

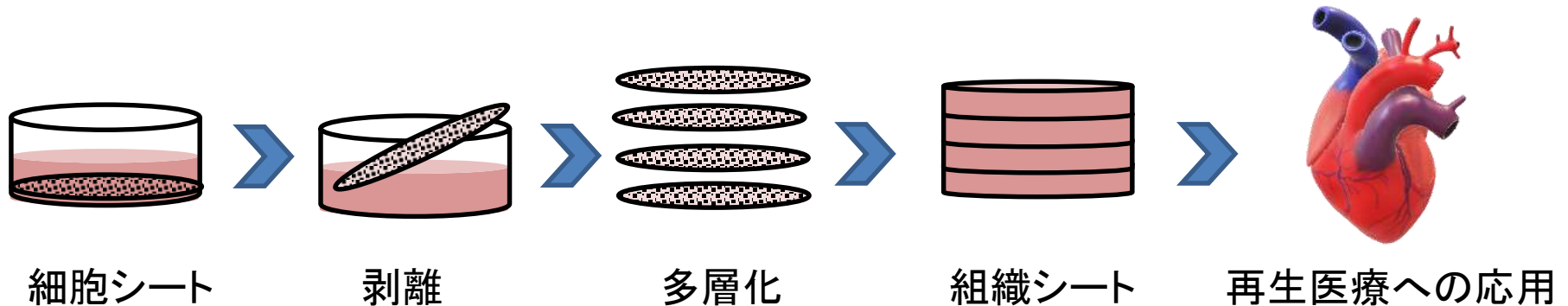
温度感受性表面改質共重合体を利用した 細胞シートの作製とその応用

福岡大学 薬学部
免疫・分子治療学
助教 櫛川 舞

再生医療における細胞シート作製技術の必要性

細胞シート技術は身体のどの部位の細胞（細胞ソース）からも作製することが可能な再生医療のプラットフォーム（基盤）技術と考えられている。

細胞シートは、積層化により厚みのある組織・臓器の作製も可能であり、新たな再生医療技術として期待されている。



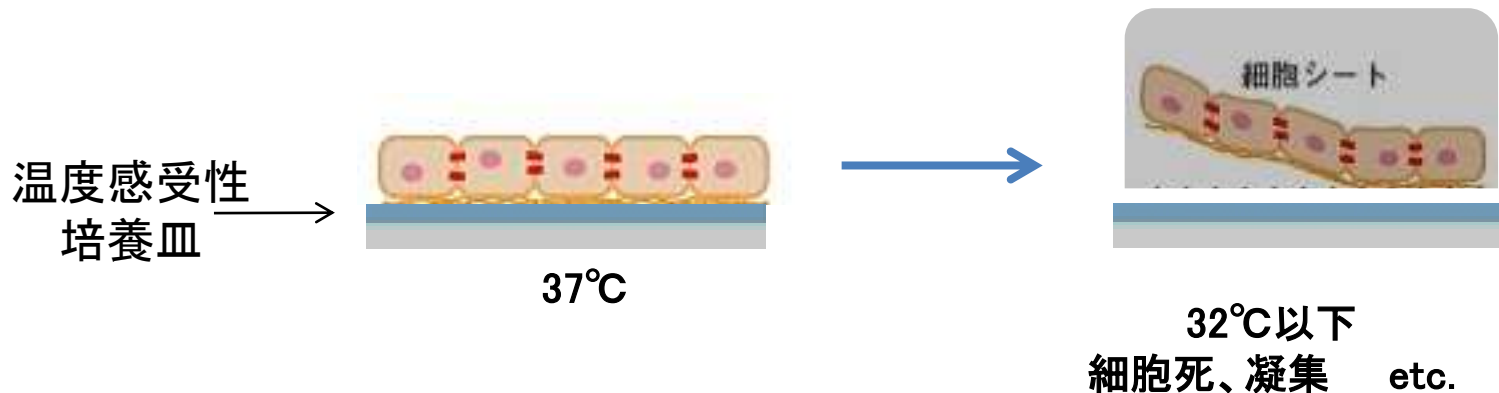
細胞シート作製は、細胞本来の機能を維持したまま、細胞をシート状に細胞支持体より剥離するかが重要である。

従来法とその問題点

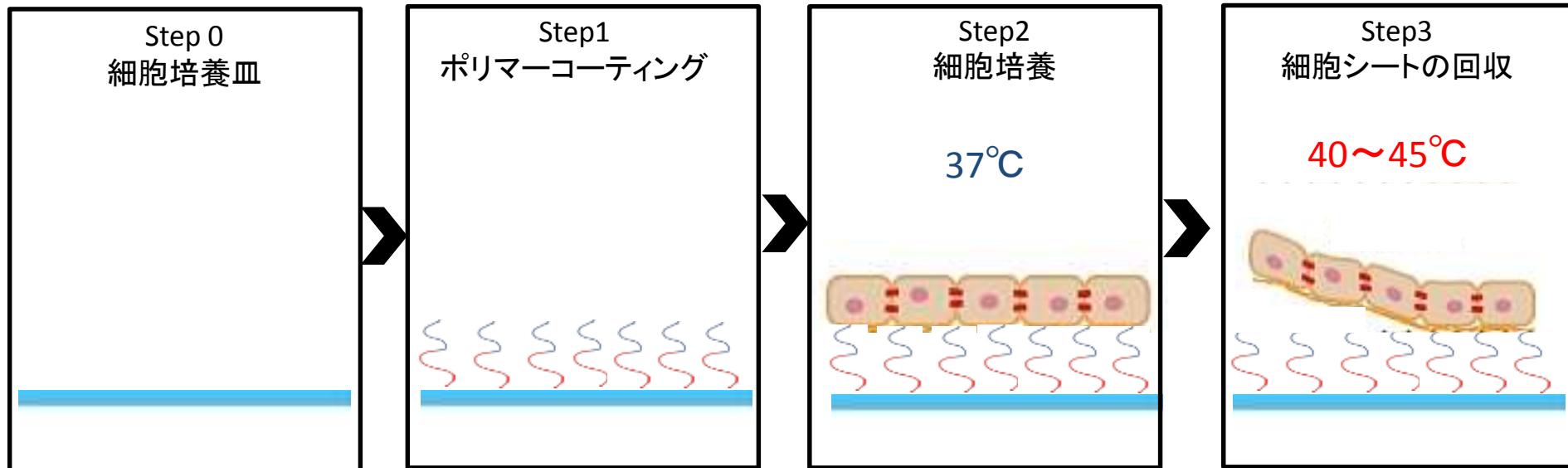
問題点①トリプシン等のタンパク分解酵素処理によって細胞回収する場合、細胞間接着まで分解されてしまう。



問題点②温度感受性培養皿を使用する場合32℃以下に温度を下げる必要があり、細胞に低温負荷を与えてしまう。

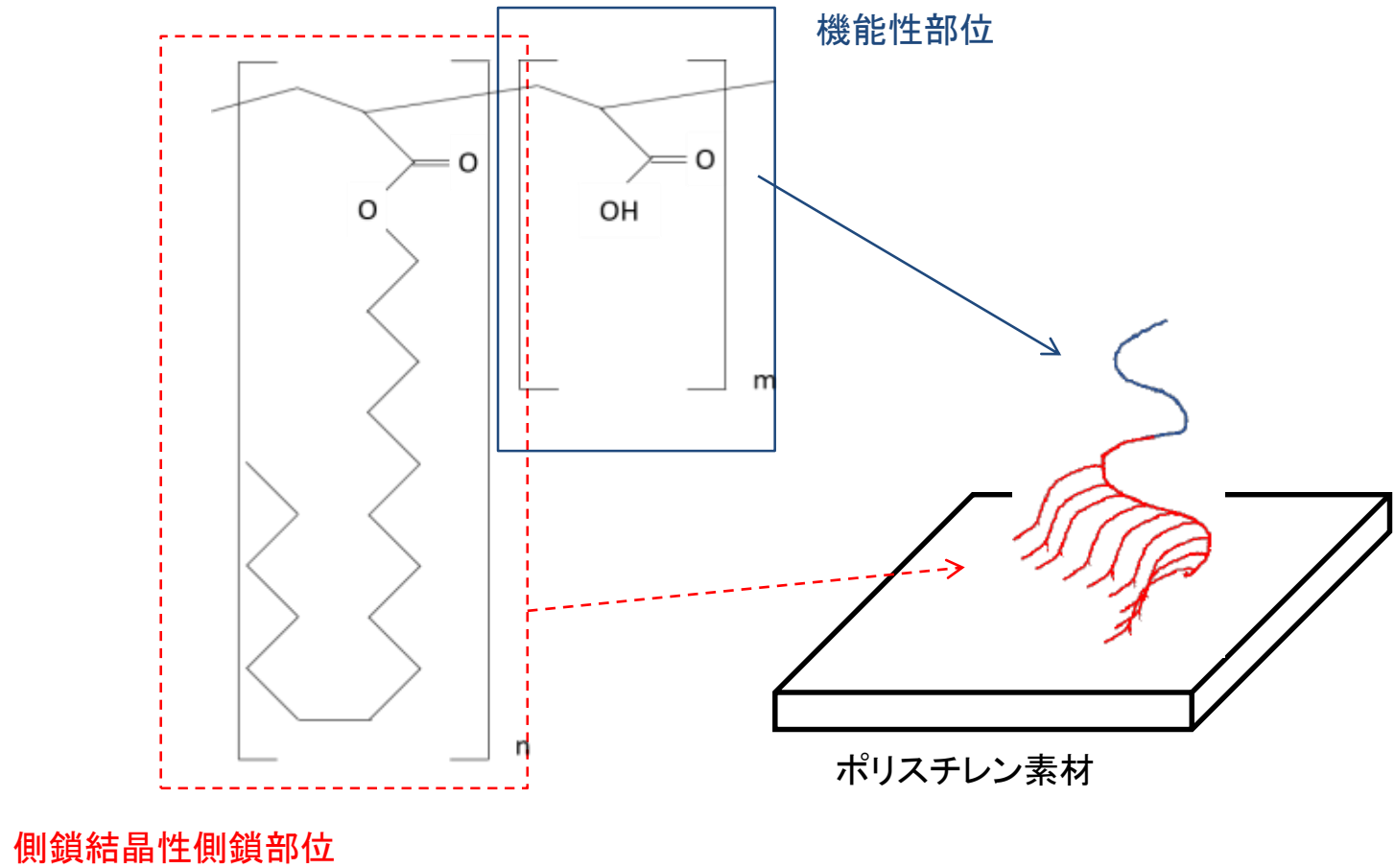


本発明の特徴



- 特殊な培養皿を必要とせず、タンパク分解酵素処理不要で、細胞シートを回収することができる。
- 温度を下げる必要がないため、細胞に低温負荷がかからない。

ポリマー(温度感受性表面改質共重合体)の構造式



検討項目

検討1 ポリマーコーティングにより親水性が高まる

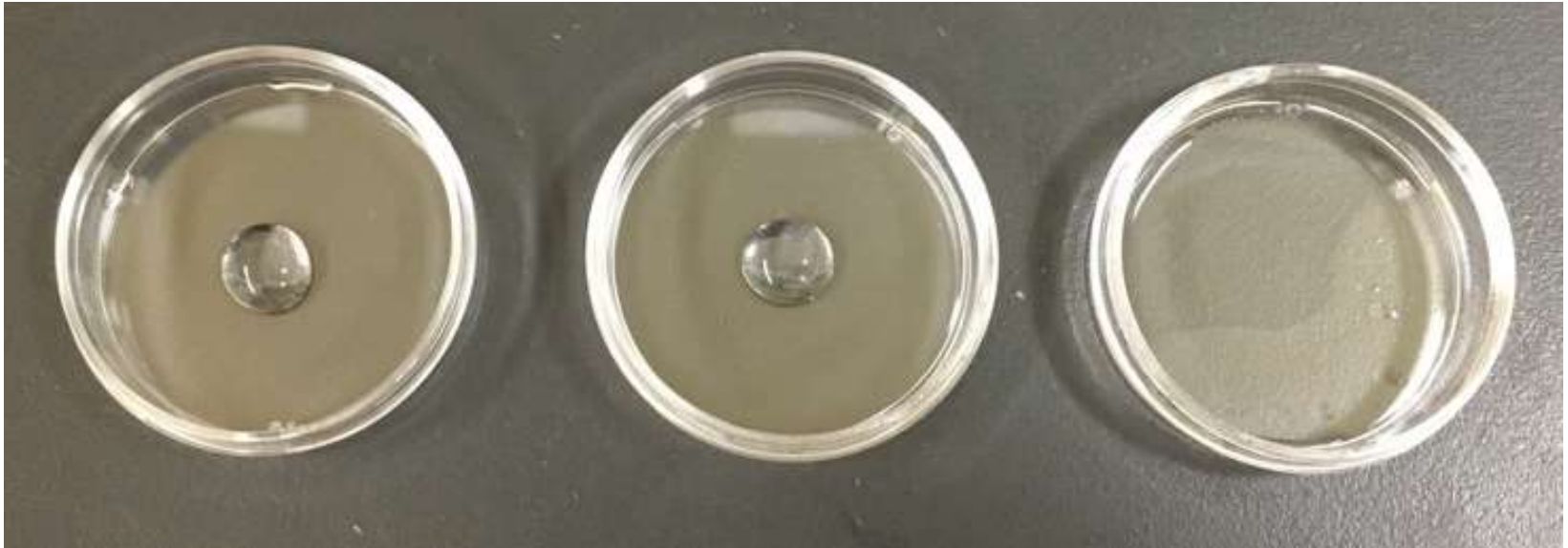
検討2 ポリマーコーティングは細胞増殖速度を促進する

検討3 45℃で細胞シートが剥離する

検討4 ポリマーは細胞シートに付着しない

検討5 剥離後の細胞シートは再生着・増殖が可能である

検討1 ポリマーコーティングにより親水性が高まる



ポリマー処理なし

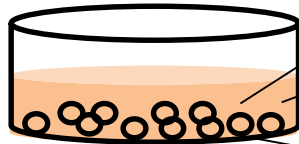
溶媒処理あり

ポリマー処理あり

ポリマーコーティングは、培養皿の表面張力を低下させた(親水性の向上)。

検討2 ポリマーコーティングは細胞増殖速度を促進する

<実験スケジュール>



<細胞株>

NA(ヒト舌がん由来扁平上皮がん)

<培地>

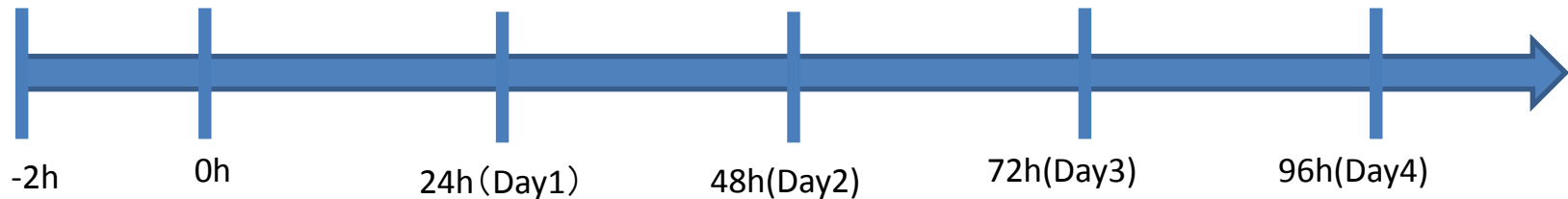
10% FCS + DMEM

<plate>

35mm dish non-treatment (ポリスチレン素材)

コーティング Cell seeding
0.05% ポリマー※ 3×10^5 cells/dish
1.5mL/dish

45°C, 振とう, 60min



※ポリマー

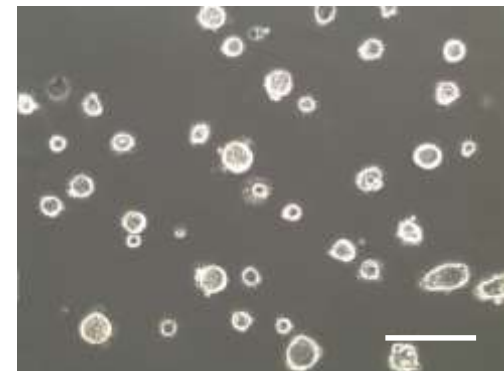
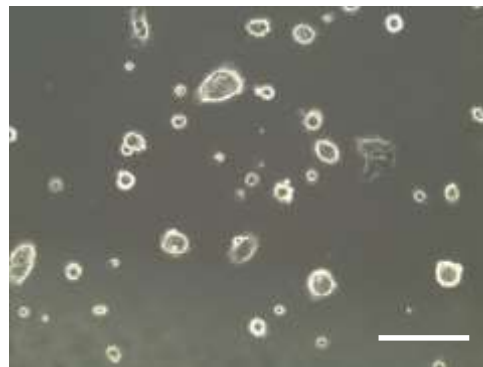
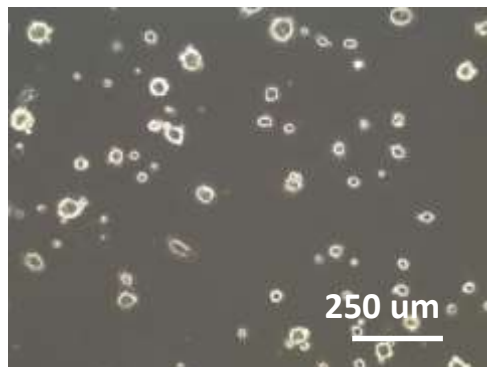
ステアリルアクリレート: アクリル酸 = 3:7(モル比) in DMSO

24h (Day1)

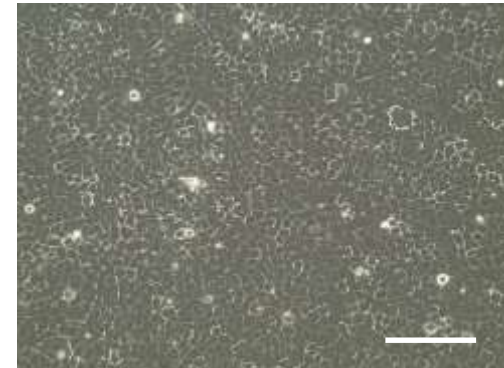
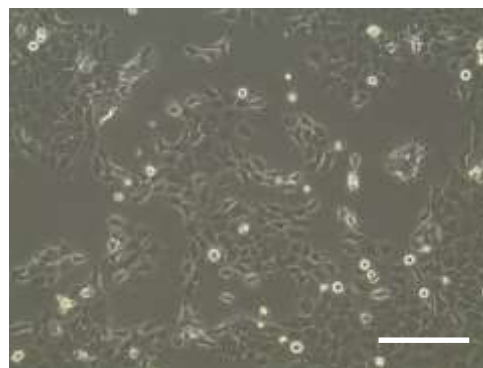
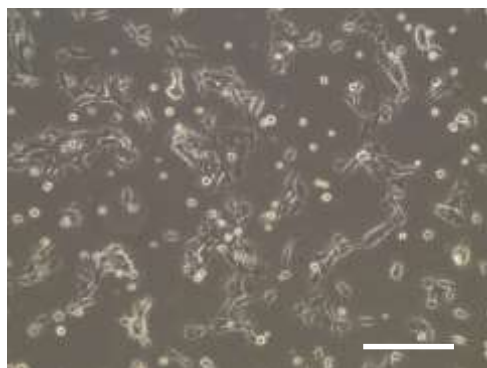
48h (Day2)

72h (Day3)

ポリマー
処理(-)



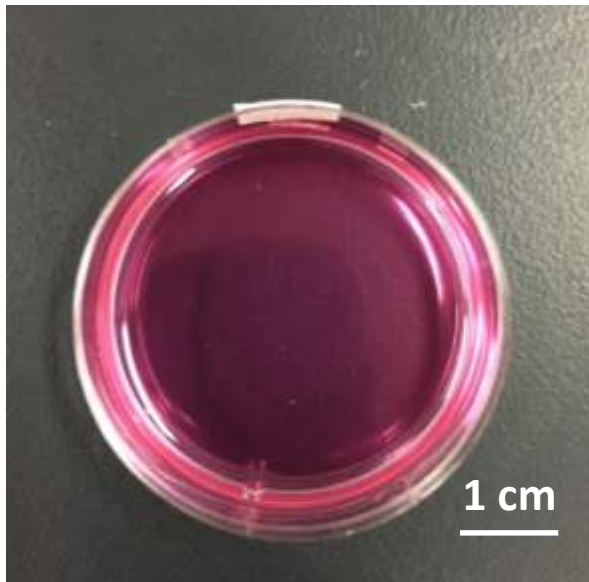
ポリマー
処理(+)



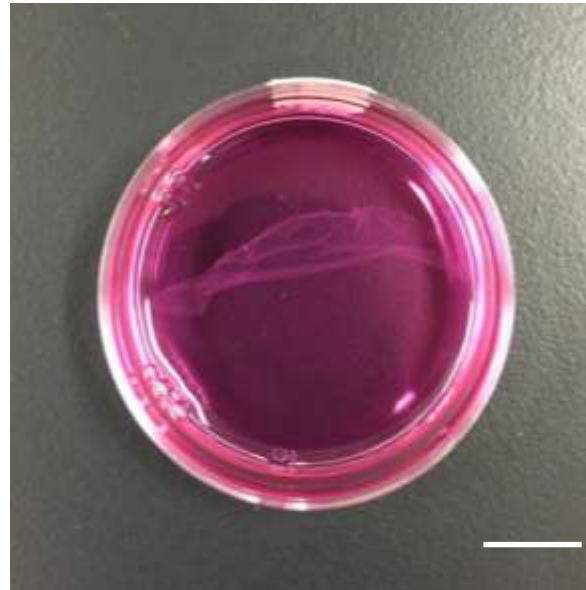
ポリマー処理を施すと、細胞は一層のシート状に広がり、細胞増殖速度も促進された。

検討3 45℃で細胞シートが剥離する

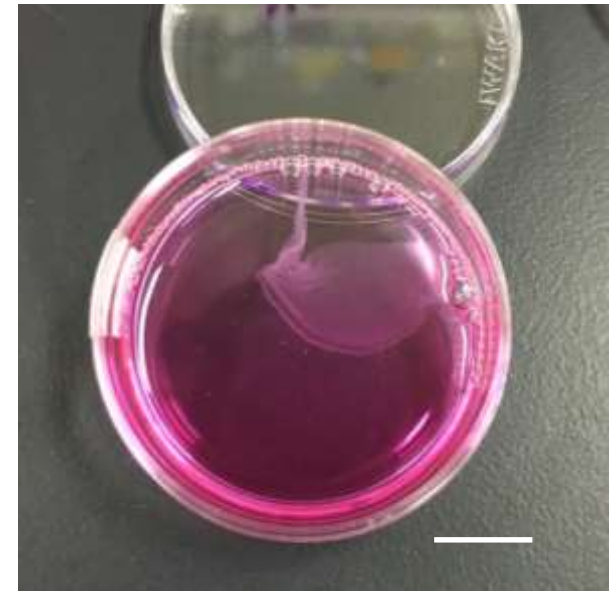
37℃
(ポリマー処理あり)



45℃ 30min振とう
(ポリマー処理あり)

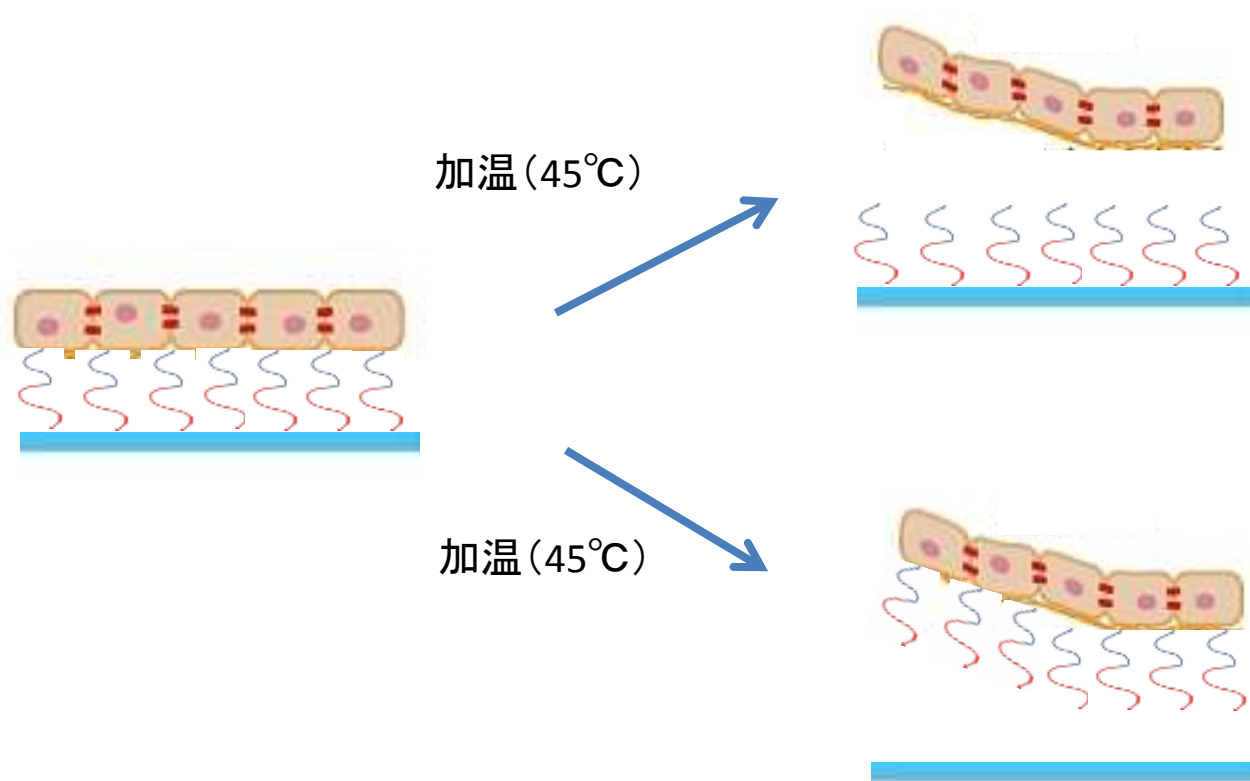


45℃ 60min振とう
(ポリマー処理あり)



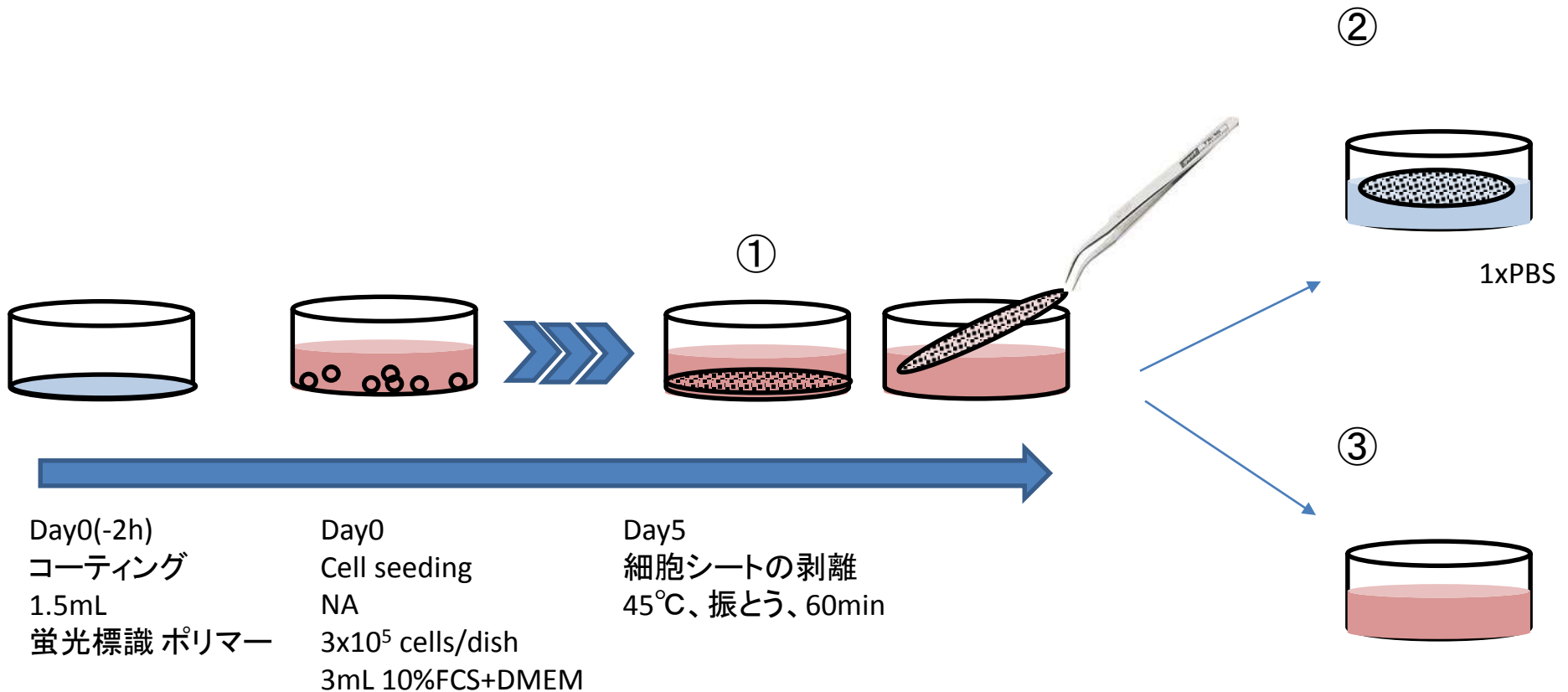
ポリマー処理後に細胞培養を行い、加温(45℃)・振とうすることで、細胞シートが剥離した。

細胞シート剥離後のポリマーの所在は？

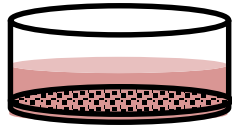


検討4 ポリマーは細胞シートに付着しない

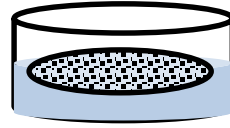
<実験スケジュール>



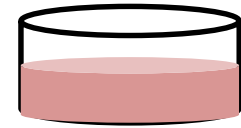
検討4 ポリマーは細胞シートに付着しない



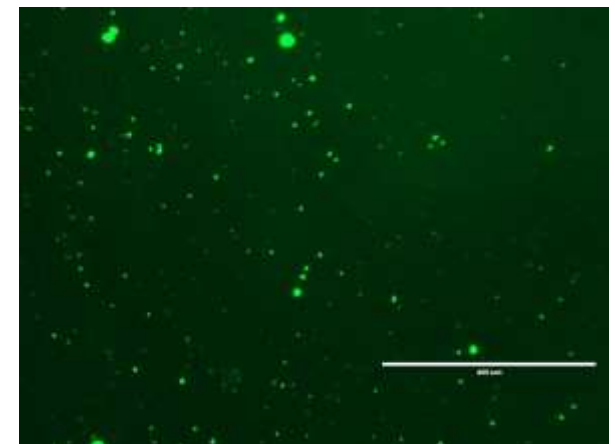
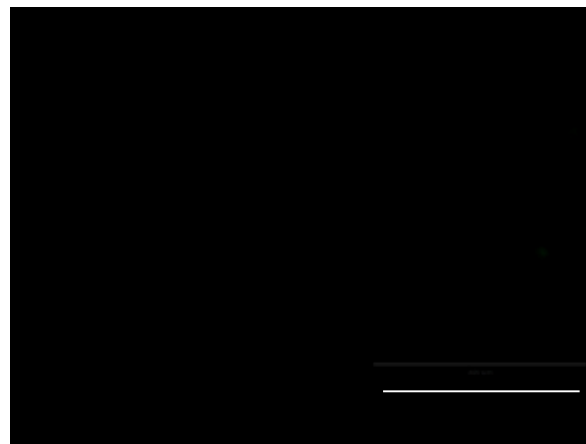
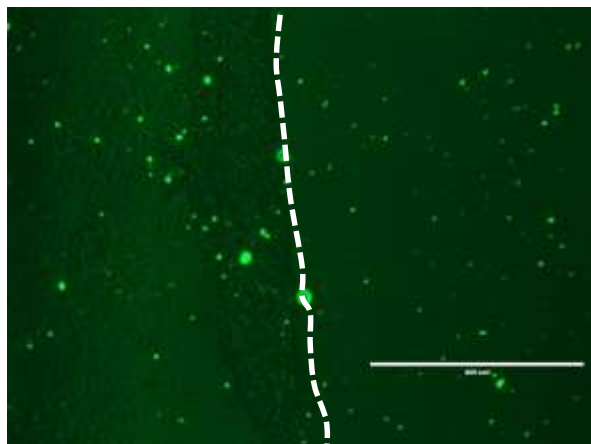
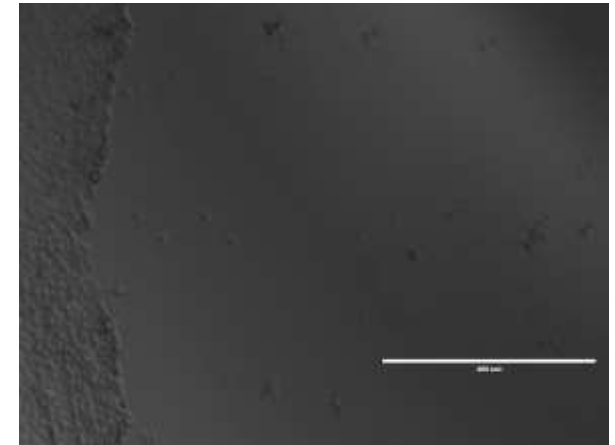
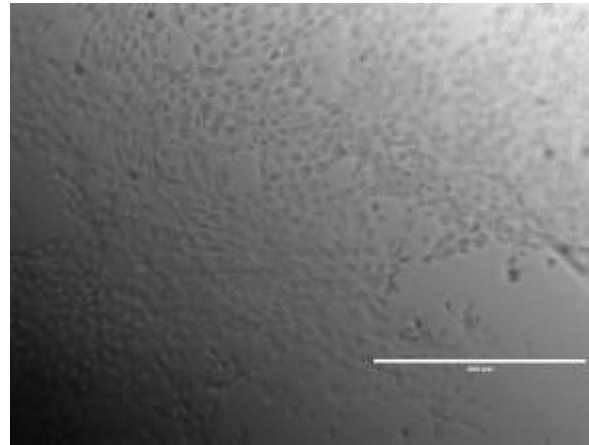
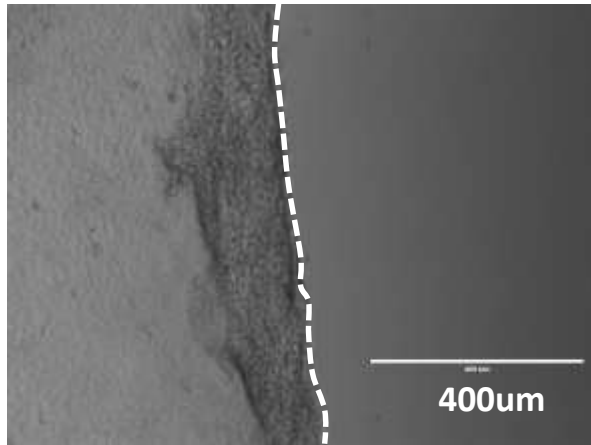
①剥離前



②剥離後の細胞シート

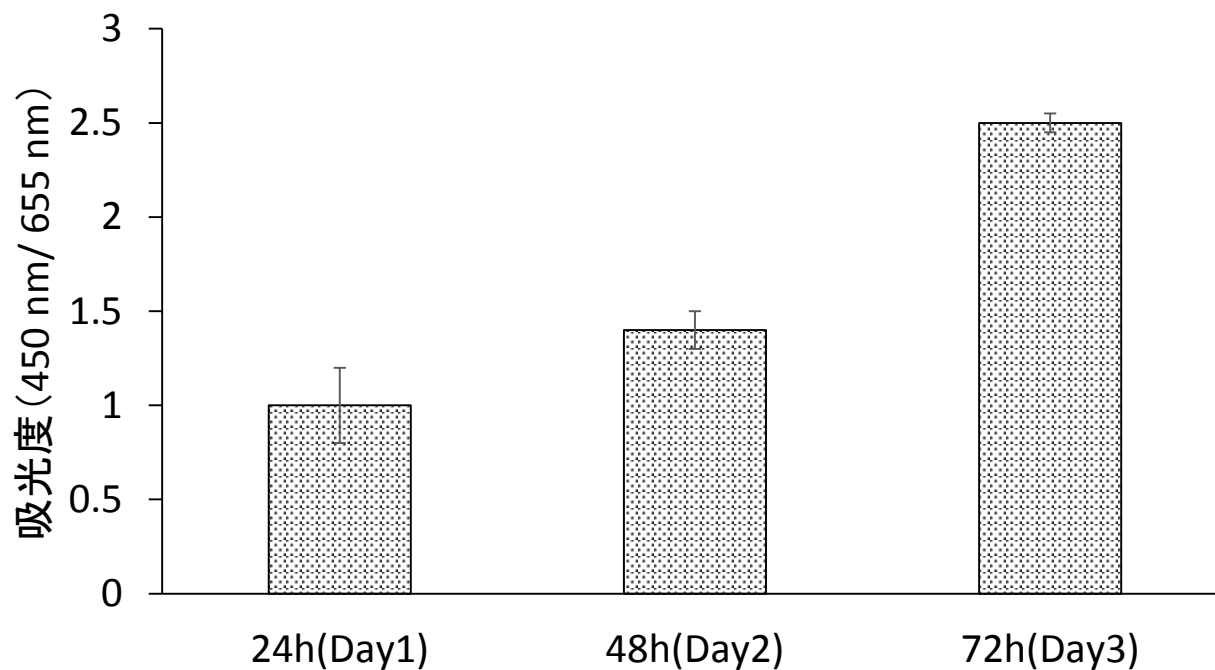
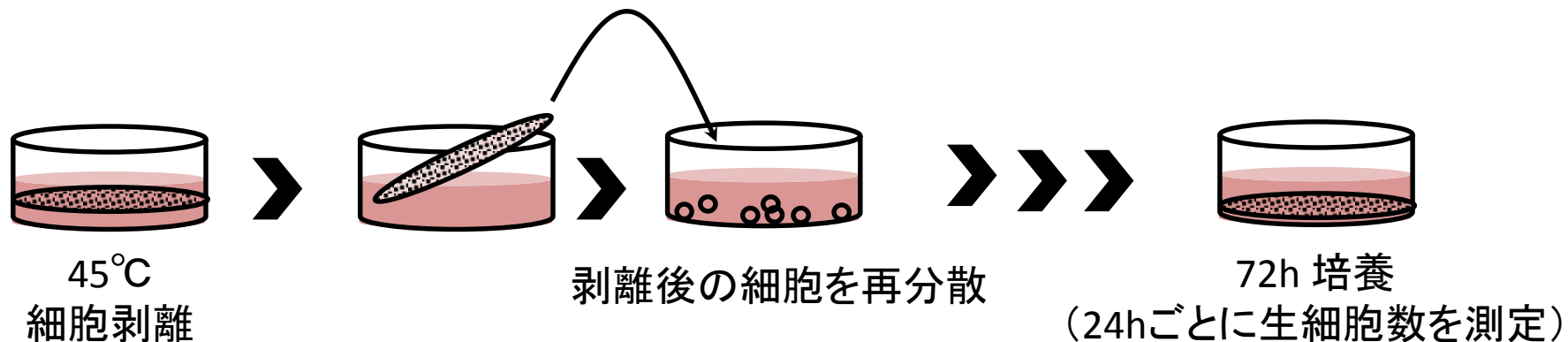


③剥離後の細胞培養皿



ポリマーは、細胞シートではなく、培養皿に残っていた。

検討5 剥離後の細胞シートは再生着・増殖が可能である



剥離した細胞は、再度培養皿に付着・増殖した。

結論

- 1) ポリマー処理は、ポリスチレン素材の培養皿において、培養皿表面の親水性を向上させ、細胞増殖を促進した。
- 2) 培養した細胞は、酵素を用いることなく、45℃での振とうだけでシート状に剥離することが可能であった。
- 3) ポリマーは培養皿に残っており、シートには付着していなかった。
- 4) 剥離後の細胞シートは、再度培養皿に接着・増殖した。

企業への期待

- 未解決の40℃以下の剥離温度条件については、共重合体の合成条件の設定により克服できると考えている。
- 細胞培養器具や細胞支持体の製品化が可能な企業との共同研究を希望する。
- 細胞シート作製に関する装置や器具を開発中の企業、再生医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。
- 本技術は、様々な細胞株における細胞シート(具体的には、褥瘡シート、心筋シート等)、多層構造細胞シート、組織シートへの展開も可能である。さらに本技術は、血液サンプルからの接着細胞の分離、または酵素処理の影響を受けない環境下での細胞表面接着分子の解析への応用(検査・研究分野)も可能である。

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : 細胞シートの製造方法及び細胞培養支持体
出願番号 : 特願2017-246221
出願人 : 学校法人福岡大学
発明者 : 中島 学、櫛川 舞、八尾 滋、中野 涼子、
新戸 浩幸、瀬戸 弘一

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター
担当コーディネーター 芳賀 慶一郎

TEL : 092-871-6631 (ext.2809)

FAX : 092-866-2308

E-mail : sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp