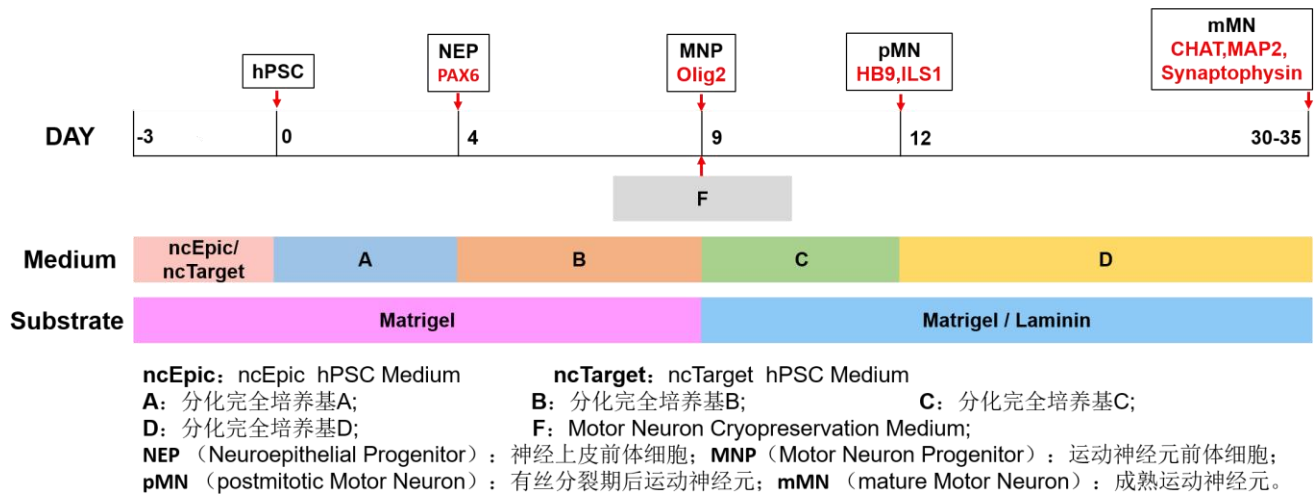


# hPSC-運動ニューロン分化キット

## 取扱説明書 V3

### 一、製品概要

hPSC-運動ニューロン分化キットは、運動ニューロンへの高効率な分化誘導能力を備えており、ヒト多能性幹細胞（hPSC）から運動ニューロンへの分化誘導に適しています。分化によって得られた運動ニューロンは、運動ニューロンの特異的マーカー（例：CHAT、MAP2、Synaptophysinなど）を発現し、電気生理学的活性を備えています。これにより、in vitro研究や疾患モデル動物での細胞移植研究などに適用可能です。



### 二、製品情報

表 1：hPSC-運動ニューロン分化製品システム

| 製品情報               | 品番        | 規格                | 保存条件                       |
|--------------------|-----------|-------------------|----------------------------|
| hPSC-運動ニューロン分化キット* | RP01018   | 1 Kit             | 基礎液 2℃～8℃<br>添加剤 -20℃～-80℃ |
| 運動ニューロン成熟培地        | RP01018-G | 1 Kit             |                            |
| hPSC-運動ニューロン前駆細胞** | RC01009   | 1×10 <sup>6</sup> | 液体窒素                       |

\* 各キットからは1×10<sup>7</sup>個の運動ニューロン前駆細胞が得られます（分化DAY9, MNP）。

\*基礎培地と添加物を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から運動ニューロンへ分化9日目の運動ニューロン前駆細胞（MNP）。

## 三、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     | 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   |
| Solase細胞消化液                    | Shownin     | RP01021   |
| ncLaminin511                   | Shownin     | RP01025   |
| Corning® Matrigel® Matrix      | Corning     | 354277    |
| Poly-L-ornithine               | Sigma       | P3655     |
| Laminin                        | Sigma       | L2020     |
| TrypLE                         | Gibco       | 12604013  |
| DMEM/F12培地                     | Thermo Sci. | 11330     |
| DPBS, no calcium, no magnesium | Thermo Sci. | 14190144  |
| 12ウェルプレート                      | Thermo Sci. | 150628    |
| 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       |
| 1.5/2 mL凍結保存管                  | Thermo Sci. | N/A       |
| 1.5 mL EP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から運動ニューロンへの分化

### 2.1、試薬の準備

表3: hPSC-運動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-運動ニューロン分化キット*の内容物:                         | RP01018   | 1 Kit  |             |
| Motor Neuron differentiation Supplement A (20×) | RP01018-A | 1 mL   | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Supplement B (25×) | RP01018-B | 1 mL   | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Supplement C (50×) | RP01018-C | 1 mL   | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Supplement D (50×) | RP01018-D | 3×1 mL | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Basal Medium E     | RP01018-E | 250 mL | 2℃~8℃       |
| Motor Neuron Cryopreservation Medium F          | RP01018-F | 20 mL  | 2℃~8℃       |

\*各キットからは $1 \times 10^7$ 個の運動ニューロン前駆細胞 (DAY9、MNP) が得られます。

\*各キットは12ウェルプレートの4ウェル分または6ウェルプレートの2ウェル分のMNP分化 (DAY0-DAY9)、および12ウェルプレートの10ウェル分または24ウェルプレートの20ウェル分のMNP成熟 (DAY9-DAY30) に使用可能です。

- 2.1.1. Motor Neuron Differentiation Supplement A、B、C、D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3を参照し、バイオセーフティキャビネット内で滅菌済みピペットおよびピペットチップを用いて分化完全培地A/B/C/D (1×)を調製します。
- 2.1.3. 2.1.3.分化培地は調製後すぐに使用することを推奨します。4℃で保存し、2週間以内に使用してください。

**TIPS : Motor Neuron 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。凍結・融解は合計で2回までとします。**

表4: ヒト運動ニューロン分化キット完全培地の調製説明

| 種類                     | 組成                                                                            | 最終体積 |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| 分化完全培地<br>A/B/C/D (1×) | Motor Neuron Differentiation Supplement<br>A (20×) /B (25×) /C (50×) /D (50×) | 1×   |
|                        | Motor Neuron Differentiation Basal Medium E                                   |      |

## 2.2、ヒト多能性幹細胞由来運動ニューロンの分化

### 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> 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 0~4 : Neuroepithelial Progenitor (NEP) の分化

2.2.2.1. DAY 0 : hPSCが80~90%コンフルエンスに達した時点で、hPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget）を吸引除去し、2 mL/ウェルでDPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を添加し、軽く揺らして吸引廃除去します。

2.2.2.2. 1 mL/ウェルで予温した**Solase消化液**を添加し、溶液がウェル底面を完全に覆うようにした後、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで5~7分間インキュベートします。プレートを穏やかに動かして細胞を基質から完全に剥離させます。

2.2.2.3. 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10~15秒間遠心します。

2.2.2.4. 上清液を吸引除去し、1 mLのヒト運動ニューロン**分化完全培地A**を加えて細胞を再懸濁します。1~2回優しくピペッティングして単一細胞に分散させた後、細胞数を計測します。

2.2.2.5. Matrigelでコーティングした6ウェルプレートに3~5×10<sup>5</sup> cells/ウェルの密度で播種し、2 mL/ウェルのヒト運動ニューロン**分化完全培地A**（10 μMのBlebbistatinを含む）を添加します。

2.2.2.6. 37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。

2.2.2.7. 22~24時間培養後、細胞培地を吸引除去し、2 mL/ウェルのヒト運動ニューロン分化完全培地Aを添加し、37℃・5%CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで継続培養します（毎日培地交換）。

**TIPS : DAY 1とその後の培地交換では、分化完全培地AにBlebbistatinを添加しません。**

### 2.2.3. DAY 4~9 : Motor neuron Progenitor (MNP) への分化

2.2.3.1. DAY 4 : 培地を吸引除去し、2 mL/ウェルのヒト運動ニューロン**分化完全培地B**を添加し、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで継続培養します（DAY 4~9、毎日培地交換）。

### 2.2.4. DAY 9~12 : Post-mitotic motor neuron への分化

2.2.4.1. DAY 9 : 培地を吸引除去し、2 mL/ウェルでDPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を添加し、軽く揺らして吸引除去します。

2.2.4.2. 1 mL/ウェルの予温した**Solase消化液**を添加し、溶液がウェル底面を完全に覆うようにした後、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで8~12分間インキュベートします。軽くプレートを揺らして細胞を完全に剥離させます。

**Tips : 細胞が12分間で基質から完全に剥離しない場合、時間を18~20分間に延長可能です。20分を超えないでください。**

2.2.4.3. 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10~15秒間遠心します。

2.2.4.4. 上清を吸引除去し、1 mLの**分化完全培地C**を加えて細胞を再懸濁します。1~2回優しくピペッティングして単一細胞に分散させ、細胞数を計測します。

**TIPS : この時点のMNPは凍結保存可能です。1 mLのMotor Neuron Cryopreservation Medium Fを加えて細胞を凍結保存します。2×10<sup>6</sup>cells/管を推奨します。**

2.2.4.5. **Matrigel (2x)** または**Laminin**でコーティングした12ウェルプレートに $2 \sim 6 \times 10^5$  cells/ウェルの密度で播種し、1 mL/ウェルの**分化完全培地C** (10  $\mu$ Mの**Blebbistatin**含有) を添加します。

2.2.4.6. 37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。

2.2.4.7. 22～24時間培養後、細胞培地を吸引除去し、**分化完全培地C**を1 mL/ウェルで添加し、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで培養します (DAY9-12)。毎日培地を交換します。

**TIPS : Motor Neuronは接着性が弱いため、2x濃度のMatrigelで培養プレートをコーティングすることを推奨します。また、Day 10以降の培地交換は特に優しくし、Blebbistatinを除去してください。**

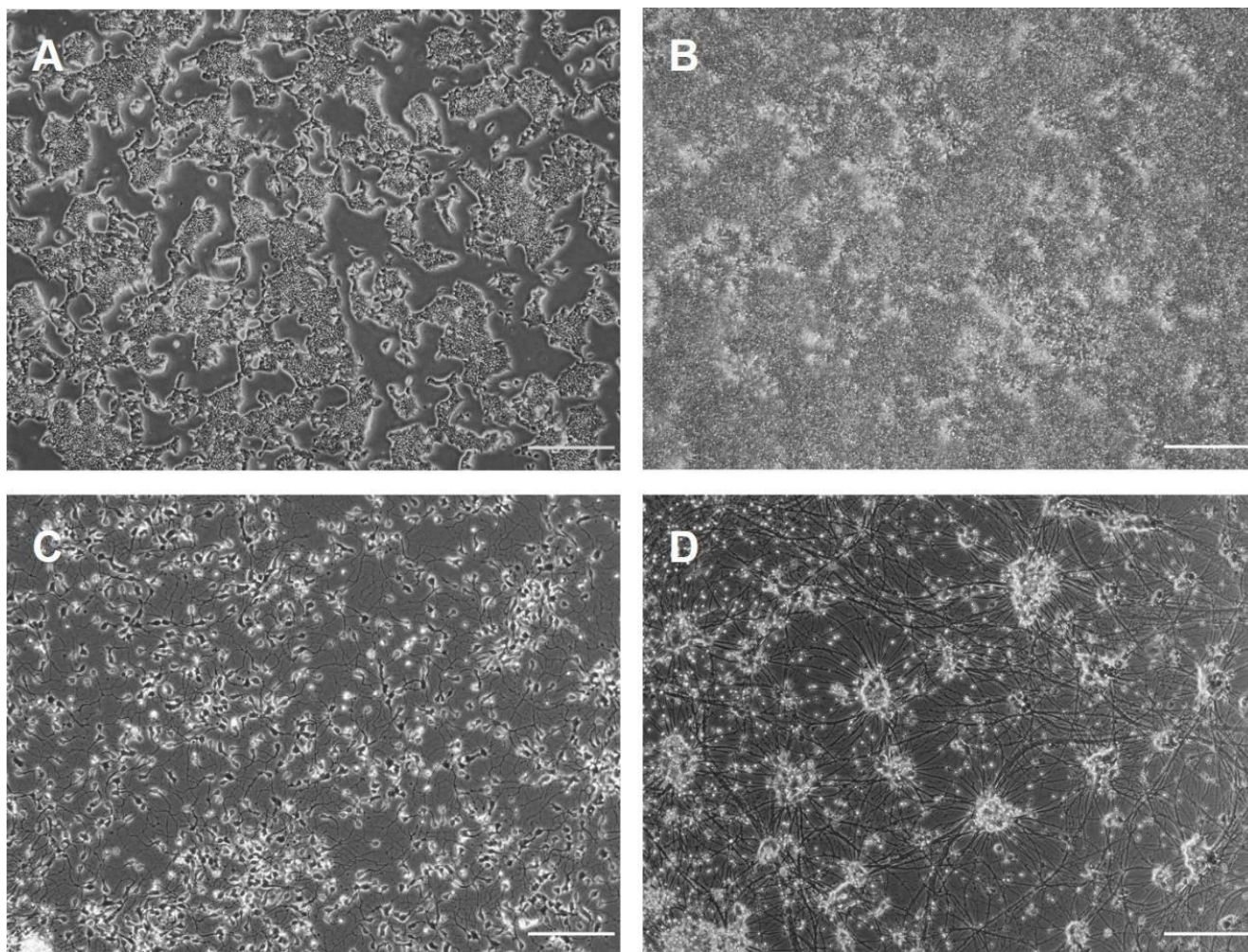
#### 2.2.5. DAY 12~35 : Motor neuron の成熟

2.2.5.1. DAY 12 ; 細胞培地を吸引除去し、**分化完全培地D**を1 mL/ウェルで添加し、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで培養します。1日おきに培地を交換します。

**TIPS : Motor Neuronは接着性が弱いため、培地交換は特に優しく行ってください。**

2.2.5.2. 培養DAY 30～35で成熟したMotor Neuronが得られます。関連検査を行うことができます。

2.2.5.3. 電気生理学的同定 : 電気生理学的検査を行う場合は、3日前から**運動ニューロン用電気生理学的培地 (RP01018-H)** で培養する必要があります。



hPSC-運動ニューロン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  $\mu$ m

図 A、B、C、Dはそれぞれ分化 4、9、12、30日目の細胞形態を示した。

### 三、hPSC-運動ニューロン前駆細胞の解凍と成熟培養

#### 3.1、試薬の準備

表5: hPSC-運動ニューロン前駆細胞培養に関連する製品システム

| 製品情報                                            | 品番        | 規格                | 保存条件        |
|-------------------------------------------------|-----------|-------------------|-------------|
| hPSC-運動ニューロン前駆細胞                                | RC01009   | 1×10 <sup>6</sup> | 液体窒素        |
| 運動ニューロン成熟培地*の内容物                                | RP01018-G | 1 Kit             |             |
| Motor Neuron differentiation Supplement C (50×) | RP01018-C | 1 mL              | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Supplement D (50×) | RP01018-D | 3×1 mL            | -20℃または-80℃ |
| Motor Neuron differentiation Basal Medium E     | RP01018-E | 200 mL            | 2℃~8℃       |

- 3.1.1. Motor Neuron Differentiation Supplement C、D は 4℃で解凍します。**37℃では解凍しないでください。**
- 3.1.2. 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C/D (1×)**を調製します。
- 3.1.3. 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Motor Neuron Differentiation Supplement C/Dを分注して凍結保存することが可能です。凍結・解凍は合計で2回までとします。**

#### 3.2、hPSC-運動ニューロン前駆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**または**Laminin**でコーティングした6ウェルプレートに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。
- 3.2.2 適量の**分化完全培地C**を準備し、1:1000 の割合で **Blebbistatin** (終濃度 10 μM) を加え、室温に戻します。
- 3.2.3 液体窒素タンクから1本の凍結保存された**hPSC-運動ニューロン前駆細胞**を取り出し、ドライアイスで細胞培養室に移動後、直ちに37℃のウォーターバスに浸し、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消失した時点で取り出します。
- 3.2.4 75%エタノール無塵紙で凍結保存管の表面を拭いた後、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15mL遠心管に移し、ピペットで10mLのDMEM/F12を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。178×gで5分間遠心します。
- 3.2.5 上清を除去し、予温した**分化完全培地C**を1mL加えて細胞を混和します。ピペッティングしないように注意します。適量の細胞を計数後、**Matrigel**または**Laminin**でコーティングした12ウェルプレートに**2~6×10<sup>5</sup> cells/ウェル**の密度で播種します。37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで水平方向に3回十字振りを行ない、培養します。
- 3.2.6 22~24時間培養後、細胞培地を吸引除去し、**分化完全培地C**を1mL/ウェルで加え、37℃・5% CO<sub>2</sub>・

飽和湿度のインキュベーターで3日間培養します。操作手順は **ステップ2.2.4**を参照可能です。

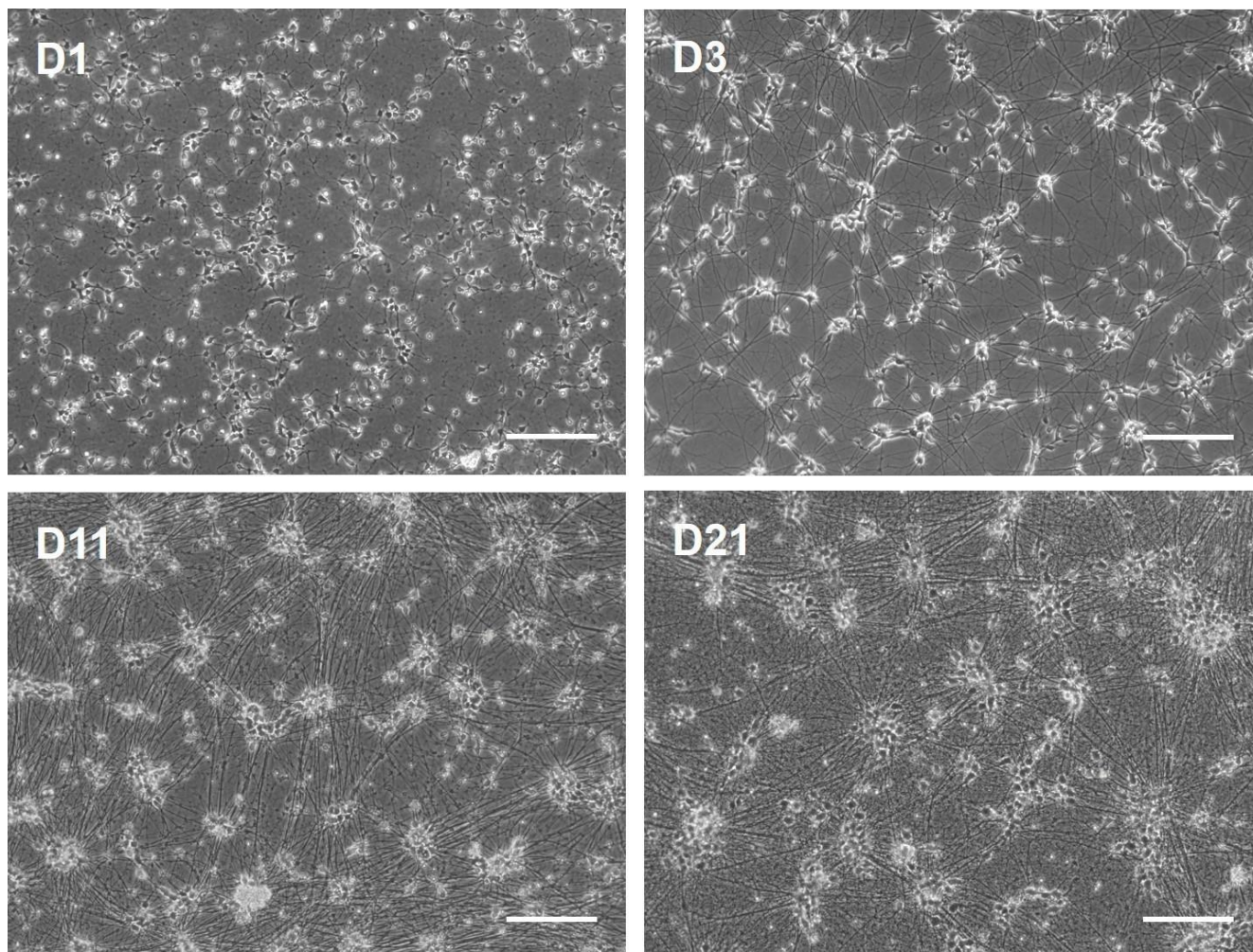
- 3.2.7 DAY 3 : 培地を吸引除去し、**分化完全培地D**を1mL/ウェルで加え、37℃・5% CO<sub>2</sub>・飽和湿度のインキュベーターで培養します。1日おきに培地を交換します。

**TIPS : Motor Neuronは接着性が弱いため、培地交換は特に優しく行い、Blebbistatinを除去してください。**

- 3.2.8 培養18~23日目 に成熟したMotor Neuronが得られます。関連同定を行うことができます。後続の検査測定のために**TrypLE**を用いて消化処理（37℃、10~15分間、15分間を超えないように注意）を行い、単一細胞に分散させます。

- 3.2.9 qPCRによる同定：少なくとも $2 \times 10^6$ 個の細胞を用いてRNAを抽出し、その後関連同定を行います。

- 3.2.10 電気生理学的同定：電気生理学的検査を行う際には、3日前から**運動ニューロン電気生理学専用培地 (RP01018-H)** で培養する必要があります。



hPSC-運動ニューロン前駆細胞解凍後 DAY1-DAY21における細胞形態

スケールバー : 200  $\mu$ m