

温度応答性細胞培養器材UpCell®を用いた 種々細胞のシート作成評価

細胞回収のための培養器材として利用されているUpCell®は、トリプシンなどの酵素やスクレーパーを使用することなく温度処理で細胞が回収でき、膜タンパク質や生理活性が生体本来に近い状態で維持されるという特徴があります。またUpCell®からの回収細胞には、細胞間接着分子や細胞外マトリックス（ECM）が保持されることを利用して、細胞種によってはコンフルエントの状態から細胞シートとして回収し、別の組織等へ速やかに生着させることも可能です。本アプリケーションノートでは、当社で行ったUpCell®（高剥離タイプを含みます）による細胞シート作製及び剥離回収の結果を紹介いたします。

方法

①各種細胞を表1に記載した条件で播種、培養した。培地交換時下記の方法にて行い、温度変化によって細胞が剥がれないよう注意した。

<培地交換>

培養上清を除去し、37℃に加熱した培地を添加した。剥がれやすい細胞種については、ThermoPlate®（UpCell®専用ガラスヒーター）上でディッシュを加熱しながら行った。

②培養最終日、細胞が十分にコンフルエントまで増殖していることを確認し、下記の方法にて温度処理及びシート剥離を行った。

<温度処理>

室温の培地に入れ替え又は培地交換をせずにディッシュを室温に静置した。静置時間は、細胞の様子を観察しながら調節した。

<シート剥離>

細胞種毎にシートの性質が異なるため、シートの状態に合わせて以下の手法を適宜選択した。

手法1：自然剥離

温度処理中に、シートの収縮力によって自発的に剥離するものに関しては、シートの状態を観察しながらそのまま静置した。

手法2：ピンセットを用いた手動剥離

シートをピンセット先端でつまみ、シート端（ディッシュの壁面付近）から中央に向かって少しずつ剥離した。



表1. 各種細胞シートの培養条件表

細胞種	使用器材	培養条件			
		培地等	播種細胞数	培養日数	培地交換
293T	UpCell	10%FBS DMEM	2x10 ⁵	4	0回
3T3-Swiss albino	UpCell	10%FBS DMEM	1x10 ⁵	4	0回
A431	高剥離	10%FBS DMEM	2x10 ⁶	3	0回
A549	UpCell	10%FBS DMEM	5x10 ⁵	7	2回
hMSC-AT	UpCell	メーカー推奨培地	2x10 ⁵	3	0回
hMSC-BM	UpCell	メーカー推奨培地	2x10 ⁵	3	0回
HepG2	UpCell	10%FBS DMEM コラーゲンコート	2.5x10 ⁶	2	0回
MDCK	UpCell	10%FBS DMEM	1x10 ⁵	4	0回
NIH/3T3	UpCell	10%FBS DMEM	1x10 ⁵	4	0回
VERO	高剥離	10%FBS DMEM	5x10 ⁵	10	3回

※使用器材サイズは全てΦ3.5cmディッシュを使用しています。

高剥離はUpCell®高剥離タイプを指します。

※社内で実績のある培養条件を記載しており、細胞シートが作製できる条件は上記に限ったものではございません。

※下記のコラーゲンコート方法は一例です。

Collagen Type I（コーニング、354236）の0.5mg/mL水溶液を調製し、ディッシュ当たり2mLを添加して室温、30min静置した。溶液を除去して2h乾燥させた後、1mLのPBSで洗浄した。

細胞シート剥離・回収サポート商品について

細胞シート支持体CellShifter™

剥離したシートを新しいディッシュ等に転写する場合にお使い頂けます。シート作製条件、剥離条件を最適化した後のご使用を推奨しております。



細胞シート積層化デバイスCellStamp™

剥離したシートを複数枚重ねたり、新しいディッシュ等に転写する場合にお使い頂けます。



結果

UpCell®又はUpCell®高剥離タイプを用いて種々細胞シートが剥離回収できた。

3T3-Swiss albino細胞、NIH/3T3細胞のシートは温度処理後に自発的な収縮によって完全に剥離した。ヒト骨髓由来間葉系幹細胞シートは自然剥離が部分的に起こった後、ピンセットを用いて手動で剥離した。その他の細胞種のシートは温度処理のみでは外観に変化がなく手動で剥離する必要があったが、ピンセットを用いて大きな損傷なく剥離回収できた。

細胞種	剥離前の位相差画像	剥離後の外観画像	剥離条件	細胞種	剥離前の位相差画像	剥離後の外観画像	剥離条件
293T			室温5min静置 + ピンセット	hMSC-BM			室温培地に入替 室温20min静置 + 自然剥離 /ピンセット
3T3-Swiss albino			室温培地に入替 室温5min静置 + 自然剥離	HepG2			室温5min静置 + ピンセット
A431			室温培地に入替 室温1h静置 + ピンセット	MDCK			室温培地に入替 室温1h静置 + ピンセット
A549			室温培地に入替 室温5min静置 + ピンセット	NIH/3T3			室温培地に入替 室温5min静置 + 自然剥離
hMSC-AT			室温培地に入替 室温5min静置 + ピンセット	VERO			室温培地に入替 室温20min静置 + ピンセット

図2. UpCell®による各種細胞シートの位相差顕微鏡像及び剥離後シートの外観 (Scale bar : 500µm)

販売代理店

販売代理店