

明 細 書

発明の名称： ナチュラルキラー細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医療分野において有用なナチュラルキラー細胞（以下、「NK細胞」と略記する場合がある）を多能性幹細胞から効率的かつ大量に製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 多能性幹細胞からNK細胞を誘導する方法について数多くの報告がなされている。例えば、特許文献1には、多能性幹細胞スフェアから造血前駆細胞（以下、「HPC」と略記する場合がある）を介してNK細胞を誘導する方法が記載されている。本発明者らは、三次元培養において形成させる多能性幹細胞のスフェアの平均粒径を従来よりも大きくし、さらに灌流培養法を組み合わせることで、効率的かつ迅速にNK細胞を誘導できることを見出し、特許出願している（特許文献2）。

[0003] 一方、培地添加物の検討としては、例えば、特許文献3にnotchリガンドを用いたNK細胞誘導法が開示されている。また、特許文献4にはnotchリガンドとポリコーム複合体の構成要素であるヒストンメチルトランスフェラーゼEZH1の阻害剤とを用いたリンパ系列細胞の誘導法が開示され、さらには、notchリガンドとアリルハイドロカーボン受容体（AHR）アンタゴニストであるStemRegenin 1（SR1）とを用いたT前駆細胞の誘導法（特許文献5）や、SR1と trombopoietin（TPO）とを用いたCD34陽性細胞からのNK細胞誘導法（特許文献6）が報告されている。

しかしながら、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害又はAHR阻害単独でのNK細胞誘導効果は明らかとはいえず、また、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害とAHR阻害とを組み合わせた場合の効果については、全く報告がない。

このような背景のもと、更に誘導効率を高めたNK細胞誘導法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO 2020/086889

特許文献2：WO 2023/145922

特許文献3：US 8, 518, 397

特許文献4：WO 2018/048828

特許文献5：WO 2021/200901

特許文献6：WO 2017/046142

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 従って、本発明の目的は、従来技術に比べて効率よく多能性幹細胞からNK細胞を誘導する方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、灌流培養法と組み合わせることで、当該方法による誘導効率改善効果をさらに高めることができる、新規な多能性幹細胞からのNK細胞の誘導方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記の目的を達成すべく種々検討した結果、多能性幹細胞からHPCを経由してNK細胞をインビトロで誘導する方法において、

- a) 多能性幹細胞からHPCを誘導する工程；
- b) HPCを増幅する工程；及び
- c) HPCからNK細胞又はその前駆細胞を誘導する工程

の1以上の工程において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はAHRを阻害することによって、効率的かつ迅速にNK細胞を誘導できることを見出した。さらに、工程a)ないしc)を三次元培養により行い、工程a)において形成させる多能性幹細胞のスフェアの平均粒径を200 μ m以上とし、該ス

フェアからHPCを含む細胞集団を誘導し、その後の培養の少なくとも一部において灌流培養法を組み合わせることにより、いっそう効率よくNK細胞を誘導することに成功して、本発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち本発明は以下の通りである。

[項 1]

多能性幹細胞からナチュラルキラー（NK）細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、

- a) インビトロにおいて、多能性幹細胞から造血前駆細胞（HPC）を誘導する工程；
- b) インビトロにおいて、HPCを増幅する工程；及び
- c) インビトロにおいて、HPCからNK細胞又はその前駆細胞を誘導する工程を含み、工程 a) ないし c) の 1 以上の工程において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はアリルハイドロカーボン受容体（AHR）を阻害することを特徴とする、方法。

[項 2]

ヒストンメチルトランスフェラーゼが、ヒストン3リジン残基27（H3K27）へのメチル基の付加を触媒するものである、項 1 に記載の方法。

[項 3]

ヒストンメチルトランスフェラーゼが、EZH1（enhancer of zeste homolog 1）及び／又はEZH2（enhancer of zeste homolog 2）である、項 1 に記載の方法。

[項 4]

ヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害が、低分子阻害剤によるものである、項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項 5]

低分子阻害剤が、GSK126、EPZ005687、GSK343、Tazemetostat（EPZ-6438）、UNC1999、EBI-2511、PF-06726304、Lirametostat（CPI-1205）、EPZ011989、CPI-169、CPI-360、GSK503、EI1、OR-S0、OR-S1、DS-3201、FT671、XL17

7A、P5091、HBX19818、Parthenolide、GNE-6640、XL188、又はL55である、項4に記載の方法。

[項6]

AHRの阻害が、AHRに対してアンタゴニスト活性を有するものである、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[項7]

AHRの阻害が、低分子阻害剤によるものである、項1～6のいずれか一項に記載の方法。

[項8]

低分子阻害剤が、SR1 (StemRegenin 1)、CH-223191、GNF-351、7-ケトコレステロール、CB7993113、6,2',4'-トリメトキシフラボン、PD98059、又はBAY 2416964である、項7に記載の方法。

[項9]

工程a)ないしc)の1以上の工程が、灌流培養法で行われる、項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[項10]

多能性幹細胞からNK細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、

(1) 第一の培地中で、平均粒径200 μm 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程；

(2) 工程(1)で得られた多能性幹細胞スフェアを、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第二の培地を用いた三次元培養によりHPCを含む細胞集団に誘導する工程；並びに

(3) 工程(2)で得られたHPCを含む細胞集団を、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第三の培地を用いた三次元培養によりNK細胞又はその前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程を含み、工程(1)ないし(3)の1以上の工程を灌流培養法で行う、方法。

[項 1 1]

ヒストンメチルトランスフェラーゼが、H3K27へのメチル基の付加を触媒するものである、項 1 0 に記載の方法。

[項 1 2]

ヒストンメチルトランスフェラーゼが、EZH1及び／又はEZH2である、項 1 0 に記載の方法。

[項 1 3]

ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、低分子阻害剤である、項 1 0 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項 1 4]

低分子阻害剤が、GSK126、EPZ005687、GSK343、Tazemetostat (EPZ-643 8)、UNC1999、EBI-2511、PF-06726304、Lirametostat (CPI-1205)、EPZ0119 89、CPI-169、CPI-360、GSK503、EI1、OR-S0、OR-S1、DS-3201、FT671、XL17 7A、P5091、HBX19818、Parthenolide、GNE-6640、XL188、又はL55である、項 1 3 に記載の方法。

[項 1 5]

AHRアンタゴニストが、低分子阻害剤である、項 1 0 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項 1 6]

低分子阻害剤が、SR1、CH-223191、GNF-351、7-ケトコレステロール、C B7993113、6,2',4'-トリメトキシフラボン、PD98059、又はBAY 2416964である、項 1 5 に記載の方法。

[項 1 7]

工程 (1) ないし (3) を三次元培養用担体及び細胞外基質を用いることなく実施する、項 1 0 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項 1 8]

工程 (1) における灌流培養が細孔径15～75 μm の分離膜を使用して行われる、項 1 7 に記載の方法。

[項 19]

工程（２）における灌流培養が細孔径45～225 μm の分離膜を使用して行われる、項 17 又は 18 に記載の方法。

[項 20]

工程（３）における灌流培養が細孔径0.2～10 μm の分離膜を使用して行われる、項 17 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

[項 21]

工程（１）ないし（３）を連続的な灌流培養法で行う、項 16 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

[項 22]

第一の培地がROCK阻害剤を含む、項 16 ～ 21 のいずれか一項に記載の方法。

[項 23]

第二の培地がVEGF、BMP4及びGSK3 β 阻害剤を含む、項 16 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

[項 24]

第二の培地がさらにROCK阻害剤又はbFGFを含む、項 23 に記載の方法。

[項 25]

第二の培地がSCF、TGF β /Smad阻害剤及びVEGFを含む、項 16 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

[項 26]

第二の培地がさらにROCK阻害剤又はbFGFを含む、項 25 に記載の方法。

[項 27]

第二の培地がSCF及びFlt3Lを含む、項 16 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

[項 28]

第二の培地がさらにROCK阻害剤、IL-3及びIL-7から選択される少なくとも一つを含む、項 27 に記載の方法。

[項 29]

工程（２）における三次元培養が、
（２－１）第二の培地としてVEGF、BMP4及びGSK3 β 阻害剤を含む培地を用いた培養工程と、
（２－２）第二の培地としてSCF、TGF β /Smad阻害剤及びVEGFを含む培地を用いた培養工程と、
（２－３）第二の培地としてSCF及びFlt3Lを含む培地を用いた培養工程と、を含む、項 16～22のいずれか一項に記載の方法。

[項 30]

第三の培地がIL-15及びSCFを含む、項 16～29のいずれか一項に記載の方法。

[項 31]

第三の培地がさらにIL-7及びFlt3Lを含む、項 30に記載の方法。

[項 32]

NK細胞の分別工程を必要としない、項 16～31のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はAHRシグナルを阻害することにより、多能性幹細胞から、効率的に大量のNK細胞を一度に製造することを可能にする。当該方法を、灌流培養を組み合わせた三次元培養に行うことにより、きわめて効率よくかつ迅速にNK細胞を製造することができる。当該方法により製造されたNK細胞は、各種がん細胞に対して高い細胞傷害活性を示し、その活性は凍結しても低下することなく維持されるため、大規模な臨床適用が可能になる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]工程（２）で得られた造血前駆細胞を種々の条件で浮遊培養してNK細胞へと分化誘導した場合の、NK生細胞密度の経日変化を示す図である。

[図2]工程（２）で得られた造血前駆細胞を種々の条件で浮遊培養してNK細胞へと分化誘導した場合の、CD56陽性細胞の経日変化を示す図である。

[図3]工程（２）で得られた造血前駆細胞を種々の条件で浮遊培養してNK細胞へと分化誘導した場合の、分化誘導10、17、24、32及び39日後の細胞集団におけるCD56及びCD14の発現を示すFACS解析結果である。

発明を実施するための形態

- [0010] 本発明は、多能性幹細胞からNK細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、
- a) インビトロにおいて、多能性幹細胞からHPCを誘導する工程；
 - b) インビトロにおいて、HPCを増幅する工程；及び
 - c) インビトロにおいて、HPCからNK細胞又はその前駆細胞を誘導する工程
- を含み、工程 a) ないし c) の 1 以上の工程において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はAHRを阻害することを特徴とする、方法（以下、「本発明の方法」という場合がある）を提供する。
- [0011] 本発明の方法に用いられる多能性幹細胞としては、胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞が挙げられるが、特に制限されない。例えばiPS細胞を用いる場合、iPS細胞の製造方法や由来細胞などは特に限定されない。またiPS細胞の培養方法も特に限定されず、二次元培養であっても三次元培養であってもよい。さらに凍結保存したiPS細胞であっても使用可能である。
- [0012] 本発明の方法は、多能性幹細胞から、HPCを経由して、NK細胞又はその前駆細胞をインビトロで誘導する。即ち、本発明の方法は、
- a) インビトロにおいて、多能性幹細胞からHPCを誘導する工程；
 - b) インビトロにおいて、HPCを増幅する工程；及び
 - c) インビトロにおいて、HPCからNK細胞又はその前駆細胞を誘導する工程
- を含む。ここで、工程 a) と工程 b) とは、同一もしくは一連の培地を用いて、HPCへの分化誘導からHPCの維持増幅を連続的に行ってよく、その場合、維持増幅期を含めて、多能性幹細胞からHPCを誘導する工程とみなすことができる。あるいは、工程 a) により得られたHPCを、例えば凍結保存すること

によりいったんストックし、一定期間保存した後、該HPCストックを工程 b) に供してもよい。例えば、工程 a) 及び b) を連続的な灌流培養法による三次元培養にて実施する場合（例えば、後述する本発明の好適な実施態様の場合）、多能性幹細胞スフェアからHPCを含む細胞集団を誘導し、HPCをさらに純化・増幅する過程を、同一もしくは一連の培地を用いた一工程（本発明の好適な実施態様における工程（2））として行うことができる。

[0013] 多能性幹細胞は、自体公知の方法、例えば、WO 2020/086889、Biochem Biophys Res Commun. 515(1): 1-8 (2019)、Methods Mol Biol. 2048: 107-119 (2019)等に記載の方法により、HPCを経由してNK細胞に分化誘導することができる。

例えば、工程 a) は、多能性幹細胞をHPCに誘導することができる培地で多能性幹細胞を培養することにより実施することができる。そのような培地としては、例えば、血管内皮増殖因子（VEGF）、骨形成タンパク質4（BMP4）及びグリコーゲン合成酵素3 β （GSK3 β ）阻害剤を含む培地、幹細胞因子（SCF）及びトランスフォーミング増殖因子 β （TGF β ）/Smad阻害剤を含む培地、SCF及びFlt3リガンド（Flt3L）を含む培地等が挙げられるが、それらに限定されない。

例えば、工程 b) は、HPCを維持増幅することができる培地でHPCを培養することにより実施することができる。そのような培地としては、例えば、SCF及びFlt3リガンド（Flt3L）を含む培地等が挙げられるが、それらに限定されない。

例えば、工程 c) は、HPCをNK細胞に誘導することができる培地でHPCを培養することにより実施することができる。そのような培地としては、例えばIL-15及びSCFを含む培地等が挙げられるが、それらに限定されない。

[0014] 前期工程 a) ないし c) における基礎培地としては、例えば、DMEM/F-12、HEPES(Thermo Fisher Scientific)、Essential 6 medium(Thermo Fisher Scientific)、Stem Pro-34 SFM (Thermo Fisher Scientific)、AIM-V Medium (Thermo Fisher Scientific)、Stemline（登録商標）II(Sigma-Aldrich)、

ALyS505N-0(株式会社細胞科学研究所)等を挙げることができ、当業者は各工程に応じて好適な基礎培地を適宜選択することができる。

[0015] 工程a)ないしb)における培養期間は、通常5～20日であり、好ましくは10～18日程度である。

工程c)における培養期間は、通常20～60日であり、好ましくは25～40日程度である。

[0016] 本発明の方法は、前期工程a)ないしc)の1以上の工程において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はAHRを阻害することを特徴とする。

[0017] 本発明の方法において標的となるヒストンメチルトランスフェラーゼは特に限定されないが、好ましくは、ヒストン3リジン残基27 (H3K27) へのメチル基の付加を触媒するものであり、より好ましくは、EZH1 (enhancer of zeste homolog 1) 及び／又はEZH2 (enhancer of zeste homolog 2) である。

[0018] ヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害は、該酵素の阻害活性を有する物質を培地に添加することにより実施することができる。ここで「ヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害」とは、結果的に該酵素が触媒するヒストンへのメチル基転移反応を阻害する限り、いかなる様式によるものであってもよく、該酵素の機能だけでなく、発現を阻害するものであってもよい。ヒストンメチルトランスフェラーゼの機能を阻害する物質としては、例えば、低分子阻害剤、抗体、アプタマー等が挙げられ、一方、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を阻害する物質としては、例えば、該酵素遺伝子又はその転写産物に相補的な核酸（例、siRNA、アンチセンス核酸、miRNA等）が挙げられるが、それらに限定されない。

[0019] 好ましい一実施態様において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、低分子阻害剤である。低分子阻害剤としては、標的のヒストンメチルトランスフェラーゼに応じて自体公知の阻害剤が適宜選択されるが、例えばEZH1及び／又はEZH2の阻害剤としては、例えばEPZ005687、GSK343、Tazemetostat (EPZ-6438)、UNC1999、EBI-2511、PF-06726304、Lirimetostat (CPI-120

5)、EPZ011989、CPI-169、CPI-360、GSK503、EI1、OR-S0、OR-S1、DS-3201、GSK126等が挙げられる。或いは、例えばPRC1.1を阻害した結果PRC2の呼び込みを抑制し結果ヒストンのメチル化を阻害することが期待される阻害剤としては、例えばFT671、XL177A、P5091、HBX19818、Parthenolide、GNE-6640、XL188、L55等が挙げられる。

この中で好ましくは、GSK503、EPZ005687、EI1、Tazemetostat (EPZ-6438)、GSK126等であり、より好ましくは、GSK126である。

[0020] ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の添加濃度は、NK細胞を効率的かつ迅速に誘導することができ、かつ細胞に悪影響を及ぼさない限り、特に制限はなく、阻害剤の種類に応じて適宜好適な濃度を選択することができるが、例えば約10 nM～約5 μ M、好ましくは約100 nM～約2 μ M、より好ましくは約500 nM～約1 μ Mの範囲から選択することができる。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0021] いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、例えば、EZH1及び／又はEZH2等のヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害剤（例、GSK126）を用いることによって、HPCからNK細胞への分化誘導時のNK細胞への分化の立ち上がりが早くなり、かつNK細胞分化誘導時間が長くなるにつれて細胞増殖効率が高くなることが示唆される。

[0022] アリルハイドロカーボン受容体（AHR）は、リガンドである芳香族炭化水素化合物と結合すると該複合体が核内に移行して、標的遺伝子の発現を調節する転写調節因子である。AHRの阻害は、該転写因子の阻害活性を有する物質を培地に添加することにより実施することができる。ここで「AHRの阻害」とは、結果的に該転写因子が発現調節する標的遺伝子の転写調節を阻害する限り、いかなる様式によるものであってもよく、該転写因子の機能だけでなく、発現を阻害するものであってもよい。AHRの機能を阻害する物質としては、例えば、低分子阻害剤、抗体、アプタマー、デコイ核酸等が挙げられ、一方、AHRの発現を阻害する物質としては、例えば、AHR遺伝子又はその転写産物に相

補的な核酸（例、siRNA、アンチセンス核酸、miRNA等）が挙げられるが、それらに限定されない。

- [0023] 好ましい一実施態様において、AHR阻害剤（アンタゴニスト）は、低分子阻害剤である。低分子阻害剤としては、自体公知の阻害剤が適宜選択されるが、好ましい一実施態様において、例えば、SR1（StemRegenin 1）、CH-223191、GNF-351、7-ケトコレステロール、CB7993113、6,2',4'-トリメトキシフラボン、PD98059、BAY 2416964等が挙げられ、好ましくは、SR1、CH-223191、GNF-351、CB7993113、6,2',4'-トリメトキシフラボン等、より好ましくはSR1である。
- [0024] AHR阻害剤の添加濃度は、NK細胞を効率的かつ迅速に誘導することができ、かつ細胞に悪影響を及ぼさない限り、特に制限はなく、阻害剤の種類に応じて適宜好適な濃度を選択することができるが、例えば約100 nM～約10 μ M、好ましくは約500 nM～約5 μ M、より好ましくは約1 μ M～約5 μ Mの範囲から選択することができる。AHR阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。
- [0025] いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、AHRの阻害剤（例、SR1）は、HPCからNK細胞への分化誘導時の早期において細胞増殖効率をより高め得ることが示唆される。
- [0026] このように、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害とAHR阻害とでは、NK細胞を効率的に誘導する作用点が異なることが示唆されるので、両方を阻害することにより相乗効果が期待できる。従って、本発明の方法において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤とAHR阻害剤とはそれぞれ単独で使用してもよいが、両者を併用することもまた好ましい。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤とAHR阻害剤とを併用する場合、前記した任意のヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及びAHR阻害剤の組み合わせを用いてもよいが、特に好ましくはGSK126とSR1との併用が挙げられる。
- [0027] ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はAHRの阻害は、工程a)ないしc)の少なくとも1工程において実施される限り、特に制限はないが、一実

施態様において、工程 a) ないし c) の全工程において実施することができる。例えば、好適な実施タイミングとして、工程 a) の後半から工程 c) の前半にかけて実施することにより、よりNK細胞の誘導効率を高めることができる場合がある。

[0028] 本発明の方法は、医療分野において有用なNK細胞を多能性幹細胞から効率的かつ大量に製造するためのものである。そのため、当該方法は、二次元培養でも実施することができるが、工業規模のスケールアップが容易である点で、三次元培養にて実施することが望ましい。また、培地交換を手動で行うと、人為的な作業により最終製品の品質に影響を及ぼすリスクがあるとともに、工数の増加による製造コストの増加も想定される。そのため、本発明の方法は、手動での培地交換が不要な灌流培養法を用いて行うことが望ましい。

[0029] 従って、好適な実施態様において、本発明の方法は、多能性幹細胞からNK細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、

(1) 第一の培地中で、平均粒径200 μm 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程；

(2) 工程(1)で得られた多能性幹細胞スフェアを、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第二の培地を用いた三次元培養によりHPCを含む細胞集団に誘導する工程；並びに

(3) 工程(2)で得られたHPCを含む細胞集団を、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第三の培地を用いた三次元培養によりNK細胞又はその前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程を含み、工程(1)ないし(3)の1以上の工程を灌流培養法で行う、方法である。

特に好ましい実施態様においては、前記工程(1)ないし(3)を連続的な灌流培養法で行う。該実施態様では、工程(2)と工程(3)の間に、HPCを含む細胞集団又は該細胞集団から精製したHPCを、例えば凍結保存などにより、いったんストックする工程を含まずに、工程(2)と工程(3)は、連

続的な灌流培養により1つの培養系内で連続的に実施されるので、工程（2）においては、多能性幹細胞からHPCの分化誘導（前記工程 a））とHPCの増幅（前記工程 b））とが連続的に一工程として実施される。

また、好ましい実施態様においては、多能性幹細胞の培養は三次元培養にて実施されるので、工程（2）（前記工程 a））に先立って、多能性幹細胞を三次元培養して多能性幹細胞のスフェアを作製する前工程として、前記工程（1）を実施する。

以下、三次元培養法及び灌流培養法について詳述する。

[0030] （三次元培養法）

本発明における三次元培養法は、はじめに細胞のスフェア（スフェロイド）を形成させ、これを培地中で浮遊させることで培養する方法（本明細書中、「三次元浮遊培養法」と記載する場合がある）のことをいう。

三次元浮遊培養法は細胞培養法のひとつであり、浮遊細胞、スフェア（スフェロイド）、若しくは細胞を接着させた三次元培養用の担体を攪拌翼若しくは振盪器を用いて三次元的に展開させながら培養することを特徴とする。そのため三次元浮遊培養は、培養容器底面のみでしか細胞を培養しない二次元培養と比較して、空間当たりの細胞数を最大化することが可能となり、更には、攪拌翼若しくは振盪器を用いて三次元的に混合することで培養液の環境を均一化することが可能である。また三次元培養では、pHセンサーや溶存酸素センサーなどの各種検出器と組み合わせることで、効率的且つ均一な環境下での培養が可能である。

[0031] このように培養空間を最大限に利用できる点や、均一な環境下で培養可能な点は、商用生産を想定した培養のスケールアップにも有用となる。また浮遊細胞やスフェロイドを培養する場合、細胞培養用の特殊加工を施したプラスチック担体や、多くの培養細胞で必要となる細胞外基質を必要としない培養法であるため、コスト面においても有利な培養方法となり得る。さらには細胞を平面に接着させ培養する二次元培養よりも生体内に近い環境で培養が可能であることも特徴の一つであり、各種細胞への分化誘導が必要な多能性

幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞など）由来の各種細胞製品の製造には有用な手段である。

[0032] （灌流培養法）

本発明の三次元培養法は、灌流培養法と組み合わせることでより効果的にNK細胞を誘導することが可能である。

灌流培養法は連続培養法の一つであり、培養容器内の培養液に一定量の新しい培地を供給しながら同時に一定量の培地を抜き取ることで、連続的に培地交換の目的である新しい栄養成分の供給と老廃物の除去を達成することが可能な方法である。

[0033] 灌流培養法を採用することで培地交換作業が不要になるため、大幅な作業負担の低減が期待できる。そしてこの方法は一般に機械的に行うことから、手動の培地交換で発生する温度変化、pH変化、溶存酸素濃度変化、及び溶存二酸化炭素濃度変化などの環境変化が発生しない。そのため同一容器内でより長期的な培養が可能となり、その結果、同一容器内で維持できる細胞密度も高く維持できる。また灌流培養法は、通常の培地交換では除去されてしまう、細胞が出す各種成長因子等を一定濃度で維持することも可能であり、血液循環系を模した生体内に近い環境で培養することが可能な培養法でもある。

[0034] 灌流培養の際に使用する分離膜は、目的の細胞集団を培養系外に逃さないような一定の細孔径、及び特性（例えば、疎水性度等）を有するものであることが望ましい。分離膜の細孔径は、目的の細胞集団によって適切なサイズを適宜選択することができるが、NK細胞への誘導工程において、スフェア内外で様々な分化細胞が誘導されるため、その細孔径の選択には一般的に種々の検討を要し、その好適化は非常に困難である。

各工程における具体的な細孔径は後述されるが、本発明の灌流培養における適切な細孔径としては、工程（１）について細孔径15～75 μm であり、工程（２）について細孔径45～225 μm であり、工程（３）について細孔径0.2～10 μm である。

[0035] 分離膜の素材としては特に限定されないが、細胞や培地中の成分に影響を与えない素材が好ましく用いられ、そのような素材としては、例えばSUS304、SUS316などの金属素材、セルロース繊維などの天然繊維、あるいはポリスルホン繊維、ポリエーテルスルホン繊維などの化学繊維が挙げられる。

[0036] 本発明の三次元培養法は、後述する各工程において培養系内に存在する細胞スフェア又は細胞といった細胞集団を灌流培養することを特徴とする。各灌流培養における条件は、各工程に関し後述する説明の通りである。また本発明における灌流培養は、「連続的に灌流培養する」ことができる。

ここで、「連続的に灌流培養する」とは、各工程間において膜交換を行うだけで培地交換時に通常行われる洗浄工程を挟むことなく、前工程の培地を抜き取りながら次工程の培地を供給することをいう。

例えば工程（１）においては、後述する第一の培地を供給しながら同時に培地を抜き取ることで連続的に培地交換を実施し、工程（１）から工程（２）に置き換わるタイミングでは、後述する第二の培地を供給しながら同時に第一の培地を抜き取ることで連続的に第一の培地から第二の培地への培地交換を実施する。また工程（２）においては、第二の培地を供給しながら同時に培地を抜き取ることで連続的に培地交換を実施し、工程（２）から工程（３）に置き換わるタイミングでは、後述する第三の培地を供給しながら同時に第二の培地を抜き取ることで連続的に第二の培地から第三の培地への培地交換を実施する。さらに工程（３）中においては、第三の培地を供給しながら同時に培地を抜き取ることで連続的に培地交換を実施する。

[0037] （多能性幹細胞のスフェアを形成する工程：工程（１）について）

好ましい本発明の方法における工程（１）は、第一の培地中で、平均粒径200 μm 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程である。

[0038] 本発明における多能性幹細胞のスフェア化に用いられる多能性幹細胞としては、上述の通りES細胞やiPS細胞が挙げられるが、特に制限されない。

[0039] スフェア化は浮遊培養条件で行われる。浮遊培養条件としては、攪拌翼若しくは振盪器を用いて三次元的に混合することで培養液の環境を均一化する

ことができれば特に限定されない。また浮遊培養に用いられる容器としては特に限定されず、攪拌翼回転式、攪拌翼上下振とう式などの攪拌機構を持った容器が用いられる。本発明の多能性幹細胞のスフェア化における多能性幹細胞の播種密度は 1.0×10^4 cells/mLから 1.0×10^6 cells/mLの範囲である。これ以上の密度であるとスフェアの形状が大きくなりすぎて後の誘導効率に影響を来す場合がある。なかでも、 5.0×10^4 cells/mLから 2.0×10^5 cells/mLの範囲で播種されることがより好ましい。

[0040] 本工程（１）における多能性幹細胞のスフェア化に用いられる培養液としては、多能性幹細胞の維持培養に用いられる培養液であれば特に限定されない。このような培養液の例としては、例えばStemFit（登録商標）AK03N（味の素ヘルシーサプライ株式会社）、mTeSR™1（STEMCELL Technologies Inc.）などのフィーダーフリー培養可能な培地が用いられる。なかでも、好ましい本発明の方法において用いられる培養液としては、フィーダーフリー培養可能な培地にROCK阻害剤を含む培地である。特に多能性幹細胞としてiPS細胞を用いる場合、StemFit（登録商標）AK03N（味の素ヘルシーサプライ株式会社）などの培地を使用することが好ましい。

本発明におけるROCK阻害剤としては、例えばY27632やチアゾピビンなどが挙げられる。iPS細胞培養においては、一般的にROCK阻害剤としてY27632を用いるが、本発明において、その濃度としては1～20 μ Mが好ましく、細胞播種後2日間は添加した状態で維持することが好ましい。

[0041] スフェア化に要する培養期間としては、スフェアが形成される限りにおいて限定されないが、本発明におけるスフェアはディンプルなどに多能性幹細胞を挿入、会合させて強制的にスフェア形成させる類のものではなく、細胞の増殖に伴って形成されるものであるため、一定の期間を要する。例えば細胞播種から2日から10日間が好ましく、4日から7日間がより好ましい。

[0042] 上記スフェア化は、攪拌条件、播種密度条件、培養期間により調節することができる。本発明の方法における工程（１）のスフェア平均粒子径は、通常200 μ m以上、具体的には200～600 μ mの範囲で適宜調整されるが、より

NK細胞の製造効率を向上させるべく200～500 μm に調整されることが好ましく、さらに200～400 μm に調整されることがより好ましい。

平均粒子径が200 μm 未満であると、培養日数が足りず、十分に細胞数が取得されず工程（2）にも影響があるため望ましくない。また平均粒子径が大きすぎると、スフェア中心部に十分な栄養源の供給、及び酸素の供給が滞るため、ネクロシス等の細胞死を誘発するため望ましくない（例えば、Cells Tissues Organs 196.1 (2012): 34-47. 参照）。

[0043] 当該スフェア化工程（1）は、灌流培養法で実施される。工程（1）中、灌流培養は多能性幹細胞の播種時から実施してもよいが、最初の多能性幹細胞の播種から1日程度経過してから実施することが好ましく、より好ましくは2日経過後から実施する。なぜならば、培養1～2日後にスフェロイドが形成され、この条件で平均粒子径が200 μm 以上となるからであり、スフェロイドが形成される前に灌流培養を実施すると、スフェロイドが満足に形成されない恐れがあるためである。

また本工程（1）において、灌流培養における分離膜の細孔径は15～75 μm であることが好ましく、細孔径25～45 μm であることがより好ましい。望ましいスフェロイドサイズを超えない細孔径の分離膜を用いることで、培養容器内に一定のスフェロイドをとどめたまま灌流培養が可能となるためである。よって好ましくは、工程（1）は、

（1－1）第一の培地中で、平均粒径200 μm 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程、及び

（1－2）工程（1－1）で得られた平均粒径200 μm 以上の多能性幹細胞スフェアを、灌流培養法で維持培養する工程を含むものである。すなわち、工程（1）（又は工程（1－2））の灌流培養における分離膜の細孔径は15～75 μm であることが好ましく、細孔径25～45 μm であることがより好ましい。

[0044] 灌流培養における培地交換は、一定の希釈率で実施される。多能性幹細胞のスフェア形成工程は、0.01から0.2 hr^{-1} の希釈率で実施することが好まし

く、細胞の播種密度、培養上清のグルコース濃度、乳酸濃度、グルタミン濃度、グルタミン酸濃度などを参考にして調整することが可能である。希釈率の調整は培養容器、供給ボトル、排出ボトルを天秤若しくはロードセル上において、若しくはペリスタリックポンプの回転数で管理することが可能である。

[0045] 本工程（１）においては、温度センサー、pHセンサー、溶存酸素センサーなどを用いて温度、pH、溶存酸素濃度を多能性幹細胞のスフェア形成に望ましい任意の数値に制御することが可能である。

培養温度としては35～39℃の間で制御することが好ましいが、36～38℃で制御することがより好ましい。pHは無菌的に処理した圧縮空気、若しくは無菌的に処理した炭酸ガスの流入、若しくはpH調整剤、若しくは灌流培養培地の希釈率で制御され、その制御値は6.8～8.0の間で制御されることが好ましく、7.0～7.4の間で制御されることがより好ましい。溶存酸素濃度は、無菌的に処理した圧縮空気、若しくは無菌的に処理した窒素ガス、若しくは無菌的に処理した酸素ガスで制御され、その値は0～6.86 mg/Lの間で制御され、2.00 mg/L以上の濃度で維持されることが好ましい。なお、pH、溶存酸素を維持するために使用するガスは、培養液上面の気層への吹込み、培養液中への吹込み、及びガス透過膜を介した交換が可能であり制限はない。

このようにして得られた多能性幹細胞スフェアを、次の工程（２）に付すことで造血前駆細胞を誘導する。

[0046] （多能性幹細胞のスフェアを、HPCを含む細胞集団に誘導する工程：工程（２）について）

好ましい本発明の方法における工程（２）は、工程（１）で形成したスフェアを、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第二の培地を用いた三次元培養によりHPCを含む細胞集団に誘導する工程である。ここで第二の培地に含まれるヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、前述の通りである。また第二の培地に含まれるAHRアンタゴニストは、前述の通りである。

[0047] ここで本工程により誘導される「HPCを含む細胞集団」とは、工程（２）によって得られる細胞集団であって、スフェア内外に誘導されるHPC集団を含む概念である。

この細胞集団には、スフェア内に形成されるHPC、誘導されたのちスフェアから逸脱したHPC、ならびにHPCへの誘導過程にあるスフェア内外の細胞が含まれる。

[0048] 工程（２）も、工程（１）と同様に灌流培養法で実施することができる。本工程で用いられる分離膜の細孔径は45～225 μm であることが好ましく、細孔径45～100 μm であることがより好ましい。本工程の灌流培養は工程（２）開始直後から工程（２）終了時まで実施される。この間、「多能性幹細胞スフェア」が「HPCを含む細胞集団」に向かって誘導される。

工程（２）の間、上記した細孔径を有する分離膜を用いることで、培養容器内に一定のHPCを含む細胞集団を留めたまま灌流培養が可能となる。

[0049] 本工程（２）における灌流培養に伴って行われる培地交換も、工程（１）で記載したものと同様に、一定の希釈率で実施される。具体的には工程（１）と同様に0.01から0.2 hr^{-1} の希釈率で実施することが好ましく、細胞の播種密度、培養上清のグルコース濃度、乳酸濃度、グルタミン濃度、グルタミン酸濃度などを参考にして調整することが可能である。この希釈率は、工程（１）で使用した培地を工程（２）で使用した培地に交換する際にも適用される。

[0050] 本工程（２）における第二の培地としては、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含み、多能性幹細胞をHPCに誘導することができる培地であれば特に限定されない。

そのような培地としては、例えば血管内皮増殖因子（VEGF）、骨形成タンパク質4（BMP4）、及びグリコーゲン合成酵素3 β （GSK3 β ）阻害剤を含む培地（以下、培地（２－１）と記載する）や、幹細胞因子（SCF）及びトランスフォーミング増殖因子 β （TGF β ）/Smad阻害剤を含む培地（以下、培地（２－２）と記載する）や、SCF及びFlt3リガンド（Flt3L）を含む培地（以下、

培地（２－３）と記載する）が挙げられる。これら各培地成分は、必要に応じて適宜組合せや量を変え適切な誘導培地を設計することも可能である。特に、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストの投与タイミング（具体的には、培地（２－１）～（２－３）のいずれに含まれるか）は適宜設計することが可能である。以下、このような培地の一例として、（２－１）～（２－３）の各培地を説明する。

[0051] 培地（２－１）は、VEGF、BMP4、及びGSK3 β 阻害剤を含む培地である。

ここでGSK3 β 阻害剤としては、CHIR99021やSB216763などが挙げられ、好ましくはCHIR99021である。

VEGFの濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは50～100 ng/mLである。BMP4の濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは50～100 ng/mLである。GSK3 β 阻害剤の濃度は、CHIR99021を使用した場合、好ましくは1～10 μ M、より好ましくは1～5 μ Mである。

[0052] さらに培地（２－１）は、ROCK阻害剤又はbFGFを含んでいても良い。ROCK阻害剤を加える場合、ROCK阻害剤としては工程（１）に記載したものが挙げられ、好ましくはY27632である。ROCK阻害剤の濃度は、Y27632を用いた場合、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは1～10 μ Mである。またbFGFを加える場合の濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは10～50 ng/mLである。

[0053] 培地（２－１）の基礎培地としては特に限定されないが、例えばDMEM/F-12、HEPES(Thermo Fisher Scientific)、Essential 6 medium(Thermo Fisher Scientific)といった培地が好ましく用いられる。

[0054] 培地（２－２）は、SCF、TGF β /Smad阻害剤及びVEGFを含む培地である。

ここで、TGF β /Smad阻害剤としては、SB431542、LY2157299、並びにLY2109761などが挙げられ、好ましくはSB431542である。SCFの濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは20～50 ng/mLである。TGF β /Smad阻害剤の濃度は、SB431542を使用した場合、好ましくは1～10 μ M、より好ましくは1～5

μM である。VEGFの濃度は、培地（2－1）と同様に、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは50～100 ng/mLである。

[0055] さらに培地（2－2）には、ROCK阻害剤又はbFGFを含んでいても良い。それぞれの具体例や使用する際の濃度は、培地（2－1）に記載したものと同様である。

[0056] 培地（2－2）の基礎培地としては特に限定されないが、培地（2－1）に記載した基礎培地と同様のものが使用できる。

[0057] 培地（2－3）は、SCF及びFlt3Lを含む培地である。SCFの濃度としては、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは20～50 ng/mLである。Flt3Lの濃度としては、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは20～50 ng/mLである。

[0058] さらに培地（2－3）は、ROCK阻害剤、インターロイキン（IL）-3及びIL-7から選択される少なくとも一つを含んでいても良い。ROCK阻害剤としては、前記したものが挙げられ、好ましくはY27632である。ROCK阻害剤を加える場合の濃度は、Y27632を用いた場合、好ましくは1～20 μM である。IL-3を加える場合の濃度は、好ましくは1～100 ng/mLである。IL-7を加える場合の濃度は、好ましくは1～100 ng/mLである。

[0059] 培地（2－3）の基礎培地としては特に限定されず、HPC誘導に適した培地が用いられるが、例えばStem Pro-34 SFM (Thermo Fisher Scientific) に終濃度1～10 mMとなるようにL-グルタミン又はL-アラニル-L-グルタミンを加えた培地が好ましく使用される。

[0060] なお、上記培地（2－1）、（2－2）及び（2－3）は、それぞれを単独で用いることもできるが、工程（2）中、適切なタイミングで培地（2－1）又は（2－2）と（2－3）とを培地交換することにより、より効率的にHPCを誘導することが可能である。例えば工程（2）の前半部分を培地（2－1）又は（2－2）で培養し、後半部分を培地（2－3）で培養することで効率よくHPCを誘導することができる。

この場合、工程（2）中の前半部分、後半部分の時間は適宜設定することができるが、例えば前半部分を2～6日間、後半部分を3～14日間と設定する

ことで、効率よくHPCを誘導することができる。この培地（2-1）又は（2-2）と培地（2-3）との交換は、連続的に灌流操作することによって実施することも、全量を新しい培地に入れ替えて培地交換することも可能であり、より好ましくは連続的に灌流操作をすることで培地交換を実施するのが望ましい。

- [0061] さらに工程（2）の前半部分で使用され得る培地（2-1）と（2-2）は、この順で培地交換をすることによって、効率的にHPCを誘導することが可能である。具体的には先ず培地（2-1）で培養し、次いで培地（2-2）で培養する。

この場合、各培地での培養時間は適宜設定することができるが、例えば培地（2-1）の培養時間を1〜3日間、培地（2-2）の培養時間を1〜3日間と設定することで、効率よくHPCを誘導することができる。この培地（2-1）と培地（2-2）との交換は、連続的に灌流操作することによって実施することも、全量を新しい培地に入れ替えて培地交換することも可能であり、より好ましくは連続的に灌流操作をすることで培地交換を実施するのが望ましい。

- [0062] よって、工程（2）における三次元培養は、例えば（2-1）第二の培地として培地（2-1）を用いた培養工程と、（2-2）第二の培地として培地（2-2）を用いた培養工程と、（2-3）第二の培地として培地（2-3）を用いた培養工程と、を含む、三次元培養であることが好ましい。各工程（2-1）〜（2-3）はこの順で実施されることが好ましい。

- [0063] 本工程（2）においても、工程（1）で記載したものと同様に、温度センサー、pHセンサー、溶存酸素センサーなどを用いて温度、pH、溶存酸素濃度を造血前駆細胞への誘導に望ましい任意の数値に制御することが可能である。

- [0064] 工程（2）におけるヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストの培地への添加は、工程（2）を通して実施してもよ

いし、該工程の一部についてのみ実施してもよい。工程（２）の一部でのみ阻害剤（アンタゴニスト）を添加する場合、例えば、前記工程（２）の後半部分のみで添加することができる。例えば第二の培地として、培地（２－１）、（２－２）及び（２－３）を順次用いて工程（２）を実施する場合、該阻害剤（アンタゴニスト）を、例えば、培地（２－２）及び（２－３）を用いた培養工程でのみ培地に添加することができるし、あるいは培地（２－３）を用いた培養工程でのみ培地に添加することができるが、前記工程（２）の後半部分のみでの添加はそれらに限定されない。しかしながら、NK細胞を効率的かつ迅速に誘導する観点から、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及びAHRアンタゴニストのいずれも、培地（２－３）を用いた培養工程のみ培地に添加することが好ましい。

[0065] なお、工程（２）における各培地にヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを加える場合、NK細胞を効率的かつ迅速に誘導することができ、かつ細胞に悪影響を及ぼさない限り、阻害剤（アンタゴニスト）の選択に特に制限はなく、また阻害剤の種類に応じて適宜好適な濃度を選択することができる。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の濃度としては、通常約10 nM～約5 μ M、好ましくは約100 nM～約2 μ M、より好ましくは約500 nM～約1 μ Mの範囲から選択することができる。AHRアンタゴニストの濃度としては、通常約100 nM～約10 μ M、好ましくは約500 nM～約5 μ M、より好ましくは約1 μ M～約5 μ Mの範囲から選択することができる。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。またAHR阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0066] 本発明の方法においては、工程（１）から工程（３）に至るまで、一貫して特段の精製工程を経ずにNK細胞集団を得ることができる。そのため、本工程（２）により得られるこれらの細胞集団は、次の工程（３）に細胞集団ごとそのまま付してもよいし、HPCのみを選別した後に工程（３）に付してもよい。

本発明者らはいずれの方法であっても工程（３）において目的のNK細胞が得られることを確認している。従って、本発明の方法において、工程（２）において得られた「HPCを含む細胞集団」からHPC以外の細胞を除く工程を入れてもよいが、工程（２）において得られた「HPCを含む細胞集団」はそのまま工程（３）に付すことが望ましい。

このようにして得られた「HPCを含む細胞集団」を工程（３）に付すことで、NK細胞を誘導する。

[0067] （HPCをNK細胞に誘導する工程：工程（３）について）

本発明の方法における工程（３）は、工程（２）で得られた「HPCを含む細胞集団」を、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第三の培地を用いた三次元培養により「NK細胞を含む細胞集団」に誘導する工程である。ここで第三の培地に含まれるヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、前述の通りである。また第三の培地に含まれるAHRアンタゴニストは、前述の通りである。

[0068] ここで本工程により誘導される「NK細胞を含む細胞集団」とは、工程（３）によって得られるNK細胞や、NK細胞への誘導過程にある細胞を含む細胞集団である。

NK細胞は、通常スフェアを形成することなく単一の細胞として存在する。よって工程（３）によれば、単一のNK細胞集団が増殖し、多数の単一NK細胞の細胞集団となっている。この細胞集団には、大多数を占めるNK細胞と、一部のNK細胞への誘導過程にある細胞とが含まれる。

[0069] 工程（３）も、工程（１）及び工程（２）と同様に灌流培養法で実施することができる。用いられる分離膜の細孔径は0.1～10 μm であることが好ましく、細孔径0.2～5 μm であることがより好ましい。本工程の灌流培養は工程（３）開始直後から工程（３）終了時まで連続して実施される。この間、HPCスフェアから誘導されたNK細胞が生成されるが、NK細胞はスフェア内に留まらず個々に濾出してくる。そのため工程（３）の間はNK細胞の細胞径を超え

ない分離膜を用いることで、培養容器内に一定のNK細胞をとどめたまま灌流培養が可能となる。

[0070] また本工程（３）における培地交換も、工程（１）で記載したとおり一定の希釈率で実施される。具体的には工程（１）と同様に 0.01 から 0.2 hr^{-1} の希釈率で実施することが好ましく、細胞の播種密度、培養上清のグルコース濃度、乳酸濃度、グルタミン濃度、グルタミン酸濃度などを参考にして調整することが可能である。この希釈率は、工程（２）で使用した培地を工程（３）で使用した培地に交換する際にも適用される。

[0071] 本工程（３）における第三の培地としては、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含み、HPCをNK細胞に誘導することができる培地であれば特に限定されない。そのような培地としては、例えばIL-15及びSCFを含む培地が挙げられる。IL-15の濃度は、好ましくは $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは $20 \sim 50 \text{ ng/mL}$ である。SCFの濃度は、好ましくは $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは $20 \sim 50 \text{ ng/mL}$ である。この培地には、さらにIL-7、Flt3L、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、及びTGF β 受容体（TGF β R）阻害剤から選ばれる1以上の成分を加えることも可能である。ここでROCK阻害剤としては、Y27632やチアゾピピンが挙げられ、好ましくはY27632である。またGSK3 β 阻害剤としては、CHIR99021やSB216763などが挙げられ、好ましくはCHIR99021である。TGF β R阻害剤としては、LY2157299、SB431542、並びにLY2109761などが挙げられ、好ましくはLY2157299である。好ましい一実施態様においては、第三の培地は、IL-15及びSCFに加えてIL-7及びFlt3Lをさらに含む。

IL-7を加える場合の濃度は、好ましくは $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは $20 \sim 50 \text{ ng/mL}$ である。Flt3Lを加える場合の濃度は、好ましくは $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは $20 \sim 50 \text{ ng/mL}$ である。ROCK阻害剤を加える場合の濃度は、好ましくは $1 \sim 20 \text{ }\mu\text{M}$ 、より好ましくは $1 \sim 10 \text{ }\mu\text{M}$ である。GSK3 β 阻害剤を加える場合の濃度は、好ましくは $1 \sim 10 \text{ nM}$ 、より好ましくは $1 \sim 5 \text{ }\mu\text{M}$ である。TGF β R阻害剤を加える場合の濃度は、好ましくは $0.1 \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ 、より好ましくは $0.1 \sim 5 \text{ }\mu\text{M}$ である。

- [0072] 工程（３）における培養期間は、通常20～60日であり、好ましくは25～40日程度である。
- [0073] また工程（３）において、IL-7、Flt3L、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、あるいはTGF β R阻害剤を加える場合、これらの因子を添加するタイミングを調節することで、誘導効率を向上させることが可能である。たとえば、IL-7及びFlt3Lについては、工程（３）における培養10日目以降に除去することが好ましく、より好ましくは20日目以降で除くことが好ましい。またROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤及びTGF β R阻害剤については、培養終了前4～7日間添加することが好ましい。
- [0074] 工程（３）において用いられる培地の基礎培地としては特に限定されないが、例えばAIM-V Medium (Thermo Fisher Scientific)、Stemline（登録商標）II(Sigma-Aldrich)、ALyS505N-0(株式会社細胞科学研究所)、及びStem Pro-34 SFM (Thermo Fisher Scientific) といった培地が用いられるが、好ましくは、AIM-V Mediumを用いる。さらに、ヒト血清、胎児ウシ血清（FBS）、血清代替品を含んでも良い。これらの濃度は1～20%が好ましく、1～10%がより好ましい。
- [0075] 本工程（３）において、さらにスフェアの除去工程を実施することが好ましい。除去のタイミングとしては、例えば本工程開始前、本工程実施中、本工程終了時が挙げられるが、特に限定されずいずれのタイミングでも実施可能である。
- スフェアの除去は、20～100 μ mのセルストレイナーを用いて除去することが好ましく、20～40 μ mのセルストレイナーを用いて除去することがより好ましい。
- [0076] また本工程（３）においても、工程（１）で記載したものと同様に、温度センサー、pHセンサー、溶存酸素センサーなどを用いて温度、pH、溶存酸素濃度をNK細胞への誘導に望ましい任意の数値に制御することが可能である。
- [0077] 工程（３）におけるヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストの培地への添加は、工程（３）を通して実施してもよ

いし、該工程の一部についてのみ実施してもよい。工程（３）の一部でのみ阻害剤（アンタゴニスト）を添加する場合、例えば、工程（３）の前半部分（例えば、IL-7及びFlt3Lを培地から除去するタイミングまで）のみで添加することができる。第三の培地として、IL-15及びSCFに加えて、IL-7及びFlt3Lを含む培地で工程（３）の前半部分を実施する場合、例えば、IL-7およびFlt3Lを培地から除去するタイミングまで、該阻害剤（アンタゴニスト）を培地に添加することができるが、それに限定されない。

また、工程（３）におけるヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストの添加について、NK細胞を効率的かつ迅速に誘導することができる、かつ細胞に悪影響を及ぼさない限り、阻害剤（アンタゴニスト）の選択に特に制限はなく、また阻害剤の種類に応じて適宜好適な濃度を選択することができる。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の濃度としては、通常約10 nM～約5 μ M、好ましくは約100 nM～約2 μ M、より好ましくは約500 nM～約1 μ Mの範囲から選択することができる。AHRアンタゴニストの濃度としては、通常約100 nM～約10 μ M、好ましくは約500 nM～約5 μ M、より好ましくは約1 μ M～約5 μ Mの範囲から選択することができる。ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。またAHR阻害剤はいずれか1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0078] また本発明の方法では、工程（３）ののちに工程（４）として得られたNK細胞の増幅培養工程、あるいはNK細胞の成熟工程をさらに実施してもよい。増幅培養工程、あるいは成熟工程は、公知の方法を適宜適用することができる。

[0079] 本発明の方法は、上記した工程（１）～（３）あるいは工程（１）～（４）全てを三次元培養用担体及び細胞外基質を用いることなく実施することを特徴とする。

[0080] 本発明の方法では、さらに得られたNK細胞を凍結保存する工程をさらに実施してもよい。本発明におけるNK細胞は、NK製造工程終了後、自体公知の方法により凍結し、保存することができる。

[0081] 以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、それらは単なる例示であって、本発明はそれらに限定されない。

実施例

[0082] 実施例 1：多能性幹細胞からNK細胞への分化誘導

本実施例では、多能性幹細胞としてヒトiPS細胞株を用い、iPS細胞スフェア形成からNK細胞の分化まで三次元培養法により実施した。多能性幹細胞のスフェアを、HPCを含む細胞集団に誘導する工程以降より培地にGSK126又はSR1を添加し、添加しないものと比較した。灌流培養を使用する工程は、培養液の混合は攪拌翼を用い、センサーとしてpHセンサー、温度センサー、溶存酸素センサーを採用し、各種管理項目を連続的に、培養液を混合しながらモニタリング、及び制御を実施した。また、灌流培養は専用のポンプ、及び天秤を用いて時間当たりの流入出速度を制御して管理を行った。

[0083] 工程（1）：多能性幹細胞スフェアを形成する工程

多能性幹細胞のスフェア形成は、二次元で拡大培養したiPS細胞を用いて三次元培養容器に 0.25×10^5 cells/mLの細胞密度となるように細胞を播種して実施した。その他詳細は、以下の方法で実施した。

工程（1）における培地としてはStemFit（登録商標）AK03N（味の素ヘルシーサプライ株式会社）にROCK阻害剤Y27632を $10 \mu\text{M}$ となるように添加したものを使用した。

[0084] 多能性幹細胞のスフェア形成工程は、培養容器として、全容量500 mLのシングルユースボトルを用い、容器内の攪拌翼を用い培養液を連続的に混合した。pHをpHセンサーで連続的にモニタリングし、無菌的な培地供給、若しくは無菌的な空気、若しくは無菌的な炭酸ガスの供給で7.00-7.40となるように制御した。

溶存酸素濃度は溶存酸素センサーを用いて連続的にモニタリングし、無菌的な空気、若しくは無菌的な酸素ガスの供給で1.50 mg/L以上を維持するように制御した。培養温度は温度センサーで連続的にモニタリングし、容器外部からヒーターで容器を加熱することで培養温度を37.0℃になるように制御した。培養液量は250 mLとなるように調整し、ポンプと天秤を用いて新しい培地を供給、培養液の排出を同一速度で実施し、培養3日目から5日目は0.04 hr⁻¹、培養5日目から10日目は0.06 hr⁻¹の希釈率で制御した。分離膜は細孔径25 μmのSUS316製の分離膜を用いて実施した。

[0085] 培養10日目に培養液からスフェアを含む細胞懸濁液を採取し、顕微鏡を用いてスフェアの平均粒子径とスフェア密度を測定した。

[0086] 工程（2）：多能性幹細胞のスフェアを、造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程

造血前駆細胞の作成は、工程（1）で作成したiPS細胞スフェアを用い、三次元培養容器に30 スフェア/mLの密度となるようにiPS細胞スフェアを播種して実施した。その他詳細は、以下の方法で実施した。

使用した培地としては、2日目までは、DMEM/F-12, HEPES (Thermo Fisher Scientific) にCHIR99021を2 μM、BMP4を80 ng/mL、VEGF165を80 ng/mL、bFGFを50 ng/mL、ROCK阻害剤Y27632を10 μMとなるように添加したものを基礎条件（条件1）とし、そこにSR1を2 μM（条件2）又はGSK126を1 μM（条件3）となるように添加したものを試験条件として使用した。2日目から4日目までは、Essential 6 (Thermo Fisher Scientific) にSCFを50 ng/mL、VEGF165を80 ng/mL、SB431542を2 μM、bFGFを50 ng/mL、ROCK阻害剤Y27632を10 μMとなるように添加したものを基礎条件（条件1）とし、そこにSR1を2 μM（条件2）又はGSK126を1 μM（条件3）となるように添加したものを試験条件として使用した。さらに4日目から14日目までは、通常の造血前駆細胞分化誘導基礎培地にSCFを50 ng/mL、Flt3Lを50 ng/mLとなるように添加したものを基礎条件（条件1）とし、そこにSR1を2 μM（条件2）又はGSK126を1 μM（条件3）となるように添加したものを、試験条件として使用した。

[0087] 本工程は、培養容器として全容量500 mLのシングルユースボトルを用いて実施し、培養液は容器内の攪拌翼を用い連続的に混合した。pHはpHセンサーで連続的にモニタリングし、無菌的な培地供給、若しくは無菌的な空気、若しくは無菌的な炭酸ガスの供給で7.07となるように制御した。溶存酸素濃度は溶存酸素センサーを用いで連続的にモニタリングし、無菌的な空気、若しくは無菌的な酸素ガスの供給で1.50 mg/L以上を維持するように制御した。培養温度は温度センサーで連続的にモニタリングし、容器外部からヒーターで容器を加熱することで培養温度を37.0℃になるように制御した。培養液量は250 mLとなるように調整し、ポンプと天秤を用いて新しい培地を供給、培養液の排出を同一速度で実施し、培養1日目から2日目は0.07 hr⁻¹、培養2日目から4日目は0.06 hr⁻¹、培養5日目から7日目は0.13 hr⁻¹、培養7日目から12日目は0.07 hr⁻¹、培養12日目から14日目は0.02 hr⁻¹の希釈率で制御を実施した。分離膜としては、細孔径75 μmのSUS316製の分離膜を用いた。

[0088] 培養14日目に培養液からスフェアを除いた浮遊細胞懸濁液を採取し、造血前駆細胞に発現していることが知られている細胞表面マーカー（CD34、CD43、CD45、CD117）をフローサイトメトリーで確認した。

GSK126及びSR1を添加した製造で、添加しなかったものと造血前駆細胞の製造効率を比較した結果、確認したマーカーの発現に大きな差はなかった。

[0089] 工程（3）：造血前駆細胞をNK細胞に誘導する工程

NK細胞の作製は、工程（2）で作成した造血前駆細胞を含む培養液（工程2で作成した14日目の培養液）を、三次元培養容器にスフェアも含めて25%播種して実施した。その他詳細は、以下の方法で実施した。

[0090] 培地は、AIM V Serum Free Medium (Thermo Fisher scientific)にFBSを5%濃度で加えた培地に、IL-15、IL-7、SCF及びFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加して作成したものを基礎条件（条件1）として使用した。そこにSR1を2 μM（条件2）又はGSK126を1 μM（条件3）となるように添加したものを試験条件として使用した。

培養容器は、全て30 mLの回転式攪拌容器を用い、5% CO₂インキュベーター内、37℃環境下において、55 rpmの回転速度で浮遊培養を実施した。

[0091] 培養中の培養液を100 μ L採取し、その浮遊細胞の密度を、NC-202 (ChemoMetec) を用いて測定し、培養開始4日目からの増殖倍率を算出した (図1)。条件2及び条件3 (それぞれ、SR1及びGSK126を添加) では、継代後の細胞密度において、比較対象よりも高い倍率で培養できる結果となった。

[0092] 本発明の方法で製造したNK細胞培養液を経時的に回収し、NK細胞で発現していることが知られている細胞表面マーカーとしてCD56の発現を、目的外細胞の確認として単球、マクロファージで発現していることが知られているCD14の発現をフローサイトメトリーで確認した (図2及び図3)。結果、条件3 (GSK126を添加) はCD56の発現上昇が条件1と比較して早く、より効率的にNK細胞が製造できることが示された。

[0093] 図1よりSR1は、NK細胞分化誘導工程の早期に基礎条件と比べて高い細胞増殖効率を付与した。一方、GSK126は分化誘導工程の後期に高い細胞増殖効率を付与し、かつCD56陽性細胞 (NK細胞又はその前駆細胞) への分化の立ち上がりが基礎条件に比べて早かった。このことから、SR1とGSK126とを併用すれば、各薬剤単独の効果が相乗的又は相互補完的に作用し、NK細胞分化の速い立ち上がり、分化誘導工程全体を通じた増殖効率の増大が見込まれる。

産業上の利用可能性

[0094] 本発明の多能性幹細胞由来NK細胞の製造方法は、がん免疫療法に使用できるNK細胞の大量製造に有用な方法であると言える。

[0095] 本出願は、2023年8月2日付で日本国に出願された特願2023-126651を基礎としており、ここで参照することにより、その内容全体が本明細書中に組み込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] 多能性幹細胞からナチュラルキラー（NK）細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、
- a) インビトロにおいて、多能性幹細胞から造血前駆細胞（HPC）を誘導する工程；
 - b) インビトロにおいて、HPCを増幅する工程；及び
 - c) インビトロにおいて、HPCからNK細胞又はその前駆細胞を誘導する工程
- を含み、工程a)ないしc)の1以上の工程において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ及び／又はアリルヒドロカーボン受容体（AHR）を阻害することを特徴とする、方法。
- [請求項2] ヒストンメチルトランスフェラーゼが、ヒストン3リジン残基27（H3K27）へのメチル基の付加を触媒するものである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] ヒストンメチルトランスフェラーゼが、EZH1（enhancer of zeste homolog 1）及び／又はEZH2（enhancer of zeste homolog 2）である、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] ヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害が、低分子阻害剤によるものである、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 低分子阻害剤が、GSK126、EPZ005687、GSK343、Tazemetostat（EPZ-6438）、UNC1999、EBI-2511、PF-06726304、Lirametostat（CPI-1205）、EPZ011989、CPI-169、CPI-360、GSK503、EI1、OR-S0、OR-S1、DS-3201、FT671、XL177A、P5091、HBX19818、Parthenolide、GN

E-6640、XL188又はL55である、請求項4に記載の方法。

[請求項6] AHRの阻害が、AHRに対してアンタゴニスト活性を有するものである、請求項1に記載の方法。

[請求項7] AHRの阻害が、低分子阻害剤によるものである、請求項1に記載の方法。

[請求項8] 低分子阻害剤が、SR1 (StemRegenin 1)、CH-223191、GNF-351、7-ケトコレステロール、CB7993113、6, 2', 4'-トリメトキシフラボン、PD98059又はBAY 2416964である、請求項7に記載の方法。

[請求項9] 工程a)ないしc)の1以上の工程が、灌流培養法で行われる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 多能性幹細胞からNK細胞又はその前駆細胞を製造するための方法であって、

(1) 第一の培地中で、平均粒径200 μ m以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程；

(2) 工程(1)で得られた多能性幹細胞スフェアを、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第二の培地を用いた三次元培養によりHPCを含む細胞集団に誘導する工程；並びに

(3) 工程(2)で得られたHPCを含む細胞集団を、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び／又はAHRアンタゴニストを含む第三の培地を用いた三次元培養によりNK細胞又はその前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程

を含み、工程(1)ないし(3)の1以上の工程を灌流培養法で行う、方法。

- [請求項11] ヒストンメチルトランスフェラーゼが、H3K27へのメチル基の付加を触媒するものである、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] ヒストンメチルトランスフェラーゼが、EZH1及び／又はEZH2である、請求項10に記載の方法。
- [請求項13] ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤が、低分子阻害剤である、請求項10に記載の方法。
- [請求項14] 低分子阻害剤が、GSK126、EPZ005687、GSK343、Tazemetostat (EPZ-6438)、UNC1999、EBI-2511、PF-06726304、Liracetostat (CPI-1205)、EPZ011989、CPI-169、CPI-360、GSK503、EI1、OR-S0、OR-S1、DS-3201、FT671、XL177A、P5091、HBX19818、Parthenolide、GNE-6640、XL188又はL55である、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] AHRアンタゴニストが、低分子阻害剤である、請求項10に記載の方法。
- [請求項16] 低分子阻害剤が、SR1、CH-223191、GNF-351、7-ケトコレステロール、CB7993113、6, 2', 4'-トリメトキシフラボン、PD98059又はBAY 2416964である、請求項15に記載の方法。