

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6865264号
(P6865264)

(45) 発行日 令和3年4月28日 (2021.4.28)

(24) 登録日 令和3年4月7日 (2021.4.7)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 3/04 (2006.01)	C 1 2 M 3/04 Z
C 1 2 M 1/22 (2006.01)	C 1 2 M 1/22
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07

請求項の数 5 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-500397 (P2019-500397)	(73) 特許権者	515036246
(86) (22) 出願日	平成29年7月5日 (2017.7.5)		コリア アドバンスド インスティテュー
(65) 公表番号	特表2019-522995 (P2019-522995A)		ト オブ サイエンスアンド テクノロジ
(43) 公表日	令和1年8月22日 (2019.8.22)		ー
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/007195		KOREA ADVANCED INST
(87) 国際公開番号	W02018/008985		ITUTE OF SCIENCE AN
(87) 国際公開日	平成30年1月11日 (2018.1.11)		D TECHNOLOGY
審査請求日	平成31年2月20日 (2019.2.20)		大韓民国 305-701 テジョン ユ
(31) 優先権主張番号	10-2016-0084856		ソング テハロ 291
(32) 優先日	平成28年7月5日 (2016.7.5)		291, Daehak-ro, Yus
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		eong-gu, Daejeon, 3
			05-701 Republic of
			Korea
		(74) 代理人	100107515
			弁理士 廣田 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞シート製作方法及び応用のための高分子薄膜培養プレート製作方法及び用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジビニルベンゼンと 4 - ビニルピリジンが形成した共重合体でコーティングされた表面を有し、

前記ジビニルベンゼンと前記 4 - ビニルピリジンとのモル比が 1 ~ 3 : 4 (ジビニルベンゼン : 4 - ビニルピリジン)であることを特徴とする、培養プレート。

【請求項 2】

前記培養プレートは、細胞シート形態の細胞集合体製造用であることを特徴とする、請求項 1 に記載の培養プレート。

【請求項 3】

前記培養プレートの素材は、ガラス、金属、金属酸化物、繊維、紙、及びプラスチックで構成された群より選択されることを特徴とする、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の培養プレート。

【請求項 4】

前記プラスチックは、ポリエチレン (polyethylene、PE)、ポリプロピレン (polypropylene、PP)、ポリスチレン (polystyrene、PS)、ポリエチレンテレフタレート (polyethyleneterephthalate、PET)、ポリアミド (polyamides、PA)、ポリエステル (polyester、PES)、ポリ塩化ビニル (polyvinylchloride、PVC)、ポリウレタン (polyurethanes、PU)、ポリカーボネート (pol

10

20

y carbonate、PC)、ポリ塩化ビニリデン (polyvinylidene chloride、PVDC)、ポリテトラフルオロエチル (polytetrafluoroethylene、PTFE)、ポリエーテルエーテルケトン (polyether ether ketone、PEEK)、及びポリエーテルイミド (polyether imide、PEI) で構成された群より選択されることを特徴とする、請求項3に記載の培養プレート。

【請求項5】

ジビニルベンゼンと4 - ビニルピリジンが形成した共重合体でコーティングされた表面を有する培養プレートで細胞を培養するステップを含み、

前記ジビニルベンゼンと前記4 - ビニルピリジンとのモル比が1 ~ 3 : 4 (ジビニルベンゼン : 4 - ビニルピリジン) であることを特徴とする、細胞シート形態の細胞集合体製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2016年7月5日付で大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10 - 2016 - 0084856号に対して優先権を主張し、前記特許出願の開示事項は本明細書に参照として挿入される。

【0002】

本発明は培養プレートに関し、より詳しくは、表面自由エネルギー調節が可能な高分子薄膜コーティングを含む培養プレートとその製造方法及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

再生医学で組織工学的治療は生分解性高分子を基盤に細胞を培養して組織を再建し、損傷されるか、または機能不全に陥った臓器に移植して正常に機能するようにする治療法に発展している。しかしながら、生分解性高分子支持体が移植された時、免疫反応及び生分解性高分子の分解による炎症反応などの問題点を避けることはできない (非特許文献1)。他の方法には、細胞を生分解性高分子溶液に混ぜて人体に注入する方法があるが、この過程中、細胞のECM (Extra Cellular Matrix : 細胞外マトリックス) が破られて、ターゲット組織に移植した時、細胞再生効率が格段に低下するようになる (非特許文献2)。

【0004】

支持体無しで細胞を移植するために細胞シートが開発されており (非特許文献3)、現在最も多く使われる方法は日本のTeruo Okanoにより開発された技術であって、ポリスチレン (polystyrene) 培養皿の表面に電子ビーム照射により温度感応型高分子ポリ (N - イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を20nm以下の厚さで共有結合させるものである (非特許文献4 ~ 5、特許文献4)。温度感応型培養皿は表面の下限臨界温度 (lower critical solution temperature、LCST) 以上では細胞が付着して細胞シートを形成し、下限臨界温度以下では高分子が膨潤して細胞をシート形態に回収することができる (非特許文献6)。しかしながら、この方式は細胞の温度を20以下に下げなければならない、表面の化学的機能基を変えることに多くの制約があり、製作方法が難しいだけでなく、多くの時間がかかる等の限界点により汎用性及び商用化が困難な問題がある (非特許文献7)。

【0005】

温度感応型培養皿以外に、電気刺激、超音波刺激、pH感応型を用いた研究が進められたが、電気刺激及び超音波効果を発生させるためには主に金属物質 (Au、Ag、またはCNT) を使用しなければならないので、細胞培養用基板を製作するに当たって、コーティング方法に難しさが発生し、また高価の装備が必要であるので使用の限界点が発生する (非特許文献8 ~ 13)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

また、細胞シートを製作したとしても、これを実際に臨床的に適用するためにはシートを積層する過程が反復的に必要であり、これを効率よく適用しようとする部位に転写可能でなければならない。しかしながら、現在まで知られている方法は相変らず積層と転写 (transfer) 時、再現性が不足し、過程が複雑で、消耗時間が長いという短所がある。特に、既存の大部分の細胞シート転写方法は多数枚の細胞シートを一度に転写するよりは、単層の細胞シートを個別的に転写して積層する方法を選択した。したがって、よりやさしくて速く細胞シートを積層すると共に、他の基板及び疾病モデルなどに転写することができる新たな細胞シートの転写方法開発に対する必要性が提起されている実状である。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 大韓民国登録特許 10 - 1583159

【 特許文献 2 】 大韓民国出願特許 10 - 2016 - 0056040

【 特許文献 3 】 大韓民国登録特許 10 - 2006 - 0091301

【 特許文献 4 】 米国特許出願公開第 2008 / 0131476 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Ronneberger B et al., J Biomed Mater Res, 1996, 30 (1), 31 - 40 20

【 非特許文献 2 】 Canavan H et al., J Biomed Mater Res A, 2005 Oct 1; 75 (1): 1 - 13

【 非特許文献 3 】 Yang J et al., Biomaterials, 2005 Nov; 26 (33): 6415 - 22

【 非特許文献 4 】 Tang J et al., Polymers, 2012, 4, 1478 - 1498

【 非特許文献 5 】 Yang J et al., Biomaterials, 2007; 28 (34): 5033 - 5043

【 非特許文献 6 】 Haraguchi, Y. et al., Nat. Protoc., 2012, 7, 850 - 858 30

【 非特許文献 7 】 Akiyama, Y. et al., Langmuir, 2004, 20, 5506 - 5511

【 非特許文献 8 】 Guillaume - Gentil O et al., Adv. Mater., 2008, 20, 560 - 565

【 非特許文献 9 】 Guillaume - Gentil O et al., Biomaterials, 2011, 32, 4376 - 4384

【 非特許文献 10 】 Hong Y, et al., Biomaterials, 2013, 34 (1), 11 - 18

【 非特許文献 11 】 L. Junge et al., Ultrasound in Med. & Biol., 2003, 29, 1769 - 1776 40

【 非特許文献 12 】 Sada T et al., ACS Nano, 2011, 5, 4414 - 4421

【 非特許文献 13 】 Kolesnikova T et al., ACS Nano, 2012, 6, 9585 - 9595

【 0 0 0 9 】

本明細書の全体に亘って多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容はその全体として本明細書に参照として挿入されて、本発明が属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【 発明の概要 】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは前記の問題点を解決するために、例の努力した結果、細胞と培養表面の接着力に影響を与える表面自由エネルギー (Surface free energy) を調節することによって、多様な形態に細胞シートの形成及び分離が可能であるだけでなく、細胞外マトリックス (extracellular matrix) が含まれた状態で回収されるので、細胞シートの積層が可能であるということを確認した。また、開始剤を用いた化学気相蒸着法 (initiated chemical vapor deposition: iCVD) による培養プレートのコーティングは気相蒸着工程であるので、基板の制約がなく、比較的短い時間に多様な機能性高分子をコーティングすることができるので、汎用性及び商用化において大きな長所を有しているだけでなく、共重合体コーティングを通じて表面自由エネルギーを調節して細胞シートを形成することができることを確認し、本発明を完成するに至った。

10

【0011】

したがって、本発明の目的は、培養プレートを提供することにある。

【0012】

本発明の他の目的は、細胞シート形態の細胞集合体製造方法を提供することにある。

【0013】

本発明の更に他の目的は、開始剤を用いた化学気相蒸着法を用いて培養プレート表面改質方法を提供することにある。

20

【0014】

本発明の目的は以上から言及した目的に制限されず、言及されていない本発明の他の目的及び長所は以下の説明により理解されることができ、本発明の実施形態により、より明らかに知ようになる。また、本発明の目的及び長所は請求範囲に示した手段及び組合せにより実現できることが容易に分かる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の一態様によれば、本発明は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートを提供する。

30

【0016】

本明細書で使われた表現、“表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体”は表面自由エネルギーが 60 mJ/m^2 以下である単量体を意味する。“表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体”は表面自由エネルギーが 60 mJ/m^2 以上である単量体を意味する。また、“第1単量体と第2単量体が形成した共重合体”は、前記第1単量体と第2単量体を用いて形成された表面自由エネルギーが $30 \text{ mJ/m}^2 \sim 90 \text{ mJ/m}^2$ である共重合体を意味する。

【0017】

本発明によれば、培養プレートの表面自由エネルギーが第1単量体または第2単量体により形成された同種重合体 (homopolymer) を通じて $30 \text{ mJ/m}^2 \sim 90 \text{ mJ/m}^2$ で具現される場合を意味することもある。

40

【0018】

本明細書で使われた表現、“表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレート”は、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレート的一部分である場合 (例えば、前記共重合体で表面がコーティングされた培養プレート) を意味するだけでなく、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体自体を培養プレートに使用できることを意味するために使われる。

50

【0019】

本明細書で、第1単量体は細胞付着の弱い低い表面自由エネルギーを有する単量体である。例えば、芳香族ビニル系単量体（例えば、ジビニルベンゼン（divinylbenzene）、ビニルベンゾエート（Vinyl Benzoate）、スチレン（styrene）など）、メタアクリレート系単量体（例えば、ベンジルメタアクリレート（Benzyl Methacrylate）、シクロヘキシルメタアクリレート（Cyclohexyl Methacrylate）、ブチルメタアクリレート（butyl methacrylate）、イソプロピルメタアクリレート（Isopropyl methacrylate）、エチレングリコールジメタアクリレート（ethylene glycol dimethacrylate）、ヒドロキシエチルメタアクリレート（hydroxyethyl methacrylate）、フッ素系列単量体（フルフリルメタアクリレート（furfuryl methacrylate）、パーフルオロデシルアクリレート（perfluorodecyl acrylate））、ビニル基を有するシラザンまたはシクロシラザン（例えば、2, 4, 6, 8 - テトラメチル（tetramethyl）- 2, 4, 6, 8 - テトラビニルシクロテトラシロキサン（tetravinyl cyclotetrasiloxane）、1, 3, 5 - トリビニル（trivinyl）- 1, 3, 5 - トリメチルシクロトリシロキサン（trimethyl cyclotrisiloxane）、ヘキサビニルジシロキサン（hexavinyl disiloxane）など）、エポキシ作用基を有する単量体（グリシジルメタアクリレート（Glycidyl methacrylate）など）、架橋剤に使われる単量体（エチレングリコールジメタアクリレート（Ethylene glycol dimethacrylate）、エチレングリコールジアクリレート（Ethylene glycol diacrylate）、ジ（エチレングリコール）ジビニルエーテル（Di（ethylene glycol） divinylether）など）で構成された群より選択される単量体でありうる。

【0020】

本明細書で、第2単量体は細胞付着の強い高い表面自由エネルギーを有する単量体である。例えば、ビニル系アミン（2 - ビニルピリジン（vinylpyridine）、4 - ビニルピリジン（vinylpyridine）、1 - ビニルイミダゾール（vinylimidazole）、1 - ビニルピロリドン（vinylpyrrolidone）、2 - ビニルピリジン（vinylpyridine）、4 - アミノスチレン（aminostyrene）、9 - ビニルカルバゾール（vinylcabazole）など）、メタアクリレート系アミン（2 - （ジメチルアミノ）エチルメタアクリレート（（Dimethylamino）ethyl methacrylate）、ジエチルアミノエチルアクリレート（diethylaminoethylacrylate）、ジメチルアミノエチルアクリレート（dimethylaminoethylacrylate）、ジエチルアミノエチルアクリレート（diethylaminoethylacrylate）など）、酸性の作用基を有する単量体（マレイックアンハイドライド（Maleic anhydride）、メタアクリル酸（Methacrylic acid）など）、アクリルアミド（acrylamide）、メタクリルアミド（methacrylamide）、塩素系列作用基を有する単量体（4 - ビニルベンジルクロライド（Vinylbenzyl chloride）、2 - クロロエチルアクリレート（Chloroethyl acrylate）など）、シアン系列単量体（シアノエチルアクリレート（Cyanoethyl acrylate）、ビニルベンジルシアニド（Vinylbenzyl cyanide）など）、ビニル - N - メチルピリジニウムクロリド（vinyl - N - methylpyridinium chloride）で構成された群より選択される単量体でありうる。

【0021】

本発明において、第1単量体と第2単量体が形成する共重合体形成時、混合割合の制限はない。第1単量体と第2単量体の混合割合は1%～99%まで調節可能である。

【0022】

したがって、本発明の一具現例によれば、第1単量体は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする単量体であり、第2単量体は表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする単量体である。

【0023】

1つの特定例によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体はジビニルベンゼン(divinylbenzene(以下、'DVB'と命名する))であり、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体は4-ビニルピリジン(4-vinylpyridine(以下、'4VP'と命名する))であり、前記第1単量体と第2単量体が形成した共重合体はジビニルベンゼン-4-ビニルピリジン共重合体(Poly(divinylbenzene-co-4-vinylpyridine))(以下、'PD4V'と命名する)である。

10

【0024】

本発明の他の具現例によれば、前記表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体上で細胞を培養することによって、細胞シート形態の細胞集合体を製造することができる(図1)。

【0025】

本発明の他の態様によれば、本発明は本発明の培養プレートで細胞を培養するステップを含む細胞シート形態の細胞集合体製造方法を提供する。

20

【0026】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は開始剤を分解して遊離ラジカル(free radical)を形成するステップと、遊離ラジカルにより第1単量体と第2単量体を重合反応させて共重合体を形成するステップと、培養プレートに共重合体が蒸着されて薄膜を形成するステップとを含む化学気相蒸着法を用いた培養プレート表面改質方法を提供する。

【0027】

本明細書で、化学気相蒸着法は開始剤を用いた化学気相蒸着法(initiated chemical vapor deposition: iCVD)を用いることができる。一方、開始剤は熱または電気により分解されて遊離ラジカルを生成し、前記遊離ラジカルにより第1単量体と第2単量体を活性化させることによって、前記単量体を連鎖重合反応させて共重合体を形成するようになり、前記共重合体が蒸着されて薄膜を形成することによって、培養プレートの表面を改質することができる。また、培養プレートの高分子薄膜の厚さは特別に制限されないが、例えば、5nm~500μmでありうる。支持体層の厚さがあまり薄いか厚ければ、薄膜形成の効率性と細胞培養のための薄膜表面の安定性に影響を及ぼすことがある。

30

【0028】

一方、iCVDは高分子薄膜が蒸着される基板表面の温度が10~45の間に低く維持される低温及び低真空工程であるので、プラスチック材質の多様な培養プレート(35pi、100piディッシュ、6、12、24、96ウェルプレート)に損傷無しで多様な高分子コーティングが可能である。既存に使われるディップコーティング、スピンコーティングなどの液状工程は、溶媒による基板損傷問題、不均衡コーティングなどの問題を有しているので、iCVDを通じて培養プレートに製作すれば、既存のコーティング方法で不可能であったコーティング問題を解決することができる。

40

【0029】

本発明によれば、前記培養プレートは細胞を培養することができる任意の空間を提供することで充分であるので、その形態は制限がない。例えば、培養プレートはディッシュ(培養皿)、シャーレやプレート(例えば、6ウェル、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、9600ウェルなどのマイクロタイタープレート、マイクロプレート

50

、ディップウェルプレートなど)、フラスコ、チャンバースライド、チューブ、セルフアクトリー、ローラーボトル、スピナーフラスコ、中空繊維(hollow fibers)、マイクロキャリア、ビーズなどの形状を有することができる。また、支持性を有する物質であれば、前記培養プレートに制限無しで使用することができ、例えば、プラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンなど)、金属、シリコン、及びガラスなどの材質を培養プレートに使用することができる。本発明の一実施形態に従う培養プレートの構造は図1に図示されている。

【0030】

本発明の一具現例によれば、第1単量体は表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする単量体であり、第2単量体は表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする単量体である。

10

【0031】

1つの特定例によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体はDVBであり、表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体は4VPであり、前記第1単量体と第2単量体が形成した共重合体はPD4Vである。

【0032】

他の1つの特定例によれば、図2に開示されたように、iCVDにより共重合体蒸着時、第1単量体であるDVBと第2単量体である4VPの注入割合によって細胞シート(cell sheet)形態または細胞スフェロイド(cell spheroid)形態の細胞集合体に培養することができ、DVB注入割合が高いほどスフェロイド形態の細胞集合体に培養することに適合した培養プレート表面改質が可能であり、DVB対4VPの注入割合が増加するほどシート形態の細胞集合体に培養することに適合した培養プレート表面改質が可能である。一方、単量体の注入割合を調節すれば、接触角と表面エネルギーが異なる培養プレート表面を製作することができ、各共重合体コーティング表面のエネルギーによって細胞と培養プレート表面との接着力が変わって、各々異なる形態に細胞が育つようになり、温度変化無しで培養プレート表面から細胞シート形態の細胞集合体を分離することができる。

20

【0033】

本発明の培養プレート上で多様な細胞を培養して細胞シートを形成することができる。培養される細胞は本発明で特別に限定されず、例えば、心臓、筋肉、肝、骨、骨髄、胸腺、腎臓、脾臓、肺、脳、精巣、卵巣、ランゲルハンス島(islet)、内臓、耳、皮膚、胆嚢組織、前立腺、膀胱、胚芽(embryo)、免疫系、及び造血系などから分離または活性化できる細胞を使用することができる。好ましくは、各種の幹細胞、角膜上皮細胞、神経細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、腎臓細胞、肝細胞、脂肪細胞、角質細胞、筋肉細胞、心臓筋肉細胞、または食道上皮細胞を含む。

30

【0034】

本発明の他の態様によれば、本発明はホール構造体を用いた細胞シート形態の細胞集合体の積層及び転写(transfer)方法を提供する。

【0035】

前記細胞集合体の積層及び転写方法は、次のステップを含むことができる：

40

(a)細胞シート形態の細胞集合体をホール構造体(structure with holes)の表面に1層以上付着するステップ；及び

(b)細胞集合体の適用を必要とする部位に細胞集合体が付着された面が対向するようにホール構造体を配置した後、ホール構造体のみを剥離するステップ。

【0036】

本発明の一具現例によれば、前記ホール構造体は細胞シート形態の細胞集合体を、適用を必要とする場所または部位に容易に適用できるように細胞集合体を載置することができるメンブレン形態の構造物をいう。前記ホール構造体は、例えばニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、ポリビニリデンフルオライド(Polyvinylidene fluoride)(PVDF)メンブレン、ポリテトラフルオロエチレン(Poly

50

tetrafluoroethylene) (PTFE) メンブレン、ポリカーボネート (polycarbonate) メンブレン、MCE (mixed cellulose ester) メンブレン、ポリアミドメンブレン、及び PES (Polyether sulfone) メンブレンからなる群より選択されたものであって、1つ以上の孔があることなどでありうるが、これに限定されるものではなく、当業界で使われることができる多様な種類のメンブレンを制限無しで使用することができることを特徴とする方法。

【0037】

本発明の一具現例によれば、前記ホール構造体は1つ以上の孔があるものが好ましく、孔の個数と形態には制限がないし、孔のサイズは細胞シート形態の細胞集合体をメンブレンの孔の上に上げて置いても下に通過されなければ制限がない。

10

【0038】

本発明の他の一具現例によれば、前記ホール構造体を細胞集合体から剥離する時、細胞集合体が付着された面の反対面に燐酸緩衝溶液、または細胞培養培地を点滴するステップを追加的に含むことができる。

【0039】

前述した細胞集合体の転写方法で使われたホール構造体の構造的特徴は構造体上に孔が形成されているということで、前記孔は細胞シートとメンブレンとの間の過度な付着力を防止すると共に、効果的な転写が可能であるようにする。

【0040】

第一に、孔が生じるようになれば、メンブレンとシートとの間の接触面積が相対的に減って、絶対的な付着力が少なくなり、転写が容易になる。

20

【0041】

第2に、転写時、孔を通じて燐酸緩衝溶液や細胞培養液を少量流せば、細胞シートとメンブレンが互いによりよく離れることができる。

【発明の効果】

【0042】

前記のような本発明によれば、表面自由エネルギーの低い薄膜を形成するようにする第1単量体と表面自由エネルギーの高い薄膜を形成するようにする第2単量体が形成した共重合体を含む培養プレートとその製造方法、及び前記培養プレートを用いて細胞シート形態の細胞集合体を製造する方法を提供することによって、従来技術と比較して易しく簡単な工程により細胞シート形態の細胞集合体を生産及び分離回収することができる効果がある。

30

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】本発明の一実施形態に従う培養プレートの構造である。

【図2】本発明の単量体注入割合に従う細胞集合体形態に対する模式図である。

【図3】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子 (pDVB)、第2単量体高分子 (p4VP)、共重合体である pD4V がコーティングされた表面の化学的構造を FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) で分析した結果である。

40

【図4】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子 (pDVB)、第2単量体高分子 (p4VP)、共重合体である pD4V がコーティングされた表面の接触角 (contact angle) と表面自由エネルギー (surface free energy) を測定した結果である。

【図5】本発明の一実施形態で製造された第1単量体高分子 (pDVB)、第2単量体高分子 (p4VP)、共重合体 (pD4V) がコーティングされた表面で培養された細胞 (NIH3T3) の顕微鏡イメージ結果である。

【図6】本発明の培養プレートで培養された細胞シート形態がバッファ (buffer) により自発的に離れて出るイメージである。

【図7】本発明の一実施形態で製造された pD4V がコーティングされた表面で成体幹細胞

50

胞シート (hMSC cell sheet) が形成され、自発的に分離回収される過程を示す光学的及び蛍光顕微鏡イメージである。

【図8】本発明の細胞シートをホール構造体上に積層させ、基板や疾病モデルなど、細胞シートの適用を必要とする個所に適用する過程を示した模式図である。

【図9】本発明の培養プレートで形成された細胞シートを分離回収して2つの細胞シートを積層して置いたイメージである。

【発明を実施するための形態】

【0044】

本発明の前述した目的、特徴、及び長所は添付した図面を参照して後述されている詳細な説明を通じてより明確になり、それによって、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者が本発明の技術的思想を容易に実施することができる。また、本発明を説明するに当たって、本発明と関連した公知技術に対する具体的な説明が本発明の要旨を不必要に曖昧にすることがあると判断される場合に、その詳細な説明を省略する。以下、添付した図面を共に参照して、本発明に従う好ましい実施形態を詳細に説明する。

【実施例】

【0045】

実施形態1．培養プレートの製造

pD4V蒸着時、化学気相蒸着反応器 (iCVD、Daeki Hi-Tech Co., Ltd) を使用して、DVB (ジビニルベンゼン) 単量体 (Sigma-Aldrich)、4VP (4-ビニルピリジン) 単量体 (Sigma-Aldrich) と開始剤 (tert-ブチルペルオキシド、TBPO、Sigma-Aldrich) を60:240:60の割合でiCVD反応器内に流しながら、反応器内のフィラメントの温度は140℃、反応器内の基板温度は23℃、反応器内チャンバーの圧力は300mTorrに維持しながら1時間30分蒸着を遂行して、400nm厚さのDVB-4VP共重合体 (npD4V) が蒸着された培養プレートを得た。

【0046】

実施形態2．細胞シート培養プレート表面分析

重合体薄膜を蒸着した後、フーリエ変換赤外線分光光学 (FT-IR、ALPHA FT-IR吸光モード、Bruker Optics) を用いて重合体の分子骨格及び分率を測定した。その結果、図3に示したように、 1596 cm^{-1} と 1415 cm^{-1} (左側2つの点線) ピークを通じて4VP分子の存在を、 710 cm^{-1} と 903 cm^{-1} (右側2つの点線) ピークを通じてDVB分子の存在及び重合体合成を確認した。

【0047】

重合体薄膜を蒸着した後、接触角測定装置 (Contact Angle Analyzer (Phoenix 150、SEO, Inc.)) を用いて5μlの蒸溜水とダイアイオドメタン (Diiodomethane、DIM) に対して基板の表面接触角を測定した。その結果、図4に示したように、単量体の混合割合によって形成された重合体により表面が改質されて接触角が変わることを確認することができた。これに基づいてVan Oss-Chaudhury-Good (OCG) 数式を用いて基板の表面自由エネルギーを計算した。その結果、重合体の分率によって表面自由エネルギー値が変わることを確認した。

【0048】

実施形態3．共重合体分率に従う細胞形態観察

DVB-4VP共重合体 (pD4V) がコーティングされている細胞培養皿にNIH3T3細胞を培養した後、細胞シート形成有無を確認した。細胞が十分に育った時、4%ホルムアルデヒドで固定し、DAPIとファロイジン (phalloidin) を用いて核とアクチンを染色して蛍光顕微鏡で観察した。図5に示したように、全ての培養プレートで細胞が毒性無しでよく育つことが確認されており、DVB培養表面では細胞スフェロイド (spheroids) が形成され、4VP培養表面では細胞が付着されて育つことが観察された。一方、共重合体培養表面 (pD4V1、pD4V2) では細胞が付着されて

育ったが、DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) を用いて洗浄した後に、自ずから細胞シート形態に離れて出ることが観察された。

【0049】

実施形態4．細胞シート形成及び分離

前記実施形態1により製造されたpD4Vが蒸着された35piディッシュでNIH3T3とhMSCを培養後、細胞シート形成を確認した。細胞培養はNIH3T3細胞をDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) / 10% FBS / 1% 抗生剤 (ペニシリンストレプトマイシン、Gibco) で、hMSC細胞はMEMα (Minimum Essential Medium α) / 17% FBS / 1% 抗生剤 (ペニシリンストレプトマイシン、Gibco) 培地を使用し、3日～5日培養したら細胞シートが形成された。この際、培養液を除去し、DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline) で洗浄すれば、形成された細胞シートが培養プレート表面から自発的に分離されて出ることを確認することができた (図6及び図7)。

10

【0050】

実施形態5．培養プレートで形成された細胞シートを分離回収後、細胞シートの積層方法

細胞シートを製造するためには、pD4V重合体がコーティングされている細胞培養プレートに細胞を培養して細胞間の接合が十分に起こることができるまで培養した後、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 溶液を用いて培養した細胞をシート形態に分離すればよい。培養皿上で剥離した1枚の細胞シートを吸引して新たな細胞培養皿に移した後、37℃ 飽和水蒸気のインキュベーターに適切な時間 (例えば、15分間～30分間) 放置した。その間に細胞シートは培養皿上に接着した。次に、剥離した直後の2番目の細胞シートを培養液と共にピペットで吸引して、培養皿上に固定された最初の細胞シートの上に滴下した。滴下した2枚のシートに、また新たな培養液をゆっくり滴下することによって、2番目のシートを最初のシートに重なった状態で接合することができた。同一な手法を繰り返して細胞シートを順に積層化することができた。

20

【0051】

実施形態6．細胞シートを積層後、転写時、ホール構造体を用いる方法

本発明により製作された前記細胞シートを積層し、これを他の細胞培養皿または細胞シートの適用を必要とする客体に一層容易に転写 (transfer) するために、次のような方法を使用した。

30

【0052】

まず、図8に示したように、培養皿上で剥離した1枚の細胞シートをホール構造体 (例えば、1つ以上の孔があるニトロセルロースメンブレン) の表面に滴下して付着させた。次に、剥離した他の細胞シートを前記ニトロセルロースメンブレンに先に付着された細胞シートの表面に追加的に滴下して付着させることによって、2枚の細胞シートを積層した。同一な方法を繰り返すと、所望の数の細胞シートをメンブレンに積層することができる。

40

【0053】

前記積層した2枚の細胞シートをメンブレンと共に新たな細胞培養皿に移した後、37℃ 飽和水蒸気のインキュベーターに適切な時間 (例えば、5分間～30分間) インキュベーションした。その結果、積層された細胞シートは培養皿上に接着され、ホール構造体メンブレンから落ちる。このように、細胞シートをホール構造体に積層して所望の個所に転写 (transfer) することが可能である。

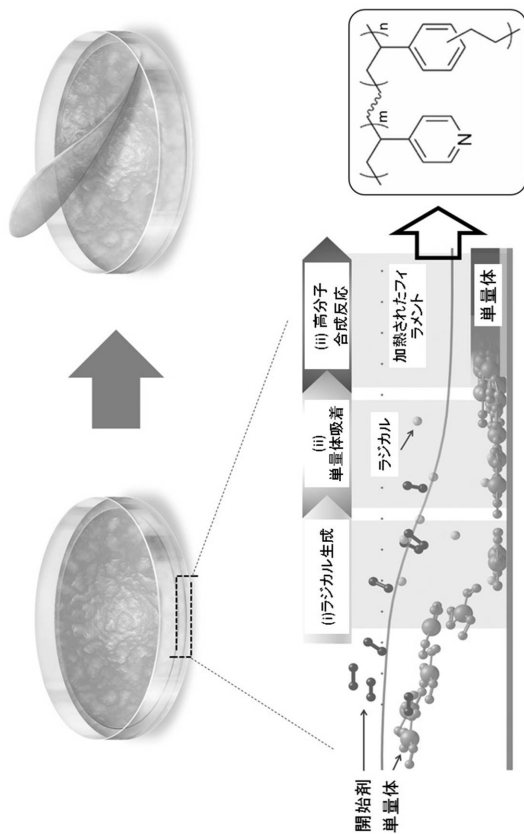
【0054】

以上で説明した本発明は、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者において、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内でさまざまな置換、変形、及び変更が可能である

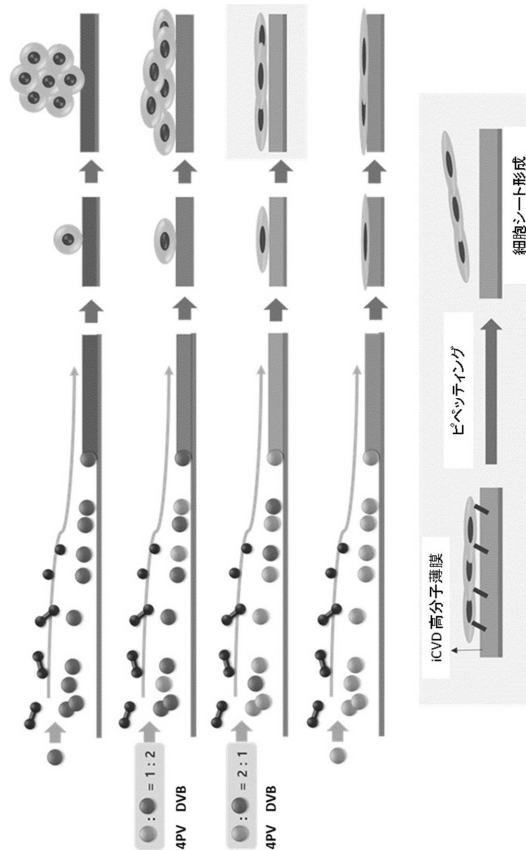
50

ので、前述した実施形態及び添付した図面により限定されるものではない。

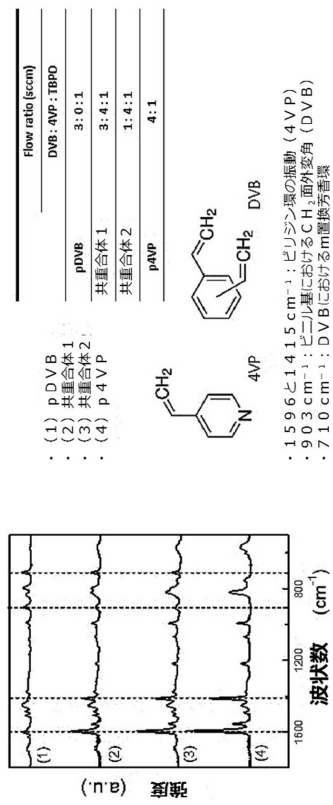
【図 1】



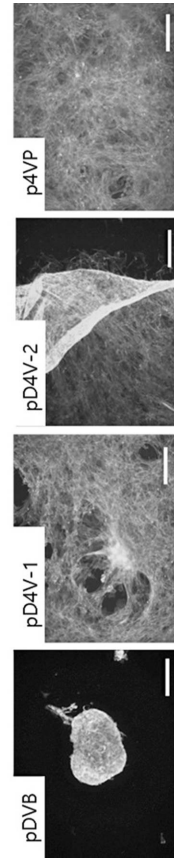
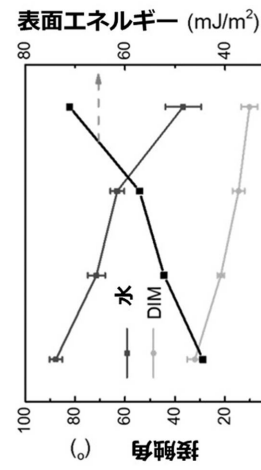
【図 2】



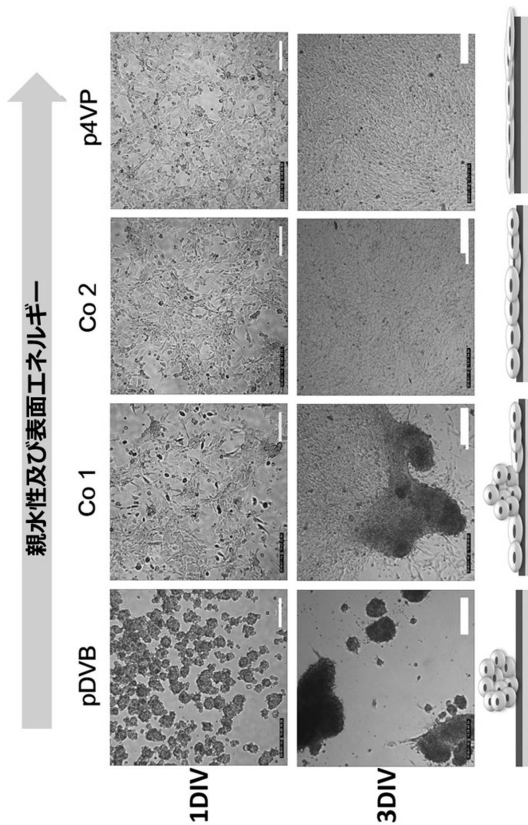
【図 3】



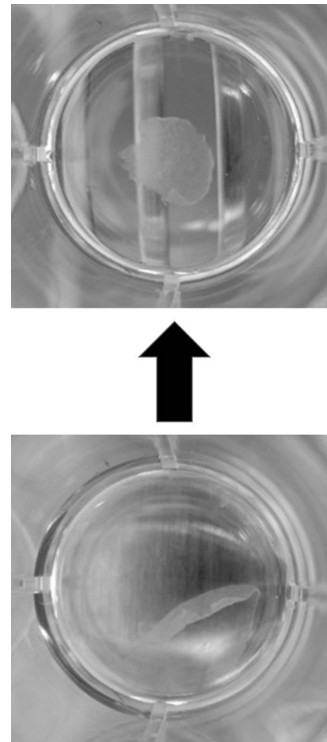
【図 4】



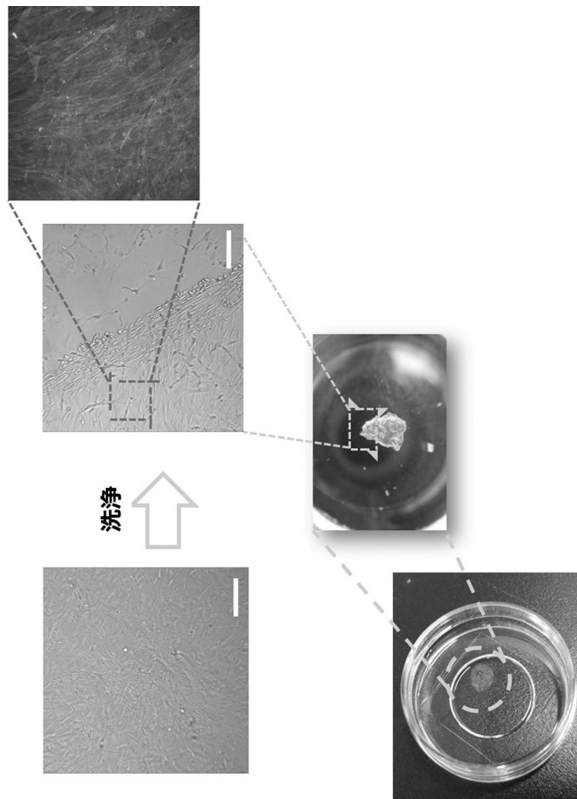
【図 5】



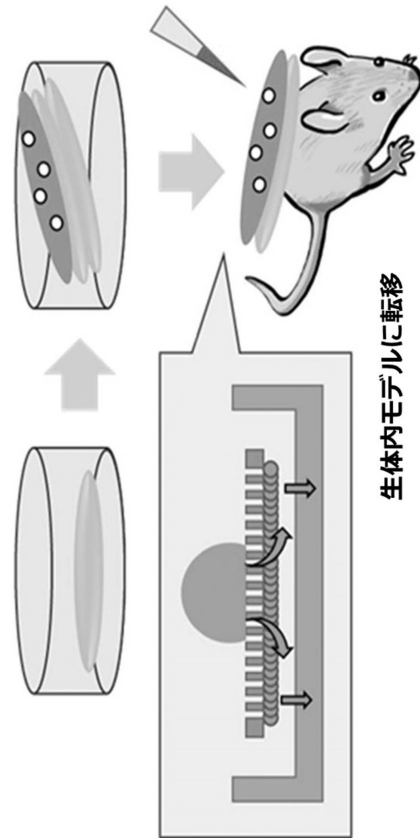
【図 6】



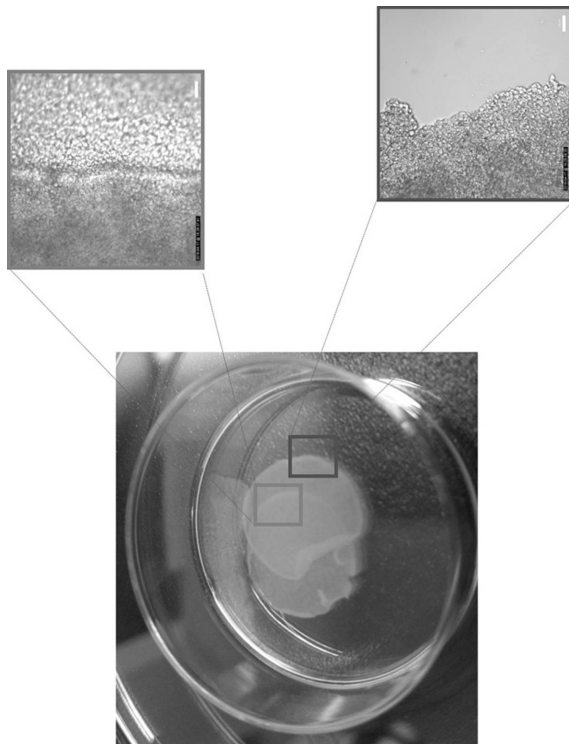
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 0 8 J	7/04	(2020.01)	C 0 8 J	7/04 C E R Z
C 2 3 C	16/44	(2006.01)	C 0 8 J	7/04 C E Z Z
			C 2 3 C	16/44 A

(74)代理人 100107733
弁理士 流 良広

(74)代理人 100115347
弁理士 松田 奈緒子

(72)発明者 スンガブ・イム
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72)発明者 ウンジョン・リ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72)発明者 ジウン・ペク
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72)発明者 ヨンハク・チョ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72)発明者 スンチョン・ユ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

(72)発明者 コロ・チェ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - 口 2 9 1

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表2015 - 527428 (JP, A)
韓国公開特許第10 - 2015 - 0142564 (KR, A)
特開2011 - 078316 (JP, A)
特開2015 - 211665 (JP, A)
特開2014 - 075979 (JP, A)
特表2011 - 510658 (JP, A)
特表2009 - 535025 (JP, A)
特開平04 - 252186 (JP, A)
特開昭55 - 097255 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M
C 1 2 N
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)