

大量培養用温度応答性細胞培養基材の開発

慈 道 裕 美 子^{*1}
 今 富 伸 哉^{*1}
 平 床 聖 也^{*1}
 根 津 友 祐^{*1}
 陳 孫 友 蒙^{*2}
 伊 藤 博 之^{*1}

Temperature-Responsive Cell Cultureware for Mass Culture

Yumiko JIDO
 Shinya IMATOMI
 Shoya HIRATOKO
 Yusuke NEZU
 Shimou CHINSON
 Hiroyuki ITOH

Cellular medicines, which are a type of biologics manufactured using cells, are pharmaceuticals that administer cells themselves to patients for treatment. The market size of cellular medicines is expected to expand because it is effective for diseases that have been difficult to treat. On the other hand, the current cellular medicines are manufactured on a small scale, so the cost is high, and the quality of cells deteriorates due to the use of proteolytic enzymes during cell recovery process. Therefore, the technique that can culture high-quality cells at low cost is necessary.

We have developed a temperature-responsive cell cultureware which is coated with a unique temperature-responsive polymer consisting of three components, a hydrophilic block, a hydrophobic block, and a temperature-responsive block. Since the developed cell cultureware has excellent temperature responsiveness due to the effect of the hydrophilic block, the cell recovery rate was 98%, which was 1.5 times that of the conventional temperature-responsive cultureware. It was confirmed that the cultured cells could be efficiently recovered. In addition, since the temperature-responsive cell cultureware can recover cells only by cooling treatment, it does not require complicated operations as compared with the method using proteolytic enzymes, and the proteins on the cell surface are not decomposed. Human mesenchymal stem cells cultured using developed cell cultureware had more than twice the expression level of CD29, a protein involved in cell adhesion, compared to enzyme-treated cells. Furthermore, the tissue factor activity involved in thrombus formation during administration to patients was suppressed to about 30%, and it is confirmed that the deterioration of cell quality could be suppressed. Moreover, since our unique temperature-responsive block copolymer can be coated regardless of the material and shape, it can be expected to be applied to a large cell cultureware for mass culture.

As mentioned above, the developed temperature-responsive cell cultureware can contribute to reduction of the manufacturing cost and improvement of the cell quality for cellular medicines.

*1 ライフサイエンス研究所 バイオマテリアルグループ
 *2 ライフサイエンス研究所 バイオプロセスグループ

1. 背景

再生医療は、機能障害や機能不全に陥った生体組織や臓器に対して細胞を用いて機能を再生する医療を指し、従来は治療が困難であった疾患に対する新たな医療として注目を集めている¹⁾。世界各地で再生医療に使用する再生医療等製品の開発が進められており、その世界市場は2020年の約1500億円から、2030年には約3.4兆円にまで急速に拡大すると予測されている²⁾。再生医療等製品は培養軟骨や培養皮膚のような細胞加工製品と、細胞そのものを患者に投与する細胞医薬品に大別される。患者への移植手術が必要な細胞加工製品と比較して、患者に投与するだけで治療が可能な細胞医薬品は市場が急速に拡大すると予想されている³⁾。しかし、現在の細胞医薬品は小規模製造が中心であるため製造コストが高く、結果として治療費が約1500万円/回と高額となっている。また、培養細胞の回収工程でタンパク質分解酵素を使用しているため、細胞表面のタンパク質が分解されて細胞の品質が低下する点も課題であり、将来の市場規模の拡大に対応した細胞の大量培養技術や、治療費の削減および品質向上を目的とした、高品質な細胞を大量に低コストで培養できる技術が求められている。

生体内では、血球系細胞以外の細胞の多くはコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM: Extra Cellular Matrices) を自ら産生し、ECMに接着した状態で増殖する。細胞医薬品の原料となる細胞は生体外で増殖させる必要があり、その場合はECMに対して接着性を有するポリスチレン (PS) 製シャーレなどの細胞培養基材を使用して培養する。培養して増殖した細胞は、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で処理することにより、ECMを分解して培養基材から剥離させて回収し、回収した細胞を再び新しい細胞培養基材へ移し、培養して増殖させる操作 (継代操作) を繰り返すことで、患者への投与に必要な細胞数を確保する。酵素処理による細胞剥離は一般的に用いられる方法であるものの、細胞表面のタンパク質なども同時に分解してしまうため細胞に与えるダメージが大きく、結果として細胞医薬品の品質が低下する可能性が高い。また、傷ついた細胞を細胞医薬品の原料として用いることで、患者に投与した際に血栓を引き起こす懸念も指摘されている。さらに、酵素を除くためには細胞を洗浄する操作や遠心分離などを行う必要があるため、大量の細胞を得る方法としては操作が煩雑であり、工程数が多いという点が課題である。

酵素処理を用いない細胞の剥離方法として、温度

応答性細胞培養基材を用いた冷却処理法が挙げられる⁴⁾。温度応答性細胞培養基材とは、スピニングコート法やグラフト法⁵⁾により基材表面に温度応答性ポリマーを固定化して作製され、温度変化に伴う基材表面の温度応答性ポリマーの親水性と疎水性の変化を利用して細胞接着性を制御可能な基材を指す。細胞は、適度な疎水性を示す基材に接着して増殖しやすく、親水性を示す基材には接着しにくい性質を持つ。従って、細胞を培養する温度である37℃では疎水性を示し、20℃以下に冷却すると親水性を示す温度応答性細胞培養基材を用いることで、冷却処理するだけで培養した細胞の剥離が可能である。従来の温度応答性細胞培養基材として、温度応答性成分のみを基材に固定化したものが市販されているが、温度応答性が不十分であることから細胞の剥離が緩やかに起こり、操作に時間を要する点および細胞の回収率が低い点が課題であった。そこで我々は、親水性を有する2-methoxyethyl acrylate (MEA)、疎水性を有する*n*-butyl acrylate (BA)、32℃付近に下限臨界溶液温度 (LCST: Lower Critical Solution Temperature) を有する*N*-isopropylacrylamide (IPAAm) の3成分からなる温度応答性ブロック共重合体を独自開発し、細胞培養基材にコーティングすることで従来品を上回る高い細胞回収率を有する温度応答性細胞培養基材を開発した。本稿では、温度応答性ブロック共重合体の設計、温度応答性細胞培養基材の物性、および細胞医薬品の原料細胞の一種であるヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hbMSC: human bone marrow mesenchymal stem cell) を用いた開発品の細胞培養性能について報告する。

なお本開発品は、細胞医薬品の治療費が高額なため、難治性疾患の治療が広範囲に普及しないといった社会課題に対し、簡便な操作で高品質な細胞を高効率に生産できる技術を提供することで、細胞医薬品の製造コスト低減と高品質化に貢献することを目指す。

2. 方法

[1] 温度応答性ブロック共重合体の合成

温度応答性ブロック共重合体は、リビングラジカル重合の一種である可逆的付加-開裂連鎖移動重合法⁶⁾ (RAFT: Reversible Addition - Fragmentation Chain Transfer Polymerization) を用いた。RAFT重合法は目的の分子量で分子量分布の狭いポリマーを得られる手法であるため再現性に優れ、品質の安定した温度応答性ブロック共重合体を得られることから選択した。

RAFT 剤として cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CMDT、Sigma-Aldrich 製、723029)、開始剤として 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN、富士フイルム和光純薬製、019-04932) を用いて、*tert*-butanol (富士フイルム和光純薬製、028-03386) 中で反応を行った。polyMEA ブロックを形成した後、polyBA ブロック、polyIPAAm ブロックの順に形成し、温度応答性ブロック共重合体 poly (MEA-*b*-BA-*b*-IPAAm) を合成した (Fig. 1)。ブロック共重合体の組成は ^1H -NMR (日本電子製、JNM-ECZ400S/L1) により解析し、分子量および分子量分布は GPC (東ソー製、HLC-8320GPC) により解析した。

[2] 温度応答性細胞培養基材の作製

上記[1]で合成した温度応答性ブロック共重合体を 2-butanol (関東化学製、04461-05) に溶解して、固形分濃度が 0.28 wt% である温度応答性細胞培養基材作製用ポリマーコート剤を調製した。調製したポリマーコート剤を、市販の直径 60 mm 組織培養用 PS 製シャーレ (AGC テクノグラス製、3010-060) に 100 μL 滴下し、3000 rpm で 60 秒間スピコートすることで温度応答性細胞培養基材 (TSA-111) を作製した。ポリマーコート膜厚は顕微分光膜厚計 (大塚電子製、OPTM-A1) により測定し、温度応答性の挙動は接触角計 (協和界面科学製、DMs-401) により測定した。接触角は、細胞培養環境に近い条件で評価するために、温度を調節した水中に測定対象の基材を設置し、その

表面に気泡を接触させる三態系法により測定した。

[3] 細胞培養

hbMSC (Lonza 製、PT-2501) を直径 60 mm のシャーレ 1 枚に対し 1.0×10^5 cells 播種し、37°C、 CO_2 濃度 5% の条件下で培養した。培養液にはウシ胎児血清 (BioWest 製、S1810) を 10 vol% 含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地 (10 vol% FBS / DMEM) を用いた。培養終了後の細胞数と細胞生存率は、自動セルカウンター (Thermo Fisher Scientific 製、Countess® II) を用いて測定した。

[4] 細胞回収

(1) 冷却処理

hbMSC の培養終了後、培養液を除去し、新たに 4°C に冷却した培養液を加え、室温で 10 分間冷却した。10 分後、数回のピペッティングを行い、剥離した細胞を回収した。また、冷却処理による細胞回収率は以下の計算式により算出した。

$$\text{細胞回収率} [\%] = \left(\frac{[\text{冷却処理による回収細胞数}]}{[\text{全細胞数}]} \right) \times 100$$

ここで、[冷却処理による回収細胞数] は上述の操作により回収した細胞数であり、[全細胞数] は、冷却処理による回収細胞数と、培養基材に残存する細胞を後述する酵素処理により回収した細胞数を足し合わせた数である。

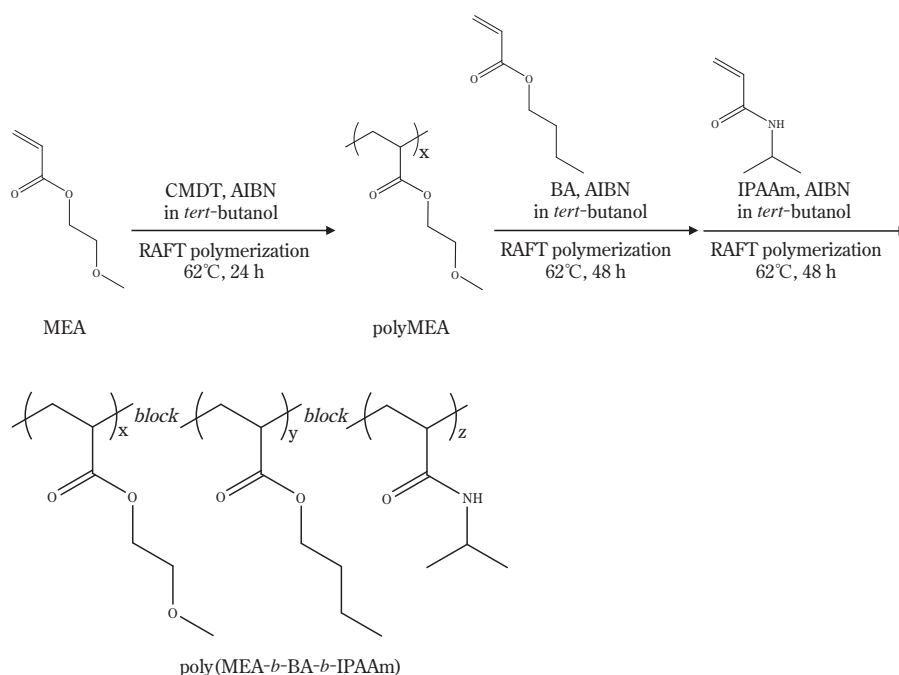


Fig. 1 Synthesis of temperature-responsive block copolymer, poly (MEA-*b*-BA-*b*-IPAAm)

(2) 酵素処理

hbMSCの培養終了後、培養液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-): phosphate-buffered saline、富士フイルム和光純薬製、166-23555) で洗浄した。0.25%トリプシン-EDTA溶液 (Thermo Fisher Scientific 製、25200056) を加え 37℃で5分間静置した後、新たに培養液を加えてピペティングを行い剥離した細胞を回収した。回収した細胞を含む液を遠心分離し上清を除去した後、細胞を培養液に懸濁させて回収した。

[5] 表面マーカータンパク質測定

冷却処理もしくは酵素処理により回収した hbMSC の性質を調べるために、細胞表面のマーカータンパク質をフローサイトメーター (Luminex 製、Guava® easyCyte™) を用いて測定した。細胞の接着性に関するタンパク質である CD29 タンパク質の測定には Anti-Integrin β 1 Antibody, clone 12G10 (Merck 製、MAB2247-I) を用いた。また、ヒト間葉系幹細胞 (hbMSC: human mesenchymal stem cell) の陽性マーカータンパク質である CD90 抗原、CD105 抗原、CD73 抗原の測定には、それぞれ FITC Mouse Anti-Human CD90 (BD 製、561969)、PE Mouse anti-Human CD105 (BD 製、560839)、APC Mouse anti-Human CD73 (BD 製、560847) を用いた。

冷却処理もしくは酵素処理により回収した hbMSC の血栓生成能を評価するために、組織因子 (TF: Tissue Factor) 活性を測定した。具体的には、回収した hbMSC から抽出したタンパク質溶液を調製し、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 製、23225) でタンパク質濃度を測定した後、Human Tissue Factor (TF) Chromogenic AssaySense Activity Assay Kit (AssayPro 製、CT1002b) を用いてタンパク質 1 μ g 当たりの TF 活性を測定した。

[6] 分化誘導培養

(1) 脂肪細胞

冷却処理もしくは酵素処理により回収した hbMSC を、フィブロネクチンをコートした組織培養用 24 ウェルプレート (Corning 製、3526) に 3.0×10^4 cells 播種し、間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地 2 (PromoCell 製、C-28016) を用いて脂肪細胞に分化誘導培養した。分化誘導終了後、10%中性緩衝ホルマリン液で細胞を固定しリピットアッセイキット (コスモバイオ製、

AK09F) を用いて、脂肪を赤色に染色した。

(2) 骨芽細胞

冷却処理もしくは酵素処理により回収した hbMSC を、フィブロネクチンをコートした組織培養用 24 ウェルプレート (Corning 製、3526) に 3.0×10^4 cells 播種し、間葉系幹細胞骨芽細胞分化培地 (PromoCell 製、C-28013) を用いて骨芽細胞に分化誘導培養した。分化誘導終了後、-20℃のメタノールを加え、4℃で20分間固定し石灰化染色キット (コスモバイオ製、AK21F) を用いて、カルシウム沈着をアリザリンレッド S で赤色に染色した。

(3) 軟骨細胞

冷却処理もしくは酵素処理により回収した hbMSC を超低接着表面 96 ウェルプレート (Corning 製、4515) に 1.0×10^5 cells 播種し、間葉系幹細胞軟骨細胞分化培地 (PromoCell 製、C-28012) を用いて軟骨細胞に分化誘導培養した。分化誘導終了後、得られた細胞凝集塊を 4%パラホルムアルデヒド/PBS (-) で固定し、アルシアンブルー染色し、染色陽性の軟骨組織の直径を測定した。

[7] 適用細胞種の拡大検討

(1) 歯髄幹細胞

ヒト歯髄幹細胞 (DPSC: dental pulp stem cell, Lonza 製、PT-5025) を直径 60 mm のシャーレ 1 枚に対し 1.0×10^5 cells 播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培養液には DPSC SingleQuots™ 添加因子セット (Lonza 製、PT-4516) を添加した DPSC 基本培地 (Lonza 製、PT-3927) を用いた。

(2) 脂肪由来幹細胞

ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC: adipose derived stem cell, Lonza 製、PT-5006) を直径 60 mm のシャーレ 1 枚に対し 1.0×10^5 cells 播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培養液には ADSC-SingleQuots™ 添加因子セット (Lonza 製、PT-4503) を添加した ADSC 基本培地 (Lonza 製、PT-3273) を用いた。

(3) iPS 細胞

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC: human induced pluripotent stem cell) の 201B7 株を iMatrix-511 (ニッピ製、892011) をコートした直径 60 mm のシャーレ 1 枚に対し 1.0×10^5 cells 播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培養液には StemFit® AK02N (味の素ヘルシーサプライ製) を用いた。

3. 結果と考察

[1] 温度応答性ブロック共重合体の合成

$^1\text{H-NMR}$ により MEA/BA/IPAAm の存在を確認し、また GPC チャートは単峰性を示したことから、生成物が MEA、BA、IPAAm の3成分からなる温度応答性ブロック共重合体であることを確認した。生成物の組成比は MEA/BA/IPAAm = 5/30/65[mol%]、数平均分子量は11万、分子量分布は1.5であった。

合成した温度応答性ブロック共重合体に含まれる polyMEA ブロックは、わずかに存在することで polyIPAAm の相転移を促進する役割を持つ。相転移を促進することで冷却処理の時間を短縮することができ、作業時間の短縮のみならず細胞へのダメージを最小限に抑えることが可能である。polyBA ブロックは基材へのコート性を付与し、基材との疎水性相互作用によりポリマーの溶出を防ぐ役割を持つ。そして、polyIPAAm ブロックは32℃付近で相転移し、細胞の脱着を制御する役割を持つ⁷⁾。高温では polyIPAAm ブロックが脱水和することで疎水性を示し、低温では水和することで親水性に変化する。

[2] 温度応答性細胞培養基材の物性

スピコート法を用いて PS 製シャーレに温度応答性ブロック共重合体をコーティングした温度応答性細胞培養基材 (TSA-111) の膜厚を測定した結果、約10 nm のポリマー膜が形成されていることがわかった。また、接触角計を用いて温度変化による表面の親水性と疎水性の変化を測定した結果、Fig. 2 に示すように40℃では疎水性を示し、15℃では親水性へと変化することを確認した。さらに開発品は、従来の温度応答性

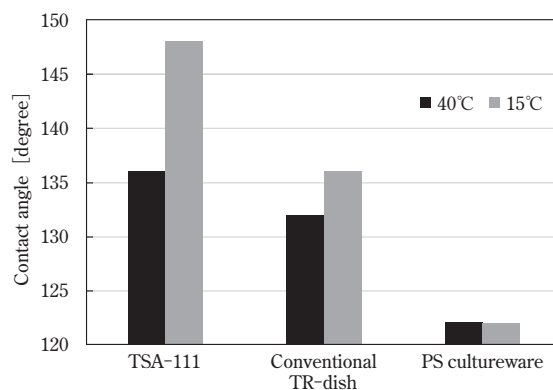


Fig. 2 Contact angle dependence on temperature (TR-dish : temperature-responsive dish)

シャーレと比較して顕著な接触角変化を示した。以上より、polyMEA ブロックを導入した優位性を確認した。

[3] 細胞増殖性と細胞生存率

我々が開発した温度応答性細胞培養基材 (TSA-111) を用いて培養した hbMSC の増殖性と細胞生存率を、温度応答性ブロック共重合体をコートしていない未コート PS 製シャーレと比較した。それぞれの細胞培養基材に hbMSC を播種後、96 時間まで 24 時間毎の細胞数と、168 時間後の細胞数および細胞生存率の測定結果を Fig. 3 に示す。播種後 168 時間までの増殖性は未コート PS 製シャーレと同等であった。また、168 時間後の細胞生存率は温度応答性細胞培養基材、未コート PS 製シャーレにおいていずれも 95% であり、未コート PS 製シャーレと同等の細胞生存率であった。以上より、温度応答性ブロック共重合体をコートした場合に細胞増殖性と細胞生存率に影響を与えないことを確認した。

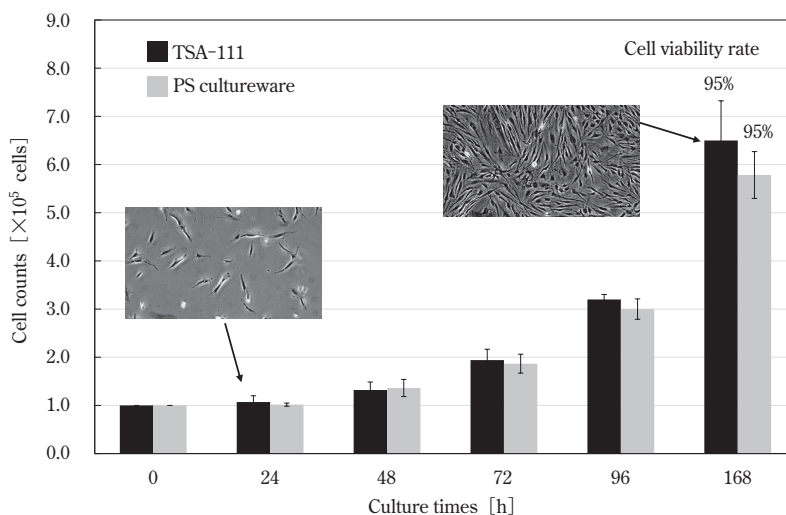


Fig. 3 Cell proliferation and cell viability rate of hbMSC cultured by temperature-responsive cultureware or PS cultureware

[4] 細胞回収

冷却処理と酵素処理による細胞回収工程の比較を Fig. 4 に示す。冷却処理では、(1) 培地除去、(2) 冷却培地添加、(3) 細胞回収の 3 工程で細胞が回収可能であるが、酵素処理では 8 工程が必要である。

開発品 (TSA-111) を用いて hbMSC を培養した後、増殖した hbMSC は冷却処理により剥離して回収した。Fig. 5 に示すように、4℃に冷却した培養液を添加して 10 分間静置すると hbMSC が基材から剥離する様子が観察できた。その後、数回のピペッティングにより hbMSC は基材から容易に剥離し、回収が可能であった。また、開発品と従来の温度応答性シャーレを用いて同様の冷却処理により hbMSC を回収した結果、従来品の細胞回収率は 65%であったのに対して開発品は 98%であり、従来品に比べて高効率に hbMSC を回収できることが判明した。さらに、データは示さないが、前述したピペッティング以外の方法として、振盪機を利用した機械的操作でも、高効率に hbMSC が回収できることも確認済みである。

将来の細胞医薬品製造においては、作業の標準化、低コスト化、汚染防止の観点から自動化に移行すると予測され、既に自動培養装置が開発されている⁸⁾。開発した温度応答性細胞培養基材は操作が簡便な冷却処理で細胞回収できる点と、機械的操作に対応可能な優れた冷却剥離性を発現できる点から、自動培養装置への用途展開も可能であると考えられる。

[5] 表面マーカータンパク質測定

開発品 (TSA-111) を用いて培養し、冷却処理により回収した hbMSC と、未コート PS 製シャーレを用いて培養し、酵素処理により回収した hbMSC について、CD29 タンパク質の発現量を比較した。なお、CD29 タンパク質は細胞-基材間の接着性に関与するインテグリンの内、インテグリン $\alpha 1 \sim \alpha 8$ と αV サブユニットと結合する抗原タンパク質である。Fig. 6 に示すように、冷却処理により回収した hbMSC の CD29 タンパク質の発現量は酵素処理により回収した hbMSC の 2 倍以上であり、細胞へのダメージが低減

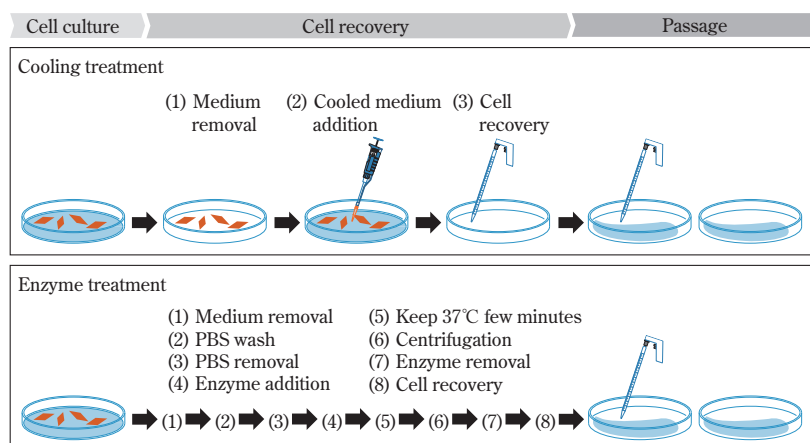


Fig. 4 Cell recovery process of cooling treatment and enzyme treatment

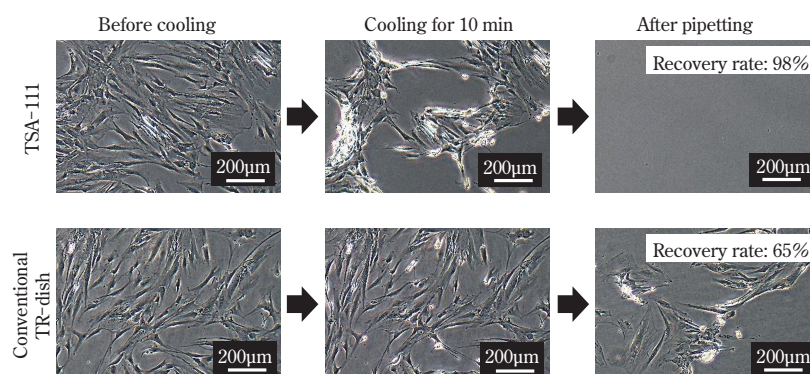


Fig. 5 Images of cell recovery by cooling treatment (TR-dish : temperature-responsive dish)

されていることが明らかになった。酵素処理では細胞-基材間の接着に関与するタンパク質を分解して細胞を剥離し回収するのに対し、冷却処理では基材表面の親水性と疎水性の変化によって細胞を剥離するため、細胞表面のタンパク質を保持したまま細胞が回収された結果、CD29 タンパク質の発現量が高くなったと考えられる。CD29 タンパク質を保持していることで、継代操作時に速やかに細胞が培養基材に接着するため、温度応答性細胞培養基材で継代操作を続けた場合は、通常の酵素処理で継代した場合と比較して細胞増殖性が向上し、より多くの細胞を得ることができる。

また、hbMSC の性質が維持されていることを hMSC の陽性マーカータンパク質測定によって評価した。国際細胞治療学会では hMSC を定義するための基準として、CD90 抗原、CD105 抗原、CD73 抗原が陽性であることを提案している⁹⁾。Fig. 7 に示すように、開発品から冷却処理により回収した hbMSC は、CD90 抗原 (Thy-1)、CD105 抗原 (Endoglin)、CD73 抗原 (5'-nucleotidase) の陽性率がいずれも未コート PS 製シャーレで培養し、酵素処理により回収した場合と同

等であり、hMSC としての性質が維持されていることが明らかになった。

さらに、開発品から冷却処理により回収した hbMSC の TF 活性について、未コート PS 製シャーレから酵素処理により回収した hbMSC と比較した。TF は血液凝固カスケードの開始因子であり、TF 活性の高い細胞は血管内に投与後血栓を形成するリスクが高くなることから、細胞医薬品に用いる細胞は低 TF 活性であることが好ましい。Fig. 8 に示すように、冷却処理により回収した hbMSC の TF 活性は酵素処理により回収した hbMSC の 1/3 程度に抑えられていることが判明し、細胞医薬品としての品質が向上していることが明らかとなった。

[6] 分化誘導培養

ヒト間葉系幹細胞は、骨、血管、脂肪、筋肉、心筋、軟骨などの細胞に分化する能力を持つことから、開発品 (TSA-111) から冷却処理により回収した hbMSC を各種分化誘導培地中で培養し、脂肪細胞 (Adipocyte)、骨芽細胞 (Osteoblast)、軟骨細胞 (Chondrocyte) への分化能を評価した。Fig. 9 に分化能評価結果を示す。未コート PS 製シャーレから酵素処理により回収した hbMSC と分化能を比較したところ、脂肪細胞、骨芽細胞においてはいずれの方法で回収した hbMSC も目的の細胞へと分化することを確認した。一方、軟骨細胞においては冷却剥離により回収した hbMSC の方が大きな軟骨細胞を形成することが判明した。従って、hbMSC を軟骨細胞に分化誘導する場合は、酵素処理で回収するよりも冷却処理で回収する方が優れることが明らかとなった。

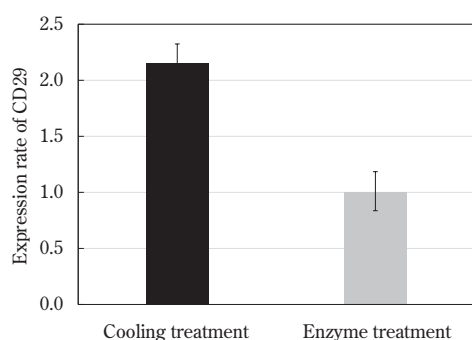


Fig. 6 Expression rate of CD29 of hbMSC recovered by cooling treatment or enzyme treatment

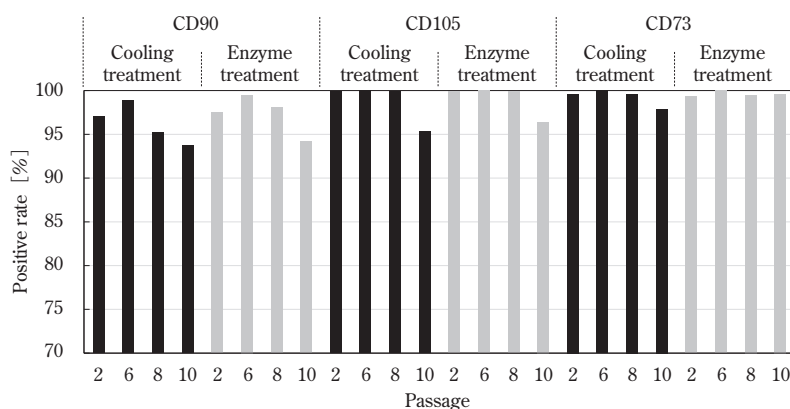


Fig. 7 CD90, CD105, and CD73 positive rate of hbMSC recovered by cooling treatment or enzyme treatment

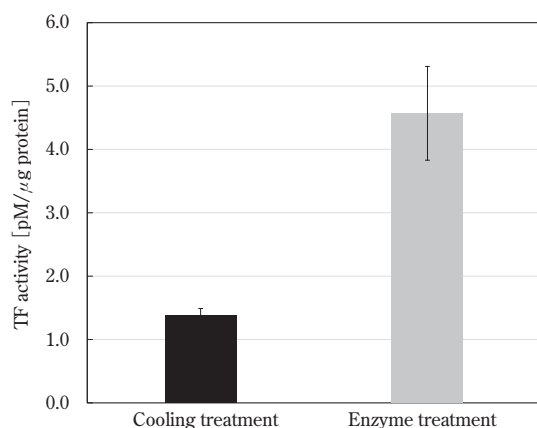


Fig. 8 TF activity of hbMSC recovered by cooling treatment or enzyme treatment

[7] 適用細胞種の拡大

ヒト間葉系幹細胞は骨髄以外に、比較的入手が容易な歯髄や脂肪組織からヒト歯髄幹細胞 (DPSC) やヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC) として採取可能である。これらのヒト間葉系幹細胞も hbMSC と同様に開発品 (TSA-111) で増殖可能であり、冷却処理による剥離

回収も可能であることを確認した。さらに、ヒト間葉系幹細胞以外の再生医療に用いられる細胞種としてヒト iPS 細胞への適用を検討した結果、開発品を用いた増殖と冷却処理による細胞の剥離回収が可能であることを確認した。各細胞の、未コート PS 製シャーレに対する増殖性および細胞回収率を **Table 1** に示す。

Table 1 に記載の幹細胞の他に、研究用途等で多用される細胞についても開発品の適用可能性を検討した結果、**Table 2** に示す細胞について増殖と冷却処理による細胞の剥離回収が可能であることを確認しており、開発品は幅広い種類の接着細胞の培養に利用可能であることが示された。

Table 1 Cell proliferation and recovery rate by cooling treatment of various stem cells

Cell	Proliferation rate [/PS cultureware]	Recovery rate [%]
DPSC	0.7	100
ADSC	1.1	77
hiPSC	0.9	98

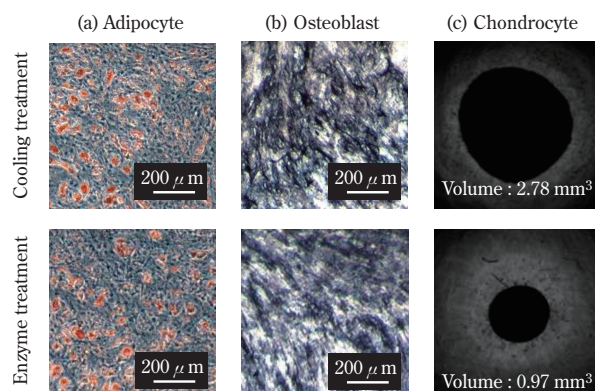


Fig. 9 Images of differentiated cells (a) adipocyte, (b) osteoblast, (c) chondrocyte

Table 2 Applicable cells of TSA-111

Type	Cell
human stem cells	bmMSC (bone marrow mesenchymal stem cell)
	DPSC (dental pulp stem cell)
	ADSC (adipose derived stem cell)
	iPSC (induced pluripotent stem cell)
human somatic cells	TIG-3 (human normal diploid fibroblast)
	HEK293 (human embryonic kidney cell)
human cancer cells	HepG2 (human hepatoma cell)
	PC9 (human lung cancer cell)
	A549 (human lung adenocarcinoma cell)
other animal-derived cells	3T3 (mouse fibroblast)
	CHO (chinese hamster ovary cell)

5. まとめ

以上のように、親水性ブロック、疎水性ブロック、温度応答性ブロックの3成分からなる独自の温度応答性ブロック共重合体を既存の細胞培養基材にコーティングした温度応答性細胞培養基材を開発した。温度応答性ブロック共重合体への親水性ブロック導入により、開発品は温度応答性に優れるため、従来の温度応答性細胞培養基材よりも高効率で細胞を回収できた。また、一般的な酵素処理と比較して、冷却処理では細胞の回収に必要な工程数が削減できた。開発品から冷却処理により回収した細胞は、細胞表面のタンパク質が分解されずに基材から剥離するため低ダメージである点や、血栓を引き起こす要因となる TF 活性を低く抑えられる点において優位であった。

本開発品は温度応答性ブロック共重合体を細胞培養基材にコーティングして得られることから、本稿で紹介したシャーレ以外の多様な基材への適用も期待できる。例えば、ポリエチレン製フィルムなどにコーティングすることで、大型の細胞培養バッグの製造が可能であり、また、PS 製微粒子などにコーティングすることで、大型リアクターでの培養が可能な細胞培養マイクロキャリアの製造が可能である。細胞医薬品の製造において、我々が開発した温度応答性ブロック共重合体を大型の細胞培養基材に展開することで、細胞医薬品の原料となる細胞の製造の効率化、低コスト化への寄与が期待される。

引用文献

- 1) 日本再生医療学会、再生医療～創る、行う、支える～ (2019)
- 2) (株)富士経済、ティッシュエンジニアリング関連アジア市場の最新動向と将来性 2021 (2021)
- 3) (株)富士経済、ティッシュエンジニアリング関連市場の最新動向と将来性 2019 (2019)
- 4) 秋山義勝、岡野光夫、高分子論文集、75 (2)、174 (2018)
- 5) Y. Akiyama, et al., *Langmuir*, 20 (13) , 5507 (2004)
- 6) John Chiefari, et al., *Macromolecules*, 31 (16), 5559 (1998)
- 7) J.S.Scarpa, et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 89, 6024 (1967)
- 8) M.Kino - oka, M.Taya, *J.Biosc.Bioeng.*, 108 (4), 267 (2009)
- 9) Dominici M, et al., *Cytotherapy*, 8 (4), 315 (2006)

