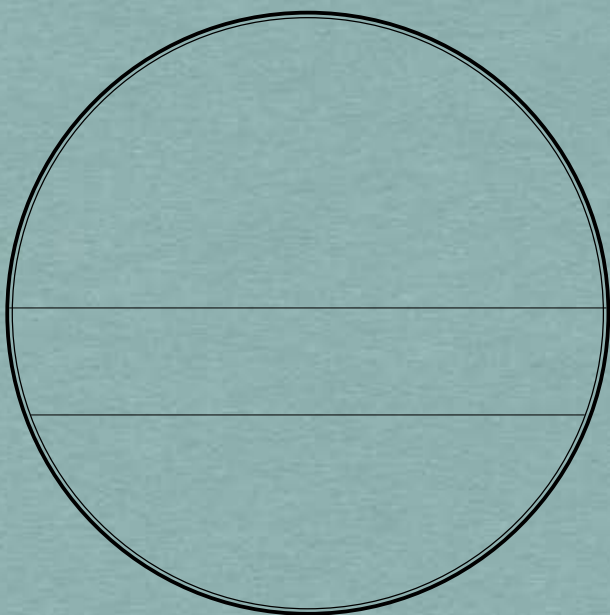


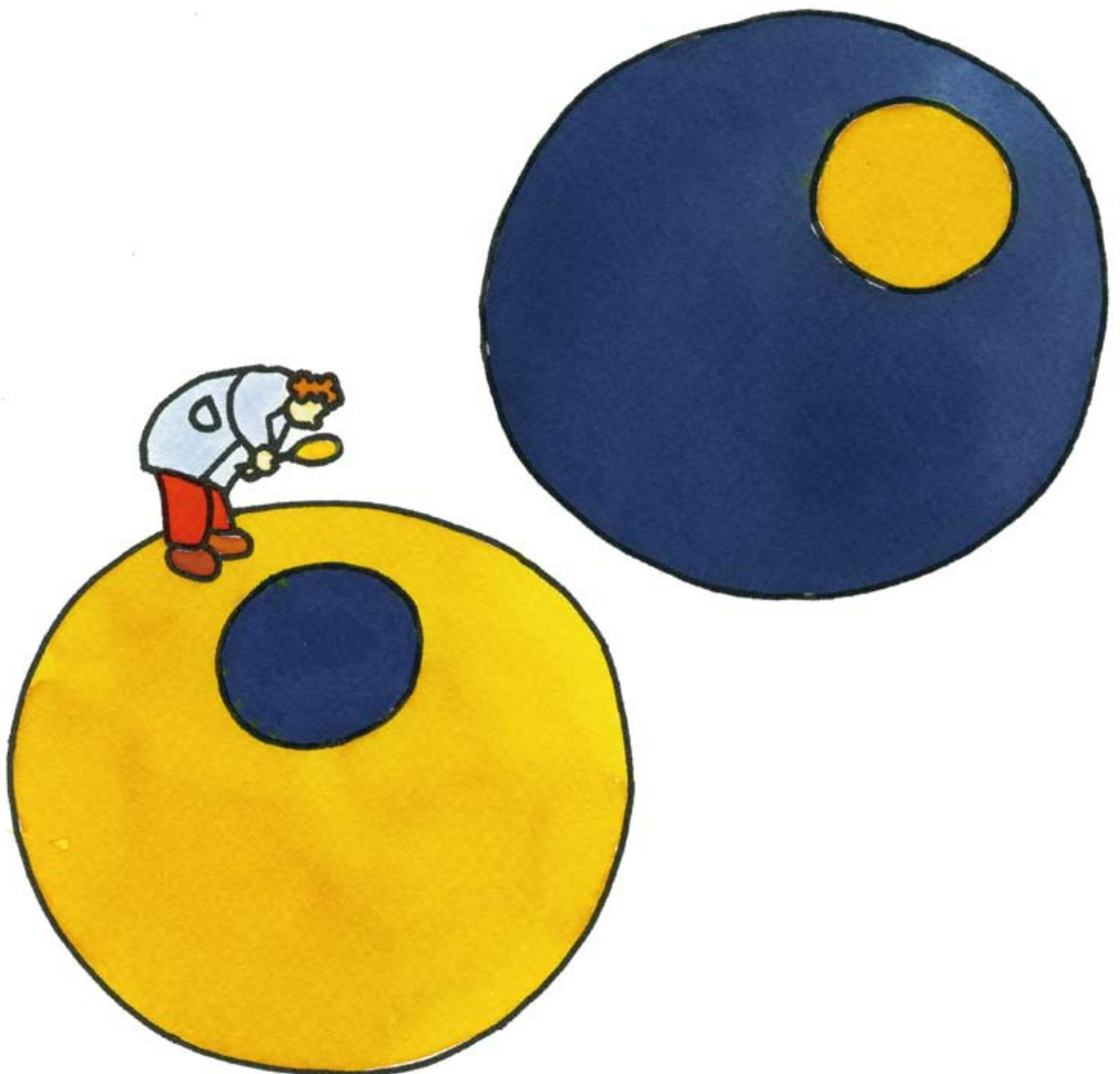
iCeMS/CiRA クラスルーム

幹細胞研究 やってみよう！

WORK BOOK



**ES 細胞と皮膚の細胞からできた iPS 細胞とが
どういう特徴をもつ細胞なのかを知りたい。**



おもな流れ

iCeMS / CiRA クラスルームでは、

ミッション（課題）が与えられる

↓

仮説を設定する

↓

仮説を検証するために実習をする

という流れで、あるテーマ（今回は幹細胞）を掘り下げて行きます。

もくじ

- ・・・ 2 おもな流れ
- 3 本日のミッション
- 4 実習 1 多能性幹細胞と線維芽細胞とを比較する
- 8 実習 2 染色したヒト多能性幹細胞とヒト線維芽細胞とを比較する
- 14 実習 3 ヒトiPS 細胞とヒトiPS 細胞由来神経細胞とを比較する
- 15 実習 4 染色したヒトiPS 細胞由来神経細胞を観察する
- 16 考えてみよう マウス iPS 細胞を使った実験を考えてみる
- 17 できるようになったこと
- 18 おまけの用語集

注意事項

実験室内では以下の事項をお守りください。

1. 貴重品はご自身の責任において管理してください。
2. 名札は常に身につけてください。
3. 実験室内に飲食物を持ち込まないでください。
4. 実験室に出入りする際は必ず手を洗ってください。
5. 実験機器・器具・薬品等、指示のあるもの以外には手を触れないでください。
6. けがをされた方、気分が悪くなられた方は速やかにスタッフに申し出て、その指示に従ってください。

その他質問等ありましたらお気軽にお尋ねください。



TODAY'S Mission!

「皮膚の細胞からできたiPS細胞」と「ES細胞」とが
同じ特徴をもつ細胞なのを知りたい。

何をもって同じ特徴をもつと
みなしますか？

どうやって調べますか？

できるだけたくさん
リストアップしよう！
他にないか友達に
聞いてみよう。

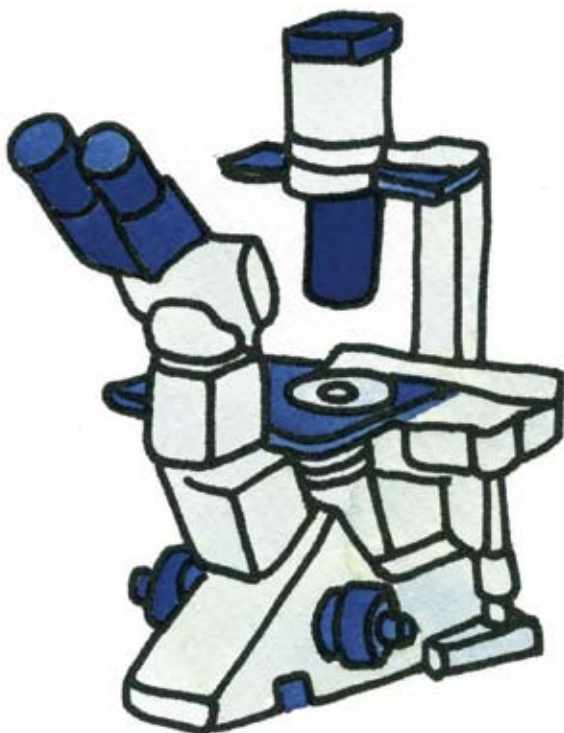
仮説

多能性幹細胞と線維芽細胞とを比較する

* 使用するもの

使用する機器

- ・ 位相差倒立顕微鏡
- ・ 位相差蛍光顕微鏡



使用する細胞

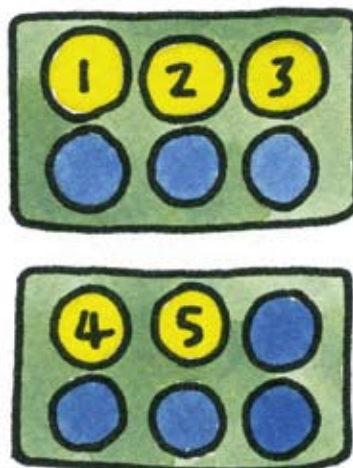
- ・ マウス線維芽細胞（皮膚の細胞）
- ・ マウス ES 細胞
- ・ マウス iPS 細胞
- ・ ヒト線維芽細胞（皮膚の細胞）
- ・ ヒト iPS 細胞

※ 上記 3 つのマウス由来の細胞には Nanog 遺伝子のレポーターが組み込まれています。
Nanog：多能性幹細胞のマーカー



* 実習準備

手を良く洗い、実験用手袋を着用する。



1

まずは、顕微鏡で6ウェルプレートの②に入っている細胞を観察してみましょう。

観察記録・メモ



Q. この中には、何種類の細胞が入っているでしょう？

種類

2

マウス線維芽細胞(①)とマウスES細胞(②)とを比べてみましょう。

観察記録・メモ



Q. 形は違いますか？



Q. 大きさは違いますか？



Q. 色は違いますか？

3

マウス ES 細胞 (②) とマウス iPS 細胞 (③) とを比べてみましょう。

観察記録・メモ



Q. 形は違いますか？



Q. 大きさは違いますか？



Q. 色は違いますか？

4

マウス線維芽細胞 (①)、マウス ES 細胞 (②)、マウス iPS 細胞 (③) を蛍光顕微鏡で観察してみましょう。

観察記録・メモ



Q. 緑色に光りましたか？
3 種類の細胞で、光り方は違いましたか？



Q. この結果から、何がわかるのでしょうか？

5

ヒト線維芽細胞（④）とヒトiPS細胞（⑤）とを比べてみましょう。

観察記録・メモ



Q. 形は違いますか？



Q. 大きさは違いますか？



Q. 色は違いますか？

6

ヒト線維芽細胞（④）とヒトiPS細胞（⑤）とを蛍光顕微鏡で観察してみましょう。

観察記録・メモ



Q. 緑色に光りましたか？
2種類の細胞で、光り方は違いましたか？



Q. この結果から、何がわかるのでしょうか？

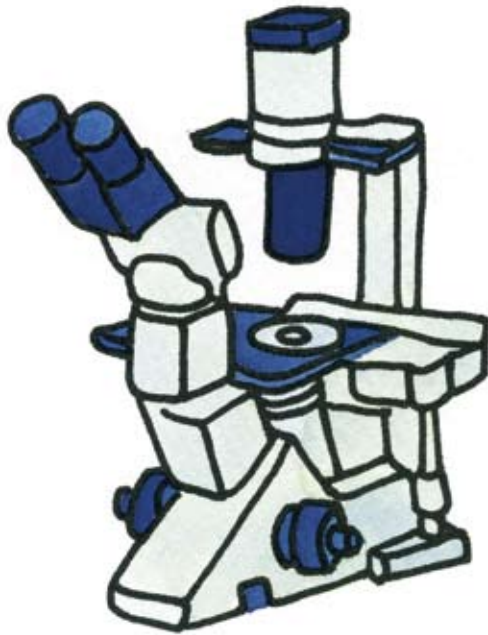
実習 2

染色したヒト多能性幹細胞とヒト線維芽細胞とを比較する

* 使用するもの

使用する機器

- ・位相差蛍光顕微鏡



使用する器具

- ・6 ウェルプレート

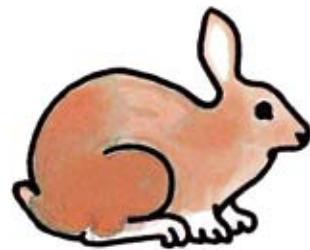


- ・ピペットマン (20 μ L 用)
- ・ピペットマン (1000 μ L 用)



使用する試薬

- ・PBS (Phosphate Buffered Saline): リン酸緩衝食塩水
- ・1% BSA 入り PBS ※ BSA (bovine serum albumin): ウシ血清アルブミン
- ・5% BSA 入り PBS
- ・0.2% Triton 入り PBS
- ・4% PFA 入り PBS ※ PFA: パラホルムアルデヒド



使用する抗体

- ・一次抗体
抗 Nanog 抗体
- ・二次抗体
Alexa488 anti-rabbit IgG
※ Alexa488: 緑色の蛍光色素



使用する細胞

- ・ヒト線維芽細胞
- ・ヒト iPS 細胞



おおまかな手順

① 細胞の準備



② 細胞の固定



③ 細胞の膜構造の破壊



④ ブロッキング



⑤ 一次抗体反応



⑥ 二次抗体反応



⑦ 観察へ



実施手順（プロトコール）

- 0) 細胞を準備する。
- 1) PBSを2mL用いてそれぞれのウェルを洗う。
- 2) 4% PFA 入り PBS を加え室温で20分間静置して、細胞を固定する。
- 3) PBSを2mL用いてそれぞれのウェルを洗う。
- 4) 0.2% Triton 入り PBSを2mLずつ加え、室温で5分間静置する。
- 5) PBS を2mL用いてそれぞれのウェルを洗う。
- 6) 5% BSA 入り PBS を加え、室温で60分間静置する。
- 7) 待ち時間に、抗 Nanog 抗体を 1/500 の濃度になるように 1% BSA 入り PBS で希釈する。
- 8) それぞれのウェルに手順（7）で調製した溶液を加える。
- 9) 4℃で一晩静置する。
- 10) P1000 のピペットマンで、それぞれのウェルに入っている液を吸って捨てる。
注意！ ウェルを乾かさないう手早く行うこと。
- 11) P1000 のピペットマンで PBS を 2mL 加える。
 その後5分間室温で静置する。
- 12) 手順（10）と手順（11）の作業をさらに2回繰り返す。

——— ここまではスタッフが行いました。



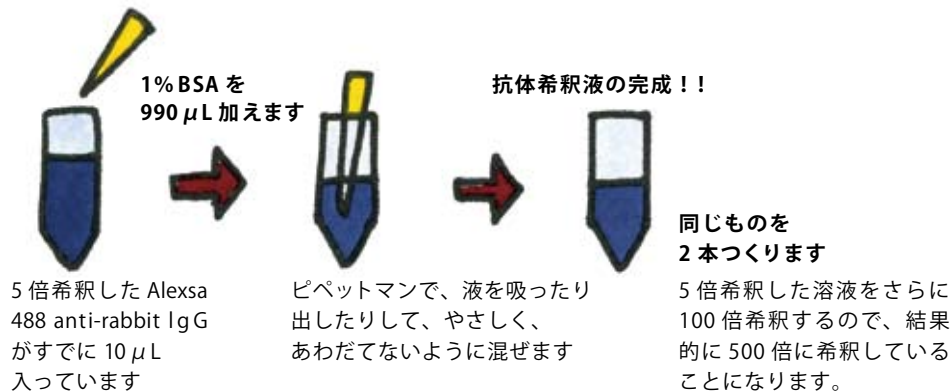
——— 今日是从ここから実際に作業を行います。

13) 抗体希釈液を作成する。

Alexa488 anti-rabbit IgG をチューブ中で 1% BSA 入り PBS を使って 500 倍になるように希釈しておく。

配布されたチューブ中にはすでに 5 倍希釈した Alexa488 anti-rabbit IgG 溶液が $10\mu\text{L}$ 入っている。そのチューブに P1000 のピペットマンで $990\mu\text{L}$ の 1% BSA 入り PBS を加える。同じものを 2 本つくる。

注意！ 優しく、泡立てないように混ぜること。



14) P1000 のピペットマンで、それぞれのウェルに入った PBS を吸って捨てる。

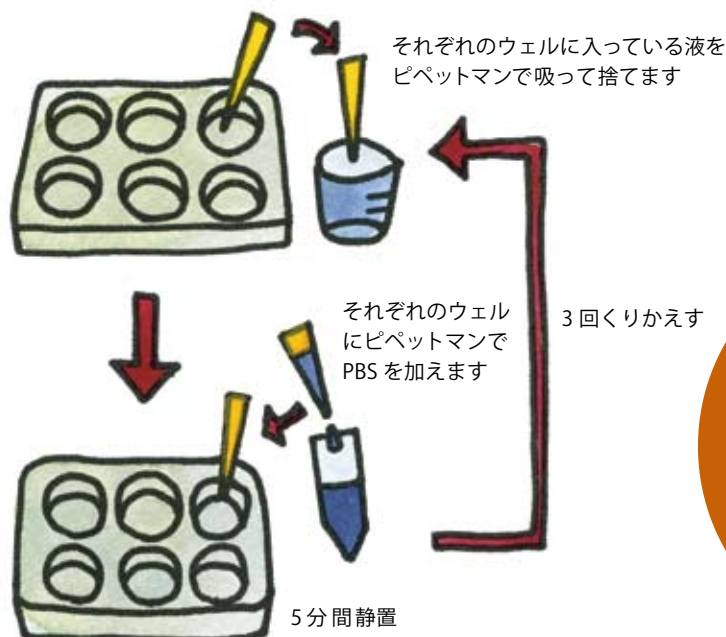
15) 手順 (13) で作成した抗体希釈液を P1000 のピペットマンを用いて、それぞれのウェルに $900\mu\text{L}$ ずつ入れる。

16) 遮光して、室温で 60 分間静置する。

開始時刻 ____ 時 ____ 分 終了時刻 ____ 時 ____ 分

17) 手順 (10) と手順 (11) の作業を 3 回繰り返し、抗体を洗い流す。

注意！ 室温で 5 分静置する際、アルミホイルでプレート进行を覆い、遮光すること (蛍光色素の褪色を防ぐため)。アルミホイルの継ぎ目が上にくるように覆う。



ドキドキしながら
蛍光顕微鏡で
観察する



ヒト線維芽細胞(④)とヒト iPS 細胞(⑤)とを蛍光顕微鏡で観察してみましょう。

観察記録・メモ



Q. 緑色に光りましたか？
2 種類の細胞で、光り方は違いましたか？



Q. この結果から、何がわかるのでしょうか？

? QUESTION!

次に、ES 細胞やiPS 細胞の分化能に関して考えていくことにしましょう。

以下の3つの質問について考えてみてください。



Q. 1 ES 細胞やiPS 細胞が「心筋細胞」になれるかを知りたい。

何をもって ES 細胞や iPS 細胞から分化した細胞が「心筋細胞」であると判断すればよいでしょうか？



Q. 2 ES 細胞やiPS 細胞が「神経細胞」になれるかを知りたい。

何をもって ES 細胞や iPS 細胞から分化した細胞が「神経細胞」であると判断すればよいでしょうか？



Q. 3 ES 細胞やiPS 細胞が「からだのあらゆる種類の細胞」になれるかどうかを知りたい。

何をもって ES 細胞や iPS 細胞が「体のあらゆる種類の細胞」に分化したと判断すればよいでしょうか？

実習 3

ヒトiPS細胞とヒトiPS細胞由来神経細胞とを比較する

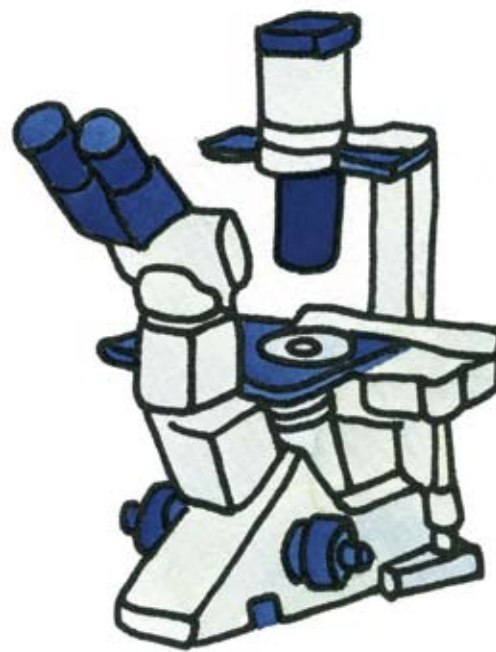
*使用するもの

使用する機器

- ・位相差倒立顕微鏡

使用する細胞

- ・ヒトiPS細胞
- ・ヒトiPS細胞由来神経細胞



ヒトiPS細胞とヒトiPS細胞由来神経細胞とを顕微鏡観察してみましょう。



ヒトiPS細胞とヒトiPS細胞由来神経細胞との違いを記録してみましょう。

また、観察して気づいたことをたくさんあげてみましょう。

実習 4

染色したヒトiPS細胞由来神経細胞を観察する

*使用するもの

使用する機器

- ・位相差蛍光顕微鏡



使用する抗体

- ・一次抗体
抗 TuJ1 抗体
※ TuJ1：神経細胞のマーカー
- ・二次抗体
Alexa488 anti-mouse IgG
※ Alexa488：緑色の蛍光色素



使用する細胞

- ・ヒト iPS 細胞由来神経細胞
※ 染色は、スタッフが前日までに行いました。



ヒトiPS細胞由来神経細胞を蛍光顕微鏡で観察してみましょう。



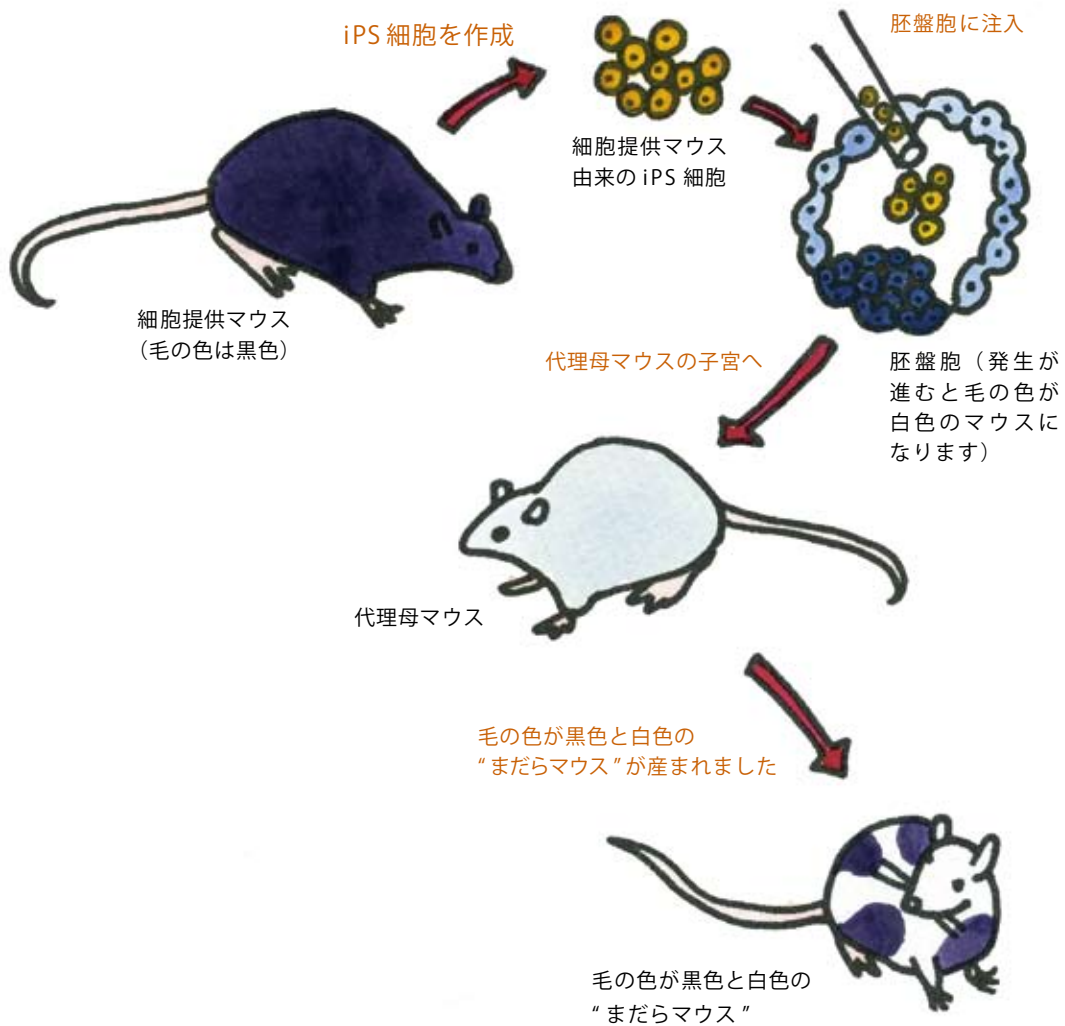
ヒトiPS細胞は、神経細胞になることができたでしょうか？

また、観察して気づいたことをたくさんあげてみましょう。



考えてみよう

マウスiPS細胞を使った実験を考えてみる

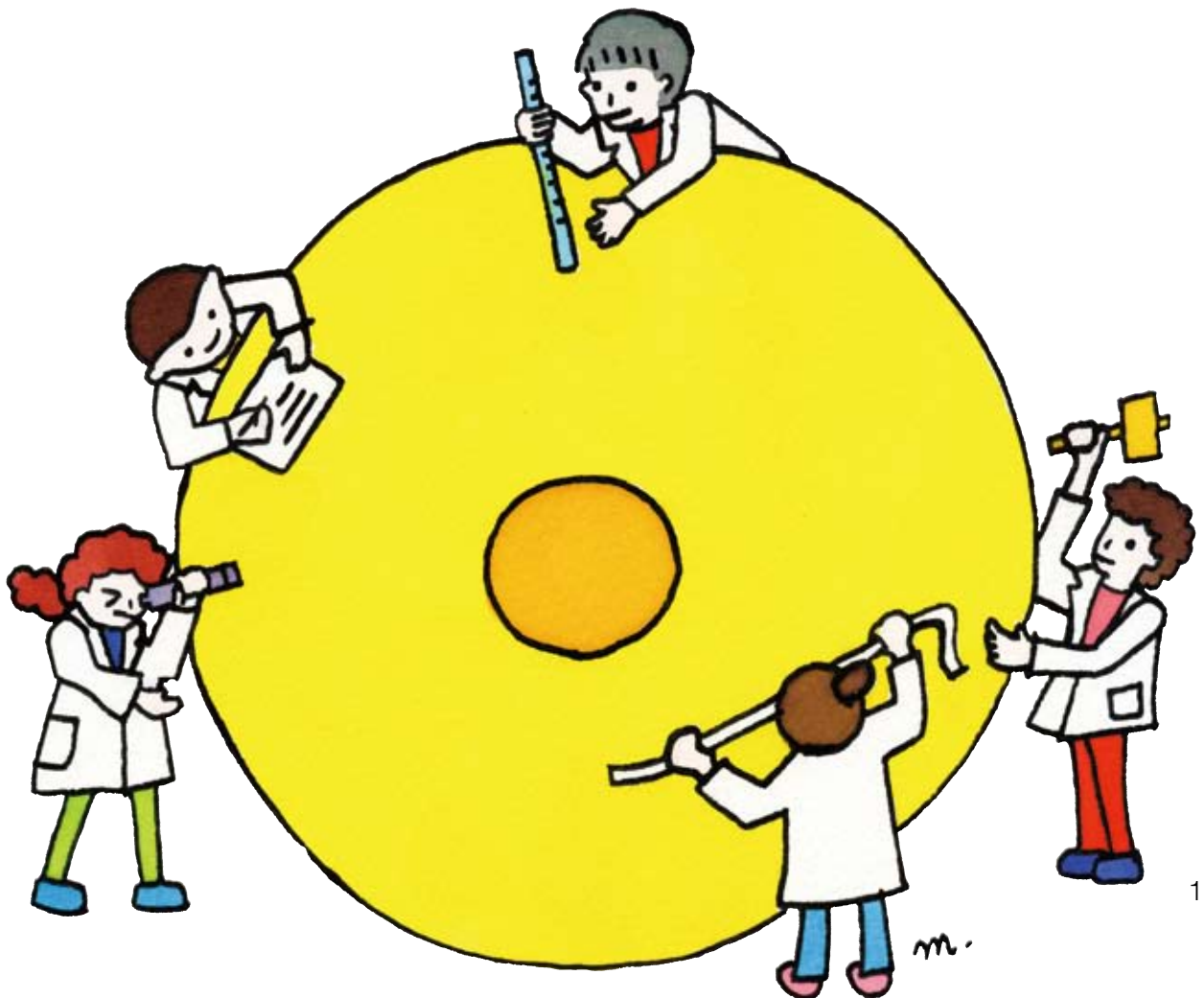


Q 毛の色が白と黒のまだらのマウスが産まれたことから、iPS細胞はどのような種類の細胞に分化する能力をもつことが確認できますか？

できるようになったこと

あなたはこの2日間で次の3つのことができるようになりました。

1. 仮説を立てること
2. とにかくまずやってみること
3. 実験により得られた結果を自分の言葉で説明し、まとめること



おまけの

用語集

フィーダー細胞：

フィーダーは、フィード（えさやり）する者という意味。名前の通り、他の細胞にえさをやるという役割をもつ。フィーダー細胞は増殖しないように処理されている。ES 細胞や iPS 細胞はフィーダー細胞の助けをかりて増殖する。

Nanog：

多能性幹細胞が多能性を保持したまま増殖するのに必要だと考えられているタンパク質。
多能性幹細胞で遺伝子スイッチが ON になっているので、多能性幹細胞のマーカーとして用いられる。
Nanog はケルト神話に登場する Tir nan Og（ティル・ナ・ノーグ；常若の国）にちなんで名づけられた。

TuJ1：

神経細胞の骨組みを作るタンパク質。主に神経細胞で遺伝子スイッチが ON になっているので、神経細胞のマーカーとして用いられる。

企 画： 京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS)
科学コミュニケーショングループ (加納 圭、水町衣里)
京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS) 国際広報室 (飯島由多加、葉草歩)
京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
国際広報室 (中村朱美、田村早紀、川上雅弘)

制 作： 京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS)
科学コミュニケーショングループ (加納 圭、水町衣里)

制作協力： 中辻 憲夫 (京都大学物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS))
山水康平 (京都大学再生医科学研究所)
田邊剛士 (京都大学再生医科学研究所)
熊谷英明 (京都大学再生医科学研究所)
小倉 綾 (京都大学再生医科学研究所)
中山和彦 (オリンパス株式会社)

デザイン： SunREOR (サンレオール)

イラスト： 竹村 真由子 (サンレオール)

発 行： 京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS)
京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

第 2 版： 2010 年 8 月 2 日 発行



