

製品コード Y50300

研究用

Takara

**MiraCell® iPS Cell to Endothelial
Cell Differentiation Kit**

説明書

v201903

目次

I.	製品説明	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	操作上の注意	5
V.	操作.....	5
	V-1. 作業フロー.....	5
	V-2. 細胞培養スケジュール.....	6
	V-3. 内皮細胞への分化誘導.....	7
VI.	アプリケーション	11
	VI-1. 内皮細胞の凍結保存	11
	VI-2. チューブ形成試験.....	11
VII.	Q & A.....	12
VIII.	Appendix : ChiPSC12 株を用いて分化誘導を行った場合の培養例	13
	VIII-1. 細胞の形態.....	13
	VIII-1. FCM 解析結果.....	13
IX.	関連製品	14
X.	注意.....	14

I. 製品説明

本製品は、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導するキットで、作製した血管内皮細胞は、血管内皮細胞の性状・機能解析、血管新生阻害試験および組織培養などに使用可能です。

ヒト初代血管内皮細胞は、現在創薬研究や組織培養において広く使用されていますが、遺伝背景が異なるドナー間差に基づくロット間差が大きいたことが問題と考えられています。それらの問題を解決する手段として、ヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞が注目されています。血管内皮細胞は心臓、腎臓および肝臓等の 3D 培養や Organ-on-a-chip 開発に応用されていることから、今後ヒト iPS 細胞由来内皮細胞の組織工学研究における重要性はさらに高まることが期待されます。

本製品は、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導するキットで、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 iHeart Japan 株式会社から 2014 年に導入し、以降、共同で開発を行った製品です。本製品は、様々なヒト iPS 細胞株から培地交換および継代を行うことで、複雑な実験操作なく高純度の血管内皮細胞を得ることが出来る点が特長です。また、作製した血管内皮細胞は凍結保存が可能で、長期間の培養に伴って生じる純度の低下が起きにくいという点も特長の一つです。

なお、本製品に対応している iPS 細胞は、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ヒト iPS 細胞です。

本製品の特長

- T25 フラスコ 1 本または 6 well plate 3 ウェル分の iPS 細胞から血管内皮細胞を誘導可能
- 分化誘導後の血管内皮細胞純度 (CD31 陽性率) は概ね 80% 以上*¹ (Day 18)
- 誘導後の血管内皮細胞は CELLBANKER 1 plus による凍結保存が可能
- MiraCell EC Culture Medium と組み合わせることで誘導した血管内皮細胞の拡大培養が可能*²

* 1：すべての iPS 細胞株で確認していないため、検討が必要な場合があります。

* 2：増殖性は使用した iPS 細胞株によって異なります。

II. 内容

試薬	容量	保存
Coating Reagent 1 (Day0 & 2)	0.35 ml	- 80°C
Coating Reagent 2 (Day11)	1.5 ml	4°C
Supplement 1 (Day3)	0.42 ml	- 80°C
Supplement 2 (Day4)	0.33 ml	- 80°C
Supplement 3 (Day7)	0.3 ml	- 80°C
Supplement 4 (Day8)	1.2 ml	- 80°C
Supplement 5 (Day9)	1.0 ml	- 80°C
Supplement 6 (Day11)	1.8 ml	- 80°C
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9)	200 ml	4°C
EC Differentiation Basal Medium 2 (Day11)	50 ml	4°C

本製品以外に必要な試薬、器具 (主なもの)

- 37°C、5% CO₂ インキュベーター
- 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滅菌チップ (フィルター付き)
- 50 ml 遠沈管
- 15 ml 遠沈管
- 1.5 ml チューブ
- T25 フラスコ
25 cm² 長方形型カントネック細胞培養用フラスコ, ベントキャップ付き (Corning, Code. 430639)
- T75 フラスコ
75 cm² U-Shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap (Corning, Code. 430641U)
- 6 well plate
6 ウェル 透明 細胞培養処理 マルチウェルプレート, 個別包装 滅菌 (Corning, Code. 3516)
- 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)
- Cellartis DEF-CS 500 Culture System (製品コード Y30010)
- MiraCell EC Culture Medium (製品コード Y50053)
- DMEM (Sigma, Code. D5796)
- Fatal bovine serum
- Penicillin-streptomycin
- TrypLE Select (1X), no Phenol Red (Thermo Fisher Scientific, Code. 12563011)
- トリパンプルー溶液
- 血球計算盤
- 凍結保存液
- バイセル (凍結処理容器) (日本フリーザー)

III. 保存

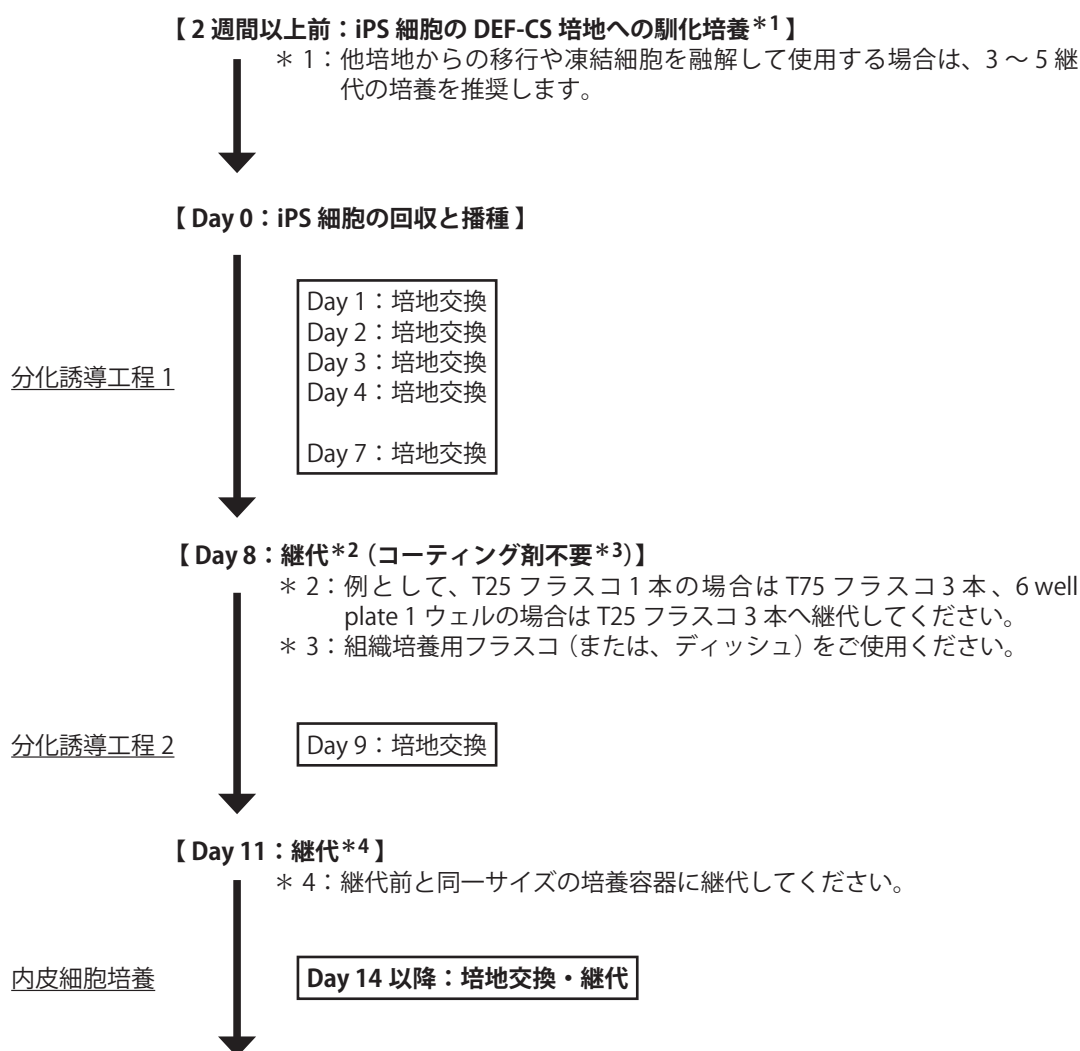
- 冷凍試薬 (Coating Reagent 1、Supplement 1 ~ 6) は、使用する直前まで - 80°C 以下で凍結保存してください。凍結融解により若干活性が下がることがあるため、融解後使用する量に小分けし、再凍結は 1 回のみとしてください。
- 冷蔵試薬 (Coating Reagent 2、EC Differentiation Basal Medium 1、2) は、4°C で保存してください。凍結保存はしないでください。

IV. 操作上の注意

1. Coating Reagent 1 (Day0 & 2) はゲル化しやすい性質があるため、4℃で融解し、冷やした培地に添加して混合してから加温してください。
2. Coating Reagent 1 (Day0 & 2) 以外の凍結試薬は、室温で融解し、予め加温した培地に添加してご使用ください。
3. 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～37℃へ温めてご使用ください。
4. また1時間を超えた長時間におよぶ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。

V. 操作

V-1. 作業フロー



V-2. 細胞培養スケジュール

日程	操作内容	培地量 (T25 フラスコの場合)	主な使用試薬
2 週間以上	iPS 細胞前培養		Cellartis DEF-CS 500 Culture System*
Day 0	セットアップ	7.5 ml	Coating Reagent 1 (Day0 & 2) Cellartis DEF-CS 500 Culture System*
Day 1	培地交換	7.5 ml	Cellartis DEF-CS 500 Culture System*
Day 2	培地交換	10 ml	Coating Reagent 1 (Day0 & 2) Cellartis DEF-CS 500 Culture System*
Day 3	培地交換	10 ml	EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9), Supplement 1 (Day3)
Day 4	培地交換	10 ml	EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9), Supplement 2 (Day4)
Day 7	培地交換	10 ml	EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9), Supplement 3 (Day7)
Day 8	継代	4 ml	EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9), Supplement 4 (Day8)
Day 9	培地交換	4 ml	EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9), Supplement 5 (Day9)
Day 11	継代	4 ml	Coating Reagent 2 (Day11) EC Differentiation Basal Medium 2 (Day11), Supplement 6 (Day11)
Day 14	培地交換	4 ml	MiraCell EC Culture Medium*

*：本製品には含まれていないので、別途ご用意ください。

V-3. 内皮細胞への分化誘導

- Cellartis DEF-CS 500 Culture System (別売) で 2 週間以上馴化させたヒト iPS 細胞をご使用ください。
- Day 0, Day 1, Day 2 は、Cellartis DEF-CS 500 Culture System の培地および添加物をご使用ください。
- Day 14 以降の培養には、MiraCell EC Culture Medium (別売) をご使用ください。

【Day 0】

馴化した iPS 細胞は、融解後 3 ~ 5 継代したものを使用し、80 ~ 90% コンフルエントの細胞を使って Day 0 の播種を行ってください。

1. 4°C で Coating Reagent 1 (Day0 & 2) を融解し、冷やした DMEM に 1/60 量添加し混合後、培養容器をコーティングする。コーティングは、37°C で 1 時間以上行う。使用後に残った Coating Reagent 1 (Day0 & 2) は、Day 2 でも使用するのので、4°C で保存しておく。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
DMEM (別売)	2.5 ml	1 ml
Coating Reagent 1 (Day0 & 2)	42 μ l	17 μ l

[注] Coating Reagent 1 (Day0 & 2) は、室温に長くおくとゲル化しやすいので、冷やした状態で分取し混合してください。

2. DEF-CS Basal Medium に GF-1、GF-2、GF-3 をそれぞれ 1/333、1/1,000、1/1,000 量添加した培地を調製し、37°C で加温する。
3. 培養したヒト iPS 細胞の上清を除き、DPBS (-/-) で細胞表面を洗浄する。
4. TrypLE select を適量添加し、37°C で 5 ~ 8 分間反応させ、細胞を剥離する。
[注] 剥離時間は、ご使用の iPS 細胞の培養プロトコールに従ってください。
5. 2. で調製した培地を加えて細胞を回収し、細胞数を測定後、 2×10^5 cells/ml に調製する。
6. 培養容器のコーティング液をアスピレーターにより除去し、下表に従って 6×10^4 cells/cm² で播種し、37°C、5% CO₂ 下で一日培養する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
2×10^5 cells/ml 懸濁液量	7.5 ml	3 ml

[注1] なるべく均一になるように播種してください。

[注2] 増殖が遅い iPS 細胞の場合は、播種密度を増やしてください。目安として、Day 2 までに 70 ~ 100% コンフルエントになるように播種してください。

【Day 1】

1. DEF-CS Basal Medium に GF-1、GF-2 をそれぞれ 1/333、1/1,000 量添加した培地を調製し、37°C で加温する。
2. iPS 細胞の培養上清を除き、1. で加温した培地に交換する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
培地量	7.5 ml	3 ml

3. 37°C、5% CO₂ 下で一日培養する。

【 Day 2 】

70～100% コンフルエントになっていることを確認してください。

1. DEF-CS Basal Medium に GF1、GF2 をそれぞれ 1/333、1/1,000 量添加した培地を調製する。
2. Day 0 で 4℃ に保存した Coating Reagent 1 (Day0 & 2) を冷えたままの 1. の培地に 1/60 量添加した後混合し、37℃ で加温する。
3. iPS 細胞の培養上清を除き、2. で加温した培地に交換する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
培地量	10 ml	4 ml
Coating Reagent 1 (Day0 & 2)	167 μ l	67 μ l

4. 37℃、5% CO₂ 下で一日培養する。

【 Day 3 】

Day 8 で、Day 7 から 28～32 時間後に継代するため、午前中に以下の培地交換を実施することをお勧めします。

1. 37℃ で加温した EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3～9) に Supplement 1 (Day3) を 1/33 量添加する。
2. iPS 細胞の培養上清を除き、全量培地交換する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
Supplement 1 (Day3)	300 μ l	120 μ l
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3～9)	10 ml	4 ml

3. 37℃、5% CO₂ 下で 24 ± 1 時間培養する。

【 Day 4 】

Day 3 の添加から 24 ± 1 時間後に以下の培地交換を行ってください。

1. 37℃ で加温した EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3～9) に Supplement 2 (Day4) を 1/50 量添加する。
2. iPS 細胞の培養上清を除き、全量培地交換する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
Supplement 2 (Day4)	200 μ l	80 μ l
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3～9)	10 ml	4 ml

3. 37℃、5% CO₂ 下で 72 ± 1 時間培養する。

【Day 7】

Day 4 の添加から 72 ± 1 時間後に以下の培地交換を行ってください。

※培地が黄色くオーバーコンフルエントになっていても、問題ありません。

- 37°C で加温した EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9) に Supplement 3 (Day7) を 1/50 量添加する。
- iPS 細胞の培養上清を除き、全量培地交換する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
Supplement 3 (Day7)	200 μ l	80 μ l
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9)	10 ml	4 ml

【Day 8】

Day 7 の添加から 28 ~ 32 時間後に以下の継代を行ってください。

目安として T25 フラスコ 1 本から T75 フラスコ 2 ~ 3 本に、または 6 well plate の 1 ウェルから T25 フラスコ 2 ~ 3 本に継代します。

[注] 剥離後の細胞は物理的な衝撃に弱いので、タッピングやピペッティング操作は緩やかに行ってください。

- 37°C で加温した EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9) に Supplement 4 (Day8) を 1/50 量添加する。

培養容器	T25 フラスコ	6 well plate (1 ウェル当たり)
Supplement 4 (Day8)	1 ml	320 μ l
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9)	50 ml	16 ml

- 培養上清を除き、DPBS (-/-) で 2 回細胞表面を穏やかに洗浄する (死細胞を除くため、洗浄は 2 回してください)。
- Accumax を 2.5 ml/T25 フラスコまたは 1 ml/well (6 well plate) 添加し、37°C で 30 分間* 反応させる。

* : 細胞により反応時間を調節してください。

- 培養容器を揺らすまたは穏やかにタッピングして、細胞の剥離を確認する。DMEM 培地 (10% FBS、1% Penicillin-streptomycin) を 2.5 ml/T25 フラスコまたは 1 ml/well (6 well plate) 加えて細胞を回収し、1.5 ml チューブに加える。
- 回収後の培養容器に DMEM 培地を 2.5 ml/T25 フラスコまたは 1 ml/well (6 well plate) 加えてタッピングし、培養容器に残った細胞を全て回収する。
- 200 × g、5 分間遠心分離を行う。
- 上清を除去し (完全に除去せず、培地を 0.2 ml 程度残す)、穏やかにタッピングして細胞をほぐす。
1. で調製した培地を 6 ml (T25 フラスコの場合) または 2.5 ml (6 well plate 1 ウェル分の場合) 加えて、穏やかにピペッティングし細胞懸濁液を調製する。
- 細胞数をカウントし、 3×10^6 cells/12 ml/T75 または 1×10^6 cells/4 ml/T25 フラスコ (4×10^4 cell/cm²) で播種する。目安として、T25 フラスコ 1 本から T75 フラスコ 2 ~ 3 本に、または 6 well plate 1 ウェルから T25 フラスコ 2 ~ 3 本に播種できます。

[注] 組織培養用フラスコ (ディッシュ) を使用して、細胞を播種してください。フラスコ (ディッシュ) のコーティングは不要です。

【Day 9】

- 37℃で加温した EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9) に Supplement 5 (Day9) を 1/50 量添加する。
- 培養上清を除き、全量培地交換する。

培養容器	T75 フラスコ 1 本あたり	T25 フラスコ 1 本あたり
Supplement 5 (Day9)	240 μ l	80 μ l
EC Differentiation Basal Medium 1 (Day3 ~ 9)	12 ml	4 ml

【Day 11】

目安として T75 フラスコ 1 本から T75 フラスコ 1 本または T25 フラスコ 1 本から T25 フラスコ 1 本に継代します。

※ この時点では、およそ 10 ~ 30% コンフルエントです。細胞数が多い場合は、内皮細胞比率が低い場合があります。確認のために、抗 hCD31 抗体を用いた FCM 解析などで純度を確認することをお勧めします。

- Coating Reagent 2 (Day11) を DPBS (+/+) に 1/20 量添加して混合後、培養容器をコーティングする。コーティングは、37℃で 20 分以上行う。

培養容器	T75 フラスコ 1 本あたり	T25 フラスコ 1 本あたり
DPBS (+/+)	7.5 ml	2.5 ml
Coating Reagent 2 (Day11)	375 μ l	125 μ l

- EC Differentiation Basal Medium 2 を 37℃で加温後、1/28 量の Supplement 6 (Day11) を添加する (EC Differentiation Basal Medium 2 (Day11) 1 ml あたり Supplement 6 (Day11) 36 μ l を添加)。

培養容器	T75 フラスコ 3 本の場合	T25 フラスコ 3 本の場合
Supplement 6 (Day11)	1.44 ml	504 μ l
EC Differentiation Basal Medium 2 (Day11)	40 ml	14 ml

- 培養上清を除き、DPBS (-/-) で細胞表面を洗浄する。
- Accumax を 1.5 ml/T75 フラスコまたは 0.5 ml/T25 フラスコ添加し、37℃で 5 分間反応させる。
- 培養容器を揺らすまたは穏やかにタッピングして、細胞の剥離を確認する。
- DMEM 培地 (10% FBS、1% Penicillin-streptomycin) を 7.5 ml/T75 フラスコまたは 2.5 ml/T25 フラスコ加えて細胞を回収し、遠沈管に加える。
- 回収後の培養容器に、DMEM 培地を 7.5 ml/T75 フラスコまたは 2.5 ml/T25 フラスコ加えてタッピングし、培養容器に残った細胞を全て回収する。
- 200 \times g、5 分間遠心分離を行う。
- 上清を除き、2. で調製した培地を 1.5 ml/T75 フラスコ 1 本分または 0.5 ml/T25 フラスコ 1 本分加えて、穏やかにピペティングし、細胞数をカウントする。
- 培養容器のコーティング剤をアスピレーターにより除去し、細胞を $7.5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/12 ml/T75 フラスコまたは $2.5 \sim 5 \times 10^5$ cells/4 ml/T25 フラスコ ($1 \sim 2 \times 10^4$ cells/cm²) で播種する。

【Day 14】

MiraCell EC Culture Medium (別売) で全量培地交換または継代を行ってください。その後の培養は、MiraCell EC Culture Medium のプロトコールに従ってください。継代方法は【Day 11】と同様です。コーティングには、1mg/ml fibronectin (ヒト血漿由来；Sigma-Aldrich, Code. F0895 等) をご使用ください。

VI. アプリケーション

VI-1. 内皮細胞の凍結保存

Day 16 以降の内皮細胞は、凍結保存することが可能です。CELLBANKER 1 plus (製品コード CB021) で $> 1.5 \times 10^6$ cell/ml に懸濁し、凍結処理容器 (バイセル等) を用いて -80°C で保存してください。解凍方法は、MiraCell EC Culture Medium のプロトコールに従ってください。

VI-2. チューブ形成試験

Angiogenesis Assay Kit (製品コード PK-CA577-K905) を用いて、チューブ形成能を評価することが可能です。

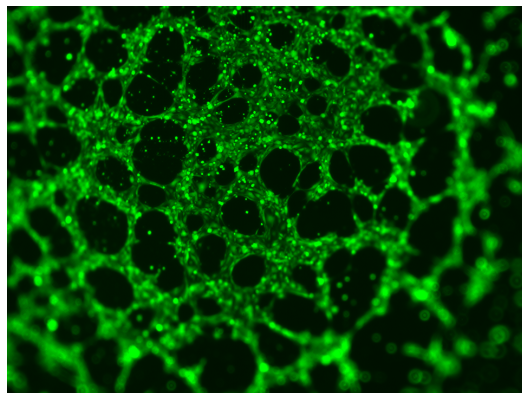


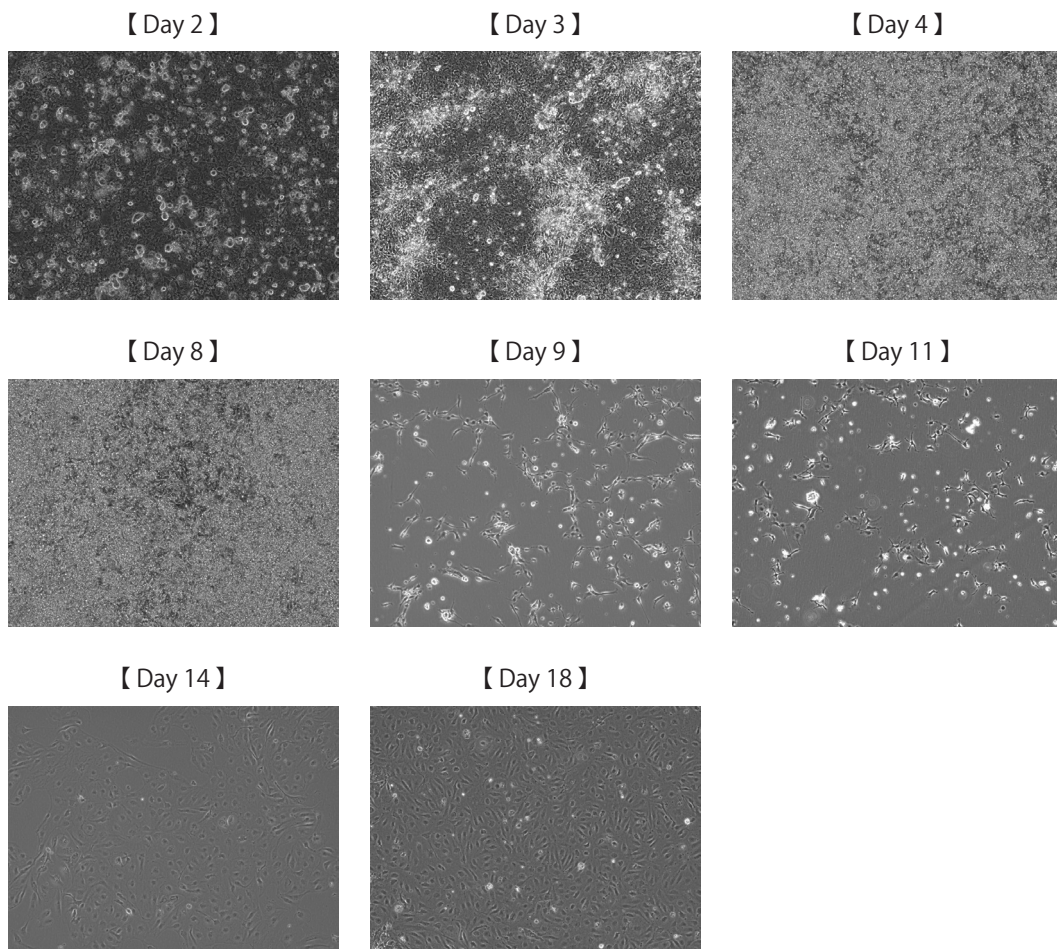
図 1. ChiPSC21 から分化させた内皮細胞
(Day 16 で凍結保存し、解凍後 8 日目にアッセイを行った)

VII. Q & A

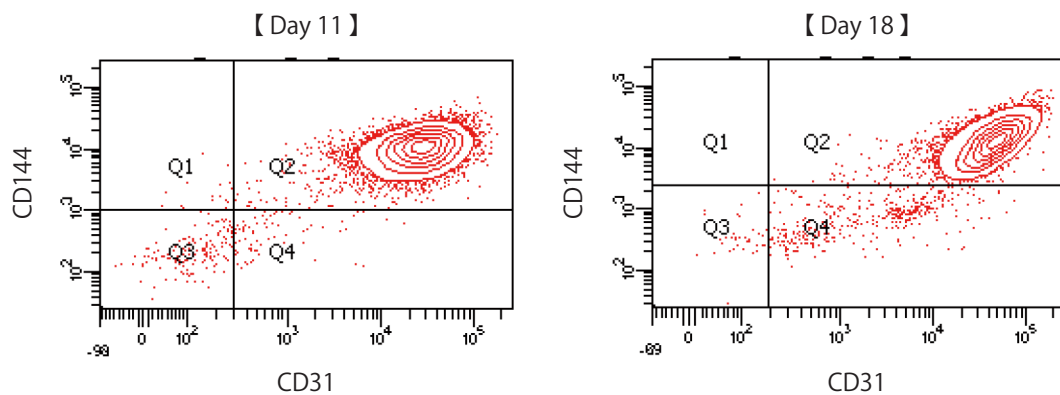
	質問	回答
Day 4 ~ Day 8	細胞死が多く、細胞が剥がれてしまう。	Day 0 での播種密度を上げてください。播種密度の薄い部分では、細胞死（接着細胞がみられない）が多くなります。
	培地が黄色く、オーバーコンフルエントで浮遊細胞が多い。	接着細胞が見られる場合は、問題ありません。
Day 9	細胞死が多く、接着細胞が見られない。	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ~ 30% コンフルエントであれば、問題ありません。 • 接着細胞がほとんど見られない場合は、推奨の培養容器をご使用ください (Day 8 でのコーティングは不要です)。 • Day 8 で継代する時間を遅くしてください。ただし、継代に時間をかけすぎないでください。 • サンプル数が多い場合は、数サンプルずつ分けて継代してください。 • ピペティングやタッピングの操作を穏やかにしてください。
Day 11	Day 9 から細胞が増殖しない。	問題ありません。Day 11 での細胞数が少なくても播き直してください。
Day 11 以降	内皮細胞の純度が低い。	Day 14 以降、MiraCell 培地で 2 ~ 3 日に 1 回培地交換することで改善されることがあります。
		<ul style="list-style-type: none"> • Day 8 の播種密度を下げ、Day 8 で継代する時間を遅くしてください。 • 上記の変更で改善が見られない場合、Day 0 での播種密度を検討してください。

VIII. Appendix : ChiPSC12 株を用いて分化誘導を行った場合の培養例

VIII-1. 細胞の形態



VIII-2. FCM 解析結果



IX. 関連製品

Cellartis human iPS cell line 12 (ChiPSC12) Kit (製品コード Y00285)
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® EC Culture Medium (製品コード Y50053)
MiraCell® Endothelial Cells (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50055)
CELLBANKER® 1 plus (製品コード CB21)
Angiogenesis Assay Kit (製品コード PK-CA577-K905)

X. 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、CELLBANKER は日本全薬工業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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社