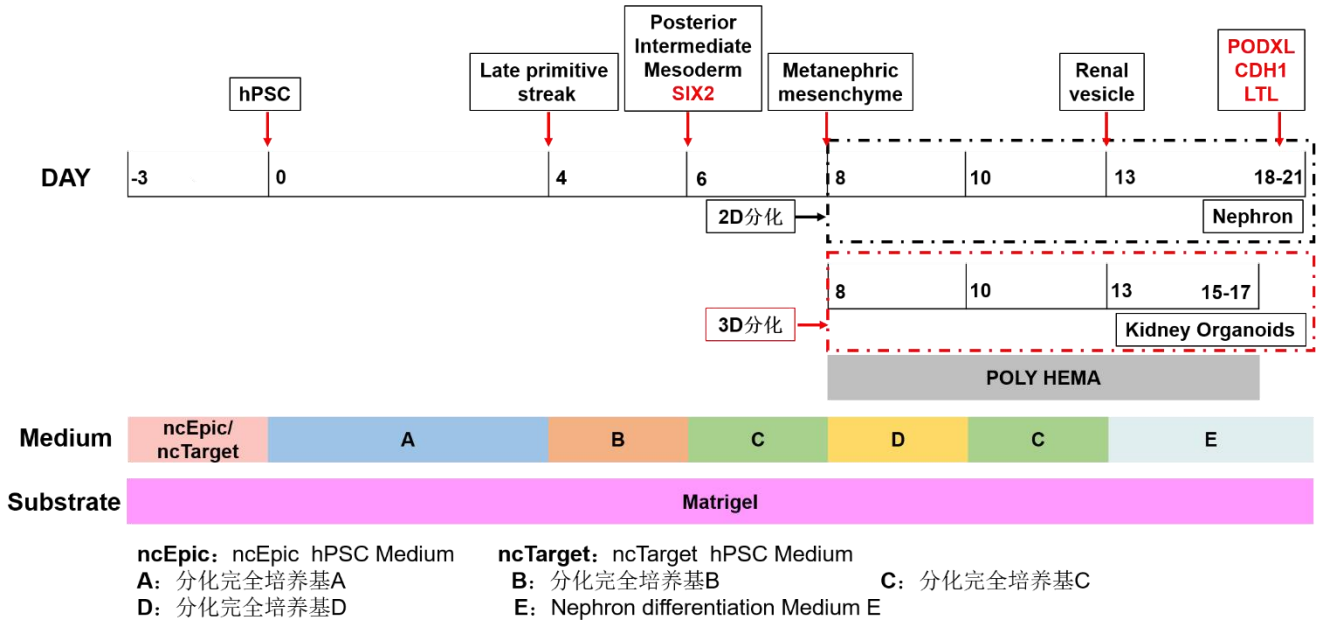
hPSC-ネフロンオルガノイド分化キット

取扱説明書 V3

一、製品概要

1.1、製品説明

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。



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**：Nephron differentiation Medium E

1.2、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	基礎液 2℃～8℃ 添加剤 -20℃～-80℃
hPSC-ネフロン細胞成熟分化培地	RP01015-F	1 Kit	
hPSC-ネフロン細胞**	RC01006	3 ×10^6	液体窒素

***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℃で保存し、2週間以内に使用可能です。**

****hPSCからネフロンオルガノイドへ分化7日目のネフロン前駆細胞。**

1.3、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	RP01001
ncTarget hPSC Medium	Shownin	RP01020
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
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ウェルプレート	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

二、hPSCからネフロンオルガノイドへの分化

2.1、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	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Supplement B（100×）	RP01015-B	1mL	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Supplement C（100×）	RP01015-C	1.5 mL	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Supplement D（100×）	RP01015-D	1.5 mL	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Medium E	RP01015-E	500 mL	2℃~8℃

***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℃で保存し、2週間以内に使用可能です。**

2.1.1. Nephron Differentiation Supplement A、B、C、D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**を調製します。

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：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可能です。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	

2.2、 hPSCからネフロンオルガノイドへの分化-2D

2.2.1. 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）

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

TIPS： hPSCの接種密度は5x10^4/ cm^2、200 μL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。

2.2.3. **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、500μL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（DAY0-DAY4）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。

2.2.4. **DAY 4**：**分化完全培地A**を吸引除去し、1mL/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（DAY4-DAY6）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）

2.2.5. **DAY 6**：**分化完全培地B**を吸引除去し、1mL /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（DAY6-DAY 8）。

2.2.6. **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（DAY8-DAY 10）。

2.2.7. **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（DAY10-DAY 13）。

2.2.8. **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（DAY13-DAY 18/21）。

2.3、hPSCからネフロンオルガノイドへの分化-3D

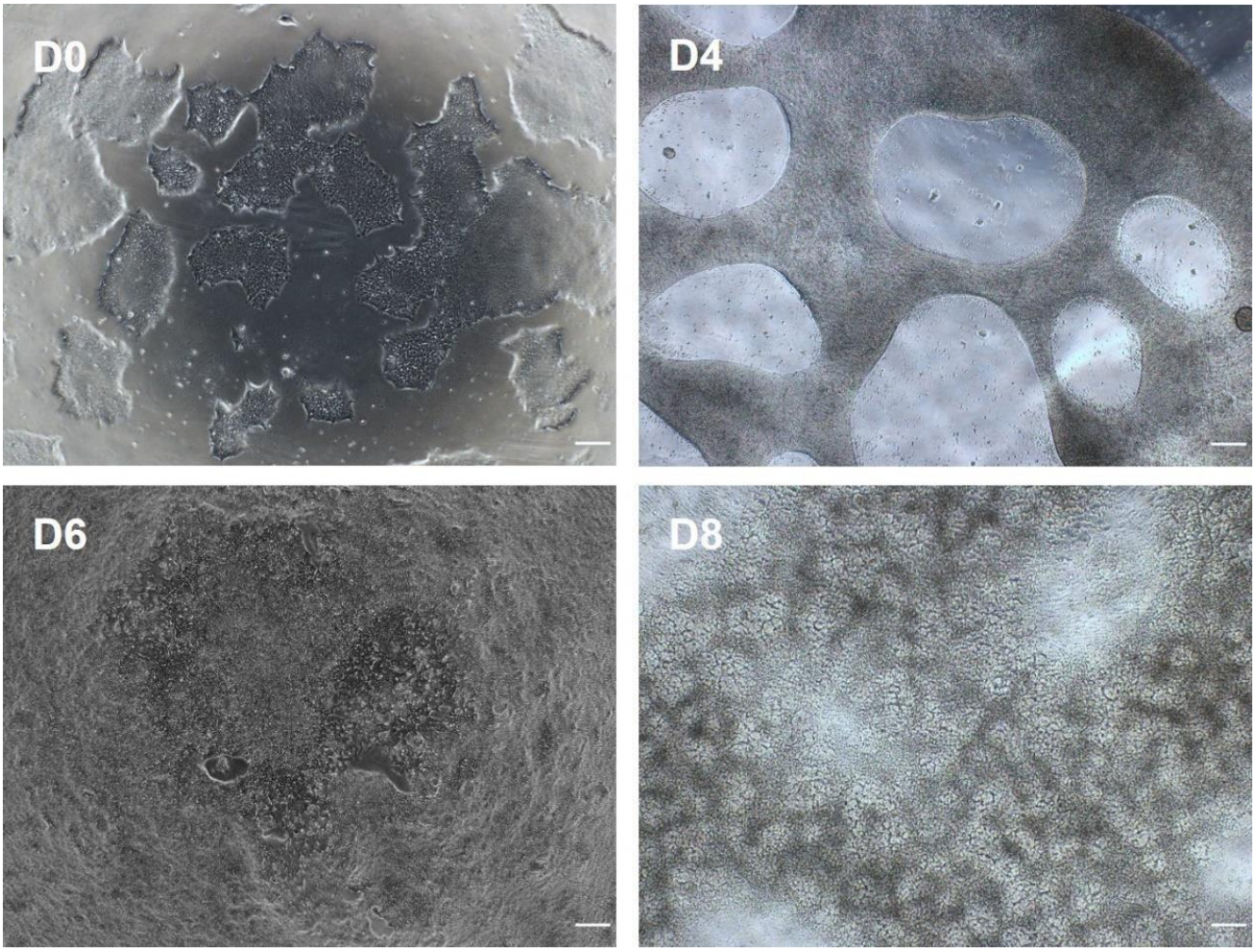
2.3.1. hPSCの培養と準備：DAY 0-DAY 8の分化操作手順は、**2.2.1-2.2.6**を参照してください。

2.3.2. **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 μLの**0.25%トリプシン消化液**を加え、37℃で3分間インキュベートした後、500 μLの**トリプシン阻害剤**を加えて消化を停止します。1 mLピペットで穏やかに吹きかけ、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。

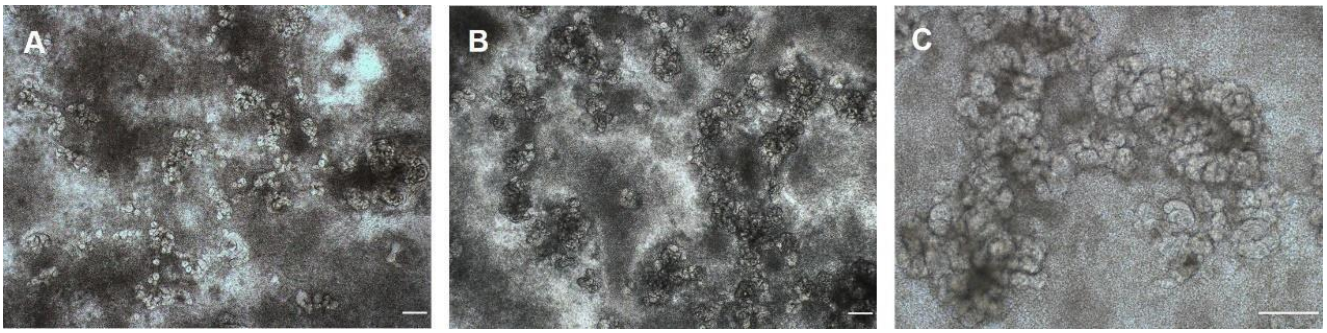
2.3.3. **DAY 10**：**分化完全培地D**を吸引除去し、6 mL /ウェルで**分化完全培地C**を加え、3日間連続培養し、毎日培地を交換します（DAY10-DAY 13）。。

2.3.4. **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）。



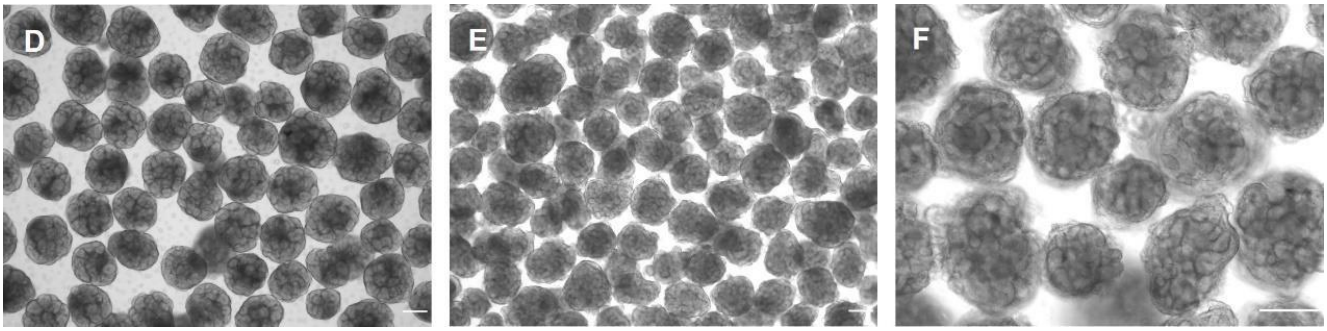
hPSC-ネフロンオルガノイド分化キットを用いた分化過程における細胞形態

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。

三、hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化

3.1、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	**RC01006**	**3 ×10⁶**	**液体窒素**
hPSC-ネフロン前駆細胞成熟分化培地	**RP01015-F**	**1 Kit**	
Nephron differentiation Supplement C（100×）	RP01015-C	1.5 mL	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Supplement D（100×）	RP01015-D	1.5 mL	-20℃または-80℃
Nephron differentiation Medium E	RP01015-E	500 mL	2℃~8℃

3.1.1. **Nephron differentiation Supplement C、Dは**4℃で解凍します。**37℃で解凍しないでください。**

3.1.2. 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×）**を調製します。

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。

3.2、 hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化-2D

3.2.1. ウォーターバスを37℃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。

3.2.2. 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℃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。

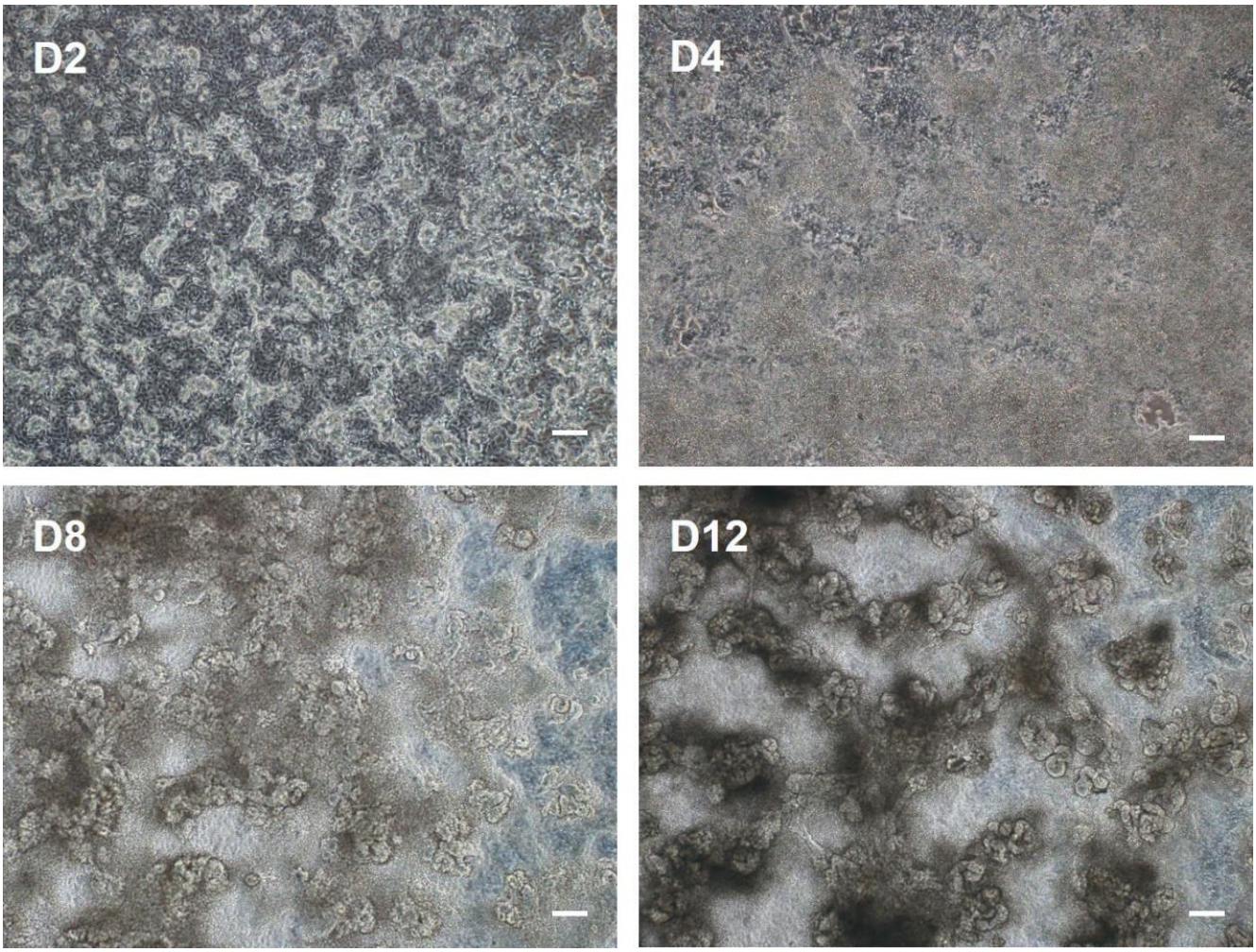
3.2.3. 75%エタノール無塵紙で凍結保存管の表面を拭き、バイオセーフティーキャビネット内に移します。細胞懸濁液を予め準備した15mLの遠心管に移し、ピペットで8 mLの**Nephron differentiation Medium E**を吸引し、凍結保存された細胞懸濁液に滴下しながら、静かに振り混ぜて細胞を均一に分散させます。150×gで5分間遠心します。

3.2.4. 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ウェルプレートのの1ウェルに播種します。37℃・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。

3.2.5. **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）。

3.2.6. **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）。

3.2.7. **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

3.3、 hPSC-ネフロン前駆細胞の解凍と継続分化-3D

3.3.1. 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。

3.3.2. **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。

3.3.3. **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。

3.3.4. **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日間連続培養し、毎日培地を交換します。

3.3.5. **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。