoderm Differentiation Kit with DEF-CS™ Culture System	iPS細胞から胚体内胚葉(DE)細胞への分化誘導キット	1 Kit	Y30035	¥95,000
Cellartis® Hepatocyte Differentiation Kit	DE細胞から肝細胞への分化誘導キット	1 Kit	Y30050	¥116,000

■ 神経分化培地

ヒトナイーブ型iPS細胞誘導の研究にも使用されています！

製品名	製品説明	容量	製品コード	価格(税別)
NDiff® 227	ヒトiPS/ES細胞のGround State維持に	500 ml	Y40002	¥55,000



(※) DOX誘導性のKLF2とNANOGを導入したヒトES/iPS細胞(プライム型)を2i、hLIF、DOXを含有するNDiff 227で培養維持することで、ナイーブ型の特徴を有するヒトES/iPS細胞へと可逆的にリセットし維持できた。

【使用文献】

Takashima Y, et al.,
Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*. (2014) 158(6):1254-1269.

・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2024年12月1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。

2024年12月修正

タカラバイオ株式会社

営業部(東京) TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 営業部(本社) 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 <https://www.takara-bio.co.jp>
 公式X @Takara_Bio_JP / https://x.com/Takara_Bio_JP

取扱店