

Application Note 2

Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture SystemによるiPS細胞のシングルセルクローニング

はじめに

ゲノム編集技術の発展により、現在ではさまざまな生物のゲノムに変異導入が可能です。ヒトiPS細胞からも、さまざまな病態疾患モデルとなる細胞や、再生医療を目的としたゲノム改変細胞の作製が可能となりました。

これまでiPS細胞を未分化状態で増殖させるためには他のiPS細胞やフィーダー細胞との細胞間接触が必要であり、シングルセルからのクローニングが困難でしたが、最近ではシングルセルクローニングを可能にする培養システムの開発が進められています。本Application Noteでは、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (製品コード Y30010) を用いてヒトiPS細胞のシングルセルクローニングを行った実験例と、他社製品よりも高いクローニング効率、良好な増殖結果を紹介します。

【材料および方法】

細胞培養

Cellartis® human iPS cell line 12、18および22 (製品コード Y00285、Y00305、Y00325) は、あらかじめCellartis® DEF-CS™ 500 Culture Systemまたは他社培地中で各推奨条件にて3週間の馴化培養を行った後、シングルセルクローニング試験に供した。各細胞を段階希釈後、96ウェルプレートに1細胞/ウェルで播種し、それぞれの培地で培養を行った。

クローニング効率と未分化維持の確認

iPS細胞を1細胞/ウェルで播種して10日間培養した後、顕微鏡観察により確かに1細胞から増殖したウェル数をカウントし、全ウェルに対するクローニング効率 (Cloning Efficiency) を算出した。さらにシングルセルから増殖したクローンの一部を継代し、9~11日間、拡大培養を行った。増殖したウェル数をカウントし、自己増殖可能なクローンの取得率 (Expanded Clones) とした。

シングルセル播種から19日間培養後、増殖したiPS細胞クローンについて未分化マーカー発現を確認した。Alexa Fluor 488 標識抗TRA1-60抗体とPhycoerythrin標識抗SSEA4抗体を用いて二重染色後、フローサイトメトリー解析により各マーカー陽性の細胞パーセントと発現強度を算出した。

【結果】

表1. シングルセルクローニングにより得られたクローン数

hiPS Cell line	Medium	Seeded Wells	Total Clones(a)	Isolated Clones(b)	Cloning Efficiency(c)	Expanded Clones(d)
Cellartis human iPS cell line 12	Cellartis DEF-CS	96	28	26	27.1 %	5/5
	B社培地	96	27	24	25.0 %	5/5
	A社培地	96	5	5	5.2 %	3/5
Cellartis human iPS cell line 18	Cellartis DEF-CS	96	33	29	30.2 %	5/5
	B社培地	96	21	20	20.8 %	1/5
	A社培地	96	0	0	0.0 %	0/0
Cellartis human iPS cell line 22	Cellartis DEF-CS	96	32	30	31.3 %	5/5
	B社培地	96	31	28	29.2 %	5/5
	A社培地	96	0	0	0.0 %	0/0

(a) Day10に増殖が見られたウェル数

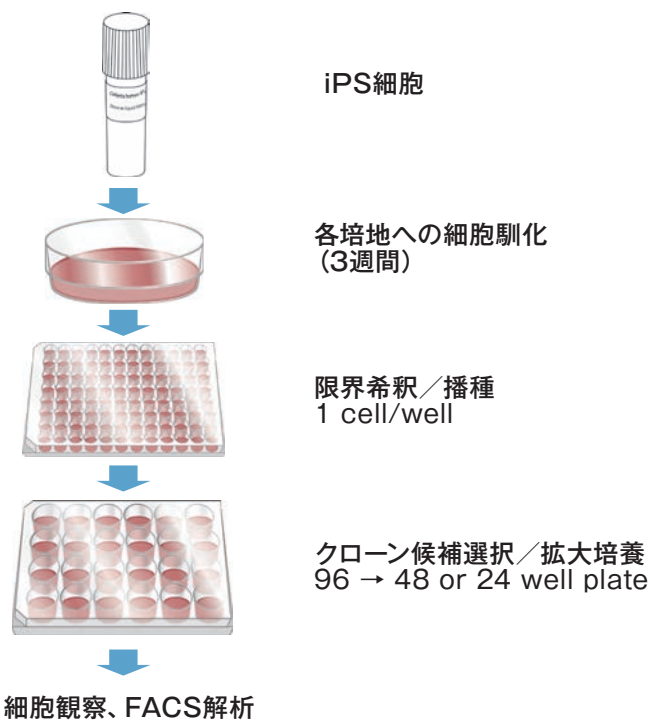
(b) Day10に増殖が見られたウェルの内、1クローン/wellであったウェル数

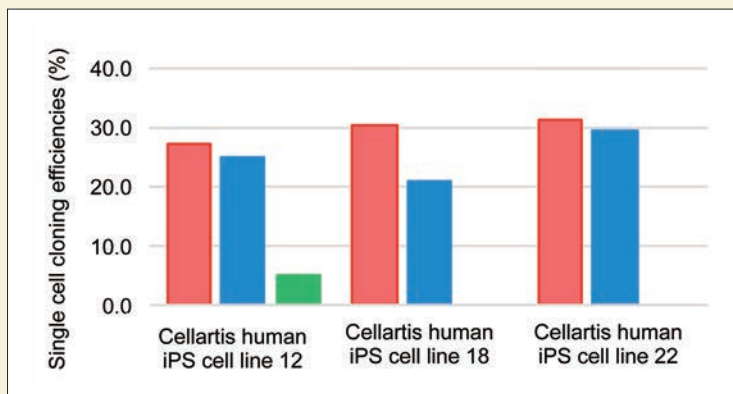
(c) 1クローン/wellで増殖が見られたウェルの割合=(b)/96

(d) 1クローン/wellで得られたクローン 5ウェルを9-11日間拡大培養し、増殖が確認された割合

(弊社比較データ)

実験フロー





■ Cellartis DEF-CS
■ B社培地
■ A社培地

図1. シングルセルクローニングの効率
表1の結果をグラフ化した。DEF-CSシステムは、3種のiPS細胞株において、他社培地と比較して最も高いシングルセルクローニング効率を示した。(弊社比較データ)

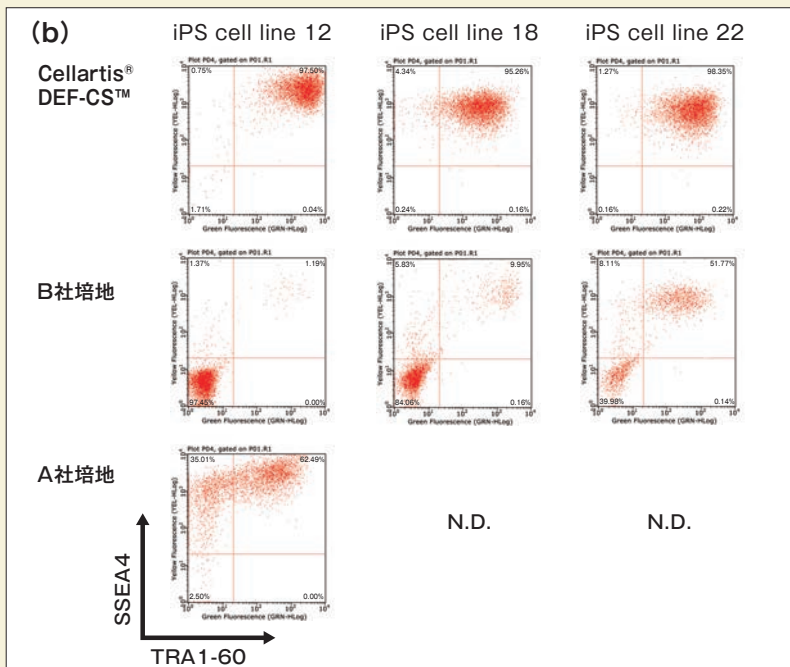
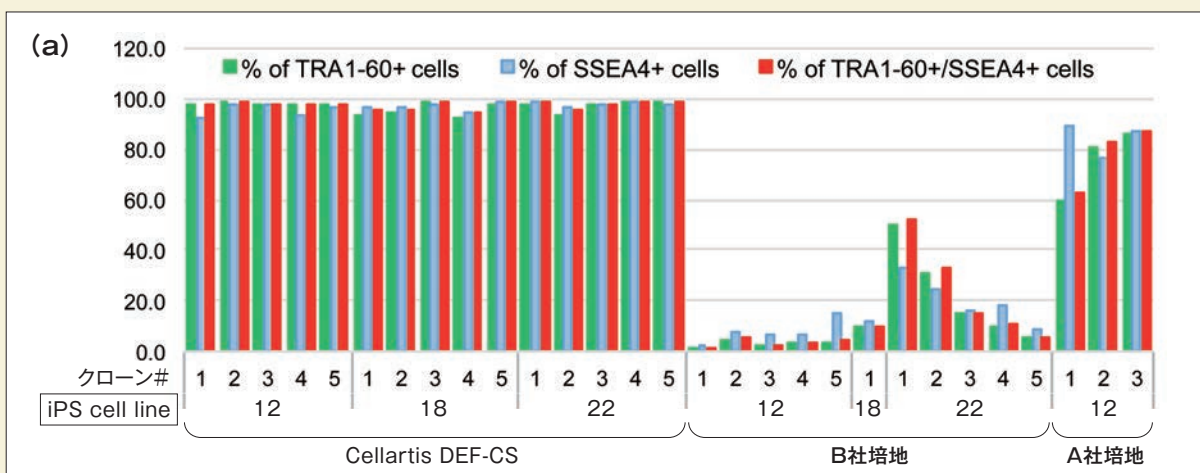


図2. TRA1-60、SSEA4未分化マーカーの発現確認

シングルセルクローニング後、拡大培養したクローン細胞について、TRA-1-60とSSEA4の発現をフローサイトメトリーで解析した。全クローンのマーカー陽性率 (a) と、各クローン #1のFCプロット図 (b) を示す。DEF-CSで取得したクローンは、未分化マーカーの高い陽性率と発現強度を示した。一方、他社培地で得られたクローンは、未分化マーカーの発現が一部またはほとんど消失していた。(弊社比較データ)

結論

Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture Systemを用いたヒトiPS細胞のシングルセルクローニングを検討した結果、他社製品と比較して高効率にiPS細胞のシングルセルクローニングが可能であり、iPS細胞がより安定に増殖することがわかりました。さらに、クローニング後のiPS細胞の未分化状態は、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture Systemでは高く維持できていましたが、他社製品では未分化マーカーの発現が一部またはほとんど消失していました。