



Application

ヒトiPS細胞／ヒトES細胞凍結保存効率の比較

製品名

バンバンカーhRM (製品番号:CS-07-001)
再生医療研究用 無血清タイプ細胞凍結保存液

メーカー名

株式会社 リンフォテック

下記フィードバックは、京都大学 再生医科学研究所 胚性幹細胞研究分野 宮崎隆道 様の御厚意により掲載させていただきました。

実験方法

当研究室にて培養維持しているヒトiPS細胞およびヒトES細胞の凍結保存にバンバンカーhRM (CS-07-001) およびバンバンカー (CS-02-001) を使用し保存効率を比較した。

凍結保存方法	保存液	特徴
簡易緩慢法	バンバンカーhRM	無血清、Xeno-free
簡易緩慢法	バンバンカー	無血清

● feeder-free 培養の場合

①ヒトiPS細胞 (iPS (IMR90) -1株)

[凍結] ヒトiPS細胞 (IMR90-1株) (mTeSR1培地、Matrigel上で継代培養) を EDTA/DPBS と TrypLE select を併用して単一分散剥離した後^{*}、 1×10^6 cells/tube に調整して細胞懸濁液を分注し、遠心分離 (300×g, 3分) を行った。凍結保存液 (0.5ml) で細胞を懸濁して凍結チューブに移し、Mr.Frostyに入れて-80℃にて一晩冷却した後、-150℃ディープフリーザーに移して保存した。

※分散方法の詳細：

Miyazaki T, *et al.* Genesis. 2014 Jan;52 (1) :49-55. doi: 10.1002/dvg.22725

[解冻および生存率測定] 一ヶ月経過後、凍結細胞を37℃温浴槽で融解し、5倍量の mTeSR1培地を加えて遠心分離 (500×g, 5分) を行った。細胞を適量の培地に懸濁した後、トリパンブルー染色法にて生存細胞数を計測し、3解冻分の平均値を生存率として評価した。

[解冻後の培養] 生存細胞の播種密度が 1×10^5 cell/cm²になるように播種数を調整してiMatrix-511コーティングディッシュに播種し、24時間後に細胞生存を確認した。

②ヒトES細胞 (KhES-1株)

[凍結] 上記①ヒトiPS細胞と同操作を行った。

[解冻および生存率測定] 上記①ヒトiPS細胞と同操作を行った。

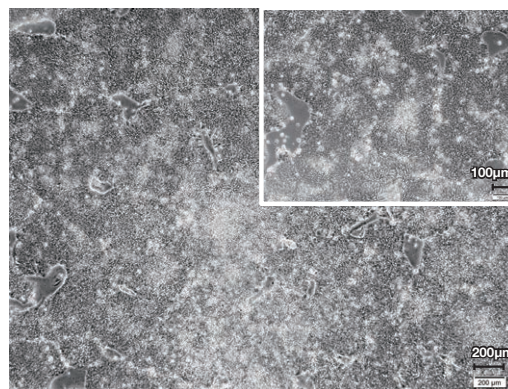
[解冻後の培養] 上記①ヒトiPS細胞と同操作を行った。

● on feeder培養の場合

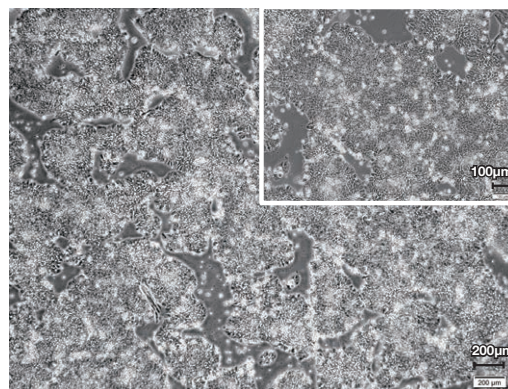
③ヒトES細胞 (KhES-1株)

[凍結] ヒトES細胞 (KhES-1株) (ヒト多能性幹細胞用培地を用いてMEF feeder上で継代培養) を EDTA/DPBS と TrypLE select を併用して単一分散剥離した後、 1×10^6 cells/tube に調整して細胞懸濁液を分注し、遠心分離 (300×g, 3分) を行った。凍結保存液 (0.5ml) で細胞を懸濁して凍結チューブに移し、Mr.Frostyに入れて-80℃にて一晩冷却した後、-150℃ディープフリーザーに移して保存した。

[解冻および生存率測定] 一ヶ月経過後、凍結細胞を37℃温浴槽で融解し、10倍量の培地を加えて遠心分離 (500×g, 5分) を行った。細胞を適量の培地に懸濁し、PI染色した後にフローサイトメトリーを用いてhPSC分画の生存数を計測し、3解冻分の平均値を生存率として評価した。



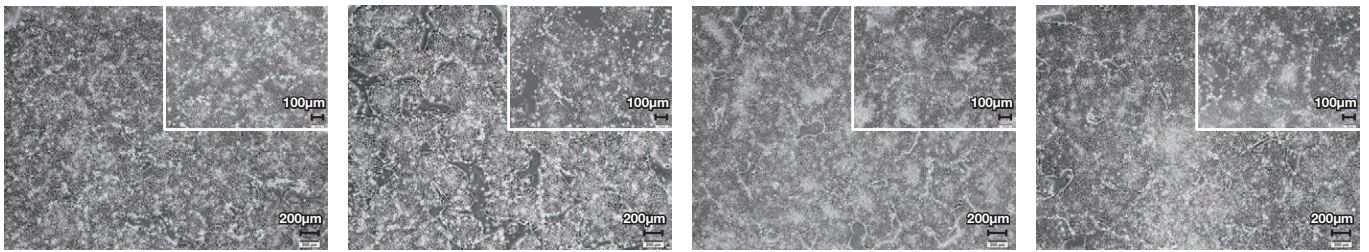
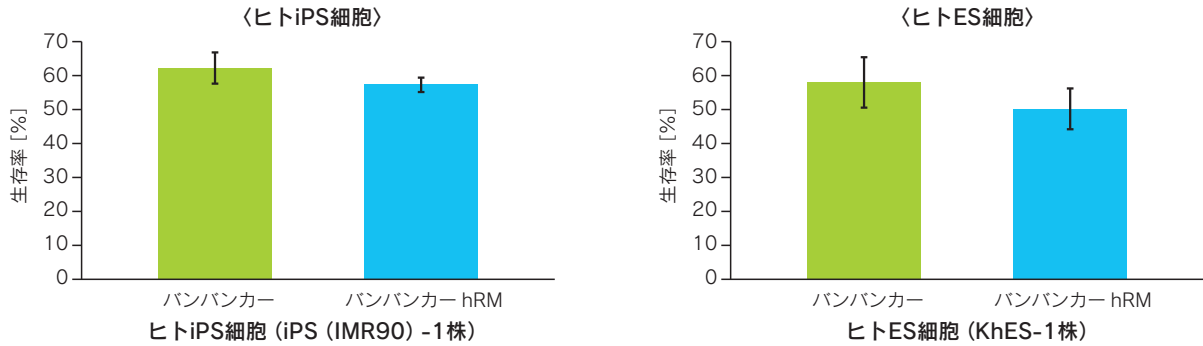
播種3日後のヒトES細胞 (KhES-1株)
バンバンカー hRM



播種4日後のヒトiPS細胞 (iPS (IMR90) -1株)
バンバンカー hRM

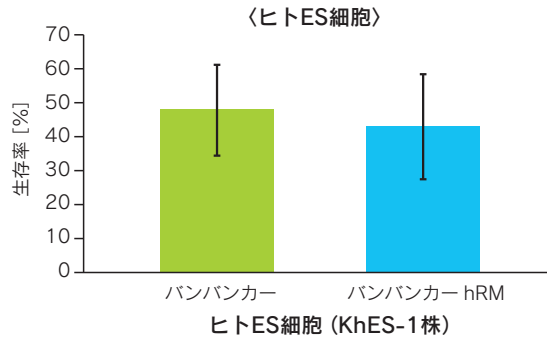
結果

上記の試験を行い、解冻直後の細胞生存率を比較した。

● feeder-free 培養の場合

播種4日後のヒトiPS細胞 (iPS (IMR90) -1株) バンバンカー
 播種4日後のヒトiPS細胞 (iPS (IMR90) -1株) バンバンカー hRM
 播種3日後のヒトES細胞 (KhES-1株) バンバンカー
 播種3日後のヒトES細胞 (KhES-1株) バンバンカー hRM

いずれの凍結保存液においても高い生存率が認められ、再播種後は良好な細胞接着と増殖を確認できた。

● on feeder培養の場合

いずれの凍結保存液においても高い生存率が認められ、再播種後は良好な細胞接着と増殖を確認できた。

**お客様のコメント**

改良型の緩慢凍結法にready-to-useのバンバンカーを組み合わせることでヒト多能性幹細胞を他の汎用動物細胞株と同じ様に扱うことができ、凍結保存のハードルが格段に下がりました。今回の実験ではいずれもROCK阻害剤を使用せずに行っていますが、融解直後及び再播種後の生存率も非常に高く保たれていますので、いずれのシリーズも効率的な試薬だと思います。

●NGCのコメント

バンバンカーhRMは無血清とXeno-freeを実現し、かつバンバンカーと比べても遜色ない生存率を得られています。今後はヒト細胞を用いた再生医療研究に期待できる製品と考えられます。