

研究用試薬



iPS 細胞作製用センダイウイルスベクターキット

*CytoTune*<sup>®</sup>-iPS 2.0

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。

## 目次

<b>I. <u>本製品 CytoTune®-iPS 2.0 について</u></b>	<b>3</b>
<b>II. <u>センダイウイルスベクターについて</u></b>	<b>3</b>
II-1 センダイウイルスベクターの特徴	3
II-2 センダイウイルスについて	4
II-3 センダイウイルスのベクター化について	4
<b>III. <u>CytoTune®-iPS 2.0 を使用した iPS 細胞の作製について</u></b>	<b>5</b>
III-1 本製品の構成	5
III-2 搭載遺伝子の情報	5
III-3 輸送および保管温度	5
III-4 本製品以外に必要な器具・装置	5
1). 器具・装置	5
III-5 本製品を使用した iPS 細胞誘導の実施例	5
1). ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (BJ 細胞) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder Free 法)	5
[BJ 細胞用の試薬]	5
[iPS 細胞誘導手順]	6
2). 末梢血単核球 (PBMC) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder Free 法)	7
[PBMC 用の試薬]	7
[iPS 細胞誘導手順]	7
3). マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder 法)	8
[MEF 用の試薬]	8
[iPS 細胞誘導手順]	9
4). iPS 細胞誘導後 (共通)	10
[アルカリホスファターゼ (ALP) 染色]	10
[センダイウイルスベクターフリーの iPS 細胞の取得]	10
[参考: センダイウイルスベクターの検出方法]	10
<b>IV. <u>Q&amp;A</u></b>	<b>11</b>
<b>V. <u>参考文献</u></b>	<b>12</b>
参考文献	12
<b>VI. <u>本製品の使用上の注意点</u></b>	<b>13</b>
必ずお守り下さい	13
付記	13

## I. 本製品 CytoTune®-iPS 2.0 について

CytoTune®-iPS は、分化した細胞を効率よく初期化する、いわゆる山中 4 遺伝子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) をセンダイウイルスベクター (SeV ベクター) に搭載した製品です。これらを適切に使用することにより、ヒトなどの体細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を誘導できることが示されています。SeV ベクターの特性により、本製品で誘導された iPS 細胞は染色体に傷害がなく、細胞からベクターや導入した初期化遺伝子を取り除くことが出来ます。また、本製品で使用されている SeV ベクターは、遺伝子導入細胞から感染性ウイルス粒子を産生、放出しないなど、環境と安全性への影響について配慮した改良がなされています。

CytoTune®-iPS 2.0 では、OCT3/4、SOX2、KLF4 を一つの温度感受性の SeV ベクターに搭載し (KOS ベクター)、これと KLF4、c-MYC ベクターを組み合わせることにより 従来の製品より効率のよい誘導と、迅速なベクター消去を実現いたしました。

本製品は、センダイウイルスベクターに関する株式会社 ID ファーマの特許上の独占的技術と、初期化遺伝子に関する iPS アカデミアジャパン株式会社の独占的技術から構成されています。

## II. センダイウイルスベクターについて

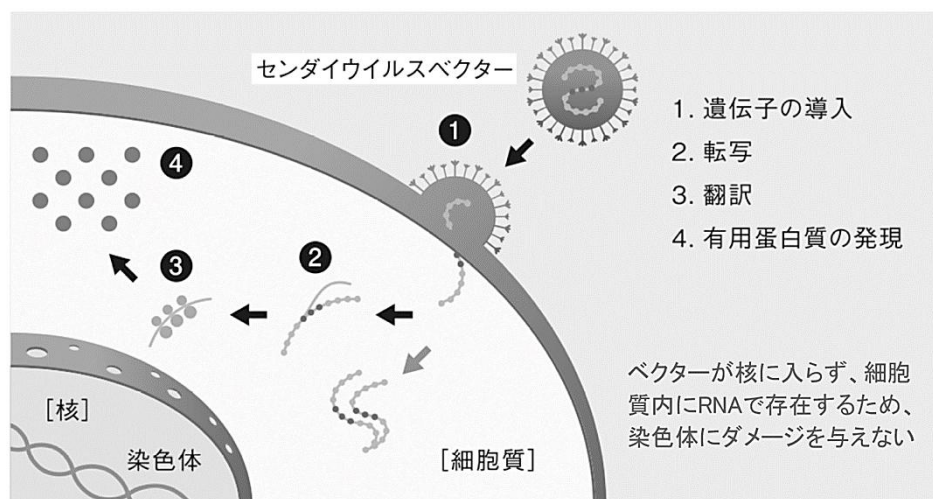
### II-1 センダイウイルスベクターの特徴

本製品で使用されている SeV ベクターは以下の特徴を持っています。

- 1). RNA として細胞質に留まり機能するため、標的細胞の染色体に組み込まれることが原理的になく、遺伝的毒性がない
- 2). 分裂、非分裂細胞を問わず、ヒトを含むさまざまな動物細胞種 (少なくとも哺乳動物と鳥類細胞を含む) に遺伝子導入が可能である (naïve T 細胞<sup>†</sup>、一部のがん細胞などで導入効率が低い例があり、その場合は工夫を必要とする)
- 3). 低い感染価 (少ないベクター量) でも高い遺伝子導入効率が得られる
- 4). 標的細胞との短い時間の接触でも高い遺伝子導入効率が得られる
- 5). 搭載遺伝子の高い発現が得られる
- 6). 遺伝子導入 6~10 時間後から発現を確認することができる (最大の発現は 24 時間以降)
- 7). 標的細胞の処理後、ベクターおよび導入遺伝子を細胞から除去することができる
- 8). 遺伝子導入細胞から感染能を持つウイルス粒子は産生されない
- 9). ヒトでの病原性が報告されていないセンダイウイルスからデザインされたベクターである

このような特徴から、SeV ベクターは細胞質型 RNA ベクターという新しい概念の遺伝子デリバリーシステムとして、遺伝子治療、遺伝子ワクチンとして開発されている他、広くバイオ分野の研究ツール、バイオプロダクツの製造ツールとして使用されています。

<sup>†</sup> : Okano, S. et al. Gene Ther, 10, 1381-1391(2003).



## II-2 センドイウイルスについて

センドイウイルス (Sendai virus, SeV) は、マウスやラットの呼吸器感染ウイルスであり、パラミクソウイルス科のマウスパラインフルエンザウイルス 1 型に分類されます。SeV は 1950 年代前半に日本で初めて分離され、SeV という通称以外に HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) とも呼ばれています。1 本のマイナス鎖 RNA (全長 15,384 塩基) をゲノムにもつ直径 150-250 nm のエンベロープ型ウイルスです。ゲノムには 3'末端から順に、ヌクレオカプシド蛋白質 (Nucleocapsid Protein, NP)、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白質 (Phosphoprotein, P)、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリクス蛋白質 (Matrix protein, M)、標的細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 (Fusion protein, F)、標的細胞との結合にかかわる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ (Hemagglutinin-Neuraminidase, HN)、RNA ポリメラーゼの大サブユニットである巨大蛋白質 (Large protein, L) の主要な 6 種の蛋白質をコードする遺伝子が配置されています。細胞表面のシアル酸を主要な受容体として感染するため、多くの動物種の多様な細胞に接着可能です。感染が成立するためには、膜融合蛋白質が、標的細胞のプロテアーゼにより活性化される必要があります。感染後は、細胞質内で自己複製と自己蛋白質の産生を経て子ウイルス粒子として放出されます。

## II-3 センドイウイルスのベクター化について

本製品に使用されている SeV ベクターは、NP、P、M、F (活性化済み)、HN、L の構成蛋白質と F 遺伝子を欠失させた SeV ゲノムより構成されています。広範な細胞への遺伝子導入能を維持している他、SeV ゲノム上より F 遺伝子を欠失させて、遺伝子導入細胞から感染可能なウイルス粒子が産生されないよう工夫されています。また、温度感受性変異などアミノ酸レベルの変異を導入してベクターを除去しやすいようにしています (SeV/TSΔF、SeV/TS12ΔF、SeV/TS15ΔF)。

染色体に組み込まれて遺伝子を発現するレトロウイルスベクター、あるいは細胞核内で染色体から離れて DNA として存在し、一定頻度で染色体に組み込まれる恐れがあるアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、プラスミドベクターなどに対し、SeV ベクターは細胞質で全生活環を通して RNA の状態で存在するため、染色体ゲノムへの組み込みによる挿入変異や染色体の構造変化を惹起する恐れがありません。

本製品の商業的利用にかかわる権利には、日本を含む世界主要各国で株式会社 ID ファーマが独占的に所有している特許等 (特許第 4999330 号、特許第 5438149 号、特許第 5763340 号、特許第 6402129 号、特許第 5908838 号、特許第 6543194 号あるいは/ならびにこれらのパテントファミリーに属する外国特許および特許出願) が含まれます。

### III. CytoTune®-iPS 2.0 を使用した iPS 細胞の作製について

#### III-1 本製品の構成

SeV KOS	(橙色キャップ : SeV(PM)hKOS/TS12ΔF)	100 μL (8 × 10 <sup>6</sup> CIU 以上/ 100 μL)
SeV Klf4	(赤色キャップ : SeV18+hKLF4/TSΔF)	100 μL (8 × 10 <sup>6</sup> CIU 以上/ 100 μL)
SeV c-Myc	(白色キャップ : SeV(HNL)hc-Myc/TS15ΔF)	100 μL (8 × 10 <sup>6</sup> CIU 以上/ 100 μL)

ヒト線維芽細胞株 BJ 細胞を用いた場合、1 × 10<sup>6</sup> の細胞に対して 1 回の実験が可能です。

力価については製品の COA をご参照ください。

本製品は無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験合格品です。

#### III-2 搭載遺伝子の情報

本製品は下記に示す遺伝子情報 (GenBank Accession No.) に基づきヒト遺伝子を用いて構築しています。

*OCT3/4* : NM\_002701.4

*SOX2* : NM\_003106.2

*KLF4* : BC029923.1

*c-MYC* : K02276.1

#### III-3 輸送および保管温度

- 本製品の輸送はドライアイスで行なわれます。
- 受取後は-70℃以下で保管してください。
- COA に記載されている使用期限内にご使用ください。

#### III-4 本製品以外に必要な器具・装置

##### 1). 器具・装置

- CO<sub>2</sub> インキュベーター
- 細胞カウンター
- ウォーターバス
- 倒立顕微鏡
- 遠心機
- 培養プレート (6-ウェルプレート、12-ウェルプレートなど)
- 培養フラスコ (T25 など)
- 遠沈管
- ピペット (5 mL~50 mL)
- マイクロピペット (20 μL~1000 μL)

#### III-5 本製品を使用した iPS 細胞誘導の実施例

本例示は、本製品使用者が標的とする細胞からの iPS 細胞誘導を保証するものではありません。

##### 1). ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (BJ 細胞; ATCC, CRL2522) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder Free 法)

##### [BJ 細胞用の試薬]

- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, no calcium, no magnesium (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 14190144)
- iMatrix-511 (ニッピ, Cat. No. 892 012)

- 0.25% Trypsin-EDTA 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 25200056)

#### BJ 細胞用培地 (BJ 培地)

DMEM に対して 10%の FBS、1%のペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を添加し、BJ 培地を調製する。

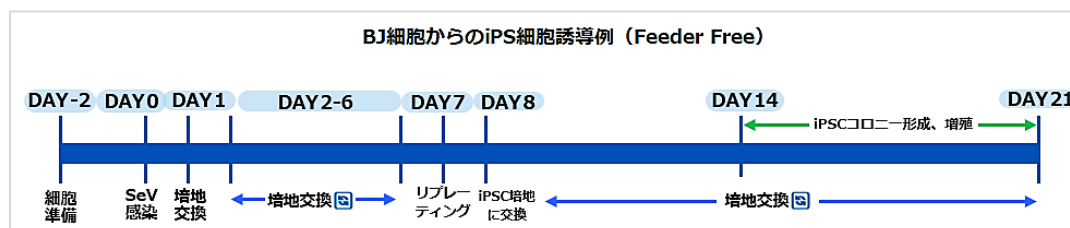
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11995065)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク, Cat. No. 26253-84)

#### iPS 細胞用培地 (iPSC 培地)

- StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ株式会社, Cat. No. AK02N)

#### [iPS 細胞誘導手順]

1. 遺伝子導入 2 日前に、6-ウェルプレートに BJ 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに静置する。(初期化効率に影響する可能性があるため、できるだけ継代数の若い細胞を使用する)
2. 遺伝子導入当日に、任意の 1 ウェルの細胞数をカウントする。
3. カウントした細胞数と、各ベクターの titer から遺伝子導入に必要なウイルス液量を計算する。遺伝子導入時の MOI は、KOS:Klf4:Myc=5:5:5 とする。  
例) 遺伝子導入当日の細胞数が  $5 \times 10^5$  cells/well の場合、各ベクターの必要量は  $2.5 \times 10^6$  CIU/well
4. CytoTune®-iPS 2.0 の各チューブ下端を 37℃ウォーターバスに浸し、半分くらい融解したところで素早くウォーターバスから取り出し、余熱で最後まで溶かして氷中に移す。  
注) 解凍後のベクターは、再凍結、再融解せず使い切るようにすること。
5. BJ 培地 1 mL にステップ 3 で計算したベクター必要量の KOS、Klf4、Myc それぞれを添加し、混和する。5 分以内にステップ 6 に従って遺伝子導入を行う。
6. ステップ 1 で用意した BJ 細胞の培地を吸引除去し、直ちにステップ 5 で用意した CytoTune®-iPS 2.0 培地混液全量を、細胞が剥がれないように静かに 1 ウェルに添加し、全体によくなじませる。
7. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに 6-ウェルプレートを静置する。
8. 翌日、BJ 培地で培地交換する (2 mL/well)。(遺伝子導入の翌日以降、細胞が丸くなり、接着が弱くなる場合もあるので培地交換は丁寧に行う。一部の細胞が剥がれた場合でもそのまま次のステップに進む。)
9. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターでさらに 6 日間培養する。その間、BJ 培地を用いて毎日または、少なくとも 1 日おきに培地交換する。
10. リプレーティング用の培養プレートにプレコート法で iMatrix-511 のコーティング処理を行う。
11. 遺伝子導入 7 日後の細胞から培地を取り除き、DPBS で 2 回洗浄する。
12. DPBS で 5 倍希釈した 0.25%Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin-EDTA) 溶液を 500  $\mu$ L/well 加え、室温または 37℃に数分間静置する。細胞が丸くなったことを確認したら、BJ 培地を加えて、剥離した細胞を回収する。  
(iPS 細胞の誘導効率に影響する可能性があるため、トリプシン処理は必要最小限にとどめる。細胞塊が残ってもよい。)
13. ステップ 10 のリプレーティング用培養プレートから余分な iMatrix-511 溶液を取り除き、BJ 培地を必要量 (6-ウェルプレートの場合は 2 mL) 添加する。細胞密度が  $2.2 \times 10^2$  cells/cm<sup>2</sup> 程度 (6-ウェルプレートの場合は  $2.0 \times 10^3$  cells/well) になるように培養プレートに細胞懸濁液を加え、細胞が分散するように素早く攪拌し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。(残りの細胞は、RT-PCR による SeV ベクター検出のポジティブコントロールとして使用することができるので、凍結してとっておくとよい。)
14. 翌日、iPSC 培地に交換し、以降、同培地にて毎日培地交換する。培養初期は 1 日おきに培地交換してもよい。



## 2). 末梢血単核球 (PBMC) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder Free 法)

### [PBMC 用の試薬]

サイトカインは DPBS 溶液に溶解し、最終濃度 10 µg/mL で使用する。

- Human SCF Recombinant Protein (SCF) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. PHC2116)
- FLT-3 Ligand Recombinant Human Protein (FLT-3) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. PHC9414)
- TPO (Thrombopoietin), Recombinant Human Protein (TPO) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. PHC9514)
- IL6 Recombinant Human Protein (IL6) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. PHC0065)

PBMC 用培地 (PBMC 培地)

StemPro-34 Nutrient を 4℃で融解後、StemPro-34 SFM ボトルに添加し、優しく完全に混合する。

GlutaMAX™ Supplement を 5mL 添加し、PBMC 培地を調製する。

- StemPro-34 SFM (1X)(Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 10639-011)
- GlutaMAX™ Supplement(Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 35050061)

PBMC 用完全培地 (PBMC CM 培地) :

PBMC 培地	100 mL
SCF (10 µg/mL)	1000 µL
FLT-3 (10 µg/mL)	1000 µL
TPO (10 µg/mL)	200 µL
IL6 (10 µg/mL)	100 µL

iPSC 培地

- StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ株式会社, Cat. No. AK02N)

細胞培養基質

- iMatrix-511 (ニッピ, Cat. No. 892 012)

### [iPS 細胞誘導手順]

#### Day -4

1. 凍結されている PBMC バイアルを 37℃のウォーターバスで解凍する。
2. 細胞懸濁液を 9 mL の PBMC CM 培地に懸濁し、200 x g, 25℃, 3 分間遠心する。
3. 上清を除去し、1 mL PBMC CM 培地に細胞を懸濁し、細胞数を TC20 細胞カウンターで測定する。
4.  $3.0 \times 10^6$  cells/well になるように細胞数を調製し、最終容量が 2 mL となるよう PBMC CM 培地に懸濁する。
5. 細胞懸濁液を 6-ウェルプレートに播種する。
6. 37℃、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養する。

#### Day 0

1. 6-ウェルプレートの細胞懸濁液を新しい 50 mL チューブに回収し、合計 10 mL となるように PBMC CM 培地を追加する。
2. 200 x g, 25℃, 3 分間遠心する。
3. 上清を除去し、2.0 mL の PBMC CM 培地を添加し、細胞数を TC20 細胞カウンターで測定する。
4. CytoTune®-iPS 2.0 の各チューブを 37℃ウォーターバスで融解する。
5. 細胞数を基に、細胞懸濁液にそれぞれ MOI=5 になるようにベクター溶液を添加する。
6. 細胞懸濁液全量を 6-ウェルプレートに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

#### Day 1

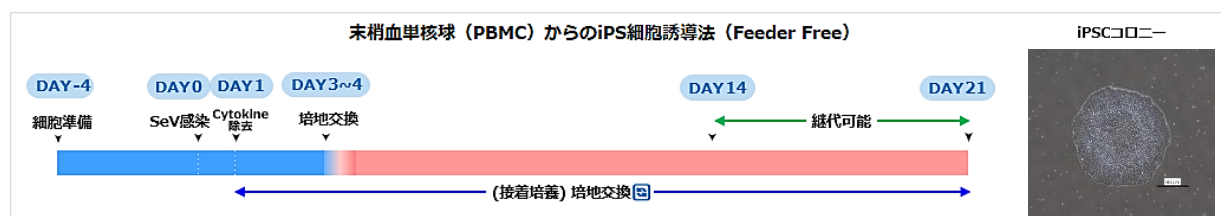
1. 6-ウェルプレートの細胞懸濁液を新しい 50 mL チューブに回収し、合計 10 mL となるように PBMC 培地を

追加する。

2. 200 x g, 25℃, 3 分間遠心する。
3. 上清を除去し、4 mL の PBMC 培地を添加し、懸濁する。
4. 25 µL の iMatrix-511 を添加し、ピペティングで混合する。
5. 細胞懸濁液全量を T25 フラスコに播種する。
6. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

#### Day 3, 4~

1. フラスコの培地を全量除去し、4 mL の iPSC 培地を添加する。
2. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに移す。以降、iPSC 培地にて毎日培地交換しながら培養する。



### 3). マウス胎児線維芽細胞 (MEF) からの iPS 細胞誘導実施例 (Feeder 法)

#### [MEF 用の試薬]

- DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11995-065)
- DMEM/ F-12, GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 10565-018)
- Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 21103-049)
- N2 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 17502-048)
- B27 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 17504-044)
- L-Glutamate (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 25030-081)
- 2-メルカプトエタノール (シグマ, Cat. No. M3148-100ML)
- LIF (メルクミリポア, Cat. No. ESG1106)
- PD 0325901 (フナコシ, Cat. No. Axon1408)
- CT 99021 (フナコシ, Cat. No. Axon1386)
- 0.1% ゼラチン水溶液
- フィーダー細胞 (マイトマイシン C 処理済みマウス胎児線維芽細胞 : MEF)
- 0.25% トリプシン-EDTA 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 25200056)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク, Cat. No. 26253-84)
- DPBS (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 14190144)
- 2i/ LIF 培地

Neurobasal medium	250 mL
DMEM/F-12, GlutaMAX	250 mL
B27	10 mL
N2	5 mL
2-メルカプトエタノール	3.5 µL
L-Glutamine	2.5 mL
ペニシリンストレプトマイシン混合溶液	5 mL
PD0325901 (5 mM)	100 µL
CT 99021 (15 mM)	100 µL
LIF (10& U/ mL)	500 µL



### [iPS 細胞誘導手順]

#### Day -1

1. MEF 細胞(129+TER/SvJc1 由来)を、 $5 \times 10^5$  cells/ well になるように 6-ウェルプレートへ播種する。
  - ・ベクター感染用のウェルと細胞数をカウントするためのウェルが必要である。
  - ・初期化効率に影響する可能性があるため、なるべく継代数の若い細胞を使用する。
2. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 晩培養する。

#### Day 0

3. 細胞のカウントを行う。
4. CytoTune®-iPS 2.0 の各チューブ下端を 37℃ウォーターバスに浸し、半分くらい融解したところで素早くウォーターバスから取り出し、余熱で最後まで溶かして氷中に移す。
5. 遠沈管等に BJ 培地 1 mL を入れ、そこに 3 種類のチューブ (KOS、KLF4、c-MYC) のベクター溶液を製品の COA に記載された分量をそれぞれ加える (ステップ 3 で算出した細胞に対し、5 倍量のベクター (MOI=5 とする) を添加する)。ピペット等で数回ピペッティングし、5 分以内にステップ 6 に従って遺伝子導入を行う。
6. ベクター感染用の細胞の培地を吸引除去し、直ちにステップ 5 で用意した CytoTune®-iPS 2.0 培地混液全量を添加し、全体によくなじませる。37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養する。

#### Day 1

7. 培養液を除き、BJ 培地を 2 mL/ well 添加し、培養する。

#### Day 2

8. 翌日、培養液を除き、BJ 培地を 2 mL/ well 添加し、培養する。

#### Day 3

9. 翌日、培養液を除き、2i/ LIF 培地を 2 mL/ well 添加し、培養する。

#### Day 4~Day 6/7

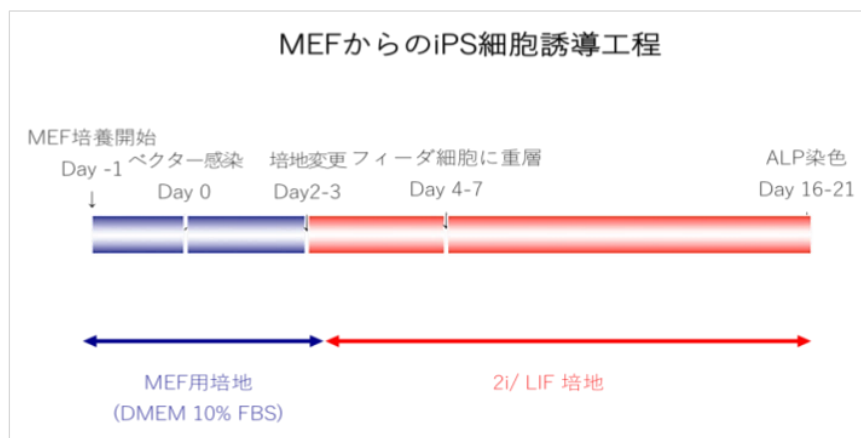
10. 毎日 2i/LIF 培地で培地交換を行いながら、3~4 日培養を行う。
11. 細胞継代の前日に、フィーダー細胞を準備する (ゼラチンコートした培養 10 cm dish に  $1 \sim 1.5 \times 10^6$  cells/ 100 mm dish になるようにフィーダー細胞を播種し BJ 培地中で培養する。)
  - \*0.1 %ゼラチン水溶液を 4 mL/ 100 mm dish または 1 mL/ well (6~12 well) 添加し、培養容器によくなじませ、37℃で 30 分から一晩静置する。使用直前にゼラチン溶液を除く。

#### Day 6/7

12. 遺伝子導入の 6~7 日後、トリプシン処理により細胞を剥がす。遠心して上清を取り除いた細胞に 2i/LIF 培地を 1~2 mL 添加、懸濁し、細胞数を計測する。約  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells/ 100 mm dish になるよう 2i/ LIF に培地交換したフィーダー細胞に重層する。
13. 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに培養ディッシュを戻し、24 時間培養する。

#### Day 7/8

14. 2i/ LIF 培地で培地交換し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに移す。以降、同培地にて毎日培地交換しながら誘導する。



#### 4). iPS 細胞誘導後（共通）

##### [アルカリホスファターゼ（ALP）染色]

1. 培養液を除き、DPBS で洗浄する（1 mL x 2 回）。
2. マイルドホルム 10N を添加し（1 mL/well）、室温に 15 分静置して細胞を固定する。
3. マイルドホルム 10N を除き、DPBS で洗浄する（1 mL x 2 回）。
4. NBT/BCIP 溶液を添加し（1 mL/well）、室温で 15～30 分程度振とうする。
5. DPBS で洗浄する（1 mL x 2 回）。
6. ALP 陽性 iPS 様細胞コロニー数をカウントし、誘導効率を計算する。

##### [センダイウイルスベクターフリーの iPS 細胞の取得]

CytoTune®-iPS は通常、感染後 6 週間程度で SeV ベクターフリーの iPS 細胞が取得できますが、培養および継代条件によって、時期が変動する可能性があります。

1. iPS 細胞のコロニーを継代時に、免疫染色用プレートと継代用プレートに同時に継代し anti-Sendai Virus 抗体\*による免疫染色を行う（下記参照）。
2. すべてのコロニーが SeV 抗原陽性の場合はクローニングを行う。
3. SeV 抗原陰性コロニーがあれば、継代用プレート上の同コロニーを継代し、SeV ベクターや、導入遺伝子が残存していないことを RT-PCR にて確認する（下記参照）。
4. クローニングを行ったものは、再度 anti-Sendai Virus 抗体による免疫染色する。

注）継代を繰り返すことにより、ベクターは自然に脱落するようになっております。また、PCR によって、c-MYC のベクターの残存のみが確認されたコロニーは、38～39℃、3%CO<sub>2</sub>（HEPES 不含培地を用いる場合は 5%）の条件で 5 日間培養すると残存する SeV ベクターの消去率が上昇する場合があります。

**iPS 細胞の取り扱い技術に関しては V の参考文献や一般解説書およびウェブサイト等のご参照をお勧めします。**

##### [参考：センダイウイルスベクターの検出方法]

<anti-Sendai Virus 抗体\*による免疫染色>

12-ウェルプレートで培養中の iPS 細胞を DPBS で洗浄する

↓

1 mL のマイルドホルム 10N を用いて 5 分間室温で細胞を固定する

↓

DPBS で 2 回洗浄する

↓

500 μL の anti-Sendai Virus 抗体（0.1% TritonX-100/PBS で 1/500 希釈）を 37℃で 1 時間反応させる

↓  
 DPBS で 3 回洗浄する  
 ↓  
 500 μL の蛍光標識 anti-rabbit IgG 抗体 (0.1% TritonX-100/PBS で 1/500 希釈) を 37℃ で 1 時間反応させる  
 ↓  
 DPBS で 3 回洗浄する  
 ↓  
 蛍光顕微鏡で検出を行う

\* anti-Sendai Virus 抗体は、株式会社医学生物学研究所 (MBL) より販売中です。  
 Cat. No. PD029 : Anti-Sendai Virus pAb (MBL)

<Transgene および SeV ゲノムを検出するための RT-PCR>  
 iPS 細胞コロニーから RNA を回収する (ポジティブコントロールとして、(P.6 参照) BJ 細胞からの iPS 細胞誘導  
 実施例 ステップ 13 で余った細胞を使用)

↓  
 逆転写反応 (RT 反応 : SeV ベクターゲノムは RNA であり、検出するためには RT-PCR が必要、プライマーはラン  
 ダムプライマーを使用) を行う

↓  
 PCR 反応を行う  
 変性温度 : 95℃ 30 sec  
 アニール温度 : 55℃ 30 sec  
 伸張温度 : 72℃ 30 sec  
 サイクル数 : 30-35 サイクル

↓  
 2%アガロース電気泳動にて PCR 産物を確認する

表 1. Transgene および SeV ゲノムを検出するための RT 反応後 PCR 用プライマー

Transgene	Forward	Reverse	Product size
<i>KOS</i>	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC	ACCTTGACAATCCTGATGTGG*	528 bp
<i>KLF4</i>	ACAAGAGAAAAACATGTATGG*	CGCGCTGGCAGGGCCGCTGCTCGAC	529 bp
<i>c-MYC(HNL)</i>	TAAGTACTAGCAGGCTTGTGCG*	TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	532 bp
SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC*	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC*	181 bp

\*SeV 配列上のプライマーであり、これらとの組合せにより SeV ベクター上の Transgene、あるいは SeV ゲノム  
 を特異的に検出する。

## IV. Q&A

Q1. 遺伝子導入させた後、細胞が剥がれてしまいます。

A1. 細胞によっては、SeVベクターによる搭載遺伝子の高発現のために細胞が丸くなり、剥がれる場合がございます。細胞密度を上げたり、コラーゲンでコートされたプレートを用いたりすることで、この現象は軽減される場合がございます。このような現象があっても、これらは主にSeVベクターの高い遺伝子発現効果によるものですので、そのまま作業を継続することもよいでしょう。

**Q2. iPS細胞が分化しているようです。**

A2. 本製品を用いると、他の方法より早めにiPS細胞が誘導される場合がございます。お早めの継代をお奨めします。

**Q3. iPS細胞から、SeVゲノムがなかなか抜けません。**

A3. 細胞によっては、時間がかかるものもございます。SeV抗体で免疫染色を行い、SeV陽性細胞が残っている場合は、クローニングを繰り返すことでSeV陰性のiPS細胞を得ることができます。クローニングの際はピペット等でコロニーの一部を移す方が、SeV陰性のコロニーを得やすいです。

**Q4. (P.6) BJ細胞からのiPS細胞誘導実施例 ステップ3に『カウントした細胞数と各ベクターのtiterから遺伝子導入に必要なウイルス液量を計算する。遺伝子導入時のMOIは、KOS:Klf4:Myc=5:5:5とする。』とありますが、ウイルス液量の計算方法を教えてください。**

A4. 次の公式より計算できます。 **$A = B \times C / D$**

A : 必要なウイルス量 (μL)

B : 細胞数 ( $10^5$  cells)

C : MOI

D : titer ( $10^8$  CIU/mL)

**Q5. プロトコルに記載されていない細胞種からもiPS細胞は誘導できますか？**

A5. 弊社では他の細胞種からのiPS細胞誘導実施例を持ち合わせておりません。他の細胞種では導入効率や初期培養条件が異なる場合がございます。尚、本プロトコルのiPS細胞誘導実施例は、ご使用者様のiPS細胞誘導を保証するものではございませんのでご注意ください。

**Q6. カスタムベクターの製造を依頼したいのですが。**

A6. 弊社では、SeVベクターにご希望の遺伝子を搭載するカスタムベクターの受託製造を行っております。末尾に記載の『お問い合わせはこちら』よりご相談ください。

## **V. 参考文献**

### **参考文献**

- 1). Medical Science Digest 35(12): 505-508 (2009)  
「センダイウイルスベクターを用いた新しいiPS細胞作製技術」 房木 ノエミ、長谷川 護
- 2). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85(8):348-362 (2009)
- 3). 羊土社 ISBN 9784758101745 (2008)  
「改訂培養細胞実験ハンドブック」 黒木 登志夫 (監修)、許 南浩、中村 幸夫 (編集)
- 4). 組織培養研究 27(4): 139-147(2008)  
「日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その 1」 古江-楠田 美保
- 5). ウイルス 57(1): 29-36 (2007)  
「特集. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2. センダイウイルスベクター：ベクター開発と医療・バイオ分野への応用」 飯田 章博

- 6). 蛋白質・核酸・酵素 51(1): 27-37 (2006)  
「センダイウイルス工学の展開」 永井 美之、加藤 篤、井上 誠
- 7). 岩波書店 ISBN4-00-006274-3 C0345 (2006)  
「センダイウイルス物語 ---日本発の知と技---」 永井 美之
- 8). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. J Virol. 74(14):6564-6569 (2000)

## VI. 本製品の使用上の注意点

### 必ずお守り下さい

- 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。ご使用の際は、カルタヘナ法を遵守してお取り扱いください。
- 本製品をご使用の際は、P2 レベル以上の施設で、必ず安全キャビネットをご使用ください。
- 本製品の使用には、遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- 本製品は、ドライアイス中にて届けられます。ご開封の際は、凍傷・切創等に十分ご注意ください。
- お取り扱いには十分ご注意ください。万が一、誤って飛散させ眼に入れたり、皮膚を汚染した場合は、すぐに洗浄し、医師にご相談ください。
- 本製品の解凍後は、分注せずに速やかにご使用ください。凍結融解後の力価は保証いたしません。

### 付記

- 本製品のご使用によって生じたいかなる事故、損害についても、株式会社 ID ファーマでは責任を負いかねますので、ご了承の上、ご使用ください。
- 本製品は、核初期化遺伝子については iPS アカデミアジャパン株式会社よりライセンスを受け、株式会社 ID ファーマが製造しています。
- 本製品を使用して作製した細胞を商用利用される場合は、事前に株式会社 ID ファーマ及び iPS アカデミアジャパン株式会社までお問い合わせください。

**製造元：株式会社IDファーマ**

**本社：〒102-0071 東京都千代田区富士見2-10-2 飯田橋グラン・ブルーム**

**つくば工場：〒300-2611茨城県つくば市大久保6番（テクノパーク大穂）**

**TEL：029-877-5155（代表） FAX：029-877-5160**

**お問い合わせ先：<https://www.iromgroup.co.jp/inq/>**



お問い合わせはこちら