

心筋分化プロトコール

ver.1.1

iPS 細胞の培養

1. 60-mm dish (Corning) を iMatrix-511 (8 μ L/dish) でコーティングする (37°C、1 時間～一晩)。
iMatrix-511 コーティングした 60-mm dish に 2×10^5 cells/dish で iPS 細胞を播種する。
2. 翌日、培地交換を行う (StmFit AK02)。
以降、細胞が増えてきて培地の色がオレンジ色～黄色に変わる場合は毎日培地交換を行う。
3. 播種後 5~7 日目に、90~100%コンフルエントの状態になったら、分化誘導に進む。

心筋分化誘導（0日目）

1. IMDM 3 mL 入りチューブ（15 mL）1 本、トリパンプルー溶液 10 μ L 入りチューブ（1.5 mL）2 本を準備する。

注：IMDM は StemPro34 でも良い。

2. dish の培地を除去し、2.0 mL の PBS(-) を添加する。
3. PBS(-) を除去し、1 mL の 0.5 \times TrypLE Select を添加する。
4. CO₂ インキュベーター（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂）内で 10 分間静置する。
5. マイクロピペット(P1000)を用いて 1~5 回ピペッティングし、シングルセルにし、1. で IMDM を入れておいたチューブ（15 mL）に全量を移す。
6. 細胞懸濁液の中央部分から 10 μ L をチューブ（1.5 mL）に分取し、10 μ L のトリパンプルー溶液で染色した後、セルカウントを行う。
7. 15mL チューブを 160 \times g 室温で 3 分間遠心し、ペレットを吸わないよう注意して上清を除去する。
8. しっかりとタッピングし、細胞ペレットを崩す。
9. セルカウント結果より平均生細胞数を算出し、 2.0×10^6 cells/1.5 mL となるように Aggregation medium で懸濁する（ピペッティングは 3 回までとする）。
10. Ultra low attachment 6 well plate（Corning）に 1.5 mL 播種する。
11. 低酸素インキュベーター（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂）で培養する。

培地交換（1日目）

1. 必要量の 2 × Differentiation Medium 1 を作製する。
2. 分化誘導開始時刻±1 時間であることを確認する（分化誘導開始から 23～25 時間後）。
3. 1.5 mL/well の 2 × Differentiation Medium 1 を添加する（培地は除去しない）。
4. plate を揺らして、均一にまぜる。
5. 低酸素インキュベーター（37℃、5%CO₂、5% O₂）で培養する。

培地交換（3日目）

1. 必要量の Differentiation Medium 2 を作製する。
2. 分化誘導開始時刻±1 時間であることを確認する。
3. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去する。
4. 2～3 mL /well の IMDM を加え、plate を軽く揺らす。

培地の色が赤色の場合は 2 mL、オレンジ色～黄色の場合は 3 mL 添加する。

注：IMDM は StemPro34 でも良い。

5. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去する。
6. 2～3 mL /well の Differentiation Medium 2 を添加する。

培地の色が赤色の場合は 2 mL、オレンジ色～黄色の場合は 3 mL 添加する。

7. 低酸素インキュベーター（37℃、5%CO₂、5%O₂）で培養する。

培地交換（7日目）

1. 必要量の Differentiation Medium 3 を作製する。
2. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去する。
3. 2～3 mL /well の Differentiation Medium 3 を添加する。

培地の色が赤色の場合は 2 mL、オレンジ色～黄色の場合は 3 mL 添加する。

4. 低酸素インキュベーター（37°C、5%CO₂、5%O₂）で培養する。

培地交換（9日目以降）

1. 7日目以降 2～3日に1度、培地交換を行う。
2. 必要量の Differentiation Medium 3 を作製する。
3. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去する。
4. 2～3 mL /well の Differentiation Medium 3 を添加する。

培地の色が赤色の場合は 2 mL、オレンジ色～黄色の場合は 3 mL 添加する。

5. 12日目までは低酸素インキュベーター（37℃、5%CO₂、5%O₂）、13日以降は CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

心筋細胞の回収（15日目）と評価

1. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去する。
2. 2 mL/well のコラゲナーゼ I を添加する。
3. CO₂インキュベーター（37°C、5%CO₂）で2時間以上（～over night）静置する。
4. plate を傾け、スフェアを吸わないよう注意して上清を除去し、1 mL/well の Accumax を添加する。
5. CO₂インキュベーター（37°C、5%CO₂）内で10分間静置する。
6. マイクロピペット(P1000)を用いてピペッティングし、シングルセルにする。
7. 顕微鏡で細胞の状態を確認し、シングルセルになっていないものがあれば、さらに CO₂インキュベーター（37°C、5%CO₂）内で最大15~30分間静置し、6.を繰り返す。
8. 細胞懸濁液をチューブ（1.5 mL）に全量回収する。
9. 細胞懸濁液の中央部分から10 µL をチューブ（1.5 mL）に分取し、10 µL のトリパンブルー溶液で染色した後、セルカウントを行う。
10. 180 × g 室温で5分間遠心する。
11. 上清を除去し、1 mL の Fixation Buffer を添加し、室温で遮光して10分間静置する。
12. 400 × g 室温で2分間遠心する。
13. 上清を除去し、1 mL の Perm/Wash Buffer(1×)を添加し、室温で遮光して10分間静置する。
14. 400 × g 室温で2分間遠心する。
15. 上清を除去し、1 mL の FCM Buffer を添加する。
16. 測定まで遮光して4°Cで保存する（1週間以内に測定すること）。
17. FCM で Troponin-T 陽性細胞を測定する。

試薬と調整方法

試薬については SDS（安全性データシート）を入手し、試薬の取扱い方法を理解し使用する。

試薬一覧表

試薬名	メーカー	型番
Accumax	Sigma-Aldrich	ICT-AM105-100
Stem Pro34	Thermo Fisher	10640-019
MTG (1-Thyoglycerol)	Sigma-Aldrich	M6145-25mL
Glutamax	Thermo Fisher	35050061
L Ascorbic acid	Sigma-Aldrich	A4544-25G
Activin A recombinant human	R&D systems	338-AC
BMP-4 recombinant human	R&D systems	314-BP
rhFGF recombinant human	R&D systems	233-FB
VEGF recombinant human	R&D systems	293-VE
Matrigel	Thermo Fisher	356230
Transferrin	Roche	10652202001
SB431542	Sigma-Aldrich	S4317-5MG
IWP-3	Stemolecule Wnt Inhibitor	04_0035
Dorsomorphin	Sigma-Aldrich	P5499-5MG
DMSO	Sigma-Aldrich	D2438
IMDM	invitrogen	12440-053
Water, 細胞培養用	Sigma-Aldrich	W3500
30w/v% Albumin Solution, from Bovine Serum(BSA), Fatty Acid Free (30%BSA)	FujiFilm Wako	017-22231
FBS	Thermo Fisher	10091148
コラゲナーゼタイプ I	FujiFilm Wako	035-17604
D-PBS(+) _{調製用} Ca,Mg 溶液	ナカライ	002492-94
Troponin T, Cardiac Isoform Ab-1 (Clone 13-11)	Thermo Fisher	MS-295-P
APC Goat Anti-Mouse IgG	BD	550826

コラゲナーゼ I

1. collagenase I 粉末 0.5 g をチューブ (50 mL) に移し、PBS(-) 20 mL を加え、collagenase I 粉末を溶解する。
2. フィルターボトルに 1.の溶液と PBS(-) 180 mL、FBS 50 mL、D-PBS(+)調製用 Ca, Mg 溶液 2 mL を加え、フィルターろ過する。

※使用期限は 4℃保管で 2 週間、-20℃保管で 6 ヶ月とする。

L-Ascorbic Acid (5 mg/mL)

1. L-Ascorbic Acid 25 g を Water 100 mL に溶かし、溶かした溶液 1 mL と Water 49 mL を混合して 5 mg/mL となるように調製する。
2. フィルターろ過し、必要に応じて適当なチューブに分注する。

※使用期限は 4℃保管で当日使い切り、-80℃保管で 6 ヶ月とする。

Matrigel

1. Matrigel 5 mL と IMDM 5 mL を混合する。

※使用期限は 4℃保管で 2 週間、-20℃保管で 6 ヶ月とする。

0.1% BSA-PBS

1. 30%BSA 100 μ L と PBS(-) 200 μ L を混合する (10%BSA-PBS) 。
2. 10%BSA-PBS 100 μ L と PBS(-) 9900 μ L を混合し、100 倍希釈する。

※使用期限は調製当日の使い切りとする。

BMP4

1. 30%BSA 100 μ L と DW 200 μ L を混合する (10%BSA-DW)。
2. DW 5 mL、1N HCL 20 μ L、10%BSA-DW 50 μ L を混合し、フィルターろ過する。
3. BMP4 粉末 10 μ g を 2.で調製した溶液 1 mL に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 3 ヶ月とする。

Activin A

1. Activin A 5 μ g を 0.1%BSA-PBS 500 μ L に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 3 ヶ月とする。

FGF

1. FGF 25 μ g を 0.1%BSA-PBS 2.5 mL に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 3 ヶ月とする。

SB431542

1. SB431542 5 mg を DMSO 1.3 mL に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 6 ヶ月とする。

Dorsomorphin

1. Dorsomorphin 5 mg を DMSO 6.26 mL に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 6 ヶ月とする。

IWP-3

1. IWP-3 2 mg を DMSO 413 μ L に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-20°C 保管で 6 ヶ月とする。

VEGF

1. VEGF 50 μ g を 0.1%BSA-PBS 5 mL に溶解する。

※使用期限は 4°C 保管で 2 週間、-80°C 保管で 3 ヶ月とする。

Anti-Troponin T, Mouse-Mono

1. Anti-Troponin T, Mouse-Mono 100 μ g に 200 μ L の PBS(-)を添加する。
2. ボルテックスで良く混合する。

※使用期限は 4°C 保管で 1 ヶ月、-20°C 保管で 6 ヶ月とする。

下記試薬は使用時に調製し、使用は当日に限る。

MTG (working)

Stem Pro34	1 mL
MTG(1-Thyoglycerol)	13 μ L

Aggregation medium

Stem Pro34	1 mL
Glutamax	10 μ L
Ascorbic Acid	10 μ L
Matrigel	10 μ L
Transferrin	5 μ L
MTG (working)	3 μ L
Y-27632	1 μ L
BMP4	0.2 μ L

2×Differentiation Medium 1

Stem Pro34	1 mL
Glutamax	10 μ L
Ascorbic Acid	10 μ L
Transferrin	5 μ L
MTG (working)	3 μ L
BMP4	1.8 μ L

Activin A	1.2 μ L
-----------	-------------

FGF	1 μ L
-----	-----------

Differentiation Medium 2

Stem Pro34	1 mL
------------	------

Glutamax	10 μ L
----------	------------

Ascorbic Acid	10 μ L
---------------	------------

Transferrin	5 μ L
-------------	-----------

MTG (working)	3 μ L
---------------	-----------

VEGF	1 μ L
------	-----------

SB431542	0.54 μ L
----------	--------------

Dorsomorphin	0.3 μ L
--------------	-------------

IWP-3	0.1 μ L
-------	-------------

Differentiation Medium 3

Stem Pro34	1 mL
------------	------

Glutamax	10 μ L
----------	------------

Ascorbic Acid	10 μ L
---------------	------------

Transferrin	5 μ L
-------------	-----------

MTG (working)	3 μ L
---------------	-----------

VEGF	0.5 μ L
------	-------------

参考文献

本プロトコルは、京都大学 iPS 細胞研究所 吉田善紀先生のご指導に従い、下記論文を参照して作成しました。詳細については、下記をご確認下さい。

Funakoshi S, Miki K, Takaki T, Okubo C, Hatani T, Chonabayashi K, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Narita M, Hoshijima M, Kimura T, Yamanaka S, Yoshida Y.

Enhanced engraftment, proliferation and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci Rep* 6, 19111 (2016).

<https://doi.org/10.1038/srep19111>