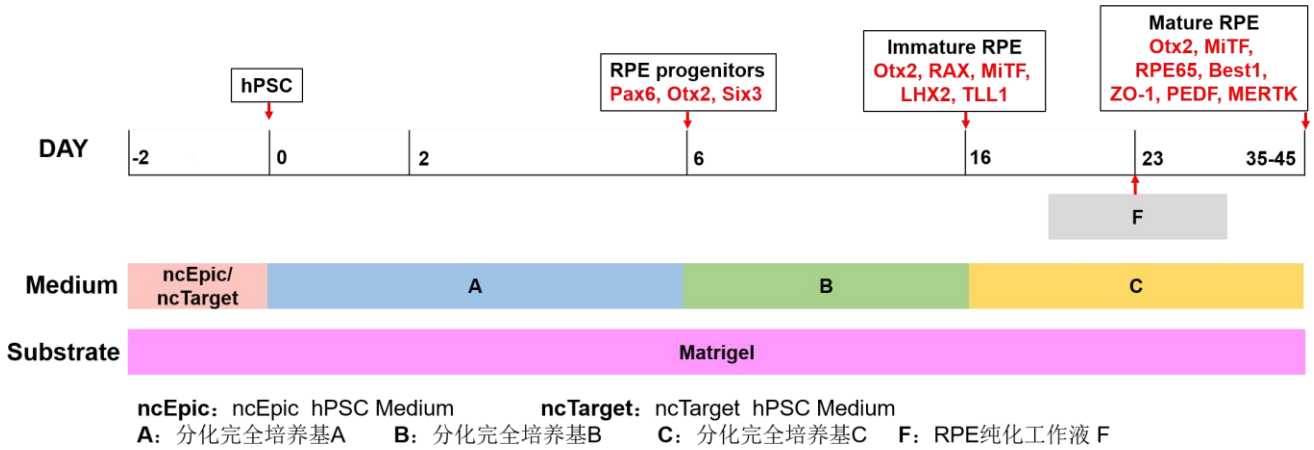
hPSC-RPE 分化キット

取扱説明書V3

一、製品概要

1.1、製品説明

hPSC-RPE分化キットは、ヒト多能性幹細胞（hPSC）をヒト網膜色素上皮細胞（RPE）に分化させるための製品です。この製品には、分化培地、RPE純化使用液、凍結保存液が含まれています。hPSC-RPE分化キットを使用することで、高純度のRPE（＞95% MiTF+/ZO-1+）をhPSCから得ることができます。hPSC由来のRPEは、関連する科学研究、薬物スクリーニング、および疾患モデル動物での細胞移植治療試験に応用可能です。



1.2、製品情報

表 1： hPSC-RPE 分化関連製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-RPE分化キット*	RP01016	1 Kit	基礎液 2℃～8℃ 添加剤 -20℃～-80℃
hPSC-RPE前駆細胞成熟培地*	RP01016-H	1 Kit	
hPSC-RPE細胞（Day25）**	RC01007	3×10^6	液体窒素

***各キットからは、最終的に約1×107個の成熟RPE細胞が得られます。**

***基礎液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。**

**** hPSCからRPEへの分化25日目のRPE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
6/12/24ウェルプレート	Thermo Sci.	140685
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遠心チューブ	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

二、hPSC-RPE 分化

2.1、試薬の準備

表 3： hPSC-RPE 分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hPSC-RPE分化キット*の内容物：	**RP01016**	**1 Kit**	
RPE Differentiation Supplement A（50×）	RP01016-A	800 μL	-20℃または-80℃
RPE Differentiation Supplement B（50×）	RP01016-B	1.2 mL	-20℃または-80℃
RPE Differentiation Supplement C（50×）	RP01016-C	2 mL	-20℃または-80℃
RPE Differentiation Basal Medium D	RP01016-D	100 mL	2℃~8℃
RPE Differentiation Basal Medium E	RP01016-E	100 mL	2℃~8℃
RPE純化使用液 F	RP01016-F	10 mL	2℃~8℃
RPE凍結保存液 G	RP01016-G	10 mL	2℃~8℃

***各キットからは、最終的に約1×10⁷個の成熟RPE細胞が得られます。**

***各キットは、12ウェルプレートの6ウェル分、または6ウェルプレートの3ウェル分の分化に使用可能です。**

***基礎液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。**

2.1.1. RPE Differentiation Supplement A/B/C は4℃ で解凍します。**37℃では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（1×）**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：実際の使用量に応じて、RPE Differentiation Supplement A/B/C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 4：hPSC-RPE 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（1×）	RPE differentiation Supplement A（50×）/ B（50×）	1×
	RPE differentiation Basal Medium D	
分化完全培地 C（1×）	RPE differentiation Supplement C（50×）	1×
	RPE differentiation Basal Medium E	

2.2、hPSC-RPE 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 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-2**：12ウェルプレートを例に、hPSC細胞が85%コンフルエンシーに達した時点で、新しいウェルに播種・継代します。hPSCの播種密度は1×10⁵細胞/ウェルとし、2日間培養します（毎日

培地交換）。

TIPS：このプロトコルは他の培養容器にも適用可能（hPSCの播種密度は2×10⁴細胞/cm²）です。hPSCは解凍後5回程度継代し、細胞状態が良好な時期に分化誘導を開始することを推奨します。

2.2.3. **DAY 0：**培養上清を吸引除去し、**分化完全培地A**を1 mL/ウェルで添加します。毎日培地を交換してDAY 6まで培養します（DAY 0-5）。

2.2.4. **DAY 6：分化完全培地A**を吸引除去し、**分化完全培地B**を1 mL/ウェルで添加します。毎日培地を交換してDAY 16まで培養します（DAY 6-15）。

2.2.5. **DAY 16：分化完全培地B**を吸引除去し、**分化完全培地C**を1 mL/ウェルで添加します。毎日培地を交換してDAY 23まで培養します（DAY 16-23）。

2.2.6. **DAY 23：分化完全培地C**を吸引除去し、DPBS（Ca^{2+}/Mg^{2+}不含）を1 mL/ウェルで添加して1回洗浄した後、1 mLの**RPE純化使用液F**を添加し、37℃・5% CO_2・飽和湿度のインキュベーターで6-8分間インキュベートすることで、雑細胞を完全にディッシュから剥離させます。

TIPS：雑細胞は線維状のフィブロブラスト様形態でRPE細胞との分離が容易です。消化の間にディッシュをインキュベーターから取り出し、顕微鏡下で雑細胞の状態を観察できます。また、ディッシュを軽く手で揺らすことで、雑細胞の分離を促進することが可能です。

2.2.7. 雑細胞が全て浮遊したら上清を吸引除去し、DPBS（Ca^{2+}/Mg^{2+}不含）を1 mL/ウェル加えて3回洗浄します。

TIPS：このステップでほぼ全ての雑細胞を除去可能です。

2.2.8. **分化完全培地C**を2 mL/ウェルで添加し、3-4日毎に培地を交換してDAY 35-45まで培養します。得られたRPE細胞は各研究実験に利用可能です。

2.2.9. **細胞凍結保存：**実験の必要に応じて、得られたhPSC-RPEを凍結保存することが可能です。上清を吸引除去し、DPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を1 mL/ウェルで添加し、1回洗浄します。その後、1 mLの**0.25%トリプシン消化液**を添加し、37℃、5% CO_2濃度、飽和湿度のインキュベーターで3～5分間インキュベートします。RPE細胞の大部分が明るくなってきたら、**消化液**を吸引除去し、各ウェルに1 mLの**トリプシン阻害剤**を添加し、3～5回穏やかにピペッティングします。その後、RPE細胞を15 mL遠心管に回収し、**180 ×g**で**5**分間遠心します。

TIPS：消化時には細胞の状態を注意深く観察する必要があります。大部分の細胞が明るくなった時点で消化を中止します。この時点では多くの細胞はまだ浮遊していない場合、トリプシンを除去した後にトリプシン阻害剤を添加し、3～5回穏やかにピペッティングして細胞を回収します。大部分の細胞がすでに浮遊している場合は、直接にトリプシン阻害剤を添加し、3～5回穏やかにピペッティングして細胞を回収します。

2.2.10. 上清を吸引除去し、適量の**RPE凍結保存液G**を加えてRPE細胞を懸濁し、細胞数を計測します。その後、所定の密度（例：3×10⁶細胞/管）で細胞を凍結保存します。

三、hPSC-RPE 細胞の解凍と成熟培養

3.1、試薬の準備

表 5： hPSC-RPE 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-RPE細胞	**RC01007**	**3×10⁶**	**液体窒素**
hPSC-RPE細胞成熟培地の内容物	**RP01016-H**	**1 Kit**	
RPE Differentiation Supplement C（50×）	RP01016-C	2 mL	-20℃または-80℃
RPE Differentiation Basal Medium E	RP01016-E	100 mL	2℃~8℃

3.1.1. RPE Differentiation Supplement Cは4℃ で解凍します。**37℃では解凍しないでください**。

3.1.2. バイオセーフティキャビネット内で、表4を参照して**RPE細胞成熟完全培地（1×）**を調製します。

RPE Differentiation Basal Medium E：98 mL

RPE Differentiation Supplement C（50×）：2 mL

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：実際の使用量に応じてRPE Differentiation Supplement C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-RPE 細胞の解凍と成熟培養

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6ウェルプレートをバイオセーフティキャビネット内で約30分間静置し、室温（15～30℃）に戻しておきます。

3.2.2. 6 mLの**RPE細胞成熟完全培地**に、6 μL の**Blebbistatin**（10 mM）を1:1000で添加し、室温（15～30℃）に戻します。

3.2.3. 液体窒素タンクから凍結された**hPSC-RPE細胞**1本を取り出し、直ちに37℃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。

3.2.4. 凍結保存管の表面を75%エタノール無塵紙で拭き、バイオセーフティキャビネットに移します。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10mL DMEM/F12を吸引し、細胞懸濁液に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。180×gで5分間遠心します。

3.2.5. 上清を除去し、管底の細胞を軽く叩き、予温した**Blebbistatin** + **RPE細胞成熟完全培地**6 mLを加え、よく混和して細胞を均一に分散させます。ピペッティングはしないようにします。

TIPS： 1-2×10⁵/cm²の密度でRPE細胞を播種することを推奨します。播種時は十分な混和を確認してください。

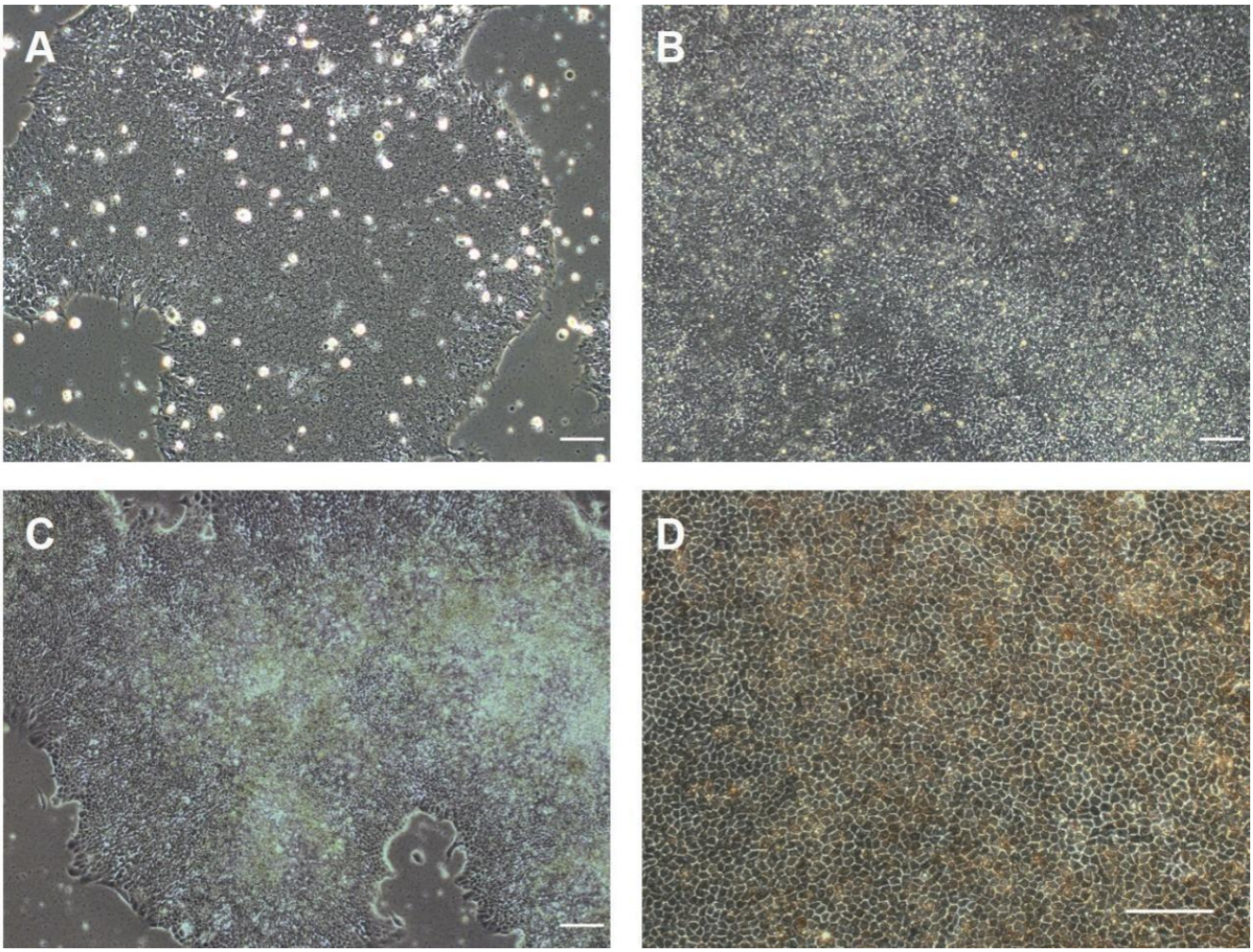
3.2.6. 6ウェルプレートの2ウェル分のMatrigel溶液を吸引除去し、ウェルに細胞を3 mL/ウェルで滴下しながら播種します。

3.2.7. 培養プレートを"水平方向に十字振りを行ない、細胞の均一な分布を確保します。

3.2.8. 6ウェルプレートに細胞由来、継代数、RPE培養日数、日付、作業者IDを記入します。培養プレートを

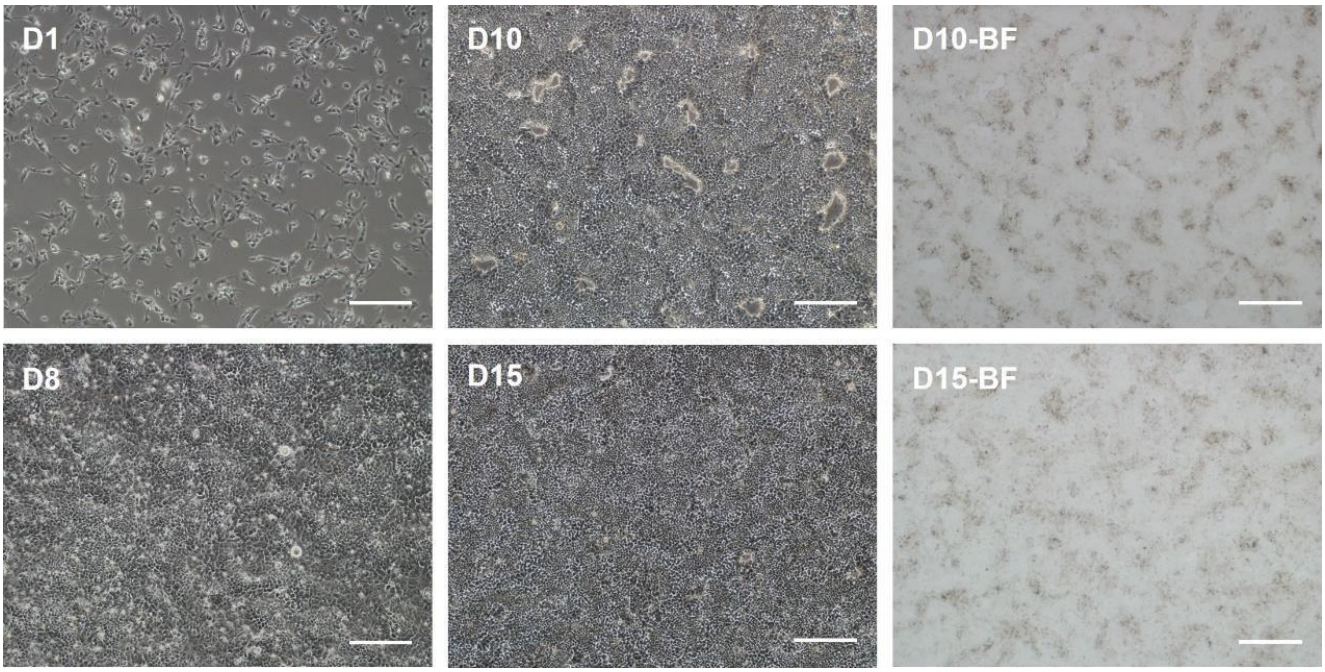
37℃・5% CO_2濃度・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再度水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。

3.2.9. 18-24時間後に**RPE細胞成熟完全培地**を交換します。以降は2日毎に培地を3 mL/ウェルで交換します。8日目に典型的なRPE細胞形態が観察され、10日目からは明らかなメラニン分泌が見えます。



hPSC-RPE 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

A：DAY 0（hPSC）　B：DAY 6（RPE progenitors）　C：DAY 16（Immature RPE）　D：DAY45（Mature RPE）



hPSC-RPE 細胞解凍後 1日目-15日目における細胞形態　スケールバー：200 μm

8日目に典型的なRPE細胞形態が見え、10日目からは明らかなメラニン分泌が観察された。