

eL-WRN 培養液の調製(小ロット) Ver.1 (10/3/2024)

by Hiroyuki Miyoshi (platform@pcm.med.kyoto-u.ac.jp)

概要

L-WRN はマウス Wnt3a を発現する L-Wnt3a 細胞([Willert et al. 2003](#))にマウス R-spondin3 とマウス Noggin のデュアル発現ベクターを安定的に導入した細胞株で、この細胞の培養上清 (conditioned medium)を使用すると腸管上皮幹細胞を安定的に継代培養することができる ([Miyoshi and Stappenbeck. 2013](#))。ヒト腸管上皮幹細胞の培養には 50%の L-WRN 培養上清を含む eL-WRN 培養液を用いる([Miyoshi et al. 2018](#))。

準備

L-WRN 細胞 (ATCC: CRL-3276)

日本代理店: フナコシ、住商ファーマインターナショナル

営利機関は別途 Washington University (St. Louis)とのライセンス契約が必要。

Washington University, Office of Technology Management

Attn. Associate Director

Email: otm@dom.wustl.edu

細胞は十分量増殖させて 150 cm² 培養フラスコ 1 個あたり凍結チューブ 6 本を作製する。

L cell medium

DMEM high glucose (Nacalai 08458-45 等)	1 本 (500 mL)
100X Penicillin/Streptomycin (Nacalai 26253-84 等)	5 mL
非働化済み FBS	50 mL

Primary culture medium

Advanced DMEM/F12 (Invitrogen 12634-010)	1 本 (500 mL)
100x L-glutamine (Nacalai 16948-04 等)	6.25 mL
100x Penicillin/Streptomycin (Nacalai 26253-84 等)	6.25 mL
非働化済み FBS	125 mL
または、	
Reduced Serum DMEM/F-12 (Nacalai: 21906-55)	1 本 (500 mL)
100x Penicillin/Streptomycin (Nacalai 26253-84 等)	6.25 mL
非働化済み FBS	125 mL

PBS-EDTA

PBS without Ca Mg (Nacalai 14249-95 等)	1 本 (500 mL)
0.5M EDTA solution (Nacalai: 06894-14 等)	500 μ L

選択用抗生物質

- ・50 mg/mL G418 Disulfate 水溶液 (Nacalai 09380-86 等)
- ・100 mg/mL Hygromycin B (InvivoGen ant-hg-1)

培地添加物

- ・Y-27632 (Selleck S1049 等) Stock: 10 mM (50 mg / 15.6 mL water)
- ・SB-431542 (Selleck S1067 等) Stock: 10 mM (50 mg / 13 mL DMSO)
- ・2.5 mg/mL Plasmocin Prophylactic (Invivogen ant-mpp)
- ・EGF (Peprotech AF-100-15) Stock: 500 μ g/mL (1 mg / 2 mL water)

その他

- ・2.5 g/L トリプシン溶液 (Nacalai: 18172-94 等)
- ・150 cm² 培養フラスコ
(コンタミネーションに注意すれば 15 cm 培養ディッシュでも可)
- ・50 mL 遠心チューブ
- ・500 mL ポリスチレン製ストレージボトル (Corning 430282 等)
(または滅菌したガラスビン)

1 日目: L-WRN 細胞の解凍

- ・50 mL 遠心チューブに 30 mL の L cell medium をとり、37°C ウォーターバスで保温しておく。
- ・ディープフリーザーあるいは液体窒素タンクから L-WRN 細胞のクライオチューブを 1 本取り出し、37°C ウォーターバスで温めて融解させる。
- ・チューブ内が完全に融解したら直ちにクライオチューブと 50 mL チューブをウォーターバスから取り出し、70% EtOH を吹きかけてよく消毒してからフードに入れる。
- ・50 mL チューブの L cell medium を 1 mL クライオチューブに加えて穏やかにピペティングし、クライオチューブの中身を全て 50 mL チューブに移す。
- ・150 cm² 培養フラスコに 50 mL チューブの中身を全て移し、ディッシュを縦横方向にゆっくりと反復して動かし細胞を均等に分散させる。
- ・37°C インキュベーターで培養を開始する。

・翌日に 250 μ L の G418 溶液と 125 μ L の Hygromycin B 溶液を加える。

※細胞を解凍した直後は薬剤耐性遺伝子が機能しないので G418 と Hygromycin B を絶対に添加しないこと

3 日目 : L-WRN 細胞のパッセージ

・2-3 日間培養してコンフルエントになったら培養液をアスピレーターで吸い取り、約 15 mL の PBS-EDTA で培養ディッシュ表面の細胞をリンスする。

・PBS-EDTA をアスピレーターで吸い取り、1 mL のトリプシン EDTA 溶液を加える。

・培養フラスコをタッピングして(横から叩いて)トリプシン EDTA 溶液をフラスコ全体に行き渡らせる。

・37°C インキュベーターで 5 分間保温する。

・培養フラスコをタッピングして細胞を遊離させる。

・11 mL の L cell medium をフラスコに加えてピペティングし、細胞を分散させる。

・細胞を 50 mL チューブに回収し、200 g で 5 分遠心する。

・150 cm² 培養フラスコ8個に 1 個あたり 20 mL の L cell medium を分注する。

・遠心が終わったら培養液をアスピレーターとピペットで完全に吸い取る。

・40 mL の L cell medium を加えて細胞を分散させ、8 枚のフラスコに 5 mL ずつ分注する。

・フラスコを縦横方向にゆっくりと反復して動かし、細胞を均等に分散させる。

・37°C インキュベーターで培養を開始する。

6 日目 : 培養上清(Conditioned medium)の調整開始

・2-3 日間培養して細胞がコンフルエントになったら Conditioned medium の調整を開始する。

※細胞が隙間なく敷石状に綺麗に並んで少数の細胞が培養液中に遊離し始めた時が適切なタイミングである。

・8 個のフラスコを取り出し、1 個ずつ作業を行う(表面の乾燥を防ぐため)。

・培養液をアスピレーターで完全に除去し、26 mL の Primary culture medium を加える。

・37°C インキュベーターで培養を開始する。

※L-WRN 細胞の増殖の具合によってここまでにかかる日数は変わる可能性がある。

7 日目 : 培養上清の回収(1 日目)

・培養開始 24 時間後に 8 個のフラスコを取り出し、1 個ずつ作業を行う(表面の乾燥を防ぐため)。

・ピペットエイドを 2 台用意し、それぞれ 10 mL ピペットと 25 mL ピペットを装着しておく(他の器具に触れないよう注意)。

・10 mL ピペットで培養液を 50 mL チューブに回収する(ディッシュ 2 枚分の培養液を 1 本のチュ

ープにまとめる)。

- ・25 mL ピペットで 26 mL の Primary culture medium を加える。
- ・合計 4 本の 50 mL チューブを 2,000 g で 5 分間遠心する(培養液中に浮遊する細胞が沈澱する)。
- ・4 本分の上清をデカンテーションで 500 mL 滅菌ボトルに回収し、冷蔵庫で保管する。

8 日目:培養上清の回収(2 日目)

- ・培養開始 48 時間後に 8 個のフラスコを取り出す。
- ・10 mL ピペットで培養液を 50 mL チューブに回収する(フラスコ 2 個分の培養液を 1 本のチューブにまとめる)。培養ディッシュは廃棄する。
- ・合計 4 本の 50 mL チューブを 2,000 g で 5 分間遠心する。
- ・4 本分の上清をデカンテーションで前日から冷蔵保存していた 500 mL 滅菌ボトルに回収し、よく混合する(合計 400 mL 弱となる)。

※3 日目以降も回収可能だが、細胞の状態によっては性能が徐々に落ちてくるため、大量に必要でなければ 2 日目までの回収を推奨する。

※特に高性能の培養上清を得たければ 1 日ごとに分けて保存し、後日性能検定を行う。

凍結保存

- ・50 mL チューブに 20 mL あるいは 25 mL ずつ分注し、凍結保存する。
- ・一本ずつ解凍して eL-WRN medium を調整する(一度解凍したら再凍結はしないこと)

※下記割合で 50% L-WRN CM を調整してから分注して凍結保存してもよい。

EGF 添加 50% L-WRN CM (eL-WRN medium)の調整

L-WRN CM (原液)	20 mL (50%)
Primary culture medium	20 mL (50%)
10 mM Y-27632	40 μ L (X 1,000)
10 mM SB-431542	4 μ L (X 10,000)
500 μ g/mL EGF	4 μ L (X 10,000)
2.5 mg/mL Plasmocin	80 μ L (X 500)

eL-WRN 培養液の調製(中ロット) Ver.1 (10/3/2024)

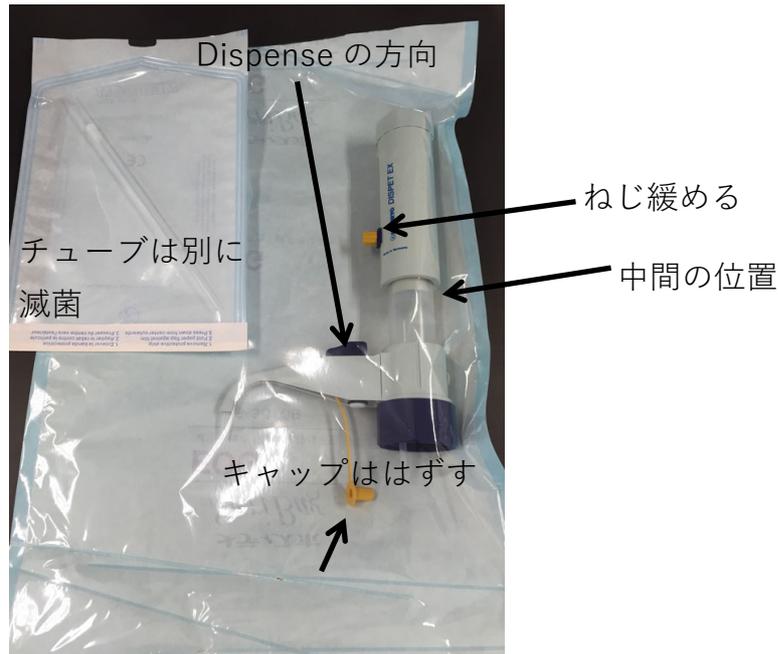
by Hiroyuki Miyoshi (platform@pcm.med.kyoto-u.ac.jp)

準備(小ロット調整に加えて必要なもの)

Nunc EasyFill Cell Factory (140360: 4 layers)

滅菌済み 2L ガラスボトル 2 本

滅菌済みディスペンサー(ニチリョーDISPET EX II: 00-DPX2-500) 1 式



1 日目:L-WRN 細胞の解凍

・小ロット調整の 1 日目と同じ

3 日目:L-WRN 細胞のパッセージ

- ・2-3 日間培養してコンフルエントになったら培養液をアスピレーターで吸い取り、約 15 mL の PBS-EDTA で培養フラスコ表面の細胞をリンスする。
- ・PBS-EDTA をアスピレーターで吸い取り、1 mL のトリプシン EDTA 溶液を加える。
- ・培養フラスコをタッピングして(横から軽く叩いて)トリプシン EDTA 溶液をフラスコ全体に行き渡らせる。
- ・37°C インキュベーターで 5 分間保温する。
- ・培養フラスコをタッピングして細胞を遊離させる。
- ・11 mL の L cell medium をフラスコに加えてピペティングし、細胞を分散させる。
- ・90 mL の L cell medium、1 mL の G418 溶液、500 μ L の Hygromycin B 溶液をさらに加える。

- ・25 mL ピペットでピペッティングし、4 個の新しい 150 cm² 培養フラスコに約 25 mL ずつ分注する。
- ・フラスコを縦横方向にゆっくりと反復して動かし、細胞を均等に分散させる。
- ・37°C インキュベーターで培養を開始する。

5 日目 : Cell Factory へのパッセージ

- ・2 日間培養して細胞がコンフルエントになったら前述の通り、トリプシン処理を行う。
- ・新しい L cell medium のボトル(約 560 mL)を用意する。
- ・細胞を 2 本の 50 mL チューブに回収し、200 g で 5 分間遠心する。
- ・上清をアスピレーターで除き、それぞれのチューブに 12 mL の L cell medium を加えてピペッティングする。
- ・チューブの中身を全て L cell medium のボトルに移して穏やかに攪拌する(泡だてないように)。
- ・Nunc EasyFill Cell Factory (4 layers)のベントキャップを外し、ボトルの中身を全て移す。
- ・ベントキャップとプラグを装着し、マニュアル通り培地を各レイヤーに分配して 2 日間培養する。

7 日目 : 培養上清の作製開始

- ・細胞がコンフルエントになっているのを確認する。
- ・500 mL 滅菌ボトルの 400 mL の線まで Primary culture medium を注ぎ、さらにピペットで 20 mL 追加する。液面に沿ってマーカーで線を引き、次回からはその線まで注ぐ。
- ・フード内で Cell Factory のベントキャップを緩め、排液口のプラグを外し、排液口から培地を排出する。
- ・排液口の周囲に培地がいたらアスピレーターで除去し、アルコール綿で注意深く拭く。プラグの内側に培地がたまっていたらアスピレーターで除去する。
- ・ストレージボトルの Primary culture medium を全て Cell Factory に注ぎ、ベントキャップとプラグを装着する。培地を各レイヤーに分配してインキュベーターに戻す。
- ・オリジナルのボトルに残った Primary culture medium は空になったストレージボトルに移して 4°C で保存する。

8-11 日目 : 培養上清の回収

- ・前日残った培地の入ったストレージボトルに、新しい培地を 420 mL の線まで注ぐ。
- ・Cell Factory を少し震盪して余分な細胞を培養液中に分散させてから培養液を新しい 500 mL ストレージボトルに回収する。
- ・420 mL の培地を Cell Factory に注ぎ、培地を各レイヤーに分配させてインキュベーターに戻す。

- ・回収した培養液を 8 本の 50 mL チューブにデカントで 50 mL ずつ分注する。400 mL を超えた分は 9 本目の 50 mL チューブに移す。
 - ・8 本の 50 mL チューブを 2,000 g、4°C で 5 分遠心する。
 - ・9 本目のチューブもバランスを取って 2,000 g、4°C で 5 分遠心する。
 - ・滅菌済み 2L ガラスボトル 2 本にそれぞれ 50 mL チューブ 4 本分(200mL)の培地をデカントで移す。沈殿させた細胞が混入しないように注意する。9 本目のチューブの培養液も半量ずつ 2 本のガラスボトルに移し、量を記録しておく。
 - ・ここまでの手順を 24 時間ごとに 4 日間繰り返す。
 - ・回収 4 日目、各ガラスボトルに $800 + \alpha$ mL (α は 9 本目のチューブの分)の Primary culture medium を加えて 50% CM を作製する。
 - ・さらに Y-27632 (1/1,000 容)、SB-431542 (1/10,000 容)、Plasmocin Prophylactic (1/500 容)、EGF (1/10,000 容)をボトルに加える。
 - ・ディスペンサーで 40 mL (50 mL 遠心チューブ)もしくは 13 mL (15 mL 遠心チューブ)を分注する。ディスペンサーに空気が入ったら残りはピペットで分注する。
 - ・キャップに培地がつかないように慎重に運んで冷凍保存する。
 - ・ディスペンサーとボトルを丁寧に洗浄する。
- ※2 ロット目(12-15 日目)の回収も可能だが、性能がやや落ちる傾向がある。ヒト由来細胞の培養には 1 ロット目の使用を推奨する。