

iPS細胞の継代 (6-wellプレートから6-wellプレートへ)

【準備するもの】

細胞

- 至適なコンフルエントに達したヒトiPS細胞

試薬

- iMatrix-511 (Laminin-511 E8)
- 10 mM Y-27632
- PBS (-)
- 0.5X TrypLE™ Select
 - * TrypLE™ Select (1 mM EDTA含有) および0.5 mM EDTA/PBSを等量混合し、調製する (最終濃度 0.75 mM EDTA) 。
- 維持培養培地 StemFit®培地 (AK03N もしくは AK02N)

物品

- 6-well プレート
- 15/50 mL コニカルチューブ
- セルスクレーパー
- ピペット

【手順】

I. 培地の準備

必要量のStemFit®培地の1/1000量の10 mM Y-27632を加えてよく混合しておく (最終濃度10 μM) (以下、StemFit+Yとする) 。

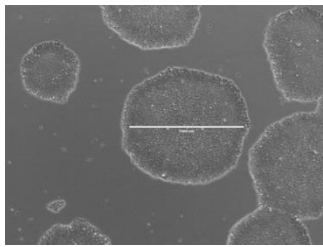
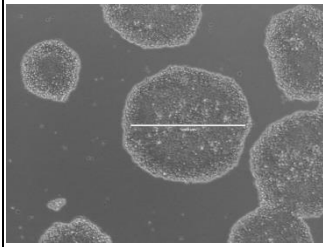
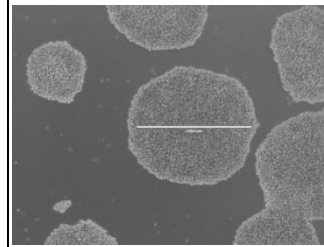
II. プレートのコーティング

1. PBS (-)で3.2 μg/mLに希釈したLaminin-511 E8溶液を、コートするウェルに1.5 mLずつ入れる。コート量は4.8 μg/well (0.5 μg/cm²) となる。
 - *まず、必要量のPBS (-)を50 mLチューブなどに入れ、そこに3.2 μg/mLになるようにLaminin-511 E8を加え、すぐによく混ぜた後、すみやかに各ウェルに1.5 mLずつ分注する。
2. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで60 min以上反応させる。
3. 反応後インキュベーターから取り出す。
4. StemFit®培地を0.75 mL/wellずつ加え良くなじませる。
5. 上清を除去する。
6. StemFit+Yを1.5 mL/well加えインキュベーターに入れておく。

III. 継代

1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し、写真撮影を行い継代に使用する。
(死細胞が多く細胞が観察しにくい場合には、新しい培地に交換して写真撮影を行う。
PBSでは細胞が剥がれる可能性があるので培地の方が好ましい)。
2. 培地を除去する。
3. PBS (-) 1 mLを加えて洗浄し、PBS (-)を除去する。
4. 0.5X TrypLE™Select を300 μ L/wellずつ加えよくなじませる。
5. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで反応させる。
 - * コロニーの中心まで細胞が解離していること（顕微鏡下ではコロニー中心部まで透過度が上昇し、細胞一つ一つが丸くなっている像がみられる）を確認した後、次の作業に移る（下表参照）。201B7株^{1), 2)} (iMatrix-511使用時)における、反応時間は7 min程度であった。

* 下表写真は、201B7株^{1), 2)}における弊社実施例

解離状態	処理前	処理がコロニー周辺のみ	処理がコロニー全体に及ぶ
画像			
コロニーの状態		コロニー周辺のみ 透過度上昇	コロニー全体の 透過度上昇

6. 0.5X TrypLE™Selectを除去する。
7. 2 mL/well のPBS (-)で洗浄し、PBS (-)を除去する（細胞が剥がれやすいので静かに加える）。
8. StemFit+Yを1 mL/well加える。
9. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
 - * ウェル底面を軽く撫でるようにスクレールする。TrypLE™Selectが十分に反応している場合、ほとんど力を入れずに抵抗感なく細胞を剥離することができる。
10. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
11. 10回ピペティングを行い新しいチューブに回収する。
(培地を加えて総量を1.5 mLにする。総量は適宜変更可能。)
- * ピペティングが弱すぎるとシングルセルになりきらない場合もあるので注意。強めでも問題ないが、チップなどの先端をプレートの底面に押し付けないようにする。
12. セルカウントを行う。
13. 13,000個の生細胞をLaminin-511 E8コーティングした6-wellプレートに1wellずつ播種する。

(細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレートを揺らし均一に広げる)

14. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで培養する。
15. 翌日、Y-27632の入っていないStemFit®培地に交換する。

* 培地交換は継代翌日、それ以降は細胞密度が低いときは隔日もしくは2日おき、細胞密度が高いときは毎日培地交換を行うことが望ましい。細胞の継代は7日±1を目途に行う。下表に弊社における培地交換スケジュール例を示す。

* 弊社における201B7株^{1), 2)}の継代スケジュール例

WED	THU	FRI	SAT	SUN	MON	TUE
継代	培地交換	培地交換	—	—	培地交換	培地交換

IV. 細胞継代後の培地交換

【準備するもの】

細胞：細胞を播種した6-wellプレート

試薬：維持培養培地 StemFit®培地 (AK03N もしくは AK02N)

物品：ピペット

【手順】

1. StemFit®培地を室温に戻しておく。
2. 位相差顕微鏡で観察し、写真を撮る。
3. 培養上清を除去する。
4. StemFit®培地を1.5 mL/well加える。
5. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで培養する。

【参考・参照文献】

- 1) Takahashi K, et al. *Cell*, 2007 Nov.30; 131(5): 861-72.
- 2) Nakagawa M, et al. *Scientific Reports* 4: 3594 (2014)
- 3) 京都大学 iPS 研究所 (CiRA) HP : 「フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立および維持培養」
http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hipsprotocolFf_140311.pdf