

201B7株オンフィーダーiPS細胞をフィーダーフリー条件にて継代する方法

【準備するもの】

細胞

- 80%コンフルエントのオンフィーダー 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) 。
- CTK溶液
 - * 2.5% trypsin 5.0 mL、1.0 mg/mL collagenaseIV 5.0 mL、0.1M CaCl₂ 0.5 mLおよびKSR 10 mLをdistilled water 30 mLに添加し調製する。-20℃で凍結保存可能。ただし、凍結融解を繰り返さない。
- 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®培地に培地の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℃、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、15 min以上（最長で60 min）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。ただし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. CTK 溶液を600 μ L/wellずつ加えよくなじませる。
5. 室温で1-2 min反応させフィーダー細胞をプレートから剥がす。
6. PBS (-) 1 mLを加えて洗浄し、PBSを除去する。
7. 0.5X TrypLE™Select を300 μ L/wellずつ加えよくなじませる。
8. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで反応させる。
 - * コロニー中心部の透過度が十分上昇したことを確認した後、次の作業に移る（細胞間接着が破壊され細胞1個1個が丸くなっている様子を確認する。）。観察時処理が不十分であった場合、さらに処理時間を延長する。201B7株^{1), 2)} (iMatrix-511使用時) における、反応時間は4-7min程度であった。
9. 0.5X TrypLE™Select を除去する。
(この時点で細胞が剥がれていることが多いので、その場合は19.に進む)
10. 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）。
11. StemFit+Yを1 mL/well加える。
12. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
13. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
14. 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。)
15. セルカウントを行う。
16. 13,000個の生細胞をLamininコーティングした6-wellプレート 1wellに播種する（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）。
17. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで培養する。
18. 翌日、Y-27632の入っていないStemFit®培地に交換する。

【途中で細胞が剥がれてしまった場合の続き（9.より）】

19. StemFit®培地を700 μ L加え（合計1000 μ L）、ピペティングを10回行い、細胞をバラバラに

する。

20. 800 rpm (160 x g)、22°C、5 minで遠心し、上清を除去してペレットをタッピングで崩す。
21. StemFit®培地を1 mL/well加え、6回ピペッティングを行い、細胞をバラバラにする。
22. セルカウントを行う。
23. 13,000個の生細胞をLamininコーティングした6-wellプレート1wellに播種する（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）。
 - * クローンにより移行状況が異なることが経験的に知られているため、使用するクローンにより播種量を調製する必要がある。
24. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで培養する。
25. 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日を目標に行う。下記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

【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