

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月1日(01.02.2024)



(10) 国際公開番号

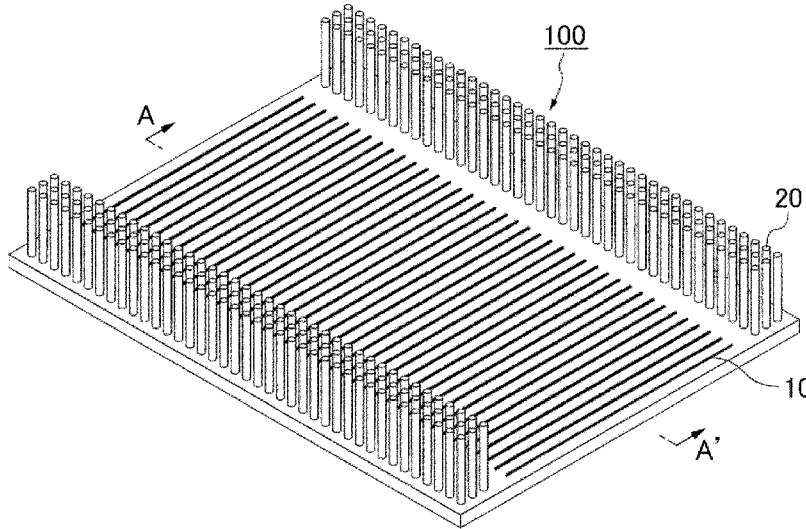
WO 2024/024929 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C12M 1/00 (2006.01) JP]; 〒5328524 大阪府大阪市淀川区西中島
4丁目1番1号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/027702 (72) 発明者: 竹内 昌治 (TAKEUCHI Shoji);
〒1138654 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 Tokyo (JP). 森本
雄矢(MORIMOTO Yuya); 〒1138654 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 Tokyo (JP). 古橋 麻衣(FURUHASHI
Mai); 〒5328524 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 Osaka (JP). 相部 かおり(AIBE
Kaori); 〒5328524 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 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2023年7月28日(28.07.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-122160 2022年7月29日(29.07.2022) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE
UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654
東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo
(JP). 日清食品ホールディングス株式会
社(NISSIN FOODS HOLDINGS CO., LTD.) [JP/

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING THREE-DIMENSIONAL MUSCLE TISSUE

(54) 発明の名称: 三次元筋組織の製造方法

[図1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing three-dimensional muscle tissue, the method including the following steps (A) and (B): (A) a step for supplying a myoblast-containing hydrogel to a culture container, the culture container comprising a pair of anchor sections on opposite edges of the container and a plurality of convexities arranged spanning between the pair of anchor sections; and (B) a step for inducing the myoblasts to differentiate into myotubes in the culture container.

(57) 要約: 本発明は、下記の工程 (A) 及び (B) を含む三次元筋組織の製造方法に関する: (A) 筋芽細胞を含むハイドロゲルを培養容器へ供給する工程であって、前記培養容器は、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部間にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器である工程、並びに、(B) 前記培養容器中で、筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程。

(74) 代理人: 弁理士法人大谷特許事務所(OHTANI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門三丁目25番2号 虎ノ門E Sビル7階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：三次元筋組織の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、三次元筋組織の製造方法、及び三次元筋組織を製造するための培養容器に関する。

背景技術

[0002] 世界的な人口増加、並びに、新興国での経済発展及び食生活の多様化に伴って、世界的に食肉需要が加速している。しかしながら、家畜の生産には飼育コストもかかり、家畜生産量は有限であり、やがて食肉の供給が追いつかなくなることが予想されている。

そこで、食肉の安定的供給の解決策の1つとして、代替肉の開発研究がなされてきている。

[0003] 家畜から生産される食肉の代替肉には複数種類があり、肉もどき、植物肉、培養ミンチ肉、培養ステーキ肉等に分類される。このうち、培養ミンチ肉と培養ステーキ肉は培養肉と呼ばれる。培養ミンチ肉がバラバラの筋細胞の集合体であり食肉の食感が劣るのに対し、培養ステーキ肉は筋組織の立体構造を再現したものであり食肉の食感を感じることが可能な代替肉である。

[0004] ここで、筋組織の立体構造を再現するには、すなわち、三次元筋組織を生体外で構築するためには、三次元的に細胞を培養することが必要である。しかし、三次元的に細胞を培養するのに乗り越えるべき技術的課題も多い。

[0005] 引用文献1には、特に食用に適した三次元筋組織の製造方法として、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、三次元筋組織の製造方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2020-141573号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 引用文献1に記載の技術により、特に食用に適した三次元筋組織、より具体的には、生体由来の筋肉と同様にサルコメア構造を有し、食用に供した際に畜産された肉に近い食感が期待できる三次元筋組織の製造方法が提供される。

一方で、食用に適した十分な大きさを有する三次元筋組織を簡便に製造することに関し、更なる改善が必要であった。

本発明は、食用に適した十分な大きさを有する三次元筋組織を簡便に製造することができる三次元筋組織の製造方法及び三次元筋組織を製造するための培養容器を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記課題を鑑みて鋭意検討を重ねた結果、容器端部に向かい合う一対のアンカー一部と、前記一対のアンカー一部間にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器を使用すること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。

[0009] 本発明は、以下の態様を包含する。

〔1〕 下記の工程（A）及び（B）を含む三次元筋組織の製造方法：

（A）筋芽細胞を含むハイドロゲルを培養容器へ供給する工程であって、

前記培養容器は、容器端部に向かい合う一対のアンカー一部と、前記一対のアンカー一部間にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器である工程、並

びに、

(B) 前記培養容器中で、筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程。

〔2〕 前記培養容器において、前記凸部の長手方向の長さ (X) が 1 cm 以上、かつ、前記凸部の短手方向の長さ (Y) が 1 cm 以上である、上記〔1〕に記載の三次元筋組織の製造方法。

〔3〕 前記培養容器において、前記凸部の長手方向の長さ (X) に対する前記凸部の短手方向の長さ (Y) の比 $[(Y) / (X)]$ が 0.7 以上である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の三次元筋組織の製造方法。

〔4〕 前記凸部が、高さ $50 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ である、上記〔1〕～〔3〕のいずれか 1 項に記載の三次元筋組織の製造方法。

〔5〕 前記凸部の互いの間隔が、 $10 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ である、上記〔1〕～〔4〕のいずれか 1 項に記載の三次元筋組織の製造方法。

〔6〕 上記〔1〕～〔5〕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。

〔7〕 三次元筋組織を製造するための培養容器であって、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部間にわたって複数の凸部が配列してなる、培養容器。

発明の効果

[0010] 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肉に近い食感が期待できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] 図 1 は、本発明の一実施形態に係る培養容器 100 の斜視図である。

[図2] 図 2 は、図 1 の線 A-A' に関する断面図である。

[図3] 図 3 は、図 1 におけるアンカー部の拡大図である。

[図4]図4は、本発明の一実施形態に係る培養容器200の斜視図である。

[図5]図5は、本発明の一実施形態に係る培養容器200の(a)平面図、(b)正面図、(c)右側面図及び(d)底面図である。

[図6]図6は、本発明の一実施形態に係る培養容器300の斜視図である。

[図7]図7は、本発明の一実施形態に係る培養容器300の(a)平面図、(b)正面図、(c)右側面図及び(d)底面図である。

[図8]図8は、本発明の一実施形態に係る培養容器400の斜視図である。

[図9]図9は、本発明の一実施形態に係る培養容器400の(a)平面図、(b)正面図、(c)右側面図及び(d)底面図である。

[図10]図10は、本発明の一実施形態に係る培養容器100の概略を示す。

培養容器100は、凸部の長手方向の長さ(X)が4cm、凸部の短手方向の長さ(Y)が3cmである。(i)アンカー部；当該部材は、直径0.5mm、高さ5mmの円柱であり、中心点間の間隔が1mmで設置されている。

(ii)配向性を促す凸部；当該部材は、高さ200 μ m、幅50 μ m、アンカーからの距離2mmである。

[図11-1]図11-1は、SAA免疫染色画像を示す。

[図11-2]図11-2は、図11-1の色反転画像を示す。

[図12]図12は、三次元筋組織のシュリンク量の経時変化を示すグラフである。具体的には、短手方向の組織幅の推移を示す。縦軸は、短手方向の組織の長さ(cm)である。

[図13]図13は、三次元筋組織の移動量(収缩量)の経時変化を示すグラフである。(A)凸部の高さが100 μ m、(B)凸部の高さが300 μ m、(C)凸部の高さが500 μ m。

発明を実施するための形態

[0012] [三次元筋組織の製造方法]

本発明の三次元筋組織の製造方法は、下記の工程(A)及び(B)を含む：

(A)筋芽細胞を含むハイドロゲルを培養容器へ供給する工程であって、

前記培養容器は、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部間にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器である工程、並びに、

(B) 前記培養容器中で、筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程。

[0013] <三次元筋組織>

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、筋細胞から構成される。筋細胞は、好ましくは収縮能を有する横紋筋細胞であり、具体的には骨格筋細胞又は心筋細胞である。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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。例えば食用の三次元筋組織である場合、筋組織を構成する筋細胞は、好ましくは骨格筋細胞である。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。

[0018] <工程 (A) >

工程 (A) は、筋芽細胞を含むハイドロゲルを培養容器へ供給する工程であって、

前記培養容器は、底部に複数の互いに平行な略長方形の凸部、及び前記凸部の長手方向の両端にアンカー部を備えた培養容器である。

[0019] [筋芽細胞を含むハイドロゲル]

(筋芽細胞)

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。

例えば、三次元組織を構成する筋細胞が骨格筋細胞であるとき、筋芽細胞は骨格筋芽細胞である。

なお、初代筋芽細胞から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できる。一方で、筋芽細胞以外の細胞を完全に除去することは必須ではなく、筋芽細胞は、筋芽細胞以外の細胞を含む混合状態で使用することができる。

[0020] また、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。

[0021] 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、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。

[0022] 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筋芽細胞または遺伝子改変されていない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、安全性及び消費者の嗜好の観点から、筋芽細胞は遺伝子改変されていない筋芽細胞を用いることが好ましい。

[0023] (ハイドロゲル)

ハイドロゲルは、三次元筋組織の培養時の足場材として機能する。

ハイドロゲルの好ましい態様の1つとしては、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（I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。

[0024] 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。

[0025] ハイドロゲルの別の好ましい態様の1つとして、血液由来血漿及び凝固剤を含むゲルが挙げられる。

血液の由来動物は、入手容易性の観点から、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であり、より好ましくはウシ由来である。

由来動物は分娩前の胎児であっても、又は、分娩後の成体のいずれであってもよい。由来動物の日齢、月齢、年齢は限定されない。成体である場合、雌性個体から分娩された後の、若い個体、若い個体、成熟した個体、老いた個体のいずれであってもよい。

好ましい態様において由来動物は成体のウシであり、中でも市場からの入手のしやすさ及び屠畜解体される量から、より好ましくは成熟したウシである。

成牛の血液は、食肉市場や卸売市場において屠畜解体される牛から検体として採取する方法や、その他の方法により得られる。

[0026] 血液は、流通や保管時の凝固を防ぐため、抗凝固剤を添加してから配送することがある。抗凝固剤が添加された血液は、遠心分離により、赤血球と、フィブリノーゲンを含む血漿に分離される。ここで、血液に抗凝固剤が添加されている場合は、赤血球も、凝固成分となるフィブリノーゲンを含む血漿も、凝固及びゲル化しない。

[0027] 遠心分離により得られたフィブリノーゲンを含む血液由来血漿に、凝固剤を添加すると、血漿はゲル化する。

なお、本態様のハイドロゲルは、血漿を含むため、細胞培養時の栄養分たる細胞培養成分の補給機能も期待される。

[0028] また、上記フィブリノーゲンを含む成牛血液由来血漿は、多血小板血漿（PRP血漿；Platelet-rich Plasma）であってもよい。多血小板血漿は、血漿を遠心分離して調製した、血小板に富む血漿濃縮物であり、血小板の他、可溶性タンパク質や成長因子が濃縮されている。

[0029] 多血小板血漿は、抗凝固剤が添加された血液の遠心分離、二重遠心分離、選択的濾過等で回収することができる。具体的には赤血球を除いた血漿をさらに遠心分離して回収してもよいし、赤血球も含まれる血液では血漿層のうち赤血球との境界に濃縮した層を回収してもよい。

[0030] 多血小板血漿を用いた場合は、血漿全体を用いた場合に比べ、ゲル化が速やかに進む傾向にある。このため、多血小板血漿を用いた細胞培養用ゲルでは、細胞の沈殿が起こりにくく、細胞をより均一に分散させることができる。

[0031] 抗凝固剤は、血液の凝固を防ぐものであれば限定されない。抗凝固剤としては、クエン酸ナトリウム、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、フッ化

ナトリウム等の、血液の凝固に不可欠なカルシウムイオンと結合するものが例示される。

クエン酸ナトリウムの場合、血液及び抗凝固剤全量に対し、2体積%~4体積%、好ましくは、3体積%前後となるように添加することがより望ましい。

[0032] 凝固剤は、抗凝固剤を含む血液の血漿をゲル化できるものであれば限定されない。凝固剤としては、塩化カルシウム、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 等が例示され、カルシウムイオンを含有するものがより好ましい。

[0033] 凝固剤が塩化カルシウムの場合、血漿及び凝固剤全量に対し、カルシウムイオン濃度として例えば、好ましくは5 mM~70 mM、より好ましくは10 mM~65 mM、さらに好ましくは10 mM~60 mMとなるように添加することができる。

なお、本明細書において、「XX~YY」は、「XX以上YY以下」を意味する。

[0034] DMEMには、L-アルギニン、L-シスチン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リシン、L-フェニルアラニン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、塩化カルシウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、ナトリウム塩化物、リン酸二水素ナトリウム、D-グルコース、葉酸、ニコチンアミド、リボフラビン、ビタミンB12、コリン、イノシトール、パントテン酸、ピリドキサルリン酸、チアミン、鉄等が含まれる。

凝固剤がDMEMの場合、DMEMの量に対し、血液由来血漿の量を、例えば好ましくは0.1体積%以上35体積%以下、より好ましくは0.1体積%以上30体積%以下、さらに好ましくは0.2体積%以上30体積%以下となるように添加することができる。

[0035] ハイドロゲルは、さらに培地成分を含んでもよい。

培地成分としては、DMEM (例えば、GIBCO社製等) や、EMEM

(例えば、G I B C O社製)、M E M A L P H A (例えば、G I B C O社製)、R P M I - 1 6 4 0 (R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e 1 6 4 0培地；G I B C O社製)等が挙げられる。

さらに培地成分には、通常培地で使用する添加剤成分を適宜配合することができる。添加剤成分としては、抗生物質の他、ビタミン類、核酸、アミノ酸、無機塩、糖、ポリアミン、炭水化物、タンパク質、脂肪酸、脂質、pH調整剤、亜鉛、銅、セレン等が例示される。

[0036] ハイドロゲルにおける筋芽細胞は、例えば細胞密度が好ましくは約 1.0×10^6 個/mL以上、より好ましくは約 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。

[0037] (培養容器)

本発明で使用する培養容器は、三次元筋組織を製造するための培養容器であって、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器である。

該凸部を備えることで、培養時に筋管及び筋線維の束の配向が効率的に形成されることが考えられる。

[0038] 本発明を実施するための好適な実施形態について、図面を用いて説明する。

図1は、本実施形態に係る培養容器100の構成例の斜視図を示す。図2は、培養容器100の断面図を示す。

[0039] 培養容器100を構成する素材は限定されない。例えば、培養容器100を構成する素材は熱可塑性樹脂又は熱硬化性樹脂である。熱可塑性樹脂としては、ポリプロピレン等のポリオレフィン系樹脂；ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系樹脂；アクリル系樹脂；熱可塑性エラストマー：ポリジメチルシロキサン（PDMS）等のシリコン系樹脂等が挙げられる。

また、培養容器100を構成する素材は、好ましくは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素材である。非接着性

となる表面処理としては、パリレンコーティングが挙げられる。

培養容器100を構成する素材は、透明又は不透明のいずれであってもよい。観察の容易性の観点から、好ましくは透明である。

培養容器100は、例えば3Dプリンターを用いて製造することができる。

[0040] 培養容器は好ましくは四角形である。この場合、前記凸部の長手方向の長さ(X)が好ましくは1cm以上、より好ましくは1.5cm以上、かつ、前記凸部の短手方向の長さ(Y)が好ましくは1cm以上、より好ましくは2cm以上である。凸部の長手方向とは、後述する一对のアンカー部が向かい合う方向であり、凸部の短手方向とは凸部が配列される方向である。

また、前記凸部の長手方向の長さ(X)に対する前記凸部の短手方向の長さ(Y)の比 $[(Y)/(X)]$ は、好ましくは0.7以上である。 $[(Y)/(X)]$ は、1以上、1.5以上、2以上とすることもできる。上限は特に限定されず、例えば4以下である。

[0041] 培養容器100は、後述する一对のアンカー部20間にわたって複数の凸部が配列してなる。

アンカー部の形状は限定されない。例えば、培養容器の上部からの平面視の形状が略長方形である。

[0042] 複数の凸部が配列する態様は限定されない。好ましくは、複数の凸部は底部に互いに平行となるように設けられている。

凸部10は、好ましくは高さ $50\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 、より好ましくは $100\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ である。

また、前記凸部の互いの間隔が、 $10\mu\text{m}\sim 5\text{mm}$ 、より好ましくは $50\mu\text{m}\sim 2.5\text{mm}$ 、更に好ましくは $100\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ である。

[0043] 本発明で使用する培養容器は、容器端部に向かい合う一对のアンカー部を備える。アンカー部は、ハイドロゲル及び製造される三次元筋組織を固定する手段であれば、特に限定されない。例えば、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)を用いて固定する部材が挙げられる。

図1に示す好ましい態様である培養容器100は、容器端部のそれぞれに複数の円柱状からなるのアンカー部20が向かい合っている。円柱状のアンカー部20は、直径が100 μ m \sim 2mm程度、高さが3mm \sim 10mm程度である。

[0044] 図4 \sim 9は、他の実施形態に係る培養容器200、培養容器300、及び培養容器400の構成例を斜視図、並びに、平面図、正面図、右側面図及び底面図により示す。

[0045] (ハイドロゲルの供給)

筋芽細胞を含むハイドロゲルは、上記培養容器に供給される。好ましくは、培養容器を底面とし、側面に型枠を設けて、筋芽細胞を含むハイドロゲルを供給する。

供給する筋芽細胞を含むハイドロゲルの量は適宜設定することができる。例えば、ハイドロゲルの厚さが好ましくは1mm \sim 1cm、より好ましくは2 \sim 5mmとなる量とすることができる。

[0046] 培養容器に供給されたハイドロゲルは、加温し固化することができる。加温の温度範囲は、好ましくは37 $^{\circ}$ C程度である。また、加温時間は、ゲル化の進み具合で調整することができ、5分間 \sim 60分間程度が例示され、より好ましくは約10分間程度である。

[0047] また、筋芽細胞を含むハイドロゲルは、増殖培養に供し、含まれる筋芽細胞を細胞増殖させることができる。

例えば、筋芽細胞がハイドロゲルに十分量（例えば、 1.0×10^8 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、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。

[0048] 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うことができる。好適な培養を行う手法として、約37 $^{\circ}$ C程度および二酸化炭素濃度約5 \sim 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うことができる。

[0049] 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)、 α MEM (alpha Modified Minimum Essential 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。

[0050] 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。

[0051] 培養期間は、例えば、1日間~2週間程度とすることができる。

[0052] 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。

[0053] <工程 (B)>

工程 (B) は、前記培養容器中で、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、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。

[0054] 上記培養は、例えば分化誘導用 (多核化用培地) の培地中で、当業者に公知の手法で行うことができる。好適な培養を行う手法として、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うことができる。

[0055] 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できる。

[0056] かくして三次元筋組織が製造される。

本発明は、上記の製造方法により得られる三次元筋組織にも関する。

実施例

[0057] 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。

[0058] 実施例 1 : ウシ筋芽細胞を用いた収縮可能な大型筋組織の作製

ウシ筋芽細胞を下記に示す組成の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 7 mm 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。

[0059] (培養容器 100 の作製)

3Dプリンター (BLULE Inc社製、Formlab 3B) を用いて図 10 に示す培養容器 100 を作成した。培養容器 100 は凸部の長手方向の長さ (X) が 4 cm、凸部の短手方向の長さ (Y) が 3 cm であった。筋細胞の配向を促すための凸部 10 は高さが 200 μ m 及び幅 5 μ m であり、アンカー部と 2 mm 離し、長手方向の長さが 3 cm であった。

アンカー部 20 は、直径 0.5 mm、高さ 5 mm の円柱状であり、中心点の間隔が 1 mm となるように設けた。

作成した培養容器の表面を、パリレン蒸着装置 (Speciality Coating System 社製、ラボコーター PDS 2010) を用いて表面をパリレンコーティングした。次いで、オゾン滅菌装置を用いて培養容器を滅菌後、細胞接着を促すためアンカー部 20 にフィブロネクチンコーティングを施した。

[0060] (対照培養容器の作製)

凸部を設けない以外は培養容器 100 と同様にして、対照培養容器を作成した。

[0061] (ハイドロゲル組成 (1))

フィブリノーゲン (25 mg/mL) 480 μ L (終濃度 4 mg/mL)

) (Sigma社製、F8630)

マトリゲル 600 μ L (終濃度20%) (Corning社製、356231)

Thrombin (200 Unit/mL) 30 μ L (終濃度2 Unit/mL) (Sigma社製、T4648-10KU)

DMEM 1890 μ L (Thermo Fisher Scientific社製、11965118)

[0062] (ハイドロゲルの作製)

筋芽細胞 3.0×10^7 cells を、 1.0×10^7 cells/mL となるようにハイドロゲルと混合し、細胞を包埋したハイドロゲルを作製した。培養容器100又は対照培養容器を底面とし、側面に型枠を設けて、そこに得られた細胞を包埋したハイドロゲルを流し込んだ。37°C、30分間、CO₂インキュベータ内で静置し、ハイドロゲルを固化した。

[0063] (培養)

次いで、増殖用培地 (10% FBS DMEM + 1% Penicillin / Streptomycin) を添加し、加えて37°C、5% CO₂で2日間培養した。

その後、培地を分化用培地 (2% HS DMEM + 1% Penicillin / Streptomycin + 100 μ M) に交換し、さらに5日間培養を継続し、三次元筋組織を得た。培地は隔日で交換した。

培養の時間経過に伴い、三次元筋組織は凸部の短手方向に収縮 (シュリンク) した。

[0064] (電気刺激)

培養5日目及び7日目に得られた三次元筋組織に対して、電気刺激培養システム C-Pace (IonOptic社製) を用いて、下記条件の電気刺激を与えた: 頻度: 1 Hz、強さ: 0.3 V/mm、持続時間: 40 ms。顕微鏡観察により、電気刺激に応答した収縮運動の有無を観察した。

培養容器100を用いて得た三次元筋組織において、明確な収縮運動が観

察された。一方、対照培養容器を用いて得た三次元筋組織においては、収縮運動は観察できなかった。

[0065] (SAA免疫染色)

7日間経過後、得られた三次元筋組織を4%PFAで固定し、Sarcmeric α -actinin (SAA) の免疫染色及びHoechst 33342を用いた細胞核染色を行った。

顕微鏡観察の結果を図11-1に示す。

培養容器100を用いて得た三次元筋組織(左図)では、SAAで染色される筋管領域が多数観察され、また筋管領域は互いに配向していた。一方、対照培養容器を用いて得た三次元筋組織(右図)では、観察される筋管領域は少なく、かつ、配向性が乏しかった。

[0066] 以上の結果から、培養容器の凸構造によって、三次元筋組織中の筋芽細胞から筋管への細胞分化及び筋管の配向が促されることが示唆された。

[0067] 実施例2：培養筋組織の大きさ検討

(培養容器200、培養容器300、培養容器400の作製)

実施例1における培養容器100と同様にして、凸部の長手方向の長さ(X)：凸部の短手方向の長さ(Y)が、4cm：3cmである培養容器200；4cm：8cmである培養容器300、10cm：10cmである培養容器400を作製した。

[0068] (ハイドロゲルの作製及び培養)

実施例1と同様にしてハイドロゲルを作製した。

得られた細胞を包埋したハイドロゲルを培養容器200には3mL、培養容器300には8mL、培養容器400には24mLそれぞれ流し込み、37℃、30分間、CO₂インキュベータ内で静置し、ハイドロゲルを固化した。

実施例1と同様の方法で、7日間培養し、三次元筋組織を得た。培養の時間経過に伴い、三次元筋組織は凸部の短手方向に収縮(シュリンク)した。

ハイドロゲルから三次元筋組織への培養中、凸部の短手方向の長さを経時

的に測定し、収縮の程度（シュリンク量）を観察した。結果を図12に示す。

7日間培養後、培養容器200及び培養容器300を用いた三次元筋組織ではシュリンク量は約2cmであり、培養容器400を用いた三次元筋組織ではシュリンク量は約5cmであった。

このことから、三次元筋組織のシュリンク量は、培養容器の凸部の短手方向の長さの約2分の1であることが示唆され、シュリンク量を推定した大きさの培養容器を使用することで、任意の大きさの三次元筋組織の作製が可能であることが明らかになった。

[0069] 実施例3：食用ブタ血液を用いたハイドロゲルの作製

（培養容器500の作製）

実施例1における培養容器100と同様にして、凸部の長手方向の長さ（X）：凸部の短手方向の長さ（Y）が、8cm：12cmである培養容器500を作製した。

[0070] （ハイドロゲル組成（2））

フィブリノーゲン（25mg/mL） 4000 μ L（終濃度4mg/mL）（Sigma社製、F8630）

食用ブタ血液 5000 μ L（終濃度20%）

Thrombin（200Unit/mL） 250 μ L（終濃度2Unit/mL）（Sigma社製、T4648-10KU）

DMEM 15750 μ L（Thermo Fisher Scientific社製、11965118）

[0071] （ハイドロゲルの作製及び培養）

実施例1におけるハイドロゲル組成において、マトリゲルに替えて食用ブタ血液を用いた上記組成によりハイドロゲルを作製した。

筋芽細胞 2.5×10^8 cellsを、 1.0×10^7 cells/mLとなるようにハイドロゲルと混合し、細胞を包埋したハイドロゲルを作製した。培養容器500又は対照培養容器を底面とし、側面に型枠を設けて、そこ

に得られた細胞を包埋したハイドロゲルを流し込んだ。37℃、30分間、CO₂インキュベータ内で静置し、ハイドロゲルを固化した。

次いで、培養期間を14日間とする以外は実施例1と同様の方法で、14日間培養し、三次元筋組織を得た。

[0072] 培養7日目で実施例1と同様の方法で電気刺激を与えて、顕微鏡観察により、電気刺激に応答した収縮運動の有無を観察した。その結果、収縮運動が観察された。

14日間培養により、約8cm×8cmの三次元筋組織を得た。培養の時間経過に伴い、三次元筋組織は凸部の短手方向に約4cm収縮（シュリンク）した。

以上の結果より、マトリゲルを食用ブタ血液に変更しても収縮可能な組織が作製可能であること、組織のシュリンク量はマトリゲルと同等であることが明らかとなった。

[0073] 実施例4：凸部の高さ検討

（培養容器の作製）

凸部10の高さ以外は実施例1における培養容器100と同様にして、凸部10の高さが100μmである培養容器600、凸部10の高さが300μmである培養容器700、及び凸部10の高さが500μmである培養容器800を作製した。

（ハイドロゲルの作製及び培養）

実施例1と同様にしてハイドロゲルを作製及び培養をした。

[0074] （電気刺激）

培養14日目に実施例3と同様にして電気刺激を行い、電気刺激に応答した三次元筋組織の収縮運動を顕微鏡にて観察及び動画撮影した。撮影した動画に基づき、収縮量として、収縮に伴う三次元筋組織の移動距離（図中、Distance（μm））の経時変化をグラフ化した。

結果を図13に示す。

[0075] いずれの場合においても、三次元筋組織の収縮運動が観察された。中でも

、凸部10の高さが100 μ mである場合に移動量（収縮量）が特に大きかった。

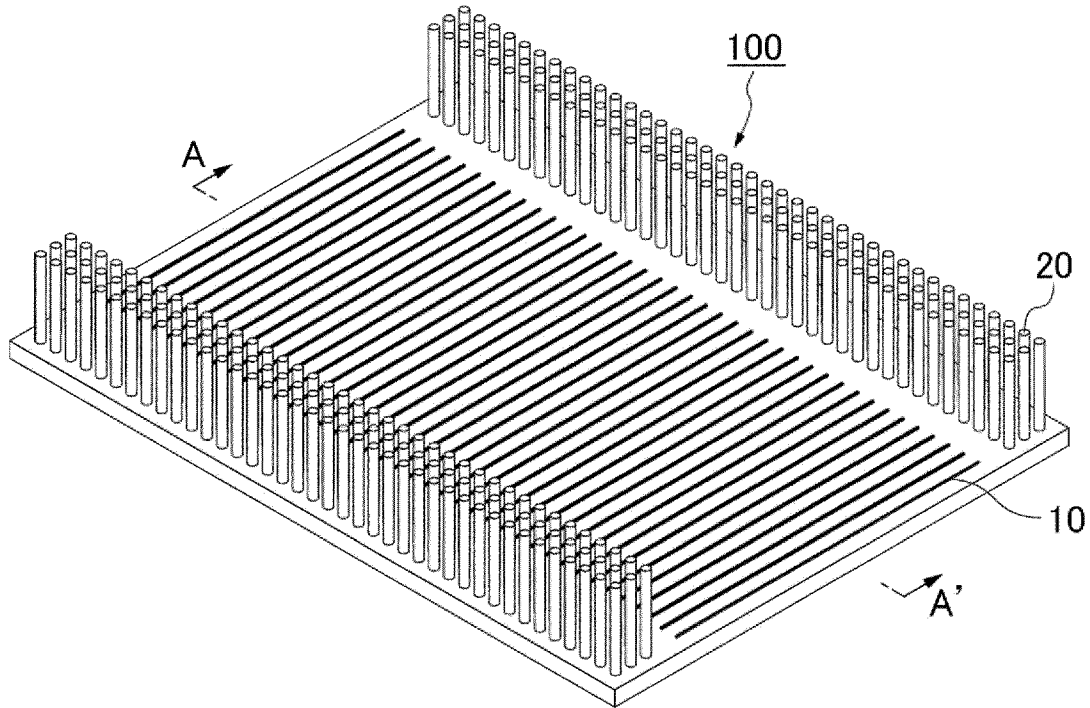
符号の説明

[0076]	100	培養容器
	10	凸部
	20	アンカー部
	200	培養容器
	300	培養容器
	400	培養容器

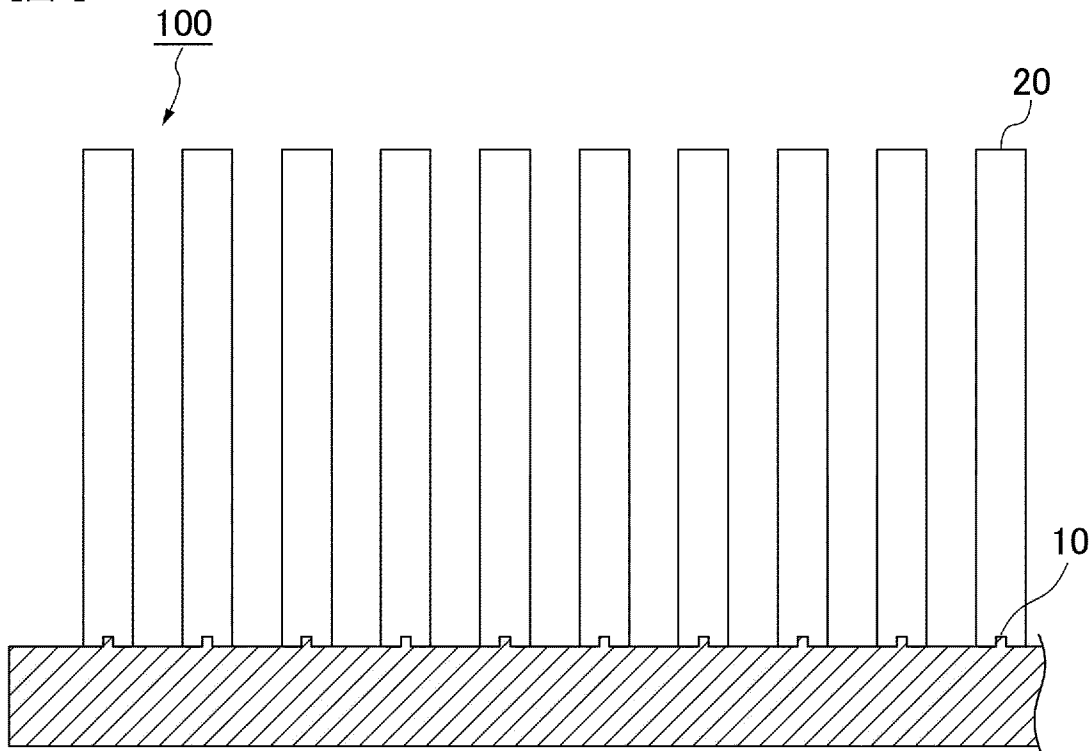
請求の範囲

- [請求項1] 下記の工程（A）及び（B）を含む三次元筋組織の製造方法：
（A）筋芽細胞を含むハイドロゲルを培養容器へ供給する工程であつて、
前記培養容器は、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部間にわたって複数の凸部が配列してなる培養容器である工程、並びに、
（B）前記培養容器中で、筋芽細胞を筋管へと分化誘導する工程。
- [請求項2] 前記培養容器において、前記凸部の長手方向の長さ（X）が1 cm以上、かつ、前記凸部の短手方向の長さ（Y）が1 cm以上である、請求項1に記載の三次元筋組織の製造方法。
- [請求項3] 前記培養容器において、前記凸部の長手方向の長さ（X）に対する前記凸部の短手方向の長さ（Y）の比〔（Y）／（X）〕が0.7以上である、請求項1に記載の三次元筋組織の製造方法。
- [請求項4] 前記凸部が、高さ50 μm～1 mmである、請求項1に記載の三次元筋組織の製造方法。
- [請求項5] 前記凸部の互いの間隔が、10 μm～1 mmである、請求項1に記載の三次元筋組織の製造方法。
- [請求項6] 請求項1～5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。
- [請求項7] 三次元筋組織を製造するための培養容器であつて、容器端部に向かい合う一対のアンカー部と、前記一対のアンカー部間にわたって複数の凸部が配列してなる、培養容器。

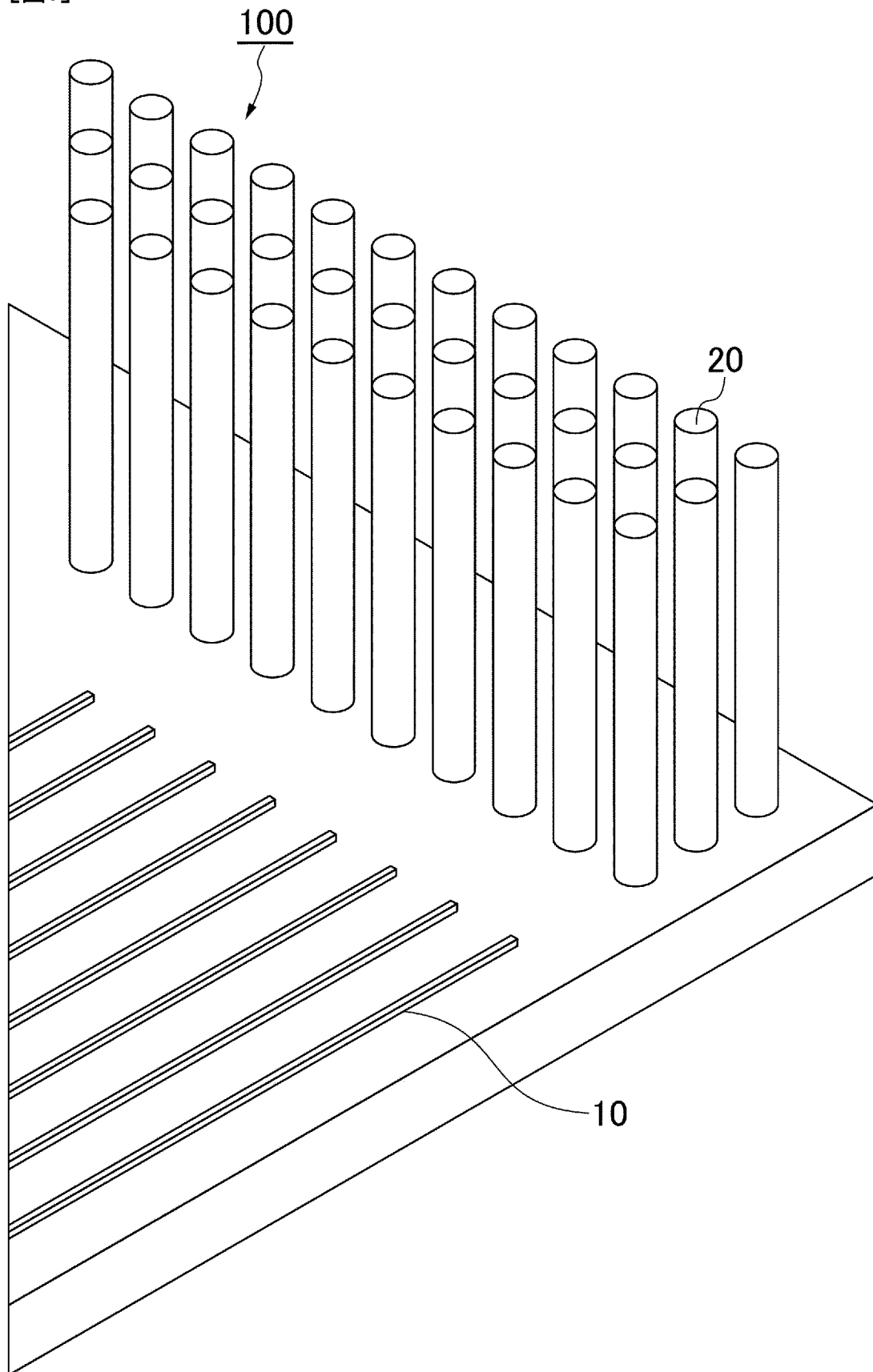
[図1]



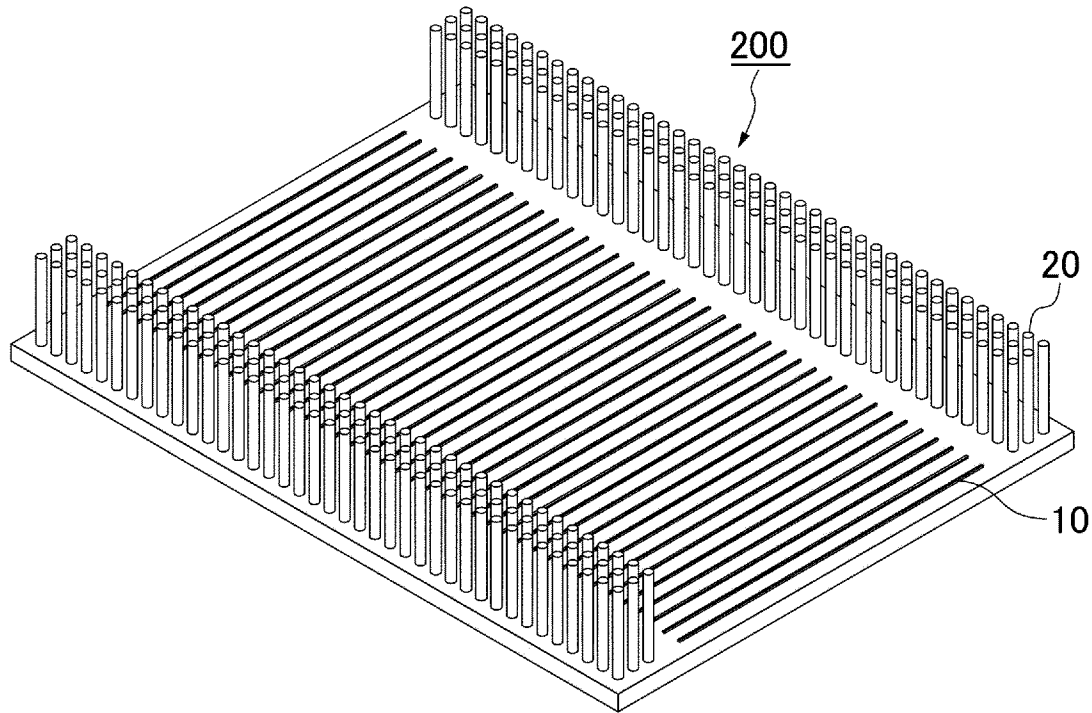
[図2]



[図3]

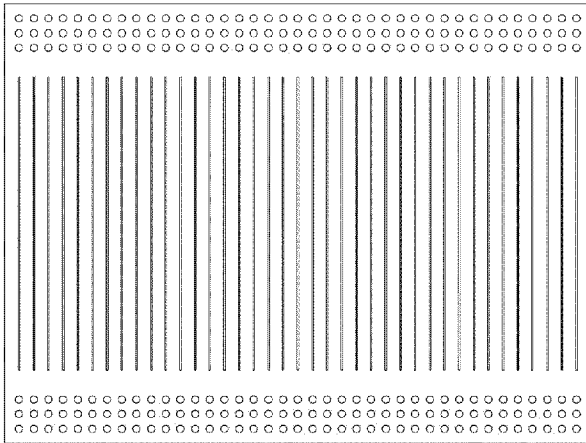


[図4]

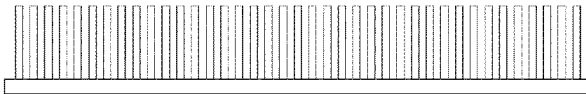


[図5]

(a)



(b)



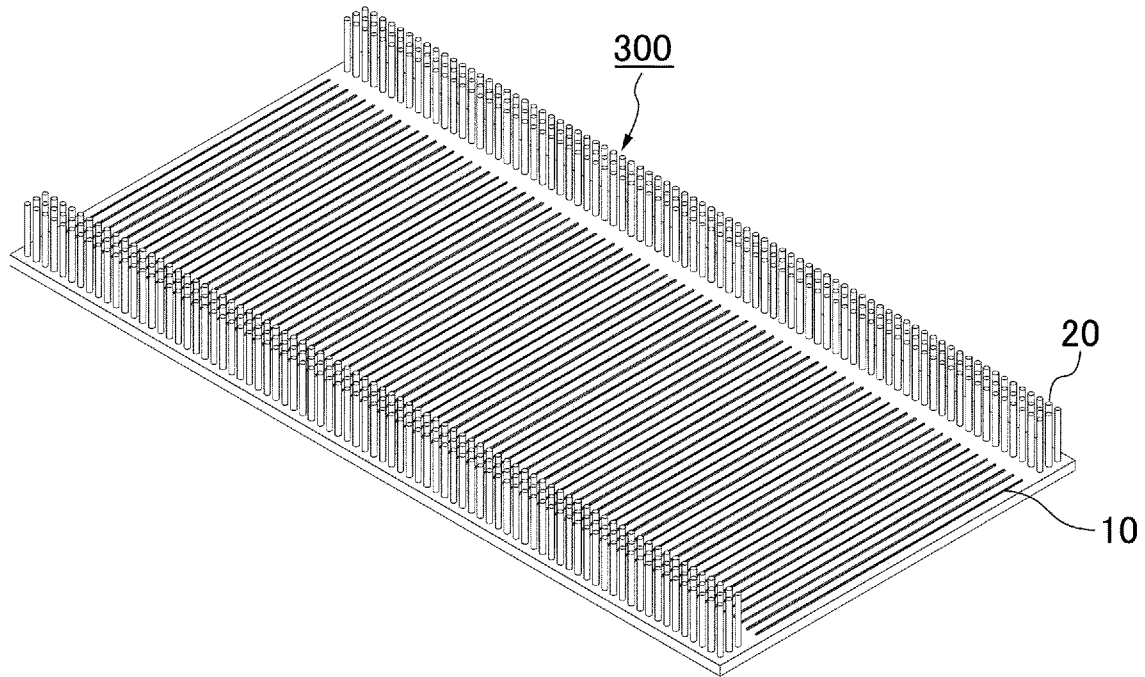
(c)



(d)

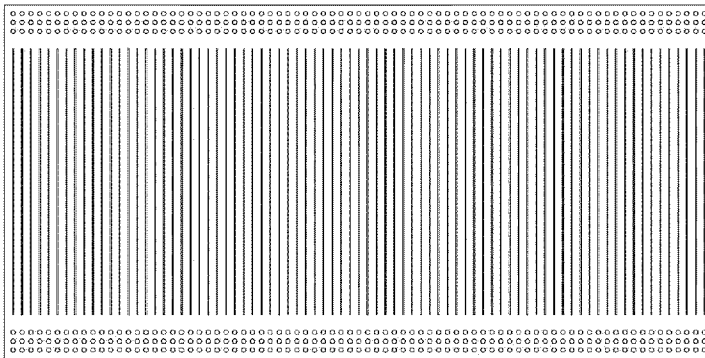


[図6]



[図7]

(a)



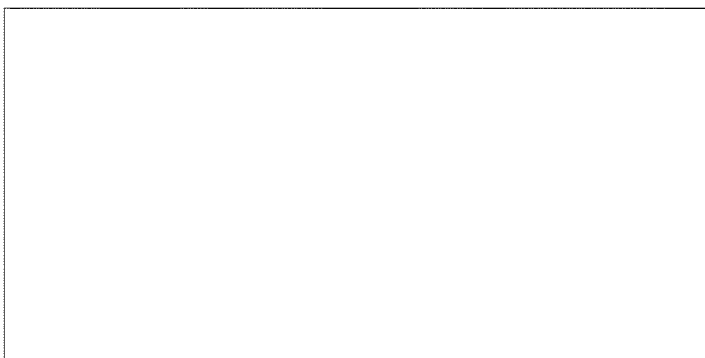
(b)



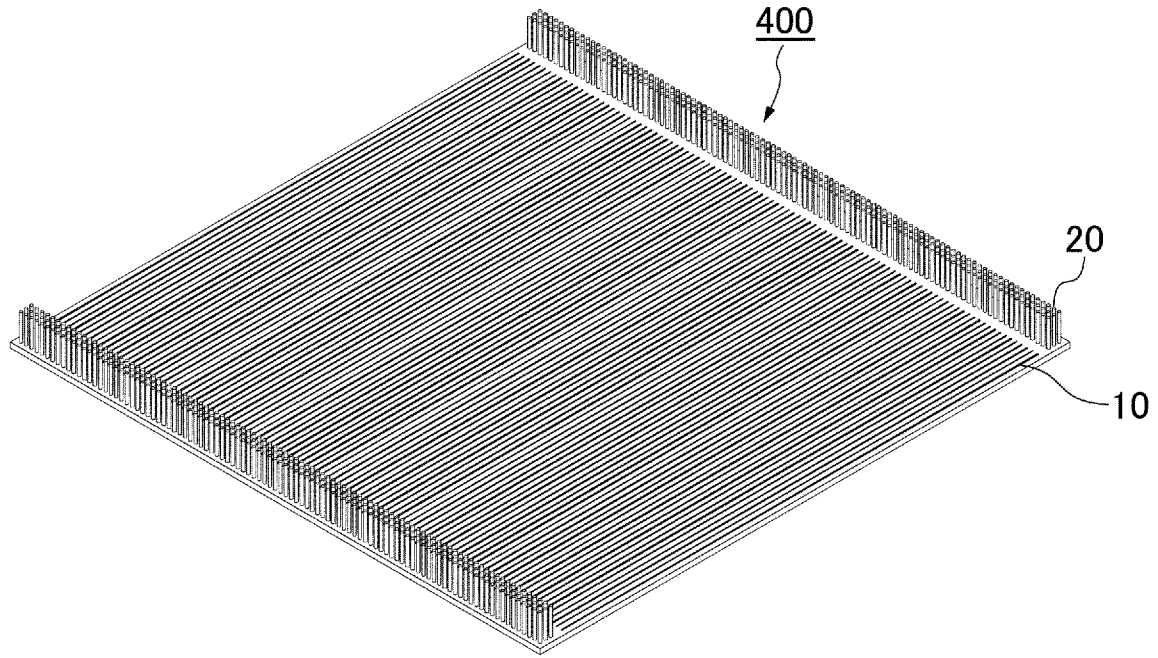
(c)



(d)

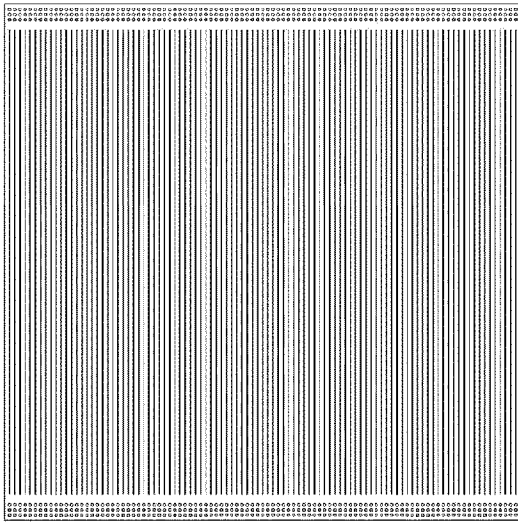


[図8]



[図9]

(a)



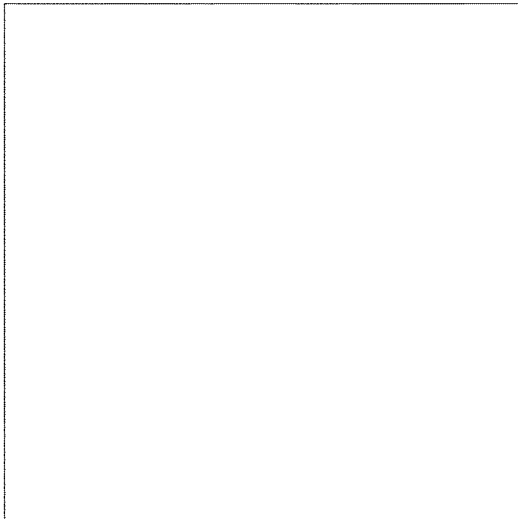
(b)



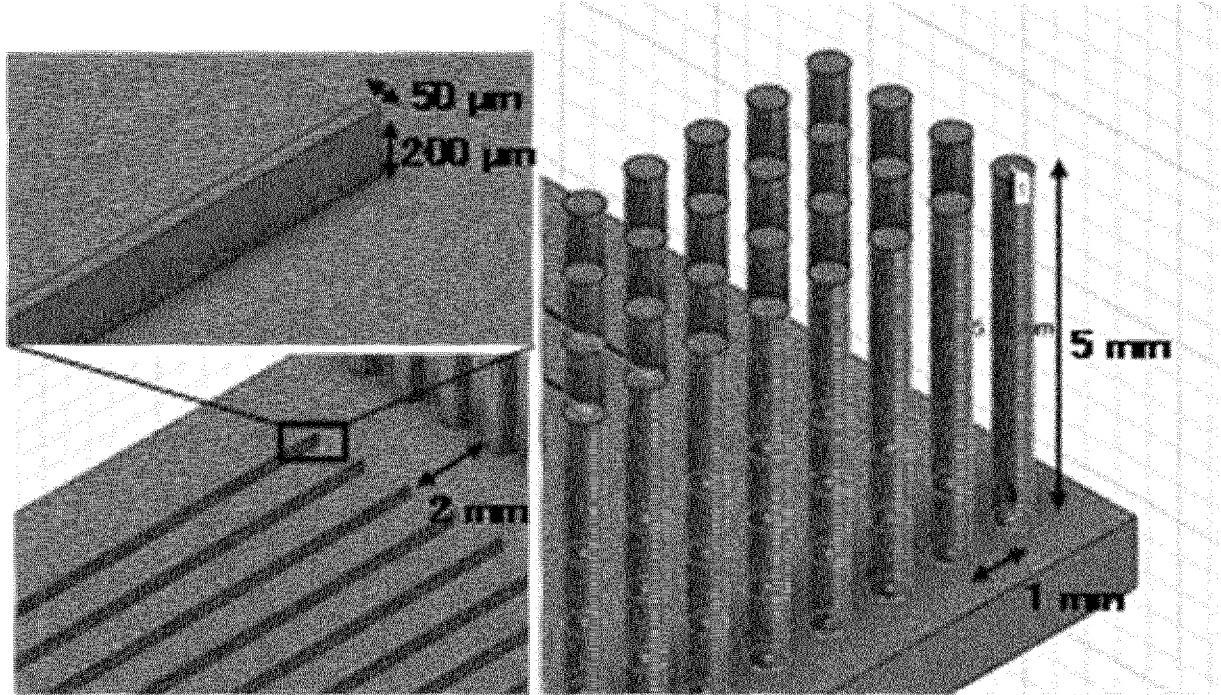
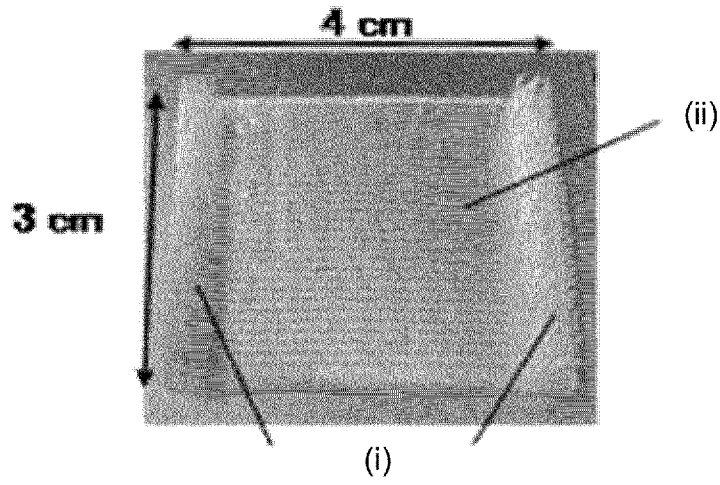
(c)



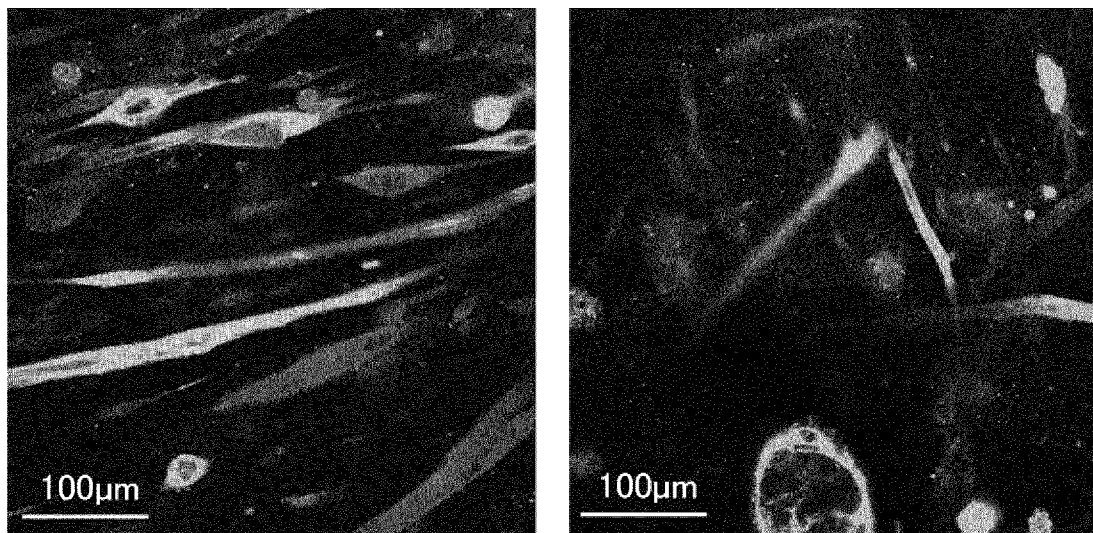
(d)



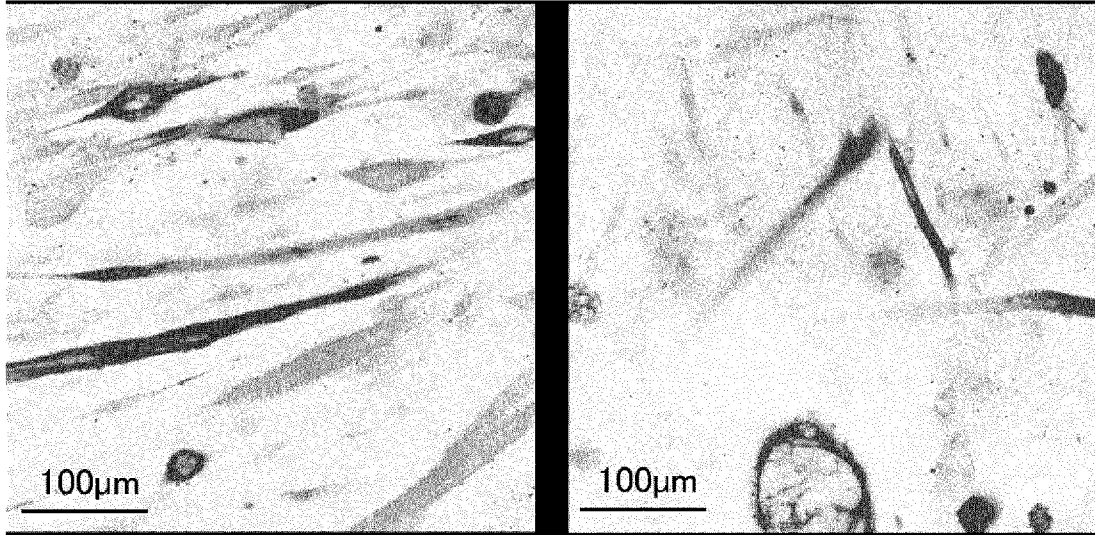
[図10]



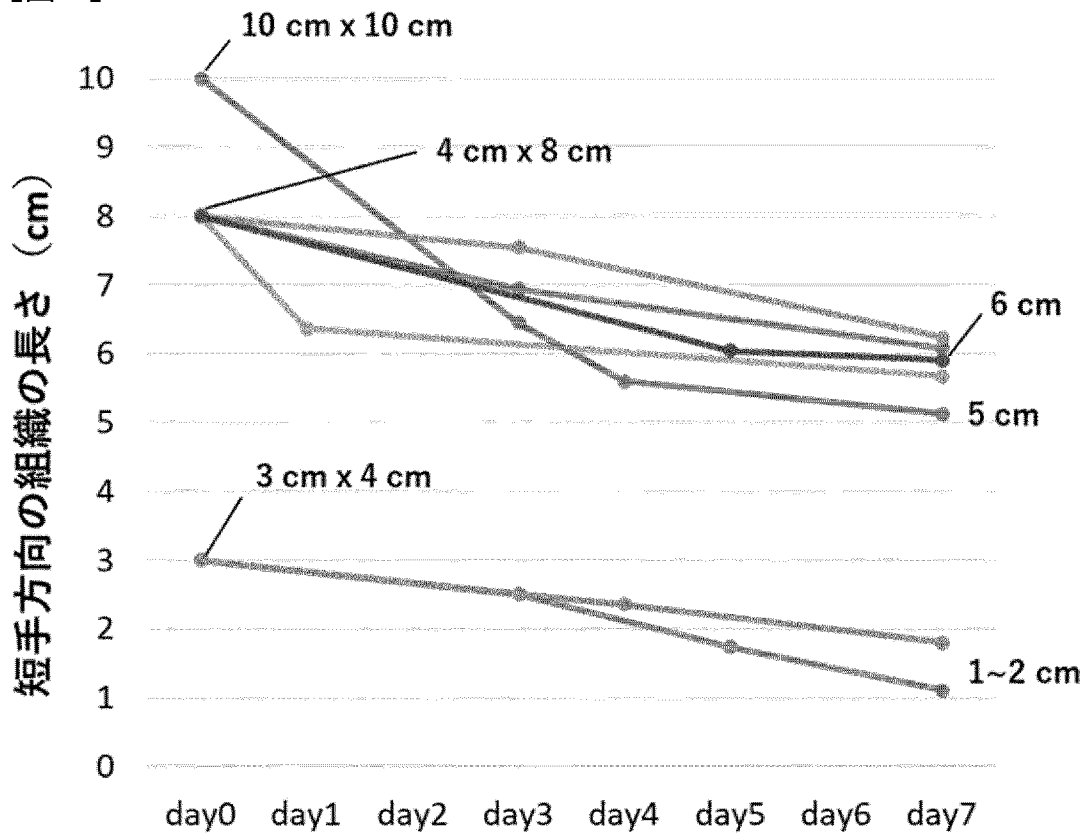
[図11-1]



[図11-2]

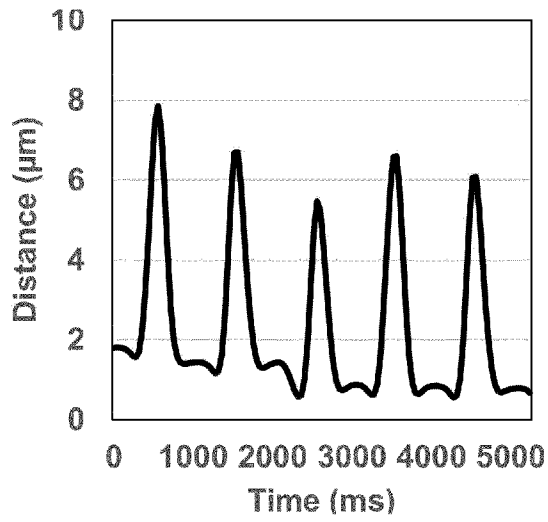


[図12]

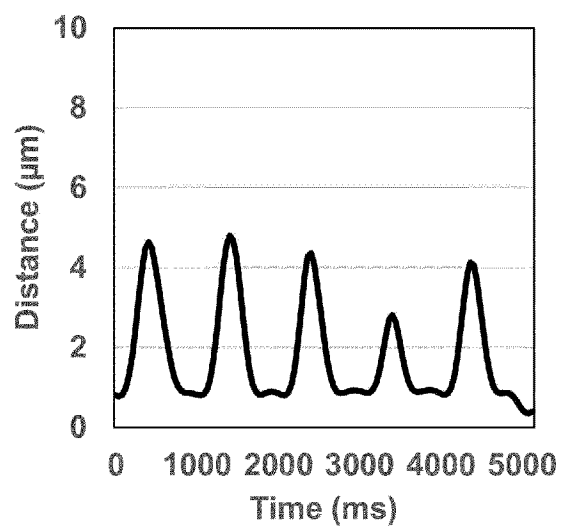


[13]

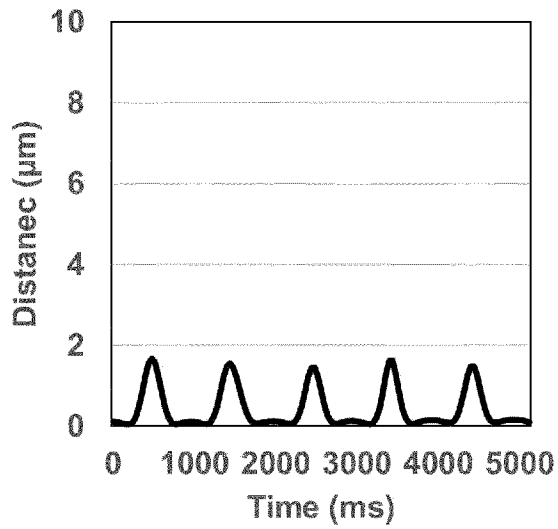
(A)



(B)



(C)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/027702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i FI: C12N5/071; C12M1/00 D According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/071; C12M1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/132478 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 01 July 2021 (2021-07-01) paragraphs [0013], [0023], [0028], [0096]-[0097], [0101], fig. 1	1, 6-7
Y		2-5
Y	JP 2020-141573 A (NISSIN FOODS HOLDINGS CO LTD) 10 September 2020 (2020-09-10) claims 1, 5-6, paragraph [0041]	2-5
A	JP 2008-289375 A (DAINIPPON PRINTING CO LTD) 04 December 2008 (2008-12-04)	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 September 2023		Date of mailing of the international search report 12 September 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/027702

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/132478	A1	01 July 2021	US 2023/0020499 A1 paragraphs [0050], [0060], [0065], [0136]-[0137], [0141], fig. 1	

JP	2020-141573	A	10 September 2020	US 2022/0169962 A1 claims 1, 5-6, paragraph [0052]	

				EP 4083195 A1	

				EP 3936604 A1	

				CN 113508172 A	

JP	2008-289375	A	04 December 2008	US 2008/0293139 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/071(2010.01)i; C12M 1/00(2006.01)i FI: C12N5/071; C12M1/00 D		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/071; C12M1/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2021/132478 A1 (国立大学法人東京大学) 01.07.2021 (2021-07-01) [0013], [0023], [0028], [0096]-[0097], [0101], 図1	1, 6-7
Y		2-5
Y	JP 2020-141573 A (日清食品ホールディングス株式会社) 10.09.2020 (2020-09-10) 請求項1, 5-6, [0041]	2-5
A	JP 2008-289375 A (大日本印刷株式会社) 04.12.2008 (2008-12-04)	1-7
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	01.09.2023	国際調査報告の発送日 12.09.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 松井 一泰 4N 5805 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2023/027702

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/132478	A1	01.07.2021	US	2023/0020499	A1	
					[0050], [0060], [0065], [0136]-[0137], [0141], FIG. 1		
				EP	4083195	A1	
JP	2020-141573	A	10.09.2020	US	2022/0169962	A1	
					Claim1, 5-6, [0052]		
				EP	3936604	A1	
				CN	113508172	A	
JP	2008-289375	A	04.12.2008	US	2008/0293139	A1	