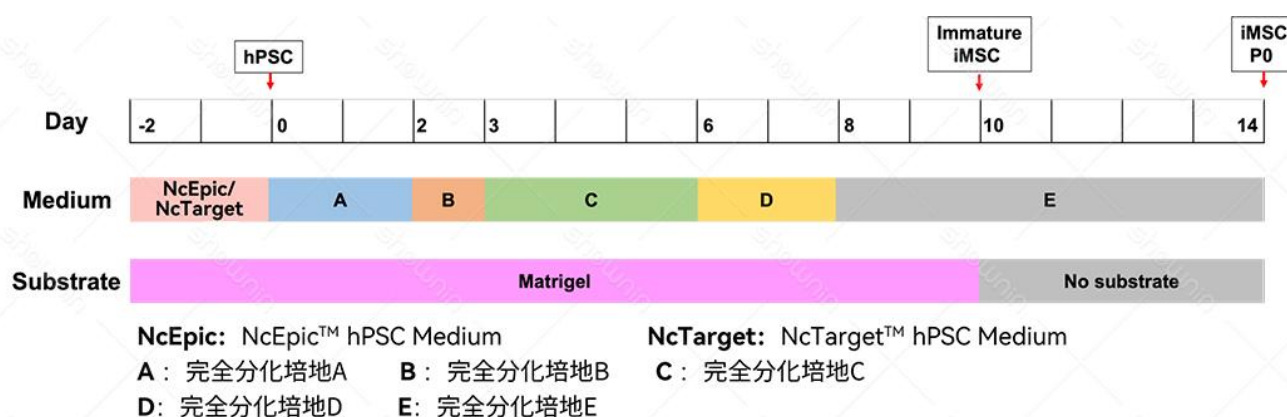


## hPSC-間葉系幹細胞分化キット

目次 # RP01013 1 Kit (2 L)

## 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。



## 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-間葉系幹細胞分化キット*の内容物：	RP01013	1 Kit	
MSC Differentiation SupplementA (10 ×)	RP01013-A	0.5 mL	-80 °C または -20 °C
MSC Differentiation SupplementB (10 ×)	RP01013-B	0.5 mL	

MSC Differentiation SupplementC (10 ×)	RP01013-C	1mL	
MSC Differentiation SupplementD (10 ×)	RP01013-D	0.5 mL	
MSC Differentiation SupplementE (30 ×)	RP01013-E	1mL	
MSC Differentiation Basal Medium F	RP01013-F	55 mL	2-8 °C

\*各キットからは約  $2 \times 10^7$  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 °C で保存し、2 週間以内に使用可能です。

## 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.)
NcEpic™ hPSC Medium	Shownin	SN-01-0010
NcTarget™ hPSC Medium	Shownin	RP01020
hPSC Cryopreservation Medium	Shownin	SN-06-1210
hPSC Dissociation Buffer	Shownin	RP01007
Blebbistatin (10 mM)	Shownin	RP01008
NcMission™ hMSC Medium V3.0	Shownin	RP02010
hMSC Cryopreservation Medium	Shownin	SN-06-1310
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 $\mu$ L/200 $\mu$ L/1000 $\mu$ L 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

## 試薬の準備

### (一) 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 °Cで解凍します。37 °C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 °C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

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 ×)	

## (二) ヒト多能性幹細胞由来間葉系幹細胞 (MSC) 分化

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)

6ウェルプレートの場合、hPSCの播種密度は  $4 \times 10^5$  /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  $4 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>とし、培地量は 200 μL/cm<sup>2</sup>

とします。

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。
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。
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. 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2.～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2.: 午前11時に継代。ステップ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。

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）。
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）。
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）。
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 °C・5% CO<sub>2</sub>・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。
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。
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。

12. P1世代から5000 cells/cm<sup>2</sup>で継代培養できます。
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。

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 °C・5% CO<sub>2</sub>・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、 $200 \times g$ で5分間遠心します。

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、 $2 \times 10^6$  /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。

16.

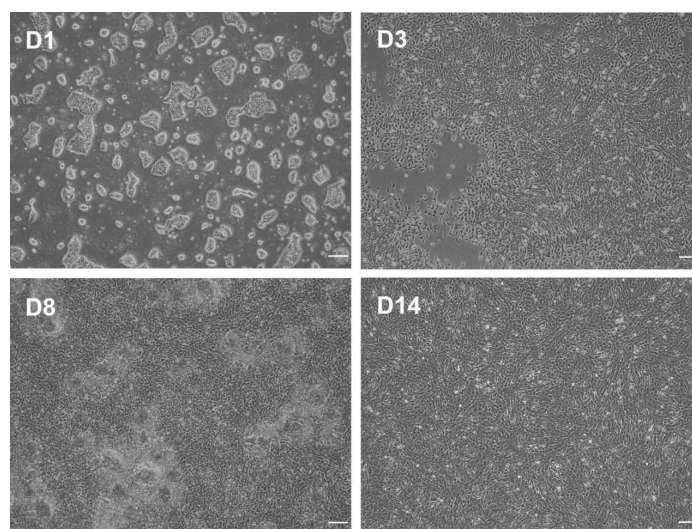


図 1：hPSC-MSC 分化キットを用いて分化した MSC の細胞形態

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：200 $\mu$ m

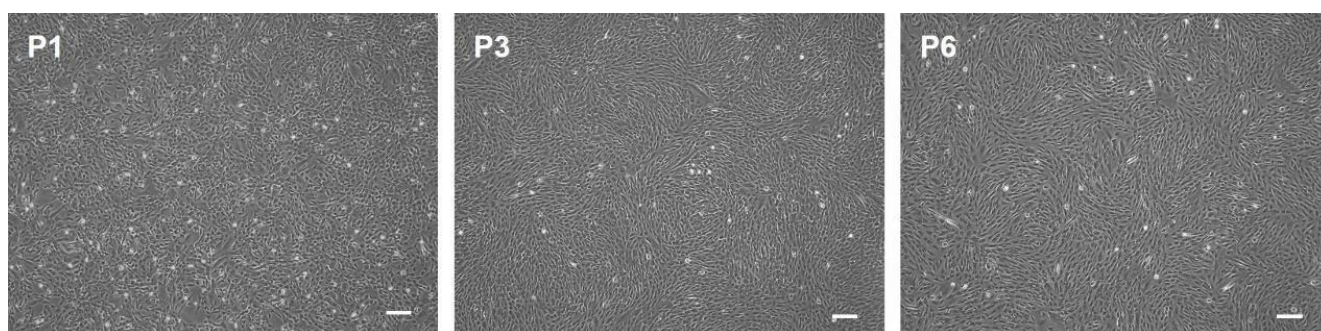


図 2：分化によって得られたhPSC-MSC細胞の連続培養形態

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

(コンフルエンスー80-85%)。スケールバー：200 $\mu$ m