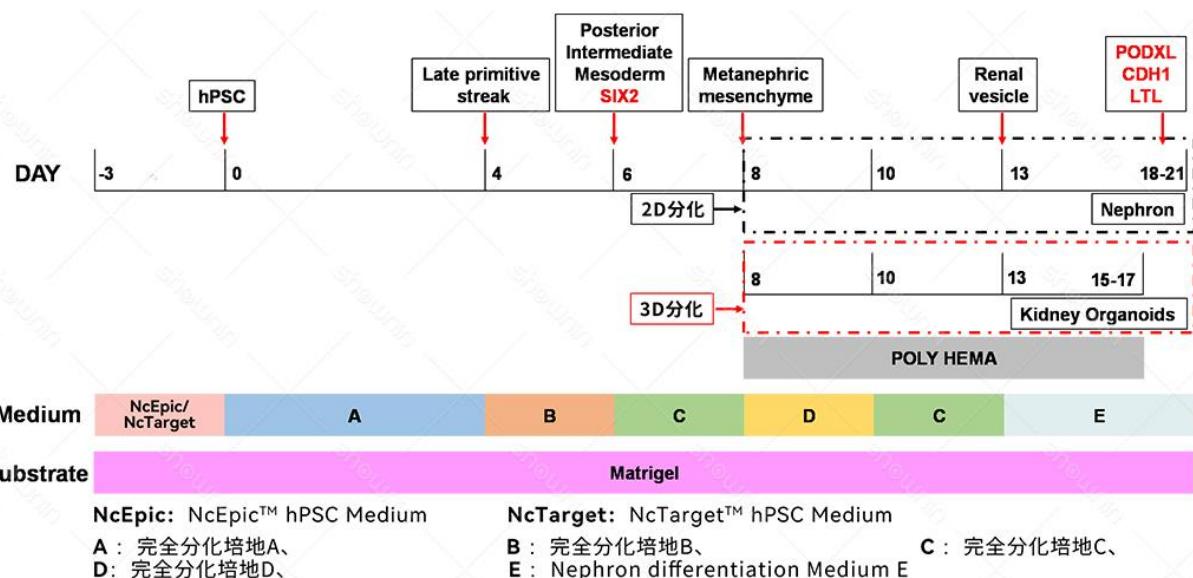


hPSC-ネフロンオルガノイド分化キット

目次 #RP01015 1 Kit (2 L)

製品概要

hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットは、ヒト多能性幹細胞（hPSC）を腎上皮細胞に分化させるための製品であり、成熟後にはネフロンオルガノイド構造を形成します。分化後のネフロンオルガノイド構造は、特異的マーカー（CDH1、LTL、PODXLなど）を高効率で発現し、様々な *in vitro* 実験、薬物スクリーニング、安全性評価、および疾患モデル動物での細胞移植試験に適用できます。



製品情報

表 1: hPSC-ネフロンオルガノイド分化関連製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-ネフロンオルガノイド分化キット*	RP01015	1 Kit	基 础 液 2-8 °C 添 加 剂 -80 °C または -20 °C
hPSC-ネフロン細胞成熟分化培地	RP01015-F	1 Kit	

*各キットからは分化 Day8 の NPC 細胞 2×10^7 個が得られます。

**基礎液と添加剤をよく混和して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&設備

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 Dissociation Buffer	Shownin	RP01007
Blebbistatin	Shownin	RP01008
hPSC Cryopreservation Medium	Shownin	SN-06-1210
Solase 細胞消化液	Shownin	RP01021
0.25%トリプシン消化液	Shownin	RP02011
トリプシン阻害剤	Shownin	RP02012
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12 培地	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
24 ウエルプレート	Thermo Sci.	162485
T25 フラスコ	Thermo Sci.	156367
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
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
POLYHEMA	Sigma	P3932

hPSC からネフロンオルガノイドへの分化

(一) 試薬の準備

表 3： hPSC-ネフロンオルガノイド分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-ネフロンオルガノイド分化キット*の内容物：	RP01015	1 Kit	
Nephron Differentiation Supplement A (100 ×)	RP01015-A	1 mL	
Nephron Differentiation Supplement B (100 ×)	RP01015-B	1mL	
Nephron Differentiation Supplement C (100 ×)	RP01015-C	1.5 mL	
Nephron Differentiation Supplement D (100 ×)	RP01015-D	1.5 mL	
Nephron Differentiation Basal Medium E	RP01015-E	500 mL	2-8 °C

*各キットからは、分化 Day8 の NPC 細胞 2×10^7 個が得られます。

*各キットは、24 ウェルプレート 1 枚分の 2D 分化、または 24 ウェルプレート 12 ウェル分の 3D 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 °C で保存し、2 週間以内に使用可能です。

1. Nephron Differentiation Supplement A、B、C、Dは4 °Cで解凍します。37 °Cで解凍しないでください。
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を調製します。
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 °Cで保存し、2 週間以内に使用してください。

Tips：Nephron Differentiation Supplement A/B/C/Dは、実際の使用量に応じて分注して冷凍保存することができます。冷凍・融解は合計で2回までとします。

表 4 : hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットの調製説明

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

(二) hPSC からネフロンオルガノイドへの分化-2D

1. hPSCの培養と準備：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> 取扱説明書)

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

2. Day -3 : 24ウェルプレートを例にして、hPSCの播種密度は $3-5 \times 10^4$ cells/ウェルとし、毎日培地を交換します。

Tips : hPSCの接種密度は $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 、 $200 \mu\text{L}$ のhPSC完全培地 (NcEpicまたはNcTarget) / cm^2 です。分化用hPSCは、解凍後少なくとも5世代継代してください。

3. Day 0 : hPSC細胞が50%コンフルエンシーに達した時点で、分化プログラムを開始し、hPSC完全培地 (NcEpicまたはNcTarget) を吸引除去し、 $500 \mu\text{L}$ のDPBS (カルシウム・マグネシウム不含) で細胞を1回洗浄した後、分化完全培地Aを 0.5 mL / ウェルで添加します。毎日培地を交換し、4日間 (Day 0- Day 4) 培養します。

Tips : 初期細胞の播種密度と細胞状態が異なるため、50%コンフルエンシーに達する時間は多少異なります。50%コンフルエンシーに達する時間に応じて、分化開始時間を調整してください。

4. Day 4 : 分化完全培地Aを吸引除去し、1 mL/ウェルで分化完全培地Bを加え、毎日培地を交換し、2日間（Day 4-Day 6）培養します。

Tips : 分化完全培地Aで4日間培養後、細胞は収縮します。収縮後に細胞が過度に分散または密集すると、その後の分化効率に影響します（図1-B）

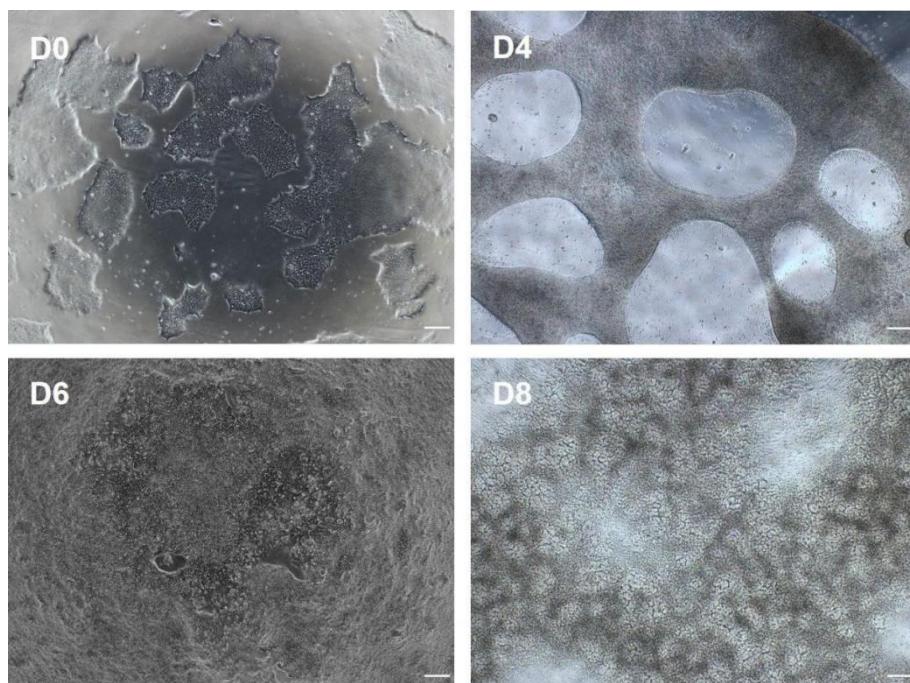
5. Day 6 : 分化完全培地Bを吸引除去し、1 mL /ウェルで分化完全培地Cを加え、2日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day 6-Day 8）。
6. Day 8 : 分化完全培地Cを吸引除去し、1mL /ウェルで分化完全培地Dを加え、2日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day 8-Day 10）。
7. Day 10 : 分化完全培地Dを吸引除去し、1mL /ウェルで分化完全培地Cを加え、3日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day 10-Day 13）。
8. Day 13 : 分化完全培地Cを吸引除去し、1mL /ウェルでNephron Differentiation Medium Eを加え、毎日培地を交換します。約5-7日間で成熟した腎上皮細胞構造を得ることができます（Day 13-Day 18/21）。

（三）hPSC からネフロンオルガノイドへの分化-3D

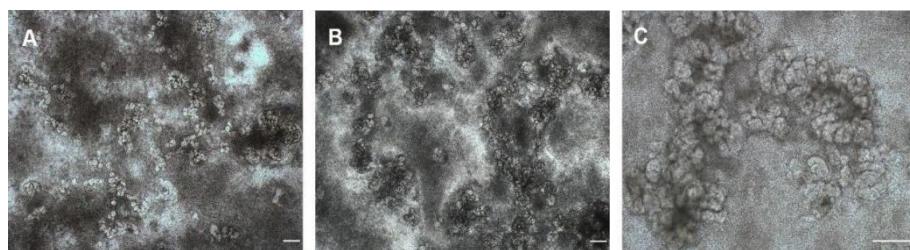
1. hPSCの培養と準備：Day 0-Day 8の分化操作手順は、2.2.1-2.2.6を参照してください。
2. Day 8 : 3D培養に転換：6 mLの分化完全培地Dを予め調製し、1:1000の割合でBlebbistatinを添加します。24ウェルプレートの1ウェルに500 μ Lの0.25%トリプシン消化液を加え、37 °Cで3分間インキュベートした後、500 μ Lのトリプシン阻害剤を加えて消化を停止します。1 mLピペットで穩やかに吹きかけ、細胞懸濁液を1.5 mL遠心管に移し、ハンドヘルド遠心機で5-10秒間瞬時遠心し、上清を吸引除去します。Blebbistatinを含む分化完全培地Dを加えて細胞を再懸濁し、POLY HEMAでコーティングした T25フラスコに移し、3次元シェーカーに置き、15 rpmの回転速度で培養します。毎日培地を交換します（Day 8-Day 10）。

Tips：24時間後にBlebbistatinを除去し、新鮮な培地に交換します。

3. Day 10：分化完全培地Dを吸引除去し、6 mL / ウェルで分化完全培地Cを加え、3日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day10-Day 13）。
4. Day 13：分化完全培地Cを吸引除去し、5 mL / ウェルでNephron Differentiation Medium Eを加え、毎日培地を交換します。約2-4日間で構造の明らかなKidney Organoidsが得られます（Day 13-Day 15/17）。



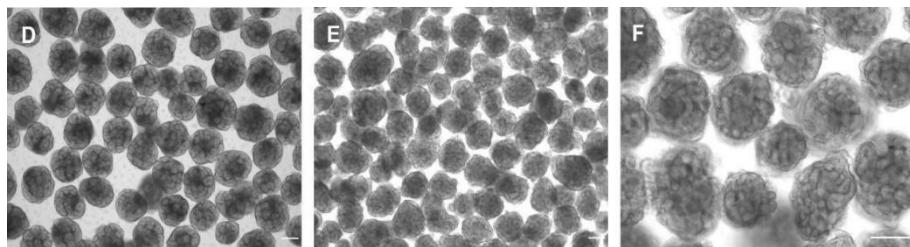
hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットを用いた分化過程における細胞形態



図はそれぞれ分化0日目、4日目、6日目、8日目における細胞形態を示した。スケールバー：200 μm

hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットを用いた2D分化過程における細胞形態 スケールバー：200 μm

図Aは2D分化14日目の細胞形態、図BとCは2D分化20日目の細胞形態を示した。



hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットを用いた3D分化過程における細胞形態 スケールバー：200 μm 図Dは3D分化13日目の細胞形態、図EとFは3D分化17日目の細胞形態を示した。

hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化

(一) 試薬の準備

表5：hPSC-ネフロン前駆細胞培養関連製品システム

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-ネフロン前駆細胞成熟分化培地	RP01015-F	1 Kit	
Nephron Differentiation Supplement C (100 \times)	RP01015-C	1.5 mL	-80 $^{\circ}\text{C}$ または -20 $^{\circ}\text{C}$
Nephron Differentiation Supplement D (100 \times)	RP01015-D	1.5 mL	
Nephron Differentiation Medium E	RP01015-E	500 mL	2-8 $^{\circ}\text{C}$

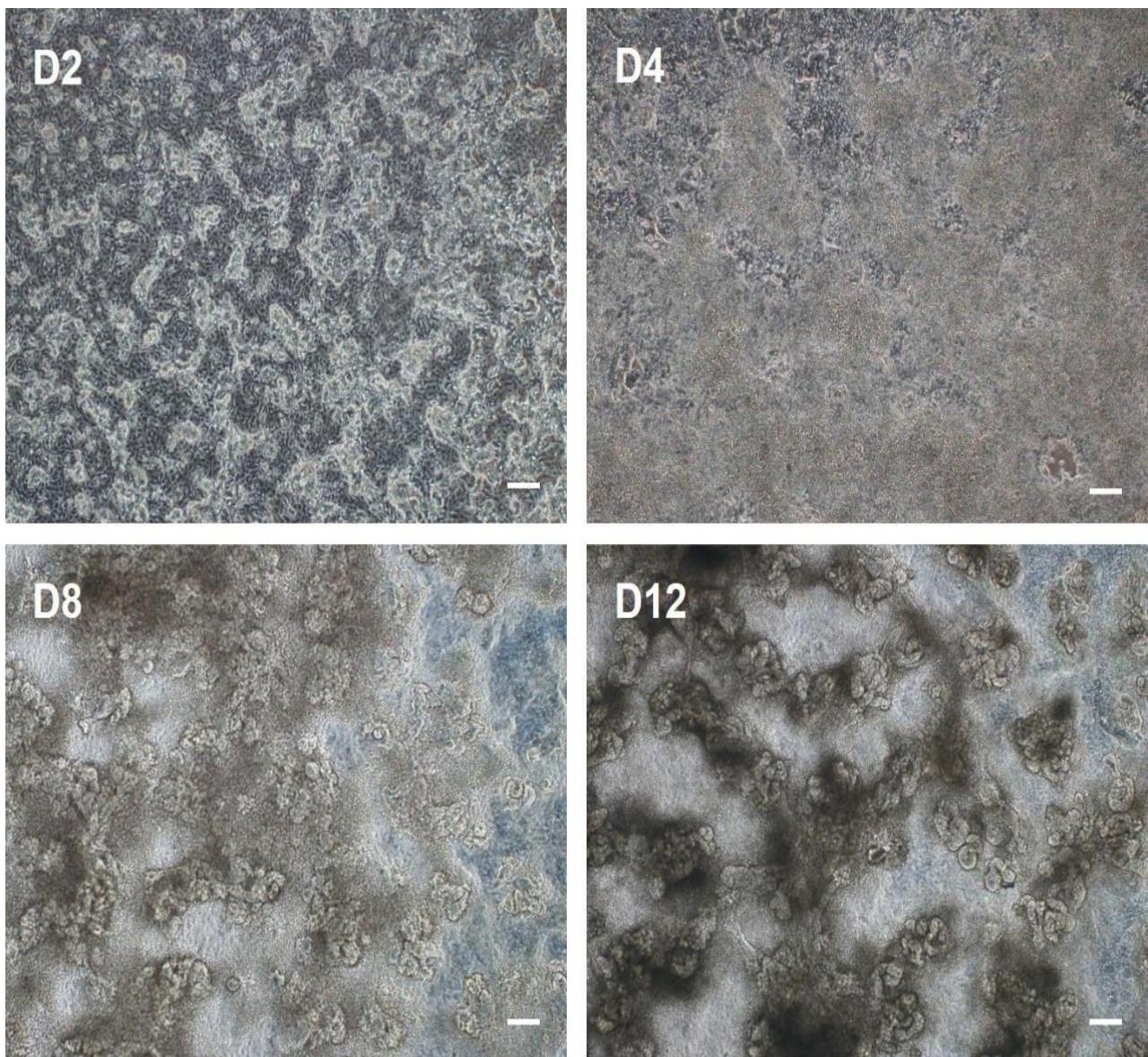
1. Nephron Differentiation Supplement C、Dはは4 $^{\circ}\text{C}$ で解凍します。37 $^{\circ}\text{C}$ で解凍しないでください。
2. 表 4を参考し、バイオセーフティーキャビネット内で分化完全培地C/D (1 \times) を調製します。
3. 分化培地は調製後すぐに使用することを推奨します。4 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、2週間以内に使用してください。

Tips：実際の状況に応じてSupplement C/D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。

(二) hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化-2D

1. ウォーターバスを37 °Cに予熱します。Matrigel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ー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。分化完全培地Cを1mL取り、1:2000の割合でBlebbistatin（終濃度5μM）を添加し、室温に戻します。
2. 液体窒素タンクから1本の凍結保存されたhPSC-ネフロン前駆細胞を取り出し、ドライアイスで細胞室に移し、直ちに37 °Cのウォーターバスに浸し、手で軽く振りながら1分間以内に解凍し、肉眼で細胞懸濁液内の氷晶がほぼ消失した時点で取り出します。
3. 75%エタノール無塵紙で凍結保存管の表面を拭き、バイオセーフティー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の遠心管に移し、ピペットで8 mL のNephron Differentiation Medium Eを吸引し、凍結保存された細胞懸濁液に滴下しながら、静かに振り混ぜて細胞を均一に分散させます。150 × gで5分間遠心します。
4. 上清を除去し、予温した1mLの分化完全培地C（Blebbistatin含有）を加えて細胞を混和します（ピペットティングはしないように注意する）。すべてをMatrigelでコーティングした24ウェルプレートの1ウェルに播種します。37 °C・5% CO₂濃度・飽和湿度のインキュベーターに入れ、水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。
5. Day2：分化完全培地Cを吸引除去し、1mL/ウェルで分化完全培地Dを加え、2日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day2-Day4）。
6. Day 4：分化完全培地Dを吸引除去し、1mL/ウェルで分化完全培地Cを加え、3日間連続培養し、毎日培地を交換します（Day4-Day 7）。
7. Day 7：分化完全培地Cを吸引除去し、1mL/ウェルでNephron Differentiation Medium Eを加え、毎日培地を交換します。約5-7日間後に成熟した腎上皮細胞の細胞構造が得られます。



hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化 Day2-Day12 における細胞形態 (2D)

スケールバー：200 μm

(三) hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化-3D

1. 6 mLの分化完全培地Cを取り、Blebbistatinを1:1000の割合で添加し、3.2.3-3.2.4の方法に従って細胞を解凍し、細胞沈殿物を回収します。
2. Blebbistatinを含む分化完全培地Cを加えて細胞を再懸濁し、POLY HEMAでコーティングしたT25 フラスコに移し、3次元シェーカーに置き、15 rpmの回転速度で培養します。
3. Day1：分化完全培地Cを吸引除去し、分化完全培地Dを6 mL/ウェルで添加します。2日間連続培

養し、毎日培地を交換します。

4. Day3：分化完全培地Dを吸引除去し、分化完全培地Cを6 mL/ウェルで添加します。3日間連續培養し、毎日培地を交換します。
5. Day 6：分化完全培地Cを吸引除去し、Nephron Differentiation Medium Eを5 mL/ウェルで添加します。毎日培地を交換し、約2-4日間後に構造の明確なKidney Organoidsが得られます。