(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-530009
(P2024-530009A)
(43)公表日　令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/077(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/077	ＺＮＡ　４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/0735(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0735	
Ｃ１２Ｎ	*5/074(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/074	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全34頁）

(21)出願番号　特願2024-506583(P2024-506583)
(86)(22)出願日　令和4年8月8日(2022.8.8)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月8日(2024.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/IL2022/050861
(87)国際公開番号　WO2023/017509
(87)国際公開日　令和5年2月16日(2023.2.16)
(31)優先権主張番号　63/230,849
(32)優先日　令和3年8月9日(2021.8.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　523168847
アレフ ファームス リミテッド
イスラエル国，７６７０４０１ レホボト，１ ハイム ホルツマン ストリート
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
(72)発明者　ラボン，ネタ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多能性細胞から分化した筋肉細胞、その産生方法、及びその使用

(57)【要約】
本発明は、骨格筋肉細胞を含む生物工学的に作られた組織の産生の分野に関し、具体的には、多能性幹細胞及びそれから分化した骨格筋肉細胞から複数の骨格筋肉にコミットした前駆細胞を産生するための組成物及び方法に関する。本発明は、骨格筋肉にコミットした前駆細胞塊及び／又は骨格筋肉細胞塊、それらを含む操作された組織、並びにそれらの使用を更に提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生する方法であって、前記方法が、複数の多能性幹細胞（ＰＳＣ）を、（ｉ）ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、（ｉｉ）ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培養培地中で培養し、それによって、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生すること、を含む、方法。
【請求項２】
前記培地が、無血清培地である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
培養することが、三次元（３Ｄ）培養条件下で行われる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記３Ｄ培養が、懸濁培養である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記３Ｄ培養が、接着性材料及び／又は支持マトリックスを欠いている、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞が、自己集合して、少なくとも１つの細胞凝集体を形成する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記３Ｄ培養が、少なくとも１つの接着性材料及び／又は支持マトリックスを含む、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項８】
培養することが、少なくとも１つの接着性材料及び／又は支持マトリックスを含む二次元（２Ｄ）培養条件下で行われる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項９】
前記ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の前記少なくとも１つの活性化因子が、アクチビンＡ、ＴＧＦ－β、ＢＭＰ２、ＢＭＰ７、ＧＤＦ９、ＮＯＤＡＬ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＧＳＫ３シグナル伝達経路の前記少なくとも１つの阻害剤が、ＣＨＩＲ－９９０２１（Ｃ２２Ｈ１８Ｃｌ２Ｎ８）又はその塩、ＳＢ　２１６７６３、ＬＹ２０９０３１４、ＴＷＳ１１９、チデグルシブ、ＧＳＫ－３β阻害剤１、ＧＳＫ－３β阻害剤２、ＧＳＫ－３β阻害剤３、ＡＲ－Ａ０１４４１８、ＴＤＺＤ－８、ケンパウロン、ＧＳＫ３阻害剤ＩＸ、クロモリンナトリウム、ＣＨＩＲ－９８０１４、ＡＺＤ１０８０、ＳＢ　４１５２８６、ＩＭ－１２、９－ＩＮＧ－４１、インジルビン－３’－モノオキシム、１－アザケンパウロン、ＢＲＤ０７０５、ＡＺＤ２８５８、ＣＰ２１Ｒ７、ＢＩＯ－アセトオキシム、ビキニン、ＶＰ３．１５、ＶＰ３．１５ジヒドロブロミド、ＧＮＦ４８７７、ＫＹ１９３８２、ＳＡＲ５０２２５０、Ａ　１０７０７２２、（Ｒ）－ＢＲＤ３７３１、ＢＲＤ３７３１、ＢＩＰ－１３５、５－ヨード－インジルビン－３’－モノオキシム、ＢＲＤ５６４８、ＧＳＫ－３阻害剤１、ＧＳＫ－３／ＣＤＫ５／ＣＤＫ２－ＩＮ－１、インジルビン－３’－モノオキシム－５－スルホン酸、ＧＳＫ３β阻害フラボノイド、リチウム、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＣＨＩＲ－９９０２１塩が、ＣＨＩＲ－９９０２１一塩酸塩、ＣＨＩＲ－９９０２１三塩酸塩、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】

前記ＧＳＫ３β阻害フラボノイドが、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ミリセチン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１０又は１１に記載の方法。

【請求項１３】

前記培地が、前記ＴＧＦ－β経路を活性化する成長因子以外の成長因子を欠いている、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】

前記培地が、ｂＦＧＦを欠いている、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

前記組み合わせが、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記組み合わせが、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１からなる、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

培養することが、前記複数の細胞の総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞に達することを可能にする期間にわたって行われる、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

前記複数のＰＳＣを培養することが、前記ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、前記ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との前記組み合わせを含む前記培地中で連続的に行われる、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９】

前記複数のＰＳＣを培養することが、サイクルで行われ、前記ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、前記ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との前記組み合わせを含む前記培地が、各サイクル後に交換される、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

各サイクルにおいて、前記ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、前記ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との前記組み合わせが、同じ組み合わせ又は異なる組み合わせである、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記産生された複数の細胞が、少なくとも１つの追加の系列にコミットした前駆細胞を更に含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

前記追加の系統にコミットした前駆細胞が、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記ＰＳＣが、人工ＰＳＣ（ｉＰＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、及び非胚性幹細胞からなる群から選択される、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記ＰＳＣが、非ヒト動物及びヒトからなる群から選択される起源のものである、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】

前記非ヒト動物が、有蹄動物、家禽、水生動物、無脊椎動物、及び爬虫類からなる群から選択される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記有蹄動物が、ウシ亜科動物、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、ウマ科動物、ブタ、キ

リン、ラクダ、シカ、カバ、又はサイからなる群から選択される、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生する方法であって、前記方法が、
ａ．請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法によって産生された骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む前記複数の細胞を接着性材料及び／又は支持マトリックス上に沈着させることと、
ｂ．前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞の骨格筋肉細胞への分化を促進する、分化培地中で前記複数の細胞を培養し、
それによって、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生することと、を含む、方法。
【請求項２８】
前記分化培地が、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤を欠いている、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記分化培地が、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１を欠いている、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
ＰＳＣから骨格筋肉細胞を含む前記複数の分化細胞を得るための全期間が、約６日～約３０日である、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記複数の分化細胞が、細胞の前記総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉細胞を含む、請求項２７～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記複数の分化細胞が、間質細胞及び脂肪細胞からなる群から選択される少なくとも１つの追加の細胞型を更に含む、請求項２７～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記間質細胞が、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
骨格筋肉細胞を含む前記複数の分化細胞が、操作された組織を形成する、請求項２７～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法によって産生された骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む、複数の細胞。
【請求項３６】
前記複数の細胞が、本質的にＰＳＣを欠いている、請求項３５に記載の複数の細胞。
【請求項３７】
前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞が、少なくとも１つの中胚葉マーカー及び／又は少なくとも１つの初期筋原性マーカーの発現を特徴とする、請求項３５又は３６に記載の複数の細胞。
【請求項３８】
前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞が、非ヒト動物ＰＳＣから産生される、請求項３５～３７のいずれか一項に記載の複数の細胞。
【請求項３９】
前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞が、ウシ亜科動物ＰＳＣから産生される、請求項３８に記載の複数の細胞。
【請求項４０】
請求項２７～３３のいずれか一項に記載の方法によって産生された骨格筋肉細胞を含む、複数の分化細胞。
【請求項４１】

前記骨格筋肉細胞が、ウシ亜科動物ＰＳＣから分化している、請求項４０に記載の複数の分化細胞。
【請求項４２】
前記複数の分化細胞が、間質細胞、脂肪細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの型の細胞を更に含む、請求項４０又は４１に記載の複数の分化細胞。
【請求項４３】
前記間質細胞が、コラーゲン産生細胞を含む、請求項４２に記載の複数の分化細胞。
【請求項４４】
請求項４０～４３のいずれか一項に記載の複数の細胞を含む、操作された組織。
【請求項４５】
請求項４１～４３のいずれか一項に記載の複数の分化細胞及び／又はそれを含む操作された組織を含む、培養食品。
【請求項４６】
前記培養食品が、培養肉である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数のインビトロ成長細胞であって、前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞が、少なくとも１つの中胚葉マーカー及び／又は少なくとも１つの初期筋原性マーカーの発現を特徴とする、複数のインビトロ成長細胞。
【請求項４８】
前記少なくとも１つの中胚葉マーカーが、ＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、Ｐａｘ３、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、前記少なくとも１つの初期筋原性マーカーが、Ｓｉｘ１である、請求項４７に記載の複数のインビトロ成長細胞。
【請求項４９】
前記骨格筋肉にコミットした前駆細胞が、ＭＳＧＮ１及びＳｉｘ１の前記発現を特徴とする、請求項４７又は４８に記載の複数のインビトロ成長細胞。
【請求項５０】
前記複数の細胞が、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの追加の系列にコミットした細胞を更に含む、請求項４７～４９のいずれか一項に記載の複数のインビトロ成長細胞。
【請求項５１】
前記複数の細胞が、少なくとも１つのＧＳＫ３β阻害フラボノイド及び／又はその代謝産物を含む、請求項４７～５０のいずれか一項に記載の複数のインビトロ成長細胞。
【請求項５２】
骨格筋肉細胞を含む複数のインビトロ成長分化細胞であって、前記骨格筋肉細胞が、少なくとも１つの筋原性マーカーの発現を特徴とする、複数のインビトロ成長分化細胞。
【請求項５３】
前記少なくとも１つの筋原性マーカーが、Ｍｙｆ５、Ｐａｘ７、ＭＥＦ２Ｃ、ＳＩＸ１、ＮＹＯＤ１、ＭＹＯＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＮＹＨ８、ＭＢ、ＭＹＭＫ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項５２に記載の複数のインビトロ成長分化細胞。
【請求項５４】
前記複数の細胞が、間質細胞、脂肪細胞、又はそれらの組み合わせのうちの少なくとも１つを更に含む、請求項５２又は５３に記載の複数のインビトロ成長分化細胞。
【請求項５５】
前記間質細胞が、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞である、請求項５４に記載の複数のインビトロ成長分化細胞。
【請求項５６】
前記細胞が、非ヒト動物細胞である、請求項５２～５５のいずれか一項に記載の複数の

インビトロ成長分化細胞。
【請求項５７】
請求項５２～５６のいずれか一項に記載の複数のインビトロ成長分化細胞を含む、操作された組織。
【請求項５８】
請求項５６に記載の複数のインビトロ成長分化細胞及び／又はそれを含む操作された組織を含む、培養食品。
【請求項５９】
前記培養食品が、培養肉である、請求項５８に記載の培養食品。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、骨格筋肉細胞を含む生物工学的に作られた組織の産生の分野に関し、具体的には、多能性幹細胞からの複数の骨格筋肉にコミットした前駆細胞及びそれから分化した骨格筋肉細胞を産生するための組成物及び方法に関する。本発明は、骨格筋肉にコミットした前駆細胞の塊及び／又は骨格筋肉細胞の塊、それらを含む操作された組織、並びにその使用を更に提供する。
【背景技術】
【０００２】
動物肉は、タンパク質の良好な栄養源であり、人体の成長及び維持に必要とされる適切な割合で全ての必須アミノ酸を含有する。しかしながら、食物のために家畜を成長させる現代の慣行は、空気及び水質に対して有害な影響を有し、大きい土地面積及びエネルギー投資を必要とする。それはまた、典型的には家畜が混雑した生息地で育てられ、時には家畜対象が苦しめられる不適当な状態で育てられるので、道徳的問題を提起する。この理由から、細胞培養肉製品は、人道上の理由で肉を控える人々によって消費される可能性もあり得る。
【０００３】
とりわけ、培養肉製品を製造する際の課題は、同等の　殺肉製品のテクスチャ及び口当たりを再現できないテクスチャ及び口当たりである。培養細胞のみを含有する培養肉は、典型的にはひき肉の形態にあり、これは消費者に提供され得る食品の種類を著しく制限する。培養細胞及び植物ベースのタンパク質を含有するハイブリッド製品は、１つの潜在的な解決策を形成するが、主に筋肉から構成される　殺肉を模倣する細胞ベースの部分を得るための必要性が依然として存在する。
【０００４】
インビトロでの筋肉の分化の試みは、主に基礎科学研究及び治療薬の開発の領域で行われてきた。骨格筋肉系統は、胚性沿軸中胚葉（paraxial mesoderm、ＰＭ）に由来し、これはまた、軸骨格、真皮、褐色脂肪、髄膜、及び内皮細胞を発生させる。マウス及びヒト多能性幹細胞（胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞）からの筋形成をインビトロで再現する実験戦略が最近報告されており、全てが、胚盤葉上層期におけるＷｎｔシグナル伝達物質（ＣＨＩＲなど）の早期活性化に依存している。これにより、神経中胚葉前駆物体（neuro－mesodermal progenitor、ＮＭＰ）が誘導され、続いてＰＭ運命及び骨格筋肉に誘導することができる。これらのプロトコルは、胎児筋線維及び未成熟衛星細胞を効率的に産生することができる。最近まで、適度に成熟した筋肉細胞の分化を可能にする唯一の効率的なプロトコルは、誘導された前駆物体の細胞分離が続くＭｙｏＤ又はＰａｘ３／７などの転写因子の過剰発現に依存していた（Ｐｏｕｒｑｕｉｅ　Ｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８．Ｃｕｒｒ　Ｔｏｐ　Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ．１２９：１２３－１４２．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｂｓ．ｃｔｄｂ．２０１８．０３．００３）。
【０００５】
以前の研究は、アクチビン／Ｎｏｄａｌ／ＴＧＦβ、ＢＭＰ、ＦＧＦ、及びＷＮＴが、多能性幹細胞から中胚葉を広く誘導することを示した（Ｋｙｌｅ　Ｍ　Ｌ　ｅｔ　ａｌ．

，２０１６．Ｃｅｌｌ　１６６（２）：４５１－４６７）。ＦＧＦ及びアクチビンは、心臓分化に必須であることが示された（Ｓｈｅｎ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０２１．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１２８：６７０－６８６；Ｓａｓａｎｏ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，１２９（６）：７４９－７５５）が、アクチビンＡは、筋肉量の負の調節因子として示された（Ｌａｔｒｅｓ　Ｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　８：１５１５３，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１５１５３）。標的化（阻害）アクチビンＡシグナル伝達経路は、微小重力における筋肉損失及び骨損失の両方に対する保護において著しく有益な効果を有することが示され、この戦略が筋肉損失及び骨損失の予防又は治療において有効であり得ることを示唆している（Ｌｅｅ　Ｓｅ－Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０．ＰＮＡＳ　１１７（３８）：２３９４２－２３９５１，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０７３／ｐｎａｓ．２０１４７１６１１７）。既知の体中胚葉様細胞誘導因子であるＴＧＦβ阻害剤ＳＢ４３１５４２は、ＰＡＸ７誘導性筋原性分化に関連して筋管生成を増強することが示された（Ｓｅｌｖａｒａｊ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９．ｅＬｉｆｅ　８：ｅ４７９７０，ＤＯＩ：１０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．４７９７０）。

【０００６】

米国特許出願公開第２０１２／０１６４７３１号には、多能性幹細胞、特に人工多能性細胞を使用して骨格筋前駆細胞を産生する方法であって、多能性幹細胞をアクチビンＡの存在下で培養することにより、ＰＤＧＦＲα陽性中胚葉細胞を得た後、得られた中胚葉細胞を無血清条件下、Ｗｎｔシグナル誘導剤の存在下で培養して、細胞を骨格筋前駆細胞に分化させることを含む、方法が開示されている。また、方法により得られた骨格筋前駆細胞を含有する細胞集団、並びに骨格筋再生促進剤、及び筋ジストロフィーなどの筋疾患の治療剤が開示され、促進剤は、骨格筋前駆細胞を有効成分として含む。

【０００７】

米国特許出願公開第２０１９／００１０４６０号には、一般に、指向性組織形成によって中胚葉分化、心臓分化、及び心臓成熟を誘導するステップを含む、多能性幹細胞から生物工学的に作られた心筋（bioengineered heart muscle、ＢＨＭ）を産生するための方法が開示されている。

【０００８】

多能性細胞から筋肉細胞を分化させるための現在の方法のほとんどは、高価な成長因子及び培地を含む多数の成分の使用を必要とし、長い培養期間を更に必要とする。

【０００９】

培養肉製品を含む細胞培養製品の産業において使用され得る筋肉細胞を得るための単純かつ経済的な組成物及び方法に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【００１０】

本発明は、操作された組織又は培養された肉製品の一部を形成し得る骨格筋肉細胞の塊に対する上記の必要性に応え、筋肉細胞に更に容易に分化し得る骨格筋肉にコミットした前駆細胞の塊を産生するための組成物及び方法を提供する。

【００１１】

本発明は、ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の活性化因子、特にアクチビンＡと、グリコーゲンシンターゼキナーゼ－３（Ｇｌｙｃｏｇｅｎ　ｓｙｎｔｈａｓｅ　ｋｉｎａｓｅ－３、ＧＳＫ３）シグナル伝達経路の阻害剤、特にＣＨＩＲ－９９０２１との組み合わせを含む培地中で培養された多能性幹細胞（pluripotent stem cell、ＰＳＣ）が、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生するという予想外の発見に部分的に基づく。次いで、当該筋肉にコミットした前駆細胞は、筋肉細胞に分化する。有利なことに、複数の細胞は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞及び脂肪細胞に容易に分化することもできる追加の系統にコミットした細胞を更に含む。

【００１２】

更に、本発明の教示は、系統にコミットした分化プロセスが、栄養素、並びに少なくとも１つのＴＧＦ－β活性化因子と少なくとも１つのＧＳＫ３阻害剤との組み合わせを補充した培地のみを必要とするという点で、ＰＳＣから骨格筋肉にコミットした前駆細胞を産生するための以前から既知の方法よりも有利である。また、本発明の方法は、ＰＳＣからの筋肉細胞の産生を数日の時間枠に短縮することを可能にし、骨格筋肉細胞を含む生物工学的に作られた組織を産生する全プロセスを約２～約４週間で完了することを可能にする。更に、本方法は、数十リットルの容積の反応器に容易に拡張可能であり、このことは、食品産業における従来のプロセスのコストに匹敵するコストで食品産業におけるその使用を可能にする。

【００１３】

ある特定の態様によれば、本発明は、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生する方法を提供し、この方法は、（ｉ）ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、（ｉｉ）ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培養培地中で複数の多能性幹細胞（ＰＳＣ）を培養し、それによって、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生することを含む。

【００１４】

ある特定の実施形態によれば、培地は、無血清培地である。

【００１５】

ある特定の実施形態によれば、培養することは、三次元（ｔｈｒｅｅ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ、３Ｄ）培養条件下で行われる。ある特定の例示的な実施形態によれば、３Ｄ培養は、懸濁培養である。ある特定の実施形態によれば、懸濁培養は、接着性材料及び／又は支持マトリックスを欠いている。これらの実施形態によれば、細胞は、自己集合し、少なくとも１つの細胞凝集体を形成する。ある特定の実施形態によれば、細胞凝集体は、クラスタ、スフェロイド、オルガノイドなどからなる群から選択される形態である。

【００１６】

更に追加又は代替の実施形態によれば、懸濁培養は、少なくとも１つの接着性材料及び／又は支持マトリックスを含む。ある特定の例示的な実施形態によれば、３Ｄ培養することは、容器内で行われる。

【００１７】

ある特定の代替の実施形態によれば、培養することは、二次元（ｔｗｏ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ、２Ｄ）培養条件下で行われる。いくつかの実施形態によれば、２Ｄ培養は、少なくとも１つの接着性材料及び／又は支持マトリックスを含む。

【００１８】

細胞培養、特にＰＳＣ及びそれから分化した細胞の培養を可能にし、支持する当技術分野で既知の又は既知となる任意の接着性材料又は支持マトリックスを、本発明の教示に従って使用することができる。ある特定の実施形態によれば、支持マトリックスは、半固体マトリックスである。いくつかの実施形態によれば、支持マトリックスは、固体である。

【００１９】

ある特定の実施形態によれば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子は、アクチビンＡ、ＴＧＦ－β、ＢＭＰ２、ＢＭＰ７、ＧＤＦ９、ＮＯＤＡＬ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００２０】

ある特定の実施形態によれば、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤は、ＣＨＩＲ－９９０２１（Ｃ２２Ｈ１８Ｃｌ２Ｎ８）又はその塩、ＳＢ　２１６７６３、ＬＹ２０９０３１４、ＴＷＳ１１９、チデグルシブ（Ｔｉｄｅｇｌｕｓｉｂ）、ＧＳＫ－３β阻害剤１、ＧＳＫ－３β阻害剤２、ＧＳＫ－３β阻害剤３、ＡＲ－Ａ０１４４１８、ＴＤＺＤ－８、ケンパウロン、ＧＳＫ３阻害剤ＩＸ、クロモリンナトリウム、ＣＨＩＲ－９８０１４、ＡＺＤ１０８０、ＳＢ　４１５２８６、ＩＭ－１２、９－ＩＮＧ－４１、インジルビン－３’

－モノオキシム、１－アザケンパウロン、ＢＲＤ０７０５、ＡＺＤ２８５８、ＣＰ２１Ｒ７、ＢＩＯ－アセトキシム、ビキニン、ＶＰ３．１５、ＶＰ３．１５ジヒドロブロミド、ＧＮＦ４８７７、ＫＹ１９３８２、ＳＡＲ５０２２５０、Ａ　１０７０７２２、（Ｒ）－ＢＲＤ３７３１、ＢＲＤ３７３１、ＢＩＰ－１３５、５－ヨード－インジルビン－３’－モノオキシム、ＢＲＤ５６４８、ＧＳＫ３阻害剤１、ＧＳＫ３／ＣＤＫ５／ＣＤＫ２－ＩＮ－１、インジルビン－３’－モノオキシム－５－スルホン酸、ＧＳＫ３β阻害フラボノイド、リチウム、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００２１】

ある特定の実施形態によれば、ＣＨＩＲ－９９０２１塩は、ＣＨＩＲ－９９０２１一塩酸塩及びＣＨＩＲ－９９０２１三塩酸塩からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００２２】

ある特定の実施形態によれば、ＧＳＫ３β阻害フラボノイドは、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ミリセチン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００２３】

ある特定の実施形態によれば、培地は、ＴＧＦ－β経路を活性化する成長因子以外の成長因子を欠いている。いくつかの実施形態によれば、培地は、ｂＦＧＦを欠いている。

【００２４】

ある特定の例示的な実施形態によれば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤と、を含む組み合わせは、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１を含む。ある特定の実施形態によれば、組み合わせは、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１からなる。

【００２５】

ある特定の実施形態によれば、播種時に、培地は、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Ｒｈｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ、Ｒｏｃｋ）の阻害剤を更に含む。

【００２６】

ある特定の実施形態によれば、培養することは、複数の細胞の総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞に達することを可能にする期間にわたって行われる。

【００２７】

ある特定の実施形態によれば、複数のＰＳＣを培養することは、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培地中で連続的に行われる。

【００２８】

ある特定の追加又は代替の実施形態によれば、複数のＰＳＣを培養することは、サイクルで行われ、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培地は、各サイクル後に交換される。各サイクルにおけるＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせは、同じであっても異なっていてもよい。

【００２９】

ある特定の実施形態によれば、産生された複数の細胞は、少なくとも１つの追加の系列にコミットした前駆細胞を更に含む。ある特定の実施形態によれば、少なくとも１つの追加の系統にコミットした前駆細胞は、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせから選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００３０】

ある特定の実施形態によれば、複数のＰＳＣは、非ヒト動物及びヒトからなる群から選

択される起源のものである。ある特定の実施形態によれば、非ヒト動物は、有蹄動物、家禽、水生動物、無脊椎動物、及び爬虫類からなる群から選択される。ある特定の実施形態によれば、有蹄動物は、ウシ亜科動物（bovine）、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、ウマ科動物（equine）、ブタ、キリン、ラクダ、シカ、カバ、又はサイからなる群から選択される。ある特定の例示的な実施形態によれば、有蹄動物はウシ亜科動物である。

【００３１】

ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、人工ＰＳＣ（induced PSC、ｉＰＳＣ）、胚性幹細胞（embryonic stem cell、ＥＳＣ）、及び非胚性幹細胞からなる群から選択される。

【００３２】

ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、遺伝子組換えされていない。ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、遺伝子組換えされている。

【００３３】

別の態様によれば、本発明は、複数の骨格筋肉細胞を産生する方法が提供され、この方法は、

－本明細書において上述される本発明の方法によって産生された骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を接着性材料及び／又は支持マトリックス上に沈着させることと、

－骨格筋肉にコミットした前駆細胞の骨格筋肉細胞への分化を促進する、分化培地中で複数の細胞を培養し、

それによって、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生することと、を含む。

【００３４】

本発明の方法では、様々な分化培地型を使用することができる。それにもかかわらず、本発明は、栄養素及び任意選択で、ある特定のホルモンを補充した無血清培地が、本発明の方法によって産生された筋肉にコミットした前駆細胞の骨格筋肉細胞への分化を得るのに十分であることをここで実証する。ある特定の実施形態によれば、分化培地は、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤を欠いている。ある特定の例示的な実施形態によれば、培地は、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１を欠いている。

【００３５】

ある特定の実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約３日～約３０日の期間培養される。ある特定の実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約３日～約１０日の期間培養される。ある特定の実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約５日～約８日の期間培養される。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を得るための全期間は、約６日～約３０日である。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を得るための全期間は、約６日～約１２日である。

【００３６】

ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉細胞は、生存可能である。

【００３７】

本発明は、本発明の方法によって産生された骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を更に提供する。ある特定の実施形態によれば、複数の骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、ＰＳＣを本質的に欠いている。本明細書で使用される場合、ＰＳＣに関して「本質的に欠く」という用語は、当技術分野で現在知られている標準的な方法によって検出できないいくつかのＰＳＣを指す。

【００３８】

ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、非ヒト動物ＰＳＣから産生される。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、ウシ亜科動物ＰＳＣから産生される。

【００３９】
本発明は、本明細書に記載の本発明の方法によって産生された分化した骨格筋肉細胞を含む操作された組織を更に包含する。ある特定の実施形態によれば、分化した筋肉骨格細胞は、非ヒト動物ＰＳＣから産生される。ある特定の実施形態によれば、分化した筋肉細胞は、ウシ亜科動物ＰＳＣから産生される。
【００４０】
ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうち約１０％～約９０％の分化した骨格筋肉細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、分化した間質細胞、分化した脂肪細胞、及びそれらの組み合わせのうちの少なくとも１つを更に含む。ある特定の実施形態によれば、分化した間質細胞は、細胞の総数のうちの約１０％～約９０％を構成する。ある特定の実施形態によれば、分化した脂肪細胞は、細胞の総数のうちの約１０％～約９０％を構成する。ある特定の実施形態によれば、間質細胞は、ＥＣＭ産生細胞である。ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、心筋肉細胞を欠いている。本発明の骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞及び／又は操作された組織は、主に、骨格筋肉細胞が分化するＰＳＣの供給源及び型に応じて、様々な用途において使用することができる。
【００４１】
ある特定の例示的な実施形態によれば、本発明の骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞及び／又は操作された組織は、培養食品、特に培養肉の生産のために使用される。
【００４２】
なお更なるある特定の態様によれば、本発明は、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数のインビトロ成長細胞を提供し、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、少なくとも１つの中胚葉マーカー及び／又は少なくとも１つの初期筋原性マーカーの発現を特徴とする。
【００４３】
ある特定の実施形態によれば、少なくとも１つの中胚葉マーカーは、ＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、Ｐａｘ３、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、少なくとも１つの初期筋原性マーカーは、Ｓｉｘ１である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【００４４】
ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、ＭＳＧＮ１及びＳｉｘ１の発現を特徴とする。
【００４５】
ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長細胞は、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの追加の系列にコミットした細胞を更に含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【００４６】
ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長細胞は、少なくとも１つのＧＳＫ３β阻害フラボノイド及び／又はその代謝産物を含む。
【００４７】
追加のある特定の態様によれば、本発明は、分化した骨格筋肉細胞を含む複数のインビトロ成長細胞を提供し、骨格筋肉細胞は、少なくとも１つの筋原性マーカーの発現を特徴とする。
【００４８】
ある特定の実施形態によれば、少なくとも１つの筋原性マーカー、Ｍｙｆ５、Ｐａｘ７、ＭＥＦ２Ｃ、ＳＩＸ１、ＮＹＯＤ１、ＭＹＯＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＮＹＨ８、ＭＢ、ＭＹＭＫ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【００４９】

ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長細胞は、間質細胞、脂肪細胞、又はそれらの組み合わせのうちの少なくとも１つを更に含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００５０】

ある特定の実施形態によれば、間質細胞は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞である。

【００５１】

ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長細胞内の細胞は、非ヒト動物細胞である。

【００５２】

本発明は更に、骨格筋肉細胞を含む複数のインビトロ成長細胞を含む操作された組織を包含する。

【００５３】

ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉細胞を含むインビトロ成長させた分化細胞は、非ヒト動物細胞である。これらの実施形態によれば、複数の細胞、又はそれを含む操作された組織は、培養食品、特に培養肉製品を形成する。

【００５４】

本明細書に開示される態様及び実施形態の各々の任意の組み合わせは、本発明の開示内に明示的に包含されることを理解されたい。

【００５５】

本発明の更なる実施形態及び適用可能性の全範囲は、以下に与えられる詳細な記述から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨及び範囲内での様々な変更及び修正は、この詳細な記述から当業者に明らかになることになるため、詳細な記述及び具体的な実施例は、本発明の例示的な実施形態を示しているが、単に例示として与えられているにすぎないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【００５６】

【図１】アクチビンＡとＣＨＩＲ－９９０２１との組み合わせを懸濁状態で含む無血清成長培地中での４日間のインキュベーション後にウシ亜科動物多能性幹細胞から得られた骨格筋肉コミット前駆細胞の代表的な明視野画像を示す。倍率×４。

【図２】アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地中でインキュベートされたウシ亜科動物（bovine）ＰＳＣから開始して４日後の分化のマーカーの代表的なＲＴ－ＰＣＲ分析を示す。

【図３Ａ】ウシ亜科動物ＰＳＣから開始して合計１１日間の分化後のミオシン重鎖の代表的な免疫蛍光染色（ＭＦ－２０抗体を使用する）を示す。ウシ亜科動物ＰＳＣを、最初の４日間、３Ｄ懸濁液（図３Ａ～図３Ｃ）又は支持体上の２Ｄ培養（図３Ｄ）中で、ＣＨＩＲ－９９０２１のみを含む無血清成長培地（図３Ａ）において、アクチビンＡと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｂ及び図３Ｄ）において、又はＴＧＦβと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｃ）において培養した。４日後、細胞／細胞凝集体を２Ｄ支持体上に沈着させ、アクチビンＡ、ＣＨＩＲ－９９０２１、及びＴＧＦβを欠く無血清培地において更に７日間培養した。灰色－ＤＡＰＩ／核、白－ＭｙｈＣ陽性細胞。倍率×１０。

【図３Ｂ】ウシ亜科動物ＰＳＣから開始して合計１１日間の分化後のミオシン重鎖の代表的な免疫蛍光染色（ＭＦ－２０抗体を使用する）を示す。ウシ亜科動物ＰＳＣを、最初の４日間、３Ｄ懸濁液（図３Ａ～図３Ｃ）又は支持体上の２Ｄ培養（図３Ｄ）中で、ＣＨＩＲ－９９０２１のみを含む無血清成長培地（図３Ａ）において、アクチビンＡと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｂ及び図３Ｄ）において、又はＴＧＦβと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｃ）において培養した。４日後、細胞／細胞凝集体を２Ｄ支持体上に沈着させ、アクチビンＡ、ＣＨＩＲ－９９０２１、及びＴＧＦβを欠く無血清培地において更に７日間培養した。灰色－ＤＡ

ＰＩ／核、白－ＭｙｈＣ陽性細胞。倍率×１０。
【図３Ｃ】ウシ亜科動物ＰＳＣから開始して合計１１日間の分化後のミオシン重鎖の代表的な免疫蛍光染色（ＭＦ－２０抗体を使用する）を示す。ウシ亜科動物ＰＳＣを、最初の４日間、３Ｄ懸濁液（図３Ａ～図３Ｃ）又は支持体上の２Ｄ培養（図３Ｄ）中で、ＣＨＩＲ－９９０２１のみを含む無血清成長培地（図３Ａ）において、アクチビンＡと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｂ及び図３Ｄ）において、又はＴＧＦβと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｃ）において培養した。４日後、細胞／細胞凝集体を２Ｄ支持体上に沈着させ、アクチビンＡ、ＣＨＩＲ－９９０２１、及びＴＧＦβを欠く無血清培地において更に７日間培養した。灰色－ＤＡＰＩ／核、白－ＭｙｈＣ陽性細胞。倍率×１０。
【図３Ｄ】ウシ亜科動物ＰＳＣから開始して合計１１日間の分化後のミオシン重鎖の代表的な免疫蛍光染色（ＭＦ－２０抗体を使用する）を示す。ウシ亜科動物ＰＳＣを、最初の４日間、３Ｄ懸濁液（図３Ａ～図３Ｃ）又は支持体上の２Ｄ培養（図３Ｄ）中で、ＣＨＩＲ－９９０２１のみを含む無血清成長培地（図３Ａ）において、アクチビンＡと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｂ及び図３Ｄ）において、又はＴＧＦβと組み合わせてＣＨＩＲ－９９０２１を含む無血清成長培地（図３Ｃ）において培養した。４日後、細胞／細胞凝集体を２Ｄ支持体上に沈着させ、アクチビンＡ、ＣＨＩＲ－９９０２１、及びＴＧＦβを欠く無血清培地において更に７日間培養した。灰色－ＤＡＰＩ／核、白－ＭｙｈＣ陽性細胞。倍率×１０。
【図４】コミットメント段階中、すなわち最初の４日間、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ－９９０２１のみを含む無血清成長培地中でインキュベートされたウシ亜科動物多能性幹細胞から開始して合計１１日間の分化後の筋原性マーカーＭｙｆ５、Ｐａｘ７、Ｍｅｆ２Ｃ、Ｓｉｘ１、ＭｙｏＤ１、ＭｙｏＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＭＹＨ８、ミオグロビン（Ｍｙｏｇｌｏｂｉｎ、ＭＢ）、及びミオマーカー（Ｍｙｏｍａｋｅｒ、ＭＹＭＫ）の代表的なＲＴ－ＰＣＲ分析を示す。
【発明を実施するための形態】
【００５７】
本発明は、大規模で費用効率の高い産生に好適である、多能性幹細胞（ＰＳＣ）から骨格筋肉細胞を産生するための方法を提供する。本発明は、これまで筋肉量の負の調節因子として知られているＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子であるアクチビンＡと、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤であるＣＨＩＲ　９９０２１との組み合わせの存在下でＰＳＣを培養することにより、著しい数のＰＳＣが中胚葉系列細胞に変換され、これが次に骨格筋肉細胞に分化することができるという予想外の発見に部分的に基づく。更に、複数の骨格筋肉細胞及び／又はそれを含む操作された組織の塊を産生するプロセスを通して必要とされる培養培地は、産生するのが簡単であり、最小数の成長因子及び小分子を含み、全成長サイクルが、これまでに知られているプロトコルと比較して短く、製品が食品産業で使用される場合であっても、経済的なコストで大規模生産を可能にする。
【００５８】
本発明は、複数の細胞又はそれを含む操作された組織の形態で治療用途に使用することができる、本発明の方法によって産生された骨格筋肉細胞を更に提供する。ある特定の実施形態では、本発明の骨格筋肉細胞及びそれを含む操作された組織は、食品産業用に、特に培養肉の生産用に調整される。
【００５９】
定義
本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他の意味を指示しない限り、複数形の言及を含む。例えば、用語「化合物」又は「少なくとも１つの化合物」は、それらの混合物を含む複数の化合物を含み得る。
【００６０】
「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語及びそれらの活用形は、「含む（

including）がこれらに限定されない」ことを意味する。

【００６１】

本出願を通して、本発明の様々な実施形態は、範囲形式で提示され得る。範囲形式での説明は、単に便宜及び簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、ある範囲の説明は、全ての可能な部分範囲及びその範囲内の個々の数値を具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、１～６などの範囲の説明は、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などの具体的に開示された部分範囲、並びにその範囲内の個々の数字、例えば、１、２、３、４、５、及び６を有するとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【００６２】

本明細書で数値範囲が示される場合は常に、示された範囲内の任意の引用された数字（分数又は整数）を含むことを意図している。第１の表示数～第２の表示数の「範囲である（ranging／ranges）」及び第１の表示数「から」第２の表示数「までの範囲である（ranging／ranges）」という語句は、本明細書では互換的に使用され、第１及び第２の表示数、並びにそれらの間の全ての分数及び整数の数字を含むように意図されている。

【００６３】

本明細書で使用される「約」という用語は、数値指定の＋１０％又は－１０％の数値指定の変動を指す。更に、本明細書における全ての数値範囲は、その範囲内の各整数全体を含むと理解されるべきである。

【００６４】

本明細書で使用される場合、「複数」という用語は、特にＰＳＣに関して、「少なくとも２個」、特に少なくとも２個の細胞、少なくとも５個の細胞、少なくとも１０個の細胞、又は少なくとも１００個、又は少なくとも、又は少なくとも１，０００個、又は少なくとも１０，０００個の細胞を指す。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞（ＰＳＣ）」という用語は、無制限に増殖することができ、体内に全ての他の細胞型を生じさせることができる細胞を指す。この用語は、ナイーブ型及びプライム型多能性幹細胞の両方を明示的に含む。

【００６６】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）」という用語は、体細胞から直接生成され得る型の多能性幹細胞を指す。

【００６７】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞（ＥＳＣ）」という用語は、多能性幹細胞由来胚盤胞の型を指す。

【００６８】

本明細書で使用される場合、「操作された組織」という用語は、本明細書で使用される場合、複数の細胞の厚さであり、少なくとも１つの層を形成する、Ｘ及びＹ平面における細胞の会合を指す。いくつかの実施形態では、操作された組織は、１つの層を含む。他の実施形態では、操作された組織は、複数の層を含む。いくつかの実施形態では、層は、細胞の連続的な、実質的に連続的な、又は非連続的な細胞層を形成する。いくつかの態様では、操作された組織又はその層は、Ｘ、Ｙ、及びＺ軸に複数の細胞を含む。本発明の教示による操作された組織は、細胞接着性材料及び／又は支持マトリックスを含んでもよく、又は含まなくてもよい。いくつかの実施形態によれば、細胞接着性材料及び／若しくは支持マトリックスは、ナノキャリア、マイクロキャリア、マクロキャリア、又はそれらの組み合わせを形成する。いくつかの実施形態によれば、細胞接着性材料及び／又は支持マトリックスは、足場を形成する。

【００６９】

「培養肉」という用語は、本明細書では、　　殺された動物の肉と区別される、インビトロでの非ヒト動物細胞培養から成長させた肉を説明するために使用される。インビトロで

の非ヒト動物細胞培養から成長させた肉を説明するために当技術分野で使用することができる追加の用語には、細胞培養肉、養殖された肉、クリーンミート、実験室で成長させた肉、試験管肉、インビトロ肉、チューブステーキ（tube steak）、合成肉、組織操作された肉、操作された肉、人工肉、及び人造肉が含まれる。

【００７０】

ある特定の態様によれば、本発明は、筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を産生する方法であって、複数の多能性幹細胞（ＰＳＣ）を、（ｉ）ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、（ｉｉ）ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培養培地中で培養し、それによって、複数の筋肉にコミットした前駆細胞を産生することと、を含む、方法を提供する。

【００７１】

ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤の両方が、骨格筋肉にコミットした前駆細胞が形成されるまでの全インキュベーション時間の間、培養培地内に存在することが明確に理解されるべきである。

【００７２】

ＴＧＦ－βシグナル伝達は、細胞成長、細胞運命、及びアポトーシスを含む多くの細胞機能に関与している。シグナル伝達は、典型的には、Ｉ型受容体を動員し、リン酸化するＩＩ型受容体へのＴＧＦ－βスーパーファミリーリガンドの結合から始まる。次いで、Ｉ型受容体は、核内で転写因子として作用し、標的遺伝子発現を調節する、転写因子のＳＭＡＤファミリーをリン酸化する。ＴＧＦ－βスーパーファミリーリガンドは、骨形成タンパク質（Bone Morphogenic Protein、ＢＭＰ）、成長及び分化因子（Growth and Differentiation Factor、ＧＤＦ）、抗ミュラー管ホルモン（anti－Mullerian hormone、ＡＭＨ）、アクチビン、ノーダル、及びＴＧＦ－βを含む。一般に、Ｓｍａｄ２及びＳｍａｄ３は、ＴＧＦ－β／アクチビン経路中のＡＬＫ４、５、及び７受容体によってリン酸化される。対照的に、Ｓｍａｄ１、Ｓｍａｄ５、及びＳｍａｄ８は、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）経路の一部としてリン酸化される。経路間にいくらかのクロスオーバーが存在するが、本発明の文脈において、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子は、好ましくは、Ｓｍａｄ２及びＳｍａｄ３を介して作用するＴＧＦ－β経路の活性化因子である。

【００７３】

ある特定の実施形態によれば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子は、アクチビンＡ、ＴＧＦ－β、ＢＭＰ２、ＢＭＰ７、ＧＤＦ９、ＮＯＤＡＬ、及びそれらの任意の組み合わせからなるが、これらに限定されない群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。本発明の方法に好適なＴＧＦ－βシグナル伝達経路の任意の他の活性化因子も適用することができる。

【００７４】

ある特定の例示的な実施形態によれば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子は、アクチビンＡである。

【００７５】

グリコーゲン合成酵素キナーゼ３（ＧＳＫ３）は、酵母から哺乳動物まで高度に保存されている。哺乳動物は、２つのＧＳＫ３アイソフォーム、α（５１ｋＤａ）及びβ（４７ｋＤａ）を発現し、これらは、別個の遺伝子によってコードされ、それらの触媒ドメイン内で９７％のアミノ酸配列同一性を共有する。しかしながら、それらの配列は、キナーゼドメイン２の外側で著しく異なる。両方のＧＳＫ３アイソフォームは、遍在的に発現されるようであり、それらは、Ｗｎｔ－β－カテニンシグナル伝達を含むいくつかのシグナル伝達経路において機能的に重複しているようであるが、それらは、他のシグナル伝達経路において異なる機能を果たす。多くの研究が、ＧＳＫ３調節不全、特に過剰活性化と、真性糖尿病、肥満、炎症、神経障害、及び腫瘍形成を含む様々な病理学的状態との関連を指摘している。

【００７６】
ある特定の実施形態によれば、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤は、ＣＨＩＲ　９９０２１（Ｃ２２Ｈ１８Ｃｌ２Ｎ８）又はその塩、ＳＢ　２１６７６３、ＬＹ２０９０３１４、ＴＷＳ１１９、チデグルシブ、ＧＳＫ－３β阻害剤１、ＧＳＫ－３β阻害剤２、ＧＳＫ－３β阻害剤３、ＡＲ－Ａ０１４４１８、ＴＤＺＤ－８、ケンパウロン、ＧＳＫ３阻害剤ＩＸ、クロモリンナトリウム、ＣＨＩＲ－９８０１４、ＡＺＤ１０８０、ＳＢ　４１５２８６、ＩＭ－１２、９－ＩＮＧ－４１、インジルビン－３’－モノオキシム、１－アザケンパウロン、ＢＲＤ０７０５、ＡＺＤ２８５８、ＣＰ２１Ｒ７、ＢＩＯ－アセトオキシム、ビキニン、ＶＰ３．１５、ＶＰ３．１５ジヒドロブロミド、ＧＮＦ４８７７、ＫＹ１９３８２、ＳＡＲ５０２２５０、Ａ　１０７０７２２、（Ｒ）－ＢＲＤ３７３１、ＢＲＤ３７３１、ＢＩＰ－１３５、５－ヨード－インジルビン－３’－モノオキシム、ＢＲＤ５６４８、ＧＳＫ－３阻害剤１、ＧＳＫ－３／ＣＤＫ５／ＣＤＫ２－ＩＮ－１、インジルビン－３’－モノオキシム－５－スルホン酸、ＧＳＫ３β阻害フラボノイド、リチウム、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるが、これらに限定されない。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。本発明の方法において好適な任意の他のＧＳＫ３阻害剤もまた、適用することができる。

【００７７】
ある特定の実施形態によれば、ＣＨＩＲ－９９０２１塩は、ＣＨＩＲ－９９０２１一塩酸塩及びＣＨＩＲ－９９０２１三塩酸塩からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００７８】
ある特定の例示的な実施形態によれば、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤は、ＣＨＩＲ－９９０２１（６－［［２－［［４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（５－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）－２－ピリミジニル］アミノ］エチル］アミノ］－３－ピリジンカルボニトリル，$C_{22}H_{18}C_{12}N_8$）である。

【００７９】
フラボノイドは、ＧＳＫ３βに対する阻害活性を有することが見出された（例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ　ＬＪ，ｅｔ　ａｌ．，２０１１．Ｊ　Ｍｅｄ　Ｆｏｏｄ　１４（４）：３２５－３３３、Ｊｕｎｇ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７．Ａｐｐｌ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　６０（３）：２２７－２３２）。ある特定の実施形態によれば、本発明の教示によるＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤は、ＧＳＫ３β阻害フラボノイドである。いくつかの実施形態によれば、フラボノイドは、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ミリセチン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【００８０】
ある特定の例示的な実施形態によれば、複数の骨格筋肉にコミットした前駆細胞を形成するための培養培地は、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子としてのアクチンＡと、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤としてのＣＨＩＲ－９９０２１との組み合わせを含む。

【００８１】
ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤の有効量の濃度が、使用された薬剤の具体的な型に依存するであろうということは、当業者によって理解されるであろう。典型的には、複数の骨格筋肉にコミットした前駆細胞を形成するための培養培地は、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路を活性化する成長因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路を阻害する成長因子以外の成長因子を欠いている。代替の実施形態では、そのような追加の成長因子は、細胞のある特定の成長段階で限定された時間にわたって培地に添加され得る。

【００８２】
ある特定の実施形態によれば、培養培地は、無血清である。本明細書で使用される場合、培地に関する「無血清」という用語は、動物の血清を含まない培地を指す。

【００８３】
ある特定の実施形態によれば、培養培地は、動物由来の成分を含まない。本明細書で使用される場合、培地に関する「動物由来の成分を含まない」という用語は、動物起源の成分を全く含有しない培地、特に哺乳動物由来の成分を含有しない培地を指す。
【００８４】
ある特定の実施形態によれば、培養することは、三次元（３Ｄ）培養条件下で行われる。３Ｄ細胞培養は、人工的に作製された環境であり、そこで生体細胞が増殖又はそれらの周囲の細胞と相互作用することができる。３Ｄ細胞培養は、最も初期のインビボ発生ステップを模倣するインビトロ成長において、自己集合した細胞凝集体又はクラスタの形成を可能にする。ある特定の例示的な実施形態によれば、３Ｄ培養は、典型的には容器内の液体懸濁液中で成長させた細胞を含む。
【００８５】
「容器」又は「組織培養容器」という用語は、本明細書では互換的に使用され、細胞が懸濁液中で成長することができる任意のレセプタクルを指す。レセプタクルは、数ミリリットルの範囲（例えば、非接着性プレート又はＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒフラスコ）から数千リットルの範囲（例えば、バイオリアクタ又は培養袋）までの様々なサイズのものであり得る。
【００８６】
ある特定の実施形態によれば、懸濁培養は、接着性材料及び／又は支持マトリックスを欠いており、細胞及び／又は細胞クラスタは、液体内に自由に懸濁／浮遊している。ある特定の実施形態によれば、懸濁培養は、細胞が接着しない材料の壁を有する容器内に維持される。
【００８７】
細胞が接着性材料／支持マトリックスなしで、懸濁培養中で成長する場合、細胞は、他の細胞と集団化して、細胞の凝集体を形成する傾向がある。細胞凝集体は、クラスタ、スフェロイド、オルガノイドなどの形態にあってもよい。
【００８８】
ある特定の実施形態によれば、培養することは、接着単層を形成する条件下で行われ、本明細書では「二次元（２Ｄ）培養」とも称される。細胞培養に使用されることが知られている任意の接着性基質／支持マトリックスを、本発明の教示に従って使用することができる。例としては、接着性物質（例えば、不活化フィーダ細胞、マトリゲル若しくはビトロネクチンのような有機細胞外マトリックス、又はフィーダ細胞馴化培地）でコーティングされた成長プレート、又はヒドロゲルが挙げられる。
【００８９】
当技術分野で既知であるか又は既知となるであろう任意の供給源に由来する多能性幹細胞を、本発明の教示に従って使用することができる。ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、ヒトに由来する。追加又は代替の実施形態によれば、ＰＳＣは、非ヒト動物に由来する。ある特定の実施形態によれば、非ヒト動物は、有蹄動物、家禽、水生動物、無脊椎動物、及び爬虫類からなる群から選択される。ある特定の実施形態によれば、有蹄動物は、ウシ亜科動物、ヒツジ、ヤギ、ウマ科動物、ブタ、キリン、ラクダ、シカ、カバ、又はサイからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。ある特定の例示的な実施形態によれば、有蹄動物はウシ亜科動物である。
【００９０】
いくつかの実施形態によれば、ＰＳＣは胚性幹細胞（ＥＳＣ）である。
【００９１】
いくつかの実施形態によれば、ＰＳＣは非胚性幹細胞（ＥＳＣ）である。
【００９２】
ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、体細胞から再プログラムされた人工ＰＳＣ（ｉＰＳＣ）である。
【００９３】

ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣは、ＥＳＣを含まない体細胞から再プログラムされた人工ＰＳＣ（ｉＰＳＣ）である。

【００９４】

ｉＰＳＣを産生するための細胞の再プログラミングは、当技術分野で知られている任意の方法によって実施することができ、例えば、Ｂｅｓｓｉ ｅｔ ａｌ．，２０２１．Ｃｅｌｌｓ １０（６）：１５３１、Ｋａｗａｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ １０（８）：ｅ０１３５４０３、Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，２０２１．ＰＮＡＳ１１８（１５）：ｅ２０１８５０５１１８、Ｐｏｌｅｇａｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１５；２６：７５１－７６６）に記載される方法が含まれる。

【００９５】

ある特定の実施形態によれば、ＰＳＣ、特にウシ亜科動物ＰＳＣの単離及び／若しくは培養、並びに／又はｉＰＳＣを産生するための細胞の再プログラミングは、本発明の出願人に対する国際（ＰＣＴ）出願公開第２０２０／２３０１３８号に記載されている方法によって行うことができる。

【００９６】

例えば、胚盤胞由来のＰＳＣを含む、ウシ亜科動物由来のＰＳＣの市販の調製物も利用可能である。

【００９７】

ある特定の実施形態によれば、播種時に、培地は、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Ｒｈｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ、Ｒｏｃｋ）の阻害剤を更に含む。当技術分野で現在知られている、又は将来開発される任意のＲｏｃｋ阻害剤を、本発明の教示に従って使用することができる。ある特定の実施形態によれば、Ｒｏｃｋ阻害剤は、Ｔｈｉａｚｏｖｉｖｉｎ、Ｆａｓｕｄｉｌ、Ｒｉｐａｓｕｄｉｌ、Ｎｅｔａｒｓｕｄｉｌ、ＲＫＩ－１４４７、Ｙ－２７６３２、ＧＳＫ４２９２８６Ａ、Ｙ３０１４１からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。ある特定の例示的な実施形態によれば、Ｒｏｃｋ阻害剤は、Ｙ－２７６３２二塩酸塩（１Ｒ，４ｒ）－４－（（Ｒ）－１－アミノエチル）－Ｎ－（ピリジン－４－イル）シクロヘキサンカルボキサミド）である。

【００９８】

ある特定の実施形態によれば、複数のＰＳＣを培養することは、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培地中で連続的に行われる。

【００９９】

ある特定の追加又は代替の実施形態によれば、複数のＰＳＣを培養することは、サイクルで行われ、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培地は、各サイクル後に交換される。各サイクルにおけるＴＧＦ－βシグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子とＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせは、同じであっても異なっていてもよい。

【０１００】

ある特定の実施形態によれば、培養することは、複数の細胞の総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞に達することを可能する期間にわたって行われる。

【０１０１】

ある特定の実施形態によれば、複数の細胞の総数のうちの約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞に到達することを可能にする期間は、約３日～約７日である。ある特定の実施形態によれば、その期間は、約３日～６日、３日～５日、又は３日～４日である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。ある特定の実施形態によれば、複数の細胞の総数のうちの約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞に到達することを可能にする期間は、４日である。

【０１０２】
特にバイオリアクタにおける培養のこの短い時間枠は、３Ｄ培養を使用する選択肢とともに、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を産生するためのこれまでに知られている方法に対する、本発明の方法の意味のある利点であり、大規模産生設備における本方法の使用、特に、　　殺肉の置き換えを可能にするためにコストを低減しなければならない、培養肉製品を産生するための食品産業におけるそれらの使用を可能にする。
【０１０３】
ある特定の実施形態によれば、本発明は、本明細書において上述されるように産生された骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を提供する。
【０１０４】
ある特定の実施形態によれば、複数の細胞は、細胞の総数のうちの約１０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む。いくつかの実施形態によれば、複数の細胞は、細胞の総数のうちの約１５％～約９０％、約２５％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約４５％～約９０％、又は約５０％～約９０％の骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む。
【０１０５】
また更なるある特定の実施形態によれば、複数の細胞は、少なくとも１つの追加の系統にコミットした前駆細胞を更に含む。ある特定の実施形態によれば、系列にコミットした前駆細胞は、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【０１０６】
ある特定の実施形態によれば、複数の細胞は、細胞の総数のうちの約１０％～約９０％の間質にコミットした前駆細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、複数の細胞は、細胞の総数のうち約１０％～約９０％の脂肪細胞にコミットした前駆細胞を含む。
【０１０７】
ある特定の実施形態によれば、本発明の方法によって産生される筋肉にコミットした前駆細胞は、ＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、Ｐａｘ３、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの中胚葉マーカーを含み、少なくとも１つの初期筋原性マーカーは、Ｓｉｘ１である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、ＭＳＧＮ１及びＳｉｘ１の発現を特徴とする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【０１０８】
ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞は、ＰＳＣを本質的に欠いている。いくつかの実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞は、ＰＳＣを欠いている。
【０１０９】
ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞は、非ヒト動物のものである。これらの実施形態によれば、複数の細胞は、非ヒト動物ＰＳＣから産生される。非ヒト動物は、本明細書上記の通りである。ある特定の例示的な実施形態によれば、非ヒト動物は、ウシ亜科動物である。
【０１１０】
ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞は、少なくとも１つのＧＳＫ３β阻害フラボノイド又はその代謝産物を含む。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞は、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ミリセチン、それらの代謝産物、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのフラボノイドを含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。少なくとも１つのフラボノイド又はその代謝産物の量は、１～数ナノモルから数百マイクロモルまで変化し得る。いくつかの実施形態によれば、少なくとも１つのフラボノイド又はその代謝産物の量は、１ｎＭ～１００μＭ、又は１ｎＭ～１０μ

Ｍ、又は１ｎＭ～１μＭである。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【０１１１】
ある特定の態様によれば、本発明は、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生する方法であって、
ａ）複数の多能性幹細胞（ＰＳＣ）を、（ｉ）ＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の少なくとも１つの活性化因子と、（ｉｉ）ＧＳＫ３シグナル伝達経路の少なくとも１つの阻害剤との組み合わせを含む培養培地中で培養し、それによって、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を形成することと、
ｂ）ステップ（ａ）で得られた骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を接着性材料及び／又は支持マトリックス上に沈着させることと、
ｃ）骨格筋肉にコミットした前駆細胞の骨格筋肉細胞への分化を促進する、分化培地中で複数の細胞を培養し、
それによって、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生することと、を含む、方法を提供する。
【０１１２】
ＰＳＣ、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子、ＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤、及び培養培地、並びにステップ（ａ）及び（ｂ）のプロセスは、本明細書において上述される通りである。
【０１１３】
ある特定の実施形態によれば、複数の培養ＰＳＣは、遺伝子組換えされていない。本発明の方法は、全プロセスを通していかなる遺伝子操作も行わずに、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を産生することを可能にする。これらの実施形態によれば、遺伝子操作されていない骨格筋肉細胞及びそれを含む組織は、製薬産業及び食品産業におけるある特定の用途において利点を有し得る。
【０１１４】
ある特定の代替の実施形態によれば、複数の培養ＰＳＣは、遺伝子組換えされている。遺伝子操作法を用いることは、体細胞からの誘導ＰＳＣ（ｉＰＳＣ）の形成を容易にし、例えば、特に胚性哺乳動物幹細胞を必要とせずに、胚性幹細胞に依存しないという利点を有し得る。
【０１１５】
接着性材料及び／又は支持マトリックス上に骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数の細胞を沈着させるための、当技術分野において既知であるか又は既知となるであろう任意の方法を、本発明の教示により使用することができる。
【０１１６】
ある特定の実施形態によれば、接着性材料は、不活化フィーダ細胞、マトリゲル若しくはビトロネクチンのような有機細胞外マトリックス、又はフィーダ細胞馴化培地からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【０１１７】
ある特定の実施形態によれば、接着性材料又は支持マトリックスは、ナノキャリア、マイクロキャリア、マクロキャリア、足場、組織培養プレート、組織培養容器などからなる群から選択される形態である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。
【０１１８】
ある特定の実施形態によれば、支持マトリックスは、半固体形態及び固体形態から選択される形態である。
【０１１９】
ある特定の実施形態によれば、沈着は、当技術分野で知られている好適なプリンタを使用して、バイオプリンティングによって行われる。いくつかの実施形態によれば、バイオプリンティングは、国際（ＰＣＴ）出願公開第２０２２／１６２６６２号に記載されるように実施される。
【０１２０】

筋肉にコミットした前駆細胞の骨格筋肉細胞への分化を促進するための、当技術分野において既知であるか又は既知となるである任意の分化培地を、本発明の教示に従って使用することができる。有利なことに、本発明は、ここで、例えばビタミン、無機塩、アミノ酸、抗酸化剤、糖などを含む栄養素、及びある特定のホルモン、例えばインスリンを供給された無血清分化培地が、多数の高価な成長因子を必要とせずに分化に十分であることを開示する。

【０１２１】

ある特定の例示的な実施形態によれば、分化培地は、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性化因子及びＧＳＫ３シグナル伝達経路の阻害剤を欠いている。更なる例示的な実施形態によれば、分化培地は、アクチビンＡ及びＣＨＩＲ　９９０２１を欠いている。

【０１２２】

ある特定の実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約３日間～約２７日間培養される。いくつかの実施形態によれば、細胞は、分化培地中で、約３日間～約２６日間、約２５日間、約２４日間、約２３日間、約２２日間、約２２日間、約２０日間、約１９日間、約１８日間、約１７日間、約１６日間、約１５日間、約１４日間、約１３日間、約１２日間、約１１日間、約１０日間、約９日間、約８日間、約７日間、又は約６日間培養される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。いくつかの実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約３日間～約１５日間、又は約５日間～約１０日間、又は約６日間～約９日間培養される。いくつかの実施形態によれば、細胞は、分化培地中で約７日間培養される。

【０１２３】

本発明による骨格筋分化前駆細胞を得るために必要な時間に関しては、前駆細胞を筋肉細胞に分化させる時間もまた、これまでに知られている方法と比較して短縮される。ある特定の実施形態によれば、筋肉細胞を含む操作された組織を得るための全期間は、約６日～約３０日である。ある特定の実施形態によれば、筋肉細胞を含む操作された組織を得るための全期間は、約７日～約２５日、約８日～約２４日、約９日～約２３日、約１０日～約２２日、約１０日～約２１日、約１０日～約２１日、約１０日～約２１日、約１０日～約２０日、約１０日～約１９日、約１０日～約１８日、約１０日～約１７日、約１０日～約１６日、又は約１０日～約１５日である。

【０１２４】

ある特定の実施形態によれば、筋肉細胞を含む操作された組織を得るための全期間は、約１１日～約１４日である。

【０１２５】

約３０日まで、典型的には１１～１４日のこの全期間は、筋肉細胞を含む操作された組織の大規模産生において非常に有利である。

【０１２６】

ある特定の実施形態によれば、接着性材料及び／又は支持マトリックス上に沈着した複数の細胞は、少なくとも１つの追加の系列にコミットした前駆細胞を更に含む。いくつかの実施形態によれば、系列にコミットした前駆細胞は、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせから選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。これらの実施形態によれば、形成された複数の細胞は、間質細胞及び脂肪細胞のうちの少なくとも１つを更に含む。

【０１２７】

いくつかの実施形態によれば、間質細胞は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞である。

【０１２８】

ある特定の実施形態によれば、本発明の方法は、筋肉細胞並びに任意選択で間質細胞及び脂肪細胞のうちの少なくとも１つを含む複数の分化細胞を、接着性材料及び／又は支持マトリックスから分離することを更に含む。

【０１２９】

ある特定の実施形態によれば、本発明は、本発明の方法によって産生される分化した骨

格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を更に提供する。

【０１３０】

ある特定の実施形態によれば、本発明の方法によって産生される分化した骨格筋肉細胞は、Ｍｙｆ５、Ｐａｘ７、ＭＥＦ２Ｃ、ＳＩＸ１、ＮＹＯＤ１、ＭＹＯＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＮＹＨ８、ＭＢ、ＭＹＭＫ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの筋原性マーカーの発現を特徴とする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１３１】

ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうち約１０％～約９０％の骨格筋肉細胞を含む。いくつかの実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうちの約１５％～約９０％、約２５％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約４５％～約９０％、又は約５０％～約９０％の骨格筋肉細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうちの約３０％の骨格筋肉細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉細胞は、生細胞である。

【０１３２】

ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうちの約１０％～約９０％の間質細胞を含む。いくつかの実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうちの約１５％～約９０％、約２５％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約４５％～約９０％、又は約５０％～約９０％の間質細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、間質細胞は、生細胞である。

【０１３３】

ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうち約１０％～約９０％の脂肪細胞を含む。いくつかの実施形態によれば、複数の分化細胞は、細胞の総数のうちの約１５％～約９０％、約２５％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約４５％～約９０％、又は約５０％～約９０％の脂肪細胞を含む。ある特定の実施形態によれば、脂肪細胞は、生細胞である。

【０１３４】

ある特定の実施形態によれば、複数の分化細胞は、本明細書において上述される、検出可能な量の少なくとも１つのＧＳＫ３β阻害フラボノイド又はその代謝産物を含む。

【０１３５】

ある特定の実施形態によれば、筋肉細胞並びに任意選択で間質細胞及び脂肪細胞のうちの少なくとも１つを含む複数の分化細胞は、操作された組織を形成する。ある特定の実施形態によれば、操作された組織は、複数の分化細胞の産生において使用される接着性材料及び／又は支持マトリックスを含む。ある特定の追加又は代替の実施形態によれば、操作された組織は、複数の分化細胞の産生において使用される接着性材料及び／又は支持マトリックスを欠いている。

【０１３６】

なお更なるある特定の態様によれば、本発明は、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数のインビトロ成長細胞を提供し、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、少なくとも１つの中胚葉マーカー及び／又は少なくとも１つの初期筋原性マーカーの発現を特徴とする。

【０１３７】

ある特定の実施形態によれば、少なくとも１つの中胚葉マーカーは、ＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、Ｐａｘ３、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、少なくとも１つの初期筋原性マーカーは、Ｓｉｘ１である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１３８】

ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞は、ＭＳＧＮ１及びＳｉｘ１の発現を特徴とする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１３９】

ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数のインビトロ成長細胞は、間質にコミットした前駆細胞、脂肪細胞にコミットした前駆細胞、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの追加の系列にコミットした細胞を更に含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１４０】

ある特定の実施形態によれば、骨格筋肉にコミットした前駆細胞を含む複数のインビトロ成長細胞は、少なくとも１つのＧＳＫ３β阻害フラボノイド及び／又はその代謝産物を含む。フラボノイド及びマウントは、本明細書において上述される通りである。

【０１４１】

追加のある特定の態様によれば、本発明は、分化した骨格筋肉細胞を含む複数のインビトロ成長分化細胞を提供し、分化した骨格筋肉細胞は、少なくとも１つの筋原性マーカーの発現を特徴とする。

【０１４２】

ある特定の実施形態によれば、少なくとも１つの筋原性マーカー、Ｍｙｆ５、Ｐａｘ７、ＭＥＦ２Ｃ、ＳＩＸ１、ＮＹＯＤ１、ＭＹＯＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＮＹＨ８、ＭＢ、ＭＹＭＫ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１４３】

ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長分化細胞は、間質細胞、脂肪細胞、又はそれらの組み合わせのうちの少なくとも１つを更に含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１４４】

ある特定の実施形態によれば、間質細胞は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）産生細胞である。

【０１４５】

ある特定の実施形態によれば、複数のインビトロ成長分化細胞内の細胞は、非ヒト動物細胞である。

【０１４６】

本発明は、骨格筋肉細胞を含む複数のインビトロ成長分化細胞を含む操作された組織を更に包含する。

【０１４７】

本発明の方法によって産生される筋肉にコミットした前駆細胞、複数の分化細胞、及びそれらを含む操作された組織は、治療用途及び食品としての使用を含む様々な使用に好適である。

【０１４８】

本明細書において上述されるように、使用される培地、骨格筋肉細胞を含む複数の分化細胞を得るために必要とされる時間、及び全体的な有効性は、本発明の方法を、食品産業における使用、特に、細胞培養肉を生産する技術における使用に非常に好適なものにする。したがって、本発明は、具体的には、本発明の骨格筋肉細胞及び／又はそれを含む操作された組織を含む培養肉及び培養肉製品を包含する。

【０１４９】

これらの実施形態によれば、操作された組織又は培養食品は、任意選択で、少なくとも１つの植物性タンパク質を更に含む。ある特定の実施形態によれば、操作された組織及び／又は培養肉は、少なくとも１つの追加の食品に使っても安全なサプリメントを更に含む。好適な追加のサプリメントとしては、飽和及び／又は不飽和脂肪酸、脂質、香味剤、着色剤、テクスチャラント、可食性繊維などが挙げられるが、これらに限定されない。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【０１５０】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を更に詳しく例示するために提示される。しかしながら、それらは決して本発明の広い範囲を限定するものとして解釈されるべき

ではない。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された原理の多くの変形例及び修正を容易に考案することができる。

【実施例】

【０１５１】

材料及び方法

ＲＮＡ抽出及びＲＴ－ＰＣＲ分析：

遺伝子発現分析のために、ＲＮＡを、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ＲＮＡ精製キット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）を使用して、ウシ亜科動物多能性幹細胞、ウシ亜科動物にコミットした細胞、及び骨格筋肉細胞から抽出し、ＲＮＡ濃度をＮａｎｏｄｒｏｐ　Ｏｎｅ　Ｃ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して決定した。精製したＲＮＡを、ＲｅｖｅｒｓｅＡｉｄ　Ｆｉｒｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ合成キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用し、Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ　ＳｉｍｐｌｉＡｍｐデバイス（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して逆転写した。ｃＤＮＡを、ＴａｑＭａｎ　Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、及びＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ　５リアルタイムＰＣＲデバイス（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用する表１に列挙されるプライマのその後のリストを使用して、ＲＴ－ＰＣＲ分析に供した。

【表１】

表１：多能性、コミットメント、及び筋原性マーカー増幅に使用したプライマ及びプローブ

マーカー	プライマ配列／ カタログ番号	配列番号
Oct4	F:CTCCTAAAGCAGAAGAGGATCAC R:TGAGCTGCAAAGCCTCAA プローブ:TTCAGCCAAACGACTATCTGCCGT／ （3IABkFQ）	1 2 3
Nanog	F:GCAGAAATACCTCAGTCTCCAG R:CTATTCCTCGGCCAGTTGTT プローブ:TTCTGGAACCAGGTCTTCACCTGC	4 5 6
TBXT	F:CGTCTCCTTCAGCAAAGTCAA R:GATGTGGATTCGAGGCTCATAC プローブ:TGTAAGGAGTTCAACATGATCTGGCCC	7 8 9
MSGN1	F:CTGCACACCCTCAGGAATTATC R:TCCGTGAGCTCTCCGATATAC プローブ:TTCAGCGTCTGGATCTTGGTGAGC	10 11 12
TBX6	F:GGGAGAATGGCCGAAACT R:GCATCTCCACTCCCATAGC プローブ:TAAGAGGGAGCGAGATGCCCG	13 14 15
Pax3	F:GATCCTTTGCAGGTATCAGGAG R:TCTCGAATTTCCCAGCTGAAC プローブ:AGCAAGCCCAAGCAGGTGACAA	16 17 18
Myf5	F:CTGCACACCCTCAGGAATTATC R:TCCGTGAGCTCTCCGATATAC プローブ:TTCAGCGTCTGGATCTTGGTGAGC	19 20 21
Pax7	F:GGCATGTTTAGCTGGGAGAT R:CTCCTTCTTCCCGAACTTGATT プローブ:ACCGTGCCCTCAGTGAGTTC	22 23 24
Six1	Fプライマ:CCAGGTCAGCAACTGGTTTA Rプライマ:GCTTGTTGGAGGAGGAGTTATT プローブ:AGGCCAAGGAAAGGGAGAACACCG	25 26 27
Mef2C	Fプライマ:GACAAGGTGCTGCTCAAGTA Rプライマ:CTGTGACCTACTGAATCGTCTG プローブ:CGTGGAGACGTTGAGAAAGAAGGGC	28 29 30
MyoD	Fプライマ:CAGCGGCGAACACTACA Rプライマ:CTGTAGTAAGTGCGGTCGTAG プローブ:TTCCGACGGCATGATGGACTACAG	31 32 33
MyoG	Fプライマ:CAGTGAATGCAGCTCCCATA Rプライマ:GATTGTGGGCGTCTGTAGG プローブ:CAACCCAGGGGATCATCTGCT	34 35 36
MyhC3	Bt03258391_m1（ThermoFisher）	
MyhC7	Bt03224257_m1（ThermoFisher）	
MyhC8	Bt04290444_m1（ThermoFisher）	
MRF4／Myf6	Bt03251628_m1（ThermoFisher）	
ミオグロビン	Bt03211694_m1（ThermoFisher）	
MYMK	Bt04314692_m1（ThermoFisher）	

【０１５２】

免疫蛍光

２Ｄ培養におけるウシ亜科動物骨格筋肉細胞を、以下のように免疫蛍光分析に供した：細胞を、４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ；Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ）を使用して透過処理し、５％ＢＳＡ（ＭＰ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）を使用してブロックした。細胞を、一次抗体、抗ミオシンＭＦ－２０（ＤＳＨＢ）１：７５、続いて二次ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｈ＆Ｌ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４）抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ１５０１１６）１：５００とともにインキュベートした。０．５μｇ／ｍｌのＤＡＰＩ（Ｓｉｇｍａ）を使用し

て核を染色した。ＥＶＯＳ　ＦＬ　Ａｕｔｏ　２　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して撮像を行った。

【０１５３】

実施例１：複数の骨格筋コミット細胞の産生

ウシ亜科動物多能性幹細胞（ＰＳＣ）を２Ｄ又は３Ｄ培養中で成長させた。細胞を採取し、解離させ、対照としての無血清成長培地、又はアクチビンＡ（２０ｎｇ／ｍｌ）及びＣＨＩＲ－９９０２１（１０μＭ）を含有する無血清成長培地（骨格筋前駆体培地）に４日間再懸濁した。Ｒｏｃｋ阻害剤（１０μＭ）を、対照及びアッセイ条件の両方の下で、１日目の成長中に添加した。図１は、４日後にウシ亜科動物ＰＳＣから得られた骨格筋肉にコミットした前駆細胞の代表的な明視野画像を示す。

【０１５４】

４日後、細胞を採取し、中胚葉マーカーＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、及びＰａｘ３、並びに初期筋原性マーカーＳｉｘ１の発現を調べるために、本明細書において上述されるようにＲＴ－ＰＣＲ分析を行った。

【０１５５】

図２に示されるように、多能性マーカーＯＣＴ４及びＮａｎｏｇの発現の著しい減少、並びに中胚葉マーカーＴＢＸＴ、ＴＢＸ６、ＭＳＧＮ１、及びＰａｘ３並びに初期筋原性マーカーＳｉｘ１の著しい増加（ＰＳＣと比較して１０倍超）が観察された。完全に分化した筋肉サテライトマーカーＭｙｆ５及びＰａｘ７の上方制御は、この初期の時点では著しくなかった。

【０１５６】

これらの結果は、ＴＧＦ－β活性化因子（アクチビンＡ）とＧＳＫ３阻害剤（ＣＨＩＲ－９９０２１）との組み合わせを補充した基礎無血清培地中でＰＳＣ、特にウシ亜科動物ＰＳＣを培養することが、骨格筋肉細胞への分化プロセスを誘導したことを明確に実証する。約４日間の比較的短時間の後、細胞は、骨格筋肉にコミットした細胞として細胞を識別するレベルで、中胚葉マーカー及び初期筋原性マーカーを発現していた。

【０１５７】

実施例２：ウシ亜科動物多能性幹細胞の骨格筋肉細胞への分化

ウシ亜科動物多能性幹細胞（ＰＳＣ）を２Ｄ及び／又は３Ｄ培養中で成長させた。細胞を解離させ、アクチビンＡ（２０ｎｇ／ｍｌ）及びＣＨＩＲ９９０２１（１０μＭ）を含有する無血清成長培地（骨格筋前駆体培地）中、ＣＨＩＲ９９０２１（１０μＭ）のみを含有する同じ無血清成長培地中、又はＴＧＦβ（２ｎｇ／ｍｌ）及びＣＨＩＲ－９９０２１（１０μＭ）を含有する同じ無血清成長培地中に再懸濁し、懸濁培養条件下で培養した。Ｒｏｃｋ阻害剤（ＲＩ、１０μＭ）を全ての培地型に添加した。

【０１５８】

懸濁培養条件（「３Ｄ培養条件」）は、回転下で、３８．５℃、５％CO_2及び７５％超の湿度下に置かれた超低接着性（ultra－low adherent、ＵＬＡ）６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を含む。骨格筋前駆体培地（ＲＩを含まない）を使用して培地をリフレッシュし、形成された凝集体を合計４日間分化させた。

【０１５９】

骨格筋肉にコミットした細胞を含む凝集体を回収し、無血清成長培地中の組織培養ビトロネクチン（０．００５ｍｇ／ｍｌ）プレコートプレート（「２Ｄ条件」）に播種した。プレートを、３８．５℃、５％CO_2及び７５％超の湿度下で、更に７日間インキュベートし（全プロセス１１日間）、培地を１日目及び３日目に交換した（ＲＩなし）。

【０１６０】

合計１１日間の分化後のミオシン重鎖の代表的な免疫蛍光染色（本明細書において上述されるようにＭＦ－２０抗体を使用する）は、アクチビンＡとＣＨＩＲ－９９０２１との組み合わせを含有する培地に供された培養（図３Ｂ）中で、かついくらか少ない程度で、ＴＧＦβ、追加のＴＧＦ－ベータ（ＴＧＦ－β）シグナル伝達経路の活性化因子、及びＣＨＩＲ－９９０２１の組み合わせを含有する培地に供された培養（図３Ｃ）中で、骨格筋

肉細胞の存在を示した。対照的に、ミオシン陽性細胞は、ＣＨＩＲ－９９０２１のみを含有する培地に供された培養中に観察されなかった（図３Ａ）。

【０１６１】

これらの結果は、合計１１日間の分化後の筋原性マーカーＭｙｆ５、Ｐａｘ７、Ｍｅｆ２Ｃ、Ｓｉｘ１、ＭｙｏＤ１、ＭｙｏＧ、ＭＹＨ３、ＭＹＨ７、ＭＹＨ８、ミオグロビン（ＭＢ）、及びミオマーカー（Ｍｙｏｍａｋｅｒ、ＭＹＭＫ）のＲＴ－ＰＣＲ分析によって更に支持された。全てのマーカーが上方制御され、骨格筋への分化を示した（図４）。

【０１６２】

更なる実験では、ＰＳＣを、アクチビンＡ（２０ｎｇ／ｍｌ）及びＣＨＩＲ９９０２１（１０μＭ）を含有する無血清成長培地中に再懸濁し、３８．５℃、５％CO_2及び７５％超の湿度下に置かれた組織培養プレート中で、２Ｄ培養条件で培養した。骨格筋前駆体培地（ＲＩを含まない）を使用して培地をリフレッシュし、形成された凝集体を合計４日間分化させた。４日後、骨格筋肉にコミットした細胞を含む細胞を回収し、上記の３Ｄ培養条件から得られた凝集体について記載したように２Ｄ培養条件で播種した。図３Ｄは、コミットされた細胞の骨格筋肉細胞への更なる分化に関して、コミットメント誘導段階において２Ｄ又は３Ｄ培養条件でＰＳＣを培養することの間に顕著差がないことを示す。

【０１６３】

特定の実施形態の前述の説明は、本発明の一般的な性質を完全に明らかにするので、他の人は、現在の知識を適用することによって、過度の実験なしに、及び一般的な概念から逸脱することなく、かかる特定の実施形態の様々な用途に容易に修正及び／又は適合することができ、したがって、かかる適合及び修正は、本開示の実施形態の均等物の意味及び範囲内で理解されるべきであり、そのように意図されている。本明細書で使用される表現又は用語は、説明を目的としたものであり、限定を目的としたものではないことを理解されたい。様々な本開示の機能を実施するための手段、材料、及びステップは、本発明から逸脱することなく、様々な代替形態をとることができる。

【図面】

【図１】

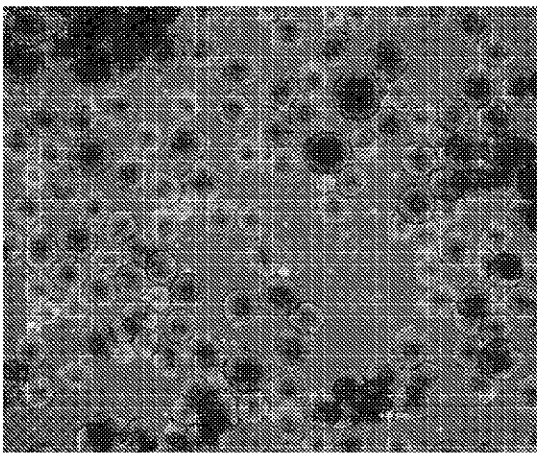
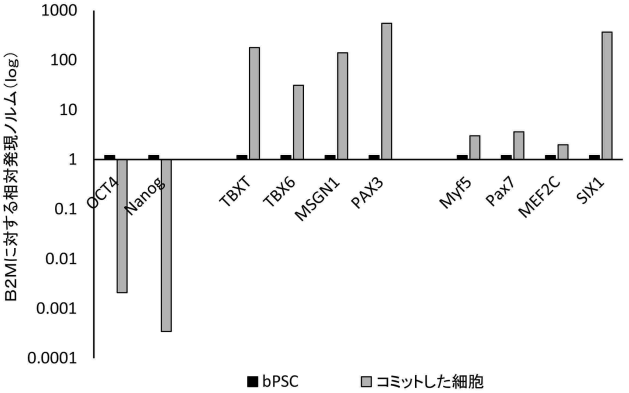


FIGURE 1

【図２】



【図３Ａ】

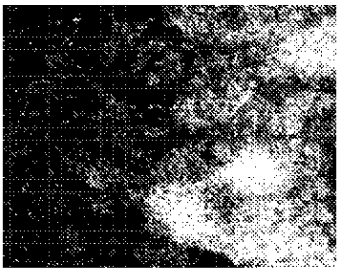


FIGURE 3A

【図３Ｂ】

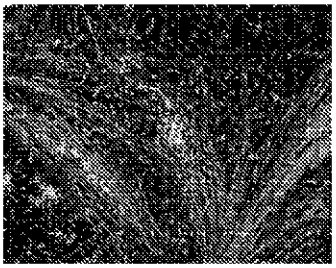


FIGURE 3B

【図３Ｃ】

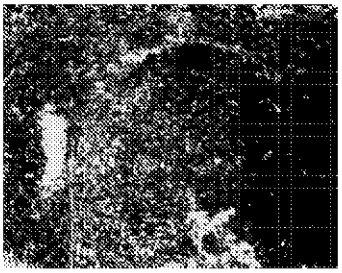


FIGURE 3C

【図３Ｄ】

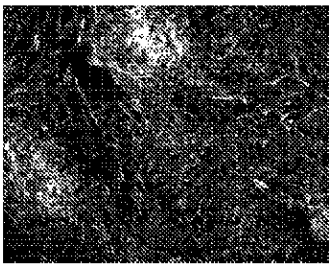
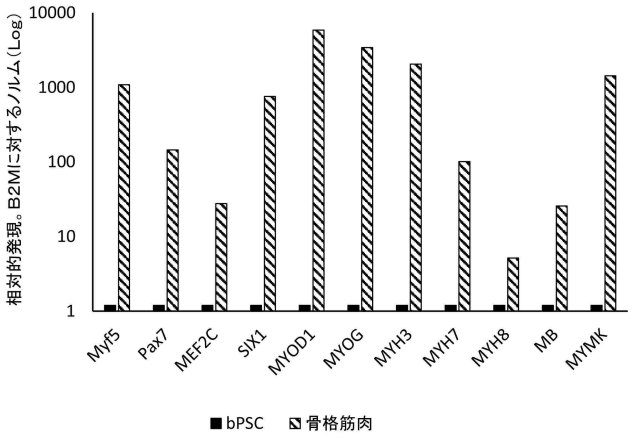


FIGURE 3D

【図４】



【配列表】

2024530009000001.xml

【手続補正書】
【提出日】令和６年４月１６日(２０２４.４.１６)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
２０２４５３０００９０００００１.ｘｍｌ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2022/050861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2022.01)i; ***C12N 5/071***(2022.01)i; ***A23L 13/00***(2022.01)i
CPC:C12N 5/0658; C12N 2506/00; C12N 2501/15; C12N 2501/415; C12N 5/0671; A23L 13/00

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)

C12N 5/077; C12N 5/071; A23L 13/00
CPC:C12N 5/0658; C12N 2506/00; C12N 2501/15; C12N 2501/415; C12N 5/0671; A23L 13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

Databases consulted: Google Patents, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar Search terms used: skeletal muscle progenitor activator TGF-beta inhibitor GSK pluripotent stem

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Chal, J., & Pourquie, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. Development, 144(12), 2104-2122.2017/12/31) #)	
Y	whole document	58,59
X	whole document, especially page 2111, 2nd para – page 2113, 1st para; page 2115, para 3; tables S1 and s2; figure 4	47-57
	WO 2020123876 A1 (WILD TYPE, INC) 18 June 2020 (2020-06-18)	
Y	whole document	58,59
	Sun, C., Serra, C., Lee, G., & Wagner, K. R. (2020). Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. Experimental neurology, 323, 113086.2020/01/31) #)	
A	whole document, especially section 5b, 2nd para; page 25 (highlight 2)	1-59
	US 2018346879 A1 (GENEA HOLDINGS PTY LIMITED) 06 December 2018 (2018-12-06)	
A	whole document	1-59

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
24 October 2022	**27 October 2022**
Name and mailing address of the ISA/IL **Israel Patent Office** **Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101,** **Israel** **Israel** Telephone No. **972-73-3927174** Email: **petoffice@justice.gov.il**	Authorized officer **MAZEL Alexander** Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2022/050861

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2022/050861

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020123876 A1	18 June 2020	WO 2020123876 A1	18 June 2020
		EP 3893668 A1	20 October 2021
		EP 3893668 A4	10 August 2022
		IL 283848 A	29 July 2021
		JP 2022513441 A	08 February 2022
		SG 11202106193Q A	29 July 2021
		US 2022025334 A1	27 January 2022
US 2018346879 A1	06 December 2018	US 2018346879 A1	06 December 2018
		AU 2016250905 A1	09 November 2017
		AU 2016250905 A8	15 March 2018
		AU 2016250905 B2	10 February 2022
		CA 2983332 A1	27 October 2016
		CN 107709545 A	16 February 2018
		EP 3286301 A1	28 February 2018
		EP 3286301 A4	20 February 2019
		EP 3286301 B1	28 July 2021
		JP 2018518943 A	19 July 2018
		JP 7055638 B2	18 April 2022
		WO 2016168890 A1	27 October 2016
		WO 2016168890 A8	30 November 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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

イスラエル国，７４００４４１ ネス ジオナ，２７ ハカラミン ストリート

(72)発明者 モロツキ‐ヘンデルマン，ナタリ

イスラエル国，５３２３５５９ ギバタイム，４ モルデイ‐ハゲタオット ストリート

(72)発明者 ロム，アビブ

イスラエル国，４２８１５００ パルデシア，１９ ハギルボア ストリート

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 BA02 BA23 BB13 BB19 BB31 BB32 BC46 BD26
BD34 BD39 CA41