

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7033095号
(P7033095)

(45)発行日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(24)登録日 令和4年3月1日(2022.3.1)

| | | | | | |
|------------|----------------|---------|-------|---|--|
| (51)国際特許分類 | | F I | | | |
| C 1 2 N | 5/077(2010.01) | C 1 2 N | 5/077 | | |
| C 1 2 M | 3/00 (2006.01) | C 1 2 M | 3/00 | A | |

請求項の数 11 (全14頁)

| | | | |
|----------|----------------------------------|----------|------------------------------------------------------|
| (21)出願番号 | 特願2019-38756(P2019-38756) | (73)特許権者 | 000226976 日清食品ホールディングス株式会社 大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号 |
| (22)出願日 | 平成31年3月4日(2019.3.4) | (73)特許権者 | 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号 |
| (65)公開番号 | 特開2020-141573(P2020-141573 A) | (74)代理人 | 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所 |
| (43)公開日 | 令和2年9月10日(2020.9.10) | (72)発明者 | 竹内 昌治 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立 大学法人東京大学内 |
| 審査請求日 | 令和3年9月24日(2021.9.24) | (72)発明者 | 森本 雄矢 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立 大学法人東京大学内 |
| 早期審査対象出願 | | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 三次元筋組織とその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第1の細胞モジュール、及び、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第2の細胞モジュールであって、該第2の細胞モジュールの穴の少なくとも一部は垂直方向において前記第1の細胞モジュールの穴とは異なる位置にある第2の細胞モジュールを作成する工程、得られた前記第1の細胞モジュールと前記第2の細胞モジュールとを交互に積層し積層体を得る工程、並びに骨格筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程を含む、三次元筋組織の製造方法。

【請求項2】

ハイドロゲルが0.3mg/mL以上コラーゲンを含む、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

ハイドロゲルが10~1000μMのビタミンC(アスコルビン酸)を含む、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】

第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの穴が、短手方向200~2000μm幅である、請求項1~3のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項5】

第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの隣接する穴の間隔が、短手方向200~2000μmである、請求項1~4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 6】

第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールの大きさが、短手方向 3 mm 以上及び長手方向 9 mm 以上である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールを合計 6 枚以上積層する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 8】

積層体において、第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールの長手方向両端が固定されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 9】

食用の三次元筋組織の製造方法である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

骨格筋芽細胞がウシの骨格筋芽細胞である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の製造方法により得られる、三次元筋組織であって、前記三次元筋組織は配向された筋管又は筋線維の束を含む、三次元筋組織。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、主に三次元筋組織の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

人口増加や新興国の所得増加に伴い、食肉需要は増大している。一方で、家畜の飼料となる穀物価格の高騰や飼育場所確保の問題から、食肉供給量を増やすことは難しく、代替肉の開発が期待されている。

【0003】

培養肉（三次元筋組織）は、培養により増やした骨格筋細胞を用いて、組織を形成することで作られる。実験室内で生産可能なことから気候変動に左右されない生産が可能であり、また従来の畜産と比較し温室効果ガス排出量が少なく環境負荷も小さい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】日本国特開 2018 - 000194 号

日本国特許 6427836 号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ステーキ肉のような食感を持つ食肉を細胞から作り出すためには、成熟した三次元筋組織を構築する必要がある。再生医療分野ではヒトやマウスの骨格筋細胞を用いて三次元筋組織の構築が報告されている（特許文献 1、2）。しかし、食用の培養肉に特化した条件の検討は不十分である。

【0006】

本発明は、特に食用に適した三次元筋組織の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記課題を鑑みて鋭意検討を重ねた結果、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第 1 の細胞モジュール、及び、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、垂直方向において前記第 1 の細胞モジュールとは異なる位置に互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第 2 の細胞モジ

10

20

30

40

50

ジュールを作成する工程；得られた前記第1の細胞モジュールと前記第2の細胞モジュールとを交互に積層し積層体を得る工程；得られた積層体に含まれる骨格筋芽細胞を増殖培養する工程；及び増殖した骨格筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程を含む製造方法により上記の課題を解決できることを見いだした。本発明は、このような発見にさらに検討を重ねて完成したものである。

【0008】

本発明は、以下の態様を包含する。

【0009】

項1、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第1の細胞モジュール、及び、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第2の細胞モジュールであって、該第2の細胞モジュールの穴の少なくとも一部は垂直方向において前記第1の細胞モジュールの穴とは異なる位置にある第2の細胞モジュールを作成する工程、得られた前記第1の細胞モジュールと前記第2の細胞モジュールとを交互に積層し積層体を得る工程、並びに骨格筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程を含む、三次元筋組織の製造方法。

10

【0010】

項2、ハイドロゲルが0.3mg/mL以上コラーゲンを含む、項1に記載の製造方法。

【0011】

項3、ハイドロゲルが10~1000μMのビタミンC(アスコルビン酸)を含む、項1又は2に記載の製造方法。

20

【0012】

項4、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの穴が、短手方向200~2000μm幅である、項1~3のいずれか1項に記載の製造方法。

【0013】

項5、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの隣接する穴の間隔が、短手方向200~2000μmである、項1~4のいずれか1項に記載の製造方法。

【0014】

項6、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの大きさが、短手方向3mm以上及び長手方向9mm以上である、項1~5のいずれか1項に記載の製造方法。

30

【0015】

項7、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールを合計6枚以上積層する、項1~6のいずれか1項に記載の製造方法。

【0016】

項8、積層体において、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの長手方向両端が固定されている、項1~7のいずれか1項に記載の製造方法。

【0017】

項9、食肉用の三次元筋組織の製造方法である、項1~8のいずれか1項に記載の製造方法。

【0018】

項10、骨格筋芽細胞がウシの骨格筋芽細胞である、項1~9のいずれか1項に記載の製造方法。

40

【0019】

項11、項1~10のいずれか1項に記載の製造方法により得られる、三次元筋組織。

【発明の効果】

【0020】

本発明により、特に食用に適した三次元筋組織の製造方法が提供される。本発明の製造方法により製造される三次元筋組織は、生体由来の筋肉と同様に、サルコメア構造を有する。また、食用に適した十分な大きさを有する三次元筋組織を製造することができる。そのため、本発明の製造方法により製造された三次元筋組織は、食用に供した際に畜産された

50

肉に近い食感が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの形状の一例。

【図2】細胞モジュールの作製方法の一例。

【図3】細胞モジュールの積層方法の一例。

【図4】Fusion indexの算出結果。

【図5】三次元筋組織の形成手法。

【図6】ハイドロゲル組成検討の結果。

【図7】細胞濃度検討の結果。

【図8】三次元大型筋組織の形成手法。

【図9】ウシ筋芽細胞を3層積層した結果。

【図10】マウス筋芽細胞を25層積層した結果。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明の、三次元筋組織の製造方法は、

ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第1の細胞モジュール、及び、ハイドロゲルに骨格筋芽細胞を含んでおり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第2の細胞モジュールであって、該第2の細胞モジュールの穴の少なくとも一部は垂直方向において前記第1の細胞モジュールの穴とは異なる位置にある第2の細胞モジュールを作製する工程、

得られた前記第1の細胞モジュールと前記第2の細胞モジュールとを交互に積層し積層体を得る工程、並びに

骨格筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程を含む。

【0023】

本発明において、三次元筋組織とは、生体に由来せず、人工的に製造された筋肉を主に意味する。本発明の三次元筋組織は、骨格筋細胞（横紋筋細胞）から構成される。骨格筋細胞は、その前駆体である筋芽細胞が多核化した筋管又は筋線維の形態である。

【0024】

一般に、筋線維は、筋肉を構成するタンパク質であるアクチンの線維（アクチンフィラメント）及び筋肉を構成するタンパク質であるミオシンの線維（ミオシンフィラメント）から構成される筋原線維を構成単位とする。さらに、筋原線維は複数のサルコメア構造が長軸方向に連なった構造を有している。サルコメアにおけるアクチン及びミオシンの相互作用（滑り込み）に基づき、筋肉の収縮及び弛緩が発生することが知られている。

【0025】

本発明の三次元筋組織は、サルコメア構造を有する。ただし、サルコメア構造における滑り込みが生じるか否かは問わない。

【0026】

三次元筋組織は、サルコメア構造を有するか否かは、公知の手法により評価することができる。例えば、サルコメア構造のZ膜を構成するタンパク質であるsarcomeric α -actinin (SAA) が存在することをSAAの免疫染色により評価し、SAA免疫染色が陽性かつSAAが規則的な縞状に分布している場合にサルコメア構造を有すると判定することができる。

【0027】

本発明の三次元筋組織は、好ましくは食用の三次元筋組織である。食用の三次元筋組織は、「培養肉」、「人工食肉」等と換言することができる。本発明の三次元筋組織が食用の三次元筋組織である場合、本発明の製造方法で用いる成分（好ましくはすべての成分）は、所定の基準を満たして食品製造用及び/又は食品用としての安全性が確保された成分であることが好ましいが、これに限定されない。

【0028】

本発明の製造方法における第1の工程は、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュール

10

20

30

40

50

ルを作製する工程である。以下、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールを包括して「細胞モジュール」と記載する場合がある。

【0029】

本発明の細胞モジュールはハイドロゲル中に骨格筋芽細胞を含んでいる。骨格筋芽細胞は、公知の手法により調製することができる。例えば、生体由来の筋組織を分解酵素（例えば、コラゲナーゼ）の処理を施して得られる初代筋芽細胞を使用することができる。初代筋芽細胞は、結合組織などの不純物を除去するために、フィルター処理を施すことが好ましい。

【0030】

また、骨格筋芽細胞は、ES細胞、iPS細胞のような万能性を有する幹細胞や骨格筋芽細胞へ分化する能力を有する体性幹細胞から分化誘導した細胞を用いることもできる。

10

【0031】

骨格筋芽細胞は、ほ乳類動物、鳥類動物、は虫類動物、両生類動物、魚類動物等の脊椎動物に由来する。ほ乳類動物としては、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス等の非ヒトほ乳類動物が挙げられる。鳥類動物としては、ダチョウ、ニワトリ、カモ、スズメ等が挙げられる。は虫類動物としては、ヘビ、ワニ、トカゲ、カメ等が挙げられる。両生類動物としては、カエル、イモリ、サンショウウオ等が挙げられる。魚類動物としては、サケ、マグロ、サメ、タイ、コイ等が挙げられる。三次元筋組織を食用とする場合、骨格筋芽細胞はウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の畜産のために飼育されるほ乳類動物に由来することが好ましく、ウシ由来であることがより好ましい。

20

【0032】

骨格筋芽細胞は、相同組み替え法、CRISPR/Cas9法等のゲノム編集の手法等により遺伝子改変をされた骨格筋芽細胞または遺伝子改変されていない骨格筋芽細胞を用いることができる。三次元筋組織を食用とする場合の一つの態様においては、安全性や消費者の嗜好の観点から、骨格筋芽細胞は遺伝子改変されていない骨格筋芽細胞を用いることが好ましい。

【0033】

本発明の細胞モジュールを構成するハイドロゲルとしては、フィブリン、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン（例えば、I型、II型、III型、V型、XI型など）、寒天、アガロース、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなどを等の細胞外基底膜マトリックスを構成する成分のゲルを使用することができる。ハイドロゲルとして市販品を使用することもできる例えば、「マトリゲル」の商品名で販売されるマウスEHS腫瘍抽出物（IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどを含む）に基づく成分を使用することができる。

30

【0034】

なお、本明細書において「コラーゲン」は、未変性のコラーゲン及び変性したコラーゲンを包含する。変性したコラーゲンとしては、ゼラチンが例示される。

【0035】

ハイドロゲルは、特に骨格筋芽細胞がウシ由来である場合に、コラーゲン、好ましくは未変性のI型コラーゲンを含むことが好ましい。I型コラーゲンを含む場合、その含有量は、好ましくは0.3mg/mL以上であり、より好ましくは1.0~3.0mg/mL、さらに好ましくは1.0~1.5mg/mLである。

40

【0036】

ハイドロゲルにおける骨格筋芽細胞は、例えば細胞密度が約 1.0×10^6 個/mL以上、好ましくは約 1.0×10^7 個/mL~約 1.0×10^8 個/mL、さらに好ましくは 5.0×10^7 個/mL~約 1.0×10^8 個/mLであることが好ましい。

【0037】

本発明の細胞モジュールは、上記骨格筋芽細胞及びハイドロゲル以外の成分（添加剤）を含むことができる。このような添加剤としては、培地成分（例えば、各種アミノ酸、無機

50

塩類、ビタミン類等)、血清成分(例えば、IGF-1、bFGF、インスリン、テストステロンなどの成長因子等)、抗生物質を例示することができる

【0038】

このような添加剤の好ましい一例として、アスコルビン酸(ビタミンC)を挙げることができる。アスコルビン酸(ビタミンC)の含有量は、10~1000 μ M、より好ましくは50~250 μ M、特に好ましくは50~100 μ Mとすることができる。アスコルビン酸(ビタミンC)を上記含有量で含むことで、特に骨格筋芽細胞がウシである場合に、骨格筋芽細胞から筋管への分化誘導を効率的に行うことができる。

【0039】

第1の細胞モジュールは、形状が略長方形であり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する。第2の細胞モジュールは、第1の細胞モジュールと同様に形状が略長方形であり、互いに平行な略長方形の穴を複数有する。第2の細胞モジュールが有する複数の穴は、その少なくとも一部、好ましくはすべてが、垂直方向において前記第1の細胞モジュールとは異なる位置にある。互いに平行な穴と穴との間には、略長方形で細幅の帯状部分が形成される。図1に、第1の細胞モジュール及び第2の細胞モジュールの形状の一例を示す。

10

【0040】

細胞モジュールは、形状が略長方形である。各モジュールの寸法としては、短手方向は好ましくは3mm以上、より好ましくは5mm以上、さらに好ましくは10mm以上である。長手方向は好ましくは9mm以上、より好ましくは13mm以上、さらに好ましくは16mm以上である。

20

【0041】

細胞モジュールは、略長方形のシート状である。各細胞モジュール厚みは、好ましくは300 μ m~2000 μ m程度、より好ましくは500~1000 μ m程度とすることができる。

【0042】

細胞モジュールが有する複数の穴の個数は、好ましくは1~30個程度、より好ましくは2~25個程度、さらに好ましくは4~10個程度である。

【0043】

細胞モジュールの穴は、形状が略長方形である。各穴の寸法としては、好ましくは短手方向に200~2000 μ m幅、より好ましくは200~1000 μ m幅、さらに好ましくは300~700 μ m幅である。また、隣接する穴の間に形成される略長方形で細幅の帯状部分の寸法としては、好ましくは短手方向に200~2000 μ m幅、より好ましくは200~1000 μ m幅、さらに好ましくは500~1000 μ m幅である。細胞モジュールの複数の穴は、互いに平行であり、互いに平行かつ略等間隔であることが好ましい。

30

【0044】

上記形状の細胞モジュールの作製方法は特に限定されない。例えば、モジュールの形状をパターンニングした鋳型スタンプと基材との間に骨格筋芽細胞を含むハイドロゲル溶液を挟むことで、所望の形状の細胞モジュールを作製することができる。鋳型スタンプ及び基材の材質は特に限定されず、例えば、シリコンゴム(ジメチルポリシロキサン、PDMS)などの熱硬化性樹脂、各種プラスチックなどの熱可塑性樹脂、ガラスなどを用いることができる。細胞モジュールの作製方法の一例を図2に示す。

40

【0045】

本発明の製造方法における第2の工程は、上記第1の工程で得られた前記第1の細胞モジュールと前記第2の細胞モジュールとを交互に積層し積層体を得る工程である。

【0046】

ここで、「交互」とは、第1の細胞モジュール、第2の細胞モジュール、第1の細胞モジュール、第2の細胞モジュール・・・と順番に積層することを意味する。交互に積層することで、積層体において任意の第1の細胞モジュールの直上及び直下の細胞モジュールは、その任意の第1の細胞モジュールの直上又は直下の細胞モジュールが存在しない場合を除き、第2の細胞モジュールである。

50

【 0 0 4 7 】

第 1 の細胞モジュールと第 2 の細胞モジュールと積層の好ましい態様においては、第 1 の細胞モジュールの穴が直上及び直下の第 2 の細胞モジュールの穴とが、それらの少なくとも一部（すべてであってもよい）において重なり合わないよう積層する。換言すると、積層の好ましい態様において、第 1 の細胞モジュールの細幅の帯状部分が直上及び直下の第 2 の細胞モジュールの細幅の帯状部分とが、それらの少なくとも一部（すべてであってもよい）において重なり合わないよう積層する。このように積層を行うことで、配向を有し、かつ、断面積の大きい筋管 / 筋線維の束を作製することができる。細胞モジュールの積層方法の一例を図 3 に模式的に示す。

【 0 0 4 8 】

積層する第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールの枚数は特に限定されない。十分な厚みを有する三次元筋組織を製造するとの観点から、第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールを合計 6 枚以上積層することが好ましく、合計 10 枚以上積層することがより好ましい。操作の簡便性の観点から、積層する枚数の上限は好ましくは合計 50 枚、より好ましくは 30 枚、特に好ましくは 20 枚とすることができるが、これに限定されない。

【 0 0 4 9 】

積層は、例えば、適切な基材の上で行うことができる。すなわち、1 枚目の細胞モジュール（第 1 の細胞モジュール及び第 2 の細胞モジュールのいずれか）を基材の上に置き、その上に細胞モジュール（前記 1 枚目のモジュールとは異なる細胞モジュール）を積層する。基材の材質は、ジメチルポリシロキサン（PDMS）のように、細胞に対して非接着性の材質又は非接着性となる表面処理が施されている材質であることが好ましい。

【 0 0 5 0 】

本発明の積層は、細胞モジュールの長手方向両端が固定されている態様で行うことが好ましい。固定を行うための手法は、当業者が適宜選択することができる。例えば、細胞モジュールの両端部分を、接着力を有する成分（例えば、フィブリン等のハイドロゲル）を用いて固定することができる。別の態様において、基材に設置した固定用部材（杭、アンカー）に、細胞モジュールの端部近傍にあらかじめ設けた穴を貫通させることで細胞モジュールを固定することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明の製造方法において、作製後積層前の各細胞モジュールを、又は、積層により得た積層体を、増殖培養に供し、含まれる骨格筋芽細胞を細胞増殖させることができる。

【 0 0 5 2 】

例えば、骨格筋芽細胞が細胞モジュールに十分量（例えば、 1.0×10^8 個 / ml 個 / ml 以上）含まれる場合、増殖培養を行うことなく次の分化誘導の工程を行うことができる。例えば、骨格筋芽細胞を増殖させる必要がある場合は、増殖培養を行った後に次の分化誘導の工程を行うことができる。

【 0 0 5 3 】

作製後積層前の各細胞モジュールを増殖培養に供することは、細胞モジュールの安定性をより向上させることができるとの観点からも好ましい。積層により得た積層体を増殖培養に供することは、細胞モジュール間の細胞同士の接着をより促進できるとの観点からも好ましい。

【 0 0 5 4 】

上記培養は、例えば上記の増殖培養用の培地中で、当業者に公知の手法で行なうことができる。好適な培養を行なう手法として、約 37 程度および二酸化炭素濃度約 5 ~ 10 %（v / v）程度の条件下で培養する手法が例示されるが、これに限定されるものではない。上記条件での培養は、例えば公知の CO₂ インキュベータを用いて行なうことができる。

【 0 0 5 5 】

増殖培養用の培地としては、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）、EMEM（Eagle's minimal essential medium）、MEM（alpha Modified Minimum Es

10

20

30

40

50

sential Medium)などの通常の液体培地に、血清成分(例えば、ウマ血清(Horse Serum)ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum(FBS))、ヒト血清(Human Serum))など)、成長因子等の成分;ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を添加した培地を使用することができる。

【0056】

増殖培養用の培地に血清成分を添加する場合、血清成分としてはウシ胎児血清を用いることができる。血清成分の濃度は10%(v/v)程度とすることができる。

【0057】

培養期間は、例えば、1日~2週間程度とすることができる。

【0058】

必要に応じて、培地交換を行うことができる。培養条件は、常法に準じることができる。

【0059】

本発明の製造方法における第3の工程は、骨格筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程である。当該工程により、骨格筋芽細胞は周囲の細胞と細胞融合により多核化し、筋管が形成される。筋管はさらに成熟することで筋線維を形成する。

【0060】

上記培養は、例えば分化誘導用(多核化用培)の培地中で、当業者に公知の手法で行なうことができる。好適な培養を行なう手法として、約37℃程度および二酸化炭素濃度約5~10%(v/v)程度の条件下で培養する手法が例示されるが、これに限定されるものではない。上記条件での培養は、例えば公知のCO₂インキュベータを用いて行なうことができる。

【0061】

筋芽細胞は栄養分が少なくなると、周囲の細胞を巻きこみ多核化を開始することが知られている。そのため、筋管への分化誘導は、前記の増殖培養よりも栄養分が少ない培地を用いて行うことが好ましい。ウマ血清はウシ胎児血清よりも栄養分が少ないことが知られているため、ウマ血清を用いることができる。血清成分の濃度は2%(v/v)程度とすることができる。

【0062】

かくして三次元筋組織が製造される。

【実施例】

【0063】

次に実施例により本発明を更に具体的に説明する。しかし下記の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0064】

1. ビタミンCによるウシ筋芽細胞の分化誘導

ウシ筋芽細胞の分化培養におけるビタミンCの影響を検討した。分化培養時にビタミンC誘導体を濃度0~1000μMまで変化させ添加し、筋管形成率を測定した。

【0065】

[手法]

ウシ咬筋から筋芽細胞を採取し、12well collagen-coat dishに1.0x10⁵cells/wellで播種した。

【0066】

Growth medium(10%FBS F12/DMEM以下GM)で3日間培養後、ビタミンC誘導体(アスコルビン酸リン酸)を添加したDifferential medium(2%HS F12/DMEM以下DM)に交換し、さらに10日間培養した。添加したアスコルビン酸リン酸濃度は0,10,100,1mMであり、隔日で培地交換を行った。

【0067】

DMで10日間培養したのち、4%PFAで固定し、sarcomeric α -actinin(SAA)を免疫染色にて、細胞核をHoechst染色にて染色した。SAAは筋肉の最小単位であるサルコメア構造のZ膜を構成するタンパク質であり、筋管形成に伴い発現する。そこでSAA染色で

10

20

30

40

50

染色された細胞を筋管と判断し、染色結果から fusion index (筋管中の核数 / 全核数) を算出した。なお fusion index は各ビタミンC (VC) 濃度につき全核数が100以上の染色画像10点から算出し、平均を求めた。

【0068】

結果を図4に示す。

【0069】

[考察]

ビタミンCを添加した場合と添加しなかった場合、いずれもDM移行後4日目で筋管形成がみられた。

ビタミンC濃度依存的に筋管形成数が増加したとともに、形成される筋管の長さ、太さも増加したことから、ビタミンCは筋管の成熟にも関与すると考えられる。

【0070】

2. ウシ筋芽細胞を用いた三次元筋組織の形成

ウシ筋芽細胞をハイドロゲルに包埋し、両端を固定し培養することにより長さ7mmの筋組織を作製した。ハイドロゲル組成および細胞密度を変化させ、筋組織の形成条件並びに成熟条件を検討した。

【0071】

[手法]

PDMS上にアンカーを固定し、アンカー間を結ぶように細胞含有ハイドロゲルを播種することにより、細長い筋組織を形成した。

【0072】

光造形装置を用いて作製した鋳型にPDMSを流し込み固めることにより、アンカー固定部材および幅調整スタンプを作製した。アンカー固定部材により長さが7mmに、幅調整スタンプにより培養開始時の組織幅が1mmに固定される。また、光造形装置を用いてアンカーを作成した。アンカーは直径100 μ m、高さ1.0mmの円柱状の固定部を18本備え、固定部をフィブロネクチンコーティングすることにより細胞接着を促し、組織の両端を固定した。

【0073】

(1) ハイドロゲル組成の検討

コラーゲンタイプ1とマトリゲルを1:0、1:1、0:1の比率でそれぞれ混合し異なるハイドロゲルを作製した。

【0074】

筋芽細胞 2.0×10^6 cellsを3種類のハイドロゲル各40 μ Lと混合し(5.0×10^7 cells/mL)、幅調整スタンプにより1mm幅にそろえた。ハイドロゲルを固めるため、37、10分間、CO₂インキュベータ内でインキュベート後、10%FBS F12/DMEMを加えて37、5%CO₂で培養した。組織形成翌日、培地を2%HS F12/DMEMに交換し、さらに12日間培養を継続した。培地は隔日で交換した。12日間経過後、成熟度および配向を確認するため、免疫染色を行った。

【0075】

(2) 細胞濃度検討

コラーゲンタイプ1で筋芽細胞を包埋し、培養を行った。その際、包埋する細胞数を 1.0×10^6 cells、 2.0×10^6 cells、 4.0×10^6 cells (それぞれ 2.5×10^7 cells/mL、 5.0×10^7 cells/mL、 10.0×10^7 cells/mL)の3種類で検討した。培養方法は(1)と同様で、培養2日目からは100 μ MビタミンCを添加した2%HS F12/DMEMで培養した。

【0076】

手法を図5に模式的に示す。ハイドロゲル組成の検討の結果を図6に、細胞濃度の検討の結果を図7にそれぞれ示す。

【0077】

[考察]

(1) ハイドロゲル組成

10

20

30

40

50

コラーゲンを含む組成では細胞の配向性が確認できる。一方、マトリゲルは細胞の分布に偏りが出る傾向にあり、組織形状の維持が劣る。3条件間で、組織の成熟度に顕著な差は見られなかった。

【0078】

(2)細胞濃度検討

5.0x10⁷cells/mL collagen gel 以上の条件でサルコメア様構造を確認した。形成される筋管数は5.0x10⁷cells/mL collagen gel が最大であった。

【0079】

3.筋芽細胞モジュールを用いた三次元大型筋組織の形成

より大きな組織を作製するため、筋芽細胞を3次元モジュールに包埋し積層した。筋組織は組織幅が大きくなると細胞の移動方向がランダム化されるため、配向性が保たれない。そこで組織の配向性を保つため、PDMSスタンプを用いて、互いに平行な略長方形の穴を複数有する略長方形の第1の細胞モジュールと、第1の細胞モジュールとは穴の位置が異なる第2の細胞モジュールとを作成した。

【0080】

穴の位置が異なる2種類の細胞モジュールを交互に積層することにより、細幅の組織同士が空隙を埋めあい、一塊の筋組織が構築されるよう設計されている。

【0081】

筋芽細胞とコラーゲンタイプ1ゲルを濃度5.0x10⁷cells/mL collagen で混合し、筋芽細胞内包コラーゲンゲルを得た。この筋芽細胞内包コラーゲンゲルをゴムモジュール上に播種し、PDMSで作製した鋳型スタンプを載せ、筋細胞モジュールを作製した。(モジュール1枚につきおよそ170μLコラーゲンゲル)コラーゲンゲルを固めるため、37℃、10分間37℃、CO₂インキュベータ内でインキュベート後、10%FBS F12/DMEMを加えて37℃、5%CO₂で24時間培養した。24時間後、スタンプを除去し、筋細胞モジュールのアンカー固定部が培養容器のアンカーに重なるよう、筋細胞モジュールを積層した。培養容器は3Dプリンターで作製し、細胞の接着性を高めるため、予めO₂プラズマ処理により細胞接着処理を行ったものを使用した。筋芽細胞モジュールを積層した翌日から、培養液を2%HS F12/DMEMに交換し、隔日で培地交換を行いながら12日間培養した。

【0082】

手法を図8に模式的に示す。

【0083】

ウシ筋芽細胞を3層積層した結果を図9に示す。また、マウス筋芽細胞を25層積層した結果を図10に示す。

【0084】

[考察]

筋芽細胞モジュールの積層により、ひとかたまりの配向した組織の作成が可能であることが明らかとなった。SAAの染色から少なくとも外側の配向や一部分での筋管形成が確認された。

10

20

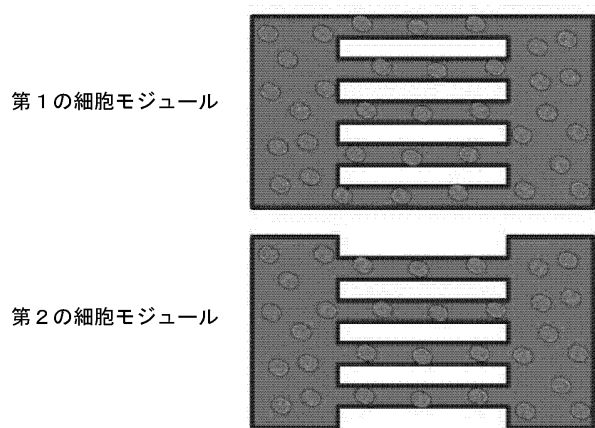
30

40

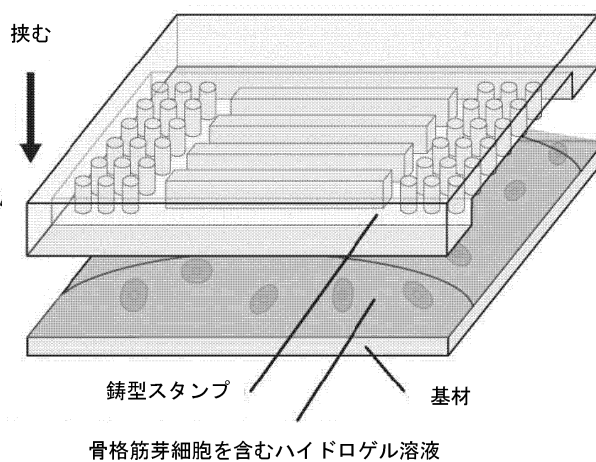
50

【図面】

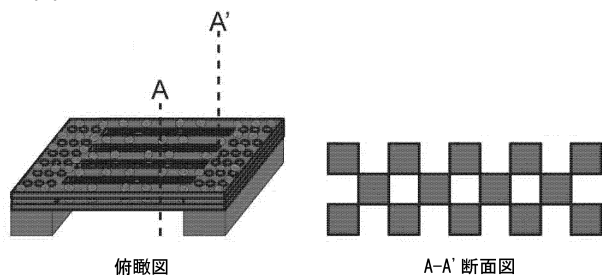
【図 1】



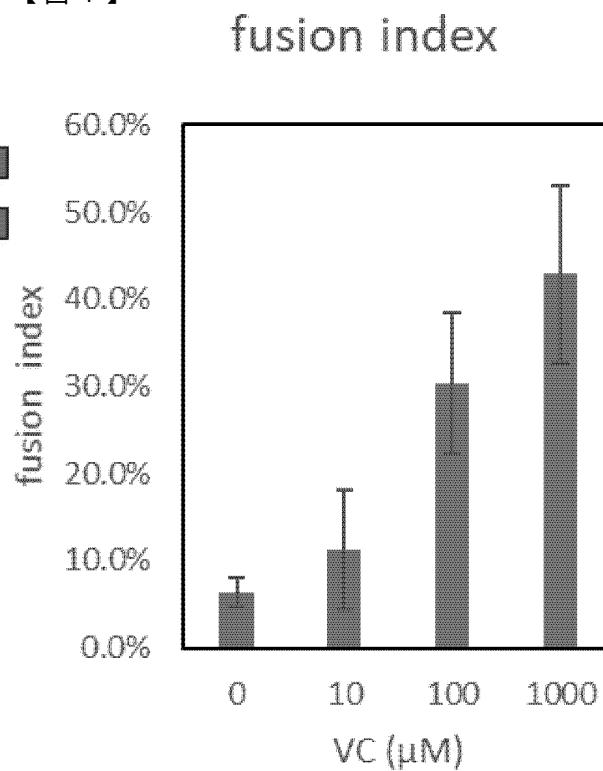
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

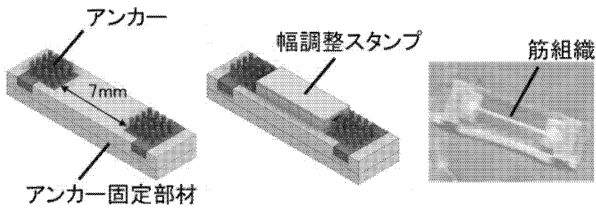
20

30

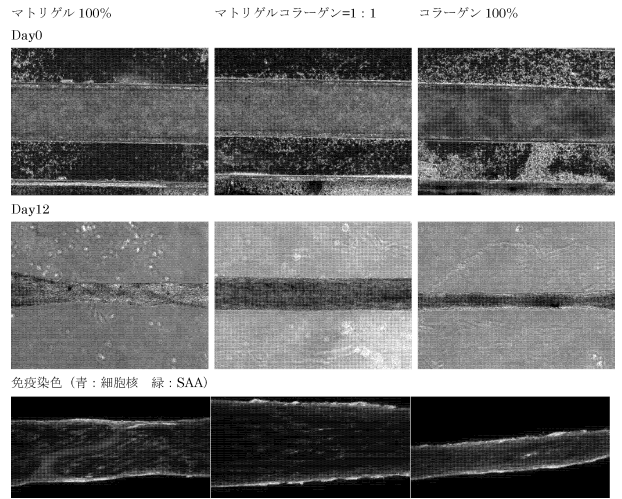
40

50

【図5】

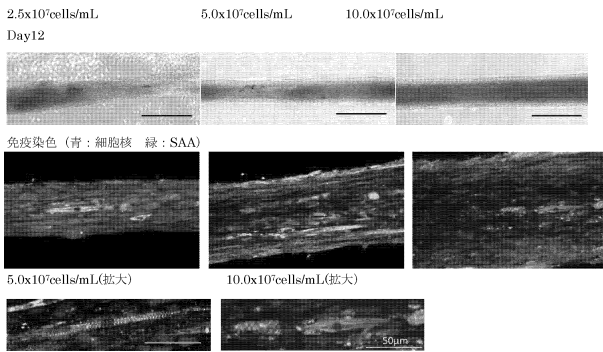


【図6】

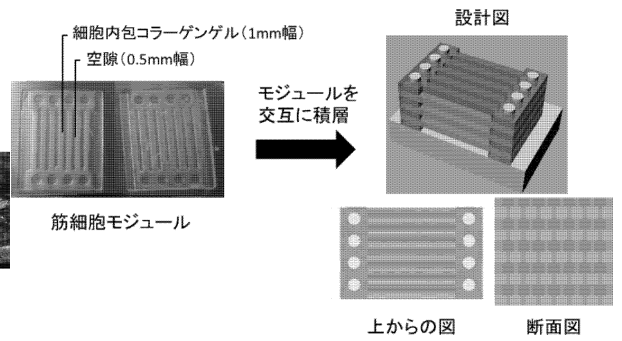


10

【図7】



【図8】



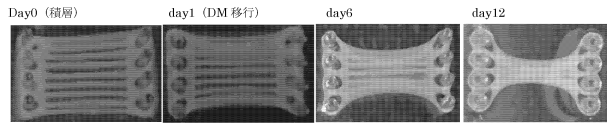
20

30

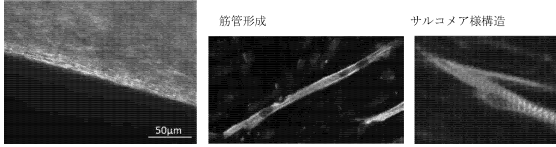
40

50

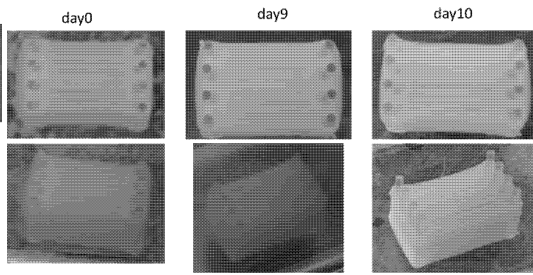
【 9 】



免疫染色 (緑: SAA 青: 細胞核)

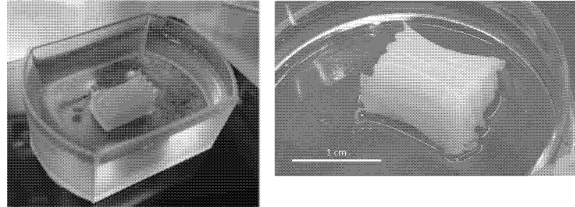


【 10 】



培養容器と培養中のイメージ

12日間培養後、ひとかたまりの組織ができる。(およそ 1 cm x 1 cm x 6mm 厚)



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 島 亜衣

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 古橋 麻衣

大阪府大阪市淀川区西中島4丁目1番1号 日清食品ホールディングス株式会社内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特開2008-072967(JP, A)

国際公開第2014/148321(WO, A1)

古橋 麻衣, 他, 筋芽細胞モジュールの積層による培養肉の構築, 日本農芸化学会2019年度大会講演要旨集(オンライン), 2019年03月05日, 1B3a10, <https://www.jsbba.or.jp/MeetingofJSBBA/2019/MeetingofJSBBA2019.pdf>, 令和2年3月5日検索

鈴木 彩, 他, コラーゲンシートを用いた培養筋芽細胞の配向性評価, ロボティクスメカトロニクス講演会2016講演会論文集, 一般社団法人日本機械学会, 2016年06月08日, 2A2-12b3

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

C12M 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)