

Laminin-521 を用いた ヒト ES/iPS 細胞の培養と凍結保存

Vol. 10
2014.02宮崎隆道 先生¹、中辻憲夫 先生^{2,3}、末盛博文 先生¹¹ 京都大学再生医科学研究所 胚性幹細胞研究分野² 京都大学 物質・細胞統合システム拠点³ 京都大学再生医科学研究所 発生分化研究分野

参考文献

Miyazaki, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H. (2013), Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis*. doi: 10.1002/dvg.22725

要訳

ES 細胞と iPS 細胞は、両者とも多様な細胞に分化できる多能性、そして自己複製能を持つことから多能性幹細胞と呼ばれており、難病研究や再生医療への応用が期待されています。

ヒト多能性幹細胞 (human pluripotent stem cells: hPSCs) の長期保存や容易な輸送のために、hPSCs を凍結保存する方法がありますが、凍結融解後の細胞生存率が低いという課題がありました。また、細胞培養基質として従来は主にマウス肉腫細胞由来のマトリックス /Matrigel を使用していましたが、将来の hPSCs 移植療法においては xeno-free (異種由来成分を含まない条件) が求められます。今回、著者らは、hPSCs をコロニーではなく 1 細胞に単離 (シングル化) してから凍結することで、融解後の生存率が向上することを見出しました。さらに、ヒト組換えタンパク質である Laminin-521 を培養基質に使用することで、凍結融解したシングル化 hPSCs の生存率が向上すること、細胞密度が従来より低い条件でも高い生存率を示すこと、3 日以内に継代できるほどコロニー形成スピードが速いことを明らかにしました。Laminin-521 は、シングル化した hPSCs の接着を促進することで、高い細胞生存率に寄与していることが示唆されます。これらの知見は、hPSCs の大量凍結保存や細胞処理の自動化に応用できると期待されます。

文献中での Laminin-521 の活用例

【マトリックスコーティング】

Laminin-521 を D-PBS で希釈し、プレートに対して $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように使用前に室温にて 3 時間コーティング処理。Laminin-521 をコーティングした 6 または 12 ウェルプレートで凍結前の hPSCs を培養。また同条件で、24 プレートで、凍結融解したシングル化 hPSCs を培養。

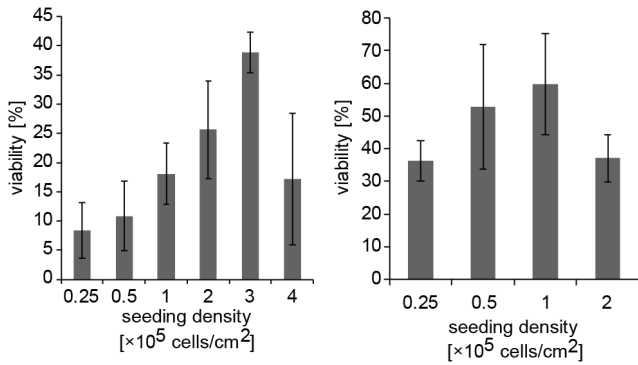
実験に使用した試薬

- Laminin-521 (BioLamina 社)
- TeSR2 (STEMCELL Technologies 社)
- 4.8 mM EDTA/PBS
- TrypLE Select (トリプシン代替品)
- DMSO
- D-PBS

【試験方法】

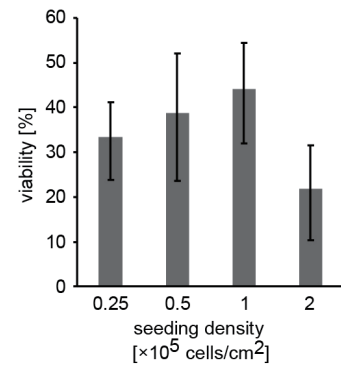
1. ヒト ES 細胞株 (H9) またはヒト iPS 細胞 (253G1) を、Laminin-521 コーティングしたプレートにて TeSR2 培地で培養する
2. セミコンフルエント状態の hPSCs に 4.8mM EDTA/PBS を添加して 37°C で 3 分間インキュベートした後、TrypLE Select を添加して 37°C で 1 分間処理する
3. 細胞を採取して 200 × g (4°C) で 3 分間遠心分離する
4. $2.0\sim 2.2 \times 10^6$ 個の hPSCs を 0.5ml の TeSR2 に懸濁し、さらに同量の 20% DMSO を含む TeSR2 と混合する
5. 細胞懸濁液をバイアルに移し、凍結処理容器に入れて -80°C で 24 時間保存する
6. バイアルを液体窒素に移し、1 週間以上保存する
7. 37°C のウォーターバスで細胞を融解した後、冷蔵した TeSR2 を添加して 200 × g で 3 分間遠心分離する
8. 各試験で使用する濃度となるように、TeSR2 で細胞を希釈する
9. Laminin-521 コーティングした 24 ウェルプレートに細胞懸濁液を添加
10. 培養開始 12 時間後、D-PBS で 2 度洗い、0.25% trypsin/ETDA で細胞を剥離し、ヘモサイトメーターで細胞数を計測する
11. 培養開始 3 日後と継代後の細胞に対してフローサイトメトリー解析を行う

【結果】



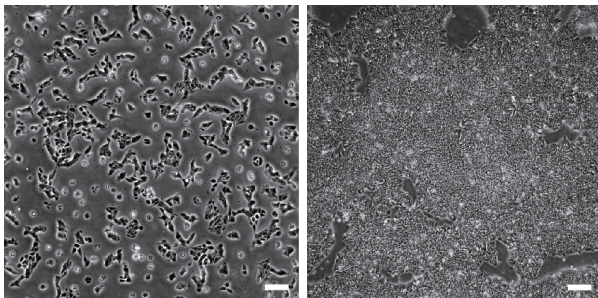
シングル化した H9 を凍結融解したときの細胞密度別の生存率

同条件の試験において、培地として mTeSR1、コーティングとして Matrigel (25 μ g/cm²) を使用した場合 (左図) に比べ、TeSR2、Laminin-521 を使用した場合 (右図) のほうが、ヒト ES 細胞株 H9 の凍結融解後の生存率が高くなっています。また、Laminin-521 使用時の最適細胞密度は 1.0×10^5 cells/cm² であり、より低い細胞密度でも高い生存率を示しています。



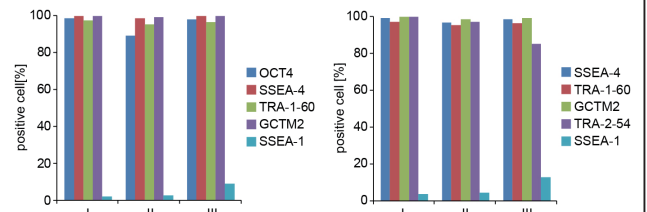
シングル化した 253G1 の凍結融解後の生存率

iPS 細胞株の 253G1 においても、Laminin-521 の使用で凍結融解後に高い生存率を示しています。



凍結融解後のシングル化した H9 は急速にコロニーを形成する

シングル化した H9 を凍結融解後、Laminin-521 コーティング上で培養し、12 時間後 (左図) と 3 日後 (右図) に撮影した位相差画像です。培養開始 12 時間後にはコロニーを形成しており、3 日後には継代可能な状態となっています。



凍結融解後のシングル化した hPSCs は未分化の状態を維持する

- I. 凍結前
- II. 凍結融解から培養 3 日目
- III. 継代培養時

フローサイトメトリー解析の結果、H9 (左図)、253G1 (右図) ともに凍結融解前と同様、未分化な状態を維持していることがわかりました。

著者のコメント

Laminin-521 を培養基質としてコーティングすることで、シングルセル状態にしたヒト多能性幹細胞の接着と生存を大幅に改善することができた。

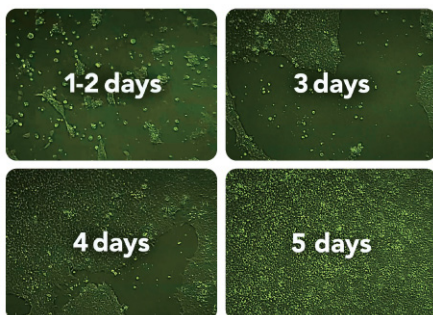
凍結解凍時のみならず継代培養時においても細胞生存率が高まるので、Laminin-521 を使用することでヒト多能性幹細胞の培養効率を上げることができると言える。TeSR2 培地を用いることで、フィーダーフリー培養条件においてもヒト多能性幹細胞を安定に維持することができ、凍結解凍の実験操作や通常の継代培養を容易に行うことができた。

BioLamina 社 Laminin-521 の特長

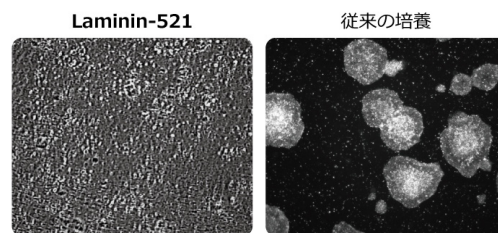
BioLamina 社は、ラミニン研究の権威であるスウェーデン・カロリンスカ研究所の Prof. Karl Tryggvason と Dr. Kristian Tryggvason により 2008 年に設立され、HEK293 細胞で産生した defined（組成が明らか）なヒトリコンビナントラミニンを供給しています。

Laminin-521（旧称：Laminin-11）はヒト初期胚細胞で発現するラミニンで、ES/iPS 細胞のような多能性幹細胞培養時の培養ディッシュのコーティングに最適な物質です。ヒト ES/iPS 細胞は、Laminin-521 をコーティングした表面で、シングルセル化した細胞から均一に単層培養および継代培養ができます。ROCK inhibitor 不要、defined、フィーダーフリー、動物由来成分フリーの培養システムで多能性マーカーを発現するヒト ES/iPS 細胞の自己再生を長期にわたり維持します。

多能性幹細胞をシングルセルから均一に単層培養！

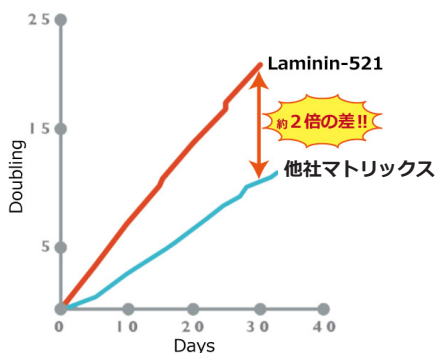


生体内の環境に最も近い条件で培養可能！

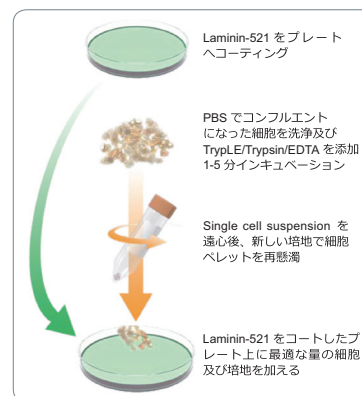


従来の培養では ES/iPS 細胞はコロニー状に生育し効率的な増殖を妨げる原因となりますが、Laminin-521 なら生体内の環境に最も近い培養を実現し、細胞はディッシュ上で均一に成育します。

増殖速度が他社マトリックスの 2 倍！



簡単な継代操作！



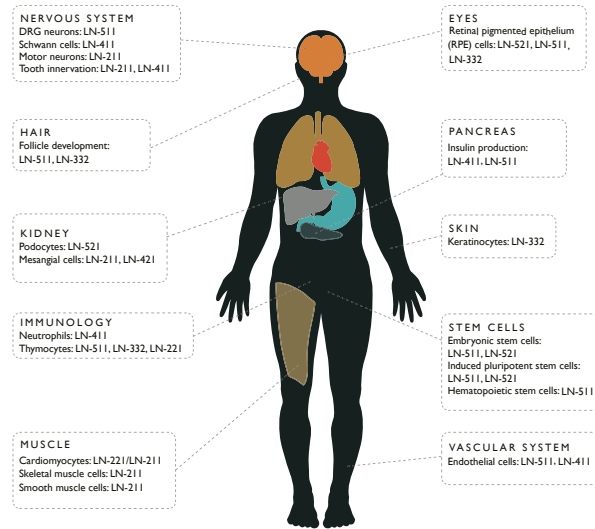
Laminin-521 の使用文献例

・ Laminin-521 でのヒト ES 細胞クローニング

Rodin S *et al.*, (2014) Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nature Communications*. 5:3195

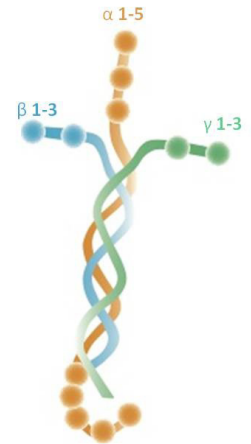
・ Laminin-521 での iPS 細胞誘導

Lu HF *et al.*, (2014) A defined xeno-free and feeder-free culture system for the derivation, expansion and direct differentiation of transgene-free patient-specific induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 35(9):2816-26



ヒト組換えラミニンのラインナップ

- **Laminin-111**
初期上皮系細胞の発生およびエピプラストの分化をサポート
- **Laminin-211**
運動神経、心筋系、骨格筋等を含む広い範囲の組織をサポート
- **Laminin-332**
ケラチノサイトの増殖や、皮膚と表皮と真皮の間に存在する皮膚基底膜を構成
- **Laminin-411**
血管系、免疫系、神経系や脾臓系の細胞等広い範囲の組織をサポート
- **Laminin-421**
腎臓、シナプスおよび炎症機能をサポート
- **Laminin-511、521**
フィーダー細胞を用いることなく、ヒト ES 細胞を未分化のまま数ヶ月間維持培養



商品コード	商品名	梱包単位	備考
BLA-LN521-02	Human recombinant laminin 521	100 µg	ヒト組換えラミニンには他にも豊富なラインナップがございます。 ↓ http://www.veritastk.co.jp/cat/MED-BLA/
BLA-LN521-03	Human recombinant laminin 521	1 mg	
BLA-LN521-04	Human recombinant laminin 521	5 mg	
ST-05860	TeSR2	500 mL	ヒト多能性幹細胞維持培地 (フィーダーフリー、異種由来タンパク不含)
ST-05850	mTeSR1	500 mL	ヒト多能性幹細胞維持培地 (フィーダーフリー、無血清)
ST-05850G	mTeSR WO 2ME/MV	500 mL	mTeSR1 から 2-メルカプトエタノールおよびメタパナジン酸アンモニウムを抜いた製品。毒劇物非該当。

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレーターは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の理解を得てお届けしています。
ご質問・ご意見は(株)ベリタス技術推進部 (TEL: 03-3593-3385 E-Mail: techservice@veritastk.co.jp) までお願い致します。

RBLF-14-0294