

凍結株化細胞製品

ラット由来神経幹細胞株 1464R

【 Rat neuronal stem cell line1464R, Code No. RNSCL-C】

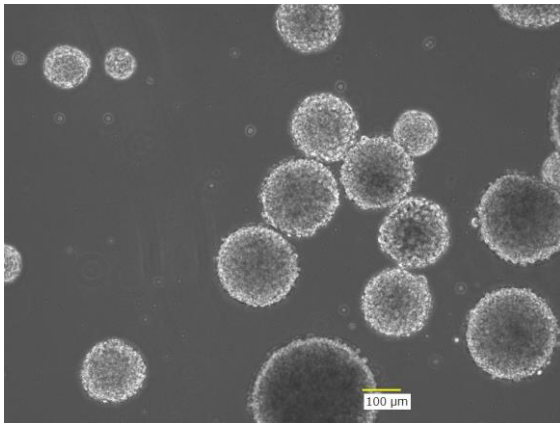
本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2022年3月2日作成

I. 製品概要

神経幹細胞株 1464R 細胞は、Fischer 344 ラット（成体・オス）の脳幹培養から得られた自然に不死化した細胞株です。長期間培養が可能であり、継代を重ねても形態の変質等がなく維持が可能です。レチノイン酸の存在下では、1464R 細胞は分裂を停止し、主にチューブリン β -III (TuJ1) 陽性の神経細胞に分化します。さらにグリア細胞系として GFAP 陽性のアストロサイトや O4 陽性のオリゴデンドロサイトにも分化します。

本製品は杏林大学・保健学部 分子神経生物学研究室 渡部 和彦 特任教授が樹立され、公益財団法人 東京都医学総合研究所のライセンスを受けて販売しています。



ニューロスフィアの浮遊培養（未分化）の様子

II. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には別売の専用培地又は専用培地用サプリメントにて調製した培地をご使用下さい。

III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用培地及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。

当社、製品サポート（メール：primarycell@cosmobio.co.jp）までご連絡下さい。

保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。

培地や使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	有効期限
ラット由来神経幹細胞株 1464R (凍結細胞)	1×10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保存	6ヶ月

※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください。

※本製品に関し、公益財団法人 東京都医学総合研究所とのライセンス契約に基づき、自己の研究目的にのみ使用し、細胞の第三者への提供（分配、貸与、譲渡、使用許可等）を禁止します。

V. 細胞の由来

ラット顔面神経核を含む脳幹組織由来 (Fischer 344 male, adult)

VI. 専用培地及びコーティング剤(別売)

品名	品番	容量	保存方法	有効期限
1464R 細胞維持用 サプリメント※1	RNSCL-SM	増殖因子 6mL×1本 抗生剤 2.5mL×1本	-20℃保存 (混合後 4℃保存)	ボトル記載
1464R 細胞維持用 コーティング溶液 A	RNSCL-CSA	50mL×1本	室温保存	ボトル記載
1464R 細胞 分化用培地※2	RNSCL-DM	基礎培地 500mL×1本 血清 25mL×1本 サプリメント 100μL×1本 抗生剤 2.5mL×1本	培地・血清・ 抗生剤 -20℃保存 サプリメント -80℃保存 (混合後 4℃保存)	ボトル記載
1464R 細胞分化用 コーティング溶液 B	RNSCL-CSB	1mL×1本	-20℃保存 (調製後 4℃保存)	ボトル記載

※1：サプリメントの他に、

Neurobasal™ Medium：Thermo Fisher Scientific K.K.、品番：21103049

B-27™ Supplement (50×), serum free：Thermo Fisher Scientific K.K.、品番：17504044

が必要になります。

※2：分化培地の他に、

B-27™ Supplement (50×), serum free：Thermo Fisher Scientific K.K.、品番：17504044

N-2 Supplement (100×)：Thermo Fisher Scientific K.K.、品番：17502048

が必要になります。

VII. 操作方法

※本製品は【継代可能】です。

維持培地調製・コーティング

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用 100mm dish
 ※コーティング時の乾燥のため、ディッシュやプレート等の蓋を外せる培養容器を推奨
- ・ 1464R 細胞維持用サプリメント
- ・ 1464R 細胞維持用コーティング溶液 A
- ・ Neurobasal™ Medium : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 21103049
- ・ B-27™ Supplement (50×), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044
- ・ PBS(-)

【維持用培地調製】

1. Neurobasal™ Medium 500mL に、4°Cで事前に解凍した B-27™ Supplement (50×)を 10mL 添加してください。
2. 1464R 細胞維持用サプリメント（増殖因子及び抗生剤）を事前に 4°Cで解凍しておき、上記 1.の培地に増殖因子 6mL 及び抗生剤 2.5mL を添加してください。
3. 調製後は 4°Cで保管ください。

【コーティング】

1. 培養に必要な分のディッシュやプレート等を用意してください。
2. 1464R 細胞維持用コーティング溶液 A を各容器に下記の表に従って添加し、均一になるように広げてください。
3. クリーンベンチの中で、容器の蓋を開けた状態で液が無くなるまで（要 1～2 時間）、完全に乾燥させてください。
4. 乾燥後はラップや密閉バッグなどに入れて、室温で保管ください。
5. 使用直前に PBS(-)等で 1~2 回洗浄してください。

培養容器	コーティング剤添加量	培養容器	コーティング剤添加量
100 mm dish	3.3mL	60mm	1.3mL
35mm	540μL	12well	250μL
24well	120μL	48well	60μL
96well	30μL		



細胞解凍・播種

※下記は、100 mm dish で培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・維持コーティング済 100mm dish 2 枚
- ・調製済維持培地
- ・PBS(-)

1. コーティング済の 100mm dish を PBS (-) 等で 1~2 回洗浄してください。
2. 凍結細胞のバイアルを、37°C 温水にて 2 分間加温して解凍してください。
※凍結バイアルを液体窒素から移動する際に時間がかかる場合はドライアイス等に入れて移動してください。
3. 解凍した細胞液は、予め室温に戻した培地 9 mL が入っている 50 mL 遠沈管に移し混和した後、遠沈管内の培地を 1 mL 分取し、バイアルを共洗いして細胞液を回収してください。
4. 室温下で、120×g、5 分間遠心してください。
5. 遠心後、上清を除去し、10mL の培地を加えてピペッティングし、再度細胞を懸濁してください。
6. 細胞懸濁液を全量、維持コーティング済 100mm dish 2 枚に播種し、5% CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養してください。
7. 培地交換は 37°C に加温した培地を用いて、2~3 日に 1 回実施してください。浮遊しているニューロスフィアを吸引しないように培地がこぼれない程度に dish を傾けて（ニューロスフィアを片側によせるように）、傾けた反対側の液の表面からピペットでゆっくりと半量を吸引してください。
※吸引装置等では吸引しすぎてしまう可能性があるため、スピードや量を調節できるピペットでの吸引を推奨します。
8. 吸引した培地と同量程度の培地を添加し、再度インキュベーターで培養してください。
※3~7 日間でニューロスフィアを形成します。

細胞継代

【準備するもの】

- ・維持コーティング済 100mm dish
- ・調製済維持培地
- ・1000 μ L マイクロピペット

1. 継代を行うタイミングは図 1 の培養写真を参照に同程度（直径 100~200 μ m 程度）のニューロスフィアになった段階で行ってください。

※ニューロスフィアを大きくしすぎると、ニューロスフィアが分散しない・中心部分が壊死する等、問題が発生する可能性が高くなるため、解凍播種後 1 回目の継代以降は週 2 回の頻度で継代することを推奨いたします。

※ニューロスフィアの大きさはかなりばらつきが出ます。大きめのニューロスフィアの中心部が壊死したり、ニューロスフィアの周囲が崩れてきたりした場合は、オーバーコンフルエントのため、そうなる前に継代してください。

2. 浮遊しているニューロスフィアを培地ごと全て 50mL 遠沈管に回収してください。
3. 室温下で、120 \times g、5 分間遠心してください。
4. 上清を除去後、培地を 1~2mL 入れ、マイクロピペットで 20~30 回ピペッティングしてください。
※大部分が Single cell か数個の塊に分散されていれば問題ありません。
5. コーティング済 dish に維持用培地を 10mL/dish 添加してください。
6. 分散した細胞懸濁液を split ratio（1 : 5~1 : 10）になるように播種してください。
7. 5% CO₂ 存在下の 37 $^{\circ}$ C インキュベーターで培養してください。
8. 培地交換が必要な場合は 37 $^{\circ}$ C に加温した培地を用いて、2~3 日に 1 回実施してください。浮遊しているニューロスフィアを吸引しないように培地がこぼれない程度に dish を傾けて（ニューロスフィアを片側によせるように）、傾けた反対側の液の表面からピペットでゆっくりと半量を吸引してください。

※基本的には週 2 回の継代のため、培地交換よりは継代したほうが良いです。

9. 吸引した培地と同量程度の培地を添加し、再度インキュベーターで培養してください。

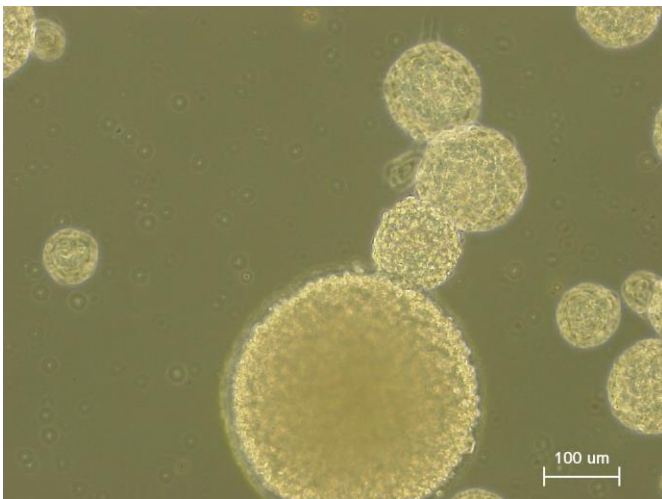


図 1：解凍播種後、培養 7 日目のニューロスフィア



凍結ストックの調製

【準備するもの】

- ・ COS banker(KOJ 製品コード COS-CFM01)
- ・ 1000 μ L マイクロピペット
- ・ 凍結保存用チューブ
- ・ 細胞凍結用コンテナ(BM 機器 製品コード BCS-136 または 同等品)

1. 細胞継代方法の 1～3 を行います。
2. 遠心後、上清を除去し、COS banker(KOJ 製品コード COS-CFM01) を 1～2mL 添加し、マイクロピペットで 20～30 回ピペッティングしてください。
3. 細胞数をカウントし、 1×10^6 cells/mL になる様に COS banker を添加してください。
4. 凍結保存用チューブに 1mL/チューブで分注し、細胞凍結用コンテナを用いて-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存します。
5. 1 日以上-80 $^{\circ}$ Cにて静置後、液体窒素中に移してください。

分化用培地調製・コーティング

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用の培養容器 (dish、plate、flask 等)
- ・ 1464R 細胞分化用培地
- ・ 1464R 細胞分化用コーティング溶液 B
- ・ B-27TM Supplement (50 \times), serum free : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17504044
- ・ N-2 Supplement (100 \times) : Thermo Fisher Scientific K.K.、品番 : 17502048
- ・ 滅菌超純水
- ・ PBS(-)

【分化培地調製】

1. 事前に 1464R 細胞分化用培地に付属の基礎培地、血清、サプリメント及び抗生物質を 4 $^{\circ}$ Cで解凍してください。
2. 事前に B-27TM Supplement 及び N-2 Supplement を 4 $^{\circ}$ Cで解凍してください。
3. 基礎培地 500mL に解凍した血清 25mL、サプリメント 100 μ L、抗生物質 2.5mL を添加してください。
4. B-27TM Supplement を 5mL ($\times 100$)、及び N-2 Supplement を 2.5mL ($\times 200$) 添加してください。
5. 調製後は 4 $^{\circ}$ Cで保管ください

※サプリメントが光に弱いため、培地調製後は直射日光や常に光が当たる場所での保管は避けてください。

※含有するサプリメントの光による劣化を防ぐため、余剰な培地は-20 $^{\circ}$ Cで分注し、凍結保管する方法もお勧めいたします（複数回の凍結融解はお勧めできません）。



【コーティング】

1. 培養に必要な分のディッシュやプレート等を用意してください。
2. 1464R 細胞分化用コーティング溶液 B を解凍し、滅菌済超純水に×100 になるように添加してください。
3. 各容器に下記の表に従って添加し、均一になるように広げてください。
4. 蓋をした状態で、37°Cインキュベーターに一晩以上静置してください。
5. 使用直前に PBS(-)等で 2 回洗浄してください。

培養容器	コーティング剤添加量	培養容器	コーティング剤添加量
100 mm dish	5.5mL	60mm	2.1mL
35mm	0.9mL	12well	0.4mL
24well	0.2mL	48well	100μL
96well	50μL		

分化培養

【準備するもの】

- ・分化コーティング済培養容器
- ・調製済分化培地
- ・1000μL マイクロピペット

1. 細胞継代方法の 1~3 を行います。
2. 上清を除去後、分化培地を 1~2mL 入れ、マイクロピペットで 20~30 回ピペッティングしてください。
※大部分が Single cell か数個の塊に解れていれば問題ありません。
3. 細胞数をカウントし、分化培地を適量添加して $1.5\sim 2\times 10^4$ cells/cm² の密度で分化コーティング済培養容器に播種してください。
4. 5% CO₂ 存在下の 37°Cインキュベーターで培養してください。
※未分化維持のためのニューロスフィアでの浮遊培養とは異なり、細胞は接着して分化していきま
す。
5. 培地交換は 37°Cに加温した培地を用いて、2~3 日に 1 回、細胞を剥離しないように注意しながら
全量交換してください。

※播種後、10 時間程度で分化し始めます。完全に分化するには 7~10 日程度かかります。分化後は増殖しないため、分化した状態で、1~2 カ月は維持が可能です（培地交換は必要です）。

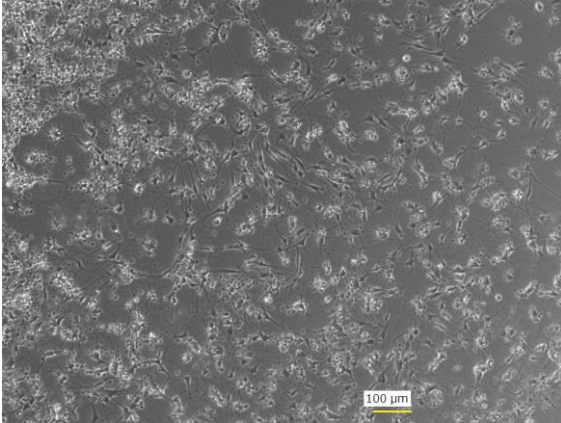
VIII. Q&A

1. 長期培養とありますが、どのくらいの期間培養可能ですか？また継代数はどのくらいですか？

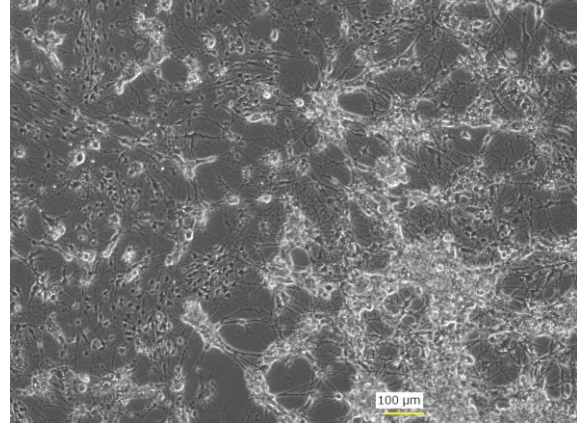
Ans. 開発者の先生の実績では、50~70回位までは継代可能であることを確認しております。継代数はロットによって異なりますので、お問い合わせください。

2. 分化割合をコントロールすることは可能ですか？

Ans. 強制分化剤で分化させる系ではないため、およそ神経細胞 70%、アストロサイト 20%、オリゴデンドロサイト 10%の割合で最終的に収束します。よって、割合をコントロールすることは出来ません。



培養例：分化3日目



分化10日目

※細胞が自然に塊を形成するため、観察する場所によって細胞の状態は異なります。上記の写真は一例となります。

IX. 技術情報

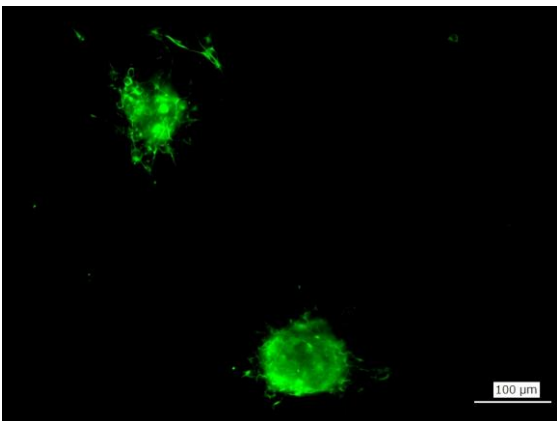
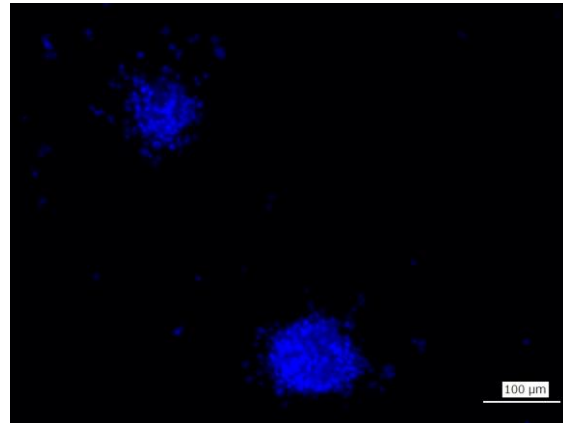
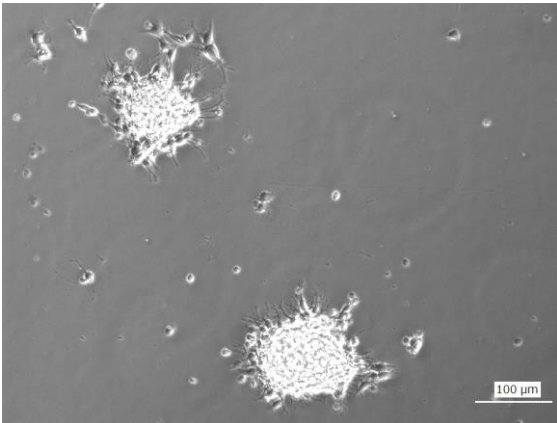


図2：未分化状態での免疫染色写真（左上：位相差画像、右上：核染色、左下：Anti-Nestin 抗体）

X. 参考文献

- 1) Watabe K, Akiyama K, Kawakami E, Ishii T, Endo K, Yanagisawa H, Sango K, Tsukamoto M. Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and shRNAs for protein degradation pathways in rodent motoneurons in vitro and in vivo. *Neuropathology*. 2014 Feb;34(1):83-98. doi: 10.1111/neup.12058. PMID:23937386.
- 2) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Myelinating cocultures of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. *Neuropathology*. 2017 Oct;37(5):475-481. doi: 10.1111/neup.12397. PMID: 28707715.
- 3) Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One*. 2017 Jun 9;12(6):e0179375. doi: 10.1371/journal.pone.0179375. PMID: 28599005.
- 4) Watabe K, Kato Y, Sakuma M, Murata M, Niida-Kawaguchi M, Takemura T, Hanagata N, Tada M, Kakita A, Shibata N. Praja1 RING-finger E3 ubiquitin ligase suppresses neuronal cytoplasmic TDP-43 aggregate formation. *Neuropathology* 2020;40(6):570-586. doi: 10.1111/neup.12694. PMID: 32686212.

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2

コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送

または primarycell@cosmobio.co.jp あて PDF ファイル送信



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）

TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp