

ドパミン神経前駆細胞分化プロトコル

ver.1.0

(2023.5.8)

ドパミン神経前駆細胞分化誘導（0日目）

1. 24-well plate を iMatrix-511 (1.9 μ L/well) でコーティングする。
2. iMatrix-511 コーティングしたプレートに 1mL の 8GMK+LAY 培地添加し、 1.0×10^6 cells/well の播種生細胞数で iPS 細胞を播種する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

培地交換（1,2 日目）

1. 必要量の 8GMK+LAFP 培地を調製する。
2. 1 mL/well の 8GMK+LAFP 培地で毎日培地交換する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

培地交換（3～6日目）

1. 必要量の 8GMK+LAFPC 培地を調製する。
2. 1.5 mL/well の 8GMK+LAFPC 培地で毎日培地交換する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

培地交換（7～11 日目）

1. 必要量の 8GMK+LC 培地を調製する。
2. 2 mL/well の 8GMK+LC 培地で毎日培地交換する。
3. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

中脳腹側細胞回収（12日目）と再播種および解析

1. 必要量の NB/B27+GABA+Y 培地を調製する。
2. Well の培地上清を除去し、1mL の PBS(-)を添加する。
3. PBS(-)を除去し、再度 1mL の PBS(-)を添加する。
4. PBS(-)を除去し、1mL の 0.5× TrypLE Select を添加する。
5. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内で 10-15 分間静置する。
6. マイクロピペット(P1000)を用いてピペッティングし、シングルセルにする。
7. 細胞懸濁液をチューブ（15 mL）に全量回収する。
8. 2mL の NB/B27+GABA+Y 培地で希釈する。
9. 190 × g , 4℃で 3 分間遠心する。
10. 上清を除去し、1mL の NB/B27+GABA+Y 培地で懸濁する。
11. 細胞懸濁液の中央部分から 10 μL をチューブ（1.5 mL）に分取し、10 μL のトリパンブルー溶液で染色した後、セルカウントを行う。
12. 2.0×10^4 cells/150 μL/well となるように 96-well plate へ再播種する。
13. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。
14. 残りの懸濁液について 200 × g 室温で 5 分間遠心する。
15. 上清を除去し、1 mL の 4%PFA を添加し、室温で遮光して 15 分間静置する。
16. 400 × g 室温で 3 分間遠心する。
17. 上清を除去し、1 mL の FCM Buffer を添加する。
18. 測定まで遮光して 4℃で保存する。

19. FCM で CORIN 陽性細胞を測定する。

培地交換（15日目以降）

1. 15日目以降2日おきに半量ずつ培地交換を行う。
2. 必要量のNB/B27+GABA培地を調製する。
3. スフェアを吸わないよう注意して上清を65 μ L除去する。
4. 75 μ LのNB/B27+GABA培地を添加する。
5. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）で培養する。

ドパミン神経細胞の回収（26日目）と評価

1. チューブ（1.5 mL）にスフェアを回収する。
2. 1mL の PBS(-)を添加する。
3. PBS(-)を除去し、再度 1mL の PBS(-)を添加する。
4. PBS(-)を除去し、1mL の 0.5× TrypLE Select を添加する。
5. CO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内で 10-15 分間静置する。
6. マイクロピペット(P1000)を用いてピペッティングし、シングルセルにする。
7. 細胞懸濁液をチューブ（1.5 mL）に全量回収する。
8. 190 × g , 4℃で 3 分間遠心する。
9. 上清を除去し、1mL の FACS buffer で懸濁する。
10. 細胞懸濁液の中央部分から 10 μL をチューブ（1.5 mL）に分取し、10 μL のトリパンブルー溶液で染色した後、セルカウントを行う。
11. 200 × g 室温で 5 分間遠心する。
12. 上清を除去し、1 mL の 4% PFA を添加し、室温で遮光して 15 分間静置する。
13. 400 × g 室温で 3 分間遠心する。
14. 上清を除去し、1 mL の FACS Buffer を添加する。
15. 測定まで遮光して 4℃で保存する。
16. FACS で FOXA2 と Tuj 1 の両陽性細胞を測定する。

試薬と調整方法

試薬については SDS（安全性データシート）を入手し、試薬の取扱い方法を理解し使用する。

試薬一覧表

試薬名	メーカー	型番
GMEM (1×), liquid + L-Glutamine-TPB	Life Technologies	11710
KSR	Life Technologies	10828
ピルビン酸ナトリウム溶液, 100 mM,	SIGMA	S8636
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×)	Life Technologies	11140
StemSure® 10mmol/l 2-メルカプトエタノール溶液	Wako	198-15781
NEUROBASAL® Medium (1×), liquid - L-Glutamine	Life Technologies	21103-049
B-27 Supplement (50×) without vitamin A	Life Technologies	12587-010
Cell Therapy Systems GlutaMAX™- I CTS (TM) (100×) 200 mM	Life Technologies	A12860-01
CultureSure® 10mmol/l Y-27632 溶液、動物由来物フリー	Wako	039-24591
LDN-193189	REPROCELL	04-0074
A-83-01	Wako	039-24111
線維芽細胞成長因子 8、ヒト、組換え体、動物由来物フリー	Wako	067-06231
パルモルファミン	Wako	166-23991
CHIR99021	Wako	034-23103
グリア細胞株由来神経栄養因子、ヒト、組換え体、動物由来物フリー	Wako	070-06261
脳由来神経栄養因子、ヒト、組換え体、動物由来物フリー	Wako	028-16451
アスコルビン酸注射液 500mg「トローワ」	東和薬品	-
アクトシン注射用 300mg	第一三共	-
DMSO	SIGMA	D2438

Water	SIGMA	W3500
Monoclonal Anti-CORIN, clone 5B6 antibody produced in mouse, purified immunoglobulin	SIGMA	WH0010699M1
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	A11001
FOXA2 antibody (goat)	R&D	AF2400
Alexa 647 anti-goat IgG	Thermo	A21447
Alexa Fluor 488 mouse anti- β -Tubulin, Class III	BD	560381

LDN-193189

- LDN-193189 粉末を DMSO で 1mM となるように調製する。

A-83-01

- 1.A-83-01 粉末を DMSO で 5mM となるように調製する。

FGF8

- 線維芽細胞成長因子 8、ヒト、組換え体、動物由来物フリー粉末を Water で 100 μ g/mL となるように調製する。

パルモルファミン

- パルモルファミン粉末を DMSO で 10mM となるように調製する。

CHIR99021

- CHIR99021 粉末を DMSO で 3mM となるように調製する。

GDNF

1. グリア細胞株由来神経栄養因子、ヒト、組換え体、動物由来物フリー粉末を Water で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製する。

BDNF

1. 脳由来神経栄養因子, ヒト, 組換え体, 動物由来物フリー粉末を Water で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製する。

アスコルビン酸

1. アスコルビン酸注射液 500mg「トーフ」粉末を Water で 200mM となるように調製する。

dbcAMP

1. アクトシン注射用 300mg 粉末を Water で 400mM となるように調製する。

8GMK 培地 約 562mL

GMEM 500 mL

KSR 45 mL

ピルビン酸ナトリウム溶液 5.5 mL

MEM Non-Essential Amino Acids Solution 5.5 mL

2-メルカプトエタノール溶液 5.5 mL

NB/B27 培地 約 515mL

NEUROBASAL® Medium 500 mL

B-27 Supplement (50×) without vitamin A 10 mL

GlutaMax 5.1 mL

8GMK+LAY 培地 約 1mL

8GMK 培地 1 mL

LDN-193189 0.1 μL

A-83-01 0.1 μL

Y-27632 1 μL

8GMK+LAFP 培地 約 1mL

8GMK 培地 1 mL

LDN-193189 0.1 μL

A-83-01 0.1 μL

FGF8	1 μ L
パルモルファミン	0.2 μ L

8GMK+LAFPC 培地	約 1 mL
---------------	--------

8GMK 培地	1 mL
LDN-193189	0.1 μ L
A-83-01	0.1 μ L
FGF8	1 μ L
パルモルファミン	0.2 μ L
CHIR99021	1 μ L

8GMK+LC 培地	約 1 mL
------------	--------

8GMK 培地	1 mL
LDN-193189	0.1 μ L
CHIR99021	1 μ L

NB/B27+GABAY 培地	約 1 mL
-----------------	--------

nb/b27 培地	1 mL
GDNF	1 μ L
BDNF	0.2 μ L
アスコルビン酸	1 μ L
dbcAMP	1 μ L

Y-27632

1 μ L

NB/B27+GABAY 培地

約 1 mL

NB/B27 培地

1 mL

GDNF

1 μ L

BDNF

0.2 μ L

アスコルビン酸

1 μ L

dbcAMP

1 μ L

参考文献

本プロトコルは、京都大学 iPS 細胞研究所 土井大輔先生のご指導に従い、下記論文を参照して作成しました。詳細については、下記をご確認下さい。

- 1) Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J.

Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease.

Nat Commun. 2020 Jul 6;11(1):3369. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>

- 2) Doi D, Kikuchi T, Morizane A, Takahashi J.

Clinically compatible differentiation protocol for human pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells.

Protoc. Exch. 2020 July 06. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-954/v1>