

(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
2020年2月13日(13.02.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/032092 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/031073

(22) 国際出願日: 2019年8月7日(07.08.2019)

(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 2018-151894 2018年8月10日(10.08.2018) JP

(71) 出願人: 日本電信電話株式会社 (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008116 東京都千代田区大手町一丁目5番1号 Tokyo (JP).

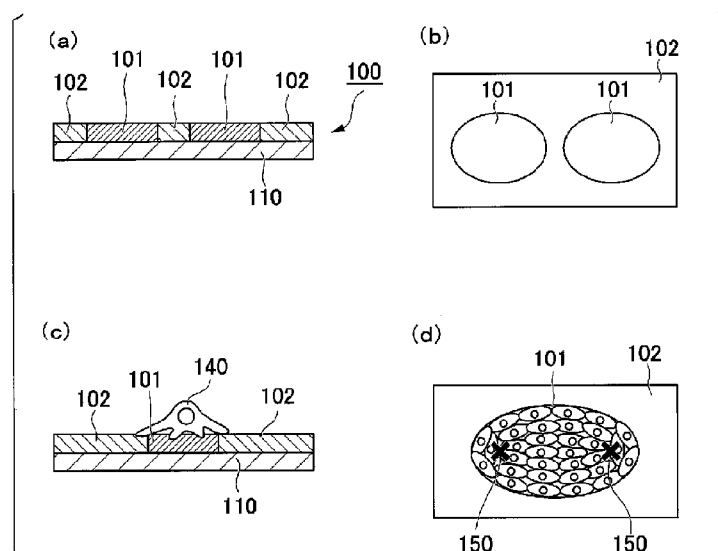
(72) 発明者: 宮廻裕樹 (MIYAZAKO Hiroki); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 上野祐子 (UENO Yuko); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 手島哲彦 (TESHIMA Tetsuhiko); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 志賀国際特許事務所 (SHIGA INTERNATIONAL PATENT OFFICE); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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,

(54) Title: SUBSTRATE FOR CELL CULTURING, PRODUCTION METHOD, AND PREDICTION METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養用基板、製造方法、及び予測方法



(57) Abstract: This method is for producing a substrate which is for cell culturing and on which cells are patterned, the method comprising culturing cells in a region in which cells are allowed to migrate on the substrate for cell culturing, and generating a structural defect at a specific location, wherein the specific location is predicted by this prediction method, and the substrate for cell culturing is the abovementioned substrate for cell culturing.

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, JO, 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,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, 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:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 細胞培養用基板の製造方法であって、前記細胞培養用基板の前記細胞遊走可能領域において、細胞を培養することと、前記構造欠陥を特定位置に生成させることと、を含み、前記特定位置が、上記の予測方法により予測される位置であり、前記細胞培養用基板が上記の細胞培養用基板である、細胞がパターンニングされた細胞培養用基板の製造方法である。

明 細 書

発明の名称：細胞培養用基板、製造方法、及び予測方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養用基板、製造方法、及び予測方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、再生医療や創薬分野において、培養細胞を用いた組織再構成に関する技術が広く研究されている。例えば、骨格筋芽細胞や心筋細胞を温度感受性培養皿上に培養し、製造された細胞シートを心臓に移植して、心臓病の治療を行う等の試みがなされている。このような培養細胞による２次元組織を製造するためには、２次元組織の構造の再現性や均質性を保証する必要がある。

[0003] 骨格筋芽細胞のような紡錘形の細胞は、増殖して細胞密度が高くなると、細胞の運動は徐々に停止し、特定の角度に配向する。しかし、この角度に配向できない点（以下、「欠陥」又は「構造欠陥」と呼ぶ）が生成される。

[0004] このような欠陥は、細胞シートの構造の均質性を阻害する要因となり得る。培養皿のような閉領域で細胞を培養する場合、欠陥は不可避免的に生成される。また、欠陥を完全に除くことはできない（例えば、非特許文献１を参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献１：Duclos G., et al., Topological defects in confined populations of spindle-shaped cells. Nature Physics, 13, 58-62, 2017.

非特許文献２：Saw TB., et al., Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion. Nature, 544, 212-216, 2017.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 培養細胞による２次元組織の均質性を高めるためには、欠陥が生成される

位置を制御することが有効であると考えられる。しかしながら、欠陥が生成される位置を制御することは不可能であった。

[0007] 欠陥は自己組織的に形成されるため、欠陥の位置を推定することは、困難であると考えられる。また、欠陥が生成する点は、弾性自由エネルギーを最小にする点であると考えられているが（例えば、非特許文献1を参照）、この点を解析的に解くことはできず、数値解を示した例も存在しない。すなわち、任意の閉領域パターンに対し、系統的に欠陥の生成位置を推定することは不可能であった。

[0008] また、欠陥の生成位置が推定できないため、欠陥に対して電場等の外部刺激を与えるアクチュエータ、欠陥周囲の化学種を計測するセンサ等を、予め配置することは不可能であった。

[0009] さらに、培養細胞による2次元組織を形成するためには、数日～数週間の時間を要する。そのため、実験による試行錯誤のみにより、高い均質性の2次元組織を形成するように、基板形状を最適化することは困難である。

[0010] 上記事情に鑑み、本発明は、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を有する細胞培養用基板、及びその製造方法を提供することを目的とする。また、本発明は、細胞の配向角度が定義できない、欠陥の生成位置の予測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

[0011] 本発明の一態様は、基板と、基板の一方の主面に形成された、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を有し、前記細胞遊走可能領域は前記細胞遊走不可能領域に囲まれており、前記細胞遊走可能領域は異方性の形状である、細胞培養用基板である。

[0012] また、本発明の一態様は、上記の細胞培養用基板であって、前記細胞遊走可能領域が楕円形である。

[0013] また、本発明の一態様は、上記の細胞培養用基板であって、前記細胞遊走不可能領域が細胞忌避剤でコートされている。

[0014] また、本発明の一態様は、上記の細胞培養用基板であって、構造欠陥が形

成される位置が特定されており、前記構造欠陥は、細胞を増殖させた場合に、前記細胞の配向角度が定義できないことである。

[0015] また、本発明の一態様は、上記の細胞培養用基板の製造方法であって、基板表面に微細加工技術を用いて、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を形成することを含む。

[0016] また、本発明の一態様は、上記の製造方法であって、細胞遊走不可能領域を形成することが細胞忌避剤をパターンングすることにより行われる。

[0017] また、本発明の一態様は、基板の一方の主面を $x-y$ 平面とし、前記 $x-y$ 平面上の、異方性の形状を有する細胞遊走可能領域 Ω において、下記式 (1) で与えられる弾性エネルギー F が最小となる位置 (x_i, y_i) を求めることと、前記位置が、構造欠陥が形成される位置であると予測することと、を含み、前記構造欠陥は、細胞を増殖させた場合に、前記細胞の配向角度が定義できないことである、前記構造欠陥の位置の予測方法である。

[数1]

$$F = \frac{K}{2} \iint_{\Omega} \left\{ \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial \phi}{\partial y} \right)^2 \right\} dx dy \quad (1)$$

[(1) 式中、 ϕ は下記式 (2) の解として与えられた配向角度であり、

[数2]

$$\nabla^2 \phi(x, y) = - \sum_{i=1}^N q_i \delta(x - x_i, y - y_i) \quad (2)$$

[(2) 式中、 $\delta(x - x_i, y - y_i)$ はデルタ関数であり、

N は、前記細胞遊走可能領域内に存在する構造欠陥の個数であり、

q_i は、下記式 (3) により与えられる、欠陥 i のまわりで一周したときの回転角度であり、

[数3]

$$q_i = k\pi \quad (3)$$

[(3) 式中、 k は 0 以外の整数である。]]]

[0018] また、本発明の一態様は、上記の細胞培養用基板の製造方法であって、前記細胞培養用基板の前記細胞遊走可能領域において、細胞を培養することと、前記構造欠陥を特定位置に生成させることと、を含み、前記特定位置が、上記の予測方法により予測される位置であり、前記細胞培養用基板が上記の細胞培養用基板である、細胞がパターンニングされた細胞培養用基板の製造方法である。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を有する細胞培養用基板、及びその製造方法を提供することができる。また、本発明によれば、細胞の配向角度が定義できない、欠陥の生成位置の予測方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1] (a) は、平坦な基板（以下、基板 1 という）の上に、領域 1 と領域 2 を有する、細胞培養用基板の一例を模式的に示す断面図である。(b) は、細胞培養用基板の一例を模式的に示す上面図である。(c) は、細胞培養用基板に細胞を播種し、その基板上で細胞の配向を誘導する過程を模式的に示した断面図である。(d) は、細胞培養用基板に細胞を播種し、その基板上で細胞の配向を誘導する過程を模式的に示した上面図である。

[図2] (a) はガラス基板を模式的に示す断面図である。(b) は、薄膜 1 が蒸着された状態を模式的に示す断面図である。(c) は、薄膜 2 が形成された状態を模式的に示す断面図である。(d) は、薄膜 2 をエッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。(e) は、薄膜 1 をエッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。(f) は、残留レジストを除去した状態を模式的に示す断面図である。(g) は、薄膜 3 を形成させた状態を模式的に示す断面図である。(h) は、エッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。(i) は、フィブロネクチンをコートした後の状態を模式的に示す断面図である。

[図3] M P C ポリマーが塗布されていない部分の蛍光強度を高くすることによ

り、細胞遊走可能領域を可視化した図である。

[図4] (a) は、MPCポリマーが塗布されていない領域1にのみ細胞が接着し、遊走した状態を示す図である。(b) は、播種した細胞が増殖することにより、領域1と領域2の境界において細胞が境界の接線方向に配向し、欠陥が生成された状態を示す図である。(c) は、細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表した図である。(d) は、配向角度と明度の対応関係を示した図である。

[図5] (a) は、長軸が800 μm であり、短軸が690 μm である領域1に、NIH-3T3細胞を播種した直後の様子を示す図である。(b) は、細胞を播種してから50時間後の様子を示す図である。(c) は、細胞を播種してから64時間後の様子を示す図である。(d) は、(b) に示される細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。(e) は、(c) に示される細胞の配向角度を、構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。

[図6] (a) は、長軸が600 μm であり、短軸が400 μm である領域1に、HFF細胞を播種した直後の様子を示す図である。(b) は、細胞を播種してから50時間後の様子を示す図である。(c) は、細胞を播種してから64時間後の様子を示す図である。(d) は、(b) に示される細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。(e) は、(c) に示される細胞の配向角度を、構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表した図である。

[図7] (a) は、真円における2つの欠陥の位置を示す図である。(b) は、楕円における2つの欠陥の位置を示す図である。(c) は、真円内の欠陥のある座標において、 $\log F$ の値を示した図である。(d) は、楕円内の欠陥のある座標において、 $\log F$ の値を示した図である。

発明を実施するための形態

[0021] [基板]

細胞遊走可能領域（以下、「領域１」という）とは、細胞が接着できるように、表面を加工した領域である。細胞遊走不可能領域（以下、「領域２」という）とは、細胞が入り込めないか、又は細胞が接着できず、結果として、細胞が遊走し、増殖することができない領域である。

[0022] ある領域の形状が異方性を持つとは、その領域が、方向によって異なる形状を持つことをいう。逆に、ある領域の形状が等方性を持つとは、その領域が、方向によって同一の形状を持つことをいう。例えば、ある２次元平面における楕円の形状は異方性を持ち、ある２次元平面における真円の形状は等方性を持つ、ということが出来る。

[0023] 欠陥又は構造欠陥とは、細胞を増殖させた場合に、細胞の集団が特定の角度に配向し、ある点において、細胞がこの角度に配向できないことをいう。このような点においては、細胞の角度を定義することができない。

[0024] 本実施形態の細胞培養用基板は、構造欠陥が形成される位置が特定されていてもよい。

[0025] 実施例において後述するように、細胞遊走可能領域の形状が楕円であり、細胞のサイズ、楕円のスケール、楕円の短軸の長さに対する長軸の長さの比（以下、「アスペクト比」という）を適切に設定した場合、欠陥は楕円の長軸上に生成する。

[0026] [製造方法]

図１（ａ）は、平坦な基板（以下、「基板１」という）の上に、領域１と領域２を有する、細胞培養用基板の一例を模式的に示す断面図である。図１（ｂ）は、細胞培養用基板の一例を模式的に示す上面図である。

[0027] 基板１の材質としては、例えば、ガラス基板を用いることができるが、材質の種類、材質の厚さはこれに限定されない。ただし、倒立型の位相差顕微鏡を用いて、接着性細胞を観察することが多いため、基板１は高い透明性を有することが好ましい。

[0028] 領域１は、細胞が接着することができる限り、どのような形態をとってもよい。ただし、領域１に細胞が接着しやすい場合、より短時間で所定の位置

に欠陥が生成されるため、領域 1 は高い細胞接着性を有するほうが望ましい。

[0029] 領域 1 に高い細胞接着性を付与するために、例えば、ポリエチレンイミン、ポリリジン等のカチオン性のポリマー、フィブロネクチン、コラーゲン等の細胞外マトリックスを、領域 1 に塗布してもよい。

[0030] 領域 2 は、細胞が存在しない限り、どのような形態をとってもよい。例えば、細胞忌避剤を基板上にパターンニングすることにより、領域 2 を形成してもよいし、細胞のサイズに対して十分に高い障壁を作成し、細胞の遊走領域を制限することにより、領域 2 を形成してもよい。

[0031] 領域 1 は領域 2 に囲まれていればよく、領域 1 が同一基板内に複数個存在してもよい。

ただし、領域 1 の間隔が小さい場合、細胞が領域 2 を乗り越えて遊走し、複数の領域 1 が相互作用するため、細胞の配向に影響を与える。したがって、領域 1 の間隔は数 100 μm 以上であることが好ましい。

[0032] 領域 1 および領域 2 の形状は、異方性を持っていれば、特に形状は限定されない。ただし、領域 1 のサイズが大きくなるほど、所定の位置に欠陥が生成されるまでの時間が長くなるため、領域 1 は 1 mm 四方角以内に収まることが好ましい。

[0033] 図 1 (c) は、上述の細胞培養用基板に細胞を播種し、その基板上で細胞の配向を誘導する過程を模式的に示した断面図である。図 1 (d) は、上述の細胞培養用基板に細胞を播種し、その基板上で細胞の配向を誘導する過程を模式的に示した上面図である。

[0034] 上述の細胞培養用基板に細胞を播種すると、細胞は増殖するとともに、領域 1 と領域 2 の境界において、細胞は境界の接線方向に配向する。細胞が領域 1 内でコンフルエントになった後、局所的に細胞の配向がそろうことにより、細胞の配向方向が定まらない点（以下、「欠陥」又は「構造欠陥」という）が生じる。

[0035] 効率よく欠陥の位置を誘導するため、領域 1 を、例えば、楕円形とするこ

ともできる。

領域 1 を楕円形とした場合、楕円の短軸の長さに対する長軸の長さの比（以下、「アスペクト比」という）を、1.5 から 4 とすることが好ましい。また、楕円の長軸の長さは、500 μm から 1000 μm とすることが好ましい。

[0036] 基板 1、領域 1、及び領域 2 は平面に限定されず、3 次元的な曲率をもっているてもよい。

[0037] 領域 2 は、細胞忌避剤を塗布することによっても形成することができる。細胞忌避剤としては、例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC ポリマー）が挙げられる。

[0038] 領域 1 と領域 2 を製造する方法は、特に限定されず、実施例において後述するように、フォトリソグラフィ法を用いてもよいし、マイクロコンタクトプリンティング等のソフトリソグラフィ法を用いてもよいし、基板 1 を物理的に切削してもよい。

[0039] フォトリソグラフィに用いられる、フォトレジストとしては、実施例で後述するように、例えば、ポジ型フォトレジストが挙げられるが、これに限定されない。

[0040] 実施例において後述するように、領域 1 の形状が、例えば、楕円であり、その楕円のアスペクト比と長軸の長さが適切である場合に、領域 1 の長軸方向に、欠陥を生成させることができる。

[0041] [予測方法]

上述の領域 1 の形状は、異方性を持つ限り、特に限定されない。領域 1 の形状が異方性を持つ場合、ネマチック液晶理論に基づき、最終的に形成される細胞の欠陥の位置は、次のように、数値計算により推定することができる。

[0042] 領域 1 内のある点 (x, y) における細胞の配向角度を $\phi(x, y)$ とする。領域内に欠陥が N 個あるとし、欠陥 i ($i = 1, 2, \dots, N$) のまわりで 1 周したときの回転角度を q_i とする。0 以外の整数 k を用いて、 q_i は次の

ように表すことができる。

[数4]

$$q_i = k\pi \quad (3)$$

[0043] このとき、 $\phi(x, y)$ は、次の2次元ポアソン方程式にしたがう。

[数5]

$$\nabla^2 \phi(x, y) = - \sum_{i=1}^N q_i \delta(x - x_i, y - y_i) \quad (2)$$

ただし、 $\delta(x - x_i, y - y_i)$ は、 (x_i, y_i) 以外の領域で0となる、デルタ関数である。

[0044] この方程式の解を用いて、領域1内の液晶がもつ弾性自由エネルギーFは、次の面積分によって求められる。

[数6]

$$F = \frac{K}{2} \iint_{\Omega} \left\{ \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial \phi}{\partial y} \right)^2 \right\} dx dy \quad (1)$$

ただし、Kは弾性定数である。

[0045] 欠陥の位置を変化させたとき、上記式(2)、上記式(3)に従って、弾性自由エネルギーが変化する。欠陥は、弾性自由エネルギーが極小となるように、生成されると推定される。Kは正の定数であるため、弾性自由エネルギーFを最小化する条件は、Kの値に依存しない。したがって、Kの正確な値を求める必要はなく、便宜的に1として計算してよい。

[0046] 領域1の境界が微分可能な滑らかな境界であり、かつ単連結な領域である場合、欠陥のまわりの回転角度 q_i の和が 2π となる制約を満たせば、ガウス・ボンネの定理より、欠陥の個数Nと回転角度 q_i は、どのようなものでもよい。ただし、欠陥の個数が多いときは、欠陥が移動し対消滅することで、最終的には回転角度が π となる欠陥が2個となることが期待される。

[0047] したがって、領域1内に回転角度が π となる欠陥を2個配置し、弾性自由エネルギーを計算することを繰り返し、弾性自由エネルギーが極小となる点

を探すことで、欠陥が生成される位置を推定することができる。

[0048] なお、生成される欠陥の個数が2個よりも多いと期待される場合は、マルコフ連鎖モンテカルロ法を用いてシミュレーションすることにより、上記式(3)の弾性自由エネルギーを極小とする、欠陥の個数とおおよその生成位置を、推定することも可能である。

[0049] ただし、モンテカルロ法によるシミュレーションは計算量が多いという欠点があるため、生成位置を精密に推定したい場合は、上記式(3)の弾性自由エネルギーを直接最小化するほうが望ましい。

[0050] 上述のように、細胞の欠陥位置は数値計算により、予め推定することができる。したがって、試行錯誤的にパターンを実際に作成して評価する必要がなく、数値計算により、所望の配向構造を効率よく設計・評価することが可能となる。

[0051] 細胞欠陥の位置は、数値計算により推定可能であるが、所定の位置に欠陥が生成されるまでの時間は、扱う細胞の大きさや配向時の細胞のアスペクト比に依存する。様々なスケールの細胞遊走可能領域パターンを、アレイ状に同一基板上にパターンニングし、細胞を培養することによって、どのスケールが最適かを効率よく評価することが可能である。

[0052] 上述の細胞培養用基板は、細胞遊走可能領域と細胞遊走不可能領域を含む単純な構造を持つため、マイクロ流体デバイスや微小電極アレイ等と組み合わせることが容易である。

また、欠陥の位置を数値計算により予測することができるため、欠陥が生成される点に、電極、各種センサ、アクチュエータ等を、予め配置することが可能である。

[0053] したがって、例えば、欠陥が生成される点にセンサを予め配置することにより、欠陥において生じる特有の生命現象を、計測することが可能になると考えられる。また、例えば、欠陥に外部から刺激を与えることにより、欠陥を移動、消失させる等のアクチュエーションが可能になる。

[0054] 欠陥の位置を誘導することにより、欠陥間では細胞の配向が一様となるこ

とが保証される。これにより、配向性を有する組織へ細胞を分化させる効率が上昇することが期待される。また、欠陥の位置を誘導することにより、合成された組織の均質性が保証されるため、創薬等において行われる、スクリーニングの高精度化、高効率化を実現すると考えられる。

[0055] 以上、この発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、この発明の要旨を逸脱しない範囲の設計等も含まれる。

実施例

[0056] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0057] [実験例 1]

領域 1 および領域 2 を備えた細胞培養用基板を製造した。

[0058] まず、基板 1 として厚さ $100\mu\text{m}$ のガラス基板を用意した。図 2 (a) はガラス基板を模式的に示す断面図である。この基板 1 の表面にアルミニウムを熱蒸着させて、薄膜 1 を形成させた。図 2 (b) は、薄膜 1 が蒸着された状態を模式的に示す断面図である。

[0059] 次に、フォトリソを塗布し、紫外光を照射して物理マスク (薄膜 2) を形成させた。図 2 (c) は、薄膜 2 が形成された状態を模式的に示す断面図である。その後、レジストおよびアルミニウムをエッチングした。図 2 (d) は、薄膜 2 をエッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。図 2 (e) は、薄膜 1 をエッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。そして、残留レジストをアセトンによって除去した。図 2 (f) は、残留レジストを除去した状態を模式的に示す断面図である。

[0060] その後、MPC ポリマーを塗布し、ベークすることで薄膜 3 を形成させた。図 2 (g) は、薄膜 3 を形成させた状態を模式的に示す断面図である。その後、再びアルミニウムをエッチングすることにより、MPC ポリマーのパターンを形成させた。図 2 (h) は、エッチングした後の状態を模式的に示す断面図である。

[0061] 最後に、フィブロネクチンをコートすることにより、培養基板を完成させた。図2 (i) は、フィブロネクチンをコートした後の状態を模式的に示す断面図である。

[0062] 作成した透明な培養基板を可視化するために、蛍光色素を吸着させた。図3は、MPCポリマーが塗布されていない部分の蛍光強度を高くすることにより、細胞遊走可能領域を可視化した図である。

[0063] [実験例2]

NIH-3T3細胞を上述の細胞培養用基板に播種し、楕円形の領域1において形成される欠陥の位置を観察した。細胞が遊走し、増殖し、欠陥が形成される様子を、図4に示す。

[0064] 図4 (a) は、MPCポリマーが塗布されていない領域1にのみ細胞が接着し、遊走した状態を示す図である。図4 (b) は、播種した細胞が増殖することにより、領域1と領域2の境界において細胞が境界の接線方向に配向し、欠陥が生成された状態を示す図である。

[0065] 細胞の配向角度は次のように算出した。ピクセル位置 (x, y) における画像の輝度を $I(x, y)$ とあらわす。このとき、画像の構造テンソル J を次のように定義した。

[数7]

$$J = \begin{bmatrix} J_{xx} & J_{xy} \\ J_{xy} & J_{yy} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (\Delta_x I)^2 & \Delta_x I \cdot \Delta_y I \\ \Delta_x I \cdot \Delta_y I & (\Delta_y I)^2 \end{bmatrix} \quad (4)$$

[0066] ただし、 $\Delta_x I$ および $\Delta_y I$ は、次のように定義される。

[数8]

$$\Delta_x I(x, y) = I(x+1, y) - I(x-1, y) \quad (5)$$

[数9]

$$\Delta_y I(x, y) = I(x, y+1) - I(x, y-1) \quad (6)$$

[0067] ピクセル位置 (x, y) における配向角度 $\phi(x, y)$ は、構造テンソル J を用いて、次式のように算出できる。

[数10]

$$\phi(x,y) = \frac{1}{2} \arctan \left(\frac{2J_{xy}}{J_{xx} - J_{yy}} \right) \quad (7)$$

ただし、構造テンソルJをガウス関数によって空間的に平滑化した後に、配向角度 ϕ を算出した。

[0068] 図4(c)は、細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表した図である。図4(d)は、配向角度と明度の対応関係を示した図である。

[0069] 実験例3において詳述するが、数値例で推定した通り、楕円の形状を持つ領域1の長軸上に欠陥が生成されることが明らかになった。また、2つの欠陥の間では細胞の配向角度が揃う傾向にあることが確認された。

[0070] したがって、異方的な形状を持つ細胞遊走可能領域に、細胞を播種し培養することによって、特定の位置に細胞の欠陥の生成位置を誘導できることが明らかになった。

[0071] 長軸が800 μ mであり、短軸が690 μ mである領域1に、NIH-3T3細胞を播種し、解析を行った結果を図5に示す。図5(a)は、NIH-3T3細胞を播種した直後の様子を示す図である。図5(b)は、細胞を播種してから50時間後の様子を示す図である。図5(c)は、細胞を播種してから64時間後の様子を示す図である。図5(d)は、図5(b)に示される細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。図5(e)は、図5(c)に示される細胞の配向角度を、構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。NIH-3T3細胞を播種した場合も、播種後2日程度で、欠陥が楕円の長軸方向に2つ生成されることが確認された。

[0072] 長軸が600 μ mであり、短軸が400 μ mである領域1に、Human foreskin fibroblast (HFF)細胞を播種し、解析を行った結果を図6に示す。図6(a)は、HFF細胞を播種した直後の様

子を示す図である。図6 (b) は、細胞を播種してから50時間後の様子を示す図である。図6 (c) は、細胞を播種してから64時間後の様子を示す図である。図6 (d) は、図6 (b) に示される細胞の配向角度を構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表し、欠陥の位置を示した図である。図6 (e) は、図6 (c) に示される細胞の配向角度を、構造テンソル法によって算出し、明度によって角度方向を表した図である。HFF細胞を、比較的面積の小さい楕円である領域1に播種した場合、欠陥は最終的に消失することが明らかになった。

[0073] 欠陥が消失した原因は、楕円の面積に対して、細胞のサイズ、および、楕円の短軸の長さに対する長軸の長さの比（アスペクト比）が大きく、回転数 $+\pi$ の配向パターンを実現できなかったためであると考えられる。この結果から、扱う細胞のサイズ、領域1の面積、アスペクト比によって、欠陥を生成しない領域1のスケールは異なると考えられる。

[0074] 欠陥を生成しない領域1の形状は、様々なスケールの領域1を同一基板上に2次元アレイ化することによって、短時間でスクリーニングすることが可能であると考えられる。

[0075] [実験例3]

楕円の細胞遊走可能領域を設けた基板において、細胞配向の欠陥が生成する点を、数値計算によって推定した。

[0076] まず、領域1の形状が半径1の真円である場合について、推定を行った。この真円内に回転角度 π の欠陥が2つあり、2つの点が対称な位置 $(+x_p, +y_p)$ と $(-x_p, -y_p)$ に存在すると仮定した（ただし、 $0 < x_p, y_p < 1$ である）。図7 (a) は、これら2つの欠陥の位置を示す図である。

[0077] 真円上にこれら2つの欠陥がある場合について、上記(1)～(3)式を用いて、弾性自由エネルギー(F)を計算した。ただし、数値積分の発散を防止するため、欠陥から半径0.01以内の領域については面積分の領域から除外した。

[0078] 図7 (c) は、欠陥のある座標において、 $\log F$ の値を示した図である

。弾性自由エネルギー（ F ）が極小となる欠陥は、等方的に広がっていることが明らかになった。すなわち、領域 1 の形状が真円である場合には、特定の位置に欠陥を誘導することが難しいと考えられる。

[0079] 次に、領域 1 の形状が、長軸の長さが 1、短軸の長さが 0.5 である、楕円である場合について、推定を行った。この楕円内に回転角度 π の欠陥が 2 つあり、2 つの点が対称な位置 $(+x_p, +y_p)$ と $(-x_p, -y_p)$ に存在すると仮定した（ただし、 $0 < x_p, y_p < 1$ である）。図 7（b）は、これら 2 つの欠陥の位置を示す図である。

[0080] 楕円上にこれら 2 つの欠陥がある場合について、上記（1）～（3）式を用いて、弾性自由エネルギー（ F ）を計算した。ただし、数値積分の発散を防止するため、欠陥から半径 0.01 以内の領域については面積分の領域から除外した。

[0081] 図 7（d）は、欠陥のある座標において、 $\log F$ の値を示した図である。弾性自由エネルギー（ F ）が極小となる欠陥は、この楕円の長軸上にあることが明らかになった。したがって、楕円のアスペクト比を大きくすることで、長軸方向に欠陥を誘導することができると予測された。この結果は実験例 2 と整合的である。

[0082] 以上の結果を小括すると、上述の数値計算による推定から、欠陥の生成位置を予測できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0083] 本発明によれば、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を有する細胞培養用基板、及びその製造方法を提供することができる。また、本発明によれば、細胞の配向角度が定義できない、欠陥の生成位置の予測方法を提供することができる。

符号の説明

[0084] 100…細胞培養用基板、101…領域 1、102…領域 2、110…基板 1、140…細胞、150…欠陥、201…薄膜 1、202…薄膜 2、203…薄膜 3、210…基板 1、240…フィブロネクチン、450…欠陥

、 5 5 0 …欠陥、 6 5 0 …欠陥

請求の範囲

- [請求項1] 基板と、基板の一方の主面に形成された、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を有し、
- 前記細胞遊走可能領域は前記細胞遊走不可能領域に囲まれており、
- 前記細胞遊走可能領域は異方性の形状である、
- 細胞培養用基板。
- [請求項2] 前記細胞遊走可能領域が楕円形である、請求項1に記載の細胞培養用基板。
- [請求項3] 前記細胞遊走不可能領域が細胞忌避剤でコートされている、請求項1又は2に記載の細胞培養用基板。
- [請求項4] 構造欠陥の形成される位置が特定されており、
- 前記構造欠陥は、細胞を増殖させた場合に、前記細胞の配向角度が定義できないことである、
- 請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞培養用基板。
- [請求項5] 基板表面に微細加工技術を用いて、細胞遊走可能領域及び細胞遊走不可能領域を形成することを含む、
- 請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞培養用基板の製造方法。
- [請求項6] 前記細胞遊走不可能領域を形成することが細胞忌避剤をパターンニングすることにより行われる、請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] 基板の一方の主面を x y 平面とし、前記 x y 平面上の、異方性の形状を有する細胞遊走可能領域 Ω において、
- 下記式(1)で与えられる弾性エネルギー F が最小となる位置(x_i , y_i)を求めることと、
- 前記位置が、構造欠陥が形成される位置であると予測することと、
- を含み、
- 前記構造欠陥は、細胞を増殖させた場合に、前記細胞の配向角度が定義できないことである、
- 前記構造欠陥の位置の予測方法。

[数1]

$$F = \frac{K}{2} \iint_{\Omega} \left\{ \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial \phi}{\partial y} \right)^2 \right\} dx dy \quad (1)$$

[(1) 式中、 ϕ は下記式 (2) の解として与えられた配向角度であり、

[数2]

$$\nabla^2 \phi(x, y) = - \sum_{i=1}^N q_i \delta(x - x_i, y - y_i) \quad (2)$$

[(2) 式中、 $\delta(x - x_i, y - y_i)$ はデルタ関数であり、

N は、前記細胞遊走可能領域内に存在する構造欠陥の個数であり、

q_i は、下記式 (3) により与えられる、欠陥 i のまわりで一周したときの回転角度であり、

[数3]

$$q_i = k\pi \quad (3)$$

[(3) 式中、k は 0 以外の整数である。]]]

[請求項8]

前記細胞培養用基板の前記細胞遊走可能領域において、細胞を培養することと、

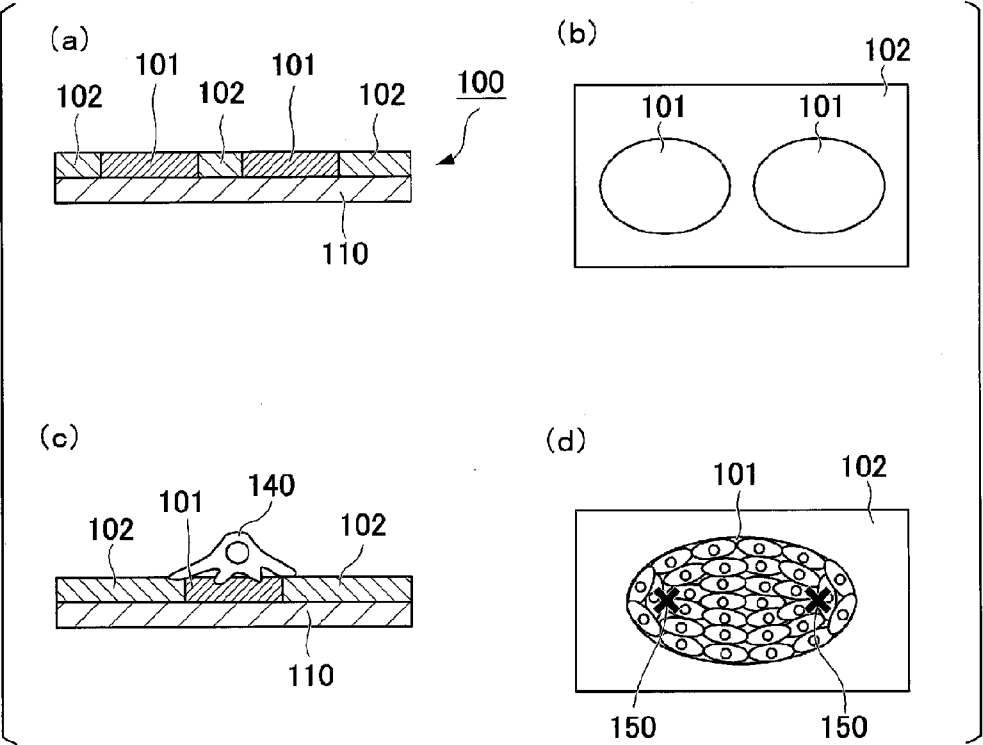
前記構造欠陥を特定位置に生成させることと、を含み、

前記特定位置が、請求項 7 に記載の予測方法により予測される位置であり、

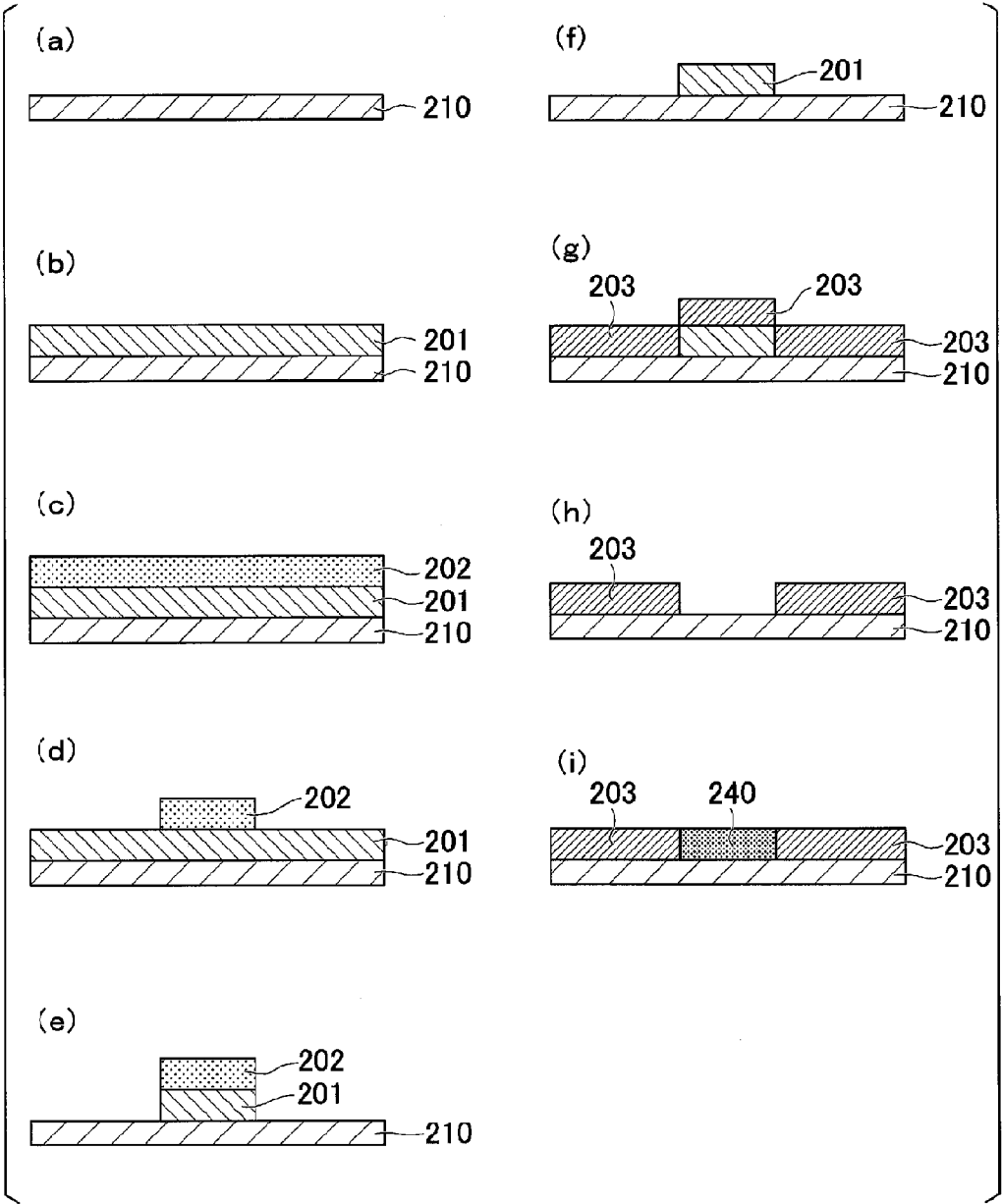
前記細胞培養用基板が請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細胞培養用基板である、

細胞がパターンニングされた細胞培養用基板の製造方法。

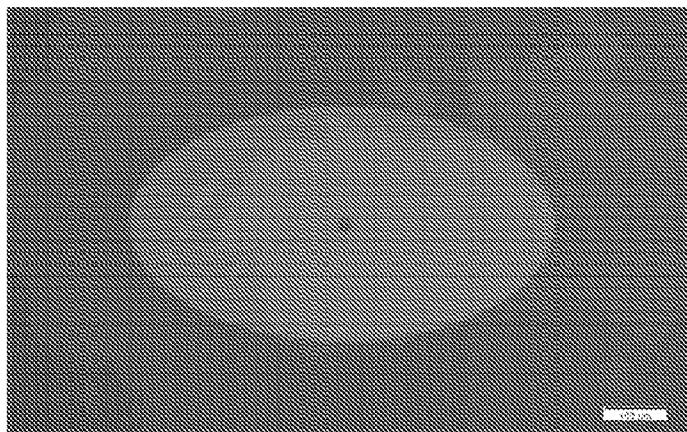
[図1]



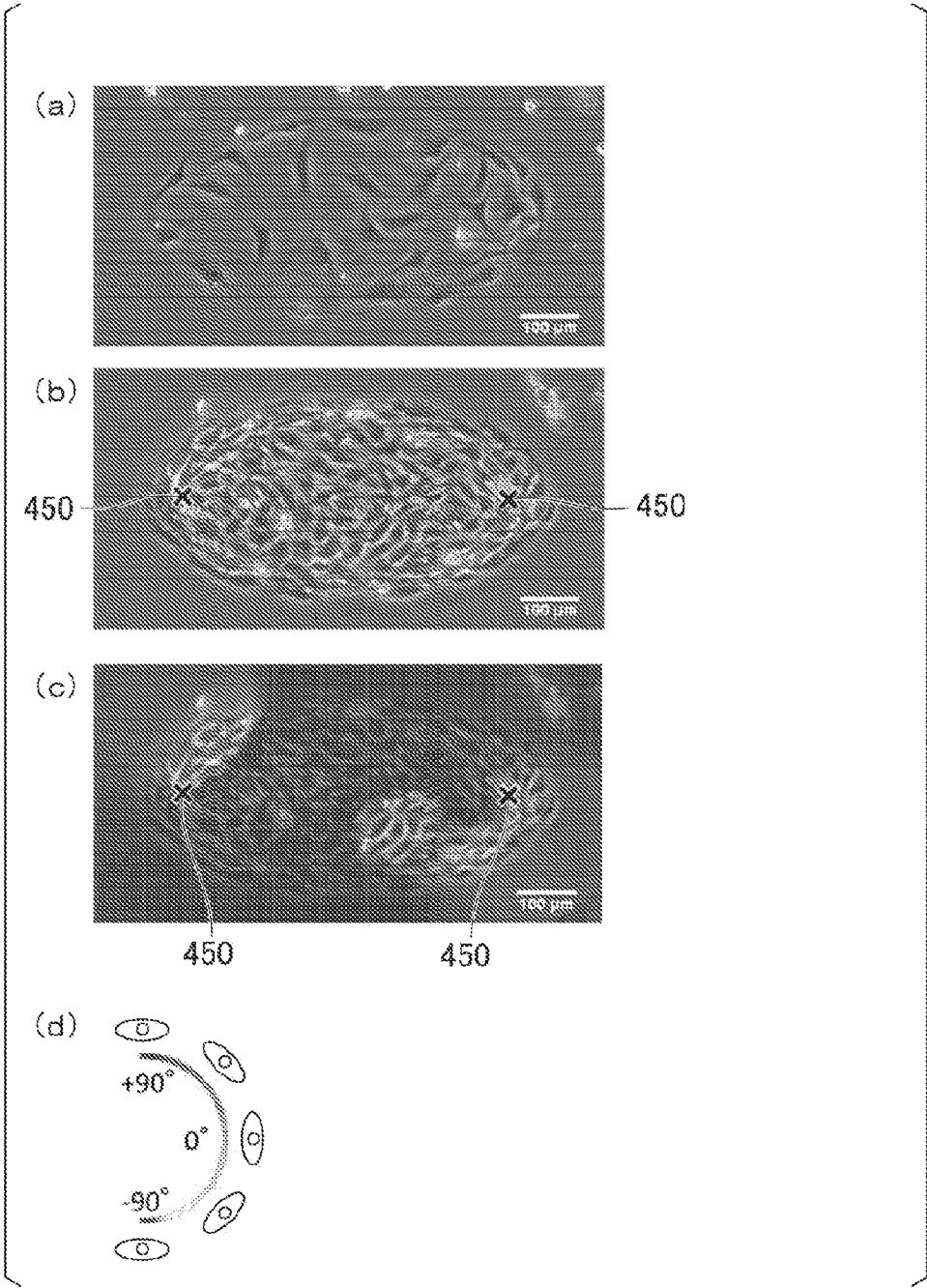
[図2]



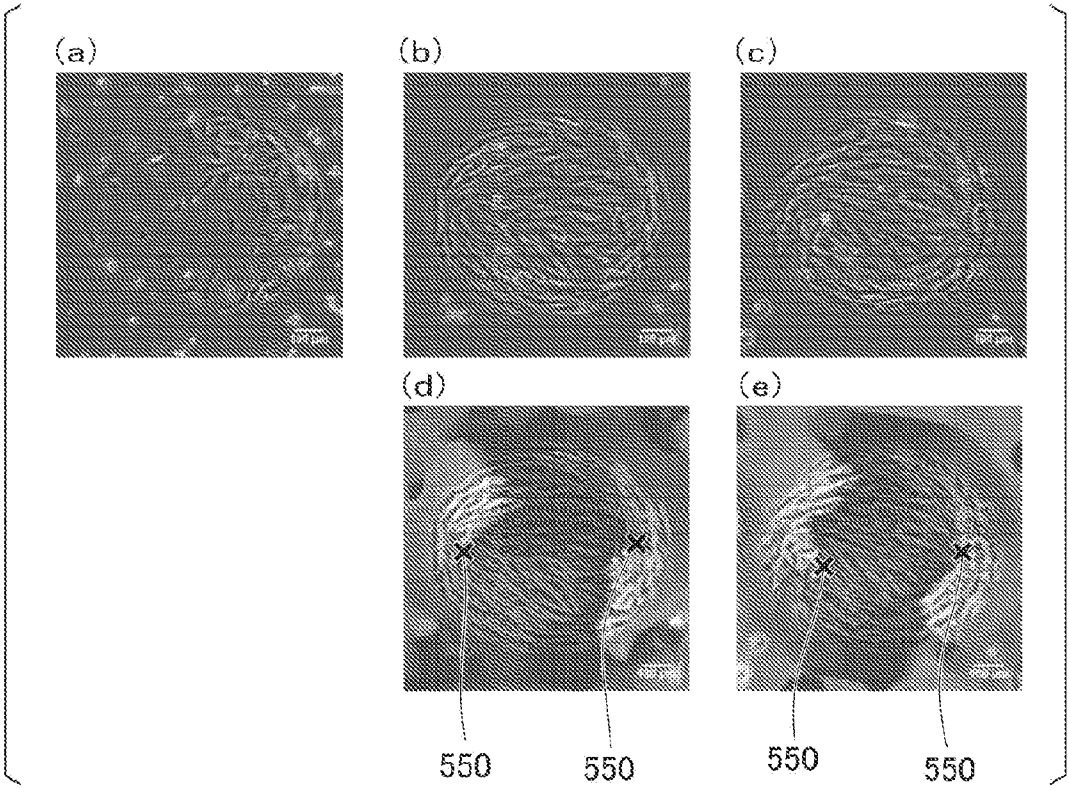
【図3】



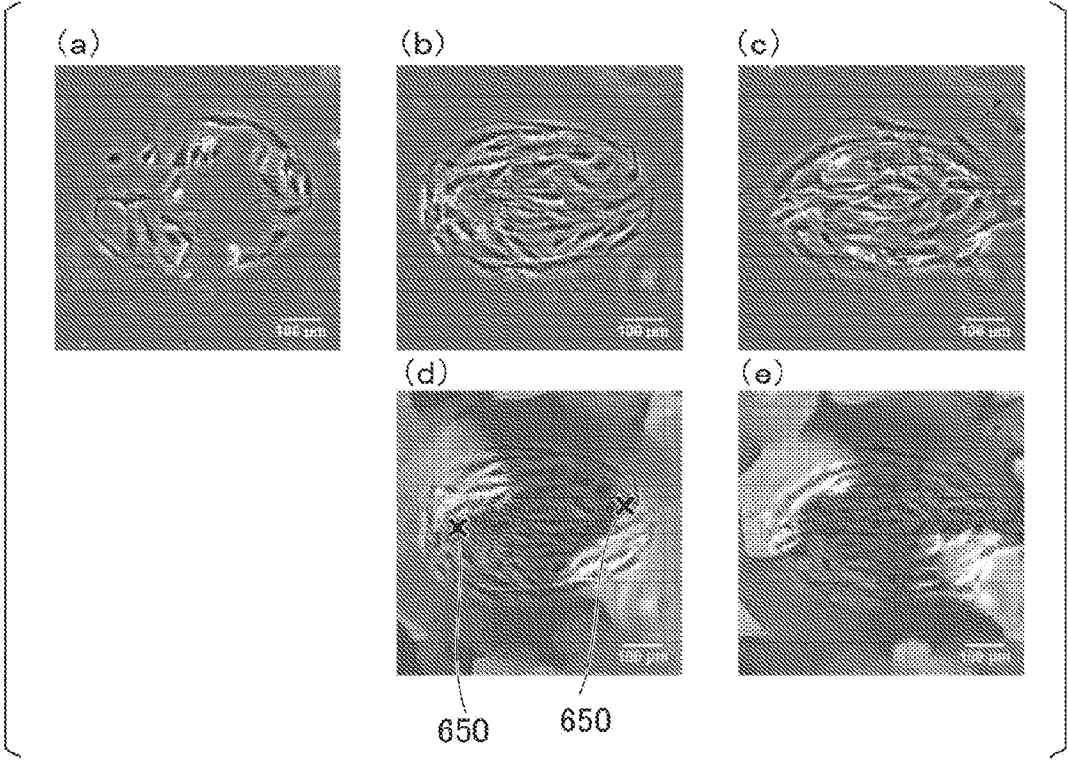
[図4]



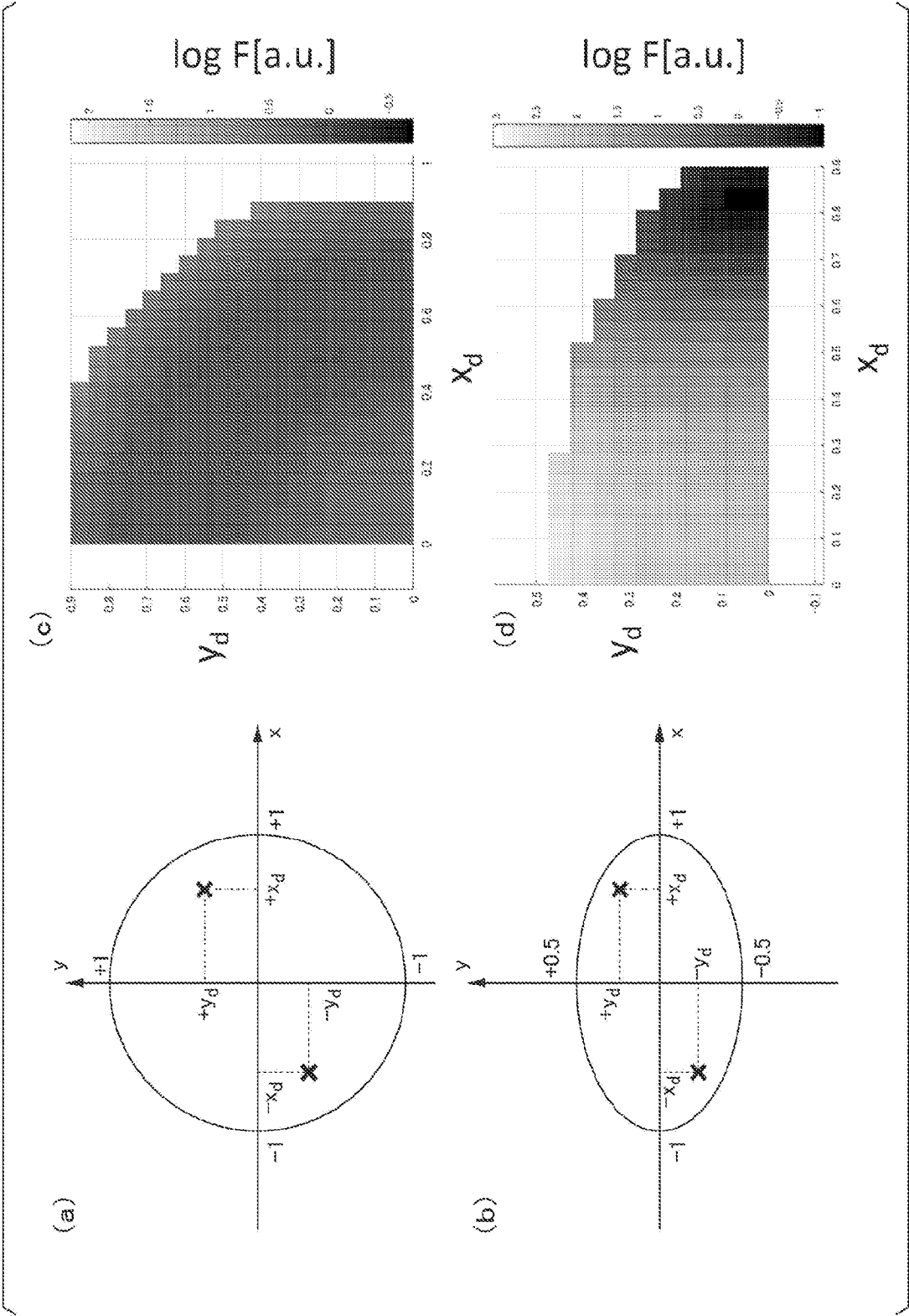
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/031073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12M3/00 (2006.01) i

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)

Int.Cl. C12M3/00

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/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 A	JP 2011-101638 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 26 May 2011, entire text, in particular, abstract, fig. 3, claims 1-10, paragraph [0080] & US 2013/0210068 A1, entire text, in particular, abstract, fig. 3, claims 1-10, paragraph [0125] & WO 2012/049784 A1	1-3, 5, 6 4, 7, 8

☒ 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

"I" 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
28 October 2019 (28.10.2019)

Date of mailing of the international search report
05 November 2019 (05.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/031073

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2016/208777 A1 (NATIONAL CEREBRAL AND CARDIOVASCULAR CENTER) 29 December 2016, entire text, in particular, abstract, claims 1-7, fig. 1, examples & US 2018/0355296 A1, entire text, in particular, abstract, claims 1-7, fig. 1, examples & EP 3315596 A1 & CN 107709539 A	1-3, 5, 6 4, 7, 8
A	KAWAGUCHI, K. et al., "Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures.", Nature, 2017, vol. 545, pp. 327-331, entire text, in particular, abstract, page 329, right column, paragraph [0002] to page 331, left column, paragraph [0001], fig. 1, 4	1-8
PX	宮廻 裕樹、外 2 名, 物理境界の計算機支援設計に基づく細胞集団におけるトポロジカル欠陥の生成位置誘導, 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会講演要旨集、30 October 2018, vol. 38, p. 28, entire text, (MIYAZAKO, Hiroki et al., "Systematic Direction of Topological Defects in Cell Population by Computer-aided-design of Geometrical Boundary", Lecture abstracts of study group of society for chemistry and micro-nano systems)	1-8
PX	宮廻 裕樹、外 2 名, 物理境界の計算機支援設計に基づく細胞集団におけるトポロジカル欠陥の生成位置誘導, 化学とマイクロ・ナノシステム, 31 March 2019, vol. 18, no. 1, pp. 16-19, entire text, in particular, abstract, fig. 5-7, page 18, left column, paragraph [0002] to page 19, left column, paragraph [0003], (MIYAZAKO, Hiroki et al., "Systematic Direction of Topological Defects in Cell Population by Computer-aided-design of Geometrical Boundary", Journal of the Society for Chemistry and Micro-Nano Systems)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M3/00 (2006.01) i

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))

Int.Cl. C12M3/00

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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 (JDreamIII)、CAplus/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 A	JP 2011-101638 A (大日本印刷株式会社) 2011.05.26, 全文、特に、要約、図3、請求項1-10、[0080] & US 2013/0210068 A1 全文、特に、要約、図3、請求項1-10、[0125] & WO 2012/049784 A1	1-3, 5, 6 4, 7, 8

☒ 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矛盾するものではなく、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

28. 10. 2019

国際調査報告の発送日

05. 11. 2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊達 利奈

4 B

3960

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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 A	WO 2016/208777 A1 (国立研究開発法人国立循環器病研究センター) 2016.12.29, 全文、特に、要約、請求項 1－7、図 1、実施例 & US 2018/0355296 A1 全文、特に、要約、請求項 1－7、図 1、実施例 & EP 3315596 A1 & CN 107709539 A	1-3, 5, 6 4, 7, 8
A	KAWAGUCHI K. et al., Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures. Nature, 2017, Vol.545, pp.327-331 全文、特に、要約、第 3 2 9 頁右欄第 2 段落－第 3 3 1 頁左欄第 1 段落、図 1、 図 4	1-8
PX	宮廻 裕樹、外 2 名 物理境界の計算機支援設計に基づく細胞集団におけるトポロジカル欠陥の生 成位置誘導. 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会講演要旨集、2018.10.30, Vol.38, p.28 全文	1-8
PX	宮廻 裕樹、外 2 名 物理境界の計算機支援設計に基づく細胞集団におけるトポロジカル欠陥の生 成位置誘導. 化学とマイクロ・ナノシステム, 2019.03.31, Vol.18, No.1, pp.16-19 全文、特に、要約、図 5－図 7、第 1 8 頁左欄第 2 段落－第 1 9 頁左欄第 3 段 落	1-8