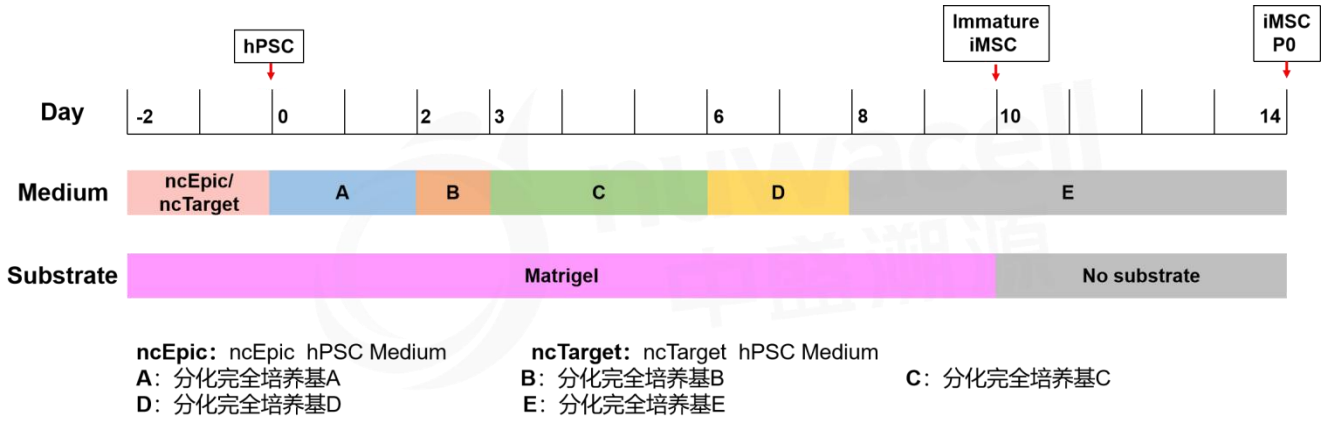
hPSC-間葉系幹細胞分化キット
取扱説明書

一、製品概要

hPSC-間葉系幹細胞分化キットは、ヒト多能性幹細胞（hPSC）からMSCへの分化に適した製品です。この製品を使用することで、hPSCから高純度のMSCへの分化が可能です。MSCは安定増殖が可能で、染色体核型が正常で、細胞表面マーカーの発現が正常（CD73+/ CD90+/ CD105+、CD14-/ CD34-/ CD45-/ CD79α-/ HLA-DR-）であり、硬骨・軟骨・脂肪の３系列への分化能を備えています。これにより、ヒト多能性幹細胞由来のMSCは、様々なin vitro実験、薬物スクリーニング、安全性評価、さらには疾患動物モデルでの細胞移植医療などの研究や応用に使用できます。



二、製品情報

表 1：hPSC-間葉系幹細胞分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-间間葉系幹細胞分化キット*の内容物：	**RP01013**	**1 Kit**	
MSC differentiation Supplement A（10×）	RP01013-A	0.5 mL	-20℃または-80℃
MSC differentiation Supplement B（10×）	RP01013-B	0.5 mL	-20℃または-80℃
MSC differentiation Supplement C（10×）	RP01013-C	1 mL	-20℃または-80℃
MSC differentiation Supplement D（10×）	RP01013-D	0.5 mL	-20℃または-80℃
MSC differentiation Supplement E（30×）	RP01013-E	1 mL	-20℃または-80℃
MSC differentiation Basal Medium F	RP01013-F	55 mL	2℃~8℃

***各キットからは約2×10^{7}のP0世代MSC細胞が得られます。**

****基礎培地と添加物をよく混和して分化完全培地を調製します。調製後は2℃～8℃で保存し、2週間以内に使用可能です。**

三、試薬と材料

表 2：推奨試薬&材料

試薬&材料	ブランド（e.g.）	品番（e.g.）
研究グレードhiPSC細胞株	Shownin	RC01001
ncEpic hPSC Medium	Shownin	RP01001
ncTarget hPSC Medium	Shownin	RP01020
hPSC CryopreservationMedium	Shownin	RP01003
hPSC Dissociation buffer	Shownin	RP01007
Blebbistatin（10mM）	Shownin	RP01008
ncMission hMSC Medium	Shownin	RP02010
MSC CryopreservationMedium	Shownin	RP02004
Solase細胞消化液	Shownin	RP01021
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培地	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
6ウェルプレート	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mLピペット	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL遠心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL凍結保存管	Thermo Sci.	N/A
10 µl/200 µl/1000 µlピペットチップ	Rainin .	N/A
プログラム凍結ボックス	Thermo Sci.	5100-0001

四、試薬の準備

➢ **hPSC-間葉系幹細胞分化完全培地の調製**

1. MSC differentiation Supplement A、B、C、D、Eは4℃で解凍します。**37℃で解凍しないでください。**
2. **表3**を参照し、バイオセーフティキャビネット内で滅菌済みピペットおよびチップを使用して**分化完全培地A/B/C/D/E**を調製します。
3. 分化完全培地は使用当日に調製してください。調製後は4℃で保存し、2週間以内に使用可能です。

TIPS：実際の使用量に応じて、MSC differentiation Supplement A、B、C、D、Eを分注して凍結保存することが可能です。凍結・融解は合計で2回までとします。

表 3：ヒト多能性幹細胞由来間葉系幹細胞（MSC）分化完全培地の調製比率

種類	組成	終濃度
分化完全培地-A	MSC differentiation Basal Medium F	1×
	MSC differentiation Supplement A（10×）	
分化完全培地-B	MSC differentiation Basal Medium F	1×
	MSC differentiation Supplement B（10×）	
分化完全培地-C	MSC differentiation Basal Medium F	1×
	MSC differentiation Supplement C（10×）	
分化完全培地-D	MSC differentiation Basal Medium F	1×
	MSC differentiation Supplement D（10×）	
分化完全培地-E	MSC differentiation Basal Medium F	1×
	MSC differentiation Supplement E（30×）	

五、ヒト多能性幹細胞由来間葉系幹細胞（MSC）分化

5.1 **hPSCの培養と準備：詳細はhPSC培地の取扱説明書を参照してください。**

（https://www.shownin.com/download/8.html?page=1 取扱説明書）

（https://www.shownin.com/video.html 操作動画チュートリアル）

6ウェルプレートの場合、hPSCの播種密度は4×10^5/ウェルとし、2日間培養します。

TIPS：分化に使用するhPSCは解凍後少なくとも5回継代してください。このプロトコルが他の培養容器にも適用可能で、hPSCの播種密度は4×10^4/cm²とし、培地量は200 μL/cm²とします。

5.2 DAY-1：5.1の方法に従い、hPSC細胞を新しい6ウェルプレートに播種し、培養します。

5.3 5.3 DAY 0（24～36時間後）：hPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget）を除去し、DMEM/F12で2回洗浄後、**分化完全培地A**を2 mL/ウェルで添加します。

5.4 DAY 2（分化完全培地A交換40時間後）：**分化完全培地A**を除去し、DMEM/F12で1回洗浄後、**分化完全培地B**を2 mL/ウェルで添加します。

5.5 DAY 3（24時間後）：**分化完全培地B**を除去し、**分化完全培地C**を2 mL/ウェルで添加します（DMEM/F12での洗浄が不要）。

TIPS：ステップ5.2～5.5は培地交換のタイミングに厳格な要求があります。推奨スケジュール：ステップ5.2: 午前11時に継代。ステップ5.3: 継代後30時間～翌日17時に分化完全培地A交換。ステップ5.4: 4日目9時に分化完全培地B交換。このスケジュールで深夜の培地交換を回避できます。

5.6 DAY 4：**分化完全培地C**を用いて培地を2 mL/ウェルで交換します（DMEM/F12での洗浄が不要）。

5.7 DAY 6：**分化完全培地C**を除去し、**分化完全培地D**を2 mL/ウェルで添加します（DMEM/F12での洗浄が不要）。

5.8 DAY 8：**分化完全培地D**を除去し、**分化完全培地E**を2 mL/ウェルで添加します（DMEM/F12での洗浄が不要）。

5.9 DAY 10：上清を除去し、1×DPBSを2 mL/ウェルで加えて1回洗浄した後、Solase 2 mLを添加し、37℃・5% CO_2・飽和湿度のインキュベーター内で3～5分間インキュベートします。200×gで5分間遠心し、上清を除去し、**分化完全培地E**で細胞を再懸濁した後、1:4の比率で継代し、**分化完全培地E**で維持培養します。

5.10 DAY 11：分化完全培地Eを用いて培地を2 mL/ウェルで交換します。

5.11 DAY13～14：細胞がコンフルエントになり、この時点の細胞はP0世代のhPSCが分化したMSCです。

TIPS：P0世代のhiMSCは凍結保存可能です。

5.12 P1世代から5000 cells/cm^2で継代培養できます。

5.13 P2世代から得られたhiMSC細胞を様々な研究実験に使用できます。

TIPS：凍結保存が必要な場合は以下の手順を実施してください。

5.14 上清を除去し、2 mL/ウェルの1×DPBSで1回洗浄した後、Solase 2 mLを添加し、37℃・5% CO_2・飽和湿度のインキュベーターで3～5分間インキュベートします。hiMSCがディッシュの底から剥離したら、15 mL遠心管に回収し、200×gで5分間遠心します。

5.15 上清を除去し、hMSC無血清培地を1 mL/ウェルで加えてhiMSCを再懸濁し、適量の細胞懸濁液を取って細胞数を計測します。計数結果に基づき、2×10^6/mLの密度でhiMSC凍結保存液に再懸濁し、液体窒素で保存します。

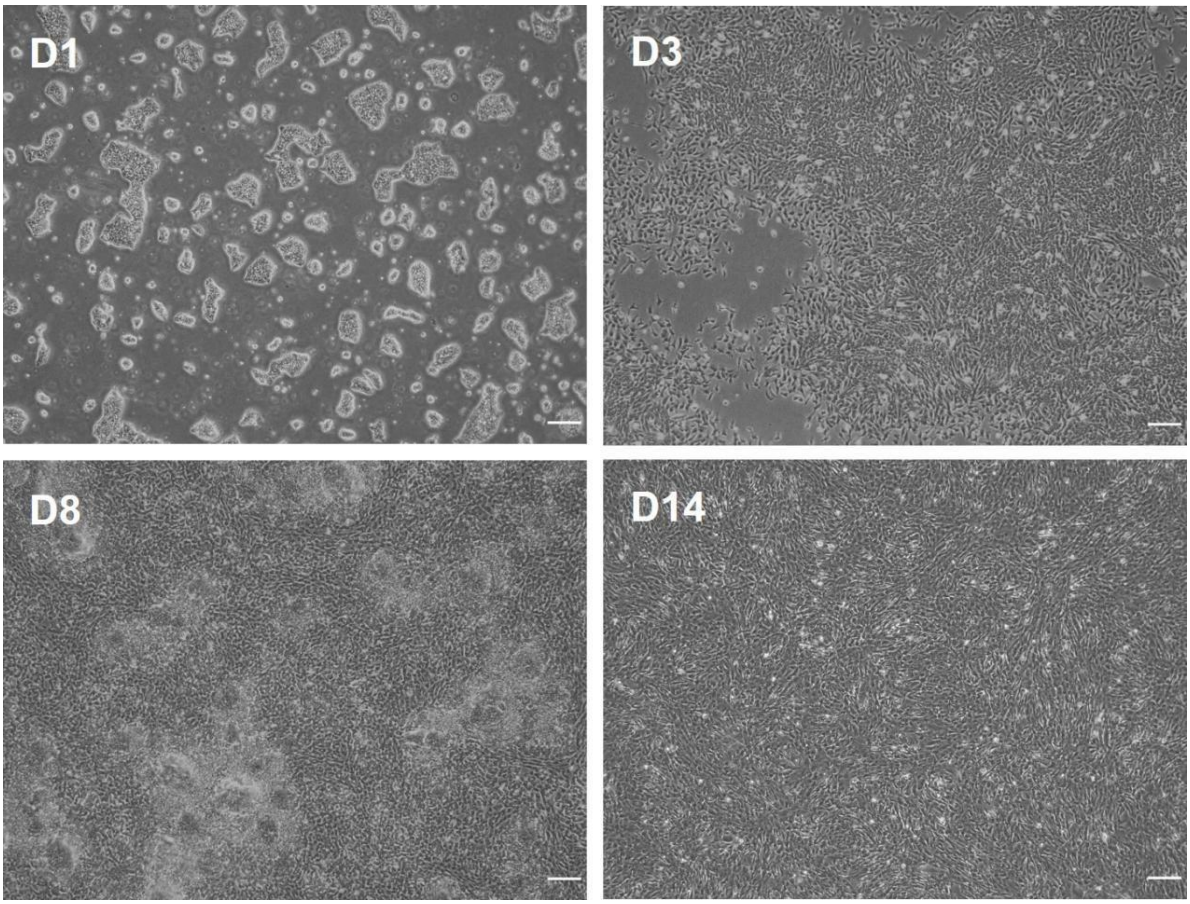


図 1：hPSC-MSC分化キットを用いて分化したMSCの細胞形態

図はそれぞれ分化DAY 1、3、8、14における細胞形態を示した。スケールバー：200μm

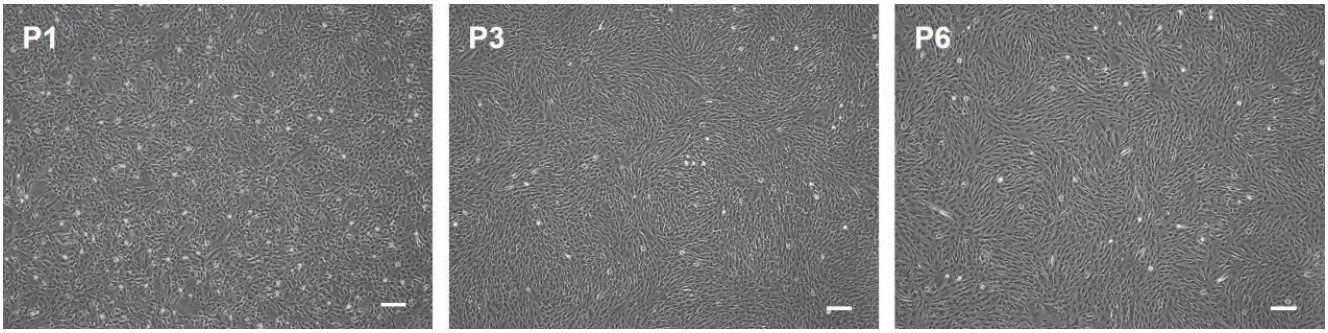


図 2：分化によって得られたhPSC-MSC細胞の連続培養形態

図はhPSC-MSCがP1、P3、P6世代まで継代培養された際の細胞形態を示した

（コンフルエンシー80-85%）。スケールバー：200μm