

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6529541号
(P6529541)

(45) 発行日 令和1年6月12日(2019.6.12)

(24) 登録日 令和1年5月24日(2019.5.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783 Z N A
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 F
請求項の数 22 外国語出願 (全 61 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2017-115944 (P2017-115944)
 (22) 出願日 平成29年6月13日 (2017.6.13)
 (62) 分割の表示 特願2015-509079 (P2015-509079) の分割
 原出願日 平成25年4月23日 (2013.4.23)
 (65) 公開番号 特開2017-158590 (P2017-158590A)
 (43) 公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 審査請求日 平成29年6月13日 (2017.6.13)
 (31) 優先権主張番号 61/637,592
 (32) 優先日 平成24年4月24日 (2012.4.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514262509
 カウフマン, ダン エス.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 93, ラ ホーヤ, ギルマン ドライブ
 9500 #0695, ユニバーシティ
 オブ カリフォルニア-サン ディエゴ
 (73) 特許権者 514262510
 クノール, デイビッド エー.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1002
 1, ニューヨーク イースト 76ティ
 エイチ ストリート 425 アパートメ
 ント6E 気付
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞よりナチュラルキラー細胞を発生させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナチュラルキラー細胞の集団を作製する方法であって、

(a) 1以上の増殖因子を含有する培地を用いて造血前駆細胞を培養し、ナチュラルキラー細胞の分化を誘導するステップ、

(b) ステップ(a)からのナチュラルキラー細胞を、無血清培地中で不活化人工抗原提示細胞(aAPC)と共培養するステップ、

を含み、それにより、ナチュラルキラー細胞の集団を作製する、方法。

【請求項2】

前記造血前駆細胞が多能性幹細胞に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞(hESC)または人工多能性幹細胞(iPSC)である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記無血清培地がさらに、1以上の増殖因子を含有する、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記1以上の増殖因子が、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン7(IL-7)、インターロイキン15(IL-15)、幹細胞因子(SCF)、Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)、またはTPO、あるいはこれらの組み合わせを

含む、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記造血前駆細胞を培養するステップが、外来性間質または間質細胞の存在下または外来性間質または間質細胞が存在しない状態で行われる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記造血前駆細胞が CD 3 4 を発現する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記造血前駆細胞が、CD 3 4 と CD 4 3、または、CD 3 4 と CD 4 5 を共発現する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 9】

作製された前記ナチュラルキラー細胞が、CD 5 6、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R)、CD 1 6、NK p 4 4、NK p 4 6 および NK G 2 D、またはこれらの組み合わせを発現する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (c) が、約 5 : 1 ~ 1 : 5 の、ナチュラルキラー細胞 : 不活化人工抗原提示細胞 (a A P C) の比で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記造血前駆細胞がマトリックス上で培養される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 12】

免疫療法に使用するための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法によって作製されたナチュラルキラー細胞を含む組成物であって、必要とする患者にナチュラルキラー細胞の有効量が投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 13】

前記患者が癌患者である、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記患者が感染症を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記患者がウイルス感染症を有する、請求項 14 に記載の組成物。

30

【請求項 16】

前記患者が、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、単純ヘルペスウイルス (H S V)、サイトメガロウイルス (C M V)、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V)、B 型肝炎ウイルス (H B V) または C 型肝炎ウイルス (H C V) に感染している、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記多能性細胞が前記患者に由来する、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記多能性細胞が同種異型である、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 19】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のナチュラルキラー (N K) 細胞の集団を製造する方法。

【請求項 20】

多能性幹細胞または造血前駆細胞 ;
1 以上の増殖因子を含有する無血清培地 ; および
不活化人工抗原提示細胞 (a A P C)
を含む、ナチュラルキラー細胞の集団を作製するためのキット。

【請求項 21】

前記 1 以上の増殖因子が、インターロイキン 3 (I L - 3)、インターロイキン 7 (I L

50

- 7)、インターロイキン15 (IL-15)、幹細胞因子 (SCF)、Fms 関連チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L)、またはTPO、あるいはこれらの組み合わせを含む、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

外来性間質または間質細胞をさらに含む、請求項20に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、参照により本明細書に組み込まれる、2012年4月24日に出願された米国仮特許出願第61/637,592号の利益を主張するものである。

10

【0002】

本発明は米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号R01 HL77923、T32 HD060536およびT32 GM008244の国庫補助によって為された。政府は本発明にある特定の権利を有する。

【0003】

1. 本発明の分野

本発明は概して幹細胞分化の分野に関する。より具体的には、本発明は癌細胞および/またはウイルス感染細胞の殺滅に使用することができるナチュラルキラー細胞を発生させるための方法に関する。

【背景技術】

20

【0004】

2. 先行技術の説明

ナチュラルキラー細胞 (NK) 細胞は細胞傷害性リンパ球であり、自然免疫系における役割を果たす。例えば、NK細胞はウイルス感染細胞および腫瘍に応答することができる。NK細胞は獲得免疫応答における役割も果たす。一般に、NK細胞は骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃、および胸腺において分化および成熟する。

【0005】

多能性幹細胞は、3種の一次胚葉、すなわち、外胚葉、内胚葉、および中胚葉の全ての派生物を含む特定の細胞種に分化することができる。ヒト胚性幹細胞 (hESC) はヒト初期胚胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞 (iPSC) は特定の遺伝子の発現により非多能性細胞 (典型的には成体体細胞) から人工的に得られた一種の多能性幹細胞である。マウスまたはヒトの骨髄またはヒト臍帯血 (UCB) より単離された造血細胞集団から出発するリンパ球新生の過程が文書になっているが、リンパ球系列に分化する未分化hESCまたはiPSCの能力についてわかっていることは比較的少ない。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

40

未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、

無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、

遠心凝集により、前記無血清培地の中で前記未分化幹細胞を凝集させ、且つ遠心胚様体を形成すること、

前記遠心胚様体からの前駆細胞の産生を誘導するために前記無血清培地の中で前記遠心胚様体を培養すること、および

第2無血清培地の中で前記前駆細胞を培養して前記前駆細胞より前記ナチュラルキラー細胞を作製すること

を含む前記方法。

(項目2)

50

前記未分化幹細胞が未分化ヒト胚性幹細胞 (h E S C) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記未分化幹細胞が未分化人工多能性幹細胞 (i P S C) を含む、項目 1 に記載の方法

。

(項目 4)

前記第 1 無血清培地が前駆細胞の産生を誘導するための増殖因子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記第 1 無血清培地が S C F 複合体、骨形成タンパク質 4 (B M P 4)、および血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) を含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 6)

マウス間質が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

マウス間質細胞が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記第 2 無血清培地がナチュラルキラー細胞誘導性増殖因子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

20

前記第 2 無血清培地がインターロイキン 3 (I L 3)、インターロイキン 7 (I L 7)、インターロイキン 15 (I L 15)、S C F 複合体、および F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記第 2 無血清培地の中で前記前駆細胞を培養する前記ステップが、外来性間質細胞が存在しない状態にある、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記第 2 無血清培地の中で前記前駆細胞を培養する前記ステップが、外来性間質細胞が存在しない状態にある、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

30

前記前駆細胞が C D 3 4 を発現する C D 3 4 + 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 3 を共発現する C D 3 4 + C D 4 3 + 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 14)

前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 5 を共発現する C D 3 4 + C D 4 5 + 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 15)

前記方法が、前記前駆細胞が発現するタンパク質に基づいて前記前駆細胞を選別する細胞選別ステップを前記遠心胚様体培養ステップと前記前駆細胞の培養の間に含まない、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 16)

作製される前記ナチュラルキラー細胞が C D 5 6、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R)、C D 1 6、N K p 4 4、N K p 4 6、および N K G 2 D のうちの 1 つ以上を発現する、項目 1 に記載の方法。

(項目 17)

人工抗原提示細胞 (a A P C) を不活性化して不活化 a A P C を作製すること、および前記ナチュラルキラー細胞を前記不活化 a A P C と共培養することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 18)

50

前記共培養ステップが1：1の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有する、項目17に記載の方法。

(項目19)

不活化 a A P C を作製するための薬剤で人工抗原提示細胞 (a A P C) を処理すること、および

インターロイキン2 (I L 2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を前記不活化 a A P C と共培養すること

をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目20)

前記共培養ステップが約5：1から1：5の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有する、項目19に記載の方法。

10

(項目21)

多能性幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、

(a) 第1無血清培地の中で前記多能性幹細胞を凝集させ、それによって胚様体を形成すること、

(b) 第2無血清培地の中で前記胚様体を培養し、それによって造血前駆細胞を作製すること、および

(c) インターロイキン3 (I L - 3)、インターロイキン7 (I L - 7)、インターロイキン15 (I L - 15)、S C F、および F m s 関連チロシンキナーゼ3リガンド (F L T 3 L) を含む第3無血清培地の中で前記造血前駆細胞を培養し、それによってナチュラルキラー細胞を作製すること

20

を含む前記方法。

(項目22)

前記多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞 (h E S C) または人工多能性幹細胞 (i P S C) である、項目21に記載の方法。

(項目23)

遠心凝集によって前記の凝集を実施する、項目21に記載の方法。

(項目24)

前記第2無血清培地が S C F、骨形成タンパク質4 (B M P 4)、および血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) を含む、項目21に記載の方法。

30

(項目25)

マウス間質またはマウス間質細胞が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目21に記載の方法。

(項目26)

外来性の間質または間質細胞が存在しない状態で前記造血前駆細胞を培養する前記ステップを実施する、項目21に記載の方法。

(項目27)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 を発現する、項目21に記載の方法。

(項目28)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 3 を共発現する、項目21に記載の方法。

40

(項目29)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 5 を共発現する、項目21に記載の方法。

(項目30)

前記方法が細胞選別ステップをステップ (b) とステップ (c) の間に含まない、項目21に記載の方法。

(項目31)

作製される前記ナチュラルキラー細胞が C D 5 6、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R)、C D 1 6、N K p 4 4、N K p 4 6、および N K G 2 D のうちの1つ以上を発現する、項目21に記載の方法。

(項目32)

50

前記ナチュラルキラー細胞を不活化人工抗原提示細胞 (a A P C) と共培養することをさらに含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

約 5 : 1 から 1 : 5 の不活化 a A P C に対するナチュラルキラー細胞の比率で前記共培養を実施する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

インターロイキン 2 (I L 2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を不活化 a A P C と共培養することをさらに含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 6)

ステップ (b) の培養を 6 ~ 2 0 日間実行する、項目 2 1 に記載の方法。

10

(項目 3 7)

ステップ (c) の培養を 2 0 ~ 6 0 日間実行する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 8)

必要とする患者に項目 2 1 に記載の方法によって作製されたナチュラルキラー細胞の有効量を投与することを含む、患者を治療する免疫療法。

(項目 3 8)

(a) 項目 2 1 に記載の方法によってナチュラルキラー (N K) 細胞の集団を作製すること、および

(b) 必要とする患者に前記 N K 細胞の有効量を投与することを含む、患者を治療する免疫療法。

20

(項目 3 9)

前記患者が癌患者である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記患者が感染症を有する、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記患者がウイルス感染症を有する、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記患者がヒト免疫不全ウイルス (H I V) 、エプスタイン・バーウイルス (E B V) 、単純ヘルペスウイルス (H S V) 、サイトメガロウイルス (C M V) 、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V) 、B 型肝炎ウイルス (H B V) または C 型肝炎ウイルス (H C V) に感染している、項目 4 1 に記載の方法。

30

(項目 4 3)

前記多能性細胞が前記患者に由来する、項目 3 8 に記載の方法。

第 1 の実施形態では、未分化多能性幹細胞より N K 細胞を作製するための方法は、第 1 無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、遠心凝集 (s p i n a g g r e g a t i o n) により、第 1 無血清培地の中で未分化細胞を凝集させ、且つ、胚様体 (E B) を形成すること (遠心胚様体 (s p i n e m b r y o i d b o d i e s) (遠心 E B (s p i n E B s)) を形成することになる) 、遠心 E B から前駆細胞の産生を誘導するために第 1 無血清培地の中で遠心 E B を培養すること、および前駆細胞から N K 細胞を作製するための第 2 無血清培地の中でそれらの前駆細胞を培養することを含む。その方法は未分化ヒト胚性幹細胞 (h E S C) または未分化人工多能性幹細胞 (i P S C) である未分化幹細胞を使用する。

40

【 0 0 0 7 】

さらなる実施形態では、多能性幹細胞より N K 細胞を作製するための方法であって、(a) 第 1 無血清培地の中で多能性幹細胞を凝集させ、それによって胚様体を形成すること、(b) 第 2 無血清培地の中で胚様体を培養し、それによって造血前駆細胞 (h e m a t o p o i e t i c p r o g e n i t o r c e l l) を作製すること、および (c) インターロイキン 3 (I L - 3) 、インターロイキン 7 (I L - 7) 、インターロイキン 1 5 (I L - 1 5) 、幹細胞因子 (S C F) 、および / または F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) を含む第 3 無血清培地の中で造血前駆細胞を培養し、それによ

50

ってナチュラルキラー細胞を作製することを含む前記方法が提供される。幾つかの態様では、それらの多能性幹細胞はヒト胚性幹細胞または人工多能性幹細胞などのヒト細胞である。ある特定の態様では、本実施形態の第2無血清培地はSCF、骨形成タンパク質4(BMP4)および/または血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を含む。さらなる態様では、約90日未満の期間、例えば、約10日、20日、25日、または30日と40日、45日、50日、60日、70日または80日の間の期間にわたってその方法を実行する。例えば、幾つかの態様では、3日と30日の間の期間、例えば3~25日、6~20日または6~15日の間の期間にわたってステップ(b)の培養を実行する。同様に、幾つかの態様では、5日と100日の間の期間、例えば5~80日、10~70日または20~60日の間の期間にわたってステップ(c)の培養を実行する。

10

【0008】

一連の方法は胚様体の形成に利用可能であり、且つ、本実施形態と一致して使用され得る。例えば、1つの態様では、遠心凝集により胚様体の凝集を実施する。胚様体とそれらに由来する細胞を培養するための方法も当技術分野において周知である。幾つかの態様では、例えば、M210-B4マウス間質細胞などのマウス間質が存在しない状態で胚様体の培養ステップを実施する。幾つかの態様では、胚様体の培養は外来性の間質が存在しない状態、または間質細胞が存在しない状態にある。本明細書中において使用される場合、外来性の間質は、胚様体の細胞と遺伝的に異なる細胞(例えば、胚様体と同じ多能性幹細胞に由来しない細胞)など、培養物に添加される間質細胞を指す。

【0009】

20

幾つかの態様では、本実施形態の方法はCD34を発現するCD34⁺細胞、CD34とCD43を共発現するCD34⁺CD43⁺細胞、および/またはCD34とCD45を共発現するCD34⁺CD45⁺細胞を含む前駆細胞を作製する。本方法の実施形態では、第2無血清培地の中で前駆細胞を培養するステップは、例えば、EL08-1D2外来性間質細胞などの外来性間質細胞が存在しない状態にある。さらなる態様では、その方法はEB培養ステップと前駆細胞培養ステップの間に(例えば、前駆細胞が発現する糖タンパク質に基づいて)前駆細胞を選別する細胞選別ステップを必要としない(および、含まない)。したがって、最初の培養ステップに由来する前駆細胞のバッチは、それらの間に細胞選別ステップを挟むことなく、第2無血清培地を使用する培養に直接移転され得る。幾つかの態様では、その方法は、例えばCD56、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)、CD16、NKp44、NKp46、およびNKG2Dのうちの一つ以上を発現するNK細胞などのNK細胞を作製する。

30

【0010】

未分化幹細胞よりNK細胞を作製するための方法の実施形態は、幾つかの事例では、第1無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、第1無血清培地の中で未分化細胞を凝集させ、且つ、EBを形成すること、EBから前駆細胞の産生を誘導するために第1無血清培地の中でEB(例えば、遠心EB)を培養すること、前駆細胞からNK細胞を作製するための第2無血清培地の中でそれらの前駆細胞を培養することを含む。幾つかの態様では、方法は不活化(例えば、放射線照射)人工抗原提示細胞(aAPC)の獲得または作製をさらに含む。そのようなaAPCを作製するための方法は当技術分野において公知であり、且つ、本明細書においてさらに詳述される。したがって、幾つかの態様では、NK細胞は不活化aAPCと共培養される。NK細胞をaAPCと共培養するステップは、例えばインターロイキン2(IL2)を含む培地の中で行われ得る。幾つかの態様では、約5:1から約1:5の不活化aAPCに対するナチュラルキラー細胞の比率でその共培養を実施する。例えば、NK細胞とaAPCの共培養は1:1(NK細胞:aAPC)、2:1(NK細胞:aAPC)または1:2(NK細胞:aAPC)の比率であり得る。

40

【0011】

癌細胞および/またはウイルス感染細胞を殺滅するための方法は上記のNK細胞を作製するための方法を含み、NK細胞を取り出し、且つ、固形塊の癌細胞にそれらのNK細胞を送達することをさらに含む。その送達ステップはNK細胞の動物またはヒトへの注射で

50

あり得る。

【0012】

1つの実施形態では、本開示は、(a)第1無血清培地の中で多能性幹細胞を凝集させ、それによって胚様体を形成すること、(b)第2無血清培地の中で胚様体を培養し、それによって造血前駆細胞を作製すること、および(c)インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン7(IL-7)、インターロイキン15(IL-15)、幹細胞因子(SCF)、およびFms関連チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)を含む第3無血清培地の中で造血前駆細胞を培養し、それによってナチュラルキラー細胞を作製することを含む、多能性幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法を提供する。

【0013】

ある特定の態様では、それらの多能性幹細胞はヒト胚性幹細胞(hESC)または人工多能性幹細胞(iPSC)であり得る。ある特定の態様では、マウス間質またはマウス間質細胞が存在しない状態でステップ(b)の培養を実施することができる。ある特定の態様では、外来性の間質または間質細胞が存在しない状態でステップ(c)の培養を実施することができる。1つの態様では、その方法は細胞選別ステップをステップ(b)とステップ(c)の間に含まない。ステップ(b)の培養を4~40日間、好ましくは6~20日間実行することができる。ステップ(c)の培養を10~100日間、好ましくは20~60日間実行することができる。

【0014】

幾つかの態様では、造血前駆細胞はCD34を発現することができ、CD34とCD43を共発現することができ、またはCD34とCD45を共発現することができる。1つの態様では、作製されるナチュラルキラー細胞はCD56、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)、CD16、NKp44、NKp46、およびNKGD2のうちの一つ以上を発現することができる。

【0015】

上で詳述したように、1つの態様では、本方法はナチュラルキラー細胞を放射線照射(そうでない場合は不活化)人工抗原提示細胞(aAPC)と共培養することをさらに含む得る。IL-2を含む培地の中で前記の共培養を実施することができる。約5:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5または1:10の不活化aAPCに対するナチュラルキラー細胞の比率で前記共培養を実施することができる。

【0016】

さらなる実施形態では、本開示は、必要とする患者に本実施形態の方法によって作製されたナチュラルキラー細胞の有効量を投与することを含む、患者を治療する免疫療法を提供する。一層さらなる実施形態では、(a)本実施形態の方法によってナチュラルキラー細胞の集団を作製すること、および(b)必要とする患者にそれらのNK細胞の有効量を投与すること、を含む免疫療法が提供される。例えば、幾つかの態様では、その患者は癌患者またはウイルス感染症などの感染症を有する患者である。幾つかの態様では、その患者はヒト免疫不全ウイルス(HIV)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、B型肝炎ウイルス(HBV)またはC型肝炎ウイルス(HCV)に感染している。

当業者は、本実施形態の治療方法は幾つかの態様では自家幹細胞に由来するNK細胞(例えば、患者の血液試料または臍帯血試料から作製した細胞)を使用することを伴い得ることを理解する。他の態様では、それらのNK細胞は異種細胞に由来し得る。

【0017】

本願の明細書中において使用される場合、「a」または「an」は1以上を意味し得る。本願の特許請求の範囲の中において使用される場合、「含む(comprising)」という単語と併せて使用されるとき、「a」または「an」という単語は1または1超を意味し得る。

【0018】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみ、または選択肢が

10

20

30

40

50

相互排他的関係にあることを指すと明白に示されない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は選択肢のみ、および「および/または」を指す定義を維持する。本明細書中において使用される場合、「別の」は少なくとも2つ目のもの、またはそれ以降のものを意味し得る。

【0019】

本願を通して「約」という用語は、ある値がその値を決定するために用いられた装置、方法の固有の誤差の分散、または試験対象の間に存在する分散を含むことを示すために使用される。

【0020】

本発明の他の目的、特徴および利点は次の詳細な説明より明らかとなる。しかしながら、本発明の好ましい実施形態が示されるが、この詳細な説明から本発明の精神と範囲の範囲内にある様々な変更と改変が当業者に明らかになるので、詳細な説明と具体的な実施例は例示のみを意図して提供されていることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0021】

次の図面は本明細書の一部を形成し、且つ、本発明のある特定の態様をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の内の1つ以上を参照することによってより良く理解され得る。

【図1】未分化幹細胞よりNK細胞を作製するための方法の実施形態の流れ図を示す図である。

【図2】未分化幹細胞よりNK細胞を作製するための方法の実施形態を示す図である。遠心EB法を用いる未分化hESC/iPSCからの造血細胞の発生とNK細胞の発生の概略図。

【図3】未分化ヒト多能性幹細胞よりNK細胞を作製するための方法の実施形態を示す図である。

【図4A】造血前駆細胞を作製するための培養ステップ中の細胞分化の結果の例を示す図である。凝集したhESCまたはiPSCがそれぞれ個々のウェルの中で別々の遠心EBを形成し、11日の期間にわたって増殖する。第7日、第9日、および第11日に4倍の倍率で写真を撮った。第11日にEBの周囲に造血性を示す多数の細胞が存在する。

【図4B】hESC由来細胞およびiPSC由来細胞についての細胞分化のサイトメトリック分析を示す図である。遠心EBは(図7~8中のように)マウス間質細胞との共培養よりもhESCおよびiPSCに由来する造血前駆細胞を高い頻度で作製した。遠心EB培養の11日目に個々のEBを収集し、解離させ、CD34、CD43、およびCD45に対する抗体で染色した。

【図4C】様々な分子を発現する遠心EBのパーセンテージの例を示す図である。遠心EB系において作製された高レベルの血液前駆細胞の定量。CD34のみを発現する細胞、またはCD45、CD43、CD31、およびCD73と組合せてCD34を発現する細胞のパーセンテージが示されている。各ドットは別々の実験の結果を表す。線は平均値±SEMを表す。

【図4D】様々なエフェクター分子を発現する得られたNK細胞の例を示す図である。hESC(EL08-1D2フィーダーを使用して、または使用せずに)、PB-NK、またはiPSC(UCBiP57)から得られたCD56⁺NK細胞。hESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞はCD117⁻94⁺で均一な、活性化PB-NKと類似する成熟集団を形成した。それぞれのNK細胞はKIR、CD16、NKG2D、NKp46、およびアポトーシス誘導リガンドTRAILを含む様々なエフェクター分子も発現した。少なくとも3回の独立した実験を表すヒストグラム。

【図5】未分化幹細胞よりNK細胞を作製するための方法の実施形態の流れ図を示す図である。

【図6A】図5に示される工程を用いて作製されたNK細胞の結果を示す図である。(A)図2~4のように作製され、その後aAPCと共に70日間さらに培養されたhESC

10

20

30

40

50

C由来NK細胞の細胞数。

【図6B】同上。(B)3週間の培養の後にEL08-1D2使用NK細胞培養物とフィーダー不使用NK細胞培養物の両方は増殖前の表現型を維持し、且つ、増殖させたPB-NK細胞と類似していた。それぞれのNK細胞は継続してCD94⁺CD117⁻であるCD56⁺NK細胞の純粋培養物を含む。それぞれのNK細胞は高レベルのKIR、CD16、およびNKG2Aを発現し、ほんのわずかなパーセンテージの細胞しかNKG2Cを発現しなかった(n=3)。

【図6C】同上。(C)増殖させたNK細胞はそれらのインビトロ機能を保持した。それぞれのNK細胞をK562標的に対する標準⁵¹Cr放出細胞傷害アッセイで試験した(それぞれについてn=3)。データは平均値±SEMとして表される。

【図7】造血系分化を支援するマウス間質との共培養ステップ、および細胞選別ステップを必要とする比較方法の流れ図を示す図である。

【図8A】前駆細胞のCD34とCD45の発現の結果を示す図である。M210-B4間質上に21日間配置した後のhESC(H1、H9)またはiPSC(BJ1-iPS、DRiPS16、UCBiPS7)に由来するCD34⁺CD45⁺前駆細胞。

【図8B】前駆細胞のCD34およびCD45の発現率を示す図である。各株について少なくとも4回の別々の実験のhESCおよびiPSCの分化効率。

【図8C】得られたNK細胞の細胞傷害の結果を示す図である。K562腫瘍細胞に対する細胞傷害アッセイ。hESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞はUCB由来NK細胞よりも有意に高いレベルでCML標的細胞を殺滅する。細胞傷害性の平均値はH1(n=2)を除いてn=3であり、BJ1iPS由来NK細胞抗腫瘍活性は以前に示されている(Niet al., 2011)。

【図9】インビボ腫瘍治療結果の結果を示す図である。

【図10】ヒト胚性幹細胞(hESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)からの機能性NK細胞の誘導を示す図である。hESC、iPSC(BJ1-iPS、NHDF-iPS、UCB-iPS)、またはUCB由来CD34⁺細胞から得られたNK細胞または成体末梢血から単離されたNK細胞(PB-NK)。ヒストグラムプロットをCD56⁺イベントに対するゲートにかける。KIRプロットはKIR抗体(CD158a/h、CD158e1/e2、およびCD158i)のカクテルを使用した。PB-NKと同様に、hESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞は機能的に成熟したNK細胞のマーカー(CD16、NKG2D、NKp44、NKp46、CD161)を発現した。ヒストグラムは少なくとも3回の独立した実験を表す。略語：iPS、人工多能性幹；KIR、キラー免疫グロブリン様受容体；NK、ナチュラルキラー；PB、末梢血；UCB、臍帯血。

【図11】フィーダー不使用条件における機能性NK細胞の誘導を示す図である。白血病細胞株K562に対する細胞傷害アッセイ(細胞種当たりN=4)。hESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞は活性化PB-NK細胞と同様に、且つ、UCB-NK細胞よりも有意に好適に(p=0.0054)K562細胞を殺滅する。データは平均値±SEMとして表される。略語：CML、慢性骨髄性白血病；ES、胚性幹；hESC、ヒト胚性幹細胞；iPSC、人工多能性幹細胞；NK、ナチュラルキラー；PB、末梢血；UCB、臍帯血。

【図12】hPSC由来間質が成熟NK細胞の発生を支援することを示す図である。(A)EL08-1D2間質細胞の存在下、または非存在下で増殖させたhESC由来NK細胞。EL08細胞を含む、または含まない培養から4週間の時点でそれらの間質細胞は56.8倍の増殖をもたらし、フィーダー不使用細胞は40.4倍増殖した。各条件についてN=4。(B)2週間のNK細胞培養の後のhESC由来間質。40倍の倍率で細胞の画像を撮った。その後、造血細胞を洗い流し、間質層のみを評価するために細胞の画像を再度撮った。間質細胞もGFPを発現し、それらのhESC起源を示した(使用した親H9株はGFP⁺であるように遺伝子操作されている)。(C)フィーダー不使用条件から得られた間質は内皮細胞(CD31)と間葉系間質細胞(MSC)の両方に典型的な表面

10

20

30

40

50

抗原を発現するが、全血球増殖性マーカーCD45または骨髄マーカー(CD14、CD15、CD11c)を発現することはない。(D)フィーダー不使用条件から得られた間質はUCB由来CD34⁺HSCからのNK細胞の発生を支援した。各間質層(EL08-1D2、HUVEC、無フィーダー間質)をNK細胞(CD56)の存在について第28日に評価した。間質無し、サイトカインのみの条件も示されている。次にCD56⁺イベントをCD117、CD94、NKG2A、およびKIRの発現について評価した(N=2)。略語:ES、胚性幹;GFP、緑色蛍光タンパク質;HUVEC、ヒト臍静脈内皮細胞;KIR、キラー免疫グロブリン様受容体;NK、ナチュラルキラー。

【図13】遠心EB由来NK細胞が様々な標的に対して機能的であることを示す図。(A)フィーダー使用条件またはフィーダー不使用条件におけるhESC由来NK細胞、UCB由来NK細胞、およびPB-NK細胞をIFN分泌およびCD107a発現についてK562標的に対して試験した。エフェクターを標的と共に5時間保温し、フローサイトメトリーにより分析した。(B)標準⁵¹Cr放出アッセイを用いて各エフェクター集団を骨髄腫(RPMI8226、U266、OPM-2)標的および膵臓癌(S2013、S2VP10)標的に対しても試験した。データは平均値±SEMとして表される。略語:IFN、インターフェロン;NK、ナチュラルキラー;PB、末梢血;UCB、臍帯血。

10

【図14】遠心EB由来NK細胞が系列特異的因子を発現することを示す図である。各NK細胞集団をNK細胞の発生に重要な遺伝子について逆転写酵素PCRにより試験した。PB-NK細胞と比較するとhESC由来NK細胞とiPSC由来NK細胞はE4BP4、E2A、およびID2を発現する。それらは多能性因子OCT4またはB細胞系列特異的転写因子PAX5を発現しない。

20

【図15】遠心EB由来NK細胞が活性化受容体NKp46を介して誘導され得ることを示す図である。hESC、iPSC、および末梢血に由来するNK細胞を、NKp46活性化受容体を介するリダイレクト殺滅、または逆ADCCについて試験した。各エフェクター株を(抗体のFc部分に結合することができる)P815標的細胞へ添加する前にアイソタイプ対照または抗NKp46抗体と事前保温した。その後、エフェクター標的間比率を上げてNK細胞をP815標的細胞と共保温した。

【図16】遠心EBが内皮細胞と間葉系間質細胞の両方の前駆細胞を含有することを示す図である。(A)第11日(NK細胞条件への移転日)の遠心EBを内皮細胞(CD31)マーカーまたは間葉系間質細胞(CD73)マーカーの存在について分析した。CD34⁺細胞の大部分がCD31を共発現する。フローサイトメトリープロットは少なくとも3回の独立した実験を表す。

30

【図17】ホタルルシフェラーゼを発現するヒト胚性幹細胞(hESC)からのナチュラルキラー(NK)細胞の誘導。(A)hESC由来NK細胞の誘導の概略図。GFP-ルシフェラーゼ⁺hESCを解離させ、播種して遠心EB条件で11日間培養した。その後、NK細胞発生を支援する条件に細胞を移した。(B)遠心EB培養中の11日後に細胞を解離させ、FAC分析のために前駆細胞マーカーCD34、CD45、およびCD43について染色した。遠心EB由来前駆細胞は高レベルのCD34、CD43、およびCD45を発現した。(C)NK細胞培養中の4週間後に細胞を回収し、FAC分析のために染色した。GFPとルシフェラーゼを発現するhESCはCD56、CD16、NKp46、およびNKG2Aを発現するNK細胞の純粋集団に分化する。各フロープロットは少なくとも5回の独立した実験を表す。EB、胚様体。

40

【図18-1】hESC由来NK細胞の存続性を示す図である。(A)静脈内(IV)注射されたhESC由来NK細胞と腹腔内(IP)注射されたhESC由来NK細胞の存続性がNK細胞注射後の表示されている時点(D=日)で生物発光画像法によりモニターされた。(B)静脈内(IV)投与と腹腔内(IP)投与により細胞を受容している、非注射対照と比較されるマウスにおけるhESC由来NK細胞ルシフェラーゼシグナルの定量。IP注射NK細胞は全部で25日間存続し、IV注射細胞は第4日までに検出不能になった。(C)非注射対照と比較したIV注射NK細胞とIP注射NK細胞の脾臓、骨髄、

50

腹膜、および末梢血内の生着を評価するための第19日における幾匹かのマウスの分析。hESC由来NK細胞をそれらのGFPの発現について、またはCD56表面抗原およびCD45表面抗原の染色について分析した。プロットは4匹のIPマウスおよび3匹のIVマウスを表す。非注射対照群については2匹のマウスを分析した。

【図18-2】同上。

【図19】hESC由来NK細胞のインビボ輸送をモニターするための二元生物発光画像撮影を示す図である。腫瘍細胞(mbgLuc⁺、上の列)とNK細胞(ホタルルシフェラーゼ⁺、Fluc、下の列)の両方の存在についての9日の期間にわたる1匹のマウスのモニタリング。腫瘍部位へのNK細胞輸送をこの特定のマウスにおいて第9日に見ることができる。

10

【図20】TurboFP650発現K652細胞を利用する改良二元レポーター画像撮影を示す図である。(A)TurboFP650レポーターで修飾されたK562細胞をFACSにより分析および選別した。(B)5匹のマウスにTurboFP650⁺K562腫瘍細胞と10×10⁶個のNK細胞の両方を注射し、2週間追跡した。画像により(B)第9日と(C)第12日におけるホタルルシフェラーゼを発現するhESC由来NK細胞の輸送が示される。(D)K562腫瘍組織量は第0日、第9日、および第12日におけるTurboFP650シグナルを測定することにより定量された。NK細胞シグナル(全NK細胞または輸送されたNK細胞)はホタルルシフェラーゼ活性を測定することにより定量された。それらの輸送されたNK細胞は腫瘍領域と共局在するNK細胞シグナルの量を定量することにより測定された。

20

【図21】インビボNK細胞輸送の免疫組織化学(IHC)による確認を示す図である。(A)生物発光画像法により輸送が確認されたマウスの腫瘍組織をホルマリン固定し、そして、IHCの前にパラフィン包埋した。その後、切片を表示されている濃度のアイソタイプ(IgG1)抗体または抗NKp46抗体で染色した。アイソタイプ抗体およびNKp46抗体を連続切片に作用させた。(B)腫瘍のみのマウスはNK細胞の染色を示さなかったが、陽性対照であるヒト扁桃組織(C)には多数のNK細胞が存在した。

【発明を実施するための形態】

【0022】

抗腫瘍リンパ球の養子移入は過去20年にわたって癌治療の分野において強い関心を持たれてきた。ヒトナチュラルキラー(NK)細胞は抗癌免疫療法用リンパ球の有望な供給源である。サイトカイン産生NK細胞は自然免疫系の一部であり、事前に抗原を曝露せずにヒト白血球抗原適合を必要としない強力な抗腫瘍活性を示す。T細胞ベースの養子免疫療法もNK細胞ベースの養子免疫療法も難治性悪性腫瘍を有する患者を治療するために使用されてきた(Ljunggren and Malmberg, 2007, Miller et al., 2005, Rosenberg et al., 2008)。これらの治療法の使用拡大に対する主要な障害は細胞調整とドナー選択の必要性である。ヒト多能性幹細胞(hPSC)からのT細胞の発生が報告されているが、それは比較的に不十分なままである(Galic et al., 2006, Timmermans et al., 2009)。

30

【0023】

対照的に、抗腫瘍能と抗ウイルス能を有するNK細胞を作製するためにヒト胚性幹細胞(hESC)と人工多能性幹細胞(iPSC)を使用することが実施されている(Niet et al., 2011, Woll et al., 2009, Woll et al., 2005)。hESCおよびiPSCに由来するNK細胞は成熟表現型を有し、サイトカインを分泌し、且つ、インビトロとインビボで血液悪性腫瘍と固形悪性腫瘍の両方に対して細胞傷害性である(Niet et al., 2011, Woll et al., 2009, Woll et al., 2005)。それ故、多能性幹細胞からのNK細胞の誘導は難治性悪性腫瘍を有する数千人もの患者を治療するための強力な抗腫瘍反応を有する標準化され、容易に入手可能な治療薬を提供することができるだろう。これまでヒト胚性幹細胞(hESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)からの造血細胞の

40

50

発生についての研究はマウス間質細胞層の使用を含む不完全限定条件を用いてきており、且つ、少数のhESC/iPSC由来造血前駆細胞の選別など、限られた規模で行われてきた。マウス間質層を使用することが(マスターセルバンクが使用される場合)臨床応用を完全に妨げることはないが、異種細胞を除外する培養系を使用することがNK細胞の発生のためのより限定的な条件を提供する。マウス間質支持体を除外することにより、NK細胞ライセンシングを促進する受容体リガンド間相互作用を研究するための重要な発生モデルも提供される。

【0024】

本明細書は、hESCおよびiPSCからの機能性NK細胞の発生のための効率的な系ならびに臨床応用に適切な改良された方法を記載する。本発明者らは、細胞選別しない状態
10
で、且つ、異種間質細胞を必要とせずにhESCおよびiPSCからNK細胞を効率的に作製するための二段階培養系を用いた。限定的な条件と人工抗原提示細胞(例えば、膜結合型インターロイキン21を発現するaAPC)を使用するこの新しい組合せの胚様体形成によって、幾つかの異なるhESC株およびiPSC株から成熟した機能性のNK細胞を作製することが可能になる。とりわけ、本明細書において詳述されるNK細胞の作製のための無フィーダー限定培養条件は機能性NK細胞の産生の点で以前のフィーダー細胞ベースの系よりも効率的であった(例えば、図4Bと図7~8を比較参照のこと)。異なるhESC株およびiPSC株の造血系細胞発生の効率は様々であったが、試験した全ての細胞株が機能性NK細胞を産生することができた。これらの方法を用いることにより250,000個よりも少ない投入hESC/iPSCにより1人の患者を治療するために
20
十分な細胞傷害性NK細胞を作製することができる。なお、この戦略はインビトロでの通常のNK細胞の発生と育成を研究するための遺伝子操作可能なプラットフォームを提供する。

【0025】

本開示は、臨床応用のための多数の細胞傷害性NK細胞を作製するために無フィーダー系を使用することができることを実証する。この無フィーダー系において得られたNK細胞はマウス間質細胞を使用して増殖させた細胞と類似する遺伝型および表現型を有した(Niet al., 2011、Woll et al., 2009)。KIRとCD16の両方を含む高レベルのエフェクター分子がhESCおよびiPSCに由来するNK細胞の表面に発現した。間質ベースの方法と無フィーダー方法の間のKIRとCD16の発現レベルの顕著な差異は発生カイネティクスに起因するようであった。M210-B4間質ベースの方法を使用するとき、NK細胞分化の前にCD34⁺/CD45⁺前駆細胞の集団を濃縮する必要があるが、NK細胞分化は低い頻度(2%~10%)でしかこれらの細胞を生じないからである(図1)。遠心EBの直接移転によってNK細胞発生が成功するようになったが、前駆細胞の出発時の比較的低いパーセンテージ(26.2±6.6%; 図2)が原因で最適なCD16とKIRの獲得により長い時間がかかることがあり得る。しかしながら、どちらの方法を用いて得られたNK細胞もaAPCとの増殖の後にKIR、CD16と他の典型的なNK細胞表面受容体および抗原を発現することを実証することができるので、それらのNK細胞の間に本質的な差異は存在しない。なお、間質ベースNK細胞もフィーダー不使用NK細胞もほぼ等しいレベルで腫瘍標的とウイルス感
30
40
染標的を殺滅するので機能的には類似している。

【0026】

I. 定義

「分化」は培養中かインビボであまり特殊化していない細胞が、分化が無い同一条件下にあるときよりも特殊化した細胞種の細胞になって、少なくとも1つの新しい細胞種の子孫細胞を形成する過程のことである。ある特定の条件下では、その新しい細胞種の特徴を有する子孫細胞の割合は好ましい順に少なくとも約1%、5%、25%またはそれより高い割合であり得る。

【0027】

「分化細胞」という用語は、本明細書中において使用される場合、特殊化していない表
50

現型から特殊化した表現型に発達した前駆細胞を指すことができる。例えば、胚性細胞は腸の上皮細胞に分化することができる。分化細胞は例えば胎児または生産（せいざん）動物から単離され得る。

【 0 0 2 8 】

「未分化細胞」という用語は、本明細書中において使用される場合、特殊化していない表現型を有し、且つ、分化することができる前駆細胞を指すことができる。未分化細胞の例は幹細胞である。

【 0 0 2 9 】

「多能性」は、細胞がその子孫細胞を介して生殖細胞を含む成体動物を構成するあらゆる細胞を生じることができることを意味する。胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、および胚性生殖細胞がこの定義の下で多能性細胞である。

10

【 0 0 3 0 】

「胚性幹細胞」という用語は、本明細書中において使用される場合、インビトロ細胞培養状態で維持される、胚から単離された多能性細胞を指すことができる。そのような細胞は、生殖細胞を含む成体動物を構成するあらゆる細胞をインビボで生じる能力を培養状態で保持する培養胚から単離された急速分裂培養細胞である。胚性幹細胞はフィーダー細胞を使用して、または使用せずに培養され得る。胚性幹細胞は、胚盤胞期の胚および前胚盤胞期の胚を含むあらゆる発生段階の胚から単離された胚性細胞より確立され得る。胚性幹細胞は球形の細胞形態を有することがあり得、且つ、フィーダー層上で球系の細胞集塊に増殖し得る。胚性幹細胞は当業者に周知である。

20

【 0 0 3 1 】

II . 細胞培養

「培養された (c u l t u r e d) 」という用語は、細胞に関して本明細書中において使用される場合、インビトロ環境において細胞分裂を行っている、または細胞分裂を行っていない1個以上の細胞を指すことができる。インビトロ環境は、例えば適切な液体培地または寒天培地などのインビトロでの細胞の維持に適切である当技術分野において公知のあらゆる培地のことであり得る。

【 0 0 3 2 】

出発細胞と分化細胞は一般に培地と培養条件について異なる要求事項を有する。出発細胞の培養に適切であることが知られている培地の存在下および培養条件の下で分化因子の導入後に少なくとも初期段階の培養を実行することは普通のことである。この後に分化細胞に適切であることが知られている分化培地の存在下および培養条件の下での後続の培養期間が続く。分化に十分な時間の後に分化した細胞は分化細胞の増殖のために増殖培地中でさらに培養され得る。そのような増殖培地は1つ以上の上述のシグナル伝達阻害剤を含んでもよく、または基本的にこれらの阻害剤を含まない培地を含んでもよい。分化条件は基本的にフィーダー細胞を含まないことがあり得る。さらなる態様では、分化培地は化学的に限定されることがあり得る。

30

【 0 0 3 3 】

本実施形態に従う培地は血清含有培地または無血清培地であり得る。無血清培地は未処理または未精製血清を含まない培地を指し、よって精製された血液由来成分または動物組織由来成分（例えば、増殖因子）を有する培地を含み得る。異種動物由来成分の汚染混入を防ぐ態様から血清は幹細胞のものと同一動物に由来し得る。

40

【 0 0 3 4 】

本実施形態に従う培地は血清代替物を含んでも含まなくてもよい。血清代替物には、アルブミン（例えば、高脂質アルブミン、組換えアルブミン、植物デンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解物などのアルブミン代替物）、トランスフェリン（または他の鉄輸送体）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、またはそれらの同等物を適宜含有する物質が挙げられ得る。

【 0 0 3 5 】

50

多能性細胞の維持

多能性細胞は、本実施形態の分化プロトコルの前に様々な方法を用いて未分化状態で培養および維持され得る。ある特定の実施形態では、多能性細胞は、限定フィーダー非依存培養系を用いて、例えば、TeSR培地またはE8培地（例えば、参照により組み込まれるChen et al., Nat. Methods, 8(5): 424-429, 2011を参照のこと）において基本的に未分化状態で培養および維持され得る。例えば、TeSR培地は未分化ヒト胚性幹細胞を培養するために使用され得る限定培地である。TeSR培地にはTeSR1培地とmTeSR培地の両方が含まれる。TeSRはbFGF、LiCl、アミノ酪酸（GABA）、ピペコリン酸およびTGFを含み、TeSRを利用する様々な方法が以前に、例えば、参照により全体が組み込まれる米国特許出願公開第2006/0084168号およびLudwig et al. (2006a、2006b)に記載されている。あるいは、非限定条件を用いることができる。例えば、多能性細胞は、未分化状態で幹細胞を維持するために線維芽細胞フィーダー細胞上または線維芽細胞フィーダー細胞に曝露された培地上で培養され得る。

【0036】

フィーダー非依存培養系および培地を使用してhESCまたはiPSCなどの多能性細胞を培養および維持することができる。これらのアプローチによりマウス線維芽細胞「フィーダー層」を必要とすることなくヒト胚性幹細胞を基本的に未分化状態で維持することができる。本明細書に記載されるように、必要に応じてコストなどを減少させるために様々な改変をこれらの方法に行うことができる。

【0037】

事実上あらゆる多能性またはヒト胚性幹細胞株が本明細書に記載される限定条件下で分化し得ることが予期される。例えば、ヒト胚性幹細胞株H1、H9、hES2、hES3、hES4、hES5、hES6、BG01、BG02、BG03、HSF1、HSF6、H1、H7、H9、H13B、および/またはH14などは本明細書に記載される方法を介して分化し得る。ある特定の実施形態ではヒト多能性細胞を使用することが好ましくあり得るが、幾つかの例では造血系分化に適した哺乳類、マウス、霊長類のものなど他の多能性細胞を使用することも可能であり得る。

【0038】

ヒト胚性幹細胞に加えてiPSCが本明細書に記載される方法を介して造血前駆細胞（hematopoietic precursor cell）に培養および/または分化され得る。iPSCは幹細胞様特性を有する再プログラム化体細胞である（Takahashi et al., 2007、Takahashi et al., 2007、Nakagawa et al., 2007）。当業者が理解するように、「多能性細胞」という用語には胚盤胞に自然に生じる、または胚盤胞に由来する細胞ならびに幹細胞への脱分化を誘導された、または幹細胞様状態に戻る細胞が含まれる（例えば、Nakagawa et al., 2007、Yu et al., 2007を参照のこと）。

【0039】

幾つかの態様では、マトリックス成分が、実質的または基本的に未分化状態で多能性細胞を培養および維持するための限定培地に含まれ得る。適切な半固形マトリックス中で培養されるとコロニー形成細胞（CFC）と呼ばれる個々の前駆細胞が増殖して別々の細胞培養物またはコロニーを形成することができる。細胞懸濁液を栄養分およびサイトカインを添加したメチルセルロースまたはコラーゲンなどの半固形培地に加え、続いて例えば約37℃で保温することによりCFCアッセイを実施することができる。

【0040】

様々なマトリックス成分を使用してhESCまたはiPSCなどの多能性細胞を培養および維持することができる。例えば、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニン、およびビトロネクチンを組合せて使用して、参照により全体が組み込まれるLudwig et al. (2006)に記載されるように、胚性細胞の培養と維持に適した固形支

10

20

30

40

50

持体を提供することができる。

【0041】

マトリゲル（商標）を使用して細胞培養と多能性細胞の維持のための基材を提供することもできる。マトリゲル（商標）はマウス腫瘍細胞から分泌され、BDバイオサイエンス社（ニュージャージー州、米国）から市販されているゼラチン様タンパク質混合物である。その混合物は多くの組織に見出される複雑な細胞外環境に似ており、且つ、細胞培養用の基材として細胞生物学によって使用されている。マトリゲル（商標）を含む限定培地中のヒト胚性幹細胞の培養と維持のための方法が、例えば、Ludwig et al. (2006) に記載されており、且つ、造血系分化前の多能性細胞の培養のために用いられ得る。当業者に理解されるように、ヒト胚性幹細胞の培養と維持のためのその他の方法を本実施形態と共に用いることができることが理解される。

10

【0042】

III. NK細胞分化

本明細書に開示される方法は、未分化幹細胞（hESC、iPSC）より造血細胞を発生させるための適切な条件を提供することを対象にする。幹細胞の分化は胚様体（EB）の形成によって誘導される。転写因子と細胞表面抗原の発現の分析から、その方法により幹細胞が通常のヒト個体発生の中に観察されるものと類似の発生カインेटクスに従うようにすることができることと示唆される。

【0043】

hESCおよびiPSCなどの多能性幹細胞は無限の自己増殖が可能であるが、適切な条件下で分化するように誘導または支援されると骨髓造血細胞系列、赤血球造血細胞系列、および巨核球造血細胞系列に派生する能力を保持する。

20

【0044】

hESC由来NK（hESC-NK）細胞も直接細胞介在性細胞傷害および抗体依存的細胞介在性細胞傷害、ならびにサイトカイン産生（例えば、IFN γ ）に非常に優れている。hESC-NK細胞のようにiPSC由来NK（iPSC-NK）細胞も癌細胞を殺滅する類似の能力を獲得する。hESC-NK細胞とiPSC-NK細胞は成体末梢血から単離されたNK細胞と類似の活性化受容体および阻害性受容体を発現する。

【0045】

hESCおよびiPSCは2段階インビトロ分化計画を用いてNK細胞に分化することができる。その2段階分化計画は（ステージ1）遠心EBを使用する幹細胞からの造血前駆細胞の作製、および（ステージ2）ステージ1より得られた遠心EBからのNK細胞の分化を含む。2段階インビトロ分化計画の例が下で詳細に提供される。しかしながら当業者は、様々な方法が多能性細胞からの造血前駆細胞の作製のために使用され得ることを理解する。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,372,642号は造血前駆細胞を作製するための非常に効率的な培養系を詳述する。

30

【0046】

ステージ1. 遠心EBによるhESCまたはiPSCからの造血前駆細胞の作製例

1. TrypLE適応未分化hESC/iPSCを低密度MEFフィーダー上またはフィーダー細胞の非存在下で維持する。遠心EB分化を始める1日または2日前にTrypLE適応hESC/iPSCを新しいMEF（または無フィーダー系）に1:1の比率で継ぎ、それにより分化開示日にそれらの細胞が80%~90%の集密になる。

40

2. 遠心EBの播種を準備するために各96ウェルプレートの外側の36ウェルに150 μ lの滅菌水をピペットで分注して蒸発によるウェル体積の減少を最小限にする。

3. hESC/iPSCから培地を吸引し、1.0mlの加熱済みTrypLE Selectを各ウェルに添加する。ES/iPSCがプレートから剥離し始めるまでプレートを恒温器（37 $^{\circ}$ C）に設置する。TrypLEが加熱済みの場合、これには通常約5分かかり、プレートを5分よりも長く恒温器に設置したままにしないことが好ましい。

4. 解離させた細胞をコニカルチューブに収集し、ピペット内で上げ下げして集塊を壊す。TrypLEを1倍体積のウシ血清アルブミン（BSA）ポリビニルアルコール基本

50

脂質 B P E L 培地と少なくとも 1 倍体積の D P B S で希釈する。細胞を 1 5 0 0 r p m、8 で 5 分間遠心する。上清を除き、細胞を 5 m l の B P E L 培地と 5 m l の D P B S に再懸濁する。細胞を再度遠心する。

5 . 上清を除き、細胞を 5 ~ 1 0 m l の B P E L 培地に再懸濁する。集塊を除去するために細胞を 7 0 μ m のフィルターに通して新しい 5 0 m l のコニカルチューブに移す。フィルターに通した細胞の数を数え、播種のために使用される細胞を 5 0 m l のコニカルチューブに等分する。細胞を遠心し、そして、それらをステージ I 遠心 E B 分化培地で再懸濁して 3×10^4 細胞 / m l にする。

6 . 外側のウェルに 1 5 0 μ l の水を入れて準備した 9 6 ウェルプレートの内側の 6 0 ウェルのそれぞれに 1 0 0 μ l の細胞アリコットを移す。9 6 ウェルプレートを 4 8 0 g、8 で 4 分間遠心する。プレートを 3 7 、5 % C O ₂ で 8 ~ 1 1 日間、造血前駆 C D 3 4 + C D 4 5 + 細胞が作製されるまで保温する。E B が形成している分化の最初の 3 日の間はプレートを乱さないこと (注記 5) 。ある特定の条件下で C D 3 4 + 細胞のパーセンテージは約 4 0 % ~ 6 0 % であり得、C D 3 4 + C D 4 5 + 細胞のパーセンテージは最大で 2 0 % ~ 4 0 % であり得る。第 1 1 日までに好適な分化により初期 E B の周囲により多くの造血細胞があるはずである。E B 中に残っている大半の細胞は内皮 / 間葉系前駆細胞集団である。

【 0 0 4 7 】

上で考察したように、内皮前駆細胞のフィーダー不使用細胞作製のための他の方法を本実施形態に従って用いることができる。例えば、多能性細胞を造血前駆細胞または内皮細胞に分化させるある特定の方法は、a) 少なくとも 1 つの増殖因子 (すなわち、多能性の維持に適切な増殖因子) を含む限定培地中に複数の実質的に未分化の多能性細胞を獲得すること、b) B M P 4、V E G F、I L - 3、F l t 3 リガンド、および G M C S F を含まない、または基本的に含まない限定培地中でそれらを所望により培養すること、c) それらの複数の細胞における分化の促進に十分な量の B M P 4 と V E G F を含むさらなる限定培地においてそれらの細胞を培養すること、および d) それらの複数の細胞における増殖と分化の促進に十分な量の (1) I L - 3 および F l t 3 リガンド、または (2) V E G F、F G F - 2 または F G F 2 模倣物、および I G F のどちらかを含む限定培地においてそれらの細胞を培養すること、を含む (例えば、米国特許第 8 , 3 7 2 , 6 4 2 号を参照のこと) 。

【 0 0 4 8 】

ステージ 2 . N K 細胞の作成例

1 . 半分ずつの培地の交換を 5 ~ 6 日毎に実施する。最初の週の間には N K 細胞分化培地は 1 0 n g / m l の I L - 3 を含み、最初の培地の交換でそれを取り除く。N K 細胞発生の表現型解析はフローサイトメトリーにより実施され得る。

2 . 成熟 C D 4 5 + C D 5 6 + N K 細胞が得られる。それらの細胞はフローサイトメトリーにより表現型解析され得る。h E S / i P S 細胞由来 N K 細胞のインビトロ機能は標準 ^{5 1} C r 放出アッセイまたは細胞傷害性顆粒もしくはサイトカインの放出についての免疫学的アッセイによる腫瘍細胞 (例えば、K 5 6 2) への直接細胞溶解活性の測定によって分析され得る。

【 0 0 4 9 】

I V . 造血前駆細胞を作製するためのその他の方法

上記のとおり、一連の方法を用いてさらに N K 細胞の作製のための造血前駆細胞の集団を作製することができる。ある特定の好ましい態様では、造血前駆細胞は限定培養条件を用い、且つ、フィーダー細胞を使用することにより作製される。例えば、多能性細胞を部分的に、基本的に、または完全に解離または個別化した後にそれらの細胞を限定培地中でさらに培養して造血系分化を促進することができる。多能性細胞の造血前駆細胞と造血細胞系列への分化を実質的に促進することができるのは特別な組合せの増殖因子である。特別な組合せの増殖因子の順次適用を用いて多能性細胞の造血系分化をさらに促進することができる。ある特定の実施形態では、特別な組合せの増殖因子が多能性細胞の造血系分化

10

20

30

40

50

に重要である。例えば、BMP4、VEGF、Flt3リガンド、IL-3、およびGM-CSFの組合せを使用して造血系分化を促進することができる。ある特定の態様では、BMP4とVEGF（および所望によりFGF-2）を含む第1培地への細胞培養物の順次曝露と続くFlt3リガンド、IL-3、およびGM-CSFを含む第2培地中での培養により多能性細胞の造血前駆細胞および造血細胞への造血系分化を増加させることができる。幾つかの態様では、BMP4とVEGFを含有する培地にFGF-2（例えば、50 ng/ml）を含めて多能性細胞からの造血前駆細胞の作製効率を少なくとも2倍にすることができる。

【0050】

多能性細胞の造血前駆細胞への造血系分化は限定条件または非限定条件を用いて実施され得るが、結果生じる細胞をヒト対象に投与することが意図されている実施形態では限定条件が一般に好ましいことが理解される。造血幹細胞を多能性幹細胞より限定条件下で（例えば、TeSR培地およびマトリゲル（商標）などのマトリックス成分を用いて、またはE8培地中で）培養することができ、造血細胞はそれらの多能性細胞から得られた胚様体より作製され得る。他の実施形態では、多能性細胞をOP9細胞またはマウス胚性線維芽細胞上で共培養し、続いて分化させることができる。

【0051】

多能性細胞より分化過程の一部として胚様体を形成させることができる。分化誘導のための「胚様体」（EB）、または増殖細胞クラスターの形成は一般に多能性幹細胞のEBへのインビトロ凝集を伴い、且つ、内肺葉起源、外肺葉起源、および中肺葉起源を示す複数の種類の組織への多能性幹細胞の突発的で無作為な分化を可能とする。立体的なEBはこのように造血細胞および内皮細胞の一部を作製するために使用され得る。

【0052】

EBは上で詳述したように形成され得る。幾つかの態様では、マトリゲル（商標）被覆プレート上での無フィーダー培養に適応した未分化hESCまたはiPSCは集密時に約37で約10分間のコラゲナーゼIV（1 mg/ml）処理を用いて回収され得る。保温後にウェルを洗浄してコラゲナーゼが無い状態にし、EB基本培地中でウェルをこそぐことによりEBを形成することができる。その培地は次の日に様々なサイトカイン製剤を含有するEB分化培地に交換され得る。

【0053】

EB形成を促進するためにそれらの細胞を低結合性プレートに移し、約20%のBIT9500（ステムセル・テクノロジーズ社）またはセラム・リプレイスメント3、約1%のNEAA、約1 mMのL-グルタミン、および約0.1 mMのメルカプトエタノール、約0.75%のBSA、および約50 µg/mlのアスコルビン酸を添加されたIMDMを含有する「EB基本培地」の中で一晚培養することができる。次の日にそれらの細胞を各ウェルから回収し、遠心分離することができる。その後、それらの細胞を、その他の増殖因子を添加されたEB基本培地を含む「EB分化培地」に再懸濁することができる。例えば、幾つかの態様では、約10~100 ng/mlの骨形成因子（BMP-4）、例えば、約50 ng/mlのBMP-4、約10~100 ng/mlの血管内皮細胞増殖因子（VEGF）例えば、約50 ng/mlのVEGF、約25~75 ng/mlの幹細胞因子（SCF）、約25~75 ng/mlのFlt-3リガンド（Flt-3L）、約10~100 ng/mlのインターロイキン-3（IL-3）、約10~100 ng/mlのインターロイキン-6（IL-6）、所望により約20~40 ng/mlの顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、所望により約20~40 ng/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、所望により約0.2 U/mlのエリスロポエチン（EPO）、所望により約25 ng/mlのトロンプオエチン（TPO）、および所望により約25~75 ng/mlのFGF-2を添加されたEB分化培地を使用する。EBを15 mLチューブに移し、それらの凝集体を約5分間静置させることにより培地を4日毎に交換することができる。ある特定の実施形態では、EB分化培地はBMP4（例えば、約10~100 ng/ml）、VEGF（例えば、約10~100 ng/ml）、および所

10

20

30

40

50

望により FGF - 2 (例えば、約 25 ~ 75 ng/ml または約 50 ng/ml) を含むことができる。幾つかの態様では、BMP - 4、VEGF および所望により FGF 2 を添加された初回 EB 分化培地を使用し、続いて上で示されたように SCF、Flt - 3 リガンド、TPO、IL - 6 および / または IL - 3 を添加された第 2 EB 分化培地において培養する。

【0054】

上清を吸引し、新しい分化培地と交換することができる。あるいは、2日毎に細胞に新しい培地を半分ずつ供給することができる。それらの細胞を分化過程の間の異なる時点で回収することができる。

【0055】

例えば、限定培地を使用して造血系 CD34 + 分化を誘導することができる。上で詳述したように、その限定培地は増殖因子 BMP - 4、VEGF、Flt3 リガンド、IL - 3 および / または GM-CSF を含有し得る。多能性細胞を、BMP4、VEGF、および所望により FGF - 2 を含む第 1 限定培地の中で培養し、続いて (Flt3 リガンド、IL - 3、および GM-CSF) か (Flt3 リガンド、IL - 3、IL - 6、および TPO) のどちらかを含む第 2 培地の中で培養することができる。その第 1 培地と第 2 培地は SCF、IL - 6、G-CSF、EPO、FGF - 2、および / または TPO のうちの 1 つ以上を含んでもよい。実質的な低酸素状態 (例えば、20% 未満の O₂) は造血系分化または内皮分化をさらに促進し得る。

【0056】

細胞は機械的手段または酵素的手段により (例えば、トリプシンまたは TrypLE (商標) を用いて) 実質的に個別化され得る。Rho キナーゼ阻害剤 (ROCK 阻害剤; 例えば、H1152 または Y - 27632) を培地を含めてもよい。これらのアプローチは、例えば、ロボットによる自動化を用いて自動化され得ると予想される。

【0057】

多能性細胞の造血前駆細胞への造血系分化に限定的方法を用いることがある特定の例では好ましくあり得るが、それにもかかわらず非限定的アプローチが様々な実施形態において用いられ得る。ヒト ESC から造血幹細胞を分化させるための 1 つの非限定的方法はマウス胚性線維芽細胞 (MEF) フィーダー層またはマウス間質細胞株 OP9 などのフィーダー細胞上で ESC を培養することを伴い、それにより CD34 + への強固な分化が誘導される。簡単に説明すると、ESC を増殖因子の存在下で MEF 上に培養することができ、それらの MEF はそれらの細胞へ基材とおそらくは幾つかの栄養を提供する。限定条件と対照的に OP9 細胞の使用は一般に CD34 + 分化を誘導するために特別な増殖因子を必要としない。これらの過程が起こる機構は完全には理解されていない。このアプローチをある特定の増殖因子および血清と併用することもできる (Wang, 2007)。MEF は、多くの場合、ヒト ESC の培養と維持にも使用される。下記のプロトコルなどのマウス胚性線維芽細胞上での培養を活用する方法は FBS の代わりに Knockout (商標) 血清代替物を含むように改変され得る。

【0058】

次の非限定プロトコルを多能性細胞の造血細胞への造血系分化のために用いることができる。H1 細胞を日常的に MEF 上で維持し、その後、MEM + 20% の限定 FBS + 100 ng/ml の TPO の中にほぼ集密状態の OP9 間質細胞上に 1 × 10⁵ 細胞 / ウェル (1 ウェルは 9.6 cm² である) の割合で移転させることができる。細胞に新しい培地を第 2 日と第 4 日に供給することができる。第 7 日にコラゲナーゼ IV を使用して細胞を新しい OP9 細胞に移して 1 : 3 に分けることができる。細胞に新しい培地を第 8 日と第 10 日に供給することができる。第 11 日にコラゲナーゼ IV を使用して細胞を新しい OP9 細胞に移して 1 : 1 に分け、続いてトリプシン / EDTA により個々の細胞を獲得し、且つ、培地を MEM + 10% の限定 FBS + 100 ng/ml の TPO に交換することができる。第 14 ~ 16 日からさらに 1 ml のこの培地を添加することにより細胞に栄養補給することができる。ある特定の実施形態では、OP9 細胞が関与する分化方法

10

20

30

40

50

は、全体が参照により具体的に組み込まれる Gaur et al., 2006 に記載されるように実施され得る。

【0059】

V. 限定培地と成分

本明細書に記載されるように、好都合にも1つ以上の限定培地を使用して多能性細胞の造血前駆細胞および/またはNK細胞への造血系分化を促進することができる。とりわけ、血清およびマウスフィーダー層などの動物製品の排除により動物製品への細胞の曝露に関するリスクを減少させることができ、より安全にヒト対象へ投与され得るだろう細胞の作製が可能になる。伝統的な幹細胞培養物の発生は幹細胞の様々な細胞種への分化に適した血清製品とマウスフィーダー層に依存していたので、これらの伝統的手法は分化が実施され得る規模を制限し、生物学的変動性と汚染物混入の可能性を上昇させ、且つ、他の場合であれば有用であることが分かるところであるES細胞の応用治療法における使用を非常に妨げてきている。本実施形態に従って使用され得る様々な培地成分が下に詳述される。

10

【0060】

A. 増殖因子

様々な増殖因子を使用して多能性細胞の造血前駆細胞への造血系分化を促進することができる。ある特定の実施形態では、本実施形態の限定培地は、例えば、(BMP-4およびVEGF)または(BMP-4、VEGF、FLT-3、IL-3、およびGM-CSF)などの1つ、2つ、またはそれより多くの増殖因子を含有し得る。

20

【0061】

本実施形態の限定培地に含めることができる増殖因子にはBMP-4、VEGF、bFGF、幹細胞因子(SCF)、Flt3リガンド、IL-3、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-15、インスリン関連増殖因子1(IGF1)、インスリン関連増殖因子2(IGF2)、エリスロポエチン(EPO)、トロンプオエチン(TPO)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSFまたはGM-CSF)、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSFまたはG-CSF)が含まれるが、これらに限定されない。本実施形態の限定培地はこれらの因子の内の1つ、2つ、3つ、またはそれより多くを含有し得る。例えば、細胞の増殖を向上させるために、または細胞の分化状態を調節するために他の増殖因子を限定培地に含めることができる。ある特定の実施形態では、限定培地は少なくとも(BMP-4およびVEGF、および所望によりFGF-2)または(FLT-3、IL-3、およびGM-CSF)を含有し得る。これらの実施形態では、必要ではないが、1つ以上の追加の増殖因子を限定培地に含めることができる。例えば、GM-CSFは分化過程の第2段階で約25 ng/mlのTPOまたはSCFを使用して置換され得る。様々な量(例えば、Yamamura et al., 2008、Fadilah et al., 2007、Bashey et al., 2007に記載の量)のこれらの因子を使用して細胞応答を刺激することができる。例えば、細胞の細胞増殖または分化を促進するために約1~50 ng/ml、約5~25 ng/ml、または約10 ng/mlのTPOを含めることができる。様々な実施形態では、SCFを約5~100 ng/mlまで、約10~50 ng/mlまで、または約25 ng/mlの濃度で限定培地に含めることができる。様々な実施形態では、IL-6を約5~50 ng/mlまで、約5~25 ng/mlまで、または約10 ng/mlの濃度で限定培地に含めることができる。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は造血前駆細胞からの顆粒球の作製のために使用され得る。

30

40

【0062】

1. BMP-4

骨形成タンパク質-4(BMP-4)は骨形成タンパク質グループのメンバーであり、腹部中肺葉誘導物質である。BMPは成体のヒト骨髄(BM)において発現し、且つ、骨再形成と骨成長に重要である。ある特定の実施形態では、BMP4を含むことは培養の最初の2~3日に必要とされるだけであり、その後はその系から取り除くことができ、分化

50

に有害な効果は無い。

【0063】

BMP-4は造血前駆細胞の増殖能と分化能の調節に重要である (Bhardwaj et al., 2001、Bhatia et al., 1999、Chadwick et al., 2003)。なお、BMP-4はヒト胎児、新生児、および成体の造血前駆細胞における初期造血細胞発生を調節することができる (Davidson and Zon, 2000、Huber et al., 1998、Marshall et al., 2000)。例えば、BMP-4は成体供給源および新生児供給源からの高純度未分化ヒト造血細胞 (primitive human hematopoietic cell) の増殖と分化を調節することができる (Bhatia et al., 1999)、BMP-4はヒト胚性幹細胞において造血系分化を促進することができる (Chadwick et al., 2003)。

10

【0064】

BMP-4を約5~100 ng/mL、約20~100 ng/mL、約20~50 ng/mL、約10~30 ng/mL、約15~30 ng/mL、約20~30 ng/mL、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で限定培地に含めることができる。ある特定の実施形態では、BMP-4は限定培地の中に約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度で含まれる。

【0065】

2. VEGF

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は胚循環系の形成と血管形成に関与する重要なシグナル伝達タンパク質である。VEGFは血管内皮および他の細胞種 (例えば、ニューロン、癌細胞、腎臓上皮細胞) を含む様々な細胞種に影響を与え得る。インビトロではVEGFは内皮細胞の細胞分裂促進と細胞移動を刺激することができる。VEGF機能は癌、糖尿病、自己免疫疾患、および眼血管疾患を含む様々な疾患状態において重要であることも示されている。

20

【0066】

VEGFを約10~100 ng/mLまで、約20~100 ng/mLまで、約10~50 ng/mLまで、約15~30 ng/mLまで、約20~30 ng/mLまで、約20~50 ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で限定培地に含めることができる。ある特定の実施形態では、VEGFは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度で含まれる。

30

【0067】

3. FGF-2

塩基性線維芽細胞増殖因子はbFGFまたはFGF-2とも呼ばれ、四肢神経系の発生、創傷治癒、および腫瘍増殖を含む広範囲の生物学的プロセスに関係があるとされている増殖因子である。bFGFはヒト胚性幹細胞のフィーダー非依存増殖を支援するために使用されてきているが (Ludwig et al., 2006)、以前の研究より、bFGFが造血細胞の発生または生存に影響を与える可能性はないことが示されている (Ratajczak et al., 1996)。ある特定の実施形態では、bFGFは分化誘導のために必要とされない。したがって、様々な実施形態では、それは本実施形態の培地に含まれ得る、または本実施形態の培地から除外され得る。

40

【0068】

bFGFを約5~約100 ng/mLまで、5~約50 ng/mLまで、約5~約25 ng/mLまで、約25~約50 ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で限定培地に含めることができる。ある特定の実施形態では、bFGFは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または約75 ng/mLの濃度で含まれる。これらの濃度は多能性細胞を未分化状態または実質的な未分化状態で維持するために使用される培地に特に

50

有用であり得る。様々な実施形態では、FGF2（例えば、約100 ng/mlの）を細胞の多能性の維持のために使用することができる。造血系分化を促進するために細胞を約5 ~ 50 ng/mlの間の濃度のFGF2に曝露することができる。

【0069】

様々な実施形態では、より低い濃度のbFGFを造血系分化の前の「事前調整」培養期において限定培地に含めることができる。例えば、約5 ng/mlから約50 ng/mlまで、約10 ng/mlから約30 ng/mlまで、約15 ng/mlから約25 ng/mlまで、約50 ng/ml未満、約40 ng/ml未満、約30 ng/ml未満、または約10、15、20、25、または30 ng/mlのbFGFを細胞の造血前駆細胞への分化前に多能性細胞の事前調整培養物における限定培地に含めることができる。ある特定の10 実施形態では、bFGF（例えば、約25 ~ 75 ng/mlまたは約50 ng/ml）またはFGF-2と0.1 ng/mlのTGF- β を添加された増殖因子を含まないTeSR培地を造血系分化の前の多能性細胞の事前調整培養物において使用することができる。ある特定の10 実施形態では、この事前調整ステップは後の造血系分化の誘導に必須であり得る。

【0070】

多能性細胞が（例えば、TGF- β とFGF-2を添加された増殖因子を含まないTeSR培地中において約1日間）事前調整された後、次いでBMP4、VEGF、およびFGF-2（例えば、約25 ~ 50 ng/ml）を含むEB分化培地の中に細胞を入れることができる。下の実施例に示されるように、FGF-2を含むことによりhESCまたは20 iPSCなどの多能性細胞の造血前駆細胞への造血系分化の効率が少なくとも2倍になり得る。

【0071】

ある特定の実施形態では、酸性FGF（aFGF）、FGF4、FGF9、FGF17またはFGF18などの他の線維芽細胞増殖因子をbFGFと、例えば、上記の濃度で置換することができる、または共に含めることができると考えられる。あるいは、FGF-2模倣化合物をFGF-2と置換して実質的または基本的に同じ作用を促進することができる。FGF-2模倣物にはFGF-2模倣ペプチド、抗体、および小分子が含まれる。例えば、合成ペプチドF2A4-K-NSはFGF-2の作用をインビトロおよびインビボで模倣し（Lin et al., 2006）、且つ、本実施形態の様々な実施形態30 においてFGF-2と置換され得る。

【0072】

FGルーブ（FGL）ペプチドは本実施形態のある特定の実施形態において使用することができるFGF-2模倣物の別の例である。FGLは、NCAMのFGFR1への結合部位の部分であるNCAMの第2のF3モジュール中の15アミノ酸配列である。FGLはFGFR1に結合、これを活性化すること、および神経突起伸長を刺激することが示されている（Kiselyov et al., 2003）。

【0073】

BioSET F2AペプチドもFGF-2と置換され得る。BioSET F2Aペプチド天然ヒトFGF-2増殖因子の合成模倣物である。BioSET F2Aペプチド40 とF2A4-KNSペプチドはFYITLニエ社またはバイオサーフェイス・エンジニアリング・テクノロジーズ社（「BioSET」）より入手可能である。FGF-2模倣化合物の組合せも本実施形態の様々な実施形態においてFGF-2と置換され得ることが考えられる。

【0074】

4. IL-3

インターロイキン-3（IL-3）は多能性造血細胞の生存、増殖および分化に関与する造血性増殖因子である。ヒトを含む5種の哺乳類動物においてIL-3をコードする遺伝子が単離され、発現されて成熟型組換えタンパク質を産出している。ヒトIL-3遺伝子は2個の保存的システイン残基と2か所の可能性のあるN-結合グリコシル化部位を有50

する133アミノ酸からなるタンパク質をコードする(Wagemaker et al., 1990)。

【0075】

ある特定の実施形態では、IL-3は本実施形態の培地の中に2.5~約50ng/mLまで、2.5~約50ng/mLまで、約5~約50ng/mLまで、約5~約25ng/mLまで、約5~約15ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、IL-3は限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、または約30ng/mLの濃度で含まれる。下の実施例に示されるように、Flt3リガンドとIL-3は多能性細胞の造血前駆細胞への造血系分化に対して相乗的作用を及ぼし得る。ある特定の実施形態では、IL-3を含むことは多能性細胞の培養の最初のおよそ1~3週間に、または多能性細胞の造血系分化を促進するための培地の中での培養のおよそ5日目からおよそ7日目までに培地の中に含まれ、その後はその系から取り除くことができ、分化に有害な効果はほとんど、または基本的に無い。

10

【0076】

5. FLT3リガンド

Flt3リガンドはFLT-3リガンドとも呼ばれ、FLT3の内在性リガンドである。FLT3は未成熟造血前駆細胞によって発現される受容体チロシンキナーゼである。FLT3のリガンドは経膜タンパク質または可溶性タンパク質であり、且つ、造血系細胞および骨髄間質細胞を含む様々な細胞によって発現される。他の増殖因子と組み合わせるとFlt3リガンドは幹細胞、骨髄前駆細胞およびリンパ系前駆細胞、樹状細胞およびナチュラルキラー細胞の増殖および発生を刺激することができる。受容体の活性化により、造血細胞における増殖、生存および他のプロセスを制御する様々なシグナル伝達経路に關与することが知られている様々な重要なアダプタータンパク質のチロシンリン酸化が引き起こされる。FLT3とFLT3に影響する突然変異は白血病の予後と治療など、病理学上の疾患にも重要である(Drexler et al., 2004)。

20

【0077】

ある特定の実施形態では、Flt3リガンドは本実施形態の培地の中に5~約100ng/mLまで、5~約50ng/mLまで、約10~約30ng/mLまで、約15~約30ng/mLまで、約20~約30ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、Flt3リガンドは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50ng/mLの濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、Flt3リガンドは多能性細胞の培養の最初のおよそ1~3週間に、または多能性細胞の造血系分化を促進するための培地の中での培養のおよそ5日目からおよそ7日目までに培地の中に含まれ、その後はその系から取り除くことができ、分化に有害な効果はほとんど、または基本的に無い。

30

【0078】

6. 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子はGM-CSFまたはGMCSFと略記されることもあり、マクロファージ、T細胞、肥満細胞、内皮細胞および線維芽細胞によって分泌されるタンパク質である。GMCSFは白血球増殖因子として機能し得るサイトカインであり、GMCSFは幹細胞を刺激して顆粒球(好中球、好酸球、および好塩基球)および単球を産生することができる。単球は血液循環より退出し、マクロファージに成熟することができる。したがって、GMCSFは免疫/炎症カスケードにおける役割を果たすことができ、それによって少数のマクロファージの活性化が、感染に立ち向かうための重要なプロセスであるそれらの数の急速な増加を引き起こすことができる。活性型のGMCSFは通常インビボではホモ二量体として細胞外に見出される。GMCSFは酵母細胞内で発現されるとモルグラモスチムまたはサルグラモスチム(リューカイン)とも呼ばれる。ある特定の実施形態では、組換え技術により作製された増殖因子を使用して多能性細胞の造血系分化を促進することができる。

40

【0079】

50

ある特定の実施形態では、GMCSFは本実施形態の培地の中に約2.5～約100 ng/mLまで、2.5～約50 ng/mLまで、約5～約50 ng/mLまで、約5～約25 ng/mLまで、約5～約15 ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、GMCSFは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、または約30 ng/mLの濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、GMCSFリガンドを含むことは多能性細胞の培養の最初のおよそ1～3週間に、または多能性細胞の造血系分化を促進するための培地の中での培養のおよそ5日目からおよそ7日目までに培地の中に含まれ、その後はその系から取り除くことができ、分化に有害な効果はほとんど、または基本的に無い。

【0080】

10

7. 幹細胞因子

幹細胞因子(SCF)はCD117(c-Kit)に結合するサイトカインである。SCFは「KITリガンド」、「c-kitリガンド」、または「スチール因子」としても知られる。SCFは2つの形態で、すなわち、細胞表面結合型SCFと可溶性(または遊離型)SCFの形態で存在する。可溶性SCFは通常メタロプロテアーゼによる表面結合型SCFの切断によりインビボで産生される。SCFは造血幹細胞および他の造血前駆細胞の生存、増殖、および分化に重要であり得る。インビボではSCFは赤血球系における最初期の赤血球前駆細胞であるBFU-E(赤芽球バースト形成単位)細胞をCFU-E(赤血球コロニー形成単位)に変えることができる。

【0081】

20

ある特定の実施形態では、SCFは本実施形態の培地の中に約5～約100 ng/mLまで、5～約50 ng/mLまで、約10～約30 ng/mLまで、約15～約30 ng/mLまで、約20～約30 ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、SCFは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度で含まれる。

【0082】

8. IL-6

インターロイキン-6(IL-6)は炎症誘発性サイトカインである。インビボではIL-6はT細胞とマクロファージによって分泌され、且つ、炎症を引き起こす外傷または他の組織損傷に対する免疫応答を刺激する。IL-6はある特定の細菌に対する応答において役割を果たすこともでき、骨芽細胞はインビボでIL-6を分泌して破骨細胞形成を刺激する。ヒトでは数多くの血管の中膜における平滑筋細胞が炎症誘発性サイトカインとしてIL-6を産生することができ、IL-6は発熱の重要なインビボメディエーターである。

30

【0083】

ある特定の実施形態では、IL-6は本実施形態の培地の中に約2.5～約100 ng/mLまで、2.5～約50 ng/mLまで、約5～約50 ng/mLまで、約5～約25 ng/mLまで、約5～約15 ng/mLまで、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、IL-6は限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、または約30 ng/mLの濃度で含まれる。

40

【0084】

9. TPO

トロンボポエチンまたはTPOは主に肝臓と腎臓によってインビボで産生され、且つ、骨髄において血小板のインビボ産生に関与する糖タンパク質ホルモンである。ある特定の実施形態では、TPOは本実施形態の培地の中に約2.5～約100 ng/mLまで、5～約75 ng/mLまで、約10～約50 ng/mLまで、約15～約35 ng/mLまで、約25 ng/mL、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で含まれる。ある特定の実施形態では、TPOは限定培地の中に約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45または約50 ng/mLの濃度で含まれる。

50

【0085】

B. ROCK阻害剤およびPKC阻害剤

本発明の一層さらなる態様では、ES細胞のアポトーシスを減少させる、または（例えば、細胞集団の分割中またはEBの形成前の）細胞の解離の後に生存を促進する分子などの追加の培地成分をES細胞増殖培地の中に入れることができる。限定培地はES細胞の播種、培養、維持、または分化のために使用され得、且つ、Rho非依存性キナーゼの阻害剤および/またはタンパク質キナーゼC（PKC）の阻害剤を含有し得る。ある特定の実施形態では、ROCK阻害剤および/またはPKC阻害剤を使用して個別化後の多能性細胞の生存分化効率を向上させることができる。ある特定の実施形態では、ROCK阻害剤および/またはPKC阻害剤を、TeSRまたはmTeSR培地およびマトリック成分を含む播種用培地に入れることができる。

10

【0086】

ある特定の実施形態では、限定培地はY-27632またはその誘導体のような1つ以上のRho関連キナーゼ阻害剤を含み得る。さらに、幾つかの態様では、限定培地はHA-100を含み得る。

【0087】

HA-100またはY-27632はES細胞増殖培地中に、例えば、約1~15 μM、5~15 μM、1~30 μM、5~30 μM、または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 μM、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で存在し得る。ある特定の実施形態では、HA-100またはY-27632はES細胞増殖培地中に約10~20 μMで存在する。

20

【0088】

本実施形態に従うES細胞増殖培地に入れることができる他のROCK阻害剤にはH-1152（（S）（+）2メチル1〔（4メチル5イソキノリニル）スルホニル〕ホモピペラジン）が挙げられる。H-1152はHA-100よりも約10倍高い力価を示す。したがって、H-1152はES細胞増殖培地中に、例えば、約0.1~10 μM、約0.5~5 μM、約1~3 μM、または約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、または5 μM、またはそれらの中に導き出せるあらゆる範囲の濃度で存在し得る。ある特定の実施形態では、HA-100はES細胞増殖培地中に約1 μMで存在する。個別化されたヒトES細胞の96ウェルプレートにおける非常に効率的な（HA-100と類似しているが、10倍低い濃度での）播種を可能とするH-1152。他の場合であれば細胞集塊の状態で継代される個別化されたHES細胞はより均一なウェル当たりの細胞密度を可能とし、それは細胞ベースの小分子スクリーニングの厳密な前提条件である。H-1152はこのように本実施形態に従う自動化細胞培養を伴うES細胞ベースの小分子スクリーニングのプロトコルにおいて使用され得る。H-1152は以前に、例えば、参照により本明細書に組み込まれるIkenoya et al. 2002 およびSasaki et al. 2002に記載されている。

30

【0089】

ES細胞増殖培地に入れることができる他のROCK阻害剤にはY-27632、N-（4-ピリジル）-N'-（2,4,6-トリクロロフェニル）ウレア、3-（4-ピリジル）-1H-インドール、グリシル-H1152（（S）（+）2メチル-4-グリシル-1-（4-メチルイソキノリニル-5-スルホニル）ホモピペラジン）および/またはHA100（ヒドロキシファスジル（Hydroxyfausdil））が挙げられる。Y-27632（（R）-（+）-trans-4-（1-アミノエチル）-N-（4-ピリジル）シクロヘキサンカルボキサミド）はシグマ・アルドリッチ社から市販されており、以前に記載されている（例えば、Maekawa et al., 1999、Davies et al., 2000を参照のこと）。

40

【0090】

細胞生存を促進するために使用することができる例となるROCK阻害剤にはHA10

50

0、H1152、(+) trans 4 (1 アミノエチル) 1 (ピリジン 4 イルアミノカルボニル)シクロヘキサジヒドロクロリド-水和物(例えば、国際公開第00078351号、国際公開第00057913号)、イミダゾピリジン誘導体(例えば、米国特許第7348339号)、置換型ピリミジン誘導体およびピリジン誘導体(例えば、米国特許第6943172号)および置換型イソキノリンスルホニル化合物(例えば、欧州特許出願公開第00187371号)が含まれるが、これらに限定されない。

【0091】

PKC阻害剤をROCK阻害剤と組み合わせて、またはROCK阻害剤の代替物として使用することが予想される。例えば、造血前駆細胞への分化前に多能性細胞を解離または個別化させた後に、例えば、PKC阻害剤を使用して細胞生存を促進することができる。使用することができるPKC阻害剤には、例えば、V5ペプチド(例えば、米国特許第7459424号)、ポリミキシンB、カルホスチンC、パルミトイル-DL-カルニチン、ステアロイルカルニチン、ヘキサデシルホスホコリン、スタウロスポリンおよびその誘導体、サンギバマイシン；サフィンゴール、D-エリスロ-スフィンゴシン；塩化チレリスリン、メリチン；塩化デカリニウム；エラグ酸、HBDE、1-O-ヘキサデシル-2-O-メチル-rac-グリセロール、ヒペルシン(Hypercin)、K-252、NGIC-J、フロレチン、ピセアタンノール、クエン酸タモキシフェン、置換型ピペラジンおよびチアジン(例えば、米国特許第6815450号)が含まれる。

【0092】

C.他の成分

限定培地は栄養素、アミノ酸、抗生物質、緩衝剤などのような追加の成分を含有することもできる。ある特定の実施形態では、本実施形態の限定培地は非必須アミノ酸、L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシン、およびモノチオグリセロールを含有し得る。

【0093】

BIT9500(ステムセル・テクノロジー社、バンクーバー、カナダ)を本実施形態の限定培地中に、例えば、およそ約10%から約30%までの量で、または約20%の量で含めることもできる。BIT9500はイスコブMDM中に事前試験済みのバッチのウシ血清アルブミン、インスリンおよびトランスフェリン(BIT)を含有する。BIT9500は50mg/mLのウシ血清アルブミン(NaHCO₃により緩衝)、50μg/mLのrhインスリン、1mg/mLのヒトトランスフェリン(鉄飽和済み)を含有する。ある特定の実施形態では、KOSRは限定培地が必要とされない実施形態においてBIT9500と置換され得る。KOSRは(例えば、ギブコ/インビトロジェン社より、カタログ番号10828)市販されており、以前に国際公開第98/30679号に記載されている非限定培地である。

【0094】

BITの使用は、上記のように、HITによって置換され得る。HITは、血清アルブミンなどの成分がヒトの成分(例えば、ヒト血清アルブミン)であることを除いてBITについて記載された組成物を含む。例えば、HITの使用は可能性がある感染症などのリスクが特に懸念される実施形態において好ましくあり得る。

【0095】

セラム・リプレイスメント3(シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州)もBIT9500と置換され得る。セラム・リプレイスメント3はヒトタンパク質だけ(すなわち、ヒト血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、ヒト組換えインスリン)を含有する。セラム・リプレイスメント3は増殖因子、ステロイドホルモン、グルココルチコイド、細胞接着因子、検出可能なIgまたは有糸分裂促進因子を含有しない。下の実施例に示されるように、セラム・リプレイスメント3を含むことは、ある特定の実施形態では、分化をさらに促進し得る。

【0096】

様々な実施形態では、限定培地は1種以上のビタミン、ミネラル、塩、脂質、アミノ酸

10

20

30

40

50

、または他の成分を含有し得る。例えば、本実施形態の限定培地は T e S R 培地に存在する 1 つ以上の成分を、例えば、T e S R に含まれるのと同じまたは同等の濃度で含有し得る。

【 0 0 9 7 】

V I . 細胞の分離

胚性幹細胞または i P S C からの造血（例えば、C D 3 4 + 、C D 4 3 + ）前駆細胞の調製後にその細胞集団からさらに進んだ細胞、または実質的に分化した細胞（例えば、造血前駆細胞、内皮細胞など）の 1 つ以上の亜集団を実質的に精製または分離することが望ましいことがあり得る。F A C S などのフローサイトメトリー、または磁気活性化細胞選別を用いる細胞分離の方法を用いて異種細胞集団から造血細胞を分離することができる。例となる細胞分離プロトコルも下の実施例に示されている。

10

【 0 0 9 8 】

A . 磁気活性化細胞選別 (M A C S)

磁気活性化細胞選別機 (M A C S) を使用して分化した h E S C から細胞を単離することができる。M A C S は通常抗 C D 3 4 抗体などの抗体を磁性ビーズと組合せて利用してカラム上で細胞を分離する。M A C S は、ある特定の形態では、おそらくは F A C S に伴う細胞へのレーザー照射のため、F A C S と比べて細胞に対してより穏やかであり、細胞の生存性と完全性に好適に影響し得る。

【 0 0 9 9 】

M A C S M i c r o B e a d s (商標) カラムまたは A u t o M A C S (商標) (ミルテニー・バイオテック社、カリフォルニア州、米国) を含む様々な M A C S 製品が市販されており、それらは製造業者の指示書に従って使用され得る。P B S / 0 . 5 % B S A (E D T A 無し) を細胞単離の緩衝液として使用することができる。幾つかの実験では、死細胞除去キット (ミルテニー・バイオテック社) を使用して C D 3 4 + 細胞の単離前に死細胞を除去することができる。必要であれば、繰返し M A C S カラムを使用することができる。

20

【 0 1 0 0 】

B . F A C S

蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を用いて C D 3 4 + 細胞を分離することもできる。F A C S は細胞を分離するために、例えば、蛍光タグを含む抗 C D 3 4 抗体への結合に起因して細胞により示される程度または蛍光を活用する。この様に F A C S は異種細胞集団から造血系 C D 3 4 + 細胞を分離するために使用され得る。

30

【 0 1 0 1 】

例えば、次のプロトコルを用いて造血細胞を定量するための F A C S を実施することができる。細胞は 1 % F B S または 0 . 5 % B S A を含有する P B S 中で調製され、モノクローナル抗体 (m A b) の組合せ、例えば、C D 3 1 - P E (クローン W M - 5 9) 、 C D 3 4 - A P C (クローン 5 8 1 、 8 G 1 2) 、 C D 4 5 - F I T C (クローン H I 3 0) (全て B D ファーミジェン社より) 、および K D R - P E (クローン 8 9 1 0 6) (R & D システム社) を用いて 4 で 1 5 ~ 3 0 分間標識され得る。特定の抗体について 1 : 5 0 希釈と I g G 対照について 1 : 2 0 0 希釈を用いることができる。試料は F A C S C a l i s b u r (商標) (ベクトン・ディッキンソン社、ニュージャージー州、米国) または別の類似の機器により分析され得る。

40

【 0 1 0 2 】

V I I . バイオリアクターとロボットによる自動化

幹細胞の培養および / または多能性細胞からの N K 細胞の分化のための 1 つ以上のステップを自動化することができる。ロボットまたは他のものによる自動化を用いる工程の自動化により細胞の生産、培養、および分化のためのより効率的で経済的な方法が可能になり得る。例えば、ロボットによる自動化はヒト胚性幹細胞の培養、継代、培地の添加、分化培地の添加、分化培地での培養、および、例えば磁気分離または F A C S を用いる細胞種の分離のうちの 1 つ以上に当たって活用され得る。

50

【0103】

バイオリアクターを本実施形態に従う細胞（例えば、ヒト胚性幹細胞、CD34+細胞、造血細胞など）の培養、維持、および/または分化のための本実施形態に当たって使用することもできる。バイオリアクターには細胞量の増加をもたらすために工程の「大規模化」を可能にするという利点がある。バッチバイオリアクター、フェドバッチバイオリアクター、連続バイオリアクター（例えば、連続攪拌タンクリアクターモデル）、および/またはケモスタットを含む様々なバイオリアクターを本実施形態に対して使用することができる。

【0104】

例えば、スピナーフラスコを使用して、増加した数の細胞の生産を可能にするために多能性細胞の維持および/または分化のための方法を大規模化することができる。ある特定の実施形態では、次のプロトコルを使用してスピナーフラスコにおけるにおけるEB形成を促進することができる：未分化状態のhESCとiPSCをマトリゲル被覆プレート上での無フィーダー培養に適應させ、且つ、集密時に、例えば、約37で約5分間のTrypLE処理を用いて回収することができる。それらの細胞は、約20%のBIT9500（ステムセル・テクノロジーズ社）またはセラム・リプレイスメント-3（シグマ・アルドリッチ社）、約1%のNEAA、約1mMのL-グルタミン、および約0.1mMのメルカプトエタノール、約0.75%のBSA、約50ug/mlのアスコルビン酸および約1μMのROCK阻害剤（例えば、H-1152）を添加されたIMDMを含有するEB基本培地中に回収され得る。その後、それらの細胞をml当たり約50~200万細胞の密度でスピナーフラスコ（例えば、125mlのコーニング社の）に入れることができる。スピナーを30~40rpmに一晚設定してEB形成を促進することができる。あるいは、それらの細胞を低結合性プレート中に静置条件下で24時間置くことができるだろう。細胞密度および/またはスピナーフラスコの運動の速度は使用する特定のスピナーフラスコまたはバイオリアクターに応じて変わり得ることが一般に認識されている。およそ12~24時間の培養の後にそれらの細胞を、例えば、約60RPMの速度で回転するスピナーフラスコ内の磁気攪拌プラットフォーム上のROCK阻害剤を含まないがサイトカインを含むEB分化培地の中に入れることができる。スピナーフラスコのサイドキャップを緩めてガス移動を可能にすることができる。それらの細胞をBMP-4、約VEGF、およびFGF-2が添加されたEB基本培地中に入れることができる。分化のおよそ4日目に懸濁されたEB凝集体がフラスコの底に15~20分間定着できるようにスピナーフラスコを動かさずにいることによってそれらの細胞に栄養を供給することができる。その後、消費された培地を吸引することができる（例えば、125mlのスピナー内に約20mlが残るようにする）。その後、それらの細胞を穏やかに回転させることができ、且つ、BMP-4、VEGF、およびFGF-2を含有する新しい培地をそれらの細胞に添加することができる。実質的により早い、または遅い回転速度を利用することができることが予想されるが、スピナーフラスコを造血系分化の全過程を通して約40~60rpmに設定することができる。分化のおよそ5~6日目に消費された培地を上記のように吸引した。それらの細胞を追加の増殖因子が添加されたEB基本培地に入れることができる。消費された培地を上記のようにおよそ8日目と10日目に吸引することができる。EB培養物を分化のおよそ12日目に回収することができる。細胞表面マーカー（例えば、CD34+またはCD45+）の表現型発現について染色して集団の造血前駆細胞量を定量することができる。

【0105】

本実施形態に関する使用が具体的に考えられるロボットによる自動化は、例えば、テカン社（カリフォルニア州、米国）から入手され得る。ロボット工学はキャップ穴開けプローブおよび試料間の持越しを最小化するための使い捨てチップなどの液体処理ツールを含み得る。様々な実施形態では、ロボット工学は（例えば、hESCの維持または増殖、hESCの造血細胞への分化、または赤血球などの後の系譜への造血細胞の分化などの間に）細胞を培養するための1つ以上のバイオリアクターと併せて利用され得る。下の実施例

10

20

30

40

50

に示されるように、造血前駆細胞の維持と作製のための条件はテカンCellerity (商標)システム(工業的に適当なロボットプラットフォーム)を使用して少なくとも部分的または完全に自動化され得る。テカンCellerity(商標)は、テカン液体処理ロボット(Freedom EVO 200)、500個のロボフラスコ(商標)に対する収容能力を有する自動化恒温器(Storex 500)、培地貯蔵冷蔵庫、Cedex細胞計数器、懸濁液細胞の増殖および播種のためのスピナーフラスコ、およびプレートと8チャンネル固定化チップピペットを扱うためのROMAロボットアームを装備している。EB分化プロトコルの一部、基本的に全て、または全てを自動化することができる。例えば、分化の12日目にそれらの細胞をテカンCellerityシステムにより回収し、マーカーの細胞表面染色のために手作業で洗浄することができる。染色後にそれらの細胞を、Accuriフローサイトメーターに連結したHypercytを使用して分析することができる。この過程は造血前駆細胞集団のハイスループットスクリーニングに使用され得る。ある特定の実施形態では、未分化hESCまたはiPSCは、例えば、マトリゲル(商標)被覆ロボフラスコ(コーニング社)を上記の方法により使用してロボット上で培養され得る。EBの維持、播種、栄養供給、および/または回収は、例えば、テカンCellerity(商標)システムを使用して部分的または完全に自動化され得る。このロボットはスピナーフラスコを含むための収容能力を有し、またはバイオリアクターが多数の細胞を作製するために使用され得る。

【0106】

ある特定の実施形態では、本実施形態の方法を最小化または「小規模化」することが有用であり得る。これらのアプローチは、例えば、それらの方法が、例えば、細胞の脱分化または特定の系列への分化を促進し得る化合物のハイスループットスクリーンを含む場合に特に有用であり得る。ハイスループットスクリーンを用いて候補物質の1つ以上の特性(例えば、毒性、分化を促進する、または減少させる能力、など)を評価することもできる。それらの方法の小規模化は低結合性プレート(例えば、96ウェルプレート)および/または低酸素(例えば、約25%未満の O_2 または約5%の O_2)条件下での細胞の培養の使用を伴い得る。ある特定の実施形態では、次の方法を使用することができる:マトリゲル被覆プレート上での無フィーダー培養に適応した未分化状態のhESCまたはiPSCを、約0.1ng/mlのTGFと約20ng/mlのゼブラフィッシュFGFが添加された増殖因子を含まないTeSRを使用して24時間事前調整することができる。それらの細胞は集密時に、例えば、約37で約5分間のTrypLE処理を用いて回収され得る。それらの細胞は、約20%のBIT9500またはセラム・リプレイスメント-3、約1%のNEAA、約1mMのL-グルタミン、および約0.1mMのメルカプトエタノール、約0.75%のBSA、約50 μ g/mlのアスコルビン酸および約1 μ MのROCK阻害剤(例えば、H-1152)を添加されたIMDMを含有するEB基本培地中に回収され得る。EB形成を開始するためにそれらの細胞を、ROCK阻害剤を含有するEB基本培地中にウェル当たり約10万細胞の密度で低結合性96ウェルプレートに入れることができる。使用する細胞の正確な濃度は同様の効果を達成するために変更され得ることが予想される。EB形成は低 O_2 条件で播種物を培養することによっても促進され得る。約12~24時間後に約50ng/mlの骨形成因子(BMP-4)、約50ng/mlの血管内皮増殖因子(VEGF)、および約25ng/mlのゼブラフィッシュFGF-2を含有するEB分化培地にそれらの細胞を入れることができる。例えば、96ウェルプレート内のウェル当たり約300 μ lの培地を使用することができる。分化のおよそ3~4日目に、消費された培地の半量(例えば、100~150 μ lの間)を穏やかに取り除き、そして、等量の新しい培地を加えることによりそれらの細胞に半分の栄養供給をすることができる。分化のおよそ5~6日目に消費された培地を上記のように吸引することができる。且つ、それらの細胞を、例えば、(1)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約10mg/mlのIL-3および約10ng/mlGMCSF、または(2)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約25ng/mlのSCF、約25ng/mlのTPO、約10ng/mlのIL-3、および約10ng/mlのIL-6を含有する培

10

20

30

40

50

地のどちらかが添加されたEB基本培地に入れることができる。分化中のEB培養物に新しい培地を上記のように分化のおよそ8日目と10日目に半分供給することができる。EB培養物を分化のおよそ12日目に回収することができる。これらのアプローチをうまく用いて様々な細胞系列（例えば、赤血球、巨核球、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、顆粒球）を作製することができ、且つ、iPSCまたはhESCを使用して同様の結果を得ることができる。

【0107】

本実施形態の方法は、個々の細胞をプレートに接着させるように細胞を誘導するための培地にROCK阻害剤のHA100および/またはH1152を含むことにより、ロボットによる自動化を用いて単一細胞アッセイに活用され得る。ロボット上で小分子HA100またはH1152またはY-27632の培養系への添加は、ES、hESC、およびiPSCを含む多能性細胞の生存度を大いに改善させることができる。ある特定の実施形態では、TeSR培地における多能性細胞の生存は、特にそれらの細胞がタンパク質分解的または機械的に集塊に分離された、または個別化された後にROCK阻害剤またはaPKC阻害剤を含むことにより改善され得る。ROCK阻害剤は個別化されたhESC細胞の表面への接着と増殖を促進することができる。多能性細胞の維持または増殖、ならびに造血前駆細胞または特定の造血系列への分化の過程の幾つか、または全てを自動化することができる。自動化方法の全ての一部は限定条件を活用することができる。

【0108】

VIII. 人工抗原提示細胞(aAPC)とその使用

本実施形態の幾つか態様はaAPCおよびNK細胞組成物の調製におけるその使用に関連する。抗原提示系の調製と使用に関する全般的な案内については、例えば、各々参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,225,042号、第6,355,479号、第6,362,001号および第6,790,662号、米国特許出願公開第2009/0017000号および第2009/0004142号、および国際公開第2007/103009号)を参照のこと。

【0109】

ある特定の態様では、NK細胞の増殖のために使用されるaAPCは(例えば、K562細胞の場合のように)MHC/HLAクラスIをほとんど、または全く発現しない。NK細胞増殖に具体的に適応されるaAPC系の例は、例えば、各々参照により本明細書に組み込まれるDenman et al., 2012、Campana et al., 2009 およびChoe et al.の概説, 2009の中に見出され得る。

【0110】

他の好ましい実施形態では、aAPCは不活化(例えば、化学処理または放射線照射)を受けることができ、その結果、不活化の後に細胞増殖または複製が基本的に起こらない。したがって、不活化はaAPCの重要なAPC機能を維持し、一方、aAPCを使用して開発された細胞療法製品の安全性に対する懸念を軽減するのに役立つ。不活化とaAPCに関する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20090017000号を参照のこと。

【0111】

その後、不活化aAPC培養物を治療上効果的なNK細胞の集団の活性化と富化に適切であるように長時間の間に維持することができる。幾つかの態様では、aAPCは、NK細胞が増殖するときに周期的に(例えば、3日毎、5日毎または週毎)NK培養物に添加される。したがって、幾つかの態様では、NK細胞の増殖は2、3、4、5、10またはそれより多くのaAPCの共培養サイクルを含む。

【0112】

IX. 細胞傷害性NK細胞の使用法

この系の効率の改善と成分の明確化によってhESC/iPSC由来細胞の臨床応用が実現可能になる。現在のNK細胞ベースの養子免疫療法はキログラム当たり約 2×10^7 細胞からなるNK細胞含有臨床製品(通常約50%のNK細胞を含む)を使用する (M

10

20

30

40

50

iller et al., 2005)。我々の aAPC を含まない方法は約 13×10^6 個の未分化 hESC または iPSC (約 1 枚の 6 ウェルプレート) からこの数の NK 細胞を提供するだろう。aAPC を使用することは患者当たり 10^6 個未満の未分化 hESC / iPSC しか現行の NK 細胞用量で必要とされないことを意味するだろう。

【0113】

この工程は、末梢血 NK (PB-NK) 細胞のために使用される個々のアフエーシスドナーによって作製される NK 細胞よりも実質的に多くの NK 細胞を単一の均一でよく特徴解析されている出発細胞集団から出発して作製するために用いられ得る。なお、これらの方法は、移植片対宿主病を防止するために T 細胞に対する抗 CD3 抗体とパッセンジャーリンパ球症候群を防止するために B 細胞に対する抗 CD20 抗体の減損を必要とする細胞調整の量を末梢血のもの比べて減少させる。T 細胞も B 細胞も本方法の培養物に存在しない (Kaufman, 2009)。KIR とアロ反応性についての拡大する知識であって、特定の KIR ハプロタイプ (セントロメア性 B/B) は同種異型造血幹細胞移植を受けている患者における残留白血病の除去に最適である (Cooley et al., 2010) というを示す大規模コホートの対象において近年に確立された概念を用いて最適の NK 細胞「スーパードナー」を創出するために多様な遺伝的背景に由来する NK 細胞が作製され得るだろう。他の腫瘍を有する患者の治療の改善も、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、および骨髄腫細胞に対する細胞溶解活性を有するこれらの hESC 由来細胞と iPSC 由来細胞を用いて実現可能であり得る (Wollett et al., 2009) (図 4)。HIV または他の慢性ウイルス感染症の治療も可能であり得る (Niet al., 2011)。なお、抗腫瘍および抗ウイルスキメラ抗原受容体を有する hESC および iPSC を設計して免疫療法のための標的化リンパ球の容易に入手可能な製品を提供することが可能であり得る (Porter et al., 2011、Torikai et al., 2012、Knorr and Kaufman, 2010、Sadellain et al., 2009)。

【0114】

hESC 由来細胞と iPSC 由来細胞の臨床応用は着実に前進し続けている。実際に研究により、hESC から得られた網膜色素上皮細胞の送達の一つの型の黄斑変性を有する患者において安全であり、且つ、有効であり得ることが示されている (Schwartz et al., 2012)。hESC / iPSC 由来造血細胞の臨床使用は 10 年間にわたって非常に興味深いものであった (Kaufman, 2009)。細胞数を厳密に考えると、治療のために十分な hESC 由来 NK 細胞を創出する能力は 1 ユニットの赤血球 (RBC) (ユニット当たり 10^{12} 個の RBC) の作製に必要とされる細胞の数よりもありそうである。臨床応用により適切な非挿入方法を用いるヒト iPSC のより効率的な誘導に対する研究も前進している (Robinton and Daley, 2012)。それ故、多数の細胞傷害性 NK 細胞を作製する能力は、多様な臨床治療のための hESC 由来造血系製品および iPSC 由来造血系製品の展望がそう遠くない将来に実現され得ることを意味する。

【実施例】

【0115】

X. 実施例

次の実施例は本発明の好ましい実施形態を示すために含まれている。当業者は、これに続く実施例において開示される技術は本発明の実施においてよく機能すると発明者により発見された技術であり、したがって、本発明の実施の好ましい形態を構成すると考えられ得ることを理解すべきである。しかしながら、当業者は本開示に照らして、多くの変更を本発明の精神と範囲から逸脱することなく開示されている特定の実施形態に実行することができ、それでも同様または類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0116】

(実施例 1)

本実施形態の方法

図1は未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法の実施形態の流れ図(100)を示す。方法(100)は未分化hESCまたはiPSCなどの未分化幹細胞を使用する。その方法は、第1無血清培地の中に未分化幹細胞を配置すること(102)、遠心凝集により、第1無血清培地の中で未分化幹細胞を凝集させ(104)、且つ遠心EBを形成すること、遠心EBから前駆細胞の産生を誘導するために第1無血清培地の中で遠心EBを培養すること(106)、および前駆細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための第2無血清培地の中で前駆細胞を培養すること(108)を含む。

【0117】

図2は前記の方法の流れ図(100)をなぞる、流れ図(100)を2段階、すなわち、(202)と(204)に分割する概略図を示す。ステージI(202)では造血前駆細胞が遠心EB(206)とその後の培養プロセス(208)によりhESCまたはiPSCから作製される。細胞のステージ1からステージ2への直接移転(210)の後にステージ2(204)においてNK細胞が作製される(212)。

【0118】

図3は、より凝集しやすい未分化幹細胞を作製するために細胞の分化を促進する前に未分化幹細胞(hESCまたはiPSC)を調製する(302)方法(300)の実施形態を示す。それらの幹細胞は、TrypLE Select(インビトロジェン社)中の幹細胞を低密度マウス胚様体線維芽細胞(例えば、90,000細胞/ウェルのMEF)上で最少でも10継代の間継代させることにより調製され得る(302)。iPSCについてはUCB由来CD34⁺造血前駆細胞から得られたUCBiP7株を使用することができる。TrypLE適応hESCまたはiPSCを作製し、60%~70%辺りの集密度の培養物を解離させ、70ミクロンの滅菌フィルターに通すことができる。どのような分化の兆候も欠く純粋なhESCの培養物だけを使用することが好ましい。それらの細胞を通常hESC培地の中で低密度MEFと1:1で、細胞増殖によって好ましくは10継代目で起きる、より希釈された比率での継代が可能になるまで継代することができる。遠心EBになるTrypLE通過hESCを樹立するために約70%の集密度の適応した細胞をTrypLEで解離させ、70μmのフィルターに通してあらゆる集塊を取り除く。調製ステップ(302)を除いて図3に示されるステップの残りは図2に示されるステップと実質的に同じである。よって、対応するステップは同じ参照文字を使用して特定化される。図3はフローサイトメトリーによって実施された第11日の後の細胞分化の分析(304)を示し、前駆細胞がCD34とCD45を発現することを示す。

【0119】

前記の方法は第1無血清培地の中に未分化幹細胞を配置すること(102)を含む。第1無血清培地は、サイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、増殖因子、コロニー刺激因子、細胞結合タンパク質、またはそれらのあらゆる組合せを含むが、これらに限定されないナチュラルキラー細胞誘導性増殖因子を含む。第1無血清培地はSCF複合体、骨形成タンパク質4(BMP4)、および血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を含み得る。例えば、幹細胞を、丸底96ウェルプレートのウェル当たり幹細胞因子(SCF、40ng/ml)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF、20ng/ml)、および骨形成タンパク質4(BMP4、20ng/ml)を含有するBPEL培地中に3000細胞の濃度(100μlの体積)で第1無血清培地の中に入れることができる(102)。BPEL培地は200mLの体積で作製され得、且つ、イスコプの改変ダルベッコ培地(IMDM、86mL、インビトロジェン社)、GlutaMax I含有F12栄養混合物(86mL、インビトロジェン社)、10%の脱イオン化ウシ血清アルブミン(BSA、5mL、シグマ社)、5%ポリビニルアルコール(10mL、シグマ社)、リノール酸(1mg/mL溶液の20μL、シグマ社)、リノレン酸(1mg/mL溶液の20μL、シグマ社)、シンセコール500倍溶液(シグマ社)、モノチオグリセラル(シグマ社)、無タンパク質ハイブリドーマ混合物II(インビトロジェン社)、アスコルビン酸(5mg/mL、シグマ社)、GlutaMax I(インビトロジェン社)、インスリン トランスフェリン セレニウム100倍溶液(インビトロジェン社)、ペニシリン/ストレプト

10

20

30

40

50

マイシン（インビトロジェン社）を含有し得る。その後、プレートの外側のウェルを滅菌水で満たして培地の蒸発を防ぐ。

【0120】

前記の方法は遠心凝集により第1無血清培地の中で未分化幹細胞を凝集させ（104）、且つ遠心EBを形成することを含む。遠心凝集はマウス間質を使用することが無い血液細胞分化のための遠心胚様体（遠心EB）プロトコルを用いる。マウス間質を使用することなく分化を誘導するための遠心EBプロセスが類似の結果を達成すること、およびそのプロセスはマウス間質を使用するプロセスよりも効率的であることが発見されている。これらの細胞は、第1無血清培地の中で未分化細胞を凝集させ、且つ、遠心EBを形成するために凝集させられる（104）。例えば、これらの細胞と培地を含有するプレートを室温で1,500RPM、5分間遠心して凝集させ、5%CO₂を含む37の恒温器に設置する。

10

【0121】

前記の方法は遠心EBから前駆細胞の産生を誘導するために第1無血清培地の中で遠心EBを培養すること（106）をさらに含む。その方法の実施形態はM210-B4マウス間質の非存在下で実施される胚様体を培養するステップ（106）を含む。その方法の別の実施形態はあらゆるマウス間質の非存在下で実施される胚様体を培養するステップ（106）を含む。培養ステップ（106）の間にプレートの中での遠心EBの形成を確実にするためにこれらの細胞を第1無血清培地から少なくとも3日間取り出さないことが好ましい。遠心EB分化は8~11日間、または9~12日間、または好ましくは11日間のこれらの条件下で促進される。

20

【0122】

図4Aは第7日の後（402）、第9日の後（404）、および第11日の後（406）の細胞分化の結果を示す。前記の方法は、CD34を発現するCD34⁺細胞、CD34とCD43を共発現するCD34⁺CD43⁺細胞、および/またはCD34とCD45を共発現するCD34⁺CD45⁺細胞を含む前駆細胞を作製する。図4Bはフローサイトメトリーによって実施された細胞分化の分析を示す。フローサイトメトリーは次の抗体：全てベクトン・ディッキンソン社から入手することができるCD34-APC、CD45-PE、CD31-PE、CD31-APC、CD-73PE、CD43-PE、NKp46-PE、NKp44-PE、CD56-APC、CD16-Per cp Cy5.5、CD117-Per cp Cy5.5、ベックマン・コールター社より入手することができるCD158a/h-PE、CD158j-PE、CD158i-PE、CD158e1/e2、CD159a-PEおよびCD159a-APC、eBioscience社から入手することができるCD107aPer cp Cy5.5およびINF- γ Pac Blueを使用して実施され得る。フローサイトメトリーはBD FACS CaliburまたはLSRIIで実行され得、FlowJo（ツリースター社）を使用してデータ解析され得る。図4Bは、例えば、CD34を発現するhESC由来造血細胞（55.9±6.4%）を示し、多くがCD43（41.8±9.51%）またはCD45（26.2±6.6%）を共発現する。図4BはCD34（12.06±5.40%）およびCD45（3.20±1.43%）を発現するiPSC由来造血細胞も示す。図4CはCD34のみを発現する遠心EBの一例とCD45、CD43、CD31、およびCD73とのCD34の共発現のパーセンテージを示す。

30

40

【0123】

遠心EB分化を誘導するための細胞の培養（106）から8~11日後、または9~12日後、または好ましくは11日後にウェルプレートを別のウェルに直接移して前駆細胞からナチュラルキラー細胞を作製するための第2無血清培地の中での培養（108）を開始することができる。その方法は、遠心EBの培養ステップと前駆細胞の培養ステップの間に前駆細胞が発現する糖タンパク質に基づいて前駆細胞を選別するための細胞選別の必要性を除外する。図4Dに示されるように、得られたNK細胞はKIR、CD16、NKG2D、NKp46、およびアポトーシス誘導リガンドTRAILを含む様々なエフェク

50

ター分子を発現することもできる。

【0124】

第2無血清培地は、サイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、増殖因子、コロニー刺激因子、細胞結合タンパク質、またはそれらのあらゆる組合せを含むが、これらに限定されないNK細胞惹起増殖因子を含む。例えば、第2無血清培地はSCF複合体、VEGF、インターロイキン3(IL3)、インターロイキン6(IL6)、トロンボポエチン(TPO)、およびエリスロポエチン(EPO)を含み得る。例えば、第2無血清培地はIL3、インターロイキン7(IL7)、インターロイキン15(IL15)、SCF複合体、およびFms関連チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)を含み得る。未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法の実施形態では、第2無血清培地の中で前駆細胞を培養するステップは外来性間質細胞が存在しない状態にある。未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法の実施形態では、第2無血清培地の中で前駆細胞を培養するステップはEL08-1D2外来性間質細胞が存在しない状態にある。例えば、上記の例の遠心EB分化の96ウェルプレートの6ウェルを、サイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、増殖因子、コロニー刺激因子、細胞結合タンパク質、またはそれらのあらゆる組合せを含むが、これらに限定されないNK細胞惹起増殖因子の24ウェルプレートの1つのウェルに直接移すことができる。それらの24ウェルプレートはウェル当たり100,000個の放射線照射(3000rad)EL08-1D2細胞を含有することができる。6ウェルの遠心EBを未被覆24ウェルプレートに直接移すことができる。その方法により、CD56、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)、CD16、NKp44、NKp46、およびNKG2Dを発現するナチュラルキラー細胞が作製される。

10

20

【0125】

培養ステップ(108)は約4週間かかることがあり得る。直接移転(培養ステップ(108)の開始)後から最初の2週間の内にEL08-1D2間質を用いて観察されるものと同様のレベルで遠心EBから非接着性造血細胞の増殖が存在する。なお、培養ステップ(108)は細胞にそれら自体の接着性細胞を培養下で産生させる。言い換えると、遠心EB細胞は外来性間質細胞が存在しない状態でそれら自体の遠心EB間質細胞層を培養物中に産生する。遠心EB間質細胞層はMHCクラスI分子(HLA-ABCおよびHLA-E)に加えて高レベルのCD31およびCD73を発現し、それらはNK細胞の発生とキラー免疫グロブリン様受容体10の獲得に重要である。なお、遠心EB間質細胞はUCB由来CD34⁺細胞からのNK細胞の発生も支援する。これらの限定条件を用いて培養物はEL08-1D2間質細胞を利用する条件と類似するNK細胞を含有する。これらの細胞は成熟NK細胞表現型を発現し、且つ、それらの間質由来の相対物と全く同程度に細胞傷害性を有する。これらの細胞はサイトカインIFN γ を分泌することもできる。これらのデータは、あらゆる選別またはマウス間質細胞の支援も無い状態での機能的細胞傷害性リンパ球のインビトロ誘導の成功を示す。異種フィーダー層が無いので、これはNK細胞の育成、ならびに養子免疫療法のための1つの明確なヒト供給源を研究するための遺伝子操作可能な系を提供する。

30

【0126】

NK細胞が発生した後にそれらのNK細胞を人工抗原提示細胞(aAPC)とさらに共培養してNK細胞をさらに増殖させることができる。図5は未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法の別の実施形態の流れ図(500)を示す。流れ図(500)は図1に示されるステップ(102)、(104)、(106)、(108)と類似のステップ(502)、(504)、(506)、(508)を示す。流れ図(500)は、第1無血清培地の中に未分化幹細胞を配置すること(502)、遠心凝集により、第1無血清培地の中で未分化幹細胞を凝集させ(504)且つ遠心EBを形成すること、遠心EBから前駆細胞の産生を誘導するために第1無血清培地の中で遠心EBを培養すること(506)、前駆細胞からナチュラルキラー細胞を作製するために第2無血清培地の中で前駆細胞を培養すること(508)、放射線照射aAPCを作製するために放射線で

40

50

人工抗原提示細胞 (a A P C) を照射すること (5 1 0) 、 およびナチュラルキラー細胞を放射線照射 a A P C と共培養すること (5 1 2) を示す。共培養培地はインターロイキン 2 (I L - 2) を含むこともできる。本方法の実施形態では、共培養ステップは 1 : 1 の放射線照射 a A P C に対するナチュラルキラー細胞の比率を有する。

【 0 1 2 7 】

クローン 9 . m b I L - 2 1 を使用して a A P C は得られた N K 細胞のさらに 2 ~ 3 倍の対数増加を引き起こすことができる。それらの a A P C 増殖細胞はそれらの N K 細胞表現型ならびにインビトロ活性を維持する。これらの h E S C 由来 N K 細胞は 2 か月よりも長い期間に培養下で維持され得、断続的に増殖させられ得る。

【 0 1 2 8 】

図 6 A は人工抗原提示細胞 (a A P C) を用いる N K 細胞増殖を示す。 a A P C と 1×10^6 個の h E S C 由来 N K 細胞を含有する培養物を第 10 日、第 21 日、第 49 日および第 70 日に N K 細胞の増殖について評価した (第 10 日と第 21 日 : $n = 4$ 、第 49 日と第 70 日 : $n = 2$)。図 6 B は N K 細胞培養物について 3 週間の増殖の後の分析を示し、その分析は N K 細胞が増殖前の表現型を維持し、且つ、比較対象の増殖済み P B - N K 細胞に類似していることを示す。各細胞培養物は $C D 9 4^+ C D 1 1 7^-$ のままである $C D 5 6^+$ N K 細胞の純粋培養物を含有することができる。各細胞培養物は高レベルの K I R、 $C D 1 6$ および N K G 2 A を発現することができ、わずかなパーセンテージな細胞しか N K G 2 C を発現しない ($n = 3$)。図 6 C は、増殖した N K 細胞が K 5 6 2 標的に対する標準⁵ クロム放出細胞傷害アッセイにおいて試験されると (それぞれに対して $n = 3$)、癌細胞を殺滅するそれらのインビトロ機能を維持していることを示す。さらに、h E S C 由来 N K 細胞および i P S C 由来 N K 細胞が H I V 感染細胞を殺滅することが研究から示されている。

【 0 1 2 9 】

この系の効率の改善と成分の明確化によって h E S C / i P S C 由来細胞の臨床応用が実現可能になる。現在の N K 細胞ベースの養子免疫療法はキログラム当たり約 2×10^7 細胞からなる N K 細胞含有製品 (~ 5 0 % の N K 細胞) を使用する。図 1 に示される工程は約 1.3×10^6 個の未分化 h E S C または i P S C からこの数の N K 細胞を提供することができる。図 5 に示されるように、 a A P C 共培養プロセスを付け加えることにより、患者当たり 10^6 個未満の未分化 h E S C / i P S C しか現行の N K 細胞用量で必要とされない。

【 0 1 3 0 】

比較として、h E S C および i P S C からの N K 細胞の作製は造血系分化を支援するマウス間質との共培養を必要とする方法によって実施され得る。図 7 の流れ図 (7 0 0) は M 2 1 0 - B 4 を使用する間質細胞共培養による造血系分化 (7 0 2) の比較的方法を示す。未分化 h E S C または i P S C を胎児ウシ血清 (F B S) 中で 1 4 ~ 2 4 日間、および好ましくは 2 1 日間共培養する。これらの条件下で $C D 3 4^+$ 細胞および / または $C D 3 4^+ C D 4 5^+$ 細胞を含む造血前駆細胞を h E S C または i P S C から発生させることができる (フローサイトメトリーによる分析 (7 0 4) によって示される)。その後、この比較的方法において、 $C D 3 4^+$ 細胞および / または $C D 3 4^+ C D 4 5^+$ 細胞を他の培養細胞から陽性選別するために細胞選別 (7 0 6) が実施されなければならない。細胞選別 (7 0 6) は磁気選別または蛍光活性化細胞選別 (F A C S) によって実施され得る。その後、選別された $C D 3 4^+$ 細胞および / または $C D 3 4^+ C D 4 5^+$ 細胞を、 $C D 3 4^+ C D 4 5^+$ 細胞からの N K 細胞の発生のために (サイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、増殖因子、コロニー刺激因子、細胞結合タンパク質、またはそれらのあらゆる組合せを含むが、これらに限定されない) ナチュラルキラー細胞誘導性増殖因子を用いる N K 細胞発生条件において E L 0 8 - 1 D 2 細胞を用いる間質細胞共培養 (7 0 8) に移す。約 4 ~ 5 週間の後に成熟 N K 細胞が通常発生する。

【 0 1 3 1 】

図 8 A ~ 8 C は図 7 に開示される方法を使用することにより h E S C および i P S C か

10

20

30

40

50

ら生じたNK細胞の特性の例を示す。2つの異なるhESC株(H1およびH9)および3つの異なるiPSC株(BJ1-iPS12、UCBiPS7、およびDRiPS16)が示されている。図8Aはそれらの幹細胞株のそれぞれについて各細胞株のCD34とCD45の発現を示す。図8Bはそれらの細胞株のそれぞれの34/45発現比率のパーセントを示す。図8Cはそれらの細胞株から得られたNK細胞(PB-NK、UCB-NK、UCB-iPS7-NK、DRiPS16-NK、H9-NK、H1-NK)の腫瘍標的に対する細胞傷害性を示す。

【0132】

癌細胞を殺滅するための方法は上で開示されたNK細胞を作製するための方法を含み、NK細胞を取り出し、且つ、NK細胞を癌細胞に送達することをさらに含む。送達ステップは、動物またはヒトの循環系へのNK細胞の静脈内注射によることがあり得る。あるいは、NK細胞は腹腔内注射されるか、癌細胞に直接、または癌細胞の近傍へ注射されることがあり得るだろう。図9は細胞傷害性比較分析の結果を示す。細胞傷害性比較分析ではルシフェラーゼ標識白血病癌細胞株をマウスに注射した。3日後にそれらのマウスのうちの1匹を臍帯血(UCB)由来NK細胞で処置し、別のマウスをhESC-NK細胞で処置した。図9は対照マウス(902)、UCB由来NK細胞を受領したマウス(904)、およびhESC-NK細胞を受領したマウス(906)の間の細胞傷害性比較の結果を示す。21日後には非注射対照(902)における癌細胞はマウス全体に広がった。UCB由来NK細胞はマウス(904)においてある程度まで増殖を抑制することができた。hESC-NK細胞はマウス(906)において癌細胞を排除した。これらの結果は癌細胞を急速に効率的に排除するhESC-NK細胞の能力を示す。したがって、hESC-NK細胞とiPSC-NK細胞は直接細胞介在性細胞傷害と抗体依存的細胞性細胞傷害性の両方によりヒト腫瘍細胞を溶解することができる。さらに、活性化hESC-NK細胞およびiPSC-NK細胞はサイトカイン産生を上方制御する。よって、hESC-NK細胞は新規の臨床治療法のための抗腫瘍リンパ球の「普遍的」供給源として役立つことができるだろう。さらに、iPSC-NK細胞はhESC-NK細胞と同程度に癌細胞を急速に効率的に排除する類似の能力を有する。iPSC-NK細胞は癌細胞の殺滅のために上に開示された方法を使用して患者に特有の基盤より効率的に得ることが期待される。

【0133】

(実施例2)

癌治療のためのヒト多能性幹細胞からのナチュラルキラー細胞の臨床規模の誘導

hESC/iPSCの維持と間質細胞介在性分化

hESC(H9およびH1)およびiPSC(UCBiPS7、NHDF-iPS、BJ1-iPS)をマウス胚性線維芽細胞(MEF)上で維持した。M210-B4細胞(アメリカ培養細胞系統保存機関、マナサス、バージニア州)上での造血前駆細胞の間質細胞介在性分化を以前に記述されたように(Hill et al., 2010、Tian et al., 2009、Woll et al., 2009)実行した。簡単に説明すると、未分化hESCまたはiPSCを、RPMI1640(インビトロジェン社、カールスバッド、カリフォルニア州)、15%の限定胎児ウシ血清(FBS)(ハイクロン社、ローガン、ユタ州)、2mMのL-グルタミン(セルグロ(Cellgro)社、マナサス、バージニア州)、1%の非必須アミノ酸(インビトロジェン社)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン(インビトロジェン社)、および0.1mMのメルカプトエタノール(インビトロジェン社)を含有する培地中でM210-B4上に配置した。培地を週に3回交換し、18~21日後にCD34⁺CD45⁺前駆細胞濃縮(Woll et al., 2009)のために細胞を回収した。100,000個のCD34⁺CD45⁺細胞を1mLのNK細胞惹起サイトカイン(インターロイキン[IL]-3、IL-7、IL-15、幹細胞因子[SCF]、fms様チロシンキナーゼ受容体-3リガンド[FLT3L]、全てニュージャージー州、ロッキーヒルのペプロテック社より)と共にEL08-1D2間質上に配置した。NK細胞培養物には4~5日毎に0.

5 mLのサイトカイン含有培地が注がれた。成熟NK細胞をEL08-1D2上での培養から28～35日の時点で測定した。

【0134】

遠心EBの作製

凝集しやすい遠心EBを作製するためにhESCおよびiPSCを低密度MEF（例えば、90,000細胞/ウェル）上のTrypLE Select（インビトロジェン社）中において最少でも10継代の間継代させた。遠心EB試験について、発明者らは将来のインビボ実験のために緑色蛍光タンパク質/ホタルルシフェラーゼコンストラクト（Tian et al., 2009）で改変されたH9株を使用した。iPSCについて、発明者らは臍帯血（UCB）CD34⁺造血前駆細胞に由来するUCBiP7株を試験した。TrypLE適応hESCまたはiPSCを作製するため、約60%～70%集密状態の培養物を解離させ、70μmの滅菌フィルターに通した。どのような分化の兆候も欠く純粋なhESCの培養物だけを使用した。細胞を通常hESC培地の中で低密度MEFと1:1で、細胞増殖によって通常10継代目辺りで起きる、より希釈された比率での継代が可能になるまで継代した。ステージIの遠心EBになるTrypLE通過hESCを樹立するために約70%の集密度の適応した細胞をTrypLEで解離させ、70μmのフィルターに通してあらゆる集塊を取り除いた。その後、細胞を計数し、丸底96ウェルプレートのウェル当たりSCF（40ng/mL）、血管内皮細胞増殖因子（20ng/mL）、および骨形成タンパク質4（20ng/mL）を含有するBPEL（ウシ血清アルブミンポリビニルアルコール基本脂質）培地中に3000細胞の濃度（100μLの体積）で配置した。BPEL培地は200mLの体積で作製され、且つ、イスコブの改変ダルベッコ培地（86mL；インビトロジェン社）、GlutaMAX I含有F12栄養混合物（86mL；インビトロジェン社）、10%の脱イオン化ウシ血清アルブミン（5mL；シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州）、5%ポリビニルアルコール（10mL；シグマ・アルドリッチ社）、リノール酸（1mg/mL溶液の20μL、シグマ・アルドリッチ社）、リノレン酸（1mg/mL溶液の20μL、シグマ・アルドリッチ社）、シンセコール500倍溶液（シグマ・アルドリッチ社）、 α -モノチオグリセラル（シグマ・アルドリッチ社）、無タンパク質ハイブリドーマ混合物II（インビトロジェン社）、アスコルビン酸（5mg/mL、シグマ・アルドリッチ社）、GlutaMAX I（インビトロジェン社）、インスリン トランスフェリン セレニウム100倍溶液（インビトロジェン社）、ペニシリン/ストレプトマイシン（インビトロジェン社）を含有した。プレートの外側のウェルを滅菌水で満たして培地のあらゆる蒸発を防いだ。その後、プレートを室温で1,500RPM、5分間遠心して凝集させ、5%CO₂を含む37℃の恒温器内で平静に設置した。プレートの中での遠心EBの形成を確実にするために細胞を少なくとも3日間取り出さなかった。

【0135】

遠心EBからのNK細胞分化

遠心EB分化の11日目に96ウェルプレートの6ウェルを上記のNK細胞惹起増殖因子の24ウェルプレートの1つのウェルに直接移した。最初、それらの24ウェルプレートはウェル当たり100,000個の放射線照射（3000rad）EL08-1D2細胞を含有した。完全限定条件について、6ウェルの遠心EBを未被覆24ウェルプレートに直接移した。分析日に各ウェルを回収、濾過、および洗浄した。

【0136】

フローサイトメトリー

次の抗体を使用した：全てベクトン・ディッキンソン社（フランクリンレイクス、ニュージャージー州）からのCD34-APC、CD45-PE、CD31-PE、CD31-APC、CD-73PE、CD43-PE、NKp46-PE、NKp44-PE、CD56-APC、NKG2D-PE、TRAIL-PE、FASリガンド-PE、CD16-PerCPy5.5、およびCD117-PerCPy5.5、ベックマン・コールター社（フラートン、カリフォルニア州）から得たCD158a/h-PE、CD1

10

20

30

40

50

58j - PE、CD158i - PE、CD158e1/e2、およびCD159a - PE
およびCD159a - APC、eBioscience社（サンディエゴ、カリフォルニア州）から得たCD107a PercpCy5.5およびINF - PacBlue。フローサイトメトリーはBD FACSCaliburまたはLSRII（BDバイオサイエンス社、サンディエゴ、カリフォルニア州）で実行され、データはFlowJo（ツリースター社、アシュランド、オレゴン州）を使用して解析された。

【0137】

遺伝子発現

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT - PCR）のために全RNAがRNeasyミニキット（キアゲン社、バレンシア、カリフォルニア州）を使用して細胞から調製された。全RNAの単離に続いて相補性DNAがSuperscript III逆転写酵素（ライフテクノロジー社、グランドアイランド、ニューヨーク州）を使用して作製された。その後、RT - PCRがペルティア・サーマルサイクラー200を使用して表1に記載されるプライマーとサイクル数で生じたcDNAに対して実施された。アニーリング温度はOCT4を除く全てのプライマーについては55 に設定され、OCT4は60 のアニーリング温度を有した。その後、PCRの産物を電気泳動により0.9%アガロースゲルで分離した。

【表 1】

表 1. プライマーと PCR サイクル

プライマー名	方向	配列 (5' → 3')	配列番号	サイクル数	アンプリコンの長さ (bp)
E4BP4	センス	AAA ATG CAG ACC GTC AAA AAG GA	1	25	100
E4BP4	アンチセンス	CTT CTG ACA CTT CCG TTA AAG CA	2	25	100
E2A	センス	TGT GCC AAC TGC ACC TCA A	3	35	116
E2A	アンチセンス	GGG ATT CAG GTT CCG CTC TC	4	35	116
ID2	センス	GAC CCG ATG AGC CTG CTA TAC	5	25	165
ID2	アンチセンス	AAT AGT GGG ATG CGA GTC CAG	6	25	165
ID3	センス	TCG GAA CGC AGT CTG GCC ATC	7	25	258
ID3	アンチセンス	CTC GGC TGT CTG GAT GGG AAG	8	25	258
PAX5	センス	CCA GTC CCA GCT TCC AGT CAC AG	9	25	173
PAX5	アンチセンス	GGA GAC TCC TGA ATA CCT TCG TCT C	10	25	173
OCT4	センス	CCC CAG GGC CCC ATT TTG GTA CC	11	20	309
OCT4	アンチセンス	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	12	20	309
GAPDH	センス	CCA CTC CTC CAC CTT TGA C	13	25	102
GAPDH	アンチセンス	ACC CTG TTG CTG TAG CCA	14	25	102

【 0 1 3 8 】

インビトロ細胞傷害

腫瘍標的 (K562、SVP10、S2013、OPM2、RPMI8226、U266) をクロム51 (^{51}Cr) と共に37℃で2時間保温し、3回洗浄し、表示されているエフェクター対標的 (E:T) 比率でNK細胞と共培養した。4時間の期間の後に細胞を回収し、分析した。特異的な ^{51}Cr 溶解が次の等式を使用して計算された: 特異的溶解のパーセンテージ = $100 \times (\text{試験放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ 。リダイレクト抗体依存的細胞性細胞傷害 (ADCC) アッセイについてP815標的を上記のように保温した。標的細胞へのNK細胞の添加の30分前にエフェクターをアイソタイプ対照 (カタログ番号400153; バイオレジェンド社、サンディエゴ、カリフォルニア州) またはNKp46抗体 (カタログ番号331904; バイオレジェンド社) のどちらかと保温した。5時間の保温の後に細胞を回収し、上記のように分析した。

10

20

30

40

50

【0139】

CD107aアッセイとIFN アッセイ

NK細胞を1:1のエフェクター対標的比率でK562標的と共に、またはK562標的を含まずに保温した。CD107a-PerCPCy5.5抗体を各ウェルに添加し、1時間保温した。その後、GolgiStopとGolgiPlug (BDバイオサイエンス社)を各ウェルに添加し、さらに4時間保温した。保温の完了時に細胞を洗浄し、CD56APCで染色し、氷上において2%のパラホルムアルデヒドで10分間固定した。その後、細胞は1%のサポニンを4で20分間用いて透過処理され、洗浄され、IFNについて染色された。

【0140】

間質細胞機能性アッセイ

NK細胞培養物の中で得られた間質に特徴的な内皮細胞と間葉系間質細胞(MSC)を評価するため、非接着性細胞を最初に洗い流し、その後、接着層をトリプシン処理し、洗浄した。細胞を内皮マーカー(CD31)およびMSCマーカー(CD73)、ならびに造血系マーカー(CD45)、単球/マクロファージマーカー(CD14、CD15)、および樹状細胞マーカー(CD11c)で染色した。NK細胞発生を支援する間質細胞層(EL08-1D2、ヒト臍静脈内皮細胞[HUVEC]、無フィーダー間質)のそれぞれの能力を評価するため、それぞれを24ウェルプレートのウェル当たり100,000細胞の割合で配置し、放射線照射した(3,000rad)。HUVECを以前に記載されたように培養した(Hill et al., 2010)。その後、各ウェルに臍帯血に由来する500個のCD34⁺細胞を播種した。間質無しの条件はUCB由来CD34⁺細胞と培地のみを含有した。その後、細胞を上記の標準NK細胞条件下で培養した。

【0141】

人工抗原提示細胞増殖

EL08-1D2またはフィーダー不使用条件からhESC由来NK細胞を増殖させるため、それぞれをクローン9.mbIL-21人工抗原提示細胞(aAPC) (Denman et al., 2012)との培養下に置いた。培養第1週の間aAPCを10,000radで放射線照射し、2:1の比率でNK細胞に添加した(第0日)。その後のaAPCを用いる刺激(7日毎)では1:1の比率であった。培養物に週に3回栄養補給し(RPMI1640、15%のFBS、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、50U/mlのインターロイキン-2)、最適な増殖のために細胞数を250,000細胞/mlに維持した。

【0142】

統計分析

群間の差異はPrism4(グラフパッド・ソフトウェア社、サンディエゴ、カリフォルニア州)を使用するスチューデントのt検定ポストホック分析またはANOVAを用いて比較された。結果は0.05以下のP値で有意であると見なされた。

【0143】

hESC由来造血前駆細胞およびiPSC由来造血前駆細胞はNK細胞に発生することができる。

初期の研究は2つの異なるhESC株(H1およびH9)および3つの異なるiPSC株(BJ1-iPS12、UCBiPS7、およびDRiPS16)の造血細胞とNK細胞の発生能を比較するために間質細胞共培養モデル(Niet al., 2011、Woll et al., 2009、Woll et al., 2005)を使用した。UCBiPS7とDRiPS16を発明者らの研究室で得て、特徴解析した。この方法では、hESCまたはiPSCはFBSのみを含有する培地の中でM210-B4間質細胞上で培養される。3週間の期間にわたって全てのhESC株およびiPSC株はCD34とCD45を共発現する造血前駆細胞を産生した(図8A、8B、および10)。H9細胞は最も高いパーセンテージのCD34とCD45を発現する造血前駆細胞(6.46±1.75%)を生じさせたが、他のhESC株およびiPSC株は一貫してより

10

20

30

40

50

少ない数の造血前駆細胞を産出した：H1hESC株について $1.45 \pm 0.18\%$ 、UCBiPS7株について $2.46 \pm 1.71\%$ 、DRiPS16株について $0.92 \pm 0.14\%$ 、およびBJ1-iPS株について $1.43 \pm 0.35\%$ （図8B）。これらの数は、間質細胞ベースの系を使用する造血系発生の効率が比較的制限される（Choi et al., 2009、Ledran et al., 2008）、発明者らおよび他の者が以前に示したものと類似している。様々なiPSC株が様々な数の造血前駆細胞を生じさせることを示した後で、我々はhESC/iPSC由来CD34⁺CD45⁺細胞集団のそれぞれからNK細胞を作製した。ここで、CD34⁺CD45⁺細胞を選別し、マウス間質細胞株EL08-1D2およびサイトカイン（SCF、FLT3L、IL-15、IL-7、IL-3）（Woll et al., 2009）を含むヒトNK細胞発生を支援することが知られている条件で4週間培養した。hESCまたはiPSCの別個の株が様々な頻度で造血前駆細胞を生じさせたが、各細胞株は表現型が成熟した機能性NK細胞を産生することができた。hESC由来NK細胞とiPSC由来NK細胞の両方はCD56、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）、CD16、NKp44、NKp46、およびNKG2Dを発現する細胞の均一な集団からなる（図10）。また、5種全てのhESC/iPSC集団に由来するNK細胞が、末梢血から単離されたNK細胞（PB-NK）と同様に腫瘍細胞を殺滅することができた（図8C）。これらの結果は、個々のhESCおよびiPSCは造血前駆細胞を派生するそれらの能力に再現性がある差異を有するが、それぞれが成熟した細胞傷害性について活性があるNK細胞を作製することができることを示した。

【0144】

前駆細胞の作製強化はhPSC由来NK細胞の誘導において細胞選別を除外する。

hESCまたはiPSCからのNK細胞の誘導を仲介するために、および培養効率を改善するために必要とされる特定の刺激をより良く理解するための努力の中で、発明者らはこれらの方法を完全無フィーダーおよび無血清培養系に翻訳するための段階的アプローチをとった。まず、「遠心EB」方法（Ng et al., 2008、Ng et al., 2005）を使用して造血前駆細胞を作製するために未分化hESCおよびiPSCを支援した。ここで、限定された数（3,000細胞）の未分化hESC（H9）またはiPSC（UCBiPS7）を96ウェル形式で無血清培地の中で遠心して凝集させた（図2）。11日の期間にわたってこれらの培養物は造血細胞発生と増殖を示した（図4A）。この方法はM210-B4マウス間質の必要性を取り除いただけではなく、発明者らはこの方法がhESCとiPSCの両方からの造血前駆細胞のより高頻度でより一貫した作製を可能にすることを見出した。hESCについて、発明者らは大部分の造血細胞がCD34を発現し（ $55.9 \pm 6.4\%$ ）、多くがCD43（ $41.8 \pm 9.51\%$ ）またはCD45（ $26.2 \pm 6.6\%$ ）を共発現することを見出した（図4Bおよび4C）。iPSCはCD34⁺細胞（ $12.06 \pm 5.40\%$ ）およびCD45⁺細胞（ $3.20 \pm 1.43\%$ ）も産生したが、通常hESCよりも少なかった。この方法はhESCとiPSCの両方についてM210-B4間質ベースの系に対する著しい改善をもたらさず（図8A、8B、および10）。

【0145】

発明者らは次に遠心EB系において作製された造血前駆細胞のNK細胞を派生する能力を試験した。これを行うため、発明者らは解離または選別を行うことなくサイトカインおよびEL08-1D2間質を含有するNK細胞惹起条件に遠心EBを直接移した。以前に示されたように、このステージII培養系は4週間の期間にわたって信頼できるNK細胞の発生を提供する（Ni et al., 2011、Woll et al., 2009）。間質細胞共培養由来前駆細胞と同様に、遠心EB由来造血前駆細胞はついに成熟NK細胞表現型に至るNK細胞表面マーカーを獲得した（図4D）。実際に、発明者らは遠心EB由来細胞が、CD117が存在しない状態でCD94を発現するCD56⁺NK細胞の均一な集団に分化することを見出した（Woll et al., 2009）。なお、これらの細胞は高レベルのKIR、CD16、NKG2D、NKp46、およ

びTRAILを発現した。それらの細胞はNK細胞系列と一致する遺伝子発現プロファイルも有する。それらの細胞はID2、E2A、およびE4BP4を発現した(図14)。それらの細胞はB細胞系列特異的転写因子PAX5を発現しなかった。また、親株と対照的にhESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞は多能性因子OCT4を発現しなかった。遠心EB由来NK細胞(hESCとiPSCの両方に由来する)は正しい表現型と遺伝型を有するだけでなく、PB-NK細胞と同様のレベルでK562腫瘍細胞を殺滅し、且つ、UCB由来NK細胞よりも高い細胞傷害性を有した(図11)。なお、発明者らはhESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞に発現された活性化受容体であるNkp46により仲介される特異的な殺滅を示した。PB-NK細胞と同様に、hESC由来NK細胞およびiPSC由来NK細胞は逆ADCCアッセイによりP815標的を殺滅するように誘導され得た(図15)。これらのデータは、遠心EBアプローチが多数の造血前駆細胞を作製するための無フィーダー系を提供するだけでなく、これらの前駆細胞が活性化PB-NK細胞と類似する細胞傷害性機能を有する表現型が成熟したNK細胞に分化するために選別を必要としないことを示す。

【0146】

hPSC由来間質は造血前駆細胞からのNK細胞発生を支援する。

hESCおよびiPSCからのNK細胞発生に必要とされる条件をより完全に明確化するため、発明者らは次にNK細胞促進サイトカイン(IL-3、IL-7、IL-15、SCF、FLT3L)を含有し、EL08-1D2または他の外来性間質細胞を含まない無フィーダーおよび無血清ステージII系における遠心EB由来細胞を試験した(図2)。移転後の最初の2週間以内にEL08-1D2間質を用いて見られるものと同様のレベルで遠心EBに由来する非接着性造血細胞の増殖があった(図12A)。なお、発明者らはこれらの細胞がそれら自体の接着性細胞を培養下で産生し始めることを見出した(図12B)。発明者らはhESCからの内皮細胞(EC)と間葉系間質細胞(MSC)の発生を以前に示している(Hill et al., 2010、Kopher et al., 2010)。ここで、発明者らはこれらの細胞種(CD34⁺CD31⁺ECとCD34⁺CD73⁺MSC)の両方(図16)が遠心EB培養物の中で日常的に産生されることを示した。骨髄に存在するECおよびMSCなどの非造血細胞はインビボでNK細胞を支援することが知られているので、発明者らはこれらの接着性細胞はインビトロでhESCからのNK細胞の成長を効率的に支援することができると仮説を立てた(Carson et al., 1997、Mrozek et al., 1996)。顕著なことに、発明者らは遠心EB間質細胞層がNK細胞発生とKIRの獲得に重要であることが知られているMHCクラスI分子(HLA-A、B、CおよびHLA-E)(Kim et al., 2005)に加えて高レベルのCD31およびCD73を発現することを見出した(図12C)。なお、これらの遠心EB由来間質細胞はEL08-1D2間質と同様に、且つ、ヒト臍静脈内皮細胞またはサイトカイン単独よりも効率的にUCB由来CD34⁺細胞からのNK細胞の発生を支援する(図12D)。

【0147】

外来性間質細胞を使用せずにこれらの限定条件を用いてNK細胞はEL08-1D2間質細胞を使用するステージII条件と比べて同様の数と表現型に発生した(図10および4D)。これらの細胞は成熟NK細胞表現型を発現し、且つ、細胞傷害アッセイにおいてそれらの間質由来相対物と同等であり、適切なNK細胞育成とエフェクター機能の獲得を示した。遠心EB由来NK細胞は脱顆粒化し、IFN γ を産生し、且つ、膵臓癌および多発性骨髄腫を含む多様な腫瘍標的に対する活性も有した(図13)。これらのデータはどのような選別またはマウス間質細胞支援も無い状態での機能的細胞傷害性リンパ球のインビトロ誘導の成功を初めて示す。異種フィーダー層の回避は、ヒトNK細胞の育成ならびに養子免疫療法のための明確なヒト供給源を研究するための新しい遺伝子操作可能な系を提供する。

【0148】

抗腫瘍免疫療法用のhESC由来NK細胞の臨床規模の増殖

このEBベースのアプローチは顕著な増殖および臨床的実用可能性を示すが、発明者らは次に別の臨床的に操作可能な方法を介して作製されるNK細胞の数をさらに増加させることを目標とした。近年、幾つかのグループが養子免疫療法用のT細胞またはNK細胞の増殖にaAPCを使用している (Fujisaki et al., 2009、Denman et al., 2012)。このアプローチの1つの主要な障害は高レベルのインビトロ増殖がテロメアの短縮化と細胞老化を引き起こすことである。DenmanらはPB-NK細胞の顕著な増殖を引き起こすが、テロメアの長さと同様にインビトロ活性を維持する膜結合型IL-21(クローン9.mbIL-21)を発現するaAPC株を作製した (Denman et al., 2012)。発明者らはこれらのaAPCがhESC由来NK細胞のさらなる増殖を引き起こし得るか試験し、クローン9.mbIL-21発現aAPCがEL08-1D2由来NK細胞と無フィーダー由来NK細胞の両方でさらに2~3倍の対数増加を仲介することを見出した。aAPC増殖性細胞はそれらのNK細胞表現型ならびにインビトロ活性を維持した(図6Bおよび6C)。なお、これらのhESC由来NK細胞は2か月よりも長い間に培養状態で維持され得、断続的に増殖させられ得た。まとめると、遠心EB法とaAPC増殖は癌免疫療法のためにhPSCから十分なヒトNK細胞を作製するための直接的で応用可能なアプローチを提供する。

【0149】

(実施例3)

インビボ輸送と免疫療法を研究するための操作されたヒト胚性幹細胞由来リンパ球hESC維持および造血系分化

hESCを低密度(90,000細胞/6ウェルプレートのウェル)のマウス胚性線維芽細胞(MEF)上に維持した。hESCからの造血前駆細胞の作製は確立された方法(Nget al., 2008)を用いて達成された。凝集しやすい遠心胚様体(EB)を作製するためにhESCおよびiPSCを低密度MEF(90,000細胞/ウェル)上のTrypLE Select(インビトロジェン社)中において継代させた。hESC由来NK細胞をインビボで追跡するために我々はGFP/ホタルルシフェラーゼコンストラクトで改変されたH9株を使用した(Tian et al., 2009)。60%~70%辺りの集密状態のTrypLE適応hESCを解離させ、70ミクロンの滅菌フィルターに通した。その後、細胞を計数し、丸底96ウェルプレートのウェル当たり幹細胞因子(SCF、40ng/mL)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF、20ng/mL)、および骨形成タンパク質4(BMP4、20ng/mL)を含有するBPEL培地(Nget al., 2008)の中に3000細胞の濃度(100mLの体積)で配置した。プレートの外側のウェルを滅菌水で満たして培地のあらゆる蒸発を防いだ。その後、プレートを室温で1,500RPM、5分間遠心して凝集させ、5%CO₂を含む37℃の恒温器内で平静に設置した。

【0150】

遠心EBからのNK細胞分化

分化第11日に96ウェルプレートの6ウェルを、NK細胞惹起サイトカイン(IL-3、IL-7、IL-15、SCF、fms様チロシンキナーゼ受容体-3リガンド(FLT3L)、全てペプロテック社より)の24ウェルプレートの1つのウェルに直接移した(Woll et al., 2009)。NK細胞培養物には4~5日毎に0.5mLのサイトカイン含有培地が注がれた。成熟NK細胞を培養から28~35日の時点で測定した。NK細胞培養の4週間後に人工抗原提示細胞(aAPC)を使用して細胞をさらに増殖した(Denman et al., 2012)。

【0151】

細胞株

K562細胞をアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)から入手した。mbGlucを発現するK562細胞は次のように作製された。まず、膜結合型ガウシア(Gaussia)ルシフェラーゼ(mbGluc)を、次のプライマーを使用してPCR増幅した:
5'-CATACAGAAATTCATGGCTCTCC CAGTGACTGCCCTA

10

20

30

40

50

CTGCTT - 3' (配列番号15) および 5' - CATACAGAAATTCGGATC
 CCTATTATTGAATCCGCCTGTGGTT - 3' (配列番号16)。EcoR
 I部位に下線が引いてある。次にmbGluc断片を消化し、EcoRI消化したmC
 AGsプロモーターと内部リボソーム侵入部位(IRES)の間にEcoRIスプライス
 部位を含有するpKT2-mCAGs-IRES-GFP:zeoコンストラクトにサブ
 クローン化した。方向はサブクローン化されたmbGluc配列の遠位末端内部の部位に
 おける制限酵素消化により確認された。K562細胞を発現するturboFP650を
 作製するために我々はプライマー5' - CATACAATTCGATATGGGAGAGG
 ATAGCGA - 3' (配列番号17) および 5' - CATACAAGATCTATCA
 GTTATCTAGATCCGGT - 3' (配列番号18) を使用してturboFP6
 50 (エプロジェン(Evrogen)社)を含有する配列を上記のようにPCR増幅し
 た。ClaI部位とBglII部位に下線をそれぞれ引いてある。次にPCR断片をCl
 aIとBglIIで消化し、pKT2-mbGluc-IRES-GFP:zeoコンス
 トラクトへGFP:zeo融合タンパク質の代わりにライゲートした。その後、確認され
 たコンストラクトはLonza4Dヌクレオフェクター装置を使用してK562細胞に形
 質移入された。Turbo-FP650発現K562細胞をFACSAria細胞選別機
 (BDバイオサイエンス社)で選別した。

【0152】

hESC由来NK細胞の輸送を追跡するためのインビボ蛍光および生物発光画像撮影
 腫瘍接種の24時間前に6~8週齢の非肥満糖尿病/鎖ノックアウト型重症複合免疫
 不全(NOD/SCID/gC^{-/-})マウス(ジャクソン・ラボラトリーズ社)に致死
 未満線量(225~250cGy)の放射線照射を施した。総計で 1×10^6 個のmbG
 luc⁺K562細胞またはmbGluc⁺/turboFP650⁺K562細胞
 を20%のFBS(ライフテクノロジーズ社)が添加された200mLのイスコブの改変
 ダルベッコ培地(IMDM)(ハイクローン・ラボラトリーズ社)に再懸濁した。その後
 、細胞をマウスの左上胸部に皮下注射した。腫瘍を4日間(mbGluc⁺)または7日
 間(turboFP650⁺)生着させた。その後、20%のFBSが添加された300
 mLのIMDMに再懸濁された 10×10^6 個のhESC-NK細胞のIP注射をマウス
 に施した。全ての実験について、NK細胞点滴を受領しないマウスが陰性対照として含ま
 れ、腫瘍のみのマウスが腫瘍移植の陽性対照として含まれた。全てのマウスがNK細胞注
 射後の最初の7日の間に毎日IL-2(1×10^4 U/マウス)とIL-15(10ng
 /マウス)のIP注射を受け、続いてマウスが殺処理されるまで2~3日毎にIL-2の
 みのIP注射を受けた。全てのマウスがミネソタ大学の動物実験委員会により表明された
 ガイドラインと米国国立衛生研究所の動物実験ガイドに従って飼育され、処置され、取り
 扱われた。腫瘍進行とNK細胞輸送を同時に追跡するために我々は二元画像法計画を活用
 した。mbGluc⁺K562細胞とFluc⁺hESC-NK細胞を追跡するた
 めに生物発光画像撮影がXenogen IVIS Spectrum画像撮影システム(カ
 リパー(Caliper)ライフサイエンス社)を使用して実施された。画像撮影の前
 にマウスをイソフルランにより麻酔した。生物発光画像は、セレンテラジン(320mg
 ;ナノライト・テクノロジー社)のIV注射から10~15秒後に、またはD-ルシフェ
 リン(150mg/kg;GOLDバイオテクノロジー社)のIP注射から10分後に1
 分の露光を用いて獲得された。マウスをセレンテラジンの注射後に個体ごとに画像撮影し
 、D-ルシフェリンの注射前に回復させた。光学画像はLiving Imageソフト
 ウェア第4.2版(カリパー・ライフサイエンス社)を使用して解析された。

【0153】

turboFP650⁺K562細胞とFluc⁺hESC-NK細胞を追跡する
 ために蛍光および生物発光画像撮影を、Xenogen IVIS Spectrum画
 像撮影システムを使用して実施した。画像撮影の前にマウスを記載通りに麻酔した。生物
 発光画像はD-ルシフェリンのIP注射から10分後に総計で1分の露光で獲得された。
 直後に蛍光画像シーケンスを、自動露出設定を使用してturboFP650(励起:6

10

20

30

40

50

05、発光：660～720）とバックグランドシグナル（励起：570、発光：640～720）の放射スキャンを実施することにより獲得した。腫瘍とバックグランドシグナルを分離させるために蛍光画像シーケンスをスペクトル分解し、Living Imageソフトウェア第4.2版（カリパー・ライフサイエンス社）を使用して標準尺度に合わせた。

【0154】

免疫組織化学

殺処理時に収集された腫瘍組織を10%ホルマリン中で24～36時間固定し、パラフィンに包埋した。標準的なプロトコルに従って4ミクロンの切片がマイクロトームを使用して切り出され、非常電スライドガラスに貼り付けられ、再水和された。スライドはOster スチーマー中で30分間pH6.0のクエン酸緩衝液を用いて前処理され、そして、15分間冷却させられた。一次抗体を次の濃度で使用した：ヒトNKp46（R&Dシステムズ社；AF1850、1：100）、IgG1 アイソタイプ対照（eBioscience社；カタログ番号14-4714-82、1：50）。抗体検出はホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとDABクロマジェン（chromagen）（コーヴァンス社）によるものであった。組織切片をヘマトキシリン中で対比染色した。実験毎にヒト扁桃組織を陽性対照として染色し、且つ、NK細胞注射を受けていないマウスの腫瘍組織を陰性対照として染色した。画像は10倍、40倍、および63倍の対物レンズの倍率で撮影された。

【0155】

インビボ追跡のためのルシフェラーゼ発現hESCからのNK細胞の作製

マウス異種移植モデルにおけるリンパ球輸送を試験するために発明者らはhESCからNK細胞を誘導するよく特徴解析されている分化プロトコルを用いた（Woll et al., 2005, Niet et al., 2011, Woll et al., 2009）。hESC由来NK細胞はインビトロとインビボの両方で強力な抗腫瘍活性を有するが、腫瘍の消失はNK細胞輸送の直接的な結果であることが示されていた。ホタルルシフェラーゼとGFPを発現するように改変されたhESC（Tian et al., 2009）を使用して、発明者らは最初に造血前駆細胞に分化し、後にNK細胞に分化する能力を示した（図17）。hESC由来NK細胞の機能をインビボでさらに探索するために発明者らはNK細胞の存続性および輸送、ならびに腫瘍組織量をモニターするためのモデルを開発した。発明者らはIV経路またはIP経路を介して免疫不全マウスに移転されたときのhESC由来NK細胞の生存を比較した。通常、養子免疫療法のエフェクター細胞はIV投与されてきた。養子移入されたNK細胞を用いる白血病の治療にとって、これらのエフェクターが脾臓および骨髄を含む腫瘍病変部位に移動し得ることが重要である。しかしながら、これは卵巣癌などの全ての悪性腫瘍に最適な送達系ではあり得ない。なお、IPアプローチを使用する非造血系区画または非リンパ系区画へのNK細胞の注射はより厳密な輸送試験を提供し得る。マウスは最初の7日の間にIL-2（10,000単位/マウス）とIL-15（10ng/マウス）の注射も受け、続いて試験の終了まで1日おきにIL-2（10,000単位/マウス）の注射も受けた。NK細胞のIP送達を受けているマウスはIV注射されたマウスと比べて長くなった存続性を有した（図18）。NK細胞のIV送達は最初にマウスの肺に細胞を輸送したが、第4日までに無くなった。一方、NK細胞のIP送達は4週間よりも長い存続性を引き起こす。第19日にマウスを殺処理し、末梢血、脾臓、骨髄、および腹膜の中での生着を調査した。NK細胞送達の両方の経路が、GFP⁺とCD56⁺CD45⁺細胞表面抗原によって測定されると末梢血、骨髄、および脾臓の中で低レベルの生着を有した。しかしながら、IV注射したマウスまたは対照と比べてIP注射したマウスの腹膜において高レベルのNK細胞が存在した（図18）。これは生物発光画像法データと一致し、且つ、NK細胞のIP送達がインビボでNK細胞の改善された存続性を可能とし、輸送の研究に最適であろうという結論になった。

【0156】

NK細胞はインビボで存続し、腫瘍と共同在する。

次に発明者らは、リンパ球存続性のよく特徴解析されているレポーターとして我々のhESC由来NK細胞によって安定して発現されるホタルルシフェラーゼ(Na et al., 2012, Negrin and Contag, 2006)をインビボで利用した。hESC由来NK細胞の強力な抗腫瘍活性をインビボで示す以前の研究はルシフェラーゼ陽性腫瘍細胞を使用した。しかしながら、発明者らはNK細胞を同時に追跡することができなかった。NK細胞と腫瘍の両方を同じマウスで撮影するために発明者らはガウシアルシフェラーゼファミリーの別のルシフェラーゼレポーターを採用した。膜につながるように改変された組み換え型のそのガウシアタンパク質(膜結合型ガウシアルシフェラーゼ、mbGluc)(Santos et al., 2009)を使用して、
10

発明者らは2つの異なる基質を利用して腫瘍とNK細胞の両方を同じマウスで撮影することができた。発明者らはmCAGSプロモーターによって駆動されるスリーピング・ビューティー(Sleeping Beauty)骨格にmbGluc遺伝子を最初にサブクロン化した。発明者らはK562腫瘍細胞を安定的に形質導入し、ルシフェリン(ホタルルシフェラーゼによって活性化される)には応答しないが、基質であるセレンテラジン(ガウシアルシフェラーゼによって活性化される)に応答するルシフェラーゼ活性を有する細胞を選択することができた。

【0157】

両方のレポーターをインビボで使用するために発明者らはmbGlucの基質であるセレンテラジンはインビボで急速に分解される(Santos et al., 2009)という事実を利用した。ホタルルシフェラーゼ(hESC由来NK細胞において発現する)は相互にインビボで安定しており(Santos et al., 2009, Kim et al., 2010)、2番目に送達された。これらの2つのレポーターを使用することで、発明者らはmbGluc⁺腫瘍細胞を最初に撮影し、次に同じマウスにおいてホタルluc発現hESC由来NK細胞を撮影することができた。発明者らは致死未満線量で放射線照射したマウスの中でK562腫瘍細胞をNK細胞注射前の4日間に生着させることにより我々の最初のモデル(Woll et al., 2009)を再現した。この試験の目的はNK細胞輸送を試験することであったので、発明者らは腫瘍をよりよく増殖させるために腫瘍用量を100万細胞に増加させた。発明者らの以前の研究は完全な腫瘍の消失を示しており、マウス当たり200,000細胞の用量を使用した。
20

第0日にNK細胞をIP投与し、マウスをサイトカインで処置した。マウスを第0日、第4日、第7日、第9日から第12日に腫瘍サイズとNK細胞輸送の両方について評価した。ここで、NK細胞は腫瘍部位に移動することができた(図19)。これは第9日と第12日の間に起きるのが典型的であったが、マウスの中で様々であった。なお、全てのマウスが生物発光によって輸送を示したわけではなかった(6匹のマウスのうちの4匹が輸送を示した)。このように、hESC由来NK細胞はこの二元生物発光系において輸送について追跡され得る。全てのマウスが輸送を示したわけではないが、これは生物発光シグナルを示すのに必要なルシフェラーゼ⁺細胞の絶対数と陰性マウスが検出限界未満であり得ることが原因であり得た。なお、マウスの腫瘍組織量の増加(1×10⁶細胞対200,000細胞)は十分なNK細胞が蓄積し、バックグランドよりも強い生物発光シグナルを発するため必要であった。
30

40

【0158】

ホタルルシフェラーゼと蛍光タンパク質turboFP650を用いる改善型二元レポーター画像法

ホタルルシフェラーゼと併せてmbGlucを使用することにより、信頼できるが、技術的には困難であるNK細胞輸送を研究するためのモデルが提供された。これは主にガウシアルシフェラーゼの基質であるセレンテラジンが静脈内送達される必要があるからである。これは幾つかの理由のために困難であった。まず、基質の消失動態のため、限られた数のマウスしか同時に画像撮影することができなかった(Santos et al., 2009)。また、セレンテラジン基質を繰り返し注射することにより時間と共に尾静
50

脈の損傷が引き起こされる。このことを打開するために発明者らは、インビボで画像撮影され得るつい最近記載された蛍光レポーター (Scherberbo et al., 2010、Lin et al., 2009) を利用した。TurboFP650は赤色側に偏移した蛍光レポーター(励起592nm、発光650nm)であり、最適なインビボ画像撮影のための組織浸透性を有する。それは2つ目の基質の送達を必要することもない。発明者らはスリーピング・ビューティーを使用してK562細胞中でturboFP650タンパク質を発現させるために同様のクローニングアプローチを用いた。TurboFP650の安定な発現はフローサイトメトリーにより測定された。1週間よりも長い期間の安定的な形質導入を確認した後に上と同じパラメーターを用いて細胞を選別した。選別された細胞はTurboFP650タンパク質の発現を維持し、さらなるインビボ試験に使用した(図20)。

10

【0159】

上と同じインビボモデルを使用してマウスに100万個のTurboFP650⁺K562腫瘍細胞を移植し、7日間生着させた。その後、第0日にマウスにホタルルシフェラーゼ発現NK細胞を腹腔内投与し、輸送について追跡した。二元ルシフェラーゼ試験と同様に、NK細胞は5匹のマウスのうちの4匹でturboFP650⁺腫瘍細胞を追跡することができ、これはNK細胞注射後9~12日の間に起きた(図20)。腫瘍組織量とNK細胞の量を同時に測定することができることが重要である。まず、turboFP650は腫瘍進行の信頼できるインビボマーカーを提供する。発明者らは腫瘍組織量の有意な増加を全てのマウスにおいて第9日(P=0.0027)と第12日(P=0.0022)の両方で観察した。次に発明者らはそれらのマウスのそれぞれにおける全NK細胞シグナルのレベルを測定し、前のようにレベルが第0日から第9日(0.0001)まで、または第12日(P=0.0001)までに有意に低下することを観察した。交換的に、発明者らは腫瘍部位におけるNK細胞シグナルの上昇を第9日(P=0.0246)と第12日(P=0.0043)に観察しており、これはhESC由来NK細胞の腫瘍部位への輸送の成功を示した。これらのデータはmbGluCと比べたレポーターとしてのturboFP650の使用を支援する。セレンテラジンベースのレポーターを使用することの技術的制約を打開することにより、これらの研究は時間と共に2つの細胞集団をモニターするための改良されたインビボ系を提供する。

20

【0160】

免疫組織化学により確認された腫瘍へのhESC由来NK細胞の輸送

腫瘍部位におけるNK細胞を決定的に示すために発明者らはマウスから取り出された腫瘍をより詳しく調べた。腫瘍部位におけるヒトNK細胞の存在を確認するために発明者らは腫瘍を取り出し、それらをパラフィン包埋し、免疫組織化学をNK細胞輸送の定性的な確認手段として用いた。腫瘍のみ(NK細胞注射無し)の群およびアイソタイプ対照と比べて、生物発光画像法により示されたNK細胞輸送を有するマウスはIHCでNKp46により示されるように存在するヒトNK細胞を有した(図21)。ヒト扁桃組織を陽性対照として用いた。NKp46は、CD56が他の種類の組織も標識することができるので、ヒトNK細胞のより特異的なマーカーである。IHC染色で陽性のNK細胞は染色された各腫瘍組織切片全体に均一に散在しており、切片当たり15~20個のhESC由来NK細胞が存在した。これらのデータはNK細胞の腫瘍部位への輸送、およびホタルルシフェラーゼを使用する生物発光画像法がリンパ球のインビボ輸送を研究するための有効なモデルであることをさらに支持する。

30

40

【0161】

考察

これらの研究により、hESC由来NK細胞の腫瘍部位への輸送を示し、且つ、hESC/iPSC由来NK細胞が腫瘍細胞をインビボで直接殺滅するという仮説を強力に支持することができたことが重要である。二元生物発光画像撮影モデルを活用しなかったら、輸送は識別するのがもっと困難であったろう。なお、生物発光画像法を用いることによりIHCよりも簡単に迅速な定量が可能となった。全てのマウスが生物発光画像法により輸

50

送を大いに示したわけではなく、輸送の兆候は9～12日にわたる範囲であった。しかしながら、生物発光定量は腫瘍領域においてNK細胞シグナルの蓄積に著しい差異を示す(図20)。いくらかのNK細胞の輸送は我々の検出限界未満である可能性がある。すなわち、NK細胞は実際に腫瘍に移動することができるが、腫瘍環境内に留まるための正確なシグナルを受け取らない。この場合では、腫瘍内持続性と活性を改善するために腫瘍特異的受容体を有するNK細胞を改変することができるだろう(Moon et al., 2011)。これは、ヒトT細胞においてキメラ抗原受容体を使用して近年達成された(Porter et al., 2011、Carpenito et al., 2009)。hESCおよびiPSCはそのような改変のために最適なプラットフォームを提供する。それらの研究は、非改変hESC由来NK細胞が疾患を消失させるために腫瘍部位に移動するという我々の最初の発見も確認する。

10

【0162】

まとめると、これらのデータはマウスにおいてヒト細胞の2つの異なる集団を追跡するためのモデル系を提供し、それは抗腫瘍治療に限定されるべきではない。hESC/iPSC由来細胞と組み合わせられた2つの多様なレポーター系を使用することは、多数の生物学システムへの広範な適用可能性を有する。治療目的にとって、hESCからほとんどあらゆる血液細胞を派生させる能力のため、新しい治療法のための細胞バンクを提供することができるだろう(Kaufman, 2009)。あるいは、iPSC作製が比較的簡単であること、およびこのプロセスの技術的進歩を考えると、治療のために患者の自家細胞を使用するという考えも合理的である(Daley, 2007)。hPSCはリン

20

【0163】

本明細書において開示および請求された方法の全ては本開示を踏まえると過度の実験を行うことなく実施および履行され得る。本発明の組成物と方法は好ましい実施形態との関係で記載されているが、本発明の構想、精神、および範囲から逸脱することなくそれらの方法、および本明細書に記載される方法のステップまたは一連のステップに変更を行うことができることは当業者に明らかである。より具体的には、本明細書に記載される薬剤を化学的にも生理学的にも関連するある特定の薬剤で置換することができ、同一または類似の結果が達成されるだろうことは明らかである。当業者にとって明らかである全てのそのような置換物および改変は添付されている特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、および構想の範囲内にあるとみなされる。

30

【0164】

参照文献

次の参照文献は、それらが本明細書において記載される細目を補完する例となる処置または他のことについての細目を提供する限り、特異的に参照により本明細書に組み込まれる。

40

米国特許第6,225,042号明細書

米国特許第6,355,476号明細書

米国特許第6,362,001号明細書

米国特許第6,790,662号明細書

米国特許第6,815,450号明細書

米国特許第6,943,172号明細書

米国特許第7,348,339号明細書

米国特許第7,459,424号明細書

米国特許出願公開第2009/0017000号明細書

米国特許出願公開第2009/0004142号明細書

50

欧州特許出願公開第00187371号明細書
 国際公開第98/30679号
 国際公開第00/057913号
 国際公開第00/078351号
 国際公開第2007/103009号

- Bashey et al., *Transfusion*, 47(11):2153-60, 2007
- Bhardwaj et al., *Nat. Immunol.* 2(2):172-80, 2001. 10
- Bhatia et al., Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 189(7):1139-48, 1999.
- Campana et al. *Cancer Res.* 69(9):4010-4017, 2009.
- Carpenito et al., Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:3360-3365, 2009. 20
- Carson et al., A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *The Journal of Clinical Investigation*, 99:937-943, 1997.
- Chadwick et al., Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 102(3):906-15, 2003. 30
- Cho et al., Expansion and Activation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Korean J Lab Med.* 29(2): 89-96, 2009.
- Choi et al., Hematopoietic and Endothelial Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*, 27:559-567, 2009.
- Cooley et al., Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116:2411-2419, 2010. 40
- Daley, Towards the generation of patient-specific pluripotent stem cells for combined gene and cell therapy of hematologic disorders. *Am. Soc. Hematol. Educ. Prog.*, 2007:17-22, 2007.
- Davidson and Zon, Turning mesoderm into blood: the formation of hematopoietic st 50

- em cells during embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 50:45-60, 2000.
- Davies et al., Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, 351(Pt 1):95-105, 2000.
- Denman et al., Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS ONE*, 7:e30264, 2012. 10
- Drexler et al., *Growth Factors*, 22(2):71-73, 2004.
- Fadilah et al., Cord blood CD34+ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c+CD1a-/c- myeloid dendritic cells. *Stem Cells, Dev.*, 16(5):849-55, 2007
- Fujisaki et al., Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Research*, 69:4010-4017, 2009. 20
- Galic et al., T lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:11742-11747, 2006.
- Gaur et al., Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost.*, 4(2):436-42, 2006. 30
- Hill et al., Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function. *Experimental Hematology*, 38:246-257, 2010.
- Huber et al., Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood*, 92(11):4128-37, 1998.
- Ikenoya et al., Inhibition of rho-kinase-induced myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in human neuronal cells by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor. *J. Neurochem.* 81(1):9-16, 2002. 40
- Kaufman, Toward clinical therapies utilizing hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood*, 114:3513-3523, 2009.
- Kim et al., Licensing of natural killer 50

- cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436:709-713, 2005.
- Kim et al., Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo. *PLoS One*, 5:e9364, 2010.
- Kiselyov et al., *Structure*, 11(6):691-701, 2003.
- Knorr and Kaufman, Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy. *Translational Research*, 156:147-154, 2010. 10
- Kopher et al., Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells function as MSC progenitor cells. *Bone*, 47:718-728, 2010.
- Ledran et al., Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 3:85-98, 2008. 20
- Lin et al., *Int. J. Mol. Med.* 17:833-839, 2006.
- Lin et al., Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem. Biol.*, 16:1169-1179, 2009.
- Ljunggren and Malmberg, Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology*, 7:329-339, 2007. 30
- Ludwig et al., *Nature Biotech.*, (2):185-187, 2006a.
- Ludwig et al., *Nature Methods*, 3(8):637-646, 2006b.
- Maekawa et al., *Science*, 285(5429):895-899, 1999.
- Marshall et al., *Blood*, 96:1591-1593, 2000.
- Miller et al., Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 105:3051-3057, 2005. 40
- Moon et al., Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and eradication by human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin. Cancer Res.*, 17:4719-4730, 2011.
- Mrozek et al., Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural 50

- killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 87:2632-2640, 1996.
- Na et al., Concurrent visualization of trafficking, expansion, and activation of T lymphocytes and T-cell precursors in vivo. *Blood*, 116:28, 2010.
- Negrin and Contag, In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology*, 6:484-490, 2006. 10
- Ng et al., A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies. *Nature Protocols*, 3:768-776, 2008.
- Ng et al., Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*, 106:1601-1603, 2005. 20
- Ni et al., Human pluripotent stem cells produce natural killer cells that mediate anti-HIV-1 activity by utilizing diverse cellular mechanisms. *Journal of Virology*, 85:43-50, 2011.
- Porter et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New Engl. J. Med.*, 365:725-733, 2011. 30
- Ratajczak et al., *Br. J. Haematol.*, 93(4):772-782, 1996.
- Robinton and Daley, The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481:295-305, 2012.
- Rosenberg et al., Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8:299-308, 2008. 40
- Sadelain et al., The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 21:215-223, 2009.
- Santos et al., Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound *Gussia princeps* luciferase. *Nat. Med.*, 15:338-344, 2009.
- Sasaki et al. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4 50

-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther.* 93(2-3):225-32, 2002.

Schwartz et al., Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet*, 379:713-720, 2012.

Shcherbo et al., Near-infrared fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 7:827-829, 2010. 10

Tian et al., Bioluminescent imaging demonstrates that transplanted human embryonic stem cell-derived CD34+ cells preferentially develop into endothelial cells. *Stem Cells*, 27:2675-2685, 2009.

Torikai et al., A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*, 119:5697-5705, 2012. 20

Wagemaker et al., *Biotherapy*, 2(4):337-345, 1990.

Woll et al., Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood*, 113:6094-6101, 2009.

Woll et al., Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *Journal of Immunology*, 175:5095-5103, 2005. 30

Yamamura et al., *Stem Cells*, 26(2):543-9, 2008.

【 図 1 】

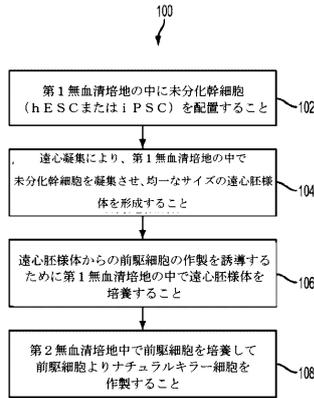


図 1

【 図 2 】

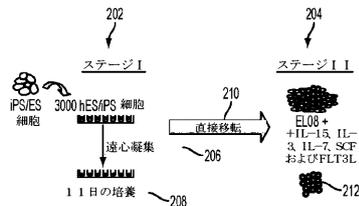


図 2

【 図 3 】

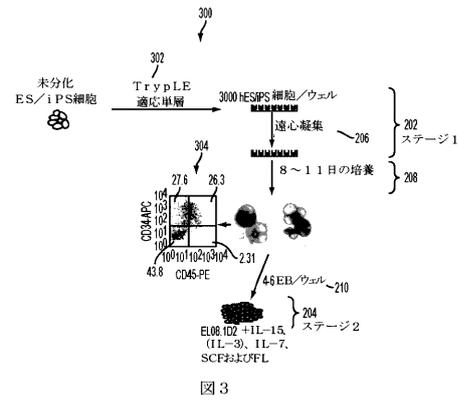


図 3

【 図 4 A 】

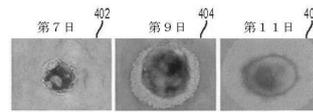


図 4 A

【 図 4 B 】

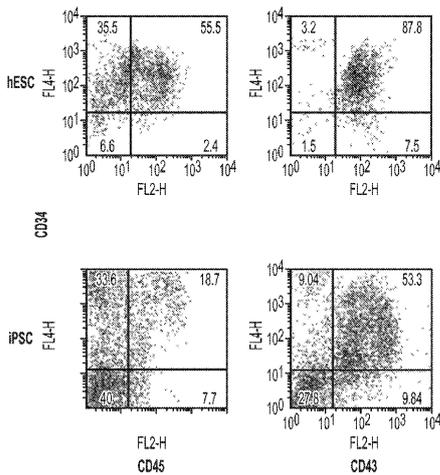
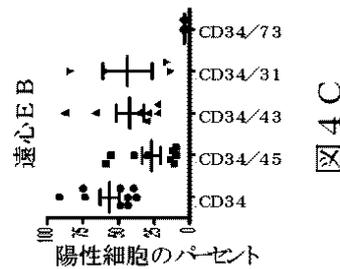
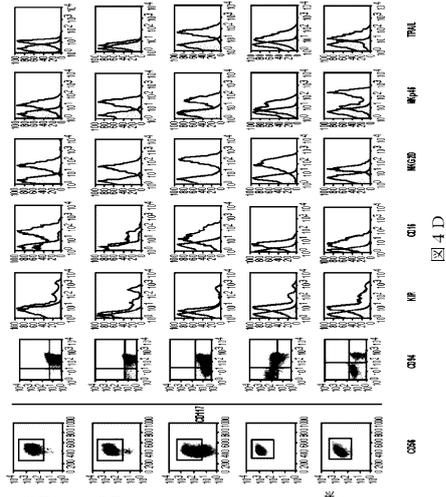


FIG. 4B

【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 5 】

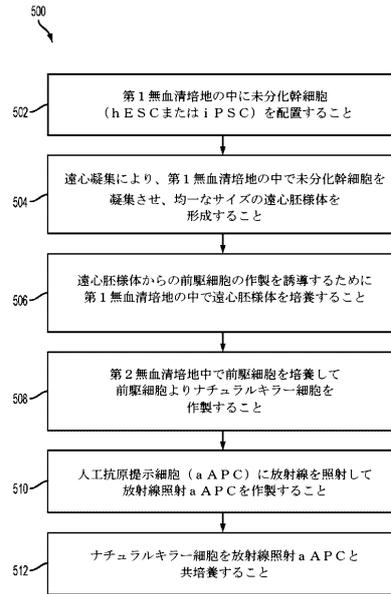


図 5

【 図 6 A 】

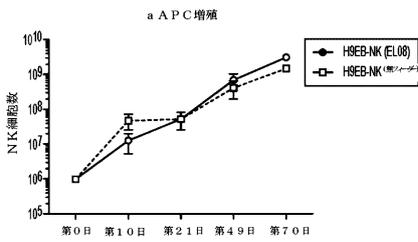


図 6 A

【 図 6 C 】

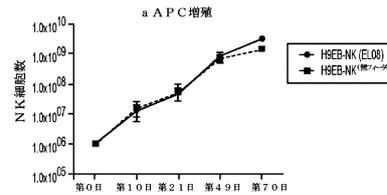


図 6 C

【 図 6 B 】

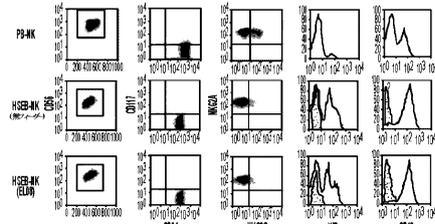


図 6 B

【 図 7 】

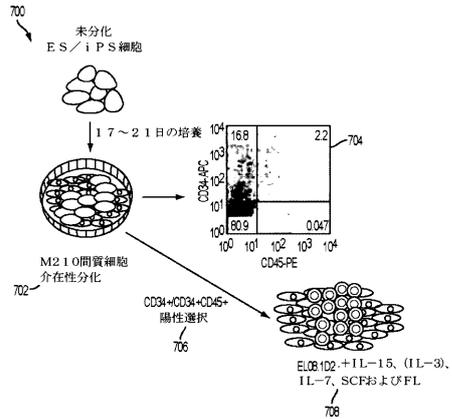


図 7

【 図 8 A 】

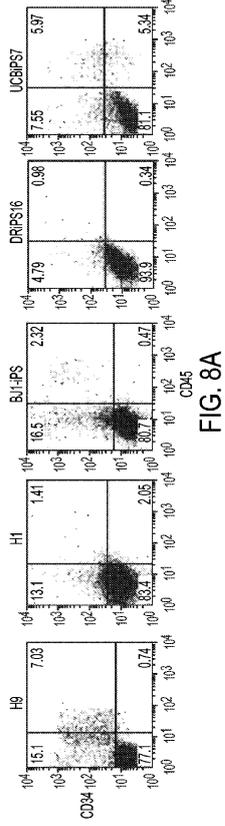


FIG. 8A

【 図 8 B 】

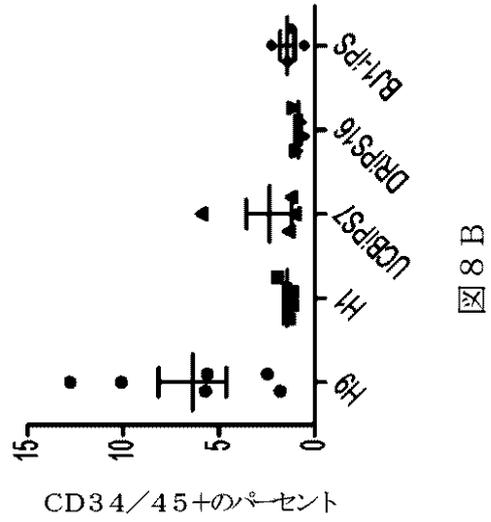


図 8 B

【 図 8 C 】

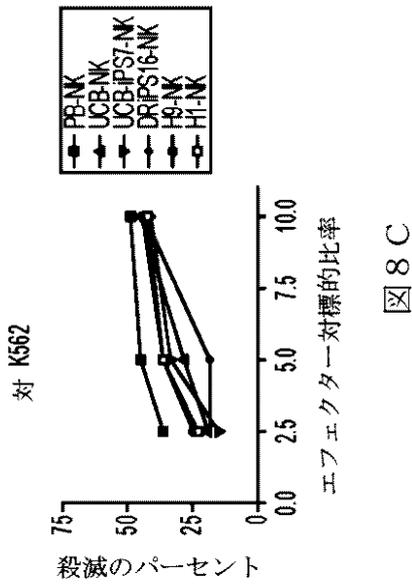


図 8 C

【 図 9 】

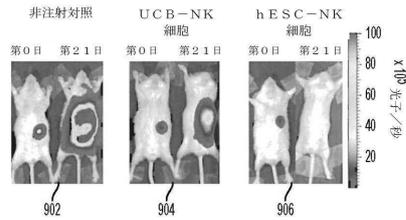


図 9

【 図 1 0 】

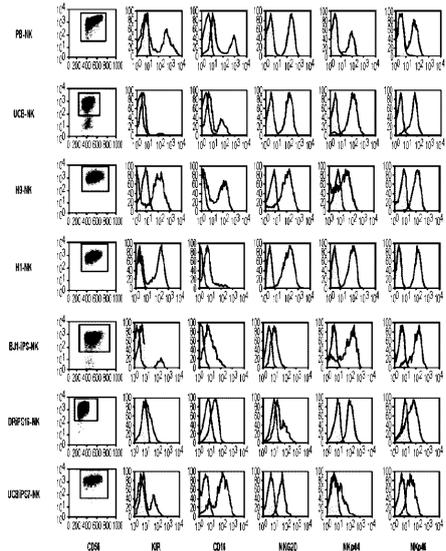


図 1 0

【 図 1 1 】

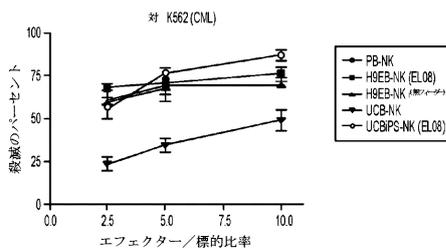


図 1 1

【 図 1 2 】

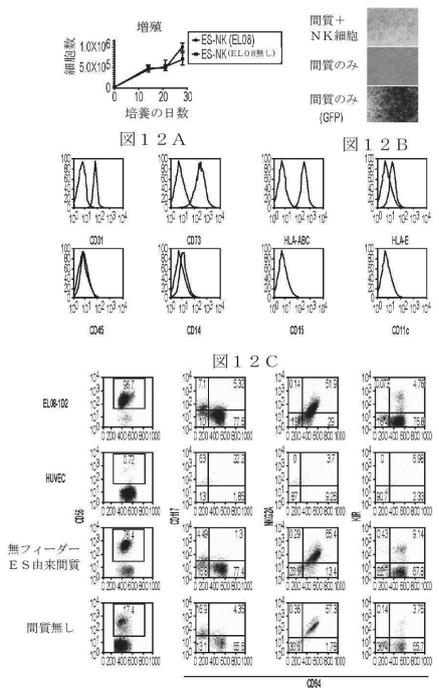


図 1 2 D

【 図 1 3 】

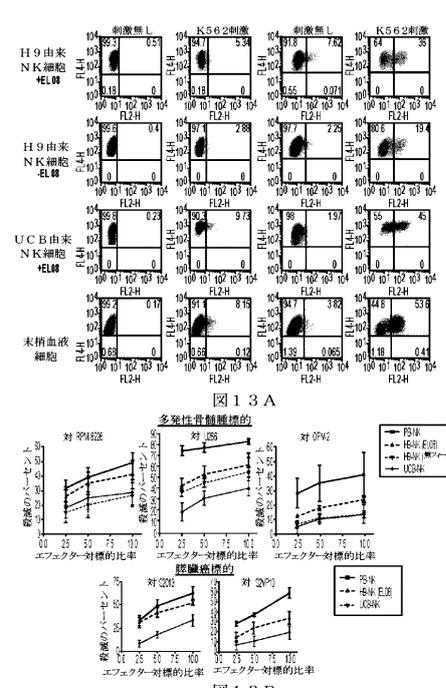


図 1 3 B

【 図 1 4 】

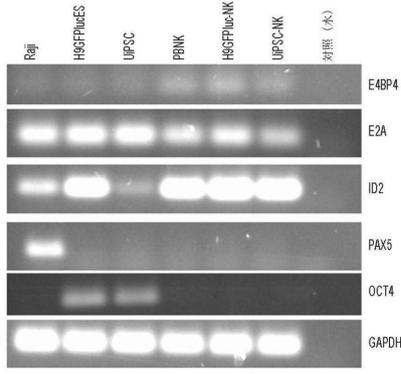


図 1 4

【 図 1 5 】

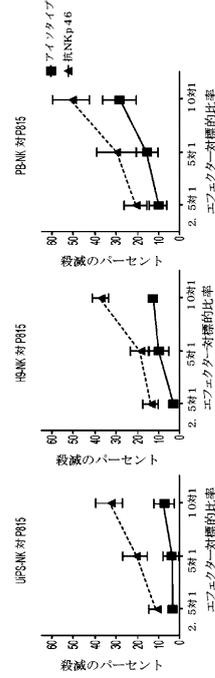


図 1 5

【 図 1 6 】

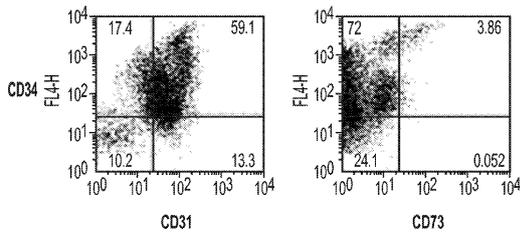


FIG. 16A

【 図 1 7 】

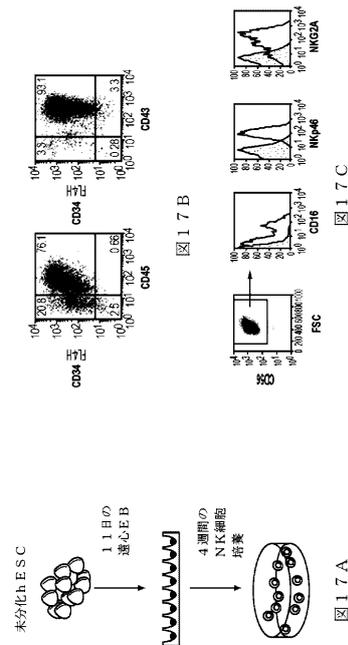


図 1 7 A

図 1 7 B

図 1 7 C

【 図 1 8 - 1 】

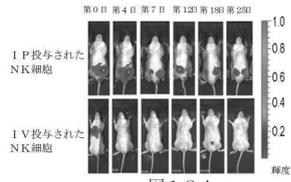


図 1 8 A

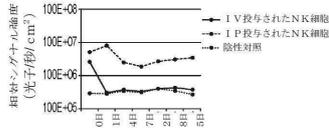


図 1 8 B

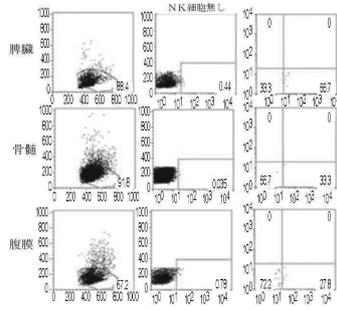


図 1 8 C

【 図 1 8 - 2 】

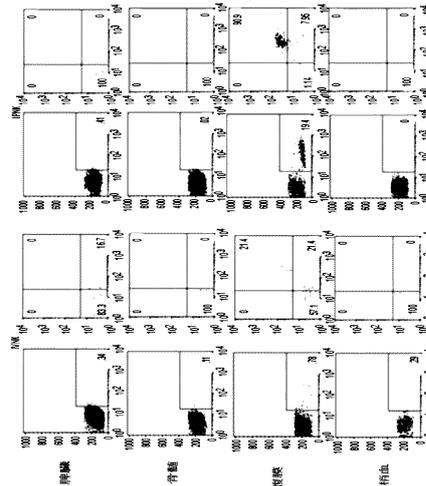


図 1 8 C (続)

【 図 1 9 】

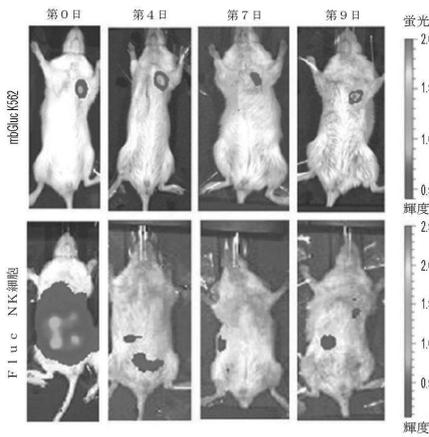


図 1 9

【 図 2 0 】

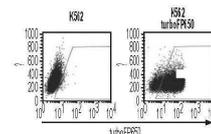


図 2 0 A

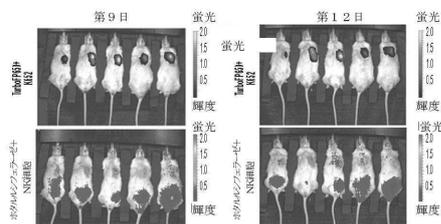


図 2 0 B

図 2 0 C

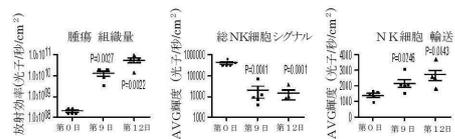


図 2 0 D

【 図 2 1 】

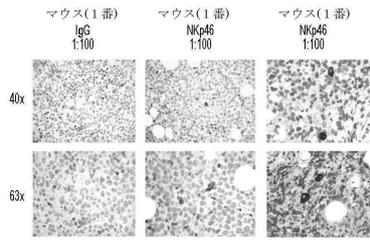


図 2 1 A

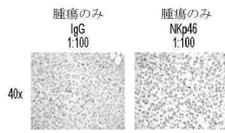


図 2 1 B

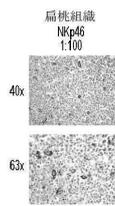


図 2 1 C

【 配列表 】

0006529541000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 カウフマン, ダン エス.

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 5 5 , ミネアポリス, デラウェア ストリート エスイー
4 2 0 , ユニバーシティ オブ ミネソタ, マヨ メール コード 4 8 0 気付

(72)発明者 クノール, デイビッド エー.

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 5 5 , ミネアポリス, デラウェア ストリート エスイー
4 2 0 , ユニバーシティ オブ ミネソタ, マヨ メール コード 4 8 0 気付

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特表2010-505845(JP,A)

BLOOD, 2010年11月, V116 N21, P53

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C a p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)