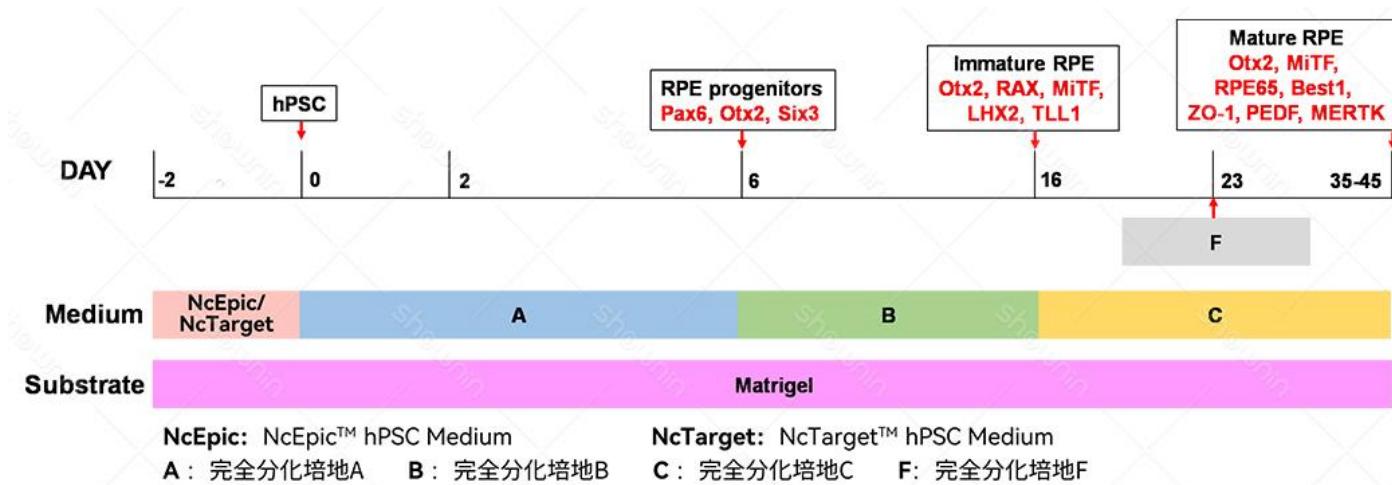


# hPSC-RPE 分化キット

目次 # RP01016 1 Kit (2 L)

## 製品概要

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、関連する科学的研究、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。



## 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 °C<br>添加剤 -80 °C または -20 °C |
| hPSC-RPE 前駆細胞成熟培地* | RP01016-H | 1 Kit |                                     |

\*各キットからは、最終的に約  $1 \times 10^7$  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 °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&amp;材料&amp;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   |
| 6/12/24 ウエルプレート                | 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  |

## hPSC-RPE 分化

### (一) 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 |                 |
| RPE Differentiation Supplement B (50 ×) | RP01016-B | 1.2 mL | -80°C または -20°C |
| RPE Differentiation Supplement C (50 ×) | RP01016-C | 2 mL   |                 |
| RPE Differentiation Basal Medium D      | RP01016-D | 100 mL |                 |
| RPE Differentiation Basal Medium E      | RP01016-E | 100 mL |                 |
| RPE 純化使用液 F                             | RP01016-F | 10 mL  | 2-8 °C          |
| RPE 凍結保存液 G                             | RP01016-G | 10 mL  |                 |

\*各キットからは、最終的に約 1 × 10<sup>7</sup> 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 °C で保存し、2 週間以内に使用可能です。

1. RPE Differentiation Supplement A/B/C は4 °C で解凍します。37 °Cでは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 (1 ×) 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 :** 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                 |     |

## (二) hPSC-RPE 分化

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)

2. Day-2 : 12 ウエルプレートを例に、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  $1 \times 10^5$  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  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> )

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。

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)。

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)。

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）。

6. Day 23：分化完全培地Cを吸引除去し、DPBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>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 °C・5% CO<sub>2</sub>・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blast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。

7. 雜細胞が全て浮遊したら上清を吸引除去し、DPBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>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。

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。

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できます。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 °C、5% CO<sub>2</sub> 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つ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。

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： $3 \times 10^6$  細胞/管）で細胞を凍結保存します。

## hPSC-RPE 細胞の解凍と成熟培養

### (一) 試薬の準備

表 5： hPSC-RPE 細胞 関連製品システム

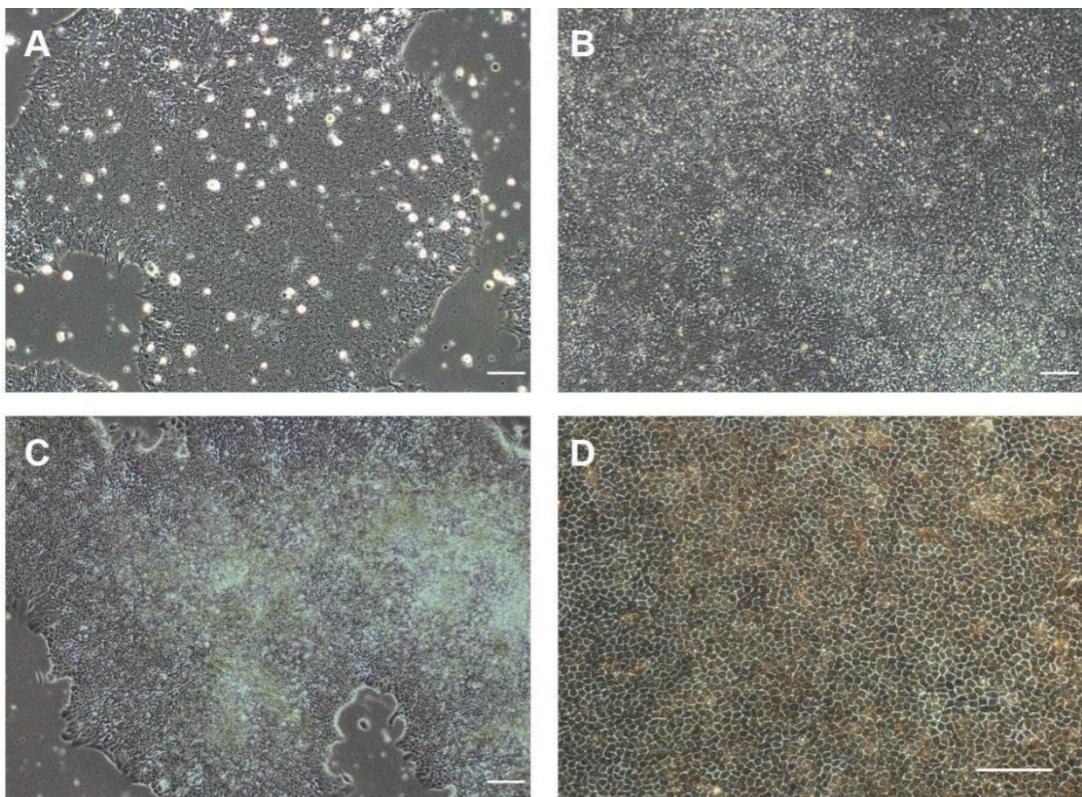
| 製品情報                                    | 品番        | 規格     | 保存条件            |
|---|-----------|--------|-----------------|
| hPSC-RPE 細胞成熟培地の内容物                     | RP01016-H | 1 Kit  |                 |
| RPE Differentiation Supplement C (50 ×) | RP01016-C | 2 mL   | -80°C または -20°C |
| RPE Differentiation Basal Medium E      | RP01016-E | 100 mL | 2-8 °C          |

1. RPE Differentiation Supplement Cは4 °C で解凍します。37 °Cでは解凍しないでください。
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. 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 : 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。

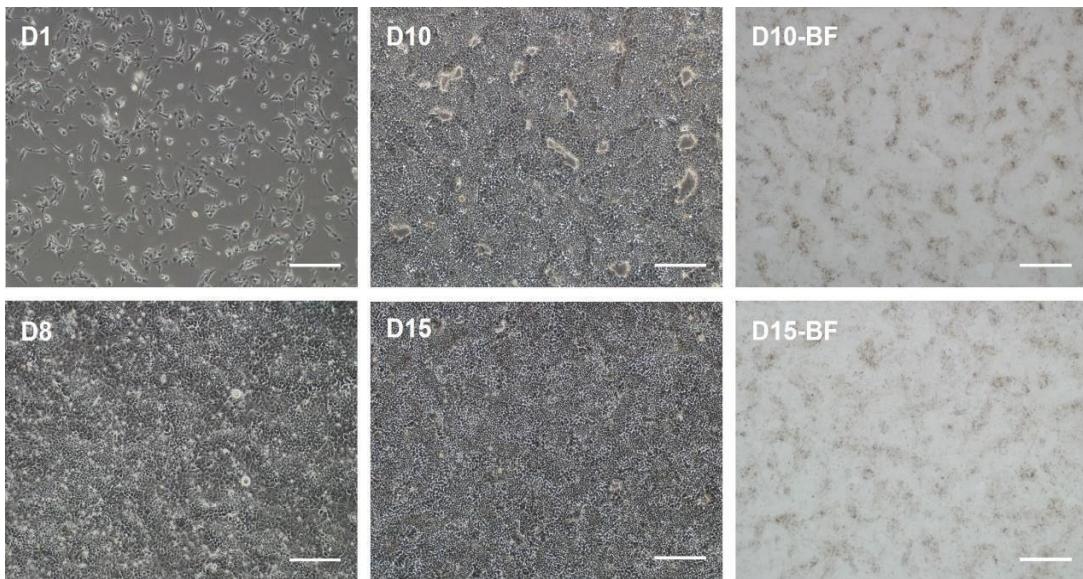
### (二) hPSC-RPE 細胞の解凍と成熟培養

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 °C）に戻しておきます。
2. 6mLのRPE細胞成熟完全培地に、6 µL のBlebbistatin (10mM) を1:1000で添加し、室温（15-30 °C）に戻します。
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 °C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。
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10 mL 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。  
Tips： 1-2 × 10<sup>5</sup> / cm<sup>2</sup>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。
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。
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。
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。
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 °C・5% CO<sub>2</sub>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。
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。