

- (8) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト末梢血単核球・単球からの iPS 細胞誘導プロトコル
(TKB_P-008-01)

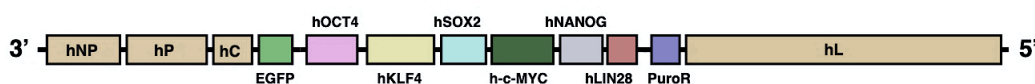
目次

I. SRV TM iPSC Vector について	p.1
II. SRV TM iPSC-3 Vector、SRV TM iPSC-4 Vector を用いた iPS 細胞誘導プロトコルについて	p.2
(8) SRV TM iPSC-4 Vector を用いたヒト末梢血単核球・単球からの iPS 細胞誘導プロトコル	p.3
III. RT-PCR による SRV TM 由来の RNA の検出方法	p.7
IV. Q&A	p.8

I. SRV™ iPSC Vector について

ときわバイオ株式会社が開発したステルス型 RNA ベクター (Stealth RNA Vector™, 略称 SRV™) は、マイナス一本鎖 RNA ウイルスの研究に基づき、RNA ゲノムを人工的に再設計して細胞障害性を抑えた遺伝子導入・発現ベクターです。1 個の SRV™ の RNA ゲノムには複数 (最大 10 個) の遺伝子を同時に搭載することができ、ヒトや動物のさまざまな細胞で長期間安定に遺伝子発現することができます。さらに、SRV™ はウイルスの粒子を作るために必要な遺伝子を含んでいないため、遺伝子を導入した細胞から感染性の二次粒子が発生する危険性はありません。また、安定な遺伝子発現は SRV™ 自身が持つ RNA 依存性 RNA polymerase (RdRp) によって維持されており、RdRp を阻害することで SRV™ を完全に細胞から消去することができます。このような SRV™ の性質は導入遺伝子による細胞リプログラミングに最適です。

SRV™ iPSC-3 Vector 及び SRV™ iPSC-4 Vector は、ヒト由来の 6 個の初期化遺伝子 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC、NANOG、LIN28) と、EGFP 遺伝子および薬剤耐性遺伝子を 1 個の SRV™ のゲノムに搭載しており、細胞に導入された初期化遺伝子は常に同じ比率で発現します。標的細胞やベクターの種類にもよりますが、4 個の初期化遺伝子 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC) に 2 個の初期化遺伝子 (NANOG、LIN28) を追加することにより、SRV™ iPSC-1 Vector や SRV™ iPSC-2 Vector よりも、iPS 細胞の作製効率が向上し、iPS 細胞の樹立までの時間が短縮されることが確認されています。



SRV™ iPSC-3 Vector、SRV™ iPSC-4 Vector のゲノム構造

SRV™ iPSC-3 Vector 及び SRV™ iPSC-4 Vector には、ベクター消去システムの違いにより、次の 2 種類があります。どちらも、標的細胞への遺伝子導入と iPS 細胞からのベクターの消失は、EGFP を指標にしてモニターすることができ、ベクター添加後 2 週間から 7 週間で、ベクターが完全に消去された iPS 細胞を得ることができます。

SRV™ iPSC-3 Vector : siRNA*を使用してベクターを除去するタイプで、線維芽細胞からの iPS 細胞誘導に適しています。

SRV™ iPSC-4 Vector : 初期化後に自動的にベクターが消去されるタイプで、末梢血や臍帯血に含まれる単核球からの iPS 細胞誘導に適しています

*SRV™ iPSC-3 Vector を細胞から除去するためには siRNA (siTB1) とトランスフェクション試薬が必要です。

siTB1 はキットに含まれていないため、以下の情報をもとにご自身で合成を発注してください。

siTB1 センス鎖 : 5' - CAAUAGUUCACGCUGAAAGug - 3'

アンチセンス鎖 : 5' - CUUUCAGCGUGAACUAUUGcu - 3'

(小文字はオーバーハング。アニーリングしてから使用のこと。)

SRV™ iPSC Vector を使って樹立した iPS 細胞からのベクターの消去は、EGFP の蛍光の消失で簡単にモニターできますが、さらに完全を期するためには、iPS 細胞から抽出した全 RNA 中に SRV™ 由来の RNA が検出されないことを RT-PCR 法で確認する方法が確実です。(「III. RT-PCR による SRV™ 由来の RNA の検出方法」参照)

使用上の注意

- ・ 本製品は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」の対象品です。
- ・ Biosafety Level 2 (BSL2)での取扱が必要ですので、必ず BSL2 準拠の安全キャビネットをご使用ください。
- ・ 本製品は研究用試薬です。使用は研究目的に限られ、医療・診断目的に使用することはできません。

II. SRV™ iPSC-3 Vector、SRV™ iPSC-4 Vector を用いた iPS 細胞誘導プロトコル

・ 培養条件について

ここでのプロトコルは、培地を StemFit® AK02N、コーティング剤を iMatrix-511 とした Feeder Free 条件での iPS 細胞の誘導方法となります。(試薬については、各メーカーの使用方法に従ってご使用ください。)

Feeder 細胞を用いた場合や、他の培地やコーティング剤を用いた Feeder Free 条件の場合も SRV™ の感染方法は同様となりますが、それ以降の条件は各自でのご検討をお願いします。特に血液細胞を標的細胞とした場合、培地やコーティング剤によってはコロニーが誘導されないこともあります。

なお、コーティング剤が乾燥しやすいので、培地交換の際には素早く行ってください。

【培地】

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

StemFit® Basic02 (AJINOMOTO, BASIC02)：標的細胞を線維芽細胞とした場合に使用

【コーティング剤】

iMatrix-511, 0.5mg/mL (nippi, 892012) : 0.25µg/cm²で添加

コーティング方法

1. iMatrix511 を PBS(-)で希釈し、プレートに添加する。
2. 37℃, CO₂ 5%インキュベータで 1 時間以上反応させ、使用直前にコーティング液を除去し培地を加える。
その際乾燥しないように素早く行う。

各 plate における 1well 当たりの容量例

培養プレート	iMatrix-511	PBS(-)	培地量
48-well plate	0.9µL	200µL	250µL
24-well plate	1.8µL	400µL	500µL
12-well plate	3.6µL	800µL	750µL
6-well plate	9.6µL	1.5mL	1.5mL

・ ベクターの融解について

ベクターは室温の水で融解し、使用までは氷中で保存してください。

一度に使用しない場合は、最初の融解時に適宜分注し、-80℃ 以下で凍結保存してください。

凍結融解を繰り返すとベクターのタイターが低下する原因となります。

・ 各標的細胞に対するプロトコル

ベクターと標的細胞の組み合わせによって推奨するプロトコルが変わりますので、適したプロトコルを選択してください。

- (6) SRV™ iPSC-3 Vector を用いたヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞誘導プロトコル
- (7) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞誘導プロトコル
- (8) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト末梢血単核球・単球からの iPS 細胞誘導プロトコル
- (9) SRV™ iPSC-3 Vector を用いたヒト CD34 陽性細胞からの iPS 細胞誘導プロトコル
- (10) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト CD34 陽性細胞からの iPS 細胞誘導プロトコル

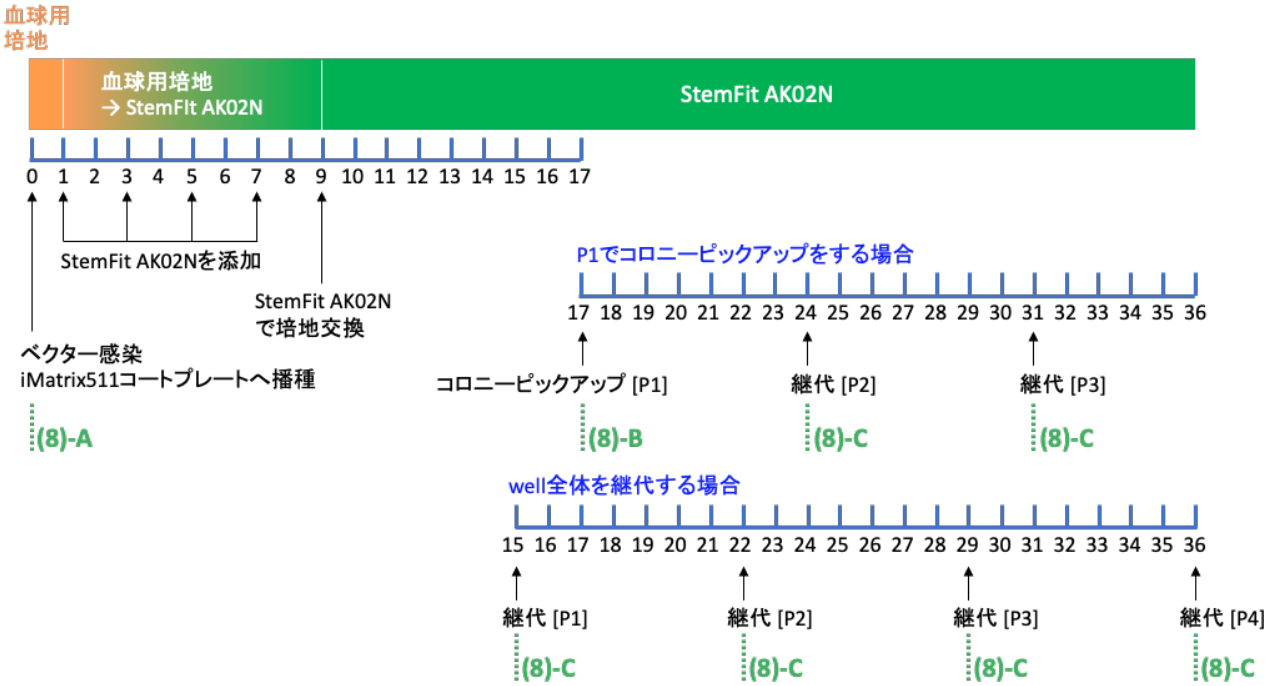
本プロトコルは、お客様の標的細胞からの iPS 細胞誘導を保証するものではありません。

プロトコルに記載の日数は目安となりますので、各実験系に合わせて実施してください。

また、「IV. Q&A」も必ずお読みになってから実験を開始してください。

(8) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト末梢血単核球単球からの iPS 細胞誘導プロトコル

実験の流れ



A. コロニー誘導

【必要なもの】

- 細胞 : ヒト末梢血単核球、単球 (市販試料、末梢血より分離精製したもの)
- 試薬 : SRV™ iPSC-4 Vector (> 3X10⁷ CIU (cell infectious unit) /mL)
- ベクター、ベクターを含んだ培地、それが付着したチップやチューブ、プレートは全て UV 照射した後、オートクレーブをかけて処理すること。
- 血球細胞用培地 A ** [RPMI1640 に FBS を 10%添加する]
- RPMI1640 (ナカライテスク, 30264-85)
- 10% FBS
- 血球細胞用培地 B ** [RPMI1640 に KSR-XF を 15%添加する]
- RPMI1640 (ナカライテスク, 30264-85)
- 15% KSR-XF [GIBCO™ CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12618013)]
- 血球細胞用無血清培地
- AIM V™ Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12055091) **
- iPS 細胞用培地
- StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N) **
- PBS(-)
- iMatrix-511, 0.5mg/mL (nippi, 892012)
- トリパンブルー溶液

**血球細胞用培地と播種用培地 (目的に応じて選択)

条件	血球細胞用培地	播種用培地
血清あり	A : 10%FBS/RPMI1640	10%FBS/RPMI1640, AK02N, AIM V
無血清	B : 15%KSR-XF/RPMI1640	AIM V

使用する培地によってコロニーの誘導効率が多少変わる。

- 器具 : 培養プレート (感染細胞の播種密度が高いほど、コロニーの出現が早く、コロニー数も多くなる。)
- 6-well plate or 12-well plate : P1でコロニーピックアップをする場合
- 48-well plate : well全体を継代する場合
- 15/50mLコニカルチューブ、1.5mLチューブ (スクリューキャップ)
- ピペッター、ピペットマン、ピペット、チップ
- セルカウンター
- 遠心機 : 単球はチューブに接着しやすいので、アングルローターでなく、スウィングローターを使用すること。
- 特に無血清培地を使用するときは、チューブに接着しやすくなり、調製中に細胞が失われるので注意する。

【手順】

Day 0

- 凍結ストック細胞
ウォーターバスで急速融解し、血球細胞用培地中に添加し遠心 (300 x g, 10min, 4°C) 後、適量の血球細胞用培地で懸濁し、細胞数をカウントする。
当日分離精製した細胞
適量の血球細胞用培地で懸濁し、細胞数をカウントする。
- 1.で準備した細胞を 1×10^5 cells/tubeで1.5mLチューブに分注し、遠心 (300 x g, 5min, 4°C) する。
- 注意深く上清を吸引除去し、タッピングしてほぐしておく。
- 1×10^5 cellsに対しMOI=3となるように、SRVTM iPSC-4 Vectorのタイターからベクター量を計算する。
 1×10^5 cells x MOI=3 $\rightarrow$ 3×10^5 CIU分を計算
例) 3×10^7 CIU/mLの場合、10 μ Lとなる。
- 4.で計算したベクターと合わせて20-33 μ Lになるように、血球細胞用培地の量を計算する。
 3×10^6 - 5×10^6 cells/mLの細胞密度での感染となる。
- ベクターを室温の水で素早く解凍後、スピンドウンし使用するまで氷上におく。
- 3.で準備した細胞に、4. 5.で計算した通りに培地とベクターを添加し、2,3回ピペッティングする。
- 細胞の入った1.5mLチューブを37°Cインキュベーターに入れ、途中2,3回タッピングしながら2時間静置する。
- 血球細胞用培地を1mL加え、遠心 (300 x g, 5min, 4°C) する。
- ベクター液を含んだ上清を除去し、細胞をタッピングしてほぐす。
9. 10. を2回繰り返す。(合計3回洗浄)
- iMatrix-511をコーティングしたプレートに播種用培地**を添加する
6-well plate : 1.5mL/well
12-well plate : 750 μ L/well
48-well plate : 200 μ L/well
- 11.で準備した感染細胞に血球細胞用培地50 μ Lを添加し、良く懸濁しながら12.のプレートに全量を添加する。
- プレートを揺らして細胞を均一に広げ、37°C, 5%CO₂インキュベーターで培養する。

Day 1, 3, 5, 7

- StemFit AK02N を元の培地量の 2/3 量を添加する。
6-well plate : 1mL/well
12-well plate : 500 μ L/well
48-well plate : 167 μ L/well

Day 9 以降

- 毎日が 1 日おきに StemFit AK02N で培地交換する。
6-well plate : 1.5mL/well
12-well plate : 750 μ L/well
48-well plate : 250 μ L/well

Day 15 以降

- コロニーが大きくなり、形状がしっかりしてきたら、以下の作業を行う。
- P1 でコロニーピックアップする場合 $\rightarrow$ B. コロニーピックアップ

well 全体を継代する場合

→ C. 継代

B. コロニーピックアップ

【必要なもの】

細胞 : iPS 細胞誘導中の EGFP 弱陽性、EGFP 陰性のコロニー

試薬 : iPS 細胞用培地

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

iMatrix-511, 0.5mg/mL (nippi, 892012)

CultureSure® Y-27632, 10mM (FUJIFILM, 036-24023)

器具 : 培養プレート

24-well plate

96-well plate (ピックアップ用)

15/50 mL コニカルチューブ

ピペッター、ピペットマン、ピペット、チップ

【手順】

1. 必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10mM Y-27632 を添加してよく混合しておく (終濃度 10 μ M)。
= [AK02N +Y 培地]
2. 96-well plate に [AK02N+Y 培地]を 50 μ L 添加しておく。
3. P10 のピペットマンを用い、顕微鏡下でコロニーを物理的に剥がして吸い取り、2.で準備したプレートに回収する。
4. iMatrix-511 をコーティングした 24-well plate に [AK02N+Y 培地] を 500 μ L/well 添加しておく。
5. 3.で回収したコロニーをピペットマンで数回ピペッティングし、4.のプレートへ移す。

コロニーピックアップの翌日、翌日以降

6. Y-27632 不含の AK02N 培地で培地交換する。

細胞が増え、コロニーが大きくなったら継代を行う。 → C. 継代

C. 継代

【必要なもの】

細胞 : iPS 細胞誘導中の EGFP 陰性のコロニー、EGFP 陽性細胞が混在するコロニー

試薬 : iPS 細胞用培地

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

iMatrix-511, 0.5mg/mL (nippi, 892012)

Accutase (ICT, AT104)

CultureSure® Y-27632, 10mM (FUJIFILM, 036-24023)

トリパンプルー溶液

器具 : 培養プレート

24-well, 12-well, 6-well plate (目的に応じて選択)

15/50 mL コニカルチューブ、1.5mL チューブ

ピペッター、ピペットマン、ピペット、チップ

セルカウンター

【手順】

1. 必要量の維持培養培地に培地の 1/1000 量の 10mM Y-27632 を添加してよく混合しておく (終濃度 10 μ M)。
= [AK02N +Y 培地]
2. iPS 細胞誘導中のプレートから培地を除去し、PBS(-)で洗浄後、Accutase を適量添加する。

48-well plate : 120 μ L/well

24-well plate : 200μL/well

12-well plate : 300μL/well

6-well plate : 500μL/well

3. 37℃インキュベータで5分反応させる。
4. ピペッティングで細胞をはがし(もしはがれにくければ、追加でインキュベートする)、1.5mL チューブに回収した後、Accutase の 1.5 倍量の AK02N で well を洗浄し、同じチューブに回収する。
5. 遠心 (200 x g, 5min, 4℃) し、上清を吸引除去し細胞をタッピングでほぐす。
6. [AK02N+Y培地] を適量添加後よく懸濁し、細胞数をカウントする。
7. iMatrix-511 をコーティングしたプレートに [AK02N+Y 培地] を添加し、 0.1×10^4 – 1.3×10^4 cells/well で細胞を播種する。

24-well plate : 0.25×10^4 cells/well

12-well plate : 0.5×10^4 cells/well

6-well plate : 1.3×10^4 cells/well

(EGFP陽性細胞を早く除きたい時は、24-well plateに 0.1×10^4 cells/wellで播種すると良い。)

8. 播種後すぐにプレートを揺らして細胞を均一に広げ、37℃, 5%CO₂ インキュベータで培養する。

継代翌日

9. Y-27632 不含の AK02N 培地で培地交換する。

継代から3日目以降

10. 毎日か1日おきに AK02N で培地交換する。

細胞が増え、コロニーが大きくなったら拡大培養を行い、必要に応じて以下の作業を行う。

- ・ベクター除去確認 (「III. RT-PCR による SRVTM 由来の RNA の検出方法」参照)
- ・iPS 細胞の性質検討 (免疫染色、フローサイトメトリー等)
- ・細胞ストック

III. RT-PCR による SRV™ 由来の RNA の検出方法

【必要なもの】

細胞 : SRV™ iPSC-1, -2, -3, -4 Vector により誘導された iPS 細胞

試薬 : RNA 抽出 kit RNeasy PLUS Mini Kit (QIAGEN, 74134)

cDNA 合成 RT-PCR kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher SCIENTIFIC, 18091050)

PCR PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa, R010A)

器具 : サーマルサイクラー

【手順】

1. SRV™ iPSC-1, -2, -3, -4 Vector により誘導された iPS 細胞から、RNeasy PLUS Mini Kit を用い、Kit のプロトコルに従い、total RNA を抽出する。
2. total RNA (0.5µg) について、SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System を用い、kit のプロトコルに従い、cDNA を合成する。RT プライマーについては kit に付属の Random Hexamer を RT-primer として用いる。
3. cDNA 1.0µL について、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用い、total volume 10µL にて、以下の条件にて PCR を行う。プライマーの配列については、表を参照のこと。

PCR 条件		
temperature	time	Cycles
98°C	10 秒	35 サイクル
55°C	5 秒	
72°C	30 秒	

primer sequence		PCR product size
MOP104	ATATGGAGTACGAGAGGACC	500bp
MOP105	CCTCAGGTTGGAGAGAGTCA	

【実験例】

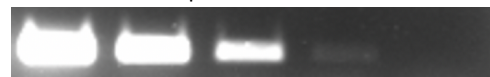
SRV™ Vector を含まないことを確認済みの iPS 細胞と、SRV™ Vector 陽性細胞を混合して検討を行った。陽性細胞は、SRV™ Vector を含まない iPS 細胞に上記 primer 配列を含む SRV™ control Vector を感染させて作製した。

樹立した TIG3 細胞由来 iPS 細胞 1x10⁶ 個に、細胞数を変えて (1000、100、10、1、0 個) 陽性細胞を加えたものから、total RNA を抽出し、RT-PCR の後、ベクターゲノムを標的にした PCR を行った。その結果、感染細胞1個を含む細胞群から抽出した total RNA からでも目的の PCR 産物の増幅が確認できた。

【細胞から抽出した total RNA の RT-PCR】



【標的配列を含む plasmid DNA を鋳型にした PCR】



Lane No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR産物	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—

細胞から抽出した total RNA の RT-PCR			
Lane No.	非感染細胞	感染細胞数	PCR 産物
1	1x10 ⁶ 個	1000 個	+
2		100 個	+
3		10 個	+
4		1 個	+
5		0 個	—

標的配列を含む plasmid DNA を鋳型にした PCR		
Lane No.	Plasmid copy 数	PCR 産物
6	20000 コピー	+
7	2000 コピー	+
8	200 コピー	+
9	20 コピー	+
10	0 コピー	—

IV. Q&A

II-(8) SRV™ iPSC-4 Vector を用いたヒト末梢血単核球、単球からの iPS 細胞誘導プロトコル

Q1 感染細胞を播種したのですが細胞が非常に少ないです。

A1 調製中に細胞を失った可能性があります。単球は、アングルローターで遠心するとチューブに吸着しやすいので、スウィングローターを使用してください。また、無血清培地で細胞を調製するとさらにロスしやすいのでご注意ください。

Q2 なかなかコロニーが出てきません。

A2 感染後 10 日を過ぎないとコロニーの形状にならないので、しばらくお待ちください。

Q3 P1 で 10 コロニー以上ピックアップしたいのですが、1well 播種すれば良いですか。

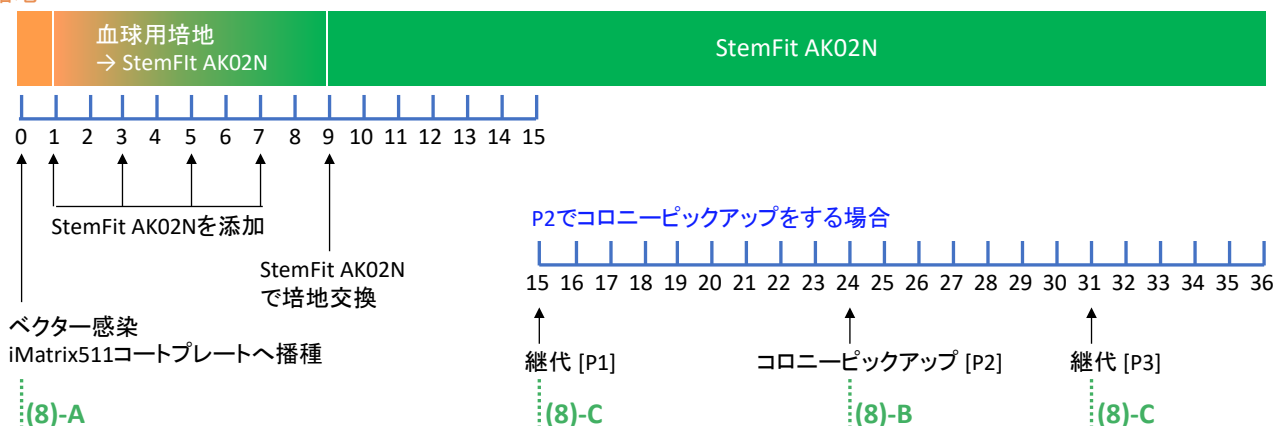
A3 1×10^5 cells/well を 2well 以上播種していただくと安心です。

Q4 P1 でコロニーピックアップしようと思いましたが、EGFP 陽性細胞が混在しています。

A4-1 多少 EGFP 陽性細胞が混入していても、継代するごとに減っていきますのでそのまま続けてください。

A4-2 P1 で well 全体を剥がして 6well plate に継代すると、混在する EGFP 陽性細胞が減り、P2 で容易にコロニーピックアップすることができます。P1 の細胞数は 0.1×10^4 - 0.5×10^4 cells/well で播種してください。

血球用
培地



Q5 いつまでも EGFP 陽性細胞が消えません。

A5-1 コロニーピックアップで EGFP 陰性コロニーを選んでください。

A5-2 SRV™ iPSC-3 Vector と同じ siRNA を使用することができるので、siRNA 導入をお試しください。(プロトコル(6)-B 参照)

ご不明な点がございましたら、メールにてお問い合わせください。

お問い合わせ先 : tech@tokiwa-bio.com