

製品コード Y50055

研究用

Takara

**MiraCell® Endothelial Cells
(from ChiPSC12) Kit**

説明書

v202012

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	操作上の注意.....	4
V.	操作.....	5
	V-1. 細胞培養スケジュール.....	5
	V-2. MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) の調製.....	5
	V-3. 培養容器のフィブロネクチンコーティング.....	5
	V-4. 血管内皮細胞の解凍と維持培養.....	6
	V-5. 血管内皮細胞の継代.....	8
VI.	応用例：チューブ形成試験.....	9
VII.	関連製品.....	9
VIII.	注意.....	10

I. 製品説明

現在、ヒト初代血管内皮細胞は広く使用されていますが、同一ドナー由来細胞の確保が難しく、ロット差が大きいなどの問題があります。一方で、ヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、iPS 細胞の有する無限増殖能を利用し、同一ドナー由来で均質な細胞を繰り返し調製可能であることから、ヒト初代血管内皮細胞に代わる新たな血管内皮細胞として注目を浴びています。

MiraCell Endothelial Cells (from ChiPSC12) は、ヒト iPS 細胞から誘導した高純度血管内皮細胞であり、血管内皮細胞の性状・機能解析や、毒性試験などに使用可能です。

本製品は、京都大学 iPS 細胞研究所の山下潤教授によって研究開発されたヒト血管内皮細胞の作製技術を、タカラバイオが iHeart Japan 株式会社から 2014 年 6 月に導入し、以降、共同で開発を行った製品です。本作製技術は、製造工程において薬剤などを用いた純化を行うことなく、高純度の血管内皮細胞を調製できる点が特長です。また、長期間の培養に伴って生じる純度の低下が起きにくい点も特長の一つです。

なお、本製品の製造には、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (製品コード Y30010) を用いてフィーダーフリー下で培養された Cellartis human iPS cell line 12 (ChiPSC12) Kit (製品コード Y00285)* を使用しています。

* : iPS 細胞株 ChiPSC12 の詳細は下記ウェブページをご参照ください。
https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009146

本製品の特長

- 血管内皮細胞の純度 95%以上 (CD31 陽性率)
- 薬剤選択や代謝による純化工程無し
- チューブ形成能あり
- Dil-Ac-LDL 取り込み活性あり
- 血管内皮細胞の各種遺伝子発現あり

II. 内容

MiraCell Endothelial Cells (from ChiPSC12)	凍結バイアル 1 本	> 1.5 × 10 ⁶ cells
MiraCell EC Culture Medium	培地 1 ボトル	500 ml
MiraCell EC Culture Supplement	凍結添加剤 2 バイアル	各 9 ml

本製品以外に必要な試薬、器具 (主なもの)

- ・ 37℃ウォーターバス
- ・ 37℃、5% CO₂ インキュベータ
- ・ クリーンベンチまたは安全キャビネット
- ・ 電動ピペッター、およびプラスチックピペット
- ・ ピペットマン、および (フィルター付き) 滅菌チップ
- ・ 50 ml チューブ
- ・ 15 ml チューブ
- ・ ダルベッコ PBS Ca & Mg 含有 (D-PBS (+/+))
Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)
- ・ ダルベッコ PBS Ca & Mg 不含 (D-PBS (-/-))
Dulbecco's PBS, w/o Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (製品コード C-40232)
- ・ Accumax Cell Dissociation Solution (Innovative Cell Technologies, Inc. Code. AM105)
- ・ 細胞培養容器 (6 ウェル細胞培養用プレート等)
- ・ 1 mg/ml フィブロンectin 溶液 (ヒト血漿由来; Sigma-Aldrich, Code. F0895 等)
- ・ トリパンブルー溶液
- ・ 血球計算盤 (または自動セルカウンターなど)

III. 保存

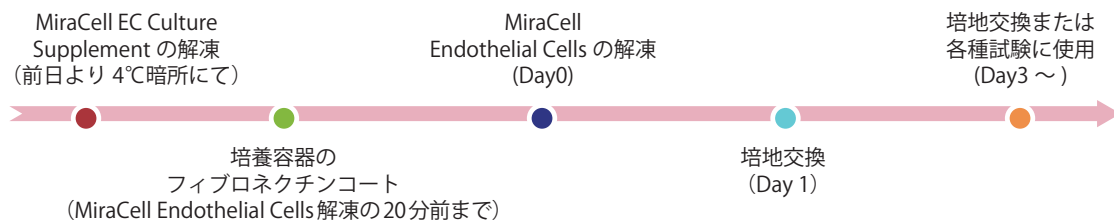
	保存
凍結血管内皮細胞 MiraCell Endothelial Cells (from ChiPSC12)	到着後、直ちに液体窒素タンクにて保存してください。
MiraCell EC Culture Medium	到着後、4℃にて遮光保存してください。 凍結保存はしないでください。
MiraCell EC Culture Supplement	使用する前日まで-20℃以下で凍結保存してください。 解凍後は再凍結しないでください。

IV. 操作上の注意

1. 使用する培地は、劣化を避けるため毎回使用量を分取した後、室温まで温めてご使用ください。
2. 1 時間を超える培地の加温も劣化の原因となりますので、避けるようご注意ください。
3. 無菌操作はクリーンベンチまたは安全キャビネット内で行ってください。
4. MiraCell EC Culture Medium には抗生物質が含まれていません。
添加する場合は、10 U/ml ペニシリンおよび 10 μg/ml ストレプトマイシンの添加が可能です。

V. 操作

V-1. 細胞培養スケジュール



V-2. MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) の調製

【細胞の解凍直前までに準備する】

1. 前日より 4℃暗所にて MiraCell EC Culture Supplement を解凍する。
2. 解凍した MiraCell EC Culture Supplement の 2 本全量を MiraCell EC Culture Medium に添加し、MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を調製する。
3. MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) の一部 (5 ml 程度) を分取し、MiraCell EC Culture Supplement のチューブをリンスした後、再び MiraCell EC Culture Medium のボトルへ戻す。

※ 培地は遮光 4℃にて保存し、MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) は調製後 2 週間以内に使い切ってください。凍結保存はできません。

※ 長期試験の場合は MiraCell EC Culture Medium の半量を別の無菌容器へ分注し、MiraCell EC Culture Supplement を 1 本のみ解凍して添加することで、MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を半量ずつ調製することが可能です。MiraCell EC Culture Supplement の解凍後の再凍結はできません。

V-3. 培養容器のフィブロネクチンコーティング

【凍結細胞バイアル解凍の当日 20 分前までに実施】

1. D-PBS (+/+) を用いて 1 mg/ml フィブロネクチン溶液を 20 倍希釈し、終濃度 50 μ g/ml のフィブロネクチン溶液を準備する。

D-PBS (+/+)	19 ml
1 mg/ml フィブロネクチン溶液	1 ml

2. ピペティングにより泡をたてないよう混合する。

[注] ボルテックス等による激しい攪拌はフィブロネクチンの活性に影響しますので避けてください。

3. 培養容器に 50 μ g/ml フィブロネクチン溶液を添加し、表面全体を覆うように溶液を満たす。

培養容器	フィブロネクチン希釈溶液
24 ウェルプレート	0.25 ml
12 ウェルプレート	0.5 ml
6 ウェルプレート	1.0 ml

[注] 血管内皮細胞は、6 ウェルプレート 3 枚程度に播種することが可能です。

4. 37℃、CO₂ インキュベーターで 20 分以上静置する。

[注] フィブロネクチン溶液は、細胞懸濁液添加直前に除去してください。

V-4. 血管内皮細胞の解凍と維持培養

【Day 0】

- ・ 解凍までにウォーターバスを 37°C に設定しておく
- ・ 8 ml の MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を 15 ml チューブへ分取する。
- ・ 培養に必要な量の MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) (35 ml 程度) を 50 ml チューブに分取し、室温まで温めておく。
- ・ MiraCell Endothelial Cells (from ChiPSC12) バイアルを液体窒素タンクから液体窒素あるいはドライアイスを含む容器に移す。

1. 凍結バイアルを 37°C のウォーターバスで 2 分間インキュベートし、解凍する。
[注] 解凍中、バイアルを振らないでください。
2. 70%エタノールでバイアルを滅菌消毒後、キムワイプ等で余分なエタノールを拭き取る。
3. 細胞懸濁液は、1 ml ピペットマンを用いてあらかじめ分取しておいた 8 ml の MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) へ添加する。
4. 培養用に用意した MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を 1 ml 分取してバイアルをリンスし、3. で細胞懸濁液を添加したチューブへ添加する。
5. 200 × g、20°C で 5 分間遠心を行う。
6. 上清をアスピレーターで吸引除去する。
[注] 吸引の際、上清を完全に除去しようとするすると細胞ごと吸引してしまう恐れがあるため、0.2 ml 程度上清を残してください。
7. 軽くタッピングを行い、細胞ペレットをほぐす。
8. 2 ml の MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を加え、2 ~ 3 回ピペッティングを行う。
9. 細胞懸濁液を 20 μl 程度分取し、トリパンブルー溶液による染色後、血球計算盤（または自動セルカウンターなど）を用いて細胞数を測定する。
10. 必要量の細胞懸濁液を別の培養用チューブに移し、MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を適量加え、細胞濃度が 0.5×10^5 cells/ml になるように調製する。
11. 培養プレートよりフィブロネクチン溶液を除去後、6 ウェルプレート 1 ウェルあたり 2 ml の細胞懸濁液を添加する（他の培養容器は下記参照）。

培養容器	細胞懸濁液量 (0.5×10^5 cells/ml)	細胞数
24 ウェルプレート	0.5 ml	0.25×10^5
12 ウェルプレート	1 ml	0.5×10^5
6 ウェルプレート	2 ml	1.0×10^5

12. プレートを前後左右に軽くゆすり細胞を均一にした後、37°C、5% CO₂ インキュベータにて培養を行う。
[注] 培養容器をインキュベータに入れた後は、可能な限り培養容器を動かさないでください。細胞の密度むらやプレーティング効率の低下を招くことがあります。

【 Day 1 】

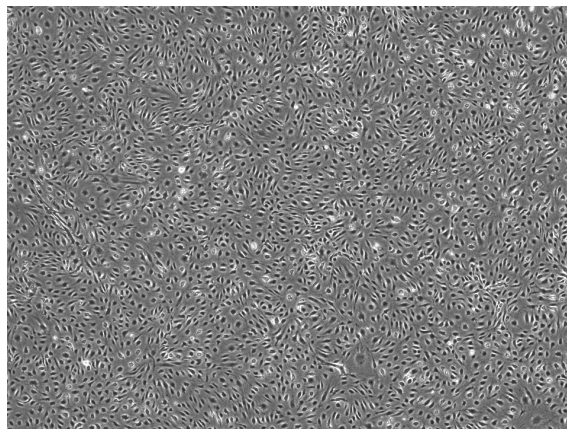
13. 解凍の翌日、培養容器から培地をアスピレーターにて吸引除去する。
14. 予め室温まで温めた MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を加える。

培養容器	培地添加量
24 ウェルプレート	0.5 ml
12 ウェルプレート	1.0 ml
6 ウェルプレート	2.0 ml

15. さらに2日間、37℃、5% CO₂ インキュベータにて培養を継続する。
その後は、1～2日おきに培地をアスピレーターで全量吸引除去し、予め室温まで温めた MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を上表の液量添加することで培地交換を行う。

V-5. 血管内皮細胞の継代

MiraCell Endothelial Cells (from ChiPSC12) は、解凍から 3～5 日経過後にコンフルエントとなり（下図参照）、各種アッセイ用の培養容器へと継代することが可能となる。ここでは、6 ウェルプレート为例に、様々なアプリケーション用にアッセイ用培養容器へと継代する方法について記載する。



1. アスピレーターで培地を吸引する。
2. 室温まで温めた D-PBS (-/-) 2 ml をウェルに加える。
3. D-PBS (-/-) をアスピレーターで吸引後、再度 D-PBS (-/-) 2 ml をウェルに加える。
4. D-PBS (-/-) を吸引除去し、Accumax を 0.5 ml 添加し、37℃で 4～8 分インキュベートする。
5. プレートを横から強くたたき、血管内皮細胞を可能な限り剥離させる。
6. 0.5 ml の室温まで温めた MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を添加し、1 ml ピペットマンを用いてウェル内の細胞懸濁液を培養用チューブに移す。
7. 1 ml の MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) を細胞回収後のウェルに添加後、ウェル上端と下端をゆっくりと 1 ml ピペットマンで各 3～5 回ピPETTINGし、残った細胞を剥離させる。
8. ウェル内の溶液を、6. にて細胞懸濁液を移した培養用チューブへ移す。
9. 細胞懸濁液を 1 回ピPETTINGした後、20 μ l をサンプリングして細胞数を測定する。
10. 200 \times g、20℃、5 分にて遠心を行い、上清をアスピレーターを用いて吸引除去する。
11. MiraCell EC Culture Medium (+Supplement) または適切な培地を用いて細胞を懸濁する。
12. 必要な細胞数を各種アッセイ用培養容器に播種する。
拡大培養を行う際にはフィブロネクチンコートプレートを使用することを推奨する。

VI. 応用例：チューブ形成試験

解凍から3日経過後、チューブ形成試験の実施が可能である。

1. 氷上にてマトリゲル（コーニング社製等）を用意し、下記記載量を培養容器の各ウェルに添加し、表面全体を覆うように溶液を満たした後、37℃にて30分以上静置することでプレートをコートする。

[注] マトリゲルは原液のまま使用してください。マトリゲルは常温において固化する特性があるため、使用の際は温めないようご注意ください。

培養容器	マトリゲル量
48 ウェルプレート	150 μ l
24 ウェルプレート	300 μ l

2. V-5. の手順に従い細胞を回収し、細胞数を測定する。
3. 200 \times g、20℃、5分にて遠心を行い、上清アスピレーターを用いて吸引除去する。
4. 2. で測定した細胞数に基づき、 3×10^5 cells/ml になるよう内皮細胞増殖培地 2 キット（製品コード C-22111）にて細胞を懸濁する。

[注] 細胞の懸濁時に 5×10^5 cells/ml に調整することで MiraCell EC Culture Medium でもチューブ形成が可能ですが、より安定した結果を取得するために内皮細胞増殖培地 2 キットを使用することをお勧めします。

5. マトリゲルコートを行ったプレートに壁側からゆっくりと細胞懸濁液を添加する。

[注] プレートは使用直前まで 37℃ に静置しておいてください。また、マトリゲルは除去しないでください。

培養容器	細胞懸濁液量
48 ウェルプレート	100 μ l
24 ウェルプレート	200 μ l

6. 37℃インキュベータにて一晩培養を行い、翌日観察を行う。

VII. 関連製品

Cellartis® human iPS cell line 12 (ChiPSC12) Kit (製品コード Y00285)

MiraCell® EC Culture Medium (製品コード Y50053)

内皮細胞増殖培地 2 キット：Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit (製品コード C-22111)

Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)

Dulbecco's PBS, w/o Ca^{++} / Mg^{++} (製品コード C-40232)

MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)

VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cellartis は Takara Bio Europe AB の、MiraCell は iHeart Japan 株式会社の登録商標です。DEF-CS は Takara Bio Europe AB の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社