

# Muse 細胞の特性解析

## 目次

【1. poly-HEMA コート処理】	1
【2. メチルセルロースを用いた bulk でのクラスターの作製】	2
【3. Single cell suspension culture におけるクラスターの作製】	3
【4. 多能性の検証① アルカリフォスファターゼ染色】	4
【5. 多能性の検証② Gelatin 上でのクラスターの培養】	5
【6. RT-PCR を行う場合】	6
【7. 免疫染色を行う場合】	6

### 【1. poly-HEMA コート処理】

\* Muse 細胞を採取後、クラスターを作成する場合には poly-HEMA コートのプレートを事前に準備する必要がある。

- まず 95% EtOH を 40 ml (99.5% EtOH 38 ml + MilliQ 2 ml) 調製し 50 mL チューブへ入れる。そこに poly-HEMA (poly 2-hydroxyethyl methacrylate, SIGMA, P3932) を 1.2 g 加える。<sup>\*1</sup>
- ↓
- 37°C のシェーカーでチューブを水平方向に振盪しながら poly-HEMA を溶かす。<sup>\*2</sup>
- ↓
- 以下の表に従って各ディッシュに入れ、均一になるように広げる。

10 cm	3.2 ml
6 cm	1.3 ml
3.5 cm	500 $\mu$ l
12 well	200 $\mu$ l
24 well	100 $\mu$ l
48 well	70 $\mu$ l
96 well	25 $\mu$ l

- ↓
- クリーンベンチの中で、ディッシュの蓋を開けた状態で乾燥させる。<sup>\*3</sup>

### 【注意事項】

<sup>\*1</sup> 先に 95% EtOH をチューブに入れておかないと、poly-HEMA は固まってしまい溶けにくくなるので注意。また、99.5% EtOH のみには溶けないので注意。

<sup>\*2</sup> チューブが斜めになってしまうと、poly-HEMA が沈殿し固まってしまうため、完全に溶けるまでに数時間かかる。

<sup>\*3</sup> クリーンベンチは 10~20 cm 程度の隙間を開けておき、UV、Blower は使用せずに乾燥させる。アルコール蒸気が飽和して乾燥しない場合があるので同時に大量に作製しないこと。乾燥した後のディッシュは保存状態にもよるが数ヶ月は使用可能。

【2. メチルセルロースを用いた bulk でのクラスターの作製】

- FACS で sorting した細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞数を計測する。

↓

- 下記の表に従い、各 well に細胞、FBS、メチルセルロース (MC, MethoCult H4100, StemCell Technologies, 04100) を入れる。

【重要】培地は Low-glucose DMEM を使用

	細胞数 (cells)	Cell + DMEM (μl)	FBS (μl)	2.6% MC (μl)	Total (μl)
6 well	2.5 万	1700	300	1000	3000
12 well	1 万	705	125	420	1250
24 well	5000	400	70	230	700
48 well	3000	230	40	130	400
96 well	1000	77	13	40	130

※最終的な組成は 10% FBS, 0.9% MC in DMEM

※dish は poly-HEMA コート処理済みのものを使用すること

※メチルセルロースはチップの先端を切って吸うこと

↓

- セルスクレイパーでメチルセルロースと細胞を優しく攪拌する。

※セルスクレイパーで底の poly-HEMA を傷つけないように注意すること

↓

- 3 日ごとに、ゲルが乾かないように 10%FBS in DMEM を下表に従って追加しながら 7 日-10 日程度培養する。

	追加量 (μl)
6 well	1300
12 well	530
24 well	300
48 well	170
96 well	60



培養 7 日目のクラスター

### 【3. Single cell suspension culture におけるクラスターの作製】

□ FACS で回収した細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞数を計測する。

↓

□ 限界希釈し、poly-HEMA コートした 96well プレートの各 well に細胞を 1 個ずつ入れる。

【注意点】培地の組成は下記の通りである。

•BM-MSC : Low-glucose DMEM, 10%FBS, **1 ng/ml FGF-2**, 0.1 mg/ml Kanamycin

•NHDF, HDFa : Low-glucose DMEM, 10%FBS, 0.1 mg/ml Kanamycin

•ADSC : Low-glucose DMEM, 15%FBS, 0.1 mg/ml Kanamycin

↓

□ 以後 3 日に一度、培地を 30  $\mu$ l ずつ追加しながら 7-10 日程度培養する。



培養 7 日目のクラスター

#### 【4. 多能性の検証① アルカリフォスファターゼ染色】

**Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Cat#86R-1KT, Sigma) を使用する**

##### ALP 染色液(用時調製)

Sodium Nitrite Solution (kit に付属) 10  $\mu$ l と FRV-Alkaline Solution (kit に付属) 10  $\mu$ l を混合する。

RT, 2 min 静置、生理食塩水 450  $\mu$ l を加える。

Naphthol AS-BI Alkaline Solution (kit に付属) 10  $\mu$ l を加える。

- クラスターを 1.5 ml チューブに回収し、生理食塩水<sup>\*1</sup> 1 ml を加えて懸濁する。  
↓
- 遠心 (400 g, 5 分間, 常温) 後、上清を除去し、生理食塩水<sup>\*1</sup> 1 ml を加えて懸濁する。  
↓
- 遠心 (400 g, 5 分間, 常温) 後、上清を除去し、生理食塩水<sup>\*1</sup> 1 ml を加えて懸濁する。  
↓
- 遠心 (400 g, 5 分間, 常温) (クラスターを 4 % PFA で固定)<sup>\*2</sup>  
↓
- ALP 染色液 200  $\mu$ l を加え、インキュベートする (37°C<sup>\*3</sup>, 15 分間)  
↓
- PBS<sup>\*4</sup> 800  $\mu$ l を加えて懸濁する  
↓
- 遠心 (400 g, 5 分間, 常温) 後、上清を除去し、PBS<sup>\*4</sup> 1 ml を加えて懸濁する  
↓
- 遠心 (400 g, 5 分間, 常温) 後、上清を除去し、スライドガラスやディッシュへ移し観察する

#### 【注意事項】

<sup>\*1</sup> PBS を使用した場合、反応が出ないので注意すること

<sup>\*2</sup> kit の protocol では固定作業を行っているが、固定しない方が発色はいい

<sup>\*3</sup> kit では RT で静置しているが、37°C の方が発色はいい

<sup>\*4</sup> 反応を停止させるため、PBS を使用する

## 【5. 多能性の検証② Gelatin 上でのクラスターの培養】

※Gelatin コートディッシュを作製しないと実験できないので要注意

•培地 : Low-glucose DMEM, 10%FBS, 0.1 mg/ml Kanamycin

•Gelatin (Cat#G-1890, SIGMA): PBS で希釈してオートクレーブをかける (最終濃度は0.1%)。

□ Gelatin solution をディッシュの底面が十分に浸る量を入れる。

↓

□ 37°Cインキュベーターで最低 10 分ほどインキュベートする。

↓

□ 使用直前に Gelatin solution を除去し、培地を入れる。

↓

□ クラスターをピックアップする。<sup>\*1</sup>

↓

□ (メチルセルロースでクラスターを作製した場合には DMEM でよく洗う)<sup>\*2</sup>

↓

□ Gelatin コートしたディッシュまたは Gelatin コートしたガラスを敷いたディッシュへクラスターを移す。<sup>\*3</sup>

↓

□ CO<sub>2</sub>インキュベーターで細胞の育成度合に応じ 1~2 週間程度培養した後、免染やRT-PCRを行う。

### 【注意事項】

\*1 ピックアップにはガラスキャピラリーまたはピペットマン (P20 相当) を使用する。

\*2 洗浄は DMEM を 200  $\mu$ l 程度入れた 4 well ディッシュ中で、ピペッティングのように何度かクラスターを出し入れして行う。この際、クラスターへメチルセルロースが付着したまま残るとゼラチンコートへの接着が悪くなる。

\*3 移す際には液量を通常の培養時よりも若干少なめにすると接着率が高くなる。数時間 37°Cで培養した後通常の培地量になるように培地を追加する。追加し忘れると干上がりやすくなるので注意。2~3 日で接着したものを以後の実験に使用する。

#### 【6. RT-PCRを行う場合】

NucleoSpin RNA XS (Cat#740902.10, Macherey-Nagel)

SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Cat#11754050, Invitrogen) TaKaRa Ex Taq (Cat#RR001A, TaKaRa)  
を使用してmRNAの回収・逆転写を行う。

#### Human RT-PCR primer

β-actin	F: 5'-AGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACC-3' R: 5'-AAGTCCTCGGCCACATTGTGAACTTTG-3'
Nkx2.5	F: 5'-GGGACTTGAATGCGGTTTCAG-3' R: 5'-CTCCACAGTTGGGTTTCATCTGTAA-3'
α-fetoprotein	F: 5'-CCACTTGTTGCCAACTCAGTGA-3' R: 5'-TGCAGGAGGGACATATGTTTCA-3'
MAP-2	F: 5'-ACTACCAGTTTCACACCCCCTTT-3' R: 5'-AAGGGTGCAGGAGACACAGATAC-3'
GATA6	F: 5'-CCTGCGGGCTCTACAGCAAGATGAAC-3' R: 5'-CGCCCCTGAGGCTGTAGGTTGTGTT-3'

#### 【7. 免疫染色を行う場合】

固定条件 : 4% (v/v) paraformaldehyde / 0.01M PBS

抗体: anti-SMA (Lab Vision, MS-113-P0, 1:100 で使用)

anti-Neurofilament-M (Chemicon, AB1987, 1:200 で使用)

anti-α-fetoprotein (DAKO, N1501, 1:100 で使用)

anti-desmin (BD Biosciences, 550626, 1:100 で使用)

anti-cytokeratin 7 (Chemicon, MAB3226, 1:100 で使用)

Blocking solution : 20% (vol/vol) BlockAce / 5% (wt/vol) BSA / 0.3% (vol/vol) Triton X-100 / 0.02 M D-PBS

Antibody diluent : 5% (vol/vol) BlockAce / 1% (wt/vol) BSA / 0.3% (vol/vol) Triton X-100 / 0.02 M D-PBS