

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。これまでの報告例では、NK細胞への分化誘導工程ならびにその後の拡大培養工程にかなりの時間を必要とし、かつ培養ディッシュ等を用いた平面培養（二次元培養）が主流である（例えば、非特許文献1および2参照）。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を介しNK細胞を誘導する方法が記載されている。しかしながら特許文献1に記載された多能性幹細胞スフェアの平均粒形は小さく、また灌流培養による培地交換についてはなんら記載されていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：W02020/086889

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 515, Issue 1, 12 July 2019, Pages 1-8

非特許文献2：Methods Mol Biol. 2019; 2048: 107-119.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] これまでの報告例に則ってNK細胞を誘導する場合、分化誘導工程や拡大培養工程にかなりの時間を要し、さらに培養培地の交換作業の機械化が困難であるため人為的作業により最終的な製品の品質に影響を及ぼすリスクがある

。また培地交換による工数の増加による製造コストの増加も想定される。特に二次元培養の場合、培養規模のスケールアップには理論上限界がある。このような背景から、従来技術に比べて効率よくかつスケールアップ可能なNK細胞の誘導技術が求められている。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、種々検討した結果、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 $200\mu\text{m}$ 以上とし、この状態で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た。また本方法で製造したNK細胞は高い活性を有し、凍結し解凍したのちもその活性が維持されることから、細胞医薬品の有効成分としても有用となり得ることが分かった。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、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]

ナチュラルキラー（NK）細胞の製造方法であって、

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

（２）工程（１）で形成した多能性幹細胞スフェアを、第二の培地を用いた三次元培養により造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程；および

（３）工程（２）で得られた造血前駆細胞を含む細胞集団を、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；

を含み、工程（１）ないし（３）を灌流培養法で行うことを特徴とする、方法。

[項2]

工程（１）ないし（３）を三次元培養用担体およ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、項1に記載の方法。

[項3]

工程（１）における灌流培養が細孔径15～75 μ mの分離膜を使用して行われる、項２に記載の方法。

[項４]

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

[項５]

工程（３）における灌流培養が細孔径0.2～10 μ mの分離膜を使用して行われる、項２に記載の方法。

[項６]

工程（１）ないし（３）を連続的な灌流培養法で行うことを特徴とする、項１～５のいずれか一項に記載の方法。

[項７]

第一の培地がROCK阻害剤を含む、項１～６のいずれか一項に記載の方法。

[項８]

第二の培地がVEGF、BMP4およびGSK3 β 阻害剤を含む、項１～７のいずれか一項に記載の方法。

[項９]

第二の培地がさらにROCK阻害剤またはbFGFを含む、項８に記載の方法。

[項１０]

第二の培地がSCF、TGF β /Smad阻害剤およびVEGFを含む、項１～７のいずれか一項に記載の方法。

[項１１]

第二の培地がさらにROCK阻害剤またはbFGFを含む、項１０に記載の方法。

[項１２]

第二の培地がSCFおよびFlt3Lを含む、項１～７のいずれか一項に記載の方法。

[項１３]

第二の培地がさらにROCK阻害剤、IL-3およびIL-7から選択される少なくとも

も一つを含む、項 1 2 に記載の方法。

[項 1 4]

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 および 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 阻害剤および 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 および Flt3L を含む培地を用いた培養工程と、
、
を含む、項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項 1 5]

第三の培地が IL-15 および SCF を含む、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項 1 6]

第三の培地がさらに IL-7 および Flt3L を含む、項 1 5 に記載の方法。

[項 1 7]

NK 細胞の分別工程を必要としない、項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明は、三次元灌流培養による製造方法により、効率的に大量の NK 細胞を一度に製造することを特徴とする。本発明の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障害活性を示し、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]本発明における灌流培養装置の典型例を示す概略図である。

[図2]ヒト iPS 細胞を種々の条件で浮遊培養した場合の、7 日目におけるスフェアの顕微鏡写真 (左から、手動で培地交換・250 mL 培養; 灌流培養・250 mL 培養; 手動で培地交換・30 mL 培養) および各条件で得られたスフェアの平

均粒径を示す図である。

[図3]工程（１）で得られたiPS細胞スフェアを種々の条件で浮遊培養して造血前駆細胞へと分化誘導した場合の、培養14日目における各種造血前駆細胞マーカー表面分子の発現頻度を示す図である（左から、手動で培地交換・250 mL培養；灌流培養・250 mL培養；手動で培地交換・30 mL培養）。

[図4]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。なお、図の途中で細胞密度が低下しているのは新しい容器に播種しなおしたためである。

[図5]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得られたNK細胞集団を凍結融解後、NK細胞マーカー表面分子（CD56）および細胞障害活性に関与するグランザイムB（GZB）・パーフォリンの発現を測定した結果を示す図である（左から、手動で培地交換・250 mL培養；灌流培養・250 mL培養；手動で培地交換・30 mL培養）。

[図6]工程（３）で得られたNK細胞を凍結融解し、さらに静置培養後に、A549細胞に対する細胞障害活性をLDHアッセイにより測定した結果を示す図である（左から、ヒト末梢血単核球から分離した初代NK細胞（ポジティブコントロール）；手動で培地交換・250 mL培養；灌流培養・250 mL培養；手動で培地交換・30 mL培養）。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、NK細胞の製造方法であって、

（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）で形成した多能性幹細胞スフェアを、第二の培地を用いた三次元培養により造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程；および

（３）工程（２）で得られた造血前駆細胞を含む細胞集団を、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；

を含み、工程（１）ないし（３）を連続的な灌流培養法で行うことを特徴と

する、方法である（以下、「本発明の方法」という場合がある）。

[0011] （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。

[0012] 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、各種細胞の分化誘導が必要な多能性幹細胞（例、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（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。

[0013] （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。

[0014] 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、大幅な作業負荷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、およ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も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。

[0015] 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、および特性（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。

発明者らは、数々の検証により上記の各培養工程における適切な細孔径を設定することで本発明による効率的なNK細胞誘導法を完成させた。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。

[0016] 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。

[0017] 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

胞スフェアまた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様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。

[0018] （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）

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 $200\mu\text{m}$ 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程である。

[0019] 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、ES細胞や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。

[0020] 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つ

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。

[0021] 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、本発明の方法において用いられる培養液として好ましくは、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 $1 \sim 20 \mu\text{M}$ 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。

[0022] 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。

[0023] 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 $200 \mu\text{m}$ 以上、具体的には $200 \sim 600 \mu\text{m}$ 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 $200 \sim 500 \mu\text{m}$ に調整されることが好ましく、さらに $200 \sim 400 \mu\text{m}$ に調整されることがより好ましい。

平均粒子径が $200\mu\text{m}$ 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、および酸素の供給が滞るため、ネクロー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）。

[0024] 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 $200\mu\text{m}$ 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 $15\sim 75\mu\text{m}$ であることが好ましく、細孔径 $25\sim 45\mu\text{m}$ 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 $200\mu\text{m}$ 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程、および

（１－２）工程（１－１）で得られた平均粒径 $200\mu\text{m}$ 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）（または工程（１－２））の灌流培養における分離膜の細孔径は $15\sim 75\mu\text{m}$ であることが好ましく、細孔径 $25\sim 45\mu\text{m}$ であることがより好ましい。

[0025] 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のせて、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。

[0026] 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、およ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。

[0027] （多能性幹細胞のスフェアを、造血幹細胞を含む細胞集団に誘導する工程：工程（２）について）

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、第二の培地を用いた三次元培養により造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程である。

[0028] ここで本工程により誘導される「造血前駆細胞を含む細胞集団」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造血前駆細胞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造血前駆細胞、誘導されたのスフェアから逸脱した造血前駆細胞、ならびに造血前駆細胞への誘導過程

にあるスフェア内外の細胞が含まれる。

[0029] 工程（２）も、工程（１）と同様に灌流培養法で実施される。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「造血前駆細胞を含む細胞集団」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造血前駆細胞を含む細胞集団を留めたまま灌流培養が可能となる。

[0030] 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。

[0031] 本工程（２）における第二の培地としては、多能性幹細胞を造血前駆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、例えば血管内皮増殖因子（VEGF）、骨形成タンパク質4（BMP4）、およ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）およ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および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。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。

[0032] 培地（２－１）は、VEGF、BMP4、および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。

[0033] さらに培地（2-1）は、ROCK阻害剤または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。

[0034] 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。

[0035] 培地（2-2）は、SCF、TGF β /Smad阻害剤および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 μ M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。

[0036] さらに培地（2-2）には、ROCK阻害剤または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。

[0037] 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。

[0038] 培地（2-3）は、SCFおよび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。

[0039] さらに培地（2-2）は、ROCK阻害剤、インターロイキン（IL）-3およびIL-7から選択される少なくとも一つを含んでも良い。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 μ M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。

[0040] 培地（2-2）の基礎培地としては特に限定されず、造血前駆細胞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-グルタミンまたは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。

[0041] なお、上記培地（2-1）、（2-2）および（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）または（2-2）と（2-3）とを培地交換することにより、より効率的に造血前駆細胞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）または（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造血前駆細胞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、効率よく造血前駆細胞を誘導することができる。この培地（2-1）または（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。

[0042] 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、効率的に造血前駆細胞を誘導す

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、効率よく造血前駆細胞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。

- [0043] 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。
- [0044] 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。
- [0045] 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、造血前駆細胞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「造血前駆細胞を含む細胞集団」から造血前駆細胞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「造血前駆

細胞を含む細胞集団」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「造血前駆細胞を含む細胞集団」を工程（３）に付すことで、NK細胞を誘導する。

[0046] （造血前駆細胞を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「造血前駆細胞を含む細胞集団」を、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。

[0047] 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。

[0048] 工程（３）も、工程（１）および工程（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 $0.1\sim 10\mu\text{m}$ であることが好ましく、細孔径 $0.2\sim 5\mu\text{m}$ 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、造血前駆細胞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。

[0049] 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。

[0050] 本工程（３）における第三の培地としては、造血前駆細胞を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およびSCFを含む培地が挙げられる。IL-15の濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは20～50 ng/mL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。この培地には、さらにIL-7、Flt3L、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、および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やチアゾピビンが挙げられ、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およびSCFに加えてIL-7およびFlt3Lをさらに含む。

IL-7を加える場合の濃度は、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは20～50 ng/mLである。Flt3L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20～50 ng/mLである。ROCK阻害剤を加える場合の濃度は、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは1～10 μ Mである。GSK3 β 阻害剤を加える場合の濃度は、好ましくは1～10 nM、より好ましくは1～5 μ 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0.1～100 μ M、より好ましくは0.1～5 μ Mである。

[0051] 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。

[0052] 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および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 阻害剤および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。

[0053] 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)、および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いても良い。これらの濃度は1～20%が好ましく、1～10%がより好ましい。

[0054] 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 μm 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 μm 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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およ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。

[0058] 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。

- [0059] 以下に実施例および試験例を示し、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

- [0060] 実施例 1：灌流培養による多能性幹細胞から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06E(TC-1133HKK_06E_MCB)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灌流培養法により実施した。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、および制御を実施した。また、灌流培養は図1で示す通り、専用のポンプ、およ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。

- [0061] 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 1.0×10^5 cells/mLの細胞密度となるように細胞播種を実施した。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て使用した。

- [0062] 培養容器は、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7.07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°C 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2日目から4日目は 0.02 hr^{-1} 、培養4日目から7日目は 0.03 hr^{-1} の希釈率で制御した。分離膜は細孔径 $45 \mu\text{m}$ のSUS316製の分離膜を用いて実施した。

[0063] なお、比較対象として手動で培地交換を実施した検体を2種類用意した。比較対象は培養液量250 mL、培養液量30 mLの2検体を用意し、培地交換は手動で実施した。

この場合の培地交換は、培養容器の攪拌を停止し、10分間静置した後に上清を2日目は50%、4, 5, 6日目は80%交換することで実施した。培養液量30 mLの検体については回転式攪拌容器で培養し、 CO_2 インキュベーター内、 CO_2 濃度5%、 37°C 環境下で浮遊培養を実施した。55 rpmの回転速度で培養液を混合して培養した。培養液量250 mLの検体については、培地交換を手動で実施した以外は灌流培養検体と同様の制御条件で培養した。

[0064] 培養7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を測定した。スフェアの顕微鏡写真（対物レンズ4倍）とスフェアの平均粒子径を図2に示す。250 mL培養の方が、スフェア径を200-400 μm の間で制御して作成できた。また、灌流培養で実施した場合、行程中に発生する培地交換を連続的に自動制御で実施し、安全キャビネット等の無菌環境下への培養槽の移動を実施することなく、問題なく均一なスフェアが形成された。

[0065] 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て三次元培養容器に $1.8 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ の細胞密度となるようにiPS細胞スフェア播種を実施した。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 $2 \mu\text{M}$ 、BMP4を80 ng/mL、VEGF165を80 ng/mL、bFGFを50 ng/mLとなるように添加したものを使用し、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 μ M、bFGFを50 ng/mLとなるように添加したものを使用した。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使用した。

[0066] 培養容器は、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°C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 μ mのSUS316製の分離膜を用いた。

[0067] なお、比較対象として手動で培地交換を実施した検体を2種類用意した。比較対象は培養液量250 mL、培養液量30 mLの2検体を用意し、培地交換は手動で実施した。培地交換の方法は、培養容器の攪拌を停止し、数分間静置した後、上清を1, 2, 3, 4, 7, 9, 12日目に全量交換で実施した。なお、培養液量30 mLの検体は回転式攪拌容器で培養し、CO₂インキュベーター内で培養を実施し、5%、37°C環境下で浮遊培養を実施し、55 rpmの回転速度で培養液を混合して培養した。250 mL培養の比較対象は、培地交換を手動で実施する以外は灌流培養検体と同様の制御で培養した。

[0068] 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（図3）。

結果、灌流培養で製造した場合と手動で培地交換を行った場合とで、造血

前駆細胞の製造効率を比較した結果、本工程において、行程中に発生する培地交換を連続的に自動制御で実施し、安全キャビネット等の無菌環境下への培養槽の移動を実施することなく培養を実施することができた上、確認したマーカーの発現に大きな差はない結果となった。よって工程（２）において灌流培養により造血前駆細胞を誘導することができた。

[0069] 工程（３）：造血幹細胞をナチュラルキラー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三次元培養容器に 1.0×10^5 cells/mLの細胞密度となるようにスフェアを含む浮遊細胞を播種して実施した。また、培養の結果、細胞密度が 1.0×10^7 cells/mL以上となった段階で継代を実施した。継代後も同一の培地、培養条件で培養を継続し、細胞密度が 2.0×10^7 cells/mL以上となるまで培養を継続した。その他詳細は、以下の方法で実施した。

[0070] 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, および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使用した。

培養容器は、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、無菌的な空気、若しくは無菌的な炭酸ガスの供給によって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、細胞密度に合わせて 0.01 hr^{-1} から 0.09 hr^{-1} の希釈率で制御を実施した。

[0071] 分離膜には細孔径7 μm のポリスルホン繊維製の製品を用いた。比較対象として培養液量250 mL、培養液量30 mLの2検体について手動で培地交換を実

施した。手動による培地交換によれば、1～2日に1回培地交換を実施した。具体的には、培養容器の攪拌を停止した後、培養液を細胞密度に合わせて50～90%回収、20℃、300 g、5分の条件で遠心分離を実施し、上清を除き、残ったペレットに新しい培地を除いた培地量と等量加え、よく混合した後に培養容器に戻した。

なお、培養液量30 mLの検体については、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。培養液量250 mLの検体については、培地交換を手動で実施する以外は灌流培養検体と同様の制御で培養した。

[0072] 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-200 (ChemoMetric) を用いて測定した (図4)。本発明の方法を採用することによって、継代後の細胞密度において、比較対象よりも高い細胞密度で培養できる結果となった。この培養工程の期間中の培地交換は連続的に自動で実施されるため、作業負荷を下げたうえで、より高密度での細胞培養が可能であることが示された。

[0073] 本発明の方法で製造したNK細胞培養液を回収後、20℃、300 g、5分の条件で遠心分離し、上清を除いた後に細胞をSTEM-CELLBANKER (登録商標) GMP gradeで再懸濁し、-80℃のフリーザーに移し、凍結した。凍結した細胞をフリーザーから取り出し、37℃のウォーターバスで融解後、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, およびFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加した培地に再懸濁し、20℃、300 g、5分の条件で遠心分離し、上清を除いた後に再度同様の培地で再懸濁し、T75フラスコに播種し、5%、37℃制御のCO₂インキュベーターで静置培養を実施した。3日後の細胞を回収し、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を、また、NK細胞の細胞障害活性に関与することが知られているグランザイムB、およびパーフォリンの発現をフローサイトメトリーで確認した (図5)。結果、比較対象と変わらず、CD56、グランザイムB、パーフォリンの発現を確認でき、本発明の方法でも既存の方法

と変わらない性質をもったナチュラルキラー細胞が製造できることが示された。

[0074] 試験例 1：得られたNK細胞の活性評価

実施例 1 により得られ、凍結、融解、静置培養ののち得られた細胞をヒト肺胞基底上皮腺癌細胞であるA549細胞と共培養した（ET比 3:1）。共培養4時間後の培養液中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定し、作成したNK細胞が有するA549細胞に対する細胞障害活性を計測した。比較対象としてヒト末梢血単核球から選択・培養を行ったNK細胞（primary NK）も同様に処理した（図6）。

結果、iPS細胞から作成したNK細胞は、primary NKと比較して高い細胞障害活性を示し、且つ本発明の方法である灌流培養を用いて作成したNK細胞は、既存の培養方法と変わらない細胞障害活性を示した。

産業上の利用可能性

[0075] 本発明の多能性幹細胞由来NK細胞の製造方法は、各工程中に発生する培地交換を連続的に自動制御で実施し、安全キャビネット等の無菌環境下への培養槽の移動を実施することなく大量製造ができ、既存方法と比較して各工程のスフェロイド形成、細胞分化も問題なく実施でき、且つNK細胞の高密度培養においては、より高い密度での培養が可能であることが示され、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。

[0076] 本出願は日本国で出願された特願2022-013646（出願日：2022年1月31日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] ナチュラルキラー（NK）細胞の製造方法であって、
（１）第一の培地中で、平均粒径 $200\mu\text{m}$ 以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程；
（２）工程（１）で形成した多能性幹細胞スフェアを、第二の培地を用いた三次元培養により造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程；および
（３）工程（２）で得られた造血前駆細胞を含む細胞集団を、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；
を含み、工程（１）ないし（３）を灌流培養法で行うことを特徴とする、方法。
- [請求項2] 工程（１）ないし（３）を三次元培養用担体およ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、請求項１に記載の方法。
- [請求項3] 工程（１）における灌流培養が細孔径 $15\sim 75\mu\text{m}$ の分離膜を使用して行われる、請求項２に記載の方法。
- [請求項4] 工程（２）における灌流培養が細孔径 $45\sim 225\mu\text{m}$ の分離膜を使用して行われる、請求項２に記載の方法。
- [請求項5] 工程（３）における灌流培養が細孔径 $0.2\sim 10\mu\text{m}$ の分離膜を使用して行われる、請求項２に記載の方法。
- [請求項6] 工程（１）ないし（３）を連続的な灌流培養法で行うことを特徴とする、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 第一の培地がROCK阻害剤を含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項8] 第二の培地がVEGF、BMP4およびGSK3 β 阻害剤を含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項9] 第二の培地がさらにROCK阻害剤またはbFGFを含む、請求項８に記載の方法。
- [請求項10] 第二の培地がSCF、TGF β /Smad阻害剤およびVEGFを含む、請求項１

に記載の方法。

- [請求項11] 第二の培地がさらにROCK阻害剤またはbFGFを含む、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 第二の培地がSCFおよびFlt3Lを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項13] 第二の培地がさらにROCK阻害剤、IL-3およびIL-7から選択される少なくとも一つを含む、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 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および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阻害剤および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およびFlt3Lを含む培地を用いた培養工程と、
を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項15] 第三の培地がIL-15およびSCFを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項16] 第三の培地がさらにIL-7およびFlt3Lを含む、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] NK細胞の分別工程を必要としない、請求項1に記載の方法。