

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 EXTM-iPS

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

I. <u>本製品 CytoTuneEX™-iPS について</u>	3
II. <u>センダイウイルスベクターについて</u>	3
・ センダイウイルスベクターの特徴	3
・ センダイウイルスについて	4
・ センダイウイルスのベクター化について	4
III. <u>CytoTuneEX™-iPS を使用した iPS 細胞の作製について</u>	5
・ 本製品の構成	5
・ 搭載遺伝子の情報	5
・ 輸送温度、保存温度	5
・ 本製品以外に必要な器具・試薬	5
1) 器具・装置	5
2) 試薬類および培地	5
・ 本製品を使用した iPS 細胞誘導の実施例	6
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	6
[iPS 細胞誘導手順]	6
[アルカリホスファターゼ (ALP) 染色]	7
[SeV ベクターフリーの iPS 細胞の取得]	7
参考: SeV ベクターの検出方法	7
IV. <u>Q&A</u>	9
V. <u>参考文献</u>	9
・ 参考文献	9
VI. <u>本製品の使用上の注意点</u>	10
・ 必ずお守り下さい	10
・ 付記	10

I. 本製品 CytoTuneEX™-iPS について

CytoTuneEX™-iPS は効率的な核初期化に必要な、4 遺伝子 (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*L-MYC*) を以下の 3 種類の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。

1. *KLF4*、*OCT3/4* 及び *SOX2* をタンデムに搭載した SeV ベクター
2. *KLF4* を搭載し更に SeV ベクターの P 遺伝子下流に iPS 細胞に発現する microRNA の標的配列を付加した SeV ベクター
3. *L-MYC* を搭載した SeV ベクター

SeV ベクターの特性により、本製品で誘導された iPS 細胞も染色体に傷害がなく、細胞からベクターや導入した核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。

従来製品である CytoTune®-iPS 2.0L では、すでに効率のよい誘導と、迅速なベクター消去を実現しておりますが、CytoTuneEX™-iPS では *KLF4* ベクターに microRNA 標的配列を付加することで、初代 iPS 細胞コロニーから更に早くベクターが消去されることが観察されています。また本製品の製造には生物由来原料基準に適合した原材料を使用しています。

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、核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

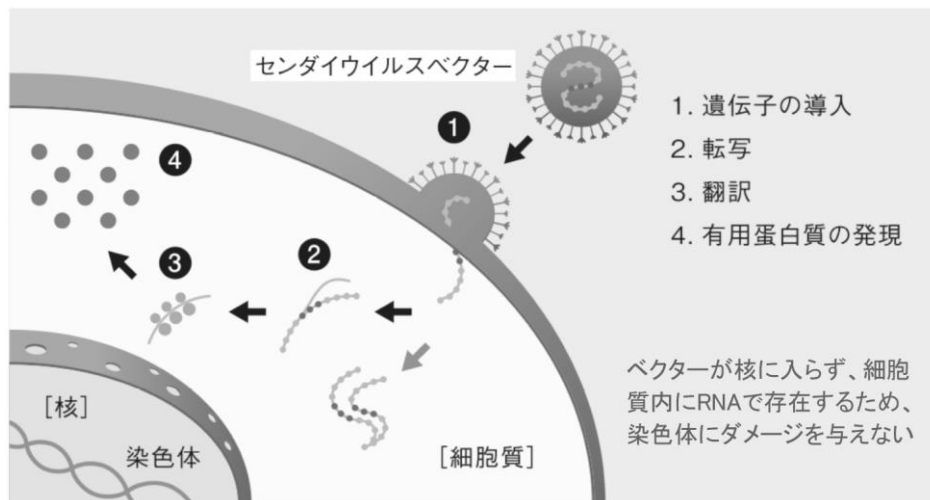
・ センダイウイルスベクターの特徴

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) 細胞質で RNA として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 (naive T 細胞[†]、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を得られる
- 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を得られる
- 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。

[†]: Okano, S. et al. Gene Ther, 10, 1381-1391(2003)



・センダイウイルスについて

センダイウイルス (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cleo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娘ウイルス粒子として放出されます。

・センダ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/TSA, SeV/TS12ΔF および 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。

パラミクソウイルスまたは SeV のベクター技術の商業的利用にかかわる特許上の権利は、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ます (特許 3602058、特許 4999330、特許 5438149、特許 5763340、特許 5908838、US 8,741,650、US 9,127,256、US 9,695,445、US 9,090,909、CN ZL805673.0、CN ZL200580009182.8、CN ZL200980136168.2、CN ZL201180052632.7、EP 1186667、EP 2434020、EP 2322611、EP 2612911、CA 2,553,976、AU 2011297075)。

III. CytoTuneEX™-iPS を使用した iPS 細胞の作製について

・ 本製品の構成

CytoTuneEX™-iPS hKOS: 透明キャップ SeV(PM)hKOS/TS12ΔF 100 μL (5 x 10⁶ CIU 以上/ 100 μL)
CytoTuneEX™-iPS hKlf4: 赤キャップ SeV18+KLF4/PmiR367T2-TSΔF 100 μL (5 x 10⁶ CIU 以上/ 100 μL)
CytoTuneEX™-iPS hL-Myc: 青キャップ SeV(HNL)hL-Myc/TS15ΔF 100 μL (5 x 10⁶ CIU 以上/ 100 μL)

ヒト線維芽細胞株 BJ 細胞を用いた場合、1x10⁶ の細胞に対して1回の実験が可能です。カ価については COA をご参照下さい。本製品は無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン否定試験合格品です。

・ 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

L-MYC: M19720.1

・ 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-80℃で保管して下さい。

COA に記載されている保証期限以内に使用してください。

本製品以外に必要な器具・試薬

1) 器具・装置

- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ 恒温槽 (ウォーターバス)
- ・ 培養プレート(Φ100 mm 培養ディッシュ、6-ウェルプレート、12-ウェルプレート)
- ・ プラスチック(ポリプロピレン)遠心管(15 mL)
- ・ プラスチックピペット (5 mL、10 mL)
- ・ 微量ピペット(200 μL、1000 μL)
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ ステムセルカッシングツール (例 Cat. No. VTL-14601, 株ベリタス)
- ・ トランスファーピペット (例 Cat. No. VTL-14319, 株ベリタス)

2) 試薬類および培地

- ・ ダルベッコ変法基本培地 (D-MEM) 高グルコース
- ・ Basic fibroblast growth factor (bFGF) : human recombinant
- ・ ES 細胞用培地 (4ng/mL bFGF を含む)
- ・ ROCK 阻害剤:Y27632
- ・ 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)
- ・ ES 細胞用剥離液

- ES 細胞用凍結保存液
- 0.25%トリプシン-EDTA 溶液
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- ペニシリン-ストレプトマイシン溶液
- PBS
- anti-Sendai Virus 抗体 (Cat. No. PD029, 医学生物学研究所: MBL)
- iPS Transgene/SeV検出用プライマーセット (Cat. No. IDT-DV0304, 医学生物学研究所: MBL)
- 10Nマイルドホルム (WAKO)

・ 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 No. CRL2522) からの iPS 細胞誘導実施例

[iPS 細胞誘導手順]

1. BJ 細胞を、ステップ 2 操作後に 5×10^5 cells/well になるように 6-ウェルプレート の 2 ウェルへ播種する (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. CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 1~2 晩培養する。細胞が十分接着伸展していることを確認する。
3. -80°C で保存されている CytoTune®-iPS 2.0 の各チューブ下端を順に 37°C 温浴に接触させ、それぞれ一部解凍後スピンドウンし、速やかに氷中へ移す (半分くらい融解したところで素早く温浴から取り出し、余熱で最後まで溶かして氷中に移す)。
4. 15 mL ポリプロピレン遠心管に 10% FBS/D-MEM 2 mL を入れ、そこに 3 種類のチューブ (KOS、KLF4、L-MYC) のベクター溶液を添付データシートに記載された分量をそれぞれ加える (10^6 細胞に対し MOI=5 となる)。5 mL のプラスチックピペットで数回ピペッティングし、5 分以内にステップ 5 に従って遺伝子導入を行う。
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. ステップ 2 で用意した BJ 細胞の培地を吸引除去し、直ちにステップ 4 で用意した CytoTune®-iPS 2.0 培地混液半量を、細胞が剥がれないように静かに培養ウェルそれぞれに添加し、全体によくなじませる。
6. CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) に 6-ウェルプレート を移す。
7. 24 時間培養後、10% FBS/D-MEM 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)。
8. CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) でさらに 5~6 日間培養する (10% FBS/D-MEM を用いて毎日培地交換する)。
9. ステップ 10 の細胞継代の前日にフィーダー細胞を準備する (予めゼラチンコートした培養ディッシュ* に $1 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/100mm dish になるように MEF を播種する、翌日 10% FBS/D-MEM を用いて培地交換を行う)。
*0.1%ゼラチン水溶液を 4 mL/100mm 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°C 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。
10. 遺伝子導入の 6~7 日後、培地を取り除き、PBS で 1 度洗浄した後、PBS で 5 倍希釈した 0.25%トリプシン-EDTA 溶液 500 μ L/well を加え室温で静置する。細胞が丸くなったことを確認したら、培地 (10% FBS/D-MEM) を加えた後、細胞を剥離回収する (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。ステップ 11 の重層時に細胞塊が残ってもよい)。
11. 細胞数を計測し、ステップ 9 で用意したフィーダー細胞上に、誘導した細胞を約 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ cells/100mm dish になるよう重層する (残りの細胞は、RT-PCR による SeV ベクター検出の陽性コントロールに使用することができるので、凍結してとっておくと良い)。

12. CO₂ インキュベーター(37°C、5% CO₂)に培養ディッシュを戻す。
13. 24 時間培養後 ES 細胞用培地に交換し、37°C、5% CO₂ インキュベーターに移す。以降、同培地にて毎日培地交換する。
14. ステップ 15 のコロニー継代の前日にフィーダー細胞を準備する(予めゼラチンコートした 6-ウェルプレートに $1.7\sim 2.5 \times 10^5$ cells/well もしくは、12-ウェルプレートに $5\sim 9 \times 10^4$ cells/well になるように MEF を播種する)。
15. 遺伝子導入から約 20 日以降コロニーが大きくなった段階で、現れたコロニーをステップ 14 で用意した 6-ウェルプレート上に顕微鏡下で IVF 用ガラスピペットを用いて移し替える(10 μ M ROCK 阻害剤、ES 細胞用培地を使用する)。
16. CO₂ インキュベーター(37°C、5% CO₂)に 6-ウェルプレートに戻す。
17. 翌日 ES 細胞用培地に交換し、以降同培地にて毎日培地交換する。
18. ステップ 15 のコロニー継代の 5~7 日後より継代を行う(通常の ES/iPS 細胞の培養方法に従う)。

[アルカリホスファターゼ(ALP)染色の例]

1. 培養液を除き、D-PBS で洗浄(1 ml x 2 回)
2. マイルドホルム 10N を添加し、細胞を固定(1 ml/well)
3. 室温で 10 分、振とう後、マイルドホルム 10N を除き、D-PBS で洗浄(1 ml x 2 回)
4. 1-Step NBT/BCIP を添加(1 ml/well)
5. 室温で 20 分程度振とう後、D-PBS で洗浄(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

[SeV ベクターフリーの iPS 細胞の取得]

BJ 細胞では通常誘導後 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(下記を参照)。
2. すべてのコロニーが SeV 抗原陽性の場合に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、RT-PCR にて 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(下記を参照)。
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°C、3% CO₂(HEPES 不含培地用いる場合は 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 PBS で洗浄する

↓

1 mL のマイルドホルム 10N(Wako)を用いて 5 分間室温で細胞を固定する

↓

PBS で 2 回洗浄

↓

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

↓
 PBS で 3 回洗浄
 ↓
 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
 ↓
 PBS で 3 回洗浄
 ↓
 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、ステップ 10 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
 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

Transgene および SeV ゲノムを検出するための RT-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>L-MYC</i>	AGTCTCTGGGTATTCGGAAG	CTGGATAGAGTATGTCAGAAGGGTTTGG*	660 bp
<i>SeV</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC*	ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC *	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、剥がれる場合があります。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あります。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、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あります。新しいフィーダー細胞上へ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あります。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ガラスピペット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。

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。使用の際には、カルタヘナ法を遵守してお取り扱い下さい。
- ・ 本製品の使用には P2 レベル以上の施設で、必ず安全キャビネットを使用して下さい。
- ・ 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。開封の際には、凍傷・切創に十分ご注意ください。
- ・ 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、皮膚を汚染したりした場合は、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、ご了承の上ご使用下さい。
- ・ 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までお問い合わせ下さい。

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

研究開発センター：〒300-2611 茨城県つくば市大久保 6 番 (テクノパーク大穂)

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