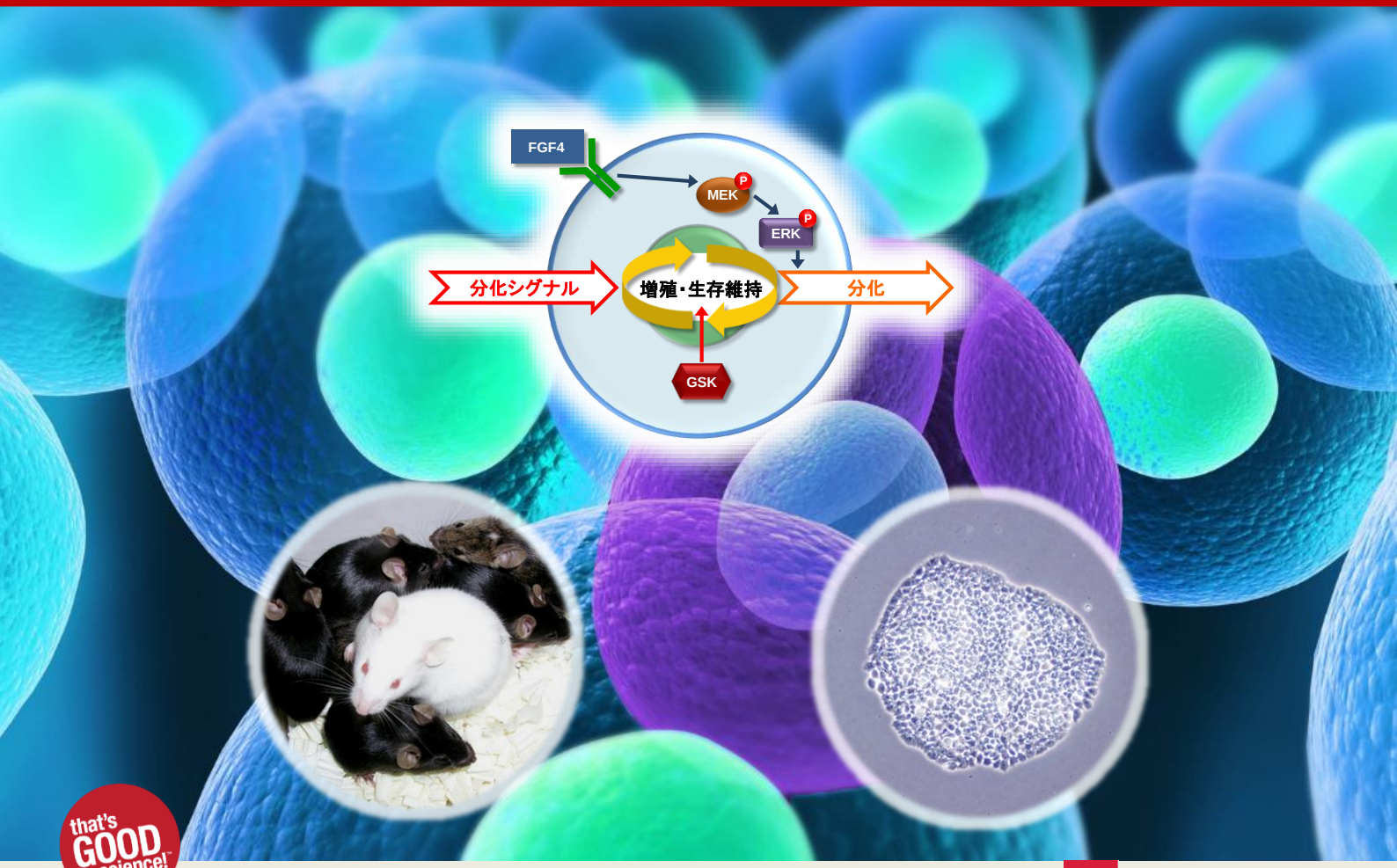
マウスES/iPS細胞用培地ガイド

（2020年7月版）

多能性幹細胞の“Ground State”の効果的維持



PRODUCTS

フィーダー 細胞 & 血清不要！ 2iテクノロジーによる“Ground State”維持

製 品 名	製品コード	容 量	価格（税別）
Cellartis® 2i mES/iPSC Culture Medium	Y40031	200 ml	¥43,000

＜製品内容＞

Cellartis mES/iPSC Culture Basal Medium	200 ml
Cellartis 2i mES/iPSC Supplement（DMSO含有）	200 µl

3iテクノロジーによる厳密な“Ground State”維持

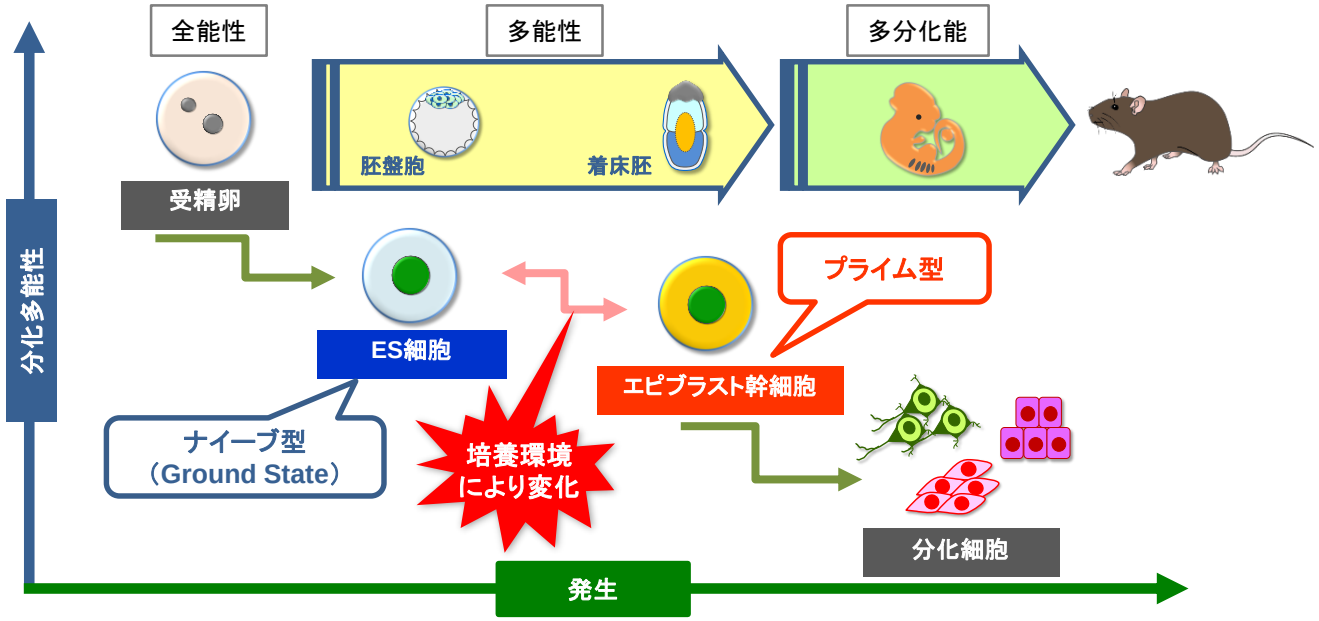
製 品 名	製品コード	容 量	価格（税別）
Cellartis® 3i mES/iPSC Culture Medium	Y40011	200 ml	¥77,000

＜製品内容＞

Cellartis mES/iPSC Culture Basal Medium	200 ml
Cellartis 3i mES/iPSC Supplement（DMSO含有）	200 µl

Clontech TaKaRa cellartis

多能性幹細胞の基底状態 “Ground State”



受精卵より樹立される多能性幹細胞であるES細胞（Embryonic Stem Cell：胚性幹細胞）は、適切な*in vitro*培養条件下で安定して増殖・維持できる（自己複製能）ほか、三胚葉を経て様々な体細胞へと分化する能力（多能性または多分化能）を有します。また、マウスES細胞では、胚盤胞移入を経て、ES細胞の形質（遺伝型）を有する個体（キメラマウス）の発生と、その後の生殖系列寄与（germline transmission）による子孫への形質伝播が可能であることが確認されています。

多能性を有するマウスES細胞として、ナイーブ型のES細胞とプライム型のエピブラスト幹細胞が存在することが知られており、中でも多能性細胞の基底状態にあることで高いキメラマウス形成、生殖系列寄与を示す状態を**“Ground State”**と呼びます。また、ナイーブ型（Ground State）のマウスES細胞は、培養環境等の影響を受けて可逆的にプライム型に変化することが報告されています。

2i／3iテクノロジーによるマウスES細胞の“Ground State”維持

図1. LIF+血清・BMP

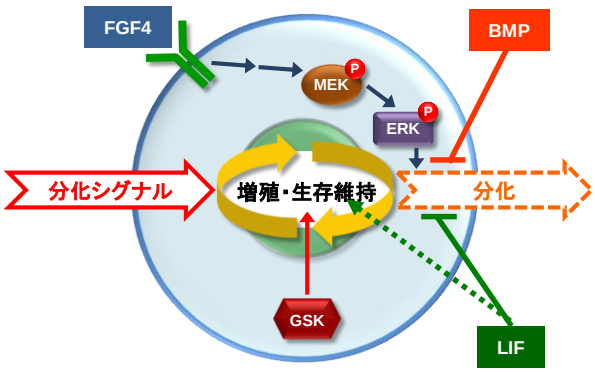


図1. 従来のES細胞維持培養用培地で必須の添加因子として用いられてきたBMPやLIFは、培養中に生じる分化や増殖・生存を妨げるシグナルを下流側で阻害する。

図2. 2iテクノロジーで用いられる2種類の低分子化合物は、分化や増殖・生存維持低下につながるシグナルを従来培養の添加因子よりも上流側（MEK, GSK）で阻害し、より強力に制御する。

図3. 3iテクノロジーでは2iで用いられる低分子化合物に加え、FGFR-TK阻害剤を用いることで、より厳密に分化シグナルを制御する。

※参考文献：*Nature* **453**, 519-523（2008）

図2. 2iテクノロジー

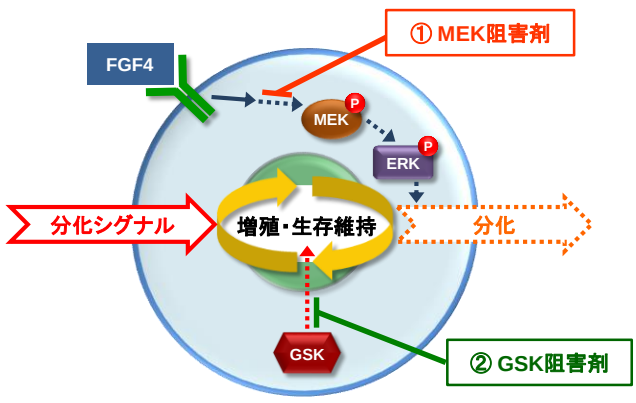
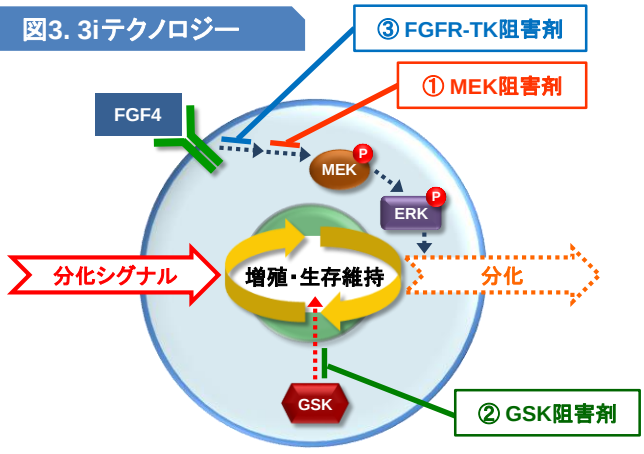


図3. 3iテクノロジー



Cellartis® 2i mES/iPSC Culture Medium　製品コード　Y40031

- **ERK/MEK, GSK3β阻害剤（2iテクノロジー）**により、培養中の分化誘導シグナルをシャットアウト
  - ➡ マウスES細胞のGround Stateを安定・高効率に維持培養
  - ➡ 高効率なキメラマウス作製
- **フィーダーフリー & 血清フリー！ LIF添加なし**でも培養可能
  - ➡ フィーダー細胞の準備やロットごとの血清品質チェックが不要
- LIF 添加によるマウスpartial iPS細胞やpre-iPS細胞の完全な多能性iPS細胞への変換も可能

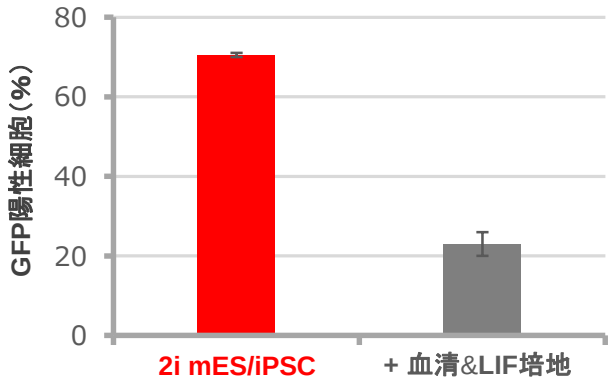
Cellartis® 3i mES/iPSC Culture Medium　製品コード　Y40011

- **ERK/MEK, GSK3β, FGFR-TK阻害剤（3iテクノロジー）**により、厳密に分化誘導シグナルをシャットアウト
  - ➡ 樹立困難なマウス種からのES細胞株の樹立時にも使用可能
  - ➡ ノックインマウスの効率的な作製が可能

これまで1～2年必要であったノックインマウス作製が2～3か月で、かつ同時進行で多種類作製できることが報告されています。

【使用文献】 Production of knock-in mice in a single generation from embryonic stem cells.
Ukai, H. *et al*., *Nature Protocols* **12**(12), 2513（2017）（文献ではiSTEMと記載されています。）

Cellartis® 2i mES/iPSC Culture MediumによるマウスES細胞のGround Stateの高効率維持



Ground State状態にあるマウスES細胞（naive型mES）のマーカー遺伝子Rex1のプロモーター下流に蛍光タンパク（GFP）遺伝子を挿入したmES細胞株（Rex1GFPd2レポーター株※）を、Cellartis® 2i mES/iPSC Culture Medium（LIF添加なし）と血清培地（10%FBS + LIF）を用いて3継代の間培養し、GFP陽性細胞（Ground State状態にあるmES細胞）の割合を評価した。

その結果、2i mES/iPSCを用いた場合に70%を超えるGFP陽性細胞が検出され、2i mES/iPSCの高効率なGround State維持が確認された。

※参考文献：*Nat. Cell Biol.* **13**, 838-845（2011）

Cellartis® 2i mES/iPSC Culture Mediumで培養したES細胞による高いキメラマウス作製率

フィーダーフリー条件下、Cellartis® 2i mES/iPSC Culture Mediumで約1週間培養したマウスES細胞を胚盤胞にインジェクションし、生まれてくるマウス個体の毛色にてキメラマウス作製率を評価した。

その結果、全身が100%黒い毛色の個体（マウスES細胞由来／写真中の白い毛色マウスは胚盤胞移植に用いた仮親マウス）を作製することができ、高いキメラ作製効率が得られることが確認された。

※本データは、新潟大学脳研究所 崎村建司先生、阿部学先生よりご提供いただきました。

Cellartis® 2i（または3i） mES/iPSC Culture Mediumを用いた標準的な培養プロトコール

1. 培地

Cellartis® 2i（または3i） mES/iPSC Culture Mediumに添付のsupplementを1/1,000量添加したもの（完全培地）

注1）抗生物質を添加する場合には、通常濃度となるよう添加してください。
注2）LIFの添加は不要ですが、10 ng/ml添加することでより安定な培養も可能です。
注3）冷蔵保存していた完全培地は、室温で2時間程度静置してから使用してください。

2. 継代

【培養器のコーティング】
下記の何れかの方法で培養プレートをコーティングする。
A) 0.1% gelatin水溶液で室温にて15分間以上静置する。
B) 0.01% poly-L-ornithine hydrobromide水溶液で37℃にて30分間以上静置後、PBSで2回洗浄し、10 µg/mlのlaminin/PBS溶液を添加して37℃で3時間以上静置する。

【継代】
① 培地を除去する。
② D-PBS(-/-)で細胞表面を洗浄する（5 ml/T25 flask）。
③ Accutase（製品コード C-41310 等）を添加後（例：1 ml/T25 flask）、CO_2インキュベータ内（37℃、5% CO_2）で5～10分間インキュベートする。
④ タッピングにより培養器より細胞を剥離する。
⑤ 新鮮な完全培地を添加し、ピペッティングによりシングルセルに分散する（例：4 ml/T25 flask）。
⑥ 細胞浮遊液を遠心管に回収した後、細胞数を計測する。
⑦ 1,100 rpm、5分間、室温で遠心する。
⑧ 上清を除いた後、細胞ペレットを新鮮な完全培地4.5 mlで再懸濁する。
⑨ コーティング済みの培養器に細胞を播種する（⑦で全量回収と想定して計算する）。

注4）マウスES細胞株によって増殖速度が異なるため、継代2～3日後に70～90%コンフルエントになる密度を目安に細胞播種密度を設定してください。
例）E14Tg2A株の細胞播種密度
2日ごとに継代する場合：6×10^4 cells/cm^2（例：1.5×10^6 cells/5 ml/T25 flask）
3日ごとに継代する場合：4×10^4 cells/cm^2（例：1.0×10^6 cells/5 ml/T25 flask）

3. 培地交換

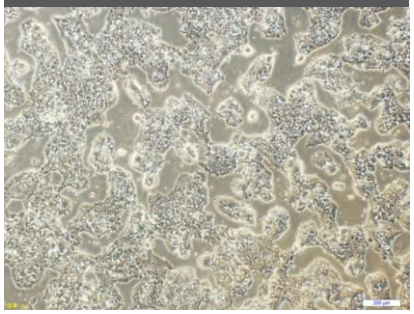
毎日または2日ごとに、全量を新鮮な完全培地に交換する。

マウスES細胞株の血清&LIF培地からCellartis® 3i mES/iPSC Culture Mediumへの移行例

血清&LIF培地中での細胞形態

移行

3i mES/iPSCへ移行後の細胞形態



血清&LIF培地（GMEM＋10% FBS & LIF）で培養中のマウスES細胞株を、推奨プロトコールに従ってCellartis® 3i mES/iPSC Culture Mediumに移行したところ、移行後2継代目には3i mES/iPSC特有の細胞形態への変化が確認された。血清&LIF培地では扁平で少し広がった形態［左写真］を示すが、3i mES/iPSCでは密度が高く、上下方向に立体的な細胞形態［右写真］へ変化している。

・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2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2月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部　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
Facebook　https://www.facebook.com/takarabio.jp

取扱店