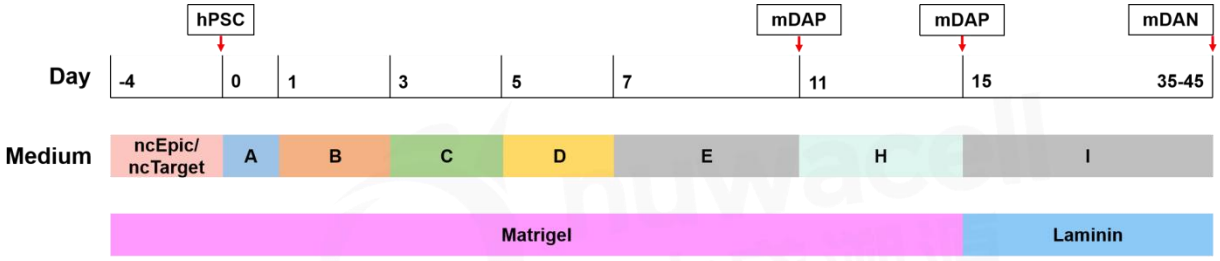
hPSC-ドーパミン作動性ニューロン分化キット
取扱説明書 V3

一、製品概要

1.1、製品説明

hPSC-ドーパミン作動性ニューロン分化キットは、ヒト多能性幹細胞（hPSC）から成熟ドーパミン作動性ニューロン（mDAN: midbrain Dopaminergic Neuron）への分化に適した製品です。このキットには、前駆細胞分化キット、前駆細胞維持培地、およびニューロン成熟分化培地が含まれ、具体的な用途に応じて柔軟に選択できます。hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キットを使用することで、hPSCから高純度のmDAP（＞90% Lmx1a+/ Foxa2+/ En1+）を得ることができます。また、ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地を用いることで、mDAPを成熟したmDAN（TH+/Nurr1+）へ分化させることが可能です。分化によって得られたヒトドーパミン作動性神経前駆細胞とヒトドーパミン作動性ニューロンは、神経変性疾患の科学研究、薬物スクリーニング、さらにはパーキンソン病モデルの細胞移植研究などに応用できます。



ncEpic: ncEpic hPSC Medium　**ncTarget:** ncTarget hPSC Medium
A：分化完全培养基A；　**B**：分化完全培养基B；　**C**：分化完全培养基C；　**D**：分化完全培养基D；
E：分化完全培养基E；　**H**：人多巴胺能神经前体细胞维持培养基；　**I**：人多巴胺能神经元成熟分化培养基；
mDAP:（midbrain Dopaminergic Progenitor）中脑多巴胺能神经前体细胞；
mDAN:（midbrain Dopaminergic Neuron）中脑多巴胺能神经元。

1.2、製品情報

表 1：hPSC-ドーパミン作動性ニューロン分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キット*	RP01017	1 Kit	基礎液 2-8℃
ヒトドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地	RP01017-H	100 mL	添加剤-20 ～-80℃
ヒトドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地	RP01017-I	50 mL	
hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞	RC01008	1×10^6	液体窒素

***各キットからは1×10^7以上のドーパミン作動性神経前駆細胞（mDAP、DAY11）が得られます。**

***基礎培地と添加剤を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。**

1.3、推奨試薬と材料

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	RP01001
ncTarget hPSC Medium	Shownin	RP01020
Vitronectin	Shownin	RP01002
研究グレードhiPSC細胞株	Shownin	RC01001
hPSC Dissociation buffer	Shownin	RP01007
Blebbistatin	Shownin	RP01008
hPSC Cryopreservation Medium	Shownin	RP01003
Solase細胞消化液	Shownin	RP01021
ncLaminin511	Shownin	RP01025
TrypLE	Gibco	12604013
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
1mL/5mL/10mL/25mLピペット	Thermo Sci.	N/A
15mL/50mL遠心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL凍結保存管	Thermo Sci.	N/A
1.5mLEPチューブ	Axygene	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

二、hPSCからドーパミン作動性神経前駆細胞への分化

2.1、試薬の準備

表 3：hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キット製品情報

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キットの内容物：	**RP01017**	**1 Kit**	
mDAP Differentiation Supplement A（100×）	RP01017-A	100 μL	-20℃または-80℃
mDAP Differentiation Supplement B（100×）	RP01017-B	200 μL	-20℃または-80℃
mDAP Differentiation Supplement C（100×）	RP01017-C	200 μL	-20℃または-80℃
mDAP Differentiation Supplement D（100×）	RP01017-D	200 μL	-20℃または-80℃
mDAP Differentiation Supplement E（100×）	RP01017-E	600 μL	-20℃または-80℃
mDAP Differentiation Basal Medium F	RP01017-F	120 mL	2℃~8℃
mDAP Cryopreservation Medium G	RP01017-G	50 mL	2℃~8℃

***各キットからは1×10^{7}個以上のドーパミン作動性神経前駆細胞（mDAP、DAY11）が得られます。**

***各キットは12ウェルプレートの8ウェル分、または6ウェルプレートの4ウェル分の分化に使用可能です。**

***基礎培地と添加物を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。**

2.1.1. mDAP Differentiation Supplement A、B、C、D、E および Differentiation Basal Medium F は、4℃ で解凍します。**37℃ で解凍しないでください。**

2.1.2. 表4 を参照し、バイオセーフティキャビネット内で**分化完全培地 A/B/C/D/E（1×）**を調製します。

表 4：hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キット分化完全培地の調製説明

種類	組成	終濃度
分化完全培地 A/B/C/D/E（1×）	mDAP Differentiation Supplement A/B/C/D/E（100×）	1×
	mDAP Differentiation Basal Medium F	

2.1.3. 分化培地は**調製後すぐに使用する**ことを推奨します。4℃で保存し、2週間以内に使用してください。

TIPS：実際の使用量に応じて、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。

2.2、ヒトドーパミン神経前駆細胞への分化

2.2.1. hPSCの培養と準備：詳細はhPSC培地取扱説明書を参照してください。

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

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

2.2.2. **DAY 0**：6ウェルプレートを例に、hPSCのコンフルエンシーが85%に達した時点で、培地を吸引除去し、DPBS（Ca^{2+}/Mg^{2+}不含）を2 mL/ウェルで添加して1回洗浄します。その後、2 mL/ウェルの**Solase細胞消化液**を添加し、37℃・5% CO_2・飽和湿度インキュベーターで5～8分間インキュベートします。プレートを軽く揺らして細胞を基質から完全に剥離させます。

2.2.3. 細胞懸濁液を1.5 mL遠心管に移し、卓上遠心機で10～15秒間遠心します。上清を除去し、細胞を回収してカウントし、2×10^6個のhPSCを8 mLの予温した**分化完全培地A**に加え、8 μL の**Blebbistatin（10 mM）**を1:1000で添加します。Matrigelでコーティングした6ウェルプレートの4ウェルに、2 mL/ウェルで細胞懸濁液を添加します。

TIPS：6ウェルプレートを例に、hPSCの播種密度は5×10^5細胞/ウェルとします。このプロトコルが他の培養容器にも適用可能で、その場合のhPSCの播種密度は5×10^4細胞/cm^2とします。

2.2.4. **DAY 1**：**分化完全培地A**を吸引除去し、その後2 mL/ウェルの**分化完全培地B**を添加します。培地を毎日交換し、DAY 3 まで培養します（DAY1-3）。

2.2.5. **DAY 3**：**分化完全培地B**を吸引除去し、その後2 mL/ウェルの**分化完全培地C**を添加します。培地を毎日交換し、DAY 5 まで培養します（DAY3-5）。

2.2.6. **DAY 5**：**分化完全培地C**を吸引除去し、その後2 mL/ウェルの**分化完全培地D**を添加します。培地を毎日交換し、DAY 7 まで培養します（DAY5-7）。

2.2.7. **DAY 7**：**分化完全培地D**を吸引除去し、その後2 mL/ウェルの**分化完全培地E**を添加します。培地を毎日交換し、DAY 11 まで培養します（DAY7-11）。

2.2.8. **DAY 11**：**分化完全培地E**を吸引除去し、DPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を2 mL/ウェルで添加して1回洗浄した後、1 mL/ウェルの**Solase細胞消化液**を添加し、37℃・5% CO_2濃度・飽和湿度のインキュベーターで8～10分間インキュベートします。ディッシュの底面から細胞が剥離した時点で、1 mL/ウェルのDPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を加えて細胞を再懸濁し、178×gで5分間遠心処理後、上清を除去します。ドーパミン作動性神経前駆細胞が得られますす。得られた前駆細胞は、さらに成熟分化させることも、凍結保存することも可能です。

2.2.9. 凍結保存が必要な場合、1 mLの**mDAP Cryopreservation Medium G**を添加して細胞を再懸濁し、計数した後、細胞密度を5×10^6 cells/mLに調整します。1 mL/管で凍結保存管に分注し、標識をつけます。凍結保存管をプログラム凍結ボックスに移し、-80℃のフリーザーで保存します。翌日、液体窒素タンクに移して長期保存します。ドーパミン作動性神経前駆細胞の成熟については、次節（**三：hPSC由来ドーパミン作動性ニューロンの成熟**）を参照してください。

三、hPSC由来ドーパミン作動性ニューロンの成熟

3.1、hPSC由来ドーパミン作動性ニューロン成熟培養用プレートのコーティング（24ウェルプレートを例とする）

3.1.1. Poly- L-ornithine/ Laminin (PO/Laminin) を用いたコーティング

3.1.1.1. **試薬の準備：PO/Laminin**でコーティングした培養プレートは、mDAPの成熟培養に使用されます。

製品情報	ブランド	品番	濃度
Poly-L-ornithine	Sigma	P3655	10 mg/ mL
Laminin	Sigma	L2020	1 mg/ mL

3.1.1.2. 予冷した滅菌水12 mLを15 mL遠心管に入れ、4.8 μLの **Poly-L-ornithine**（10 mg/mL）を添加して十分に混和します。その後、24ウェルプレートに500 μL/ウェルで素早く滴下し、4℃で保存します。

3.1.1.3. 翌日、Poly-L-ornithineでコーティングした24ウェルプレートを4℃から取り出し、室温に戻し、Poly-L-ornithineを除去後、1x DPBSで1回洗浄します。

3.1.1.4. 予冷した無菌1×DPBS 12 mLを15 mL遠心管に入れ、48 μLの **Laminin**（1 mg/mL）を加え、十分に混和した後、24ウェルプレートに500 μL/ウェルで素早く滴下し、4℃で保存します。

3.1.2. ncLaminin511コーティング

3.1.2.1. 試薬の準備：ncLaminin511でコーティングした培養プレートは、mDAPの成熟培養に使用されます。

製品情報	ブランド	品番	濃度
ncLaminin511	Shownin	RP01025	100 μg/ mL

3.1.2.2. 予冷した無菌1×DPBS 12 mLを15 mL遠心管に入れ、240 μL の**ncLaminin511**（100 μg/mL）を加え、十分に混和した後、24ウェルプレートに500 μL/ウェルで素早く滴下し、4℃で保存します。

3.2、ドーパミン作動性神経前駆細胞（hPSC-mDAP）の維持培養

3.2.1. ドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地の調製

3.2.1.1. **mDAP Maintenance Supplement（100×）**を4℃で解凍します。

3.2.1.2. 以下のリストを参照し、バイオセーフティキャビネット内で**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地**を調製します。

mDAP Maintance Basal Medium : 99 mL

mDAP Maintance Supplement（100×）：1 mL

3.2.1.3. 分化培地は**調製後すぐに使用する**ことを推奨し、4℃で保存し、2週間以内に使用可能です。実際の使用量に応じてSupplement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 5：ドーパミン作動性神経前駆細胞（mDAP）維持培地製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
ドーパミン作動性神経前駆細胞（mDAP）維持培地：	**RP01017-H**	**100 mL**	
mDAP Maintance Basal Medium		99 mL	2℃~8℃
mDAP Maintance Supplement（100×）		1 mL	-20℃ ~ -80℃
hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞	**RC01008**	**1×10^6**	**液体窒素**

3.2.2. ドーパミン作動性神経前駆細胞の解凍

3.2.2.1. ウォーターバスを37℃に予熱します。MatrigelまたはncLaminin511でコーティングした6ウェルプレートをバイオセーフティキャビネットに約30分間静置し、室温に戻しておきます。

3.2.2.2. 適量の**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地**を準備し、1:2000で**Blebbistatin**（終濃度5 μM）を添加し、室温に戻します。

3.2.2.3. 液体窒素タンクから凍結保存した**hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞**1本を取り出し、ドライアイスで細胞培養室に移動させます。直ちに37℃のウォーターバスに浸し、手で軽く振りながら1分以内に解凍します。肉眼で細胞懸濁液内の氷晶がほぼ完全に消失した時点で取り出します。

3.2.2.4. 凍結保存管の表面を75%エタノール除菌ワイパーで拭き、バイオセーフティキャビネット内に移します。細胞懸濁液を予め準備した15 mL遠心管に移し、ピペットで10 mLのDMEM/F12を吸引し、ゆっくり滴下しながら、静かに振り混ぜて細胞を均一に分散させます。178×gで5分間遠心します。

3.2.2.5. 上清を除去し、予温した1 mLの**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持完全培地（+ Blebbistatin）**を加え、細胞を均一に混和します。ピペッティングはしないようにします。適量の細胞を採取して細胞数を計測します。

3.2.2.6. 6ウェルプレートのコーティング液を除去し、細胞を**1×10^5/cm²**の密度で**0.2 mL/cm²**の培地を用いて各ウェルに播種します。水平方向に3回十字振りを実施後、標識を付けます。37℃・5% CO_2・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再度水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。

3.2.2.7. 18～24時間後に新鮮な**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持完全培地**（3 mL/ウェル）に交換した後、2日ごとに培地を交換します。後続の成熟分化のために、4～5日目に細胞を回収・計数します（**Solase細胞消化液、5～8分間**）。

TIPS：本プロトコルは6ウェルプレートを用いたmDAPの継代を例にし、他の培養容器にも適用可能です。hPSCからドーパミン作動性神経前駆細胞への分化11日目の際、連続成熟分化（ステップ2.2.8）させる場合はステップ3.2.2.6と同様の播種密度でmDAPを継代してよいです。

3.3、ドーパミン作動性ニューロンの成熟

表 6：ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地の内容物：	**RP01017-I**	**50 mL**	
mDAN Maturation Basal Medium		50 mL	2℃~8℃
mDAN Maturation Supplement（100×）		0.5 mL	-20℃ ~ -80℃

3.3.1. ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地の調製

3.3.1.1. **mDAN Maturation Supplement（100×）**は4℃で解凍します。

3.3.1.2. 以下のリストを参照し、バイオセーフティキャビネット内で**ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地**を調製します。

mDAN Maturation Basal Medium : 49.5 mL

mDAN Maturation Supplement（100×）：0.5 mL

3.3.1.3. 分化培地は**調製後すぐに使用する**ことを推奨します。**4℃で保存し、2週間以内に使用可能です。必要量に応じてSupplement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。

3.3.2. ドーパミン作動性ニューロンの成熟培養

3.3.2.1. **PO/Lamininまたは**ncLaminin511でコーティングした**24ウェルプレート**をバイオセーフティキャビネット内に約**30分間**静置し、室温に戻しておきます。

3.3.2.2. 適量の**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地**を準備し、1:2000で**Blebbistatin**（終濃度5 μM）を添加し、室温に戻します。

3.3.2.3. **ステップ3.2.2.7**で4～5日目に回収したドーパミン作動性神経前駆細胞を、**ドーパミン作動性神経前駆細胞維持培地**で再懸濁し、$5\times10^5/cm^2$の密度でLamininでコーティングした24ウェルプレートに播種し、標識を付けます。平方向に3回十字振りを行ない、37℃・5% CO_2・飽和湿度のインキュベーターで培養します。

3.3.2.4. 18～24時間後に新鮮な**ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地**に交換します（0.5 mL/ウェル）。最初の7日間は毎日培地を交換し、以降は2日ごとに培地を交換します（0.5 mL/ウェル）。

3.3.3. 成熟ドーパミン作動性ニューロンの同定

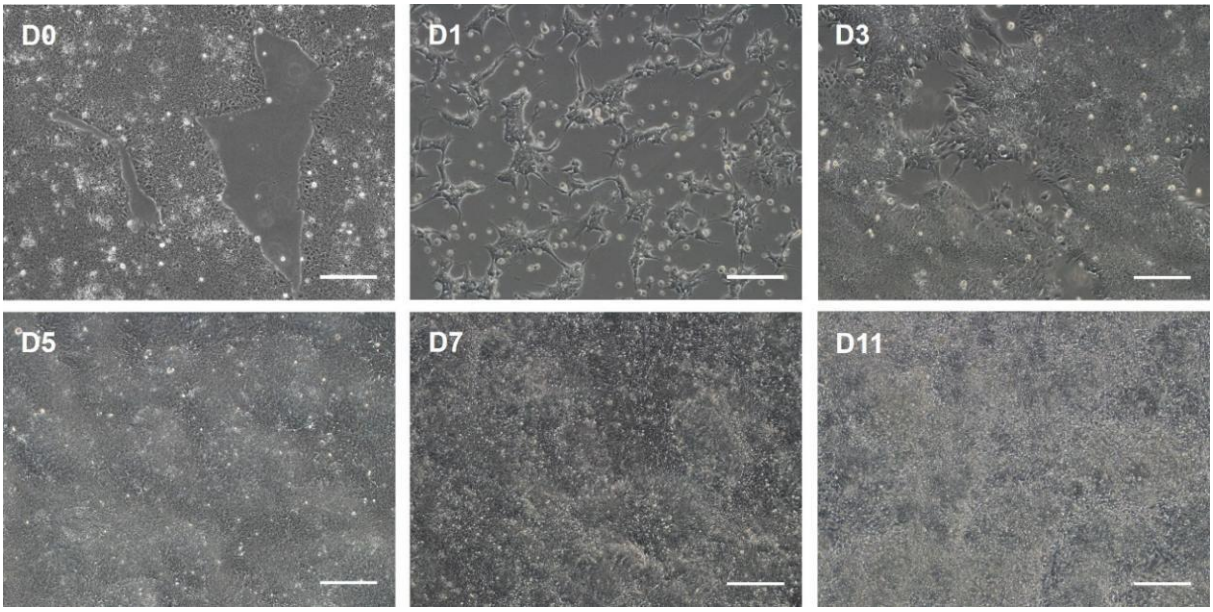
3.3.3.1. PO/Laminin または ncLaminin511 でコーティングした24ウェルプレートをバイオセーフティキャビネット内に30分間静置し、室温に戻しておきます。

3.3.3.2. ドーパミン作動性前駆細胞を**ドーパミン作動性ニューロン成熟分化培地**で20～30日間培養後、成熟指標の検査測定を行ないます。後続の検査測定のために**TrypLE**を用いて単細胞に消化処理します（37℃、10～15分間、15分間を超えないように注意）。

3.3.3.3. qPCRによる検査：少なくとも2x106の細胞からRNAを抽出し、関連検査を行います。

3.3.3.4. 免疫蛍光染色による検査：ドーパミン作動性ニューロンをLamininでコーティングした培養プレートに1-2 x 105/cm2の密度で播種し、3～5日間以上培養します。細胞形態が回復した後、免疫蛍光染色テストを実施します。

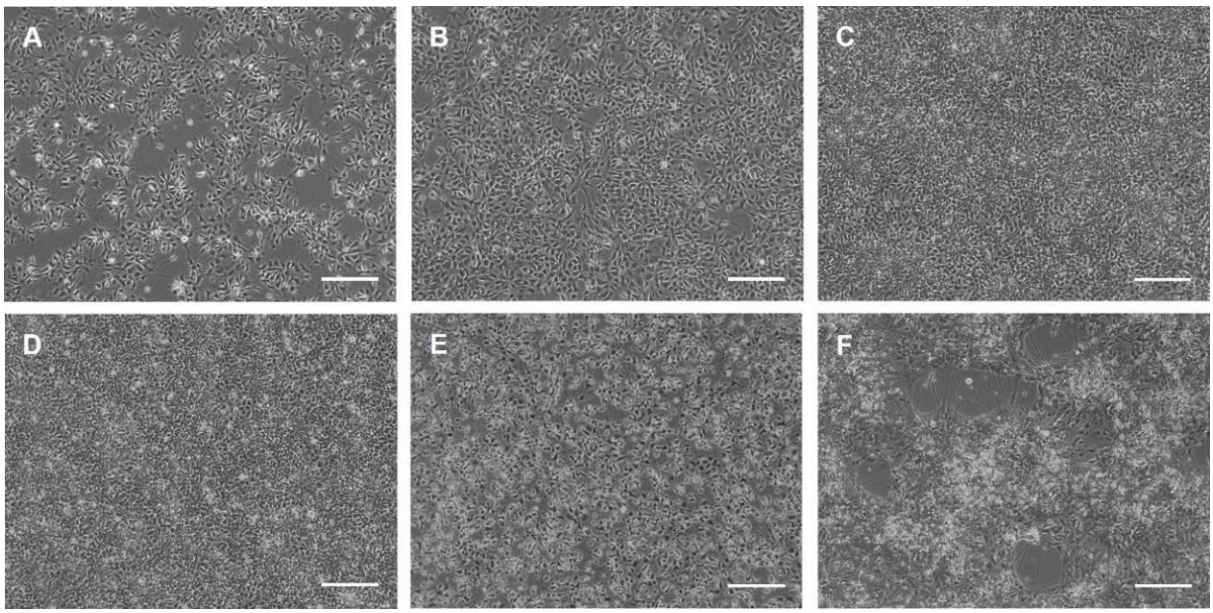
3.3.3.5. 電気生理学的検査：40～50日間培養したドーパミン作動性ニューロンを用いて電気生理学的実験を行ないます。実験の3日前から、**ドーパミン作動性ニューロン用電気生理学専用培地**（RP01017-J）で培養します。



hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞分化キットを用いた分化過程における細胞形態

スケールバー：200 μm

図はそれぞれ、hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞の分化DAY 0、1、3、5、7、11の細胞形態を示した。



hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞の解凍・維持培養・成熟分化形態　スケールバー：200 μm

図A、B、Cは、hPSC-ドーパミン作動性神経前駆細胞（mDAP）解凍DAY 1、2、4の細胞形態を示した。

図D、E、Fは、mDAPが成熟ドーパミン作動性ニューロン（mDAN）へ分化する過程におけるDAY 1、9、30の細胞形態を示した。