

Cardiomyocyte Differentiation

目的 ヒトES/iPS細胞（ヒト多能性幹細胞[hPSC]）をTASCL培養を介して心筋細胞（心筋トロポニンT陽性[cTnT +]）に分化させる。

Materials

リプロセル(802-3G) RCRP002NStemRNA Human iPSC

株名：RPChiPS8023G1

Human RNA-iPS cell line established from endothelial progenitor cells (derived from peripheral blood)

樹立方法：RNA法 (3rd Gen RNA) *StemRNA-3 rd Gen Reprogramming Kit (Cat.# 00-0076)

性別：女性

Karyotype: 46, XX

人種：Hispanic

年齢：30歳

由来細胞：血管内皮前駆細胞

Freezing medium: Cryostem freezing medium (Cat.# 01-0013-05)

Passage Number: 10

Viability: 92%

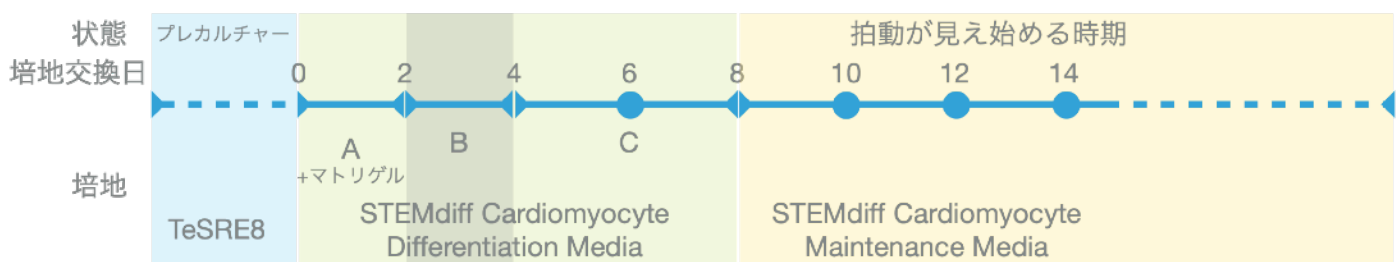
Microbiology: Bacteria Mycoplasma Virus (HIV1&2;HCV;HBV;HTLV1&2;Parvovirus B19) are all Negative

Storage Conditions: liquid Nitrogen

VERITAS STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Kit (ST-05010)

1. STEMdiff Cardio Diff Basal Medium
2. STEMdiff Cardio Diff Supplement A (10X)
3. STEMdiff Cardio Diff Supplement B (10X)
4. STEMdiff Cardio Diff Supplement C (10X)
5. STEMdiff Cardio Maintenance Basal Medium
6. STEMdiff Cardio Maintenance Supplement (50X)
7. Corning Matrigel

方法 タイムライン



培地の準備

A. STEMdiff™ CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION MEDIA の準備 (A, B, & C)

* 心筋細胞分化誘導培地 A, B, C共に100 mL 分

1. Differentiation Supplement A を室温 (15 - 25°C) で解凍する。
2. 完全に混ぜる。
 - 注1: すぐに使用しない場合は、分注して-20°Cで保管する
 - 注2: 再凍結は繰り返さない
 - 注3: サプリメントの保存期間を超えないように注意する (2 - 8°C で 2 週間)
 - 注4: Aは実際に使用する際にはマトリゲルを1:100で加えて使用することに注意。
3. 使用前に室温 (15~25°C) に温めておく。
4. Differentiatin Mediaの 90 mL にサプリメント A 10 mL を加え, 完全に混合する。

B. Maintenance Mediaの準備

1. メンテナンスサプリメント を室温 (15 - 25°C) で解凍 する。
2. 完全に混合する。
 - 注1~3は上に同じ。
3. Maintenance Basal Medium を室温 (15 - 25°C) に温める
4. Maintenance Basal Medium 490 mLにサプリメント10 mLを加える。
5. 完全に混合する。

培養

A. TASCL 播種前hPSCs培養

材料: Easy iMatrix

培養ディッシュ(3.5cmφ~10.0cmφ)

PBS(-)

TeSR™-E8™

Y-27632(stock solution 10 mM)

- * 1 TASCL micro-well に対し, 3.5 cm 径ディッシュであればconful 1~1.5枚、
6 cmディッシュであればhalf conful 1枚 で賄える。
confulの10 cmディッシュ1枚でTASCL 6個分(6-well 1枚分)が賄える。

1. 培養ディッシュにEasy iMatrix を滴下し、底面全体が塗布された状態にしてから、37°C 1 時間または4°C O/N でコートを完了する。
2. 凍結細胞ストックを37°Cで一気に溶かす。
3. 溶かした細胞の懸濁液を15 mLチューブに移し、TeSR™-E8™10 mLを少しずつ加えて全体を緩やかなピペティングで均一にする。
4. 300 x g, 5 分間, 25°Cで遠心し、上清を捨てる。

5. TeSR™-E8™で細胞を懸濁し、コート済みのディッシュにまく。
コート液は直前に吸引除去し、乾かないうちに細胞を播種する。
6. f.c. 10 μ MでY-27632添加し、37°C, 5%CO₂環境で培養を開始する。
7. トリパンプルーとヘモサイトメーターを用いて細胞数を測定する。
8. 24 hr後細胞の接着状態を確認し、Y-27632を添加していないTeSR™-E8™に交換する。
9. 適切な細胞数になるまで2日に1回培地を交換しながら培養する。

B. hPSCsのTASCLへの播種

材料: TASCL600

滅菌済みMilliQ

PBS(-)

TrypLE - PBS(-) - EDTA

TeSR™-E8™

1. TASCLの気泡をMilliQで除去し、PBS(-)→培地の順で置換しておく。
2. 増殖した細胞に対し、PBS(-)で2回washする。
3. TrypLE - PBS(-) - EDTAを行き渡らせ、37°Cで5~10分インキュベートする。
* シングルセル化が必要だが、極端に長く処理すると細胞塊を作らなくなるので、スムーズに剥がれる様になったら後は軽いピペティングでシングル化する様にする
4. 細胞を15 mLチューブに回収し、PBS(-)で懸濁して300xg, 5minで集め、上清を捨てる。
5. TASCLの収まっているwellに2 mLの培地を満たした状態で、細胞を1 TASCL分あたり700 μ L程度で懸濁し、上から静かに中央、四隅、その間の順で滴下していき、全体を覆う。
6. 顕微鏡で細胞がTASCLのmicrowellに収まっているのを確認したら、37°C、5%CO₂のインキュベーターに入れる。
7. できれば1, 2, 3 hrの経過を観察し、細胞塊が形成されそうかどうか確認する。
24 hr以上において、細胞塊として安定させる。

C. 心筋分化誘導とメンテナンス (0日目~15日目)

材料: Corning® Matrigel®

Corning® Matrigel®コート済みプレート

細胞塊

[0日目]

1. Corning Matrigel を氷上で解凍し、20 μ L を2 mL の心筋細胞分化誘導培地 Aに加える。
2. TASCL上の細胞塊を、1. の培地でピペティングで回収する。
3. Corning Matrigelコート済みプレートにまく。
4. 37°Cで2日間インキュベートする。

[2日目]

5. 培地A+マトリゲルを除去し、心筋細胞分化誘導培地B 2 mLを加える。
6. 37°Cで2日間インキュベートする。

[4日目]

7. 培地Bを除去し、心筋細胞分化誘導培地C 2mLを加える。
8. 37°Cで2日間インキュベートする。
9. 6日目に培地Cを除去し、心筋細胞分化誘導培地C 2mLを加える。
10. 37°Cで2日間インキュベートする。

[8日目]

11. 培地Cを除去し、2 mL の心筋細胞維持培地を穏やかに添加する。
12. 37°Cで2日間インキュベートする。

[10日目]

注: 一部で拍動している心筋細胞が見え始める。

SupData(10日目のサンプルで拍動を確認したムービー)

<https://www.dropbox.com/s/5oyyy9ndvrjqton/CDx20.mp4?dl=0>

13. 10日目、12日目、および14日目に、心筋細胞維持培地の交換を行う。
14. 37°C でインキュベートします。

注: 心筋細胞の大きな領域は時間の経過とともに目に見えるようになる。

SupData(以降の日付で拍動を確認したムービー)

<https://www.dropbox.com/s/kzbxlrpgnb1hmrf/0004.mp4?dl=0>

[15日目]

15. hPSC 由来の心筋細胞 (> 80% cTnT+) を回収し、マーカーアッセイに使用する
16. 1ヶ月以上維持するために、2日毎に2 mL の心筋細胞維持培地の交換を行う。

C. 継続してTASCLを使用する場合の心筋分化誘導とメンテナンス (0日目～15日目)

材料: Corning® Matrigel®

Corning® Matrigel®コート済みプレート

細胞塊

[0日目]

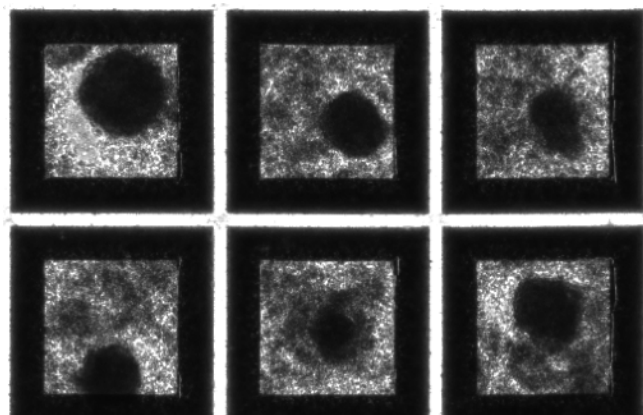
1. Corning Matrigel を氷上で解凍し、20 μ L を2 mL の心筋細胞分化誘導培地 Aに加える。
2. TASCLの収まっているウェル内の培地を1. の培地に交換する。
3. 37°Cで2日間インキュベートする。

[2日目]

5. 培地A+マトリゲルを除去し、心筋細胞分化誘導培地B 2 mLを加える。
6. 37°Cで2日間インキュベートする。

[4日目]

7. 培地Bを除去し、心筋細胞分化誘導培地C 2mLを加える。
8. 37°Cで2日間インキュベートする。*現在この時点
3/25時点でのTASCL内の細胞塊の様子。



9. 6日目に培地Cを除去し、心筋細胞分化誘導培地C 2mLを加える。(3/26)
10. 37°Cで2日間インキュベートする。

[8日目]

11. 培地Cを除去し、2 mL の心筋細胞維持培地を穏やかに添加する。(3/28)
12. 37°Cで2日間インキュベートする。

[10日目]

注: 一部で拍動している心筋細胞が見え始める。(3/30)

SupData(10日目のサンプルで拍動を確認したムービー)

<https://www.dropbox.com/s/5oyyy9ndvrjqton/CDx20.mp4?dl=0>

13. 10日目、12日目、および14日目に、心筋細胞維持培地の交換を行う。
14. 37°C でインキュベートします。

注: 心筋細胞の大きな領域は時間の経過とともに目に見えるようになる。

SupData(以降の日付で拍動を確認したムービー)

<https://www.dropbox.com/s/kzbxlrpgnb1hmr/0004.mp4?dl=0>

[15日目]

15. hPSC 由来の心筋細胞 (> 80% cTnT+) を回収し、マーカーアッセイに使用する
16. 1ヶ月以上維持するために、2日毎に2 mLの心筋細胞維持培地の交換を行う。

参考:

* TASCLを使用しない A. hPSCs前培養のための播き直し

前培養の方法(参考)

材料: Matrigelでコーティングされた6well

PBS(-)

mTeSR™1またはTeSR™-E8™

Y-27632(stock solution 10 mM)

1. (播種用プレートの準備)6穴プレートを Corning Matrigel hESC-Qualified Matrix でコートし、使用の少なくとも 1 時間前に室温 (15 - 25°C) に戻す。
2. (播種用細胞の準備)PBS(-)1 mLで細胞を洗浄する。
3. 洗浄液を吸引し、Dissociation Reagent (TrypsinEDTA)を 1 mL/dish 添加する。
4. 37°C、5%CO₂ で 8~10 分間インキュベートする。
5. 1000µLチップを用いて3~4回ピペッティングし、single cellにする。
6. 細胞を1 mLの増殖用培地(TeSR™-E8™)で懸濁し、チューブに移す。
7. 300 x g で 5 分間遠心し、上清を捨てる。
8. 細胞ペレットをf.c. 10 µMでY-27632添加した1 mLの増殖用培地でゆっくり再懸濁する。
9. トリパンブルーとヘモサイトメーターを用いて細胞数を測定する。

B. hPSCsの前培養

1. 3.5×10^5 cells/wellの密度で細胞（セクションAから）を播種する。
注：前後左右にプレートを動かして細胞の分布を均一にする。
2. 37°Cで24時間インキュベートする。
3. 翌日培地を取り除き、新しいY-27632を含まないTeSR™-E8™ 1 mL と交換する。
注：細胞は分化誘導を開始する前に> 95% confluency に達する必要がある。
コンフルになるまで培地交換を毎日行いながら細胞を増殖させる。