

(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
2022年6月9日(09.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/118977 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/044598

(22) 国際出願日: 2021年11月30日(30.11.2021)

(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 2020-199782 2020年12月1日(01.12.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 安達 泰治 (**ADACHI, Taiji**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). オケヨ ケネディ オモンディ (**OKEYO, Kennedy Omondi**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (**YAMAO, Norihito et al.**); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS,

MW, MZ, NA, RW, 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, 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:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) **Title:** STRUCTURE, CELL CULTURE DEVICE, ORIENTED CELL SHEET AND METHOD OF INDUCING ORIENTED CELL SHEET FORMATION

(54) 発明の名称: 構造体、細胞培養装置、配向した細胞シートならびに配向した細胞シート形成を誘導する方法

(57) **Abstract:** The present invention provides a structure that is for inducing the formation of an oriented cell sheet on a continuous cell culture surface and that has anisotropic mechanical properties.

(57) 要約: 本発明では、連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための構造体であって、異方的な力学特性を有する構造体を提供される。



WO 2022/118977 A1

明 細 書

発明の名称：

構造体、細胞培養装置、配向した細胞シートならびに配向した細胞シート形成を誘導する方法

技術分野

[0001] 本発明は、連続的な細胞培養面における配向した細胞シート形成の誘導技術に関する。

より詳細には、本発明は、構造体、細胞培養装置、配向した細胞シートならびに配向した細胞シート形成を誘導する方法に関する。

背景技術

[0002] 本発明者のうちの一人は、状態のよい細胞のみで形成された高品質で安全性の高い細胞シートを、継代を必要とせず作製及び維持できる細胞培養支持体、およびこれを使用して製造した細胞シート等を提供することを課題として、平面状メッシュ構造を有する細胞培養支持体に関する発明を出願している（特許文献1）。

[0003] 特許文献1の発明では、細胞培養支持体を培養液中に浮かせた状態で細胞を播種すると、細胞が自発的にメッシュ状構造の開口部に伸展し、接触した細胞同士が接着・連結してメッシュ構造の開口部を埋め、最終的に単層の細胞シートが形成され、このような細胞シートによれば、細胞がコンフルエントな状態になることがなく、細胞が増殖しても死細胞や状態の悪い細胞は細胞培養支持体から自然に脱落するので、継代を行わずに長期間培養維持でき、状態の良い生細胞のみからなる安全性の高い細胞シートを得ることができると記載されている。

さらに、特許文献1には、メッシュ構造に形状的異方性を付与することにより細胞の配向性を制御できることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開番号 WO2015-005349A1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 再生医療分野では、細胞が自己集合的に形成した細胞シートの応用が期待されており、一部実用化されつつある。

特に配向性を有する骨格筋や心筋等の組織の再生には配向性細胞シートが有用であるため、細胞が配向した細胞シートの製造方法および装置の要望が存在する。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、鋭意検討した結果、配向した細胞シート形成が、細胞が接する培養支持体の培養面内に生じる力学的異方性によって誘導されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] より具体的には、本発明者は、細胞自体が固有に有する培養支持体の培養面内に生じる力学的異方性の感知能力を利用して、配向した細胞シート形成を誘導できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、

連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための構造体であって、異方的な力学特性を有する変形可能な構造体；

上記の構造体と、培養液とを含む、前記連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための細胞培養装置；

上記の細胞培養装置を用いて誘導された配向した細胞シート；

上記の構造体を培養液に浸漬し、前記構造体の前記連続的な細胞培養面に細胞を播種し、培養することを含む、配向した細胞シート形成を誘導する方法
を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明では、細胞が配向した細胞シートの形成を誘導できる。例えば、本

発明に係る構造体によれば、生体内の力学的環境下で形成される配向した細胞組織（例えば、皮膚細胞組織、心筋細胞組織、骨格筋細胞組織、腱・靱帯細胞組織など）の形成を生体外の環境下で誘導することができる。また、高次細胞構造体を形成することもでき、各種の研究や再生医療に適用することができる。また、細胞が高次の組織を構築する過程における細胞の移動を制御することができる。さらに、薬剤スクリーニングのためのイン・ビトロモデルを作製したり、機械的刺激による細胞分化の調節に利用することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1（A）は構造体の1つの実施形態（正方形リブ型部位を有する構造体）の斜視図を示す。図1（B）は図2（B）（正方形または長方形のリブ型部位を有する構造体）のY-Y'線の断面図である。本明細書および図面においては、構造体の1つの方向のリブ型部位ともう1つの方向のリブ型部位の幅が異なる場合はそれぞれ w_1 および w_2 と記載し、両方のリブ型部位の幅が同じである場合は両方の幅を w としている。

[図2]図2は構造体の1つの実施形態（菱形リブ型部位を有する構造体（A）および正方形または長方形リブ型部位を有する構造体（B））を示す上面図である。

[図3]図3は構造体の1つの実施形態（埋め込み型部位）を示す断面図である。

[図4]図4は菱形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）に誘導された配向した細胞シート形成を示す顕微鏡画像と細胞シートの配向度の分布を示すグラフである。

[図5]図5は正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性（または等方性）の面内弾性特性）における顕微鏡画像と細胞シートの配向度の分布を示すグラフである。

[図6]図6は菱形リブ型部位のリブ幅を変化させた構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）に誘導された配向した細胞シート形成を示す顕微鏡

画像である。

[図7]図7は菱形リブ型部位のピッチを変化させた構造体（異方性の面内弾性特性）に誘導された配向した細胞シート形成を示す顕微鏡画像である。

[図8]図8は正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性（または等方性）の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における顕微鏡画像と細胞シートの配向度の分布を示すグラフである。

[図9]図9は図8の構造体から横のリブ幅のみを変化させた場合の正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性（または等方性）の面内弾性特性・面内粘弾性特性から異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性に変化）における顕微鏡画像と細胞シートの配向度の分布を示すグラフである。

[図10]図10は異なる幅および／または高さの正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性または異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における配向強度を示すグラフである。

[図11]図11は菱形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における培養3日目（A）および培養5日目（B）の経時的な配向性獲得を示す顕微鏡画像である。

[図12-1]図12-1は縦と横で異なるリブ幅を有する正方形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における培養10時間後（A）から56時間後（D）までの経時的な配向性獲得を示す顕微鏡画像である。

[図12-2]図12-2は縦と横で異なるリブ幅を有する正方形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における培養70時間30分後（E）から86時間後（F）までの経時的な配向性獲得を示す顕微鏡画像である。

[図13]図13はプレビスタチン処理および無処理の、異なる幅の正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性または異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性）における誘導された配向した細胞シート形成の配向強度を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 本明細書中で用いる「連続的な細胞培養面」とは、細胞シートの形成が誘導される構造体の少なくとも一面を構成する、実質的に平坦な面をいう。

本明細書中で用いる「配向した細胞シート」とは、複数の細胞が所望に集合してできたシート、好ましくは、ある方向（例えば、構造体および／または細胞培養面の面内方向としてのある方向）に相対的に多く細胞が集合してできたシートをいい、より好ましくは複数の細胞が一軸方向を向いて集合してできたシートをいう。このような細胞シートにおいては、細胞同士は接触していても接触していなくてもよい。

本明細書中で用いる「異方的な力学特性」とは、構造体の力学特性（培養する細胞自体が発する力を含む）が等方性または等二軸でないこと、換言すれば、構造体の力学特性をいい、例えば、弾性、剛性または粘弾性特性が、培養面内の任意の直交する二軸で等しい大きさを有さないことを意味する。

本明細書中で用いる「変形可能な構造体または部位」とは応力（付着する細胞自体が発生する力を含む）に対して変形可能な材料からなる構造体または部位をいい、例えば弾性体および／または粘弾性体などからなる構造体または部位が含まれる。換言すれば、変形可能な構造体または部位とは、剛体でない構造体または部位ということもできる。変形可能な部位は、構造体の内部に配置しても、下記するリブ型部位のように構造体の外部に配置してもよく、またいずれの形状および／または大きさを有するものであってもよい。

本明細書中で用いる「リブ型部位」とは、構造体の連続的な細胞培養面の外部（例えば裏面）に形成される突出部をいい、複数のリブ型部位が任意の角度で配置することによって正方形、長方形、菱形、および／またはハニカム（六角形、もしくは長六角形）などのリブ形状が形成される。リブ型部位自体の形状は、特に制限はない。例えば、細胞培養面の面内方向に垂直となる方向のリブ型部位の断面が四角形（正方形および／または長方形）、三角形、五角形および／または六角形などの多角形、半円形または楕円形などとなる形状としてよい。また、「リブの幅」とは連続的な細胞培養面の外部（

例えばその裏面)の面内方向のリブ型部位の大きさまたは寸法である。例えば、「リブの幅」は、細胞培養面の面内方向に延在するリブについて当該延在方向に直交する方向における大きさまたは寸法であってよく、より具体的には、そのようなリブ延在方向に直交する方向の大きさまたは寸法のうち最大となるもの(リブ同士の交点箇所を除く部分での最大の大きさまたは寸法)であってよい。例えば、幅が異なる、ピッチの異なるおよび/または高さが異なる2種類以上のリブ型部位(例えば、互いに交差する2種類以上のリブ型部位)を配置して、力学的異方性を生じさせてよい。「リブの高さ」とは連続的な細胞培養面の外部(例えばその裏面)の面内方向に垂直のリブ型部位の大きさをいう。また、「リブのピッチ」とは、例えばリブ間の距離が最大となる方向のリブ中心線とリブ中心線との間の長さをいう。一方、「埋め込み型部位」とは構造体の内部に配置される変形可能な部位をいい、リブ型部位と同様に任意の角度、幅、高さ、および/またはピッチで配置することができる。

本明細書中で用いる「構造体の一軸方向」とは、連続的な細胞培養面の面内方向の任意の直交する二軸のうちの弾性、剛性または粘弾性が大きい軸方向をいい、「細胞の一軸方向」とは、結果として細胞が配向する軸方向をいう。

本明細書中で用いる「配向強度」とは、最も多数の細胞が配向する方向から $\pm 10^\circ$ 以内に入る細胞の数を培養細胞の総数で除した無次元の値をいう。

[0012] 本発明と特許文献1に係る発明は、両方とも細胞シートの形成を誘導するために構造体を用いるものである。しかし、本発明では連続的な細胞培養面、すなわち実質的に平坦な細胞培養面に配向した細胞シート形成が誘導され、特許文献1では培養基材メッシュ構造の開口部に細胞シート形成が誘導される。したがって、両者は細胞シートを誘導する構造体の形状が全く異なる。

[0013] また、本発明では構造体の面内の力学的異方性を感知して細胞が配向する

という性質を利用する発明である。一方、特許文献1の発明は細胞がメッシュ状構造の開口部に伸展し、接触した細胞同士が接着・連結してメッシュ構造の開口部を埋めるという性質を利用する発明である。したがって、両者は細胞シート形成の誘導機構が全く異なる。

[0014] 本発明はある実施態様において、連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための構造体であって、異方的な力学特性を有する構造体を提供する。

本発明は1つの実施態様において、前記の構造体は、その内部または外部に、該構造体の前記異方的な力学特性を生じさせる変形可能な部位を有しているてもよい。また、前記の構造体は、その内部または外部に、該構造体の前記異方的な力学特性を生じさせる部位を有しているてもよい。例えば、当該部位を含めて構造体に変形可能であってよい。構造体はその内部または外部に異方的な力学特性を生じさせる変形可能な部位を有する場合は、構造体のみでは等方的な力学特性を有している場合において、その部位により構造体内部に異方的な力学特性を生じさせて、細胞が一軸方向に配向している細胞シートを誘導することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記部位として、構造体の内部または外部に、前記構造体の一軸方向に前記異方的な力学特性を生じさせる形状の部位が設けられていてよい。構造体はその内部または外部に構造体の一軸方向に異方的な力学特性を生じさせる形状の部位が設けられている場合は、構造体のみでは等方的な力学特性を有している場合において、その部位により構造体内部に一軸方向に異方的な力学特性を生じさせて、細胞が一軸方向に配向している細胞シートを誘導することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記部位として、前記構造体の内部または外部に、前記構造体の一軸方向に前記異方的な力学特性を生じさせる幅の異なる部位が設けられていてよい。構造体の内部または外部に、前記構造体の一軸方向に前記異方的な力学特性を生じさせる幅の異なる部位が設けられている場合は、幅の異なる部位を設けることによって構造体内部に一軸方

向に異方的な力学特性を生じさせて、細胞が一軸方向に配向している細胞シートを誘導することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記部位として、剛性の異なる部位が構造体の内部または外部に不均一に配置されていてよい。前記部位として、剛性の異なる部位が構造体の内部または外部に不均一に配置されている場合は、構造体の内部または外部に不均一に配置された剛性の異なる部位によって構造体内部に一軸方向に異方的な力学特性を生じさせて、細胞が一軸方向に配向している細胞シートを誘導することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記構造体が、生体適合性材料および生体分解性材料からなる群から選択される少なくとも1種の素材から構成されていてよい。構造体が、生体適合性材料および生体分解性材料からなる群から選択される少なくとも1種の素材から構成される場合は、イン・ビボまたはイン・ビトロにおいて構造体を安全に利用することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記部位がポリマーまたは金属からなっていてよい。部位の素材がポリマーまたは金属からなる場合は、簡単にかつ低コストで細胞を一軸方向に配向している細胞シートを製造できる。

本発明は1つの実施態様において、前記細胞シート形成が自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞が集合して形成されたシートの形成であってよい。細胞シート形成が自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞が集合して形成されたシートの形成である場合は、自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞に対して本発明の構造体を用いてシート形成をすることができる。

本発明は1つの実施態様において、前記配向した細胞シート形成が、前記構造体において剛性がより高い軸方向に誘導されてよい。配向した細胞シート形成が、構造体において剛性がより高い軸方向に誘導される場合は、構造体において剛性がより高い軸方向を設けることにより配向した細胞シート形成を誘導することができる。

本発明は1つの実施態様において、前記変形可能な構造体をあらかじめ一

軸方向に引っ張っておくことにより、該構造体の前記異方的な力学特性を有してよい。変形可能な構造体をあらかじめ一軸方向に引っ張っておくことにより、構造体に異方的な力学特性を生じさせる場合は、構造体そのものは等方的な力学特性を有するものであっても異方的な力学特性を生じさせて、細胞が一軸方向に配向している細胞シートを誘導することができる。

本発明はある実施態様において、前記いずれか1つに記載の構造体と、培養液とを含む、前記連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための細胞培養装置を提供する。当該細胞培養装置により、細胞が一軸方向に配向している細胞シート形成を誘導することができる。ある好適な例であるが、例えば、構造体の剛性、弾性および／または粘弾性などの力学特性が最も高い軸方向に配向するように細胞シート形成を誘導することができる。

本発明はある実施態様において、前記の細胞培養装置を用いて誘導された配向した細胞シートを提供する。当該細胞シートは、細胞組織（例えば、皮膚、心筋、骨格筋、腱、靱帯、神経、血管、弁等の組織）の構築と再生医療に利用できる可能性がある。また、細胞が組織を構築する過程における細胞移動の制御に利用できる可能性がある。さらに、薬剤スクリーニングのためのイン・ビトロモデルの作製（例えば、配向した心筋細胞の収縮力測定）や機械的刺激による細胞分化の調節などに利用できる可能性がある。

本発明はある実施態様において、前記いずれか1つに記載の構造体を培養液に浸漬し、前記構造体の前記連続的な細胞培養面に細胞を播種し、培養することを含む、配向した細胞シート形成を誘導する方法を提供する。当該方法により誘導される細胞シートは、細胞組織（例えば、皮膚、心筋、骨格筋、腱、靱帯、神経、血管および／または弁等の組織）の構築と再生医療に利用できる可能性がある。また、細胞が組織を構築する過程における細胞移動の制御に利用できる可能性がある。さらに、薬剤スクリーニングのためのイン・ビトロモデルの作製（例えば、配向した心筋細胞の収縮力測定）や機械的刺激による細胞分化の調節などに利用できる可能性がある。

本発明は1つの実施形態において、前記方法は静置培養で行ってよい。当該方法を静置培養で行うことにより、通常の培養として静置培養される細胞に対して、この方法を適用することができる。

[0015] 本発明の構造体を図1～図13を参照しつつ説明する。

＜構造体＞

本発明の構造体(1)は、細胞の播種・培養を行う少なくとも1つの連続的な細胞培養面(2)を有する変形体、より具体的には弾性体および／または粘弾性体であり、どのような形態のものであってもよいが、一般的には膜やプレートなどを含む直方体、正方体、その他の角柱などとすることができる。本発明の構造体により、前記の連続的な細胞培養面(2)上に配向した細胞シートの形成が誘導される。

[0016] 1つの態様において、構造体の異方的な力学特性は、等方的な構造体(1)の連続的な細胞培養面(2)の外部、例えばその裏面(3)、または構造体内部に、異方的な力学特性を生じさせる部位を形成すること又は備えることにより生じさせることができる。すなわち、細胞が直接的に接触する連続的な細胞培養面(2)自体は細胞からみて実質的に平坦であるが、構造体上記の部位を形成することにより、構造体としては異方的な力学特性を生じさせることができる。このような説明から分かるように、構造体の外部とは、構造体(例えば、好ましくはプレートもしくはプレート構造体またはフィルムもしくはフィルム構造体)の主要部材に対して外側を指している。一方、構造体の内部とは、構造体の主要部材(例えば、好ましくはプレートもしくはプレート構造体またはフィルムもしくはフィルム構造体)の細胞培養面を含めて当該面から内側を指している。

[0017] ＜構造体の部位＞

(リブ型部位)

構造体が有するこの部位は、例えば構造体の裏面(3)に突出したリブ(4)であってよい。例えば、かかる部位は変形可能な材料からなっていてよい。例えば外力などに起因して変形可能な材料(1つ例示すると、ポリマー

などの樹脂材)を含んで成っていてよい。別の切り口からいえば、構造体および／または当該部位などは弾性特性および／または粘弾性特性を有する材料・材質から構成されていてよい。例えば、図1に示すように構造体の細胞を培養する連続的な細胞培養面(2)の外部、例えば裏面(3)に突出した、構造体の培養面内の一軸方向に異方的な力学特性を生じさせる形状のリブ(4)として当該部位を設けてよい。リブは複数設けてよい。複数のリブを任意の角度で配置するように形成することにより、正方形、長方形、菱形、ならびに／またはハニカム(六角形、もしくは長六角形)などのリブの形状とすることができる。一例として、図2にリブ(4)を $<90^\circ$ で交差させて形成した菱形のリブを示す。一般に正方形のリブを有する構造体は培養面内において等二軸性の力学特性を有するが、正方形を形成する複数のリブの寸法を異なるものとするにより、構造体の培養面内の力学特性を異方性にするすることができる。例えば、正方形を形成する複数のリブの幅を異なるものとしたり、複数のリブの高さを異なるものとするにより、構造体の培養面内の力学特性を異方性にするすることができる。例えば、平面視でみた場合の正方形を形成する縦方向と横方向のリブの幅を互いに異なるものとしたり、縦方向と横方向のリブの高さを互いに異なるものとするにより、構造体の培養面内の力学特性を異方性にするすることができる。一方で、長方形や菱形のリブは、構造体の培養面内の二軸方向に力学特性の大きさに差が生じるため、リブの幅や高さが同じであっても異方的な力学特性が生じる。また、長方形や菱形を形成する複数のリブの幅および／または高さは、異なるものとすることもできる。さらに、構造体の異方的な力学特性は、異なる幅および／または高さのリブを例えば一定のピッチで形成することにより、または同一の幅および／または高さのリブを例えば異なるピッチで配置することによっても生じさせることができる。

上記したリブ型部位は構造体の外部(例えばその裏面)に突出した凸部を形成することにより構造体の培養面内の力学特性を異方性にする態様であるが、構造体(例えばその裏面)に嵌入した凹部を設ける態様によっても構造

体の培養面内の力学特性を異方性にすることができる。すなわち、構造体の外部（例えばその裏面）に凹凸部を設けることにより、構造体の培養面内の力学特性を異方性にする事ができる。

[0018] （埋め込み型部位）

また、異方的な力学特性を生じさせる部位は、例えば、図3に示すような剛性、弾性および／または粘弾性が互いに異なる変形部位（5、6）を構造体内部に不均一に配置したものとすることができる。例えば、異なる剛性、弾性および／または粘弾性を有する材料からなる複数の部位を上記したようなリブ型部位の形状または幅で構造体の内部に配置することにより、構造体に異方的な力学特性を生じさせることができる。また、構造体の異方的な力学特性は、異なる幅の部位を一定のピッチで構造体に配置することにより、または同一の幅の部位を異なるピッチで配置することによっても生じさせることができる。

[0019] 播種した細胞は、上記したような部位により生じる構造体の異方的な力学特性を感知し、構造体の連続的な細胞培養面上で構造体の剛性、弾性および／または粘弾性が一般的には相対的に高い軸方向に配向し、好ましくは構造体の剛性、弾性および／または粘弾性が最も高い軸方向に配向して、細胞シートの形成が誘導される。

[0020] <引っ張りによる異方的な力学特性の発生>

また、上記した配向した細胞シート形成の誘導メカニズムの下で、等方的な力学特性を固有に有する構造体を細胞播種の前または後に単軸（一軸）方向に引っ張ることにより異方的な力学特性を生じさせることによっても、配向した細胞シート形成を誘導することができる。換言すれば、変形可能な構造体の一軸方向（または所定方向）の引っ張りに起因して異方的な力学特性を有する構造体であってもよい。単軸方向の引っ張りは、細胞を播種する前から予め行っておいても、細胞を播種した後に行ってもよい。

[0021] 細胞を播種する構造体の連続的な細胞培養面は平滑な表面であるが、材料の力学的特性（剛性、弾性、および／または粘弾性）が方向に依存して変化

する（等方性でない）特性をもたせる、すなわち、異方性をもつ弾性および／または粘弾性（細胞の自己収縮力と同程度で細胞自身が弾性変形に伴う接着力を制御できる）構造体であってよい。例えば、変形可能な弾性膜（ポリマーやシリコンゴム）をあらかじめ単軸に引っ張っておいてもよく、すなわち、予延伸を与えることで、弾性膜の非線形弾性特性を活用し、弾性特性および／または粘弾性特性の異方性を実現してもよい。

[0022] さらに、細胞を培養する間に、一軸方向の動的な繰り返し引張りを構造体に加えることにより、構造体の弾性特性および／または粘弾性特性の異方性を実現してもよい。

[0023] 構造体に動的な繰り返し引張りを与えて培養する場合は、播種した細胞が構造体の弾性および／または粘弾性が最も高い軸方向に配向して細胞シートの形成が誘導される場合に限らず、播種した細胞が構造体の弾性および／または粘弾性が最も低い軸方向に配向して細胞シートの形成が誘導される場合もあり得る。

[0024] <構造体および部位の材料>

本発明の構造体および／または部位は、細胞毒性を示さず、細胞シート形成が誘導される限り、同一または異なる材料から構成されるものであってよい。例えば、構造体および／または部位は、樹脂材、および／または金属材料から構成・形成されていてよい。なお、埋め込み型の部位においては、構造体とは剛性、弾性および／または粘弾性が異なる単数または複数の種類の材料から部位が構成される。本発明に係る構造体および部位は、例えば、生体適合性金属および／または生体適合性ポリマーなどの生体適合性材料、または生体分解性材料から構成されていてよい。

[0025] 生体適合性材料および／または生体分解性材料から構成される構造体および部位を用いて得られる細胞シートは、これらの構造体および部位と一緒に生体に移植するなどして再生医療により好適に用いることができる。

[0026] 生体適合性材料としては、チタンなどの金属、シリコン、ポリエーテルブロックアミド（PEBA X）、ポリウレタン、シリコンーポリウレタン

共重合体、セラミックス、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ナイロン、ポリエチレンテレフタレート、および／またはゴアテックス（登録商標）などの超高分子量ポリエチレン、ならびに／またはポリ塩化ビニルなどのポリマー、その他生体由来材料などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0027] 生体分解性材料としては、ポリラクチド（PLA）、ポリグリコリド（PGA）、ポリカプロラクトン（PCL）、および／もしくはそれらの共重合体、PHB-PHV系ポリ（アルカン酸）類、ポリエステル類、ならびに／またはデンプン、セルロース、および／もしくはキトサンなどの天然高分子やその誘導体などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0028] また、本発明の構造体および／または部位は、生体適合性材料以外の材料で形成し、表面を生体適合性材料および／または生体分解性材料で被覆したものであってもよい。

[0029] また、構造体および／または部位の材料として樹脂を用いる場合は、慣用的な方法によって本発明の構造体および／または部位を作製してよい。

構造体および／または部位の材料として、例えば可塑性樹脂および／または硬化性樹脂を用いてよい。硬化性樹脂を用いる場合、例えばフォトリソグラフィ法を用いて構造体および／または部位を作製してもよい。フォトリソグラフィ法を用いて構造体および／または部位を作製する場合に用いる光硬化性樹脂としては、例えば、アクリレート化合物、メタクリレート化合物、エポキシ化合物、イソシアネート化合物、チオール化合物、またはシリコーン系化合物などが挙げられるがこれらに限定されない。また、これらの2種以上を組み合わせ用いてもよい。光硬化性樹脂の具体例としては、ウレタンアクリレート、ポリエステルアクリレート、エポキシアクリレート、ポリ（メタ）アクリル酸メチル、エトキシ化ビスフェノールAアクリレート、脂肪族ウレタンアクリレート、ポリエステルアクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリカーボネート、アクリル変性脂環式エポキシド、2官能アルコールエーテル型エポキシド、アクリルシリコーン、および／またはアクリルジメチルシロキサンなどが挙げられるがこれらに限定さ

れない。

[0030] 本発明の細胞を培養する構造体の連続的な細胞培養面にはフィブロネクチン等の細胞接着性分子をコーティングして、細胞の集合または接着、および配向した細胞シート形成の誘導を促進してもよい。

[0031] <構造体の製造方法>

本発明に係る構造体および部位は、その構造、用途、および／または材料等に応じて、当業者が公知の方法やそれに準ずる方法で適宜作製することができるが、一例として、フォトリソグラフィ法や、および／もしくはインクジェット方式などのプリンティング法、ならびに／または成型法によって作製する方法が挙げられる。

フォトリソグラフィ法により部位を有する構造体を樹脂材から作製する場合、以下の工程により作製することができる。

[0032] ・リブ型部位を有する構造体

(1) ウェハ基板上に構造体を構成する光硬化性樹脂をスピンコーティングにより塗布し、加熱、露光を行って構造体を作製し、

(2) 硬化した光硬化性樹脂の上に、部位に相当する光硬化性樹脂をスピンコーティングにより塗布し、

(3) リブ型部位を形成しない光硬化性樹脂の上にフォトマスクを設置し、加熱、露光を行った後に非硬化部分を除去してリブ型部位を有する構造体を作製することができる。

[0033] ・埋め込み型部位を有する構造体

(1) ウェハ基板上に構造体を構成する光硬化性樹脂をスピンコーティングにより塗布し、

(2) 埋め込み型部位を形成する光硬化性樹脂の上にフォトマスクを設置し、加熱、露光を行った後に、非硬化部分を除去して構造体を作製し、

(3) 埋め込み型部位に相当する部分に光硬化性樹脂を流し込み、加熱、露光を行って埋め込み型部位を有する構造体を作製することができる。

[0034] <細胞>

本発明の構造体を用いて配向したシート形成を誘導する細胞としては、支持体となる構造体の力学特性の異方性を感知することができる細胞であればどのような細胞であってもよいが、例えば、接着性を有する細胞、具体的には構造体の細胞培養面に対して接着性を有する（例えば、構造体の細胞培養面にくっつく、接着するまたは付着する）細胞、および／または、自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞を挙げることができる。構造体の力学特性の異方性を感知できる細胞としては、例えば、骨格筋、心筋および／または平滑筋などの筋系細胞、生体内で配向性を有する細胞および／または力学的機能を有する細胞を挙げるができる。また、細胞の例としては、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）や間葉系幹細胞（MS細胞）から分化する過程において自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する性質を有するに至った細胞などが挙げられ、より具体的には、例えば、皮膚、心筋、骨格筋、腱、靱帯、神経、血管および／または弁などの組織を構成する細胞などが挙げられるがこれらに限定されない。

配向したシート形成では、これらの細胞が固有に有する構造体の力学特性の異方性を感知して配向し、構造体の最も高い力学特性の方向に連続的な細胞培養面上に集合して形成される。

[0035] <細胞培養装置>

本発明はある実施態様において、前記した構造体と、培養液とを含む、前記連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための細胞培養装置を提供する。

細胞培養装置を構成する培養液としては、例えば、各種添加剤を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Ames培地、イーグル基礎培地、クリック培地、DME-ハム混合培地、ダルベッコPBS（D-PBS）、アール平衡塩、F10培地、F12培地、Glasgow MEM培地、グレース昆虫培地、ハンクス緩衝塩HBS）、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM培地）、IPL41昆虫培地、L15培地、M2、M16培地、マッコイ5A培地、MCDB培地、199培地、MEM、NCTC培地、ウィリアムス培地などが挙げられるが、対象となる細胞を培養できるものであればこれ

らに限定されない。

[0036] <細胞シート>

本発明はある実施態様において、前記した細胞培養装置を用いて誘導された配向した細胞シートを提供する。

[0037] <配向した細胞シート形成の誘導>

本発明はある実施態様において、前記した構造体を培養液に浸漬し、前記構造体の連続的な細胞培養面に細胞を播種し、培養することを含む、配向した細胞シート形成を誘導する方法を提供する。例えば、面積が12mm²の前記構造体の連続的な細胞培養面に対し、1万～50万個/mlの濃度の細胞を100μl播種し、37℃、5%CO₂の条件下で3日～15日、例えば3日～7日培養して、配向した細胞シート形成を誘導してもよいが、使用する細胞などによってこれらを変化させてもよい。

[0038] なお、本発明の構造体は異方的な力学特性を有するところ、培養面内の任意の直交する二軸で等しい大きさを有さない力学的特性を有してよい。この特性につき、例えば、リブ部位の形状、リブ部位の幅および／またはリブ部位のピッチは、培養面内の任意の直交する二軸の一方の力学的特性において他方のものとは異なるように設定してよい。

[0039] 尚、上述の本発明は、次の態様を包含し得ることを確認的に述べておく。

第1態様：細胞培養面において細胞シートを形成するための構造体であって、前記細胞培養面を有する板状部材を有して成り（例えば、構造体が好ましくはプレートまたはプレート構造体となっており）、該板状部材の前記細胞培養面の反対側の面にリブ（即ち、リブに相当する部位）を備える、構造体。例えば、細胞培養面の反対側となる構造体の裏面は、局所的に構造体の厚み方向に突出または隆起するリブ形態を有してよい（例えば、構造体又は板状部材の裏面に設けられた1またはそれによりも多い複数のリブであって、構造体または板状部材の厚み方向と直交する方向に延在するリブ、好ましくは当該裏面に沿うように長く延在するリブ、例えば長尺状に延在するリブが構造体に設けられていてよい）。第1態様に係る構造体は、好ましく

は、貫通孔または開口部を有さない非貫通・非開口構造体、またはメッシュ構造を有さない非メッシュ構造体である。別の表現でいえば、第1態様に係る構造体は中実の構造体であってよく、好ましくは板状部材および／またはリブの実質的に全てが中実となった構造体である。第1態様に係る構造体の細胞培養面では、複数の細胞の集合体が形成され、そのような細胞集合体は、好ましくは細胞培養面にくっ付いて、接着してまたは付着してシート状に形成される細胞集合体（即ち、細胞の集合体から構成されるシート、好ましくは複数の細胞が自発的に集合して構成されるシート、より好ましくは複数の細胞が互いに接合または接続した箇所を少なくとも有する集合体からなるシート）であってよく、より好ましくは細胞培養面に接着した細胞から構成される細胞シート（例えば、細胞培養面の面内方向における所定方向に沿って、好ましくはある一方向に沿ってより多く細胞が集合した細胞列から成るような配向性を有する又は配向性が高い若しくは向上した細胞集合体から構成される細胞シート）である。

第1態様において、構造体は、細胞シート形成を誘導するための構造体であってよい。第1態様の構造体において、細胞培養面は平坦面であってよい。例えば、細胞培養面は、連続的な面、平面または平滑面などを成してよい。また、そのような構造体の細胞培養面は、細胞がくっつく、接着するまたは付着する細胞接着面であってよい。第1態様の構造体において、板状部材とリブとは互いに一体化してよい。例えば、板状部材とリブとは互いに同一および／または異なる材質・材料などから構成されていてよい。第1態様の構造体は、その平面視において、リブが幾何学的パターンを有してよい。すなわち、リブは全体的に規則的な配置形態を有してよい。例示すると、平面視にてリブ間の距離が所定ピッチとなる配置形態となっていたり、および／または、平面視にてリブ同士が交差している配置形態となっていてよい（例えば、交差するリブ同士が成す角度は1またはそれ以上の所定角度を有するように全体として統一された配置形態を有してよい）。そのような配置形態につき、リブ（特に複数のリブ、例えば互いに交差す

る形態を有する複数のリブ）は、構造体の平面視にて正方形、長方形、菱形、またはハニカム（例えば六角形もしくは長六角形）のパターン・形態を成すように設けられていてよい。第1態様の構造体では、平面視にて互いに異なる方向（例えば平面視にて互いに交差する又は直交する“一方の方向”と“他方の方向”）に沿って延在するリブ（特に複数のリブ）に関する形状および／または配置などは互いに異なっていてよい。例示すると、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）に沿って延在する複数リブのリブ間隔（例えばピッチ）が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）のリブ間隔（例えばピッチ）と異なっていたり、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）のリブ交点の間隔（すなわち、交差するリブ同士の交点箇所の間隔）が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）におけるリブ交点の間隔（すなわち、交差するリブ同士の交点箇所の間隔）と異なっていたり、ならびに／または、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）におけるリブ交点角度（すなわち、交差するリブ同士によって形成される角度）が、当該互いに異なる方向の“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）におけるリブ交点角度（すなわち、交差するリブ同士によって形成される角度）と異なっていたりしてよい。このような構造体では、互いに異なる方向の“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）における複数のリブ同士は、互いに同じ形状・形態など（例えば、互いに同じ幅寸法、ピッチおよび／または高さ）を有していてよく、同様に、互いに異なる方向の“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）における複数のリブ同士は、互いに同じ形状・形態など（例えば、互いに同じ幅寸法、ピッチおよび／または高さ）を有していてよい。第1態様の構造体において、リブ同士の幅寸法は

非一定であってよい。特に制限されないが、ある所定のリブまたは所定の複数のリブ（例示すると平面視にて縦方向および横方向のいずれか“一方の方向”に延在する複数リブ又は互いに交差する方向における“一方の方向”の複数リブ）が、他のリブまたは他の複数のリブ（同様に例示する平面視にて縦方向および横方向の“他方の方向”に延在する複数リブ又は互いに交差する方向における“他方の方向”の複数リブ）よりも幅寸法が相対的に小さく若しくは大きくてもよい（例えば、一方の方向の複数リブにおける各リブ幅寸法が、他方の方向の複数リブにおける各リブの幅寸法の1.2倍以上20倍以下であってよく、例えば1.5倍以上10倍以下、1.5倍以上8倍以下、1.5倍以上6倍以下、2倍以上5.5倍以下、3倍以上5倍以下、3.5倍以上4.5倍以下、3.8倍以上4.2倍以下などであってよい）。

第1態様の構造体では、リブ同士の高さ寸法が非一定であってよい。同様に特に制限されないが、ある所定のリブまたは所定の複数のリブ（例示すると平面視にて縦方向および横方向のいずれか“一方の方向”に延在する複数リブ又は互いに交差する方向の“一方の方向”における複数リブ）が、他のリブまたは他の複数のリブ（同様に例示する平面視にて縦方向および横方向の“他方の方向”に延在する複数リブ又は互いに交差する方向の“他方の方向”における複数リブ）よりも高さ寸法が相対的に小さく若しくは大きくてもよい。換言すれば、互いに異なる方向の“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）における複数リブに関するリブ幅および／またはリブ高さが、当該互いに異なる方向の“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）における複数リブに関するリブ幅および／またはリブ高さとは異なっていてよい。第1態様の構造体において、リブの高さ寸法は、板状部材の厚み寸法と同じであってよく、あるいは、板状部材の厚み寸法よりも大きくてもよい。すなわち、リブの高さ寸法は板状部材の厚み寸法（プレート厚み）以上であってよい。例えば、リブの高さ寸法が板状部材の厚み寸法の1倍以上50倍以下、1倍以上40倍以下、1倍以上30倍以下、1倍以上20倍以下、1倍以上15倍以下、

または1倍以上1.3倍以下であってよく、あるいは、例えば例えば4倍以上1.3倍以下などであってもよい。第1態様の構造体（特にその板状部材および／またはリブ）は、変形可能な材料・材質から構成されていてよい（例えば、構造体に加えられる引張り応力など外力を増していくと変形できるような材料・材質から構成されていてよく、例えば常温・大気圧条件下でそのような外力を増していくと最終的に又は任意の時点から変形できるような材料・材質から構成されていてよい）。ある好適な第1態様に係る構造体は、好ましくはリブに相当するような部位も含め、そのような変形可能な材料・材質から構成されている。第1態様の構造体（特にその板状部材および／またはリブ）は、ポリマーなどの樹脂材を含んで成っていてよい。ある好適な第1態様では、構造体（特にその板状部材および／またはリブ）が、ポリマーなどの樹脂材を含んで成っていてよく、それゆえ、弾性特性および／もしくは粘弾特性、ならびに剛性などを有する構造体となっていてよい。第1態様の構造体において、細胞培養面は必ずしも平坦面である必要はなく、細胞培養面が凸状部および／または凹状部を有していてもよい（つまり、細胞培養面が局所的に隆起した形態を有していてもよい）。かかる場合、細胞培養面の凸状部とリブとが板状部材の厚み方向にて互いに整合する形態となっていてよい（よって、かかる場合、構造体またはその板状部材が全体として凹凸形態を有していてもよく、好ましくは断面視または平面視で規則的な凹凸形態を有していてもよい）。第1態様の構造体の材質は、いわゆる生体適合性材料および／または生体分解性材料からなる材質となっていてよい。なお、第1態様において、構造体は、細胞培養液と少なくとも組み合わされ、細胞培養手段・細胞培養品・細胞デバイス（端的に言えば、例えば細胞培養装置）などとして供されてよい。また、そのような第1態様の構造体を有して成る細胞培養装置では、好ましくは、配向性を有する細胞シートを得ることができる。

[0040] 第2態様：細胞培養面において細胞シートを形成するための構造体であって、前記細胞培養面を有する板状部材を有して成り（例えば、構造体が好ま

しくはプレートまたはプレート構造体となっており）、該板状部材が互いに異なる剛性特性、弾性特性および／または粘弾性特性を有する剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分を有している、構造体。例えば、構造体は、その板状部材における主要材またはボディ材（例えば板状部材にて相対的に大きな体積を占めている材質・材料）と異なる材質・材料を当該板状部材が有していてよい。例えば、板状部材のボディ材・主要材とは剛性特性、弾性特性および／または粘弾性特性などの点で異なる材質・材料が当該板状部材のボディに組み込まれた又は埋め込まれた形態（好ましくは局所的もしくは部分的に組み込まれた又は埋め込まれた形態）を構造体が有していてよい。第2態様では、そのように局所的もしくは部分的に構造体に組み込まれた又は埋め込まれた部分や部位を、説明の便宜上、単に「組込み・埋込み部分」とも称す。ある1つの好適な態様では、互いに異なる剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分を少なくとも含むように板状部材の細胞培養面が構成されていてよい。そのような剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分は、構造体において1またはそれによりも多い複数の部分・領域として設けられてよい。例えば、構造体または板状部材の厚み方向と直交する方向に延在するように組込み・埋込み部分が設けられていてよく、その場合、当該厚み方向と直交する方向に組込み・埋込み部分が長く延在していてよく、例えば長尺状に延在していてよい。第2態様に係る構造体は、好ましくは、貫通孔または開口部を有さない非貫通・非開口構造またはメッシュ構造を有さない非メッシュ構造体である。別の表現でいえば、第2態様に係る構造体は中実の構造体であってよく、好ましくは板状部材の実質的に全てが中実となった構造体である。第2態様に係る構造体の細胞培養面では、複数の細胞の集合体が形成され、そのような細胞集合体は、好ましくは細胞培養面にくっ付いて、接着してまたは付着してシート状に形成される細胞集合体（即ち、細胞の集合体から構成されるシート、好ましくは複数の細胞が自発的に集合して構成されるシート、より好ましくは複数の細胞が互いに接合または接続した箇所を少なくとも有する集合体からなるシート）であって、より好ま

しくは細胞培養面に接着した細胞から構成される細胞シート（例えば、細胞培養面の面内方向における所定方向に沿って、好ましくはある一方向に沿ってより多く細胞が集合した細胞列から成るような配向性を有する又は配向性が高い若しくは向上した細胞集合体から構成される細胞シート）である。

第2態様において、構造体は、細胞シート形成を誘導するための構造体であってよい。第2態様の構造体では、細胞培養面が平坦面であってよい。かかる細胞培養面は、例えば、連続的な面、平面または平滑面などを成してよい。また、そのような構造体の細胞培養面は、細胞がくっつく、接着するまたは付着する細胞接着面であってよい。第2態様の構造体の平面視において、互いに異なる剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分（例えば、互いに異なる材質・材料部分）は幾何学的パターンを有してよい。換言すれば、互いに異なる剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分が板状部材にて全体的に規則的な配置形態を有してよい。つまり、第2態様の構造体の板状部材では、相対的に高いまたは低い剛性特性を有する剛性部分が幾何学的パターンを有していたり、相対的に高いまたは低い弾性特性を有する弾性部分が幾何学的パターンを有していたり、あるいは、相対的に高いまたは低い粘弾性特性を有する粘弾性部分が幾何学的パターンを有してよい。例示すると、第2態様の構造体の平面視または平面透視図において、互いに異なる剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分（例えば、互いに異なる材質・材料部分の少なくとも一方）が正方形、長方形、菱形、またはハニカム（例えば六角形もしくは長六角形）のパターン・配置形態を成すように設けられていてよい。第2態様の構造体の複数の組込み・埋込み部分については、ピッチ、幅寸法および／または厚み寸法などが全て一定となっていてよく、非一定であってよい（例えば全体として全てが同じではなく、その点で不均一と捉えることもできるようなピッチ・パターン、互いに異種の幅寸法パターンおよび／または厚み寸法パターンなどを複数の組込み・埋込み部分が有してよい）。第2態様の構造体では、平面視にて互いに異なる方向（例えば平面視にて互いに交差する又は直交する“一方の方

向”と“他方の方向”）に延在する組込み・埋込み部分（特に複数の組込み・埋込み部分）の形状、材質・材料および／または配置などは互いに異なっていてよい。例示すると、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）に沿って延在する複数の組込み・埋込み部分の間隔（例えばピッチ）が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）に沿って延在する複数の組込み・埋込み部分の間隔（例えばピッチ）と異なっていたり、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）における組込み・埋込み部分交点の間隔（すなわち、互いに交差する組込み・埋込み部分同士の交点箇所の間隔）が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）における組込み・埋込み部分交点の間隔（すなわち、互いに交差する組込み・埋込み部分同士の交点箇所の間隔）と異なっていたり、ならびに／または、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）に沿って設けられる組込み・埋込み部分の交点角度（すなわち、互いに交差する組込み・埋込み部分同士によって形成される角度）が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）の組込み・埋込み部分の交点角度（すなわち、互いに交差する組込み・埋込み部分同士によって形成される角度）と異なっていたりしてよい。あるいは、互いに異なる方向における“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）に沿って延在する複数の組込み・埋込み部分の材質・材料が、当該互いに異なる方向における“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）に沿って延在する複数の組込み・埋込み部分の材質・材料と異なってもよい。このような構造体では、互いに異なる方向の“一方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”）における複数の組込み・埋込み部分同士は、互いに同じ形状・形態および／または材質・材料を

有していてもよく、同様に、当該互いに異なる方向の“他方の方向”（例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”）における複数の組込み・埋込み部分同士は、互いに同じ形状・形態および／または材質・材料を有していてもよい。第2態様の構造体において、互いに異なる剛性部分、弾性部分および／または粘弾性部分同士（例えば、互いに異なる材質・材料部分同士）の幅寸法は非一定となっていてよい。特に制限されないが、ある所定の組込み・埋込み部分または所定の複数の組込み・埋込み部分（例示すると、平面視にて縦方向および横方向のいずれか“一方の方向”に延在する複数の組込み・埋込み部分又は互いに交差する方向における“一方の方向”に延在する複数の組込み・埋込み部分）は、他の所定の組込み・埋込み部分または所定の複数の組込み・埋込み部分（同様に例示すると平面視にて縦方向および横方向の“他方の方向”に延在する複数の組込み・埋込み部分又は互いに交差する方向における“他方の方向”に延在する複数の組込み・埋込み部分）より幅寸法が相対的に小さく若しくは大きくてもよい。第2態様の構造体（特にその板状部材）は、変形可能な材料・材質から構成されていてよい（例えば、構造体に加えられる引張り応力など外力を増していくと変形できるような材料・材質から構成されていてよく、例えば常温・大気圧条件下でそのような外力を増していくと最終的にまたは任意の時点から変形できるような材料・材質から構成されていてよい）。ある好適な第2態様に係る構造体は、好ましくは組込み・埋込み部分に相当するような部位も含め、そのような変形可能な材料・材質から構成されている。第2態様の構造体では、構造体がポリマーなどの樹脂材を含んで成っていてよい。また、構造体の材質は、いわゆる生体適合性材料および／または生体分解性材料からなる材質となっていてよい。例えば、互いに異なる剛性特性を有する樹脂部から板状部材が構成されたり、互いに異なる弾性特性を有する樹脂部から板状部材が構成されていたり、あるいは、互いに異なる粘弾性特性を有する樹脂部から板状部材が構成されていたりしてよい（そのような互いに異なる剛性特性、弾性特性または粘弾性特性の部分は、互いに一体化して構造体・板状部材を成し

ていてよい)。ある1つの例示にすぎないが、相対的に硬い部分と相対的に柔らかい部分とから板状部材が構成されており、その板状部材の平面視において、相対的に硬い部分が全体的に規則的な配置形態を有していたり、あるいは、相対的に柔らかい部分が全体的に規則的な配置形態を有していたりしてよい。かかる場合、板状部材において、相対的に硬い部分と相対的に柔らかい部分とは互いに隣接又は接してよく、例えば、板状部材の断面視（板状部材の厚み方向に板状部材を切断して得られる断面視）にて、相対的に硬い部分および相対的に柔らかい部分とは、一方が他方の間に位置するように配置されていてよい。なお、かかる相対的に硬い部分と相対的に柔らかい部分は、上記の関係を有してよく、すなわち、平面視において、互いに異なる方向（例えば互いに直交する“一方の方向”と“他方の方向”との間）において互いに異なる関係を有してよい。第2態様では、構造体は、細胞培養液と少なくとも組み合わせられ、細胞培養手段・細胞培養品・細胞デバイス（端的にいえば、例えば細胞培養装置）などとして供されてよい。また、そのような第2態様の構造体を有して成る細胞培養装置では、好ましくは、配向性を有する細胞シートを得ることができる。

[0041] 第3態様：細胞培養面において細胞シート（例えば、細胞培養面にくっ付いた、接着したまたは付着した細胞シート、より好ましくは細胞培養面に配向した細胞シート）を形成するための構造体であって、所定方向（例えば、ある1つの方向もしくは単一方向のみ）に引張り応力が加えられる又は加えられた構造体。第3態様において、構造体は細胞シート形成を誘導するための構造体であってよい。第3態様の構造体では、細胞培養面が平坦面であってよい。かかる細胞培養面は、例えば、連続的な面、平面または平滑面などを成してよい。そのような構造体の細胞培養面は、細胞がくっ付く、接着するまたは付着する細胞接着面であってよい。第3態様の構造体は、細胞培養面を有する板状部材から構成されていたり（構造体が例えばプレートまたはプレート構造体となっていたり）、あるいは、膜状部材から構成されていてよい（例えば、構造体が好ましくはフィルムまたはフィルム構造体とな

っていてよい)。第3態様の構造体(特にプレート構造体またはフィルム構造体)は、変形可能な材料・材質から構成されていてよい(例えば、構造体に加えられる引張り応力などの外力に起因して変形できるような材料・材質から構成されていてよい)。特に、第3態様の構造体(例えば、その板状部材または膜状部材)は、細胞培養時の加えることが可能な外力によって変形可能となっていてよい。例えば、細胞培養に際して加えることができる引張り力などに起因して構造体が細胞培養時に変形可能となっていてよい(例えば、目視で確認できるレベルで変形可能となっていてよい)。第3態様の構造体(例えば、その板状部材または膜状部材)は、弾性材(例えば、ポリマー、エラストマーおよび/またはシリコーンゴムなどの弾性材)を含んで成っていてよい。また、第3態様の構造体では、第1態様および第2態様と同様、平面視で互いに異なる方向において(例えば平面視にて互いに直交する“一方の方向”と“他方の方向”との間で)互いに異なる関係を有してよい。例示すると、平面視にて互いに異なる方向における“一方の方向”(例えば互いに交差する又は直交する方向の“一方の方向”)で引張り応力が加えられる又は加えられた構造体でありつつも、当該互いに異なる方向における“他方の方向”(例えば互いに交差する又は直交する方向の“他方の方向”)では、そのような引張り応力が加えられない又は加えられていない構造体となっていてよい。あるいは、そのような“他方の方向”では“一方の方向”とは異なる引張り応力が加えられる又は加えられた構造体であってもよい。第3態様に係る構造体は、好ましくは、貫通孔または開口部を有さない非貫通・非開口構造またはメッシュ構造を有さない非メッシュ構造体である。別の表現でいえば、第3態様に係る構造体は中実の構造体であってよく、好ましくはプレート構造体またはフィルム構造体の実質的に全てが中実となった構造体である。第3態様に係る構造体の細胞培養面では、複数の細胞の集合体が形成され、そのような細胞集合体は、好ましくは細胞培養面にくっ付いて、接着してまたは付着してシート状に形成される細胞集合体(即ち、細胞の集合体から構成されるシート、好ましくは複数の細胞が自発的に集

合して構成されるシート、より好ましくは複数の細胞同士が互いに接合または接続した箇所を少なくとも有する集合体から構成されるシート）であってよく、より好ましくは細胞培養面に接着した細胞から構成される細胞シート（例えば、細胞培養面の面内方向における所定方向に沿って、好ましくはある一方向に沿ってより多く細胞が集合した細胞列から成るような配向性を有する又は配向性が高い若しくは向上した細胞集合体から構成される細胞シート）である。第3態様の構造体の材質も、第1態様および第2態様と同様、いわゆる生体適合性材料および／または生体分解性材料からなる材質となってもよい。同様に第3態様においても、構造体は、細胞培養液と少なくとも組み合わせられ、細胞培養手段・細胞培養品・細胞デバイス（端的に言えば、例えば細胞培養装置）などとして供されてよい。また、そのような第3態様の構造体を有して成る細胞培養装置では、好ましくは、配向性を有する細胞シートを得ることができる。

[0042] 上記第1態様～第3態様の構造体では、細胞が一軸方向に配向している細胞シートの製造方法および装置の要望などに応えることができ、好ましくは簡易にかつ低コストで細胞が一軸方向に配向している細胞シートの製造方法および装置の要望に応えることができる。

実施例

[0043] リブ型部位を有する構造体の作製

リブ型部位は樹脂から構成した。リブ型部位の作製はフォトリソグラフィ法により行った。具体的には、光硬化性樹脂であるSU-8-2（Microchem株式会社）を約5mlウェハ上に添加し、スピンドーターに設置して回転させ、平坦な第1層を作製した。その後、マイクロアライナーと呼ばれる露光装置にてウェハ全面に紫外線（波長405nm程度）を照射することにより構造体となる厚み2 μ mの層を作製した。次に、上記で作製した前記構造体の上にさらに5mlのSU-8-2またはSU-8-3010（Microchem株式会社）またはSU-8-3025（Microchem株式会社）を添加し、同じようにスピンドーターで回転させて第2層を作製した後、リブ型部位のパターンの刻まれたマスクを介して紫外線を照射した。

エッチングを行うことにより、マスクによってさえぎられていた部分でSU-8が解けて第1層が露出し、逆に紫外線が当たった部分ではSU-8が硬化し、前記リブ型部位を作製した。

フォトリソグラフィ法では、様々なリブ型部位の幅、配置する角度、形状等のパラメータを自由に設計し易い。また、スピンコーターの回転速度で層の厚みが決まるため、回転速度を調節して所望の構造体およびリブの厚みにすることが可能である。なお、リブの高さを $2\mu\text{m}$ とする場合にはSU-8-2を用い、リブの高さを $10\mu\text{m}$ とする場合SU-8-3010を用い、リブの高さを $25\mu\text{m}$ とする場合SU-8-3025を用いた。

[0044] 実験条件

実証試験1～4および実証試験6～7の細胞シートの誘導実験はすべて以下の条件で行った。

- ・培養細胞：マウス筋芽細胞（C2C12）（製品名：製造販売会社名：理研セルバンク）
- ・培養期間：インキュベーター（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ ）3～7日間
- ・構造体および部位のコーティング剤：フィブロネクチン（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）
- ・培地： $10\%\text{FBS}$ （製品名、製造販売会社名：FSB, Gibco, Thermo Fisher Scientific）および 1% 抗生物質（製品名、製造販売会社名：抗生物質-抗真菌剤溶液（Penicillin streptomycin amphotericin B, Sigma Aldrich）を添加したDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）培地（製品名、製造販売会社名：DMEM high glucose GlutaMAX, GIBCO (Thermo Fisher Scientific)）

[0045] [実証試験1]

構造体のリブ型部位形状による細胞シート配向性の制御

以下のリブ型部位を有する構造体の連続的な細胞培養面（面積 12mm^2 ）にマウス筋芽細胞（C2C12）を $50\text{万個}/\text{ml}$ の濃度で $100\mu\text{l}$ を播種し、静置条件下、 37°C にて7日培養した後に位相差顕微鏡（製品：Olympus IX83、製造販売会社名：オリンパス株式会社）を用いて細胞の配向性を解析した。

- [0046] ・菱形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性

を有する構造体)

構造体の厚み (t_1) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ (t_2) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w) : $30\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$

リブ角度 : 50°

・ 正方形リブ型部位を有する構造体 (等二軸性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体)

構造体の厚み (t_1) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ (t_2) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w) : $30\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$

リブ角度 : 90°

[0047] それぞれのリブ型部位を有する構造体の培養後の顕微鏡画像および細胞の配向角度の分布を図4および図5に示す。

[0048] 図4の菱形リブ型部位を有する構造体では異方性の面内弾性および／または面内粘弾性が生じており、図中の上下方向の弾性および／または粘弾性よりも左右方向の弾性および／または粘弾性が大きい。

リブ型部位が形成された面とは反対側の連続的な細胞培養面に誘導された細胞シートには、図中の左右方向の配向性が認められた。

一方、図5の正方形リブ型部位を有する構造体では異方性を生じない等二軸性の面内弾性および／または面内粘弾性特性を有しており、力学的異方性を有さない構造体であるので配向性が認められなかった。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有することにより異方的な力学特性を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されたものの、異方的な力学特性を有しない構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されなかった。

以上より、細胞が構造体の培養面に生じる異方性の面内弾性および／また

は面内粘弾性特性を感知して配向した細胞シート形成が誘導されることが示された。

[0049] [実証試験 2]

リブ型部位の幅による細胞シート配向性の制御

菱形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体）

構造体の厚み（ t_1 ）： $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ（ t_2 ）： $2\mu\text{m}$

リブ型部位の幅（ w ）：15、 $30\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ（ p ）： $100\mu\text{m}$

リブ角度： 50°

[0050] それぞれのリブ型部位を有する構造体の培養後の顕微鏡画像を図 6 に示す。

図 6 のリブ型部位の幅のみを変化させたいずれの構造体においても、誘導された細胞シートには図中の左右方向の配向性が認められた。

すなわち、異方的な力学特性を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導された。

以上より、細胞が構造体における裏面のリブ型部位の占有面積および／または幅の大小ではなく、構造体の培養面に生じる異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を感知して配向した細胞シート形成が誘導されることが示された。

[0051] [実証試験 3]

リブ型部位のピッチによる細胞シート配向性の制御

菱形リブ型部位を有する構造体（異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体）

構造体の厚み（ t_1 ）： $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ（ t_2 ）： $2\mu\text{m}$

リブ型部位の幅（ w ）： $45\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$

リブ角度 : 50°

[0052] それぞれのリブ型部位を有する構造体の培養後の顕微鏡画像を図7に示す。

図7のリブ型部位のピッチのみを変化させたいずれの構造体においても、誘導された細胞シートには図中の左右方向の配向性が認められた。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導された。

以上より、細胞が構造体における裏面のリブ型部位のピッチの大小ではなく、構造体の培養に生じる異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を感知して配向した細胞シート形成が誘導されることが示された。

[0053] [実証試験4]

リブ型部位の幅による細胞シート配向性の制御

正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性または異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体）

構造体の厚み (t1) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ (t2) : $25\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w1) : $5\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w2) : 5 、 $20\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$

リブ角度 : 90°

[0054] $5\mu\text{m}$ の幅 (w1) と $5\mu\text{m}$ の幅 (w2) のリブ型部位を有する構造体、および、 $5\mu\text{m}$ の幅 (w1) と $20\mu\text{m}$ の幅 (w2) のリブ型部位を有する構造体（それぞれ、等二軸性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体、および異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体）を用いた培養後の顕微鏡画像および細胞の配向角度の分布を図8および図9に示す。

リブ型部位の幅 (w2) のみを変化させた構造体において、図8の2種類の幅が同じである構造体 ($w1 = w2 = 5\mu\text{m}$) において誘導された細胞シー

トには配向性が認められなかった一方、図9の2種類の幅が異なる構造体（ $w_1 = 5\mu\text{m}$ 、 $w_2 = 20\mu\text{m}$ ）において誘導された細胞シートには図中の左右方向の配向性が認められた。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されたものの、異方的な力学特性を生じさせる部位を有しない構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されなかった。

以上より、細胞が構造体における裏面のリブ型部位の占有面積および／または幅の大小ではなく、構造体の培養面に生じる異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を感知して配向した細胞シート形成が誘導されることが示された。

[0055] [実証試験5]

実験条件

実証試験5および以下の実証試験8の配向した細胞シートの誘導実験はすべて以下の条件で行った。

- ・培養細胞：マウス筋芽細胞（C2C12）（製品名：製造販売会社名：理研セルバンク）
- ・培養期間：インキュベーター（37℃、5%CO₂）7日間
- ・構造体および部位のコーティング剤：フィブロネクチン（10μg/ml）
- ・培地：15%FBS（製品名、製造販売会社名：FSB, Gibco, Thermo Fisher Scientific）および1%抗生物質（製品名、製造販売会社名：抗生物質-抗真菌剤溶液（Penicillin streptomycin amphotericin B, Sigma Aldrich）を添加したDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）培地（製品名、製造販売会社名：DMEM high glucose GlutaMAX, GIBCO (Thermo Fisher Scientific)）

[0056] リブ型部位の高さおよび幅による細胞シート配向性の制御

- ・正方形リブ型部位を有する構造体（等二軸性または異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体）

構造体の厚み（ t_1 ）：2μm

リブ型部位の高さ (t_2) : $10, 25 \mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w_1) : $5 \mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w_2) : $5, 20 \mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100 \mu\text{m}$

リブ角度 : 90°

[0057] $10 \mu\text{m}$ 高さ (t_2)、 $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_1) および $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_2) のリブ型部位を有する構造体、 $25 \mu\text{m}$ 高さ (t_2)、 $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_1) および $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_2) のリブ型部位を有する構造体、 $10 \mu\text{m}$ 高さ (t_2)、 $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_1) および $20 \mu\text{m}$ の幅 (w_2) のリブ型部位を有する構造体、ならびに、 $25 \mu\text{m}$ 高さ (t_2)、 $5 \mu\text{m}$ の幅 (w_1) および $20 \mu\text{m}$ の幅 (w_2) のリブ型部位を有する構造体をそれぞれ用いた培養後の細胞の配向強度を図 10 に示す。

図 10 の $w_2 = 5 \mu\text{m}$ (左側) は、異方的な力学特性を有さない構造体の結果に相当し、図 10 の $w_2 = 20 \mu\text{m}$ (右側) は、異方的な力学特性を有する構造体の結果に相当する。構造体の平面視にて互いに交差するように延在する複数のリブ型部位について一方の方向に延在するリブ型部位と他方の方向に延在するリブ型部位との間でリブ幅寸法が互いに異なる構造体では細胞シートの配向性が認められた。具体的には、互いに交差するリブ同士の幅寸法が互いに異なる構造体 ($w_1 = 5 \mu\text{m}$ 、 $w_2 = 20 \mu\text{m}$) で形成された細胞シートでは所定方向 (図 9 (A) に示されるのと同様の顕微鏡画像における左右方向) の配向性が認められた。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されたものの、異方的な力学特性を生じさせる部位を有さない構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導されなかった。

以上より、リブ型部位の全体的な配置形態および／またはリブ型部位の幅の種類によって構造体の培養面に生じる異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を感知し易くなり配向した細胞シート形成が誘導され易いことが示され

た。

[0058] [実証試験 6]

配向性獲得の経時的観察 (1)

菱形リブ型部位を有する構造体 (異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体)

構造体の厚み (t_1) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ (t_2) : $10\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w) : $15\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$

リブ角度 : 50°

[0059] マウス筋芽細胞 (C2C12) を菱形リブ型部位を有する構造体の連続的な細胞培養面に加えて培養した際の経時的な細胞配向性の変化を示した顕微鏡画像を図 11 に示す。培養 3 日目となる細胞 (A) では配向が一時的に乱れているものの、次第に配向の乱れが減じられ、培養 5 日目の細胞 (B) では図中の左右方向に細胞が配向した細胞シート形成が誘導されることが示された。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有する構造体は、その細胞培養面において所望の細胞シート形成が誘導された。

[0060] [実証試験 7]

配向性獲得の経時的観察 (2)

複数種 (ここでは 2 種類) の幅寸法を有する正方形リブ型部位を有する構造体 (異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を有する構造体)

構造体の厚み (t_1) : $2\mu\text{m}$

リブ型部位の高さ (t_2) : $10\mu\text{m}$

リブ型部位の幅 (w) : 上下方向のリブの幅 $20\mu\text{m}$ 、左右方向のリブの幅 $5\mu\text{m}$

リブ型部位のピッチ (p) : $100\mu\text{m}$

リブ角度 : 90°

[0061] マウス筋芽細胞 (C2C12) を正方形リブ型部位を有する構造体の連続的な細

胞培養面に加えて培養した際の経時的な細胞配向性の変化を示した顕微鏡画像を図12-1および図12-2に示す。培養後10時間の細胞(A)は配向が一時的には乱れているものの、培養後86時間の細胞(F)に向けて一方向(上下方向)に配向した細胞シート形成が経時的に誘導されることが示された。

すなわち、異方的な力学特性を生じさせる部位を有する構造体の細胞培養面においては所望の細胞シート形成が誘導された。

[0062] [実証試験8]

細胞内張力の抑制効果

実証試験5の構造体を用いた培養において、ミオシンの阻害剤として知られているブレビスタチン(10 μ M)を用いて培養細胞自らが有する収縮能および／または収縮力の発生を抑制した場合の配向した細胞シート形成の誘導について調べた。その結果を図13に示す。

細胞は異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性に応じて、構造体の所定方向(例えば剛性および／または弾性が最も高い軸方向)に配向することが示された。また、細胞自らが有する収縮能または収縮力を抑制した場合には、異方性の面内弾性を有する構造体を用いて培養した場合でも配向が乱れ易いことが示された。

この結果から、自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞は、構造体の培養面に生じる異方性の面内弾性特性・面内粘弾性特性を感知し易く、配向した細胞シート形成が誘導され易いことが分かった。

[0063] 上記した一連の実験から、細胞が構造体の培養面に生じる異方的な力学特性(例えば、構造体の剛性、弾性および／または粘弾性などの力学特性の異方性)を感知して、当該異方的な力学特性に応じて細胞シートの形成が誘導されることが実証された。

[0064] [関連出願の相互参照]

本願は2020年12月1日に出願された日本国特許出願2020-199782号明細書を基礎とする優先権を主張し、その全内容は参照により本

明細書に組み込まれる。

[0065] 本願明細書に記載された効果はあくまでも例示であって、これらの効果に必ずしも限定されるものでなく、また、付加的な効果があってもよい。

[0066] 以上、本発明のある一実施形態について説明してきたが、あくまでも典型例を例示したに過ぎない。したがって、本発明はこれら記載したものに限定されず、種々の態様・変更態様などが考えられることを当業者は容易に理解できるであろう。

[0067] 例えば、構造体は、製造に際して異方的な力学特性を持たせてよい。例えば、構造体の材料の溶融物を押出しおよび／または延伸などすることによって、構造体の製造時に剛性特性、弾性特性および／または粘弾性特性などに関して異方性（異方的な力学特性）を構造体に付与してよい。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明は、再生医療に向けた配向性細胞シート、細胞組織（例えば、皮膚、心筋、骨格筋、腱、靱帯、神経、血管、弁等の組織）の構築と再生医療に利用できる可能性がある。また、細胞が組織を構築する過程における細胞移動の制御に利用できる可能性がある。さらに、薬剤スクリーニングのためのイン・ビトロモデルの作製（例えば、配向した心筋細胞の収縮力測定）や機械的刺激による細胞分化の調節などに利用できる可能性がある。

符号の説明

[0069] 1：構造体、2：連続的な細胞培養面、3：裏面、4：リブ、5、6：弾性が異なる変形部位、 p ：リブ型部位のピッチ、 w_1 ：一方のリブ型部位の幅、 w_2 ：もう一方のリブ型部位の幅、 t_1 ：構造体の厚み、 t_2 ：リブ型部位の高さ

請求の範囲

- [請求項1] 連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための構造体であって、異方的な力学特性を有する変形可能な構造体。
- [請求項2] 前記構造体は、その内部または外部に、該構造体の前記異方的な力学特性を生じさせる変形可能な部位を有する、請求項1に記載の構造体。
- [請求項3] 前記部位として、構造体の内部または外部に、前記構造体の一軸方向に前記異方的な力学特性を生じさせる形状の部位が設けられている、請求項2に記載の構造体。
- [請求項4] 前記部位として、前記構造体の内部または外部に、前記構造体の一軸方向に前記異方的な力学特性を生じさせる幅の異なる部位が設けられている、請求項2に記載の構造体。
- [請求項5] 前記部位として、剛性の異なる部位が構造体の内部または外部に不均一に配置される、請求項2に記載の構造体。
- [請求項6] 前記構造体が、生体適合性材料および生体分解性材料からなる群から選択される少なくとも1種の素材から構成される、請求項1～5のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項7] 前記部位がポリマーまたは金属からなる、請求項2～5のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項8] 前記細胞シート形成が自ら収縮能を有するまたは収縮力を発する細胞が集合して形成されたシートの形成である、請求項1～7のいずれか1項に記載の構造体。
- [請求項9] 前記配向した細胞シート形成が、前記構造体において剛性がより高い軸方向に誘導される、請求項1に記載の構造体。
- [請求項10] 前記変形可能な構造体をあらかじめ一軸方向に引っ張っておくことにより、該構造体の前記異方的な力学特性を有する、請求項1に記載の構造体。
- [請求項11] 請求項1～10のいずれか1項に記載の構造体と、培養液とを含む

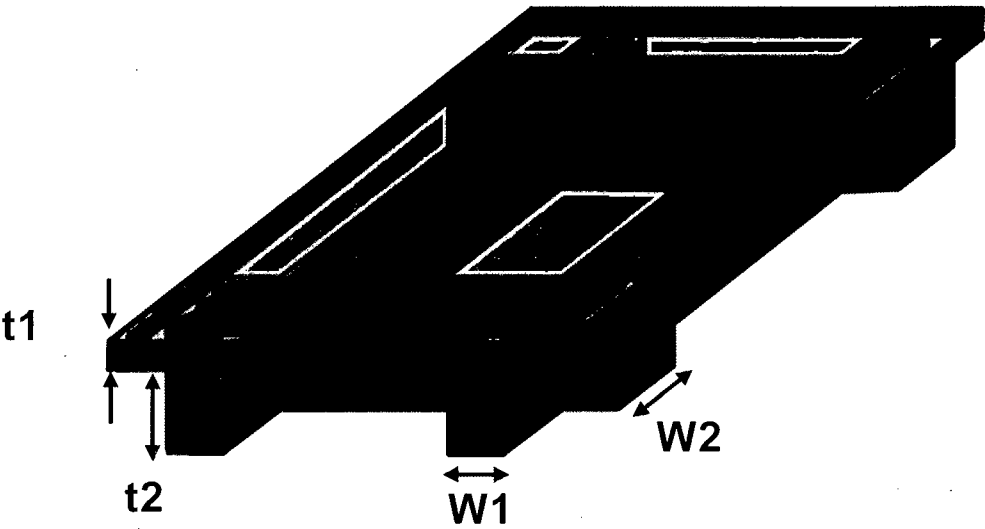
、前記連続的な細胞培養面において配向した細胞シート形成を誘導するための細胞培養装置。

[請求項12] 請求項11に記載の細胞培養装置を用いて誘導された配向した細胞シート。

[請求項13] 請求項1～10のいずれか1項に記載の構造体を培養液に浸漬し、前記構造体の前記連続的な細胞培養面に細胞を播種し、培養することを含む、配向した細胞シート形成を誘導する方法。

[請求項14] 静置培養で行う、請求項13に記載の配向した細胞シート形成を誘導する方法。

図 1
(A)



(B)

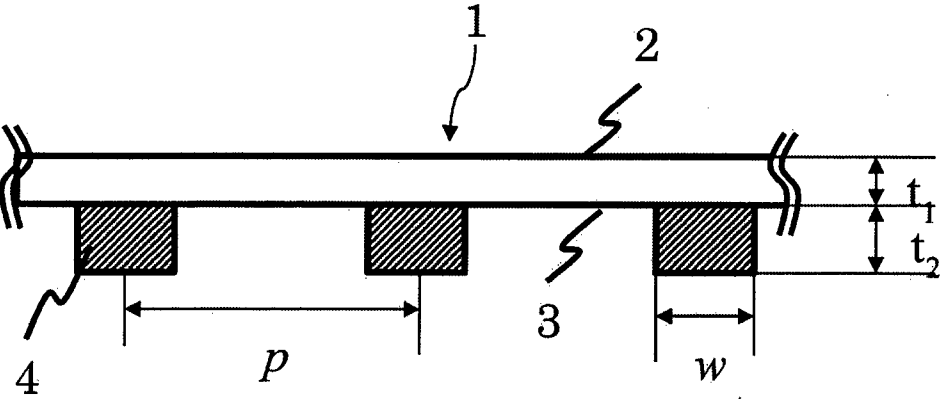
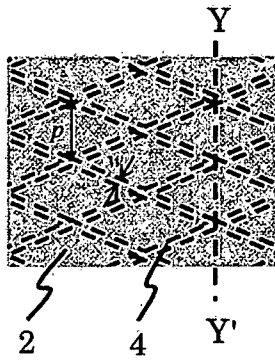


図 2

(A)



(B)

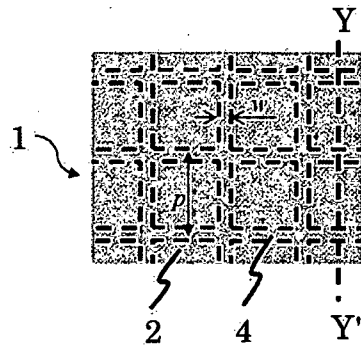


図 3

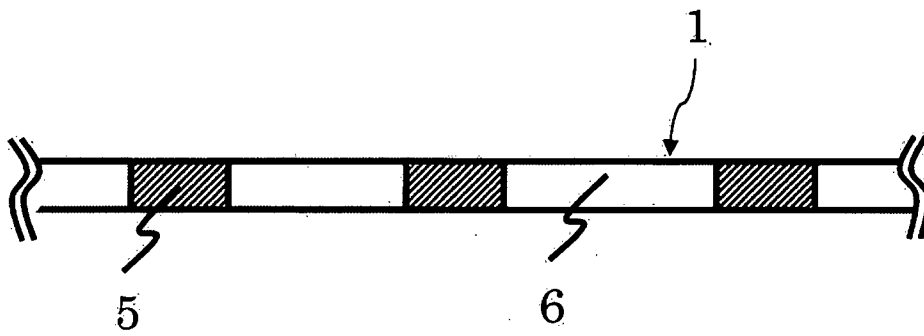
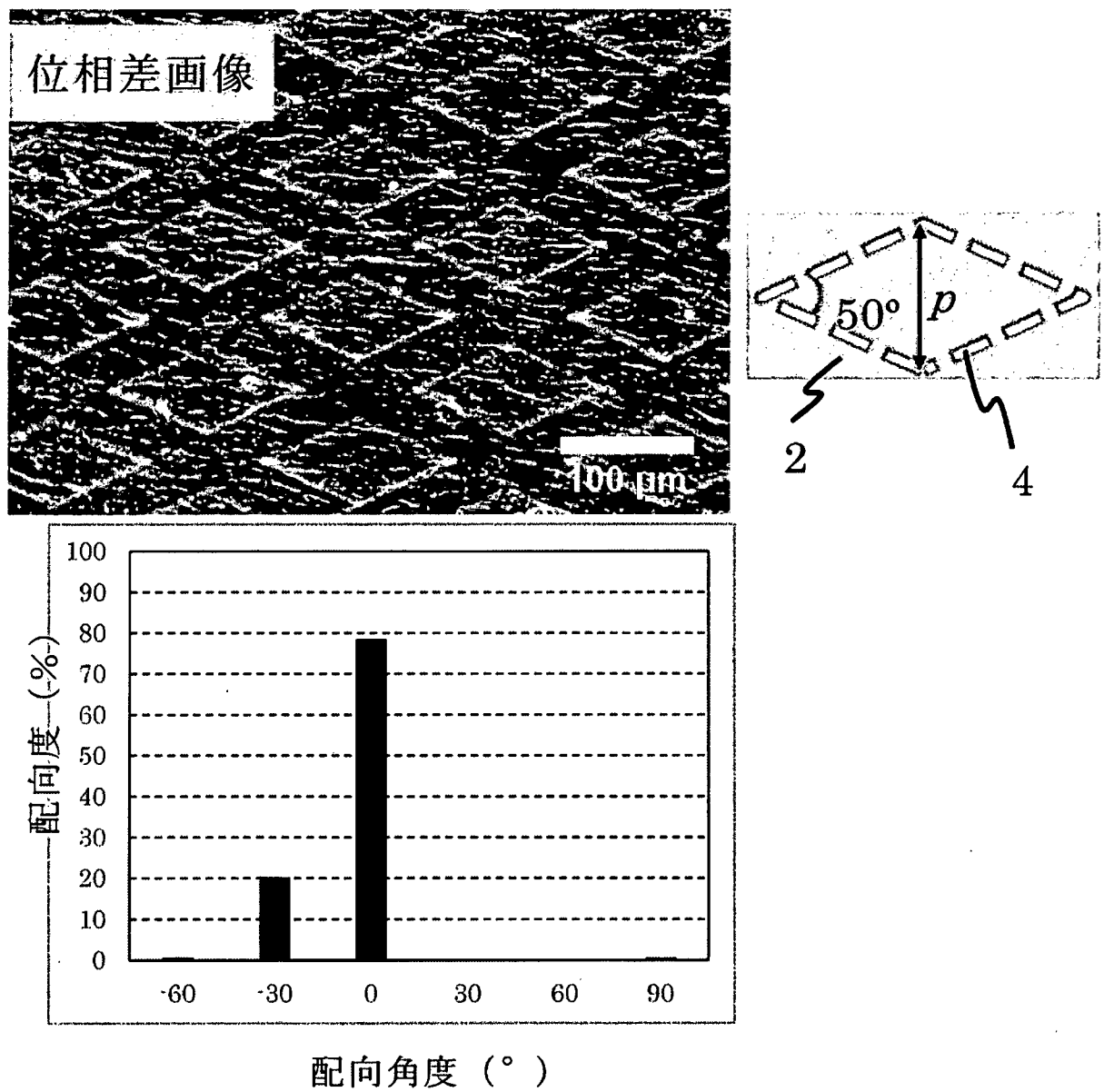
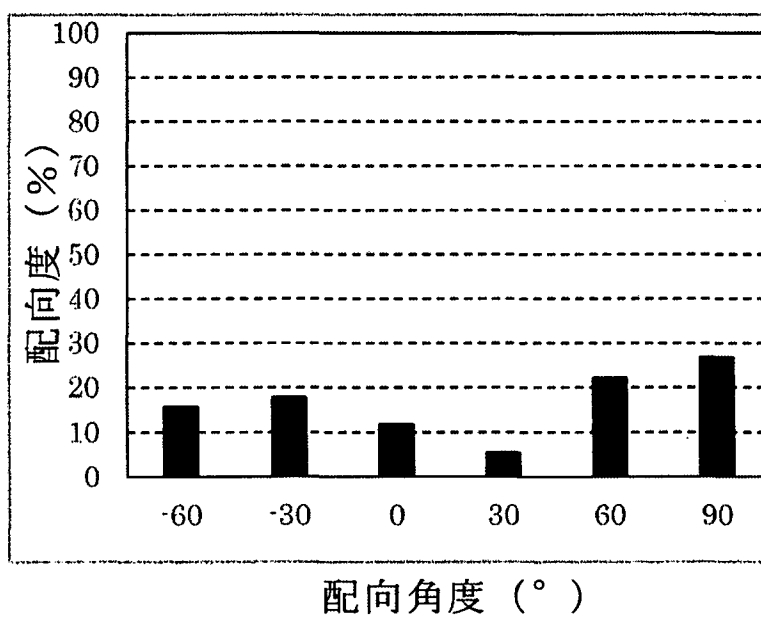
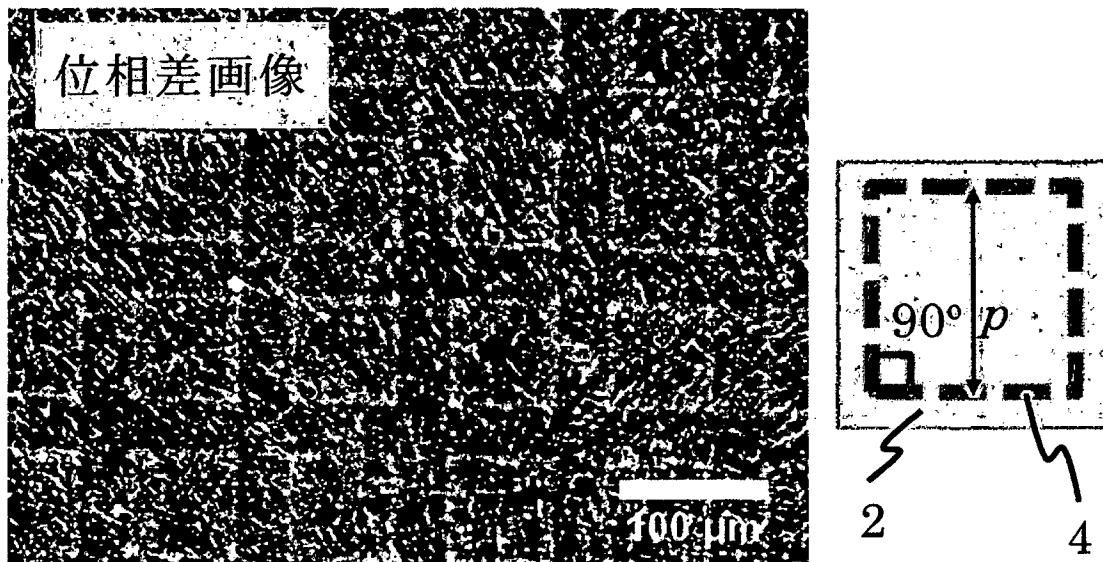


図 4



菱形リブ形状 (鋭角 =
50°, ピッチ $p = 100 \mu\text{m}$)

図 5



菱形リブ形状 (正方形 =
90°, ピッチ $p = 100\ \mu\text{m}$)

図 6

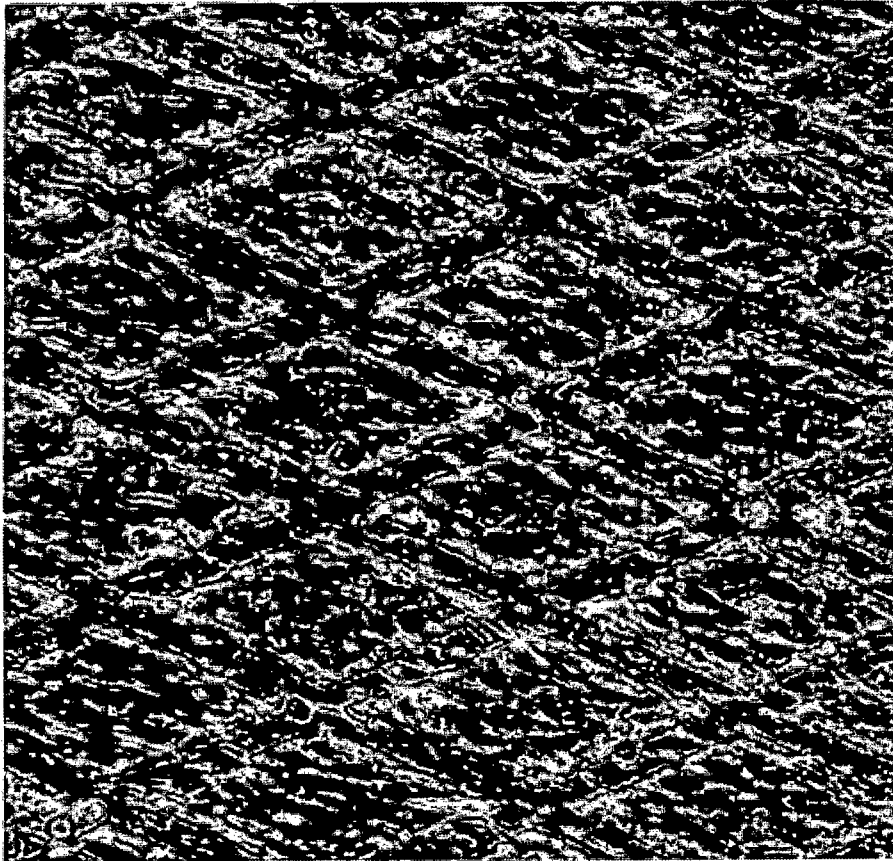
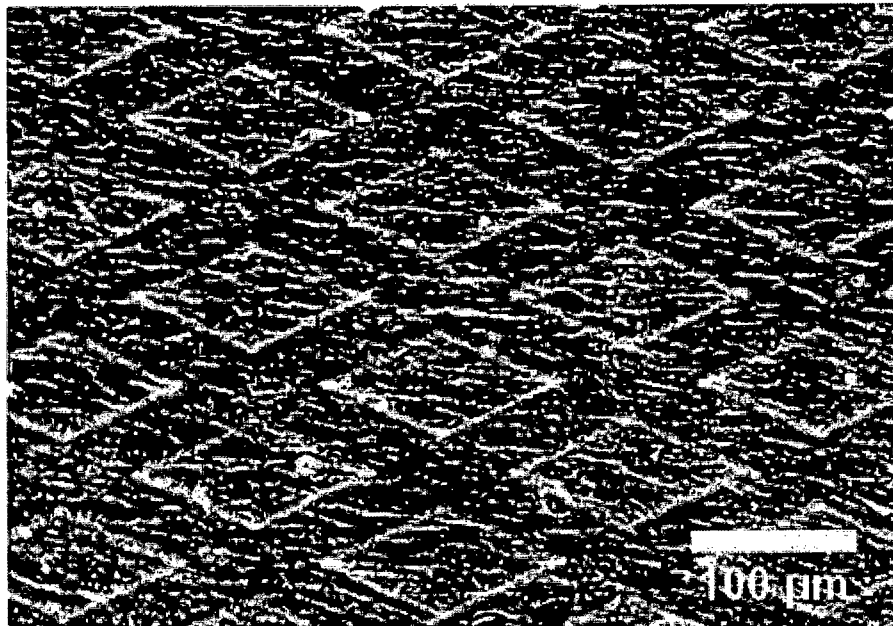
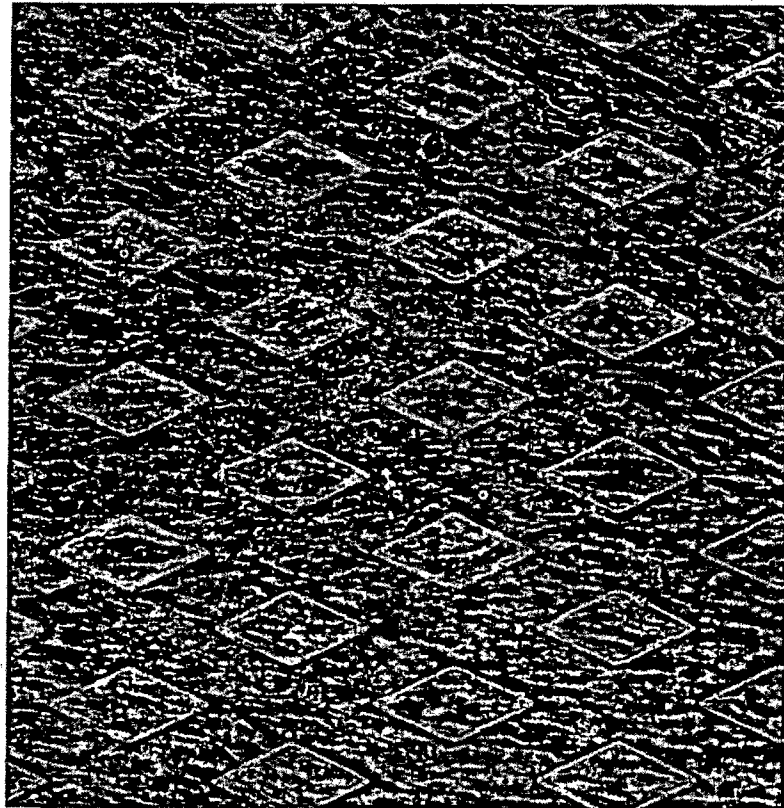
 $p=100\ \mu\text{m}$ リブの幅 $w=15\ \mu\text{m}$  $p=100\ \mu\text{m}$ リブの幅 $w=30\ \mu\text{m}$ 

图 7

$p=100\mu\text{m}$ 、リブの幅 $w=45\mu\text{m}$



$p=200\mu m$ リブの幅 $w=45\mu m$

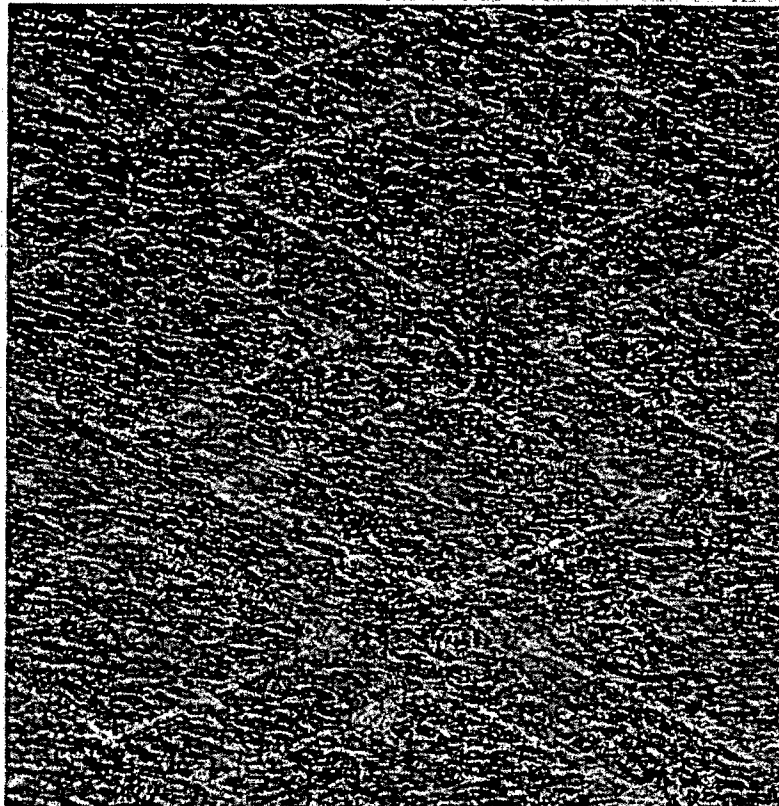


図 8

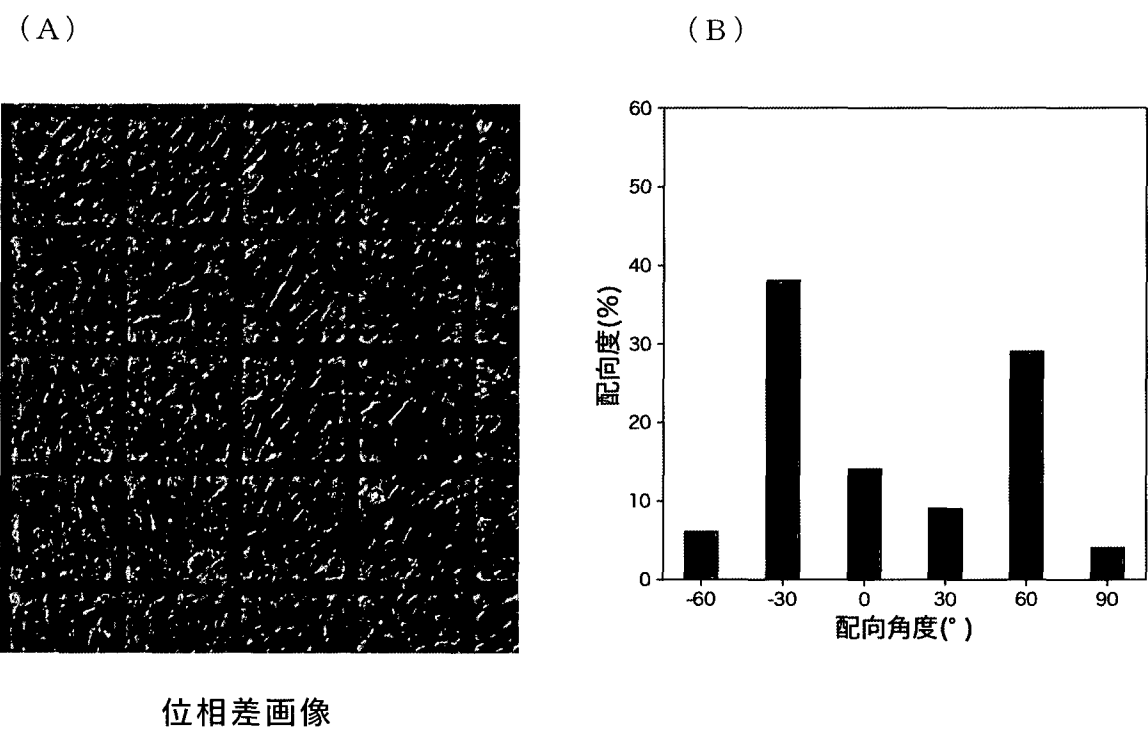


図 9

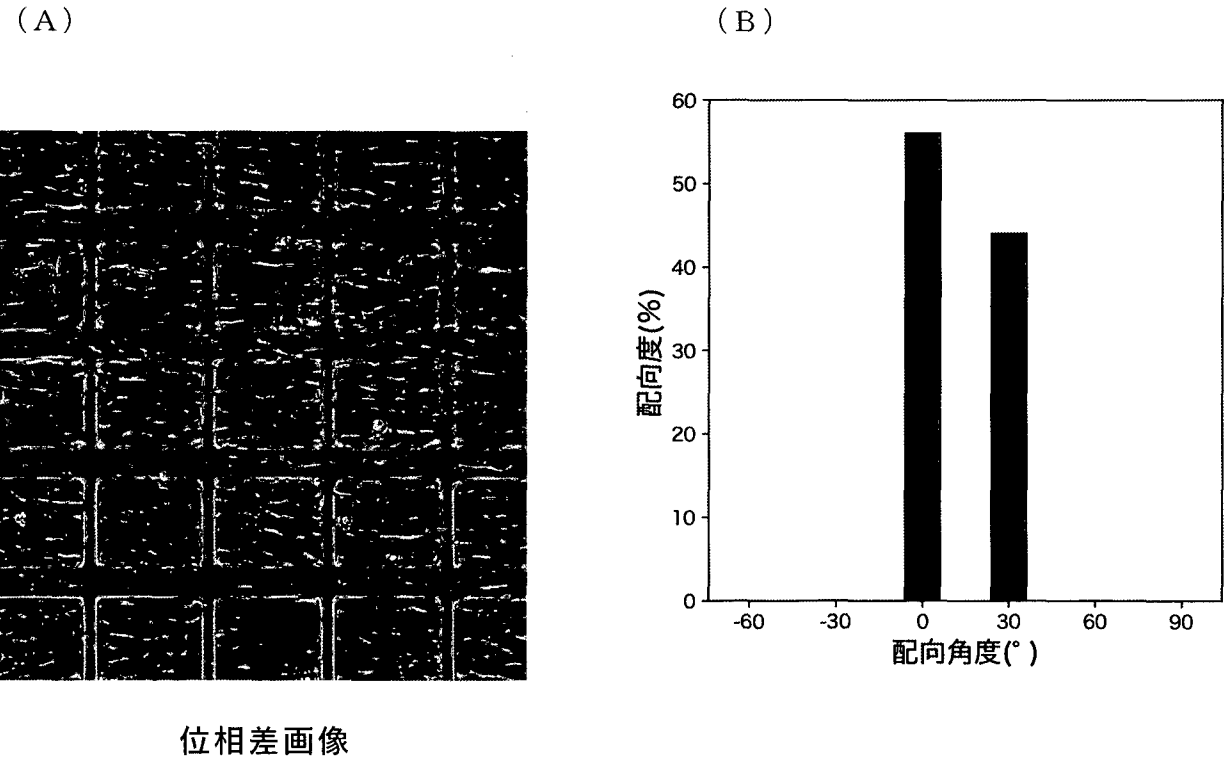


図 1 0

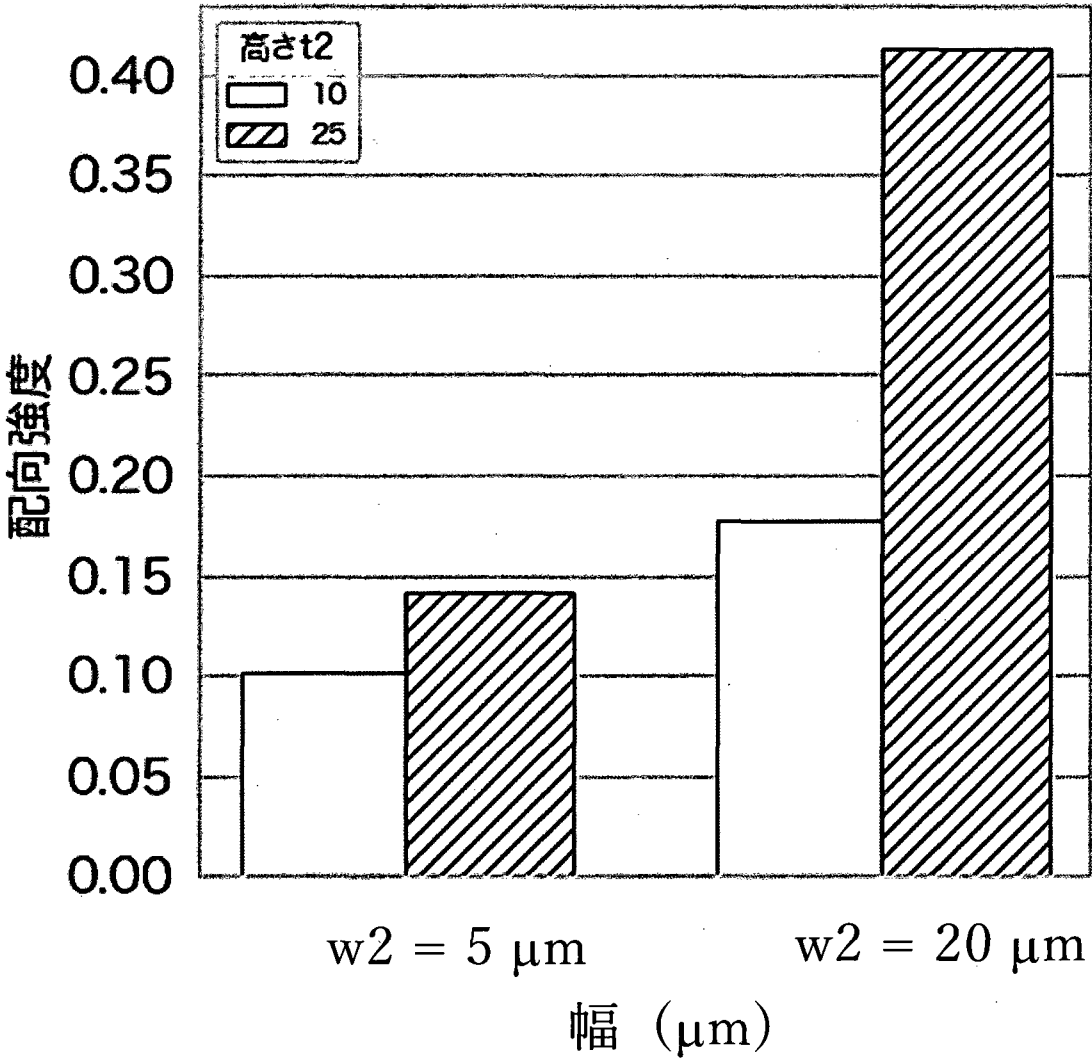
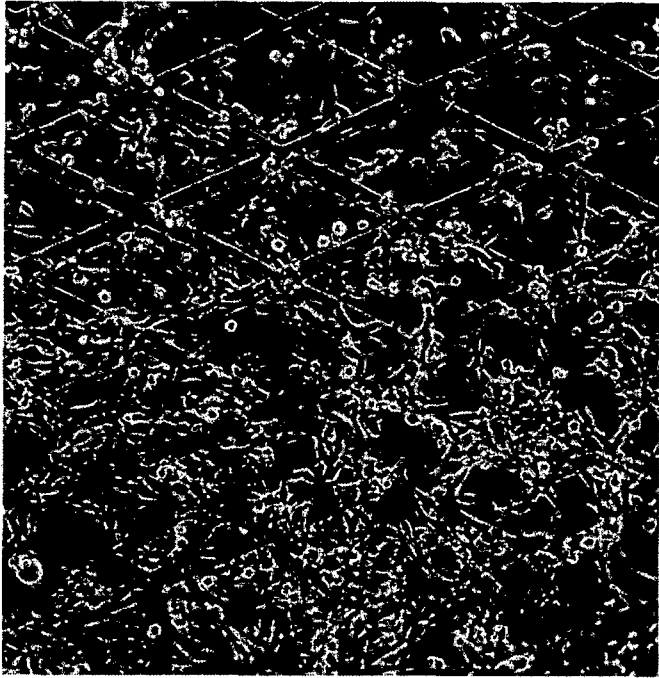


図 1 1
(A)



(B)

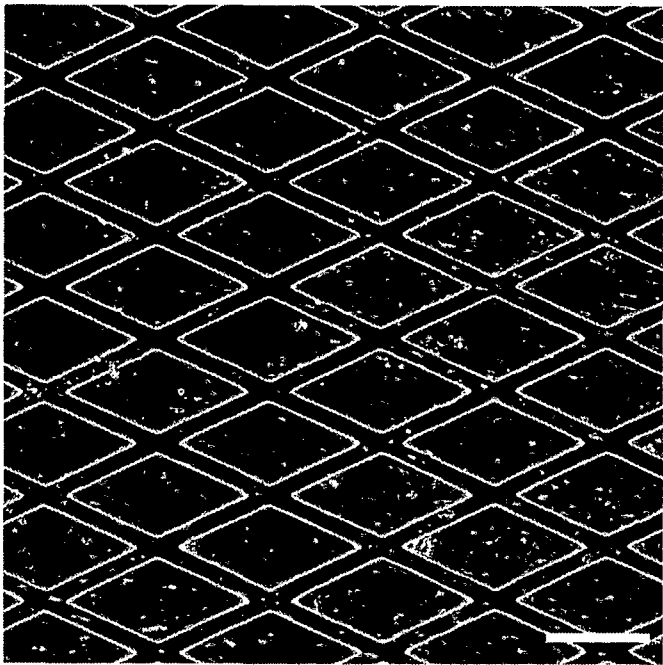


図 1 2 - 1

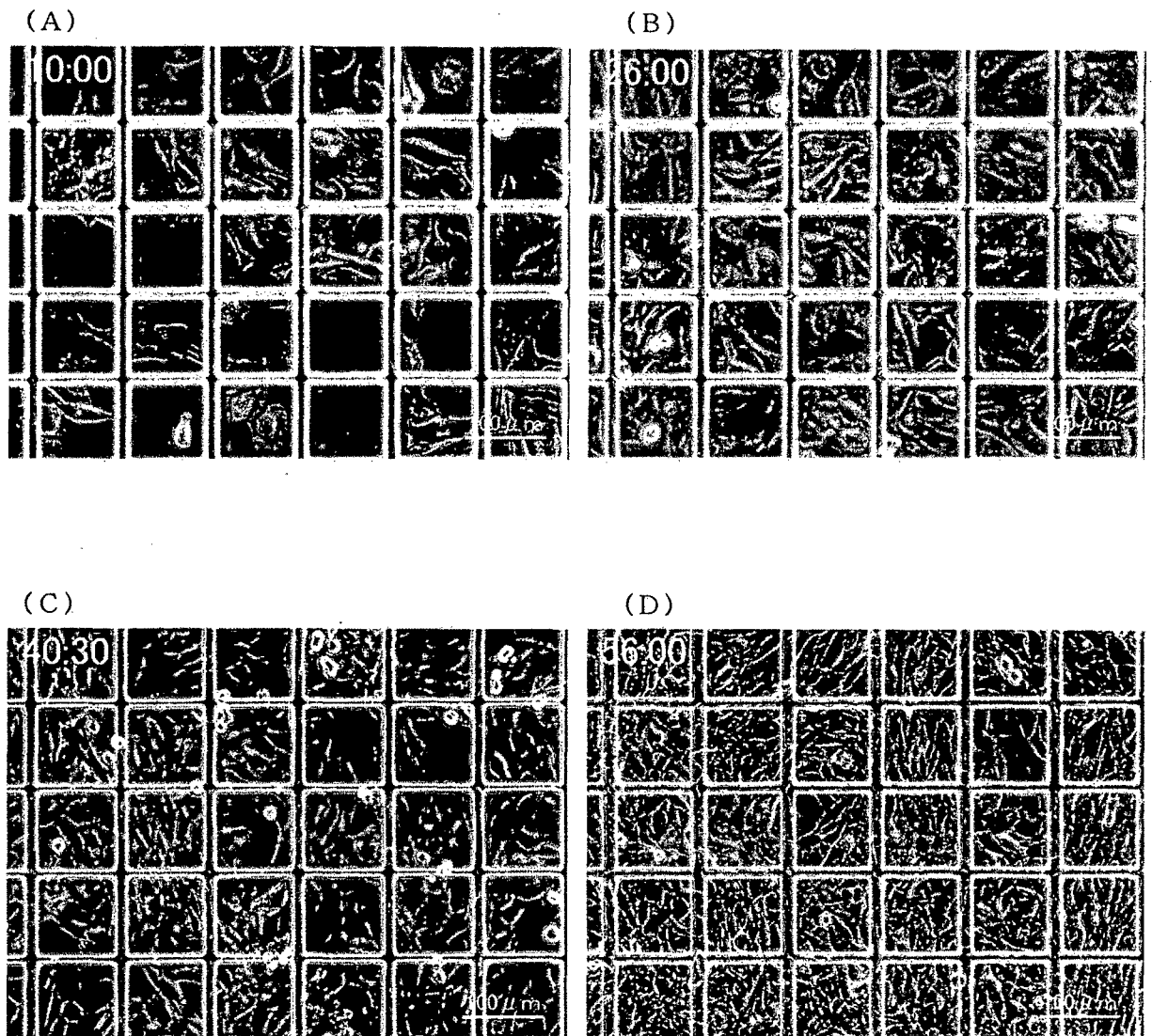


図 1 2 - 2

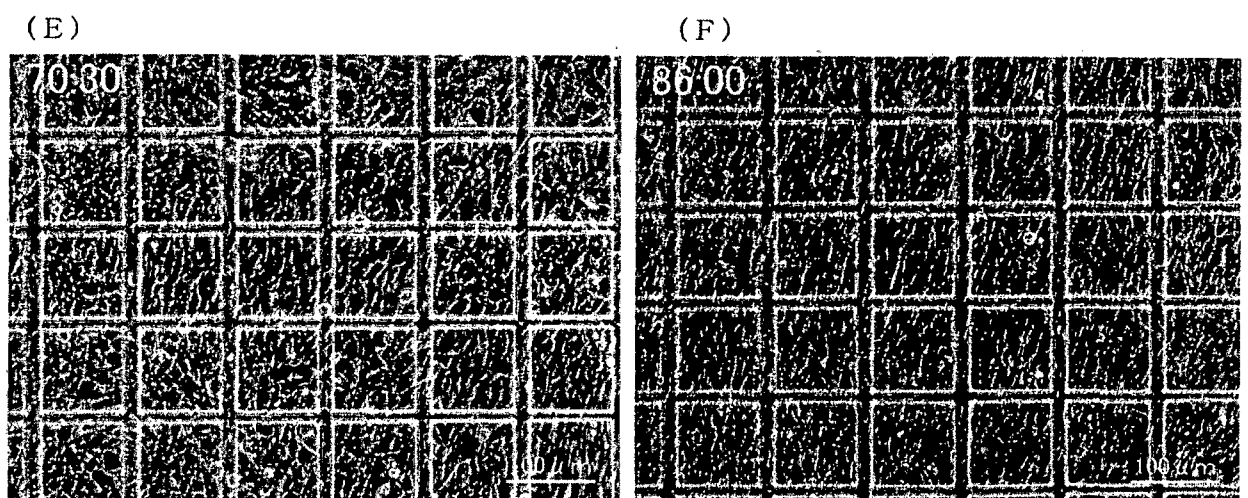
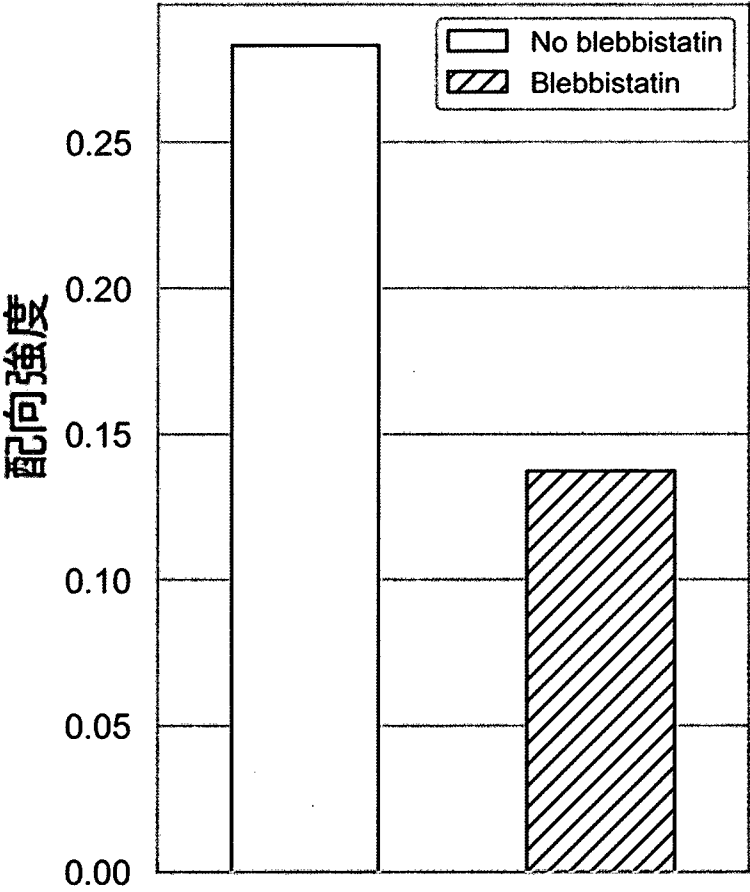


図 1 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/044598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12M 3/00*(2006.01)i; *C12M 1/00*(2006.01)i; *C12N 5/071*(2010.01)i

FI: C12M3/00 A; C12M1/00 A; C12N5/071

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)

C12M3/00; C12M1/00; C12N5/071

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 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2020-25496 A (NIPPON TELEGRAPH & TELEPHONE) 20 February 2020 (2020-02-20) claims 1, 2, 5, paragraphs [0006], [0021], [0029], [0032], [0037], [0052], [0054], [0074], experiment examples 1, 2, fig. 1, 2	1-14
Y	experiment example 2	8, 11-14
Y	JP 2001-233786 A (LTT INSTITUTE CO LTD) 28 August 2001 (2001-08-28) paragraph [0031]	8, 11-14
A	paragraph [0031]	1-14
Y	JP 2018-507895 A (BIONOOX SUISSE SA) 22 March 2018 (2018-03-22) paragraph [0115]	8, 11-14
A	paragraph [0115]	1-14
Y	JP 11-28083 A (MENICON CO LTD) 02 February 1999 (1999-02-02) paragraphs [0072], [0089], [0090]	8, 11-14
A	paragraphs [0072], [0089], [0090]	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

09 February 2022

Date of mailing of the international search report

22 February 2022

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/JP2021/044598

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-25496	A	20 February 2020	WO 2020/032092 A1	
JP	2001-233786	A	28 August 2001	(Family: none)	
JP	2018-507895	A	22 March 2018	US 2018/0055815 A1	
				example 3	
				WO 2016/146843 A1	
				EP 3270901 A1	
JP	11-28083	A	02 February 1999	EP 890636 A1	
				p. 9, lines 8-10, p. 12, lines 30-41	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i FI: C12M3/00 A; C12M1/00 A; C12N5/071		
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）） C12M3/00; C12M1/00; C12N5/071		
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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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	JP 2020-25496 A（日本電信電話株式会社）20.02.2020（2020-02-20） 請求項1、2、5、段落0006、0021、0029、0032、0037、 0052、0054、0074、実験例1、2、図1、2	1-14
Y	実験例2	8, 11-14
Y	JP 2001-233786 A（株式会社エルティーティー研究所）28.08.2001（2001-08-28） 段落0031	8, 11-14
A	段落0031	1-14
Y	JP 2018-507895 A（バイオヌークス スイス エスエー）22.03.2018（2018-03-22） 段落0115	8, 11-14
A	段落0115	1-14
Y	JP 11-28083 A（株式会社メニコン）02.02.1999（1999-02-02） 段落0072、0089、0090	8, 11-14
A	段落0072、0089、0090	1-14
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ 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 09.02.2022		国際調査報告の発送日 22.02.2022
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） 斉藤 貴子 4N 4509 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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/JP2021/044598

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-25496	A	20.02.2020	WO	2020/032092	A1	
JP	2001-233786	A	28.08.2001	(ファミリーなし)			
JP	2018-507895	A	22.03.2018	US	2018/0055815	A1	
				実施例 3			
				WO	2016/146843	A1	
				EP	3270901	A1	
JP	11-28083	A	02.02.1999	EP	890636	A1	
				第 9 頁第 8 - 1 0 行、第 1			
				2 頁第 3 0 - 4 1 行			