

血管内皮細胞分化プロトコル

ver.1.0

(2022.7.26)

血管内皮細胞分化誘導（0日目）

1. 60-mm dish を iMatrix-511（9.5 μ L/dish）でコーティングする。
2. iMatrix-511 コーティングした 60-mm dish に 3.05×10^5 cells/dish の播種生細胞数で iPS 細胞を播種する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

培地交換（1、3日目）

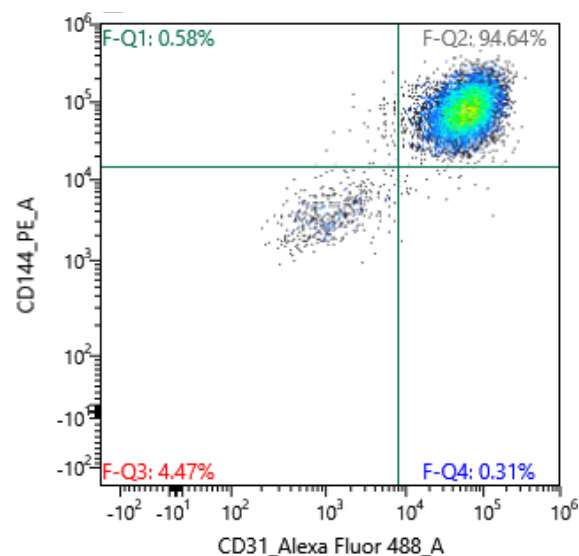
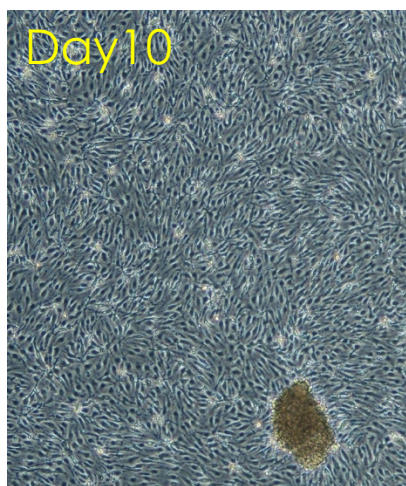
1. 必要量の Mesoderm 誘導培地を調製する。
2. 4 mL/dish の Mesoderm 誘導培地で培地交換する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

培地交換（4～9 日目）

1. 必要量の EC 誘導培地を調製する。
2. 4 mL/dish の EC 誘導培地で培地交換する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

血管内皮細胞の回収（10日目）と評価

1. dish の培地を除去し、2.0 mL の PBS(-) を添加する。
2. PBS(-) を除去し、1 mL の Accutase を添加する。
3. CO₂ インキュベーター（37℃、5%CO₂）内で 2-5 分間静置する。
4. 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。
5. 細胞懸濁液をチューブ（1.5 mL）に全量回収する。
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 のトリパンブルー溶液で染色した後、セルカウントを行う。
7. 250 $\times$ g 室温で 5 分間遠心する。
8. 上清を除去し、1 mL の 4% PFA を添加し、室温で遮光して 15 分間静置する。
9. 250 $\times$ g 室温で 5 分間遠心する。
10. 上清を除去し、1 mL の FCM Buffer を添加する。
11. 測定まで遮光して 4℃で保存する。（1 週間以内に測定すること。）
12. FCM で CD31 と CD144 両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
Accutase	Innovative Cell Technologies	AT104
DMEM/F-12	Thermo	11330-032
StemPro-34 SFM	Thermo	10639-011
B27 supplement	Thermo	17504-044
Glutamax	Thermo	35050061
Y-27632	Wako	035-24593
CHIR99021	Cayman chemical	13122
Forskolin	Cayman chemical	11018
BMP4	R&D	314-BP-01M
VEGF	Wako	229-01313
iMatrix-511	nippi	892021
DMSO	sigma	D2438
Water	sigma	W3500
CD31 (PECAM-1)(89C2) Mouse mAb (Alexa®488)	Cell Signaling	42777S
PE anti-human CD144 (VE-Cadherin)	BioLegend	348506

CHIR99021

1. CHIR99021 粉末を DMSO で 2mM となるように調製する。

Forskolin

1. FORSKOLIN 粉末を DMSO で 2mM となるように調製する。

BMP4

1. BMP4 粉末を Water で 10 μ g/ml となるように調製する。

VEGF

1. VEGF 粉末を Water で 100 μ g/ml となるように調製する。

Mesoderm 誘導培地	約 100mL
DMEM/F12	97.35 mL
B27 SUPPLEMENT	1 mL
GLUTAMAX	1 mL
BMP4	250 μ L
CHIR99021	400 μ L

EC 誘導培地	約 100mL
STEM PRO34	99.7 mL
FORSKOLIN	100 μ L
VEGF	200 μ L

参考文献

本プロトコルは、横浜市立大学 岡本理志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。

Patsch C, et al.

Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. Nat Cell Biol. 2015, 17(8):994-1003, <https://doi.org/10.1038/ncb3205>