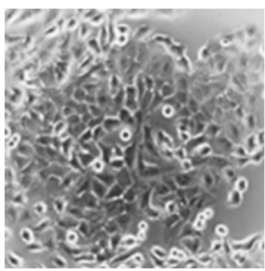
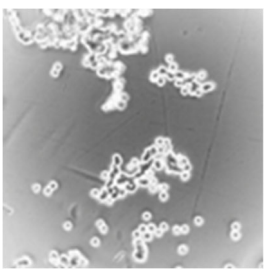
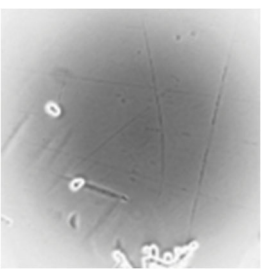
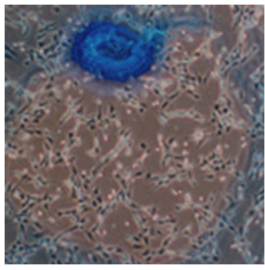
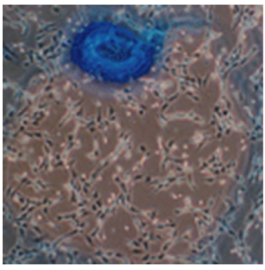
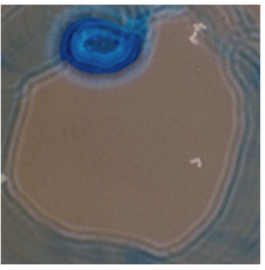
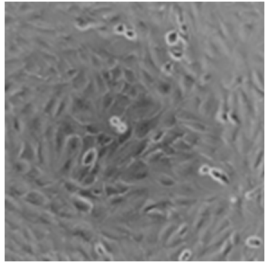
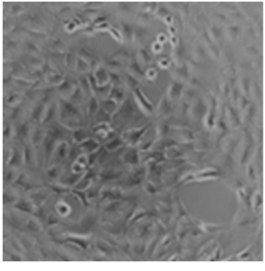
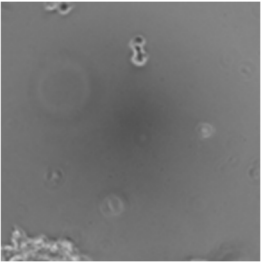
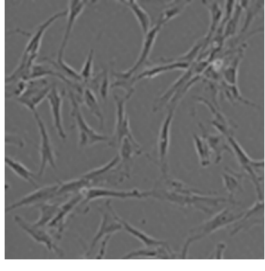
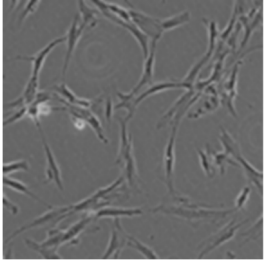
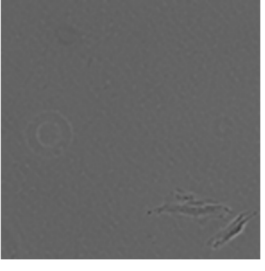
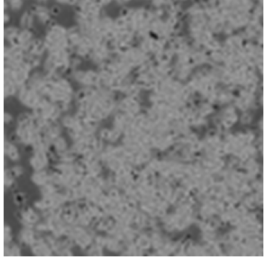
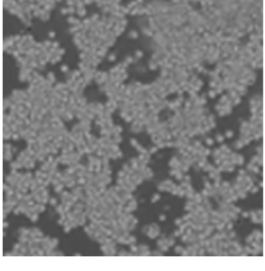
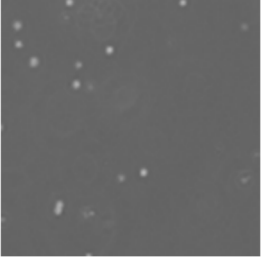


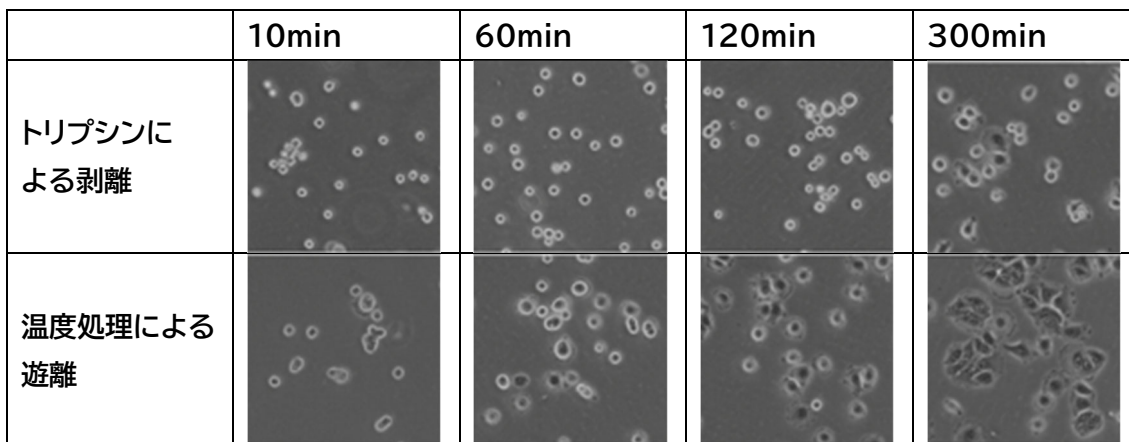
## 温度応答性細胞培養器材 RepCell®・UpCell® データ集

1. 温度処理による細胞の遊離
2. 剥離後、再播種された A549 の再付着性
3. 剥離手法の違いによる E-カドヘリンのイムノブロット比較
4. 剥離手法の違いによるフローサイトメトリー比較
5. 剥離手法の違いによるマクロファージの回収比較
6. 剥離後、再播種されたマクロファージの再付着性
7. マクロファージ用シングルセル回収プロトコル
8. 樹状細胞用シングルセル回収プロトコル
9. CellShifter™ を使用した細胞シートの回収とトランスファープロトコル (3.5cmUpCell®)
10. 細胞シートの移植アプリケーション例
11. 細胞シートの積層化アプリケーション例
12. 接着力の違いを利用した細胞分離例
13. UpCell®を用いた ECM コーティング推奨濃度
14. UpCell®を用いた分化誘導実験実績

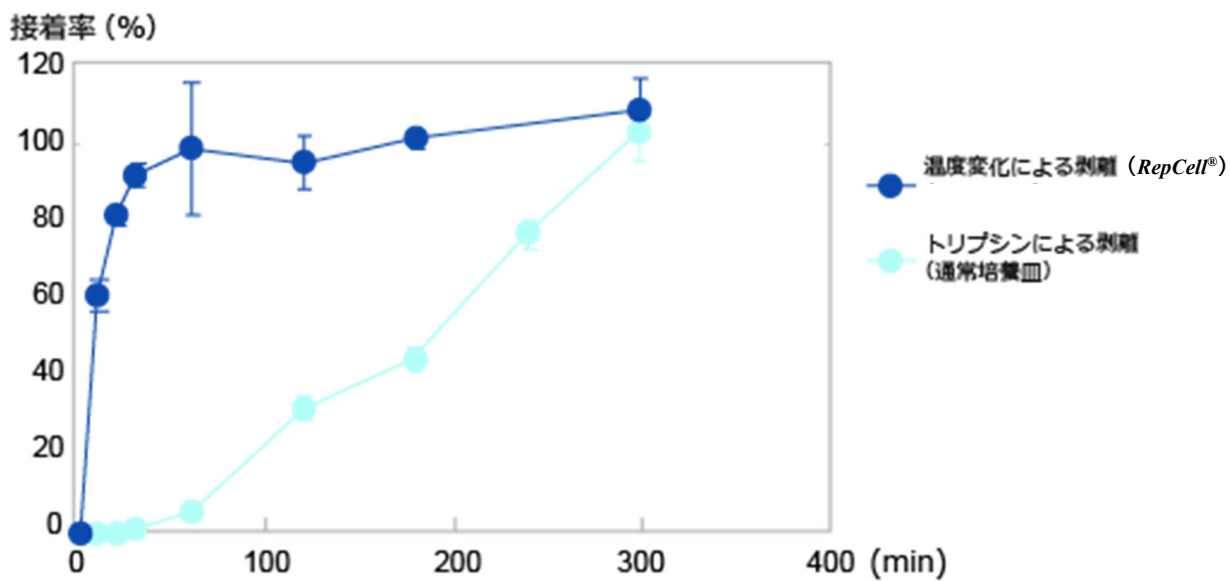
## 1. 温度処理による細胞の遊離

	培養時(37°C)	温度処理後 30 分 (20°C)	ピペットによる攪拌 後
A549			
Swiss 3T3			
NRK			
間葉系幹細胞			
マウス腹マクロファージ			

## 2. 剥離後、再播種された A549 の再接着性

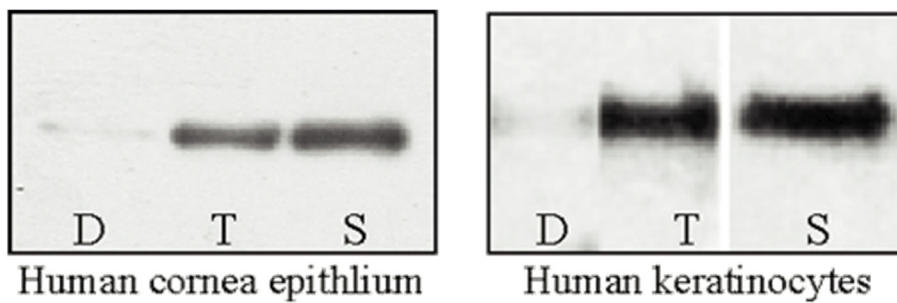


### 剥離後、再播種された A549 の再接着性



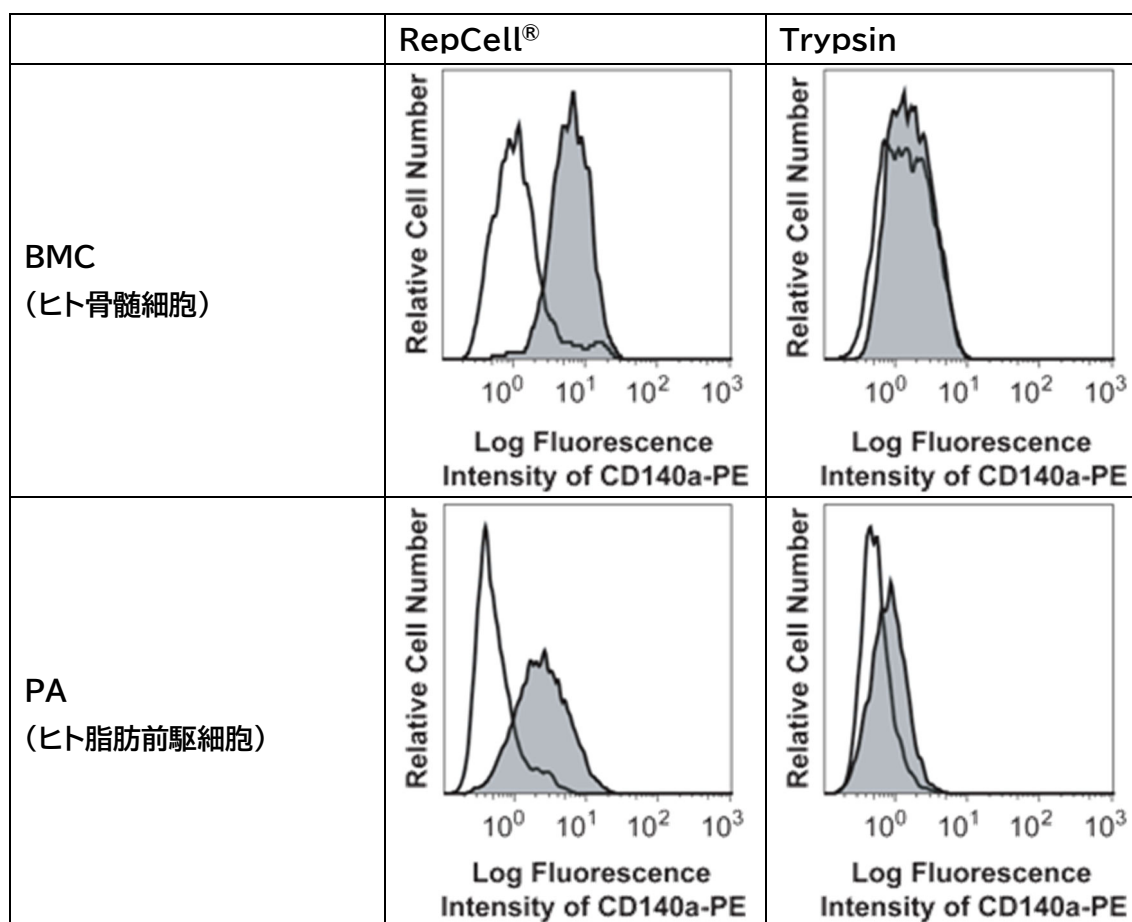
### 3. 剥離手法の違いによる E-カドヘリンのイムノブロット比較

剥離手法の違いによる E-cadherin ブロット比較



D:ディスパーゼによる剥離 T:低温処理による剥離(RepCell<sup>®</sup>使用) S:スクレーパーによる剥離

#### 4. 剥離手法の違いによる E-カドヘリンのイムノブロット比較



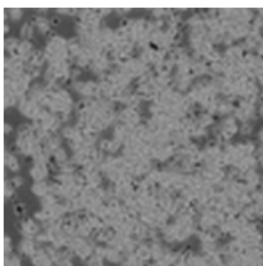
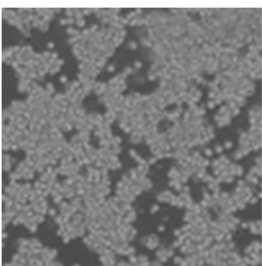
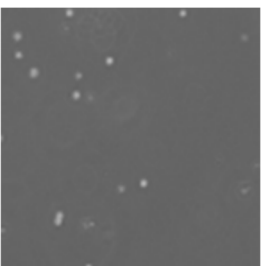
#### 測定条件

- RepCell®及び通常細胞培養用ディッシュに上記細胞を  $6.8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種して 24 時間培養した。  
RepCell®: 温度処理(20℃、30 分)により細胞を回収した。  
Trypsin: Trypsin 処理(37℃、3 分)により細胞を回収した。
- 回収した細胞を PE 標識抗体と 4℃、1 時間インキュベート後、FC500(BeckmanCoulter) でフローサイトメトリー解析を行った。

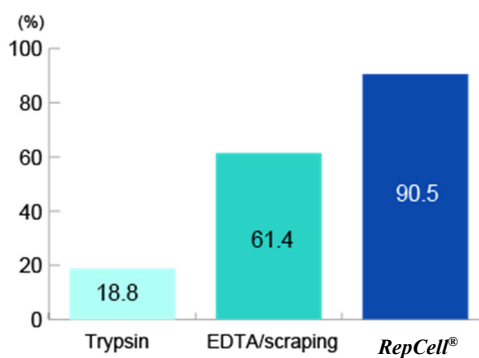
#### 抗体

- D140a(PDGFR $\alpha$ )-PE:Pharmingen,556002, $\alpha$ R1, Ab1 $\mu$ g/2.5 $\times 10^5$ cells/0.2mL 1%FBS-PBS,
- Mouse IgG2a-PE(Isotype control):Pharmingen, 5592529, MPC-11, Ab 1 $\mu$ g/2.5 $\times 10^5$  cells/0.2mL 1%FBS-PBS,

## 5. 剥離手法の違いによるマクロファージの回収比較

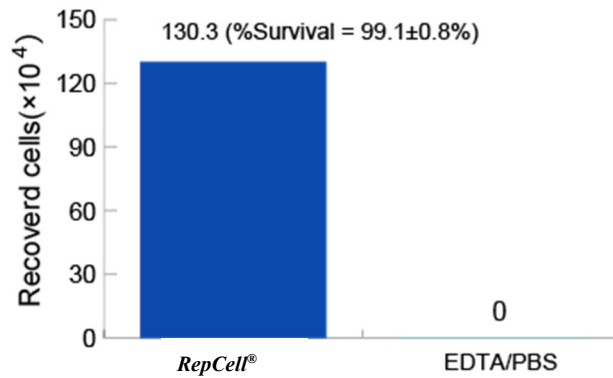
	培養時(37℃)	温度処理後 30 分 (20℃)	ピペットによる攪拌 後
マウス 腹腔浸出性 マクロファージ の回収			

マウス腹腔浸出性マクロファージの回収率



1. マウス腹腔浸出性マクロファージを RepCell®及び細胞培養用ディッシュに  $5 \times 10^6$  個を播種
2. 2 時間培養後、浮遊細胞を回収し、PBS で洗浄
3. 2 日間培養後、PBS に置換し、温度処理(氷冷、5 分)、トリプシン処理及び 2.5ml EDTA/スクレーピング処理により回収率を測定。

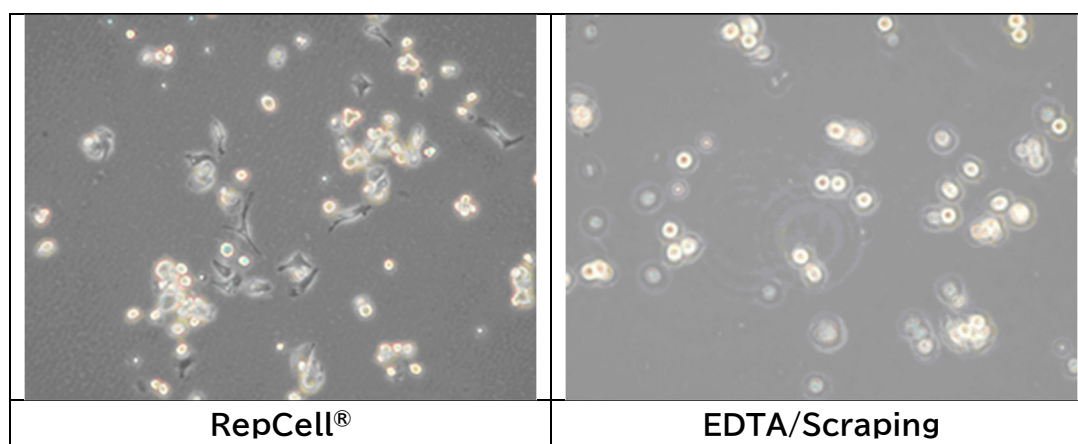
ヒトマクロファージの回収(HL-60、PMA 刺激)



1. RepCell®及び細胞培養用ディッシュに  $5 \times 10^6$  個を播種、100nM PMA(Phorbol 12Myristate 13-Acetate)を添加してマクロファージに分化誘導する。
2. 5日間培養後、PBSに置換し、温度処理(室温 30分)及びEDTA/PBS処理により回収

(東邦大学理学部・小林芳郎教授ご提供)

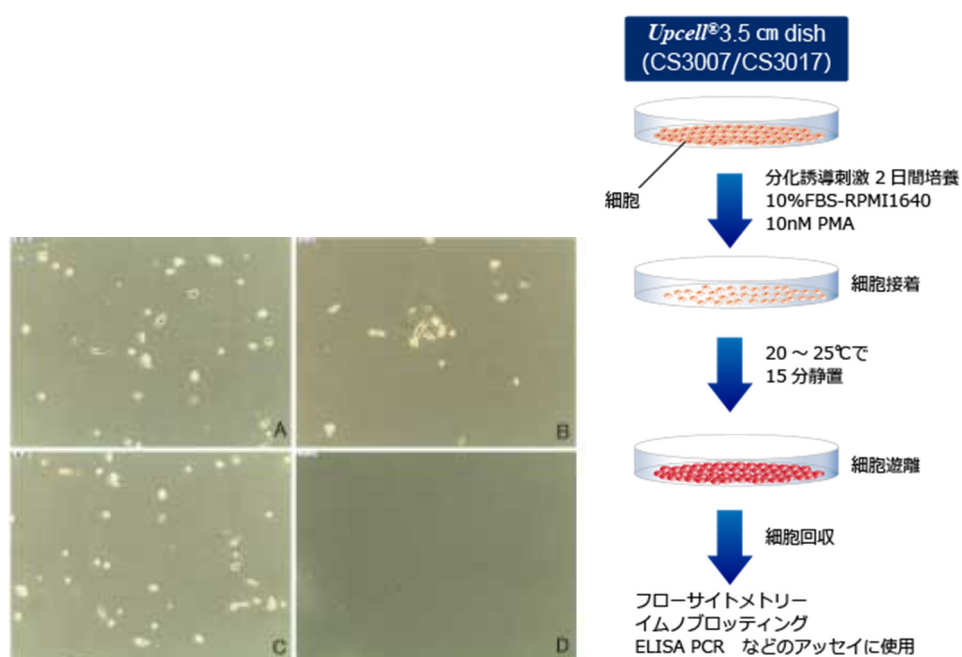
6. 剥離手法の違いによるマクロファージの再付着性(再播種後 24 時間)



1. マウス腹腔マクロファージを RepCell®及び通常細胞培養用ディッシュに  $5 \times 10^6$  個を播種。
2. 2 時間培養後、浮遊細胞を回収し PBS で洗浄。
3. 2 日間培養後、PBS に置換し、温度処理(氷冷、5 分)及び PBS+EDTA 処理により回収。
4. 細胞培養用ディッシュに RepCell®及び通常細胞培養用ディッシュから回収した細胞を再播種。
5. 再播種 24 時間後に観察。



## 7. マクロファージ用シングルセル回収プロトコル(3.5cm UpCell®使用)



### 細胞培養条件

1. 細胞種: HL-60, JCRB0085/ATCC CCL-240
2. 播種密度:  $1.0 \times 10^5$  cells/3.5cm UpCell®
3. 培養日数: 分化誘導刺激後 2日間
4. 培地: 10%FBS-RPMI1640, 100nM PMA

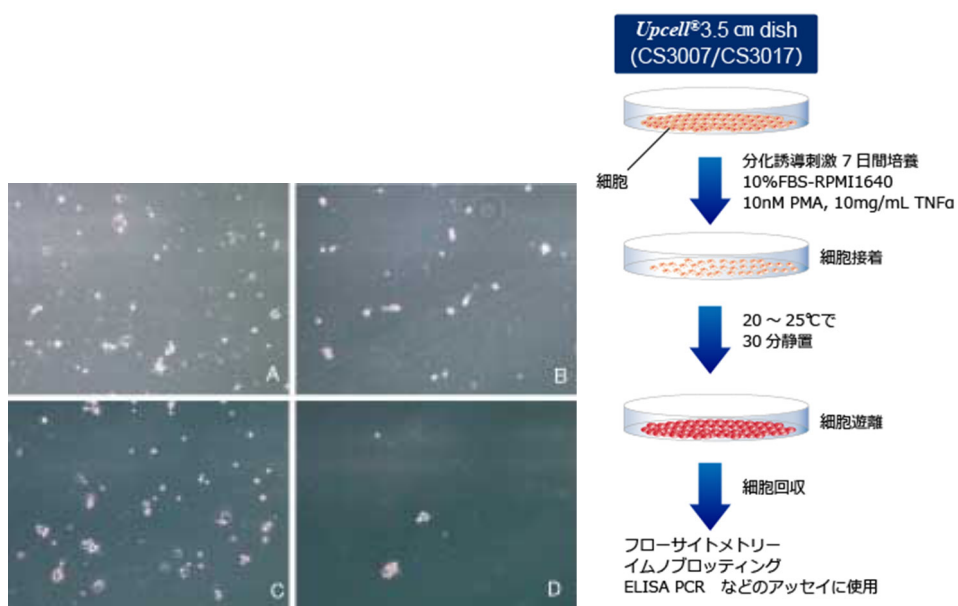
\* 細胞の種類により培養条件は異なります。

(JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources ATCC: American Type Culture Collection)

### 方法

1. 細胞同士が接触しない密度で細胞を播種します(A,B)。
2. インキュベーターから UpCell®を取り出し、20-25°Cで15分間静置します。
3. 培地を穏やかにピペッティングすると、付着していた細胞が剥がれます(D)。
4. 同様の処理をした通常の細胞培養ディッシュの細胞は付着したままです(C)。

## 8. 樹状細胞(DC)様シングルセル回収プロトコル(3.5cm UpCell®使用)



### 細胞培養条件

1. 細胞種: HL-60, JCRB0085/ATCC CCL-240
2. 播種密度:  $1.0 \times 10^5$  cells/3.5cm UpCell®
3. 培養日数: 分化誘導刺激後 2 日間
4. 培地: 10% FBS-RPMI1640, 100nM PMA

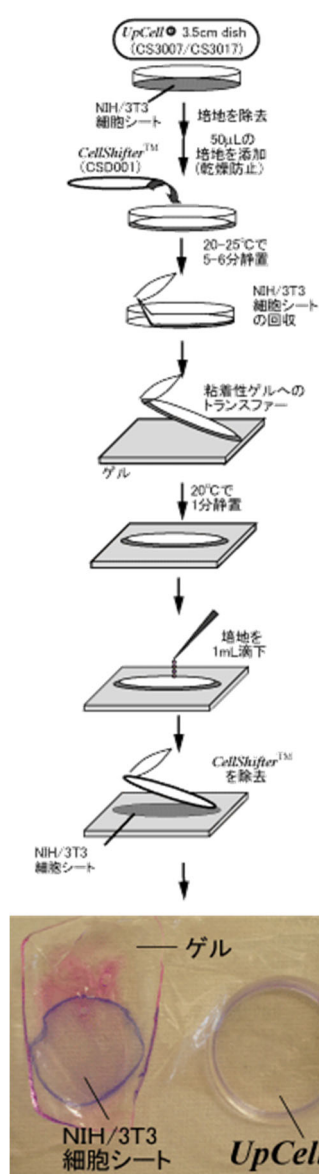
\* 細胞の種類により培養条件は異なります。

(JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources ATCC: American Type Culture Collection)

### 方法

1. 細胞同士が接触しない密度で細胞を播種します(A,B)。
2. インキュベーターから UpCell®を取り出し、20-25°Cで 15 分間静置します。
3. 培地を穏やかにピペッティングすると、付着していた細胞が剥がれます(D)。
4. 同様の処理をした通常の細胞培養ディッシュは細胞は付着したままです(C)。

## 9. CellShifter™ を使用した細胞シートの回収とトランスファープロトコル(3.5cmUpCell® )



### 細胞培養条件

1. 細胞種: NIH3T3, ATCC CCL-1658
  2. 播種密度:  $5.0 \times 10^4$  cells/3.5cm UpCell®
  3. 培養日数: 7日間(オーバーコンフルエント)
  4. 培地: 10%FBS-DMEM
- \* 細胞の種類により培養条件は異なります。  
(ATCC: American Type Culture Collection)

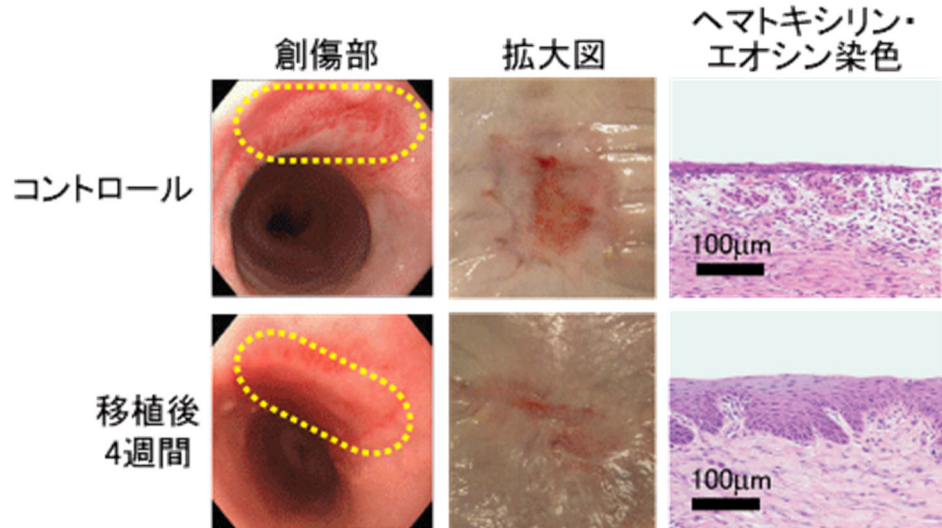
### 方法

1. NIH3T3 を UpCell®3.5cm ディッシュに  $5.0 \times 10^4$  cells 播種し、オーバーコンフルエントになるまで1週間培養します(コンフルエントになりにくい細胞種が一部ございます。あらかじめご了承ください。)
2. インキュベーターから UpCell®を取り出し、培地を除去します。
3. 細胞の乾燥を防ぐため、速やかに 50uL の培地を添加します。
4. 細胞の上に気泡が入らないように CellShifter™ をピンセットで重ねます。
5. 20度で 5-6 分間、静置します。

6. CellShifter™ の端からピンセットでゆっくりめくって、NIH3T3 細胞シートを UpCell®より回収します。
  7. 細胞シートを移植したい部位や別の細胞の上に密着させ、静置します(左図では生体組織の代わりに表面が粘着性のゲルに 1 分間静置し、トランスファーしています)。
  8. 1mL の培地を CellShifter™ の上に滴下します。
  9. CellShifter™ のみをピンセットでつまんでゆっくり剥がします。
  10. NIH3T3 細胞シートはゲル側に接着し(左下の写真左側)、UpCell®上には NIH3T3 細胞は残っていません(左下写真右側)。
- \* 他の細胞種では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承下さい。

## 10. 細胞シートの移植アプリケーション例

イヌ食道がん切除モデル移植例

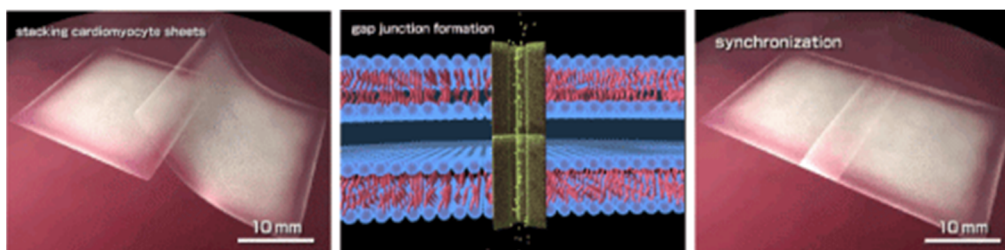


イヌ食道がん切除モデルに口腔粘膜細胞シートを移植。コントロールに比べ細胞シート移植モデルの治癒は大幅に促進。ヘマトキシリン・エオシン染色で確認したところ、細胞シート移植モデルでは上皮部分が早期に厚く再生。

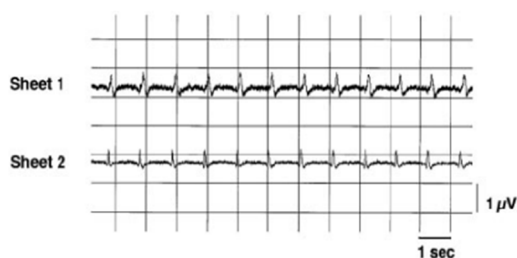
”Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model.” T.Ohki, M.Yamato, D.Murakami, R.Takagi, J.Yang, H.Namiki, T.Okano and K.Takasaki, GUT., 55, 1704-1710

## 11. 細胞シートの積層化アプリケーション例

細胞シートの積層化(3D 培養)により心臓組織を模倣！



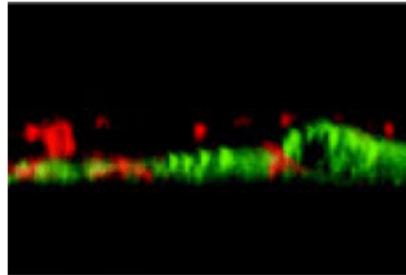
- 心筋細胞シート同士を重ねる。
- 表面のタンパク質が保持されているのでギャップジャンクションも容易に形成
- 3D 心筋細胞シートの出来上がり



- 細胞外マトリクスが保持されているから積層化したシート同士の接着が良好です。
- 積層化したシート同士は電氣的に結合します。
- 電氣的結合は 30 分で完了します。
- 両シートの単層領域の電気スパイクのタイミングはシンクロナイズします。

”Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation.” Y.Haraguchi, T.Shimizu, M.Yamato, A.Kikuchi, T.Okano, *Biomaterials.*, 27, 4765-4774 (2006)

ヘテロな細胞シートの積層化(3D 培養)により、生体内環境を限りなく再現

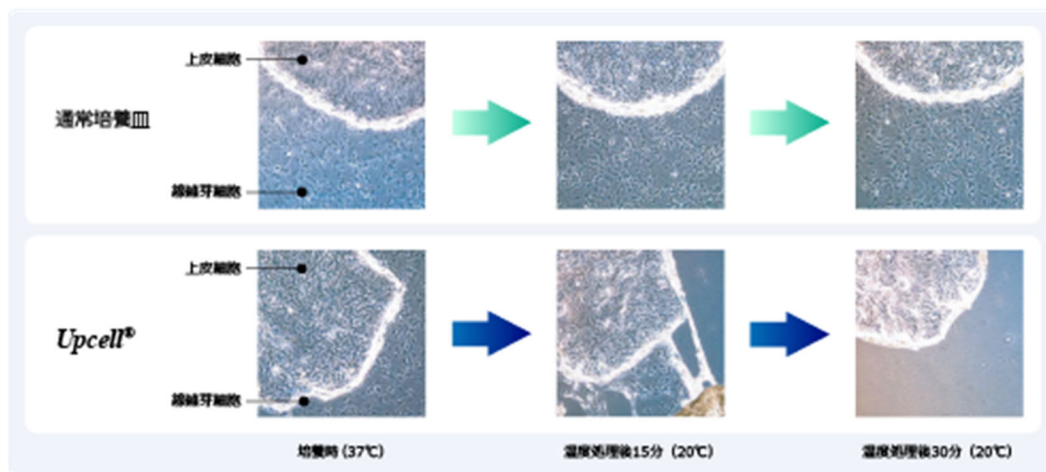


- 血管内皮細胞(HAEC)を肝細胞に積層化して共培養。
- 赤はファロイジン染色した血管内皮細胞。
- 緑は抗アルブミン抗体で染色した肝細胞。

”Novel approach for achieving double-layered cell-sheets co-culture: overlaying endothelial cell-sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes.” M.Harimoto, M.Yamato, M.Hirose, C.Takahashi, Y.Isoi, A.Kikuchi and T.Okano, J.Biomed. Mater. Res., 62, 464-470 (2002)

## 12. 接着力の違いを利用した細胞分離例

### 上皮細胞と線維芽細胞の分離



#### 方法

1. UpCell®6cm ディッシュに上皮細胞と線維芽細胞を播種し、培養します。
2. 室温(20℃)の培地で培地交換(2mL)を行い、15-30分静置します。
3. 遊離した線維芽細胞をピペット等で回収します。

\* 他の細胞腫では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承ください。



### 13. UpCell®のECMコーティング推奨濃度

PC12HS 細胞を用いて、増殖率の向上する ECM 溶液の推奨濃度範囲を求めました。

ECM	推奨濃度範囲
Laminin	10~100 $\mu$ g/mL(1~10 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> )
Collagen I	30~300 $\mu$ g/mL(3~30 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> )
Collagen IV	3~100 $\mu$ g/mL(0.3~100 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> )
Poly-D-Lysine	30~100 $\mu$ g/mL(30~100 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> )

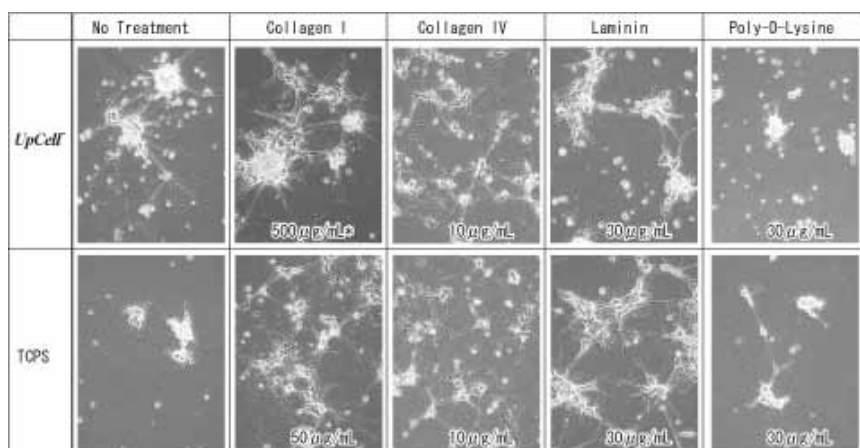
#### 培養条件

1. 細胞:PC12HS 細胞 (JCRB0266)
2. 培地:RPMI1640 + 10%HorseSerum + 5%FBS
3. ECM: Laminin (BD 354232), Collagen I (BD 354236), Collagen IV (BD 354233), Poly-D-Lysine (BD 354210)
4. 培養容器:UpCell® 3.5cm dish
5. 比較対象:Nunc Tissue culture 3.5cm dish
6. コーティング条件:37°C, 1時間, 1mL/dish
7. 播種密度:2~6 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/dish
8. 培養期間:5日間

## 14. UpCell®を用いた分化誘導実績

様々な ECM コーティングした UpCell®上で PC12HS 細胞を NGF により分化誘導し、神経突起の伸長の程度を通常の培養皿と比較しました。

分化誘導後 9 日目の比較写真



\* Collagen I は、血清濃度が低いため、UpCell®では TCPS よりコーティング濃度を高くした。

培養条件

1. 細胞: PC12HS 細胞 (JCRB0266)
2. 培地: RPMI1640 + 10% Horse Serum + 5% FBS
3. 分化誘導培地: RPMI1640 + 0.1% Horse Serum + 0.05% FBS + 50 ng/mL NGF
4. ECM: Laminin (BD 354232), Collagen I (BD 354236), Collagen IV (BD 354233), Poly-D-Lysine (BD 354210)
5. 培養容器: UpCell® 3.5cm dish
6. 比較対象: Nunc Tissue culture 3.5cm dish (図中に TCPS と省略して記載)
7. コーティング条件: 37°C, 1 時間, 1 mL/dish (濃度はメーカーの推奨濃度を参考にしました。上図各写真の右下参照。)
8. 播種密度:  $6 \times 10^4$  cells/dish
9. 培養期間: 播種後 1 日で分化誘導培地に交換し、3 日おきに培地交換しながら 9 日間培養