(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7212615号
(P7212615)

(45)発行日　令和5年1月25日(2023.1.25)

(24)登録日　令和5年1月17日(2023.1.17)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	ZNA
C12N 15/867 (2006.01)		C12N	15/867	Z
C12N 15/869 (2006.01)		C12N	15/869	Z
C40B 40/02 (2006.01)		C40B	40/02	

請求項の数　14　（全69頁）

(21)出願番号　特願2019-518229(P2019-518229)
(86)(22)出願日　平成29年10月5日(2017.10.5)
(65)公表番号　特表2019-528771(P2019-528771A)
(43)公表日　令和1年10月17日(2019.10.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/055369
(87)国際公開番号　WO2018/067836
(87)国際公開日　平成30年4月12日(2018.4.12)
審査請求日　令和2年10月2日(2020.10.2)
(31)優先権主張番号　62/404,470
(32)優先日　平成28年10月5日(2016.10.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/486,895
(32)優先日　平成29年4月18日(2017.4.18)
最終頁に続く

(73)特許権者　510003830
フジフィルム セルラー ダイナミクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１， マディソン， サイエンス ドライブ ５２５， スイート ２００， ユニバーシティー リサーチ パーク
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　ボドヤニク マクシム エイ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート ２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多能性幹細胞からＨＬＡホモ接合免疫細胞への指向分化方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＨＬＡホモ接合免疫細胞を産生する方法であって、
（ａ）誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得ることであって、前記ｉＰＳＣがＨＬＡホモ接合血液細胞集団からリプログラムされること、
（ｂ）前記ｉＰＳＣを、ＣＤ７、ＤＬＬ４、ＣＤ１４４、およびＣＤ２３５からなる群から選択される細胞表面マーカーの１つ以上を発現する造血前駆細胞（ＨＰＣ）に分化させること、および
（ｃ）免疫細胞分化を促進する条件下で下記単離されたＨＰＣを培養することによりＨＬＡホモ接合免疫細胞を産生すること、
を含み、
前記（ｂ）と（ｃ）との間に、ＣＤ１４４及びＣＤ３４、ＣＤ１４４及びＣＤ４５、ＣＤ１４４及びＣＤ７、又は、ＣＤ１４４、ＣＤ３４、ＣＤ４５及びＣＤ７のいずれかの細胞表面マーカーの組み合わせを発現するＨＰＣを単離することを更に含む、方法。
【請求項２】
前記ＨＬＡホモ接合血液細胞が、遺伝子座対立遺伝子ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡＣ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、およびＨＬＡ－ＤＱの１つ以上に関してホモ接合である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＨＬＡホモ接合免疫細胞がリンフォイド細胞である、請求項１に記載の方法。

【請求項４】
前記リンフォイド細胞が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、およびＮＫ細胞の一以上である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ＨＬＡホモ接合血液細胞集団が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、およびＮＫ細胞の一以上を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ＨＬＡホモ接合血液細胞集団が、プロジェニター血液細胞、末梢血単核細胞、およびリンパ芽球様細胞からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、Ｔヘルパー１（ＴＨ１）細胞、Ｔヘルパー２（ＴＨ２）細胞、ＴＨ１７細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、レギュラトリーＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、メモリーＴ細胞、またはγδＴ細胞である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ｉＰＳＣをＨＰＣに分化させることが、
（ａ）少なくとも１つの成長因子を含む第１の規定培地で前記ｉＰＳＣを培養すること、
（ｂ）ＩＬ－３、Ｆｌｔ３リガンド、およびＧＭ－ＣＳＦがフリーまたは本質的にフリーの第２の規定培地で前記ｉＰＳＣをインキュベートすること、
（ｃ）複数の前記ｉＰＳＣを拡大または分化を促進するのに十分なＢＭＰ４、ＦＧＦ２、およびＶＥＧＦを含む第３の規定培地で前記ｉＰＳＣを培養すること、および
（ｄ）複数の前記細胞を拡大または分化を促進するのに十分なＩＬ－３およびＦｌｔ３リガンドを含む第４の規定培地で前記ｉＰＳＣを培養すること、の逐次工程を含み、
複数の前記ＰＳＣをＨＰＣに分化させる、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記第２の規定培地がＧＳＫ３阻害剤をさらに含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＧＳＫ３阻害剤がＣＨＩＲ９９０２１である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ｉＰＳＣが工程（ｂ）の前に個別化される、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
工程（ｂ）～（ｄ）が、アミン被覆培養プレートを用いて実施される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記第４の規定培地がヘパリンを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＨＰＣが、ＣＤ４３、ＣＤ３４、ＣＤ３１、ＣＤ４１、ＣＤ２３５、およびＣＤ４５からなる群から選択される少なくとも２つのマーカーを発現する、請求項８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１６年１０月５日出願の米国仮特許出願第６２／４０４，４７０号および２０１７年４月１８日出願の同第６２／４８６，８９５号に基づく利益を主張し、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、一般的には、分子生物学の分野に関する。より特定的には、血液細胞由来の誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）からＨＬＡホモ接合免疫細胞を産生するための方法および組成物に関する。
【背景技術】
【０００３】

細胞治療法は、腫瘍、ウイルス、および細菌病原体に対する宿主免疫反応を増強するために開発されてきた。細胞治療法は、多くの場合、ｅｘ　ｖｉｖｏでのＴ細胞の活性化および拡大を必要とする。こうしたタイプの治療の例としては、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、拡大腫瘍流入領域リンパ節細胞、および各種の他のリンパ球調製物の使用が挙げられる。造血幹細胞および造血プロジェニター細胞の医学的可能性がかなり高いため、造血プロジェニター細胞からＴ細胞やＮＫ細胞などの免疫細胞への分化の方法の改善を試みて実質的研究がなされてきた。

【０００４】

ヒトにおいて、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞は、通常、真皮線維芽細胞から生成させる。しかしながら、皮膚生検に対する要件および数回のｉｎ　ｖｉｔｒｏ継代で線維芽細胞を拡大する必要性があるため、患者特異的幹細胞の生成源として扱いにくいものとなっている。さらに、これまでのヒト体細胞リプログラム方法は、ヒト被験体から体細胞を直接得る必要があるかまたは多くの労力を要する細胞培養系で細胞を維持する必要があるため不便である。したがって、単純で便利でしかも容易に利用可能な代替源から多能性幹細胞を誘導する方法を開発する必要性が存在する。したがって、血液は、患者もしくは健常者からの採取、貯蔵、またはたとえば中央配布ユニットから１つ以上の遠隔地への移送を行いうるので、血液サンプルはかかる源でありうる。そのため、血液細胞からｉＰＳ細胞にリプログラムしてから血液細胞由来ｉＰＳ細胞をＴ細胞、ＮＫ細胞、Ｔ／ＮＫ細胞、樹状細胞などの免疫細胞に効率的に分化させる方法の明確な必要性が現在存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本開示の第１の実施形態は、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得ることであって、ｉＰＳＣがＨＬＡホモ接合血液細胞集団からリプログラムされること、ｉＰＳＣを造血前駆細胞（ＨＰＣ）に分化させること、および免疫細胞分化を促進する条件下でＨＰＣを培養することによりＨＬＡホモ接合免疫細胞を産生することを含む、ＨＬＡホモ接合免疫細胞の産生方法を提供する。いくつかの態様では、ｉＰＳＣは、組込み外因性ウイルスエレメントが本質的にフリーである。

【０００６】

いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞は、遺伝子座対立遺伝子ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、またはＨＬＡ－ＤＱの１つ以上がホモ接合である。特定の態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞は、遺伝子座対立遺伝子ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、またはＨＬＡ－ＤＱの２つがホモ接合である。特定の態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞は、ＨＬＡ－ＡおよびＨＬＡ－Ｂがホモ接合である。特定の一態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃがホモ接合である。

【０００７】

ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞はリンフォイド細胞である。特定の態様では、リンフォイド細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、および／またはＮＫ細胞である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞はミエロイド細胞である。特定の態様では、ミエロイド細胞は樹状細胞である。

【０００８】

いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団は哺乳動物由来である。特定の態様では、血液細胞集団はヒト由来である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団は、外因的適用Ｇ－ＣＳＦにより動員されていない。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、および／またはＮＫ細胞を含む。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団は、プロジェニター血液細胞、末梢血単核細胞、またはリンパ芽球様細胞としてさらに規定される。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団は、末梢血、臍帯血、またはリンパ組織から単離される。特定の態様では、リンパ組織は、骨髄、リンパ節、または胎児肝臓を含む。特定の態様では、ＨＬＡホモ接合血

液細胞集団はＴ細胞を含む。いくつかの態様では、Ｔ細胞は、抗ＣＤ３抗体および／または抗ＣＤ２８抗体の存在下で培養される。特定の態様では、Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$またはＣＤ８$^+$のＴ細胞である。いくつかの態様では、Ｔ細胞は、Ｔヘルパー１（ＴＨ１）細胞、Ｔヘルパー２（ＴＨ２）細胞、ＴＨ１７細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、レギュラトリーＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、メモリーＴ細胞、またはγδＴ細胞である。

【０００９】

ある特定の態様では、リプログラミングは、血液細胞集団にリプログラミング因子を導入することを含む。いくつかの態様では、リプログラミングは、ＨＬＡホモ接合血液細胞集団にＲＮＡ、タンパク質、または低分子を導入することを含む。

【００１０】

いくつかの態様では、リプログラミング因子は、１つ以上の発現カセットによりコードされる。ある特定の態様では、リプログラミング因子は、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ４、ｃＭｙｃ、Ｋｌｆ４、Ｎａｎｏｇ、ＳＶ４０ラージＴ抗原、およびＬｉｎ２８からなる群から選択される２つ以上の遺伝子を含む。いくつかの態様では、リプログラミング因子は、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ４、ｃＭｙｃ、Ｋｌｆ４、Ｎａｎｏｇ、ＳＶ４０ラージＴ抗原、およびＬｉｎ２８からなる群から選択される遺伝子の３つ、４つ、５つ、または６つを含む。ある特定の態様では、１つ以上の発現カセットは、ウイルスベクター、エピソームベクター、およびトランスポゾンからなる群から選択されるリプログラミングベクターに含まれる。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターとしてさらに規定される。特定の態様では、エピソームベクターは、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）ベースのエピソームベクターとしてさらに規定される。いくつかの態様では、リプログラミングは、規定されたフィーダーフリー条件下で細胞を培養することを含む。

【００１１】

いくつかの態様では、ＨＰＣは、１個のＨＰＣ当たり少なくとも２０のＨＬＡホモ接合免疫細胞、たとえば、１個のＨＰＣ当たり少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、またはそれ以上のＨＬＡホモ接合免疫細胞に分化する。特定の態様では、ＨＰＣは、１個のＨＰＣ当たり少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、またはそれ以上のＮＫ細胞に分化する。いくつかの態様では、ＨＰＣは、１個のＨＰＣ当たり少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、またはそれ以上のＴ細胞に分化する。

【００１２】

ある特定の態様では、ｉＰＳＣをＨＰＣに分化させることは、少なくとも１つの成長因子を含む第１の規定培地でｉＰＳＣを培養すること、ＩＬ－３、Ｆｌｔ３リガンド、およびＧＭ－ＣＳＦがフリーまたは本質的にフリーの第２の規定培地で細胞をインキュベートすること、複数の細胞を拡大または分化を促進するのに十分なＢＭＰ４、ＦＧＦ２、およびＶＥＧＦを含む第３の規定培地で細胞を培養すること、および複数の細胞を拡大または分化を促進するのに十分なＩＬ－３およびＦｌｔ３リガンドを含む第４の規定培地で細胞を培養すること、の逐次工程を含む。いくつかの態様では、複数の多能性細胞はＨＰＣに分化される。いくつかの態様では、第２の規定培地はブレビスタチンを含む。ある特定の態様では、第２の規定培地はＧＳＫ３阻害剤をさらに含む。いくつかの態様では、ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０２１である。いくつかの態様では、第２の規定培地は、ＢＭＰ４、ＶＥＧＦ、およびＦＧＦ２をさらに含む。ある特定の態様では、細胞は、第２の規定培地で細胞をインキュベートする前に個別化される。いくつかの態様では、第２の規定培地で細胞をインキュベートすること、第３の規定培地で細胞を培養すること、および第４の規定培地で細胞を培養することは、アミン培養プレートを用いて実施される。ある特定の態様では、第２の規定培地はＶＥＧＦおよびＦＧＦ２をさらに含む。特定の態様では、第４の規定培地は、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＳＣＦ、ＴＰＯ、およびＢＭＰ４からなる群から選択されるサイトカインの１つ以上をさらに含む。いくつかの態様では、第４の規定培地はヘパリンを含む。いくつかの態様では、本方法は、２５％未満の酸素、たとえば、２４％未満、２３％未満、２２％未満、２１％未満、２０％未満、１９％未満、１８％未満

、１７％未満、１６％未満、１５％未満、１０％未満、または５％未満の酸素の大気圧で細胞を培養することを含む。いくつかの態様では、複数の多能性細胞は胚様体（ＥＢ）を形成する。ある特定の態様では、ＨＰＣはＣＤ３４を発現する。特定の態様では、ＨＰＣは、ＣＤ４３、ＣＤ３４、ＣＤ３１、ＣＤ４１、ＣＤ２３５、およびＣＤ４５からなる群から少なくとも２つのマーカー、たとえば、ＣＤ４３およびＣＤ３４の両方を発現する。

【００１３】

いくつかの態様では、免疫細胞分化を促進する条件は、リンフォイド分化を促進する条件としてさらに規定される。ある特定の態様では、ＣＤ３４およびＣＤ４３を発現するＨＰＣは、リンフォイド分化を促進する条件下で培養される。いくつかの態様では、リンフォイド分化を促進するように細胞を培養することは、マトリックスおよびＮｏｔｃｈリガンドで被覆された表面上の規定培地でＨＰＣを培養することであって、ＨＰＣが、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７、ＤＬＬ４、ＣＤ１４４、およびＣＤ２３５からなる群から選択される細胞表面マーカーの１つ以上を発現すること、および１つ以上のサイトカインの存在下で培養を維持することによりリンフォイド細胞を産生することを含む。いくつかの態様では、ＨＰＣは、ＣＤ１４４、ＣＤ３４、ＣＤ４５、およびＣＤ７を発現する。特定の態様では、ＨＰＣは、ＣＤ１４４、ＣＤ３４、ＣＤ４５、およびＣＤ７を発現する。

【００１４】

追加の態様では、リンフォイド分化の第１の工程は、１つ以上の細胞表面マーカーを発現するＨＰＣを単離することをさらに含む。いくつかの態様では、単離は磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）を含む。ある特定の態様では、細胞は５％未満の酸素の大気圧で培養される。ある特定の態様では、細胞は約５％の酸素の大気圧で培養される。いくつかの態様では、規定培地はアスコルビン酸および／またはニコチンアミドを含む。ある特定の態様では、アスコルビン酸は５０μＭ～１ｍＭたとえば９０μＭ～１００μＭの濃度で存在する。いくつかの態様では、ニコチンアミドは０．１ｍＭ～５ｍＭの濃度で存在する。いくつかの態様では、ニコチンアミドはニコチン酸である。いくつかの態様では、マトリックスは細胞外マトリックスタンパク質である。いくつかの態様では、マトリックスはレトロネクチン、コラーゲン、ラミニン、またはフィブロネクチンである。特定の態様では、マトリックスはレトロネクチンである。いくつかの態様では、ＮｏｔｃｈリガンドはＤＬＬ４である。ある特定の態様では、ＤＬＬ４はＤＬＬ４：Ｆｃキメラタンパク質である。特定の態様では、１つ以上のサイトカインは、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＩＬ－７、およびＦｌｔ－３からなる群から選択される。いくつかの態様では、第２の工程は１～６週間たとえば２～４週間である。いくつかの態様では、リンフォイド細胞は、ＣＤ８、ＣＤ７、ＣＤ４５、ＣＤ５、ＣＤ４、およびＣＤ３からなる群から選択されるマーカーの１つ以上を発現する。いくつかの態様では、リンフォイド細胞の５％超は、マーカーの少なくとも２つが陽性である。特定の態様では、リンフォイド細胞の１０％超は、マーカーの少なくとも２つが陽性である。

【００１５】

いくつかの態様では、免疫細胞分化を促進する条件は、ミエロイド分化を促進する条件としてさらに規定される。ある特定の態様では、ミエロイド分化を促進する条件下でＨＰＣを培養することは、ＴＰＯ、ＳＣＦ、およびＦｌｔ３リガンドを含む第１の規定培地でＨＰＣを培養することによりミエロイド細胞集団を産生すること、およびＴＰＯ、ＳＣＦ、およびＦｌｔ３リガンドが本質的にフリーの第２の規定培地で細胞をインキュベートすることによりミエロイド細胞富化集団を産生することを含む。いくつかの態様では、第１の規定培地はＩＬ－６およびＩＬ－３をさらに含む。ある特定の態様では、第２の規定培地はＧＭ－ＣＳＦを含む。特定の態様では、第１の工程で産生されるミエロイド細胞集団の少なくとも５０％は、ＣＤ４５、ＣＤ４３、およびＣＤ３１が陽性である。いくつかの態様では、ＣＤ４５、ＣＤ４３、およびＣＤ３１が陽性のミエロイド細胞集団は、ＣＤ３４を本質的に発現しない。特定の態様では、ミエロイド細胞富化集団の少なくとも８０％は、$CD43^{+}$、$CD45^{+}$、$CD31^{+}$、および$CD34^{-}$である。いくつかの態様では、第２の工程は５～１０日間である。

【００１６】
ある特定の態様では、本方法は、ミエロイド細胞富化集団を樹状細胞に分化させることをさらに含む。いくつかの態様では、ミエロイド細胞富化集団を樹状細胞に分化させることは、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、およびＴＮＦαを含む規定培地でミエロイド細胞富化集団を培養することにより樹状細胞を産生することを含む。いくつかの態様では、規定培地はリポタンパク質をさらに含む。ある特定の態様では、樹状細胞は、ＣＤ２０９、ＣＤ１ａ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ８３、およびＣＤ８６からなる群から選択されるマーカーの１つ以上を発現する。特定の態様では、樹状細胞はＣＤ１２を本質的に発現しない。
【００１７】
さらなる実施形態では、各ライブラリーメンバーがＨＬＡ型に従って特徴付けられる形でＨＬＡホモ接合免疫細胞のライブラリーが提供される。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、スーパードナーから得られる血液サンプルに由来する。特定の態様では、スーパードナーはヒトである。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は同種異系である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は自己由来である。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、１つ以上のＨＬＡクラスＩ遺伝子および／またはＨＬＡクラスＩＩ遺伝子が少なくともホモ接合である。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、遺伝子座対立遺伝子ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、またはＨＬＡ－ＤＱの１つ以上がホモ接合である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、遺伝子座対立遺伝子ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、またはＨＬＡ－ＤＱの２つがホモ接合である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、ＨＬＡ－ＡおよびＨＬＡ－Ｂがホモ接合である。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃがホモ接合である。いくつかの態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、リンフォイド細胞、たとえば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、および／またはＮＫ細胞である。ある特定の態様では、ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、ミエロイド細胞たとえば樹状細胞である。特定の態様では、各ライブラリーメンバーは潜在的レシピエントにＨＬＡがマッチする。いくつかの態様では、ライブラリーは凍結保存ＨＬＡホモ接合免疫細胞を含む。特定の態様では、ライブラリーは、メンバーが別個のＨＬＡハプロタイプを含む形で少なくとも１５のライブラリーメンバーを含む。いくつかの態様では、ライブラリーは、少なくとも３０のライブラリーメンバー、たとえば、少なくとも３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、またはそれ以上のライブラリーメンバーを含む。
【００１８】
他の一実施形態では、ヒトスーパードナーから得られる複数の血液サンプルのＨＬＡタイピングを行うこと、複数の血液サンプルからｉＰＳＣに細胞をリプログラムすること、ｉＰＳＣをＨＰＣに分化させること、および免疫細胞分化を促進する条件下でＨＰＣを培養することによりＨＬＡホモ接合免疫細胞のライブラリーを作製することを含む、実施形態のＨＬＡホモ接合免疫細胞のライブラリーの作製方法が提供される。
【００１９】
本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨および範囲に含まれる各種の変更形態および修正形態は、本詳細な説明から当業者には明らかになるであろうから、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示すが単に例示を目的として与えられているにすぎないことを理解すべきである。
【００２０】
以下の図面は、本明細書の一部を形成するものであり、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の１つ以上を参照すればよりよく理解されよう。
【図面の簡単な説明】
【００２１】

【図１Ａ】（Ａ）ｉＰＳＣからＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞を誘導するフィーダーフリー法の模式図。ｉＰＳＣは、３Ｄプロセスによりリンフォイドおよびミエロイドの潜在能力を有するＨＰＣに分化され、次いで、７～１０日目のプロジェニターは、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞を生成させるように２Ｄ分化プロセスに付される。
【図１Ｂ】（Ｂ）ｉＰＳＣから樹状細胞を誘導するフィーダーフリー法の模式図。ｉＰＳＣは、３Ｄプロセスによりリンフォイドおよびミエロイドの潜在能力を有するＨＰＣに分化され、１２日目のプロジェニターは、ミエロイドプロジェニターを生成させるようにさらに分化され、そして樹状細胞を生成させるようにステップワイズ３Ｄ分化プロセスに付される。
【図１Ｃ】（Ｃ）ＨＰＣは、分化１２日目の各種血液細胞由来ｉＰＳＣ細胞系から生成させ、そしてフローサイトメトリーにより定量されたＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ３４$^{+}$細胞のパーセントが示される。
【図１Ｄ】（Ｄ）生成ＨＰＣ絶対数／投入ｉＰＳＣ数の比として１２日目のｉＰＳＣからのＨＰＣ生成効率が示される。
【００２２】
【図２】７～１０日目のＨＰＣのリンフォイド分化時のリンフォイド集団およびリンフォミエロイド集団を同定するフローサイトメトリー散布プロットが示される。プレＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞の存在が決定された。
【００２３】
【図３Ａ】（Ａ）臍帯血由来ｉＰＳＣ、ウイルス的にリプログラムされたＴ細胞ｉＰＳＣ（ＴｉＰＳＣ）、およびエピソーム的にリプログラムされたプロジェニター血液細胞ｉＰＳＣ（０１２７９．１０７．３９０８）を含めてウイルス的およびエピソーム的にリプログラムされたｉＰＳＣからのリンフォイド細胞の出現を検出する代表的な染色プロファイル。細胞は、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ４５、ＣＤ３、ＣＤ５６、およびＣＤ８を含む各種マーカーの表面発現に関して染色された。ＦＳＣ－ＳＳＣ散乱ゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。（ＥＢ７＝７日目、ＥＢ８＝８日目、ＥＢ９＝９日目、ＥＢ１０＝１０日目、およびＥＢ１１＝１１日目。
【図３Ｂ】（Ｂ）ＴｉＰＳＣから分化させた７～１１日目のＨＰＣ（上：全ＨＰＣ、下：ＣＤ４３$^{+}$ＣＤ３４$^{+}$ＨＰＣ）をリンフォイド細胞にさらに分化させ、ＣＤ４５、ＣＤ７、およびＣＤ５の表面発現に関して染色した。ＦＳＣ－ＳＳＣ散乱ゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。
【図３Ｃ－１】（Ｃ）ＴｉＰＳＣから生成させた７～１１日目のＨＰＣ（上：全ＨＰＣ、下：ＣＤ４３＋ＣＤ３４＋ＨＰＣ）を低酸素条件下で分化させ、ＣＤ５６、ＣＤ８、およびＣＤ３の表面発現に関して染色した。
【図３Ｃ－２】（Ｃ）ＴｉＰＳＣから生成させた７～１１日目のＨＰＣ（上：全ＨＰＣ、下：ＣＤ４３＋ＣＤ３４＋ＨＰＣ）を低酸素条件下で分化させ、ＣＤ５６、ＣＤ８、およびＣＤ３の表面発現に関して染色した。
【図３Ｄ】（Ｄ）ＴｉＰＳＣからのリンフォイド細胞生成効率が示される（左：全ＨＰＣ、右：ＣＤ４３$^{+}$ＣＤ３４$^{+}$ＨＰＣ）。
【００２４】
【図４】ＴｉＰＳＣから分化させた７～１１日目のＨＰＣ（たとえば、ウイルス的にリプログラムされたＴｉＰＳＣ１Ｅまたはエピソーム的にリプログラムされた０１２７９．１０７．３９０２）を７日目～１１日目の種々のＨＰＣ分化日数でＣＤ４３／ＣＤ３４、ＣＤ３４、Ｄｌｌ４、Ｄｌｌ４／ＣＤ１４４、ＣＤ３１／ＣＤ１４４、およびＣＤ２３５の発現に関して分析した。示される場合、マーカーの各セットが陽性の細胞のパーセント。ＣＤ４３／ＣＤ３４発現は左の列、ＣＤ３４は右の列、ＤＬＬ４／ＣＤ１４４は下の線、ＣＤ３１／ＣＤ１４４は中間の線、およびＣＤ２３５は上の線に示される。
【００２５】
【図５】ＨＰＣ分化時にリンフォイドプロジェニターを検出する磁気選別ストラテジーの

模式図。対象マーカーは、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ１４４、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ７、ＣＤ２３５、ＦＬＫ１（ＫＤＲ、ＶＥＧＦＲ２、ＣＤ３０９としても知られる）、およびＤＬＬ４を含んでいた。分化８日目、対象マーカーに基づいて細胞を各種画分に選別し、次いで、リンフォイド分化プロセスに付した。

【００２６】

【図６Ａ】（Ａ）図５の磁気選別ストラテジーに基づいて陽性および陰性の各細胞画分について、ＣＤ３陽性細胞のパーセントが対照としての非選別細胞と共に示される。

【図６Ｂ】（Ｂ）図５の磁気選別ストラテジーに基づいて陽性および陰性の画分について、ＨＰＣから生成させたＴ細胞の富化倍率が対照としての非選別細胞と共に示される。

【００２７】

【図７Ａ】（Ａ）図５の磁気選別に基づいて陽性の各細胞画分について、ＴｉＰＳＣからのリンフォイド分化の４週間後のＣＤ３陽性細胞のパーセントが示される。

【図７Ｂ】（Ｂ）ＴｉＰＳＣ１Ｅ細胞からの５週間の分化のＦＡＣＳプロット。出現するリンフォイド細胞の発現に関するＣＤ３陽性細胞のフローサイトメトリー分析は、ＣＤ７＋、ＣＤ５＋、ＣＤ３＋、ＣＤ８＋、ＣＤ５６＋ＣＤ３３５＋、ＣＤ１６１＋、ＴＣＲαβ＋、およびＴＣＲγδ－である。

【００２８】

【図８Ａ】（Ａ）陽性および陰性の両方の磁気選別画分について、１６日目のＨＰＣからのＴｉＰＣリンフォイド分化プロセスの効率が投入ＨＰＣ対産生リンフォイド細胞の比として示される。

【図８Ｂ】（Ｂ）陽性磁気選別画分から出発して４週間の終りの分化プロセスの累積効率。

【００２９】

【図９Ａ】（Ａ）分化４２日目のｉＰＳＣ０２１７９（ＭｅＣＰ２ＷＴ）由来樹状細胞の表現型分析。ミエロイド樹状マーカーＣＤ２０５、ＣＤ２０９、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ８０、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、およびＣＤ８３の細胞表面発現を有する細胞を染色した。

【図９Ｂ】（Ｂ）樹状細胞上に発現された各種細胞表面マーカーの発現を定量するための代表的なＦＡＣＳプロットヒストグラム。

【００３０】

【図１０】ＤＱ（商標）オボアルブミン（ＤＱ－ＯＶＡ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を１ｍｇ／ｍｌでＰＢＳに溶解させて１００μｇ／ｍｌでｉＰＳＣ由来ＤＣに添加した。３７℃または４℃のいずれかで細胞をインキュベートし、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、そしてＡｃｃｕｒｉフローサイトメーターで分析した。ＯＶＡの特異的取込みは、４℃での非特異的ＯＶＡ取込みと比較して３７℃でｉＰＳＣ由来ＤＣにより実証された。

【００３１】

【図１１】ｈＰＣＳのフィーダーフリーおよび血清フリーのＴ細胞分化およびＮＫ細胞分化を表す図。最初に、凝集体形成、中胚葉誘導、および９日間のＨＰＣ分化の逐次工程を介して懸濁（３Ｄ）胚様体（ＥＢ）培養でＰＳＣをＣＤ３４＋造血プロジェニター細胞（ＨＰＣ）に分化させた。ダイレクトＣＤ３４常磁性ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてＭＡＣＳによりＣＤ３４＋細胞を単離し、そしてＤＬＬ４＋レトロネクチン被覆プレートに移して２週間のＴ／ＮＫ分化に供した。抗ＣＤ３ｍＡｂ（ＯＫＴ３）＋レトロネクチン被覆（両方とも０．５μｇ／ｃｍ^2）プレート上において、ＩＬ２単独または他のＴ細胞成長促進サイトカイン（ＩＬ７、ＩＬ１５、ＩＬ２１）との組合せで補充されたＴ－ＥＭ（ＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ－ＸＦ Ｔ細胞拡大培地（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））により、培養下でＴ細胞を２週間さらに拡大可能であった。略号：ＳＦＤＭ、血清フリー分化培地、ＴＣＤＭ、Ｔ細胞分化培地、ＴＣＥＭ、Ｔ細胞拡大培地、ＭＡＣＳ、磁気活性化細胞選別。

【００３２】

【図１２】Ｔ／ＮＫ分化培養物のフローサイトメトリー分析。Ｔ／ＮＫ分化条件で２週間後のＰＳＣ（１Ｃ ＴｉＰＳＣ）由来ＣＤ３４＋細胞は、低ＦＳＣ／ＳＳＣパラメーター

により規定される典型的なリンフォイド細胞集団を生成する（左のドットプロット）。このリンフォイド集団は、主にＣＤ３＋Ｔ細胞およびＣＤ５６＋ＣＤ３－ＮＫ細胞を含有する（中間のドットプロット）。Ｔ細胞集団は、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋の単一陽性および二重陽性の細胞、さらにはかなりの割合の二重陰性細胞を含む（右のドットプロット）。

【００３３】

【図１３】分化全体を通じたさまざまな細胞集団の収率。各細胞型ごとの収率は、図に示される細胞誘導の各段階における産生対投入の細胞絶対数の比として表される。たとえば、１．５のＣＤ３４＋細胞収率は、１の（投入）ＰＳＣ細胞から平均で１．５の（産生）ＣＤ３４＋細胞を誘導可能であることを示唆する。したがって、１０２のＴ細胞収率は、１の（投入）ＣＤ３４＋細胞から１０２の（産生）Ｔ細胞を誘導可能であることを示唆する。

【００３４】

【図１４】ＰＳＣ由来Ｔ細胞の表現型。４週間にわたり分化および拡大させたＰＳＣ由来Ｔ細胞（ＣＤ３＋）は、α／βＴＣＲ（γ／δでも不変Ｖα２４でもないＮＫＴ　ＴＣＲ）および典型的なＴ細胞マーカーＣＤ５、ＣＤ２７、ＣＤ７を発現する。また、ＮＫ関連（ＣＤ１６１、ＣＤ９４）マーカーおよび活性化（ＣＤ６９）マーカーも発現する。

【００３５】

【図１５】ＰＳＣ由来Ｔ細胞の拡大。ＰＳＣ由来Ｔ細胞の拡大を達成するためには、固定化抗ＣＤ３抗体（ｉＣＤ３）が最低限でも十分に必要とされる（棒グラフ）。可溶性刺激性ＣＤ３ｍＡｂおよびＣＤ２８ｍＡｂ（ｓＣＤ３、ｓＣＤ２８）は、単独または組合せ（ｓＣＤ３＋ｓＣＤ２８）またはｉＣＤ３に添加した場合（ｉＣＤ３＋ｓＣＤ２８）のいずれでも有効ではなかった。拡大培養時に増殖するＴ細胞は、不規則形状リンパ芽球の特徴的形態を獲得する（写真）。比較的不均一な投入細胞集団とは対照的に、２週間のＴ細胞拡大から採取された細胞は、本質的に純粋なＣＤ３＋Ｔ細胞であるとともに、ＣＤ５６を発現しかつＣＤ８発現を獲得する（フローサイトメトリーのドットプロット）。

【００３６】

【図１６Ａ】（Ａ）８日目のＨＰＣ培養物の代表的な写真：ＨＰＣは下側の内皮層から生成する。

【図１６Ｂ】（Ｂ）２Ｄ　ＨＰＣ分化プロセスの模式図。

【図１６Ｃ】（Ｃ）分化７～１０日目の０１２７９．１０７．３９０２（ＭｅＣＰ２ＫＯ）細胞系からのＨＰＣ生成。

【図１６Ｄ】（Ｄ）分化７～１０日目のＴｉＰＳＣ１Ｅ細胞系からのＨＰＣ生成。細胞を採取し、ＣＤ４３／ＣＤ３４細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより定量した。

【図１６Ｅ】（Ｅ）ｉＰＳＣからのＨＰＣ生成効率。プロセス効率は、生成ＨＰＣ絶対数を投入ｉＰＳＣ数で除算することにより計算される。

【図１６Ｆ】（Ｆ）プレＴ細胞およびプレＮＫ細胞の分析。ｉＰＳＣ０．１２７９．１０７．３９０２（ＭｅＣＰ２ＫＯ）から生成させたＨＰＣを７～１０日目に採取して凍結保存した。ＨＰＣを解凍し、レトロネクチン－ＤＬＬ４被覆プレート上に２５Ｋ／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングした。低酸素条件下でリンフォイド分化を刺激するために、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ、１％ペニシリンストレプトマイシン、９５μＭ　Ｌ－アスコルビン酸２－リン酸、５０ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）、Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ－３）、およびＩＬ－７を含有する血清フリー規定（ＳＦＤ）培地に細胞を配置した。４８時間ごとに新鮮培地を細胞に供給して１４日目に冷ＰＢＳを用いて細胞を採取した。ＣＤ４、ＣＤ７、ＣＤ５、ＣＤ５６、ＣＤ８、およびＣＤ３の表面発現を有する細胞を染色した。リンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞の存在を定量した。

【図１６Ｇ】（Ｇ）プレＴ細胞およびプレＮＫ細胞の分析。ＣＤ４、ＣＤ７、ＣＤ５、ＣＤ５６、ＣＤ８、およびＣＤ３の表面発現を有する細胞を染色した。リンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。

【図１６Ｈ】（Ｈ）ＨＰＣからのＴ細胞生成効率。プロセス効率は、生成Ｔ細胞（ＣＤ３

＋）絶対数を投入ＨＰＣ（ＣＤ４３／３４＋）数で除算することにより計算される。
【００３７】
【図１７Ａ－１７Ｂ】（Ａ）Ｅ８培地および低酸素条件の存在下におけるＭａｔｒｉｇｅｌまたはビトロネクチン上でのフィーダーフリー成長に適合化されたｉＰＳＣを用いた３Ｄ　ＨＰＣ分化プロセスの模式図。ＨＰＣ分化の第１段階は、４日間にわたりＢＭＰ４とＶＥＧＦとＦＧＦとにより駆動され、分化の第２段階は、ヘパリンとＳＣＦとＴＰＯとＦｌｔ－３リガンドとＩＬ－３とＩＬ－６とを含有する培地に細胞を配置することにより駆動される。（Ｂ）雄性ｉＰＳＣ細胞系２．０３８のＭｅＣＰ２　ＫＯを生成させて９００６（０１２７９．１０７．００３９０２）を形成する工学操作ストラテジー。
【図１７Ｃ】（Ｃ）ＭｅＣＰ２　ＴＡＬＥＮＳおよびドナープラスミドｐ１５５３でトランスフェクトされた０１２７９ｉＰＳＣに由来するＭｅＣＰ２変異体００１、００２、００５、および００８のアミノ酸アライメントの描画図。変異体（００１、００２、００５、および００８）はすべて、メチルＣｐＧ結合ドメインをコードしない。
【００３８】
【図１８Ａ－１８Ｃ】ＨＰＣ分化７～１１日目にｉＰＳＣのＴｉｐｓ１Ｅを採取してＲｅｔ－ＤＬＬ４被覆プレート上に配置することにより２．５×１０^{4}／ｃｍ^{2}の密度でリンフォイド分化を開始させたプレＴ細胞およびプレＮＫ細胞の定量。低酸素条件下（Ａ）および正常酸素条件下（Ｂ）で維持された０１２７９（ＭｅＣＰ２ＷＴ）細胞、さらには０１２７９．１０７．３９０２細胞（ＭｅＣＰ２Ｋ０）（Ｃ）について、ＣＤ８＋ＣＤ３＋（Ｔ細胞）、ＣＤ５６＋／ＣＤ８＋（ＮＫ細胞）、およびＣＤ５６＋／ＣＤ３＋（ＮＫ／Ｔ細胞）のパーセントを決定した。（Ａ～Ｂ）ＮＫ細胞は、陽性細胞の中で最も高いパーセントを有し、ＮＫ／Ｔ細胞およびＴ細胞がそれに続く。（Ｃ）７日目～１０日目、陽性細胞のパーセントは、上位から下位の順にＴ細胞、ＮＫ／Ｔ細胞、およびＮＫ細胞である。１１日目、最も高パーセントの陽性細胞はＮＫ細胞であり、ＮＫ／Ｔ細胞およびＴ細胞がそれに続く。
【００３９】
【図１９Ａ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成させたリンフォイド細胞を同定するためのゲーティングストラテジー。（Ａ）成人末梢血由来のリンパ球の一般的散乱プロファイル。
【図１９Ｂ－１９Ｃ】（Ｂ）分化１８日目のリンフォイド細胞の散乱プロファイル。ＦＳＣ－ＳＳＣゲートおよびリンフォイドゲートが例示される。（Ｃ）ヨウ化プロピジウムを用いたＦＳＣ－ＳＳＣ散乱内およびリンフォイド散乱内の生細胞のゲーティング。
【００４０】
【図２０】ｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成させたリンフォイド細胞を同定するためのゲーティングストラテジー。分化１８日目のリンフォイド細胞の散乱プロファイルが示される。ＦＳＣ－ＳＳＣゲートおよびリンフォイドゲートが例示される。生細胞は、フローサイトメトリーによりヨウ化プロピジウムを用いてＦＳＣ－ＳＳＣ散乱内およびリンフォイド散乱内でゲートされてからＣＤ７およびＣＤ５が陽性の細胞に関して染色された。
【００４１】
【図２１Ａ】ＨＰＣ分化７～１１日目に２．５×１０^{4}／ｃｍ^{2}の密度でリンフォイド分化を開始するようにＲｅｔ－ＤＬＬ４被覆プレート上に配置されたＮＫ（ＣＤ３－／ＣＤ５６＋）細胞の定量。ＭｅＣＰ２ＷＴおよびＭｅＣＰ２ＫＯの状態を含むｉＰＳＣクローンで、すべて生存するＦＳＣ－ＳＳＣゲート下（Ａ）およびリンフォイドゲート下（Ｂ）の二重陽性ＣＤ５６＋／ＣＤ３－のパーセントを決定した。
【図２１Ｂ】ＨＰＣ分化７～１１日目に２．５×１０^{4}／ｃｍ^{2}の密度でリンフォイド分化を開始するようにＲｅｔ－ＤＬＬ４被覆プレート上に配置されたＮＫ（ＣＤ３－／ＣＤ５６＋）細胞の定量。ＭｅＣＰ２ＷＴおよびＭｅＣＰ２ＫＯの状態を含むｉＰＳＣクローンで、すべて生存するＦＳＣ－ＳＳＣゲート下（Ａ）およびリンフォイドゲート下（Ｂ）の二重陽性ＣＤ５６＋／ＣＤ３－のパーセントを決定した。
【００４２】
【図２２】ＰＳＣ由来Ｔ細胞の１型サイトカイン産生プロファイル。ＴｉＰＳＣ（１Ｃ）

由来ＣＤ３４＋細胞から２週間のＴ／ＮＫ分化培養で生成させたＴ細胞をＴ細胞拡大培養（固定化抗ＣＤ３ｍＡｂ、ＩＬ２、およびＩＬ７）に移した。ＬＥＧＥＮＤｐｌｅｘフローサイトメトリーマルチプレックスサイトカインアッセイ（ＣＤ８／ＮＫパネル、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いて培養上清でサイトカインを測定した。相対サイトカインレベルはそれぞれのドットプロットに描かれる。

【００４３】

【図２３Ａ－２３Ｂ】ＨＬＡスーパードナーＰＳＣのＴ／ＮＫ分化潜在能力。トランスジーンフリーエピソーム法により誘導されたＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系Ｈ、Ｋ、Ｌ、およびＯのＴ／ＮＫ分化潜在能力を評価し、レトロウイルスによりリプログラムされた高Ｔ／ＮＫ産生１Ｃ　ＴｉＰＳＣと比較した。（Ａ）ドットプロットは、９日目に採取されたＰＳＣ分化培養物のＣＤ３４＋ＨＰＣの割合を示す。棒グラフは、ＣＤ３４＋ＨＰＣのそれぞれの定量的収率を示す。（Ｂ）ＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系に由来するＣＤ３４＋ＨＰＣのＴ／ＮＫ分化は、試験されたすべてのＨＰＣで比較的高いＴ／ＮＫリンパ球新生潜在能力を示した（１投入ＣＤ３４＋ＨＰＣ当たり１００～２００Ｔ／ＮＫ）。

【発明を実施するための形態】

【００４４】

ある特定の実施形態では、本開示は、体細胞（たとえば血液細胞）の出発集団からリプログラムされた誘導多能性幹細胞から免疫細胞を生成させるための高効率の方法を提供する。本方法により産生される免疫細胞は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｔ／ＮＫ細胞、および樹状細胞を含みうる。いくつかの態様では、体細胞の出発集団はＴ細胞を含む。Ｔ細胞は、血液サンプルなどの各種供給源から単離しうる。

【００４５】

特定の実施形態では、血液細胞の出発集団は、ＨＬＡホモ接合細胞を含む（すなわち、ＭＨＣクラスＩおよびＩＩの遺伝子がホモ接合である）。したがって、ｉＰＳＣは、ＨＬＡホモ接合被験体（本明細書ではＨＬＡスーパードナーという）から単離された細胞から産生可能である。

【００４６】

血液細胞集団は、ウイルスベクターやエピソームベクターなどを介してリプログラミング因子を導入することによりｉＰＳＣにリプログラムしうる。次いで、こうした血液細胞由来ｉＰＳＣ（たとえばＴ細胞由来ｉＰＳＣ（ＴｉＰＳＣ））を造血前駆細胞に分化させる。一方法では、分化プロセスは、ＷＮＴ活性化、造血誘導サイトカインを用いた培養、およびＣＤ３４$^{+}$細胞単離を必要とする。次いで、最後に、ＨＰＣをリンフォイド細胞（たとえば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＴ／ＮＫ細胞）やミエロイド細胞（たとえば、樹状細胞）などの免疫細胞に分化させる。

【００４７】

リンフォイド細胞への分化は、フィーダーフリーマトリックスとしてＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎおよびＤＬＬ－４を用いて行いうる。Ｔ細胞分化は、効率および成熟を増加させるアスコルビン酸を用いることにより、さらには低酸素条件下で培養することによりさらに増強しうる。興味深いことに、本発明者らは、リンフォイド潜在能力に関してＨＰＣ分化時に最適時間枠（たとえば７～１１日目）を決定した。リンフォイド潜在能力を有するこうしたＨＰＣは、ＣＤ３４およびＣＤ４３の発現により同定しうる。そのほか、リンフォイド潜在能力を向上させたＨＰＣは、マーカーＣＤ１４４、ＣＤ３４、ＣＤ４５、およびＣＤ７の２つ以上が陽性の細胞画分を選別することにより単離しうる。いくつかの態様では、樹状細胞誘導プロジェニターは、ＨＰＣ分化の約１６日目に出現する共通ミエロイドプロジェニターである。

【００４８】

血液細胞由来ＰＳＣから産生されるリンフォイド細胞は、特徴的なＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）遺伝子再構成を保持するとともにたとえば遺伝的追跡マーカーとしてまたはヒトＴ細胞生成を研究する再分化実験で活用可能な性質を保持するＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＴ／ＮＫ細胞を含みうる。本開示の特定の利点は、分化させたＴ細胞で保持しうるＴ細胞

レセプターの再構成され低減されたＶ、Ｄ、Ｊ遺伝子セグメントにある。これは、Ｔ細胞由来ｉＰＳ細胞のさまざまなクローン集団の特異的な特徴または「バーコード」として機能するとともに、Ｖ（Ｄ）Ｊ組換えを受けていない多能性幹細胞からそうしたｉＰＳ細胞を分化させるのに役立つ。

【００４９】

そのため、本開示の方法は、安定なｉｎ　ｖｉｖｏ移植、化合物のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニング、血液疾患および傷害の機序の解明などの広範にわたる用途で、無制限の数のＨＬＡホモ接合免疫細胞、たとえば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｔ／ＮＫ細胞、および樹状細胞を提供可能である。

【００５０】

Ｉ．定義

本明細書で用いられる場合、特定の成分に関して「本質的にフリー」とは、特定の成分がいずれも組成物に意図的に配合されたものではないことおよび／または汚染物質としてのみもしくは痕跡量でのみ存在するにすぎないことを意味するものとして本明細書で用いられる。したがって、組成物の意図されないなんらかの汚染から生じる特定の成分の全量は、０．０５％を十分に下回る、好ましくは０．０１％未満である。最も好ましいのは、特定の成分の量が標準的分析方法でまったく検出できない組成物である。

【００５１】

本明細書の中で用いられる場合、「ａ」または「ａｎ」は１つ以上を意味しうる。本特許請求の範囲の中で用いられる場合、「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（～を含む）」という語と組み合わせて用いられるとき、「ａ」または「ａｎ」という語は１つまたは２つ以上を意味しうる。

【００５２】

本特許請求の範囲における「ｏｒ（または）」という用語の使用は、選択肢のみを意味するものとして明示的な指定がない限りまたは選択肢が互いに排他的でない限り「ａｎｄ／ｏｒ（および／または）」を意味するものとして用いられるが、本開示は、選択肢のみおよび「ａｎｄ／ｏｒ（および／または）」を意味する定義を支持する。本明細書で用いられる場合、「他の一つ」とは、少なくとも第２のものまたはそれよりも多くのものを意味しうる。

【００５３】

本出願全体を通じて、「ａｂｏｕｔ（約）」という用語は、その値がデバイスやその値の決定に利用される方法に固有の誤差の変動または研究対象に存在する変動を含むことを意味するものとして用いられる。

【００５４】

「外因性」という用語は、細胞もしくは生物のタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドとの関連で用いられるとき、人工もしくは天然の手段により細胞もしくは生物に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドを意味し、または細胞との関連では、この用語は、単離後に人工もしくは天然の手段により他の細胞もしくは生物に導入された細胞を意味する。外因性核酸は、異なる生物もしくは細胞に由来しうるか、または生物内もしくは細胞内に天然に存在する核酸の１つ以上の追加のコピーでありうる。外因性細胞は、異なる生物に由来しうるかまたは同一の生物に由来しうる。限定されるものではないが、例として、外因性核酸は、天然の細胞のときとは異なる染色体上の位置にあるものであるか、さもなければ天然に見いだされるものとは異なる核酸配列がフランキングするものである。

【００５５】

「発現構築物」または「発現カセット」とは、転写の指令が可能な核酸分子を意味する。発現構築物は、１つ以上の所望の細胞型、組織、または器官で遺伝子発現を指令する少なくとも１つ以上の転写制御エレメント（たとえば、プロモーター、エンハンサー、または機能的にそれらと等価な構造）を含む。転写終止シグナルなどの追加のエレメントもまた含まれうる。

【００５６】
「ベクター」または「構築物」（遺伝子送達系または遺伝子移入「媒体」ということもある）とは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含むマクロ分子または分子複合体を意味する。
【００５７】
ベクターの通常のタイプである「プラスミド」は、染色体ＤＮＡとは独立して染色体ＤＮＡに依存せずに複製可能な染色体外ＤＮＡ分子である。ある特定の場合には、それは環状の二本鎖である。
【００５８】
「複製の起点」（「ｏｒｉ」）または「複製起点」とは、細胞のプラスミド中に存在するとき、結合された配列をプラスミド中におよび／またはＤＮＡ合成が開始される部位もしくはその近傍に維持可能なＤＮＡ配列たとえばリンパ球向性ヘルペスウイルスのＤＮＡ配列のことである。例として、ＥＢＶ（エプスタイン・バー（Ｅｂｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ）ウイルス）のｏｒｉは、ＦＲ配列（３０ｂｐリピートの不完全な２０コピー）および好ましくはＤＳ配列を含むが、ＥＢＶの他の部位はＥＢＮＡ－１に結合し、たとえば、Ｒｅｐ＊配列は、複製の起点としてＤＳの代わりとなりうる（Ｋｉｒｓｈｍａｉｅｒ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９９８）。そのため、ＥＢＶの複製起点は、ＦＲ配列、ＤＳもしくはＲｅｐ＊配列、または核酸修飾された機能的に等価な任意の配列、またはそれらに由来する合成的組合せを含む。たとえば、本開示はまた、Ｌｉｎｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８に具体的に記載されるように、個々のエレメントの挿入や突然変異などによりＥＢＶの複製起点を遺伝子工学操作したものも使用しうる。
【００５９】
特定のタンパク質を「コード」する「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」、または「トランスジーン」とは、適切なレギュラトリー配列の制御下に配置されたときに転写されるとともに任意選択的に遺伝子産物たとえばポリペプチドにｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで翻訳される核酸分子のことである。コード領域は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、またはＲＮＡの形態のいずれかで存在しうる。ＤＮＡの形態で存在するとき、核酸分子は一本鎖（すなわちセンス鎖）または二本鎖でありうる。コード領域の境界は、５’（アミノ）末端の開始コドンおよび３’（カルボキシ）末端の翻訳停止コドンにより決定される。限定されるものではないが、遺伝子は、原核または真核ｍＲＮＡ由来のｃＤＮＡ、原核または真核ＤＮＡ由来のゲノムＤＮＡ配列、および合成ＤＮＡ配列を含みうる。転写終止配列は、通常は遺伝子配列の３’側に位置するであろう。
【００６０】
「制御エレメント」という用語は、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流レギュラトリードメイン、複製の起点、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）、エンハンサー、スプライス接合部などを総称して意味し、全体としてレシピエント細胞において複製、転写、転写後プロセシング、コード配列の翻訳を提供する。これらの制御エレメントは、選択されたコード配列が適切な宿主細胞において複製、転写、および翻訳されうるのであれば、すべてが存在する必要はない。
【００６１】
「プロモーター」という用語は、本明細書では、ＤＮＡレギュラトリー配列を含むヌクレオチド領域を意味するものとしてその通常の意味で用いられ、この場合、レギュラトリー配列は、ＲＮＡポリメラーゼに結合可能かつ下流（３’方向）のコード配列の転写を開始可能な遺伝子に由来する。それは、核酸配列の特異的転写を開始するようにＲＮＡポリメラーゼや他の転写因子などのレギュラトリータンパク質および調節分子が結合しうる遺伝的エレメントを含有しうる。「作動的に配置」、「作動的に結合」、「制御下」、および「転写制御下」という語句は、プロモーターが核酸配列との関連で適正な機能位置および／または配向状態にありその配列の転写開始および／または発現を制御することを意味する。

【００６２】
「エンハンサー」とは、プロモーターに近接して配置したときにエンハンサードメインの不在下でプロモーターからもたらされる転写活性と比較して増加した転写活性を付与する核酸配列を意味する。
【００６３】
核酸分子に関して「作動可能に結合」または共発現」とは、２つ以上の核酸分子（たとえば、転写される核酸分子、プロモーター、およびエンハンサーエレメント）が、核酸分子の転写を可能にするよう接続されることを意味する。ペプチドおよび／またはポリペプチド分子に関して「作動可能に結合」または「共発現」とは、２つ以上のペプチドおよび／またはポリペプチド分子が、単一のポリペプチド鎖、すなわち、融合体の各ペプチドおよび／またはポリペプチド成分の少なくとも１つの性質を有する融合ポリペプチドを生じるように接続されることを意味する。融合ポリペプチドは、好ましくはキメラである。すなわち、異種分子で構成される。
【００６４】
「相同性」とは、２つのポリヌクレオチド間または２つのポリペプチド間の同一性パーセントを意味する。一方の配列と他方の配列との対応関係は、当技術分野で公知の技術により決定可能である。たとえば、相同性は、配列情報をアライメントして２つのポリペプチド分子間の配列情報を直接比較することによりおよび容易に入手可能なコンピュータープログラムを用いることにより決定可能である。代替的に、相同性は、相同領域間の安定な二本鎖の形成を促進する条件下でポリヌクレオチドをハイブリダイズさせた後で一本鎖特異的ヌクレアーゼで消化して消化断片のサイズを決定することにより決定可能である。２つのＤＮＡまたは２つポリペプチドの配列は、以上の方法を用いて決定した場合、それぞれヌクレオチドまたはアミノ酸の少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、最も好ましくは少なくとも約９５％が分子の規定の長さにわたりマッチしたとき、互いに「実質的に相同」である。
【００６５】
「細胞」という用語は、本明細書では、当技術分野でのその最広義で用いられ、多細胞生物の組織の構造ユニットである、外部からそれを隔離する膜構造体に取り囲まれる、自己複製能を有する、かつ遺伝情報およびそれを発現する機序を有する、生存体を意味する。本明細書で用いられる細胞は、天然に存在する細胞または人工的に改変された細胞（たとえば、融合細胞、遺伝子改変細胞など）でありうる。
【００６６】
「幹細胞」という用語は、本明細書では、好適な条件下では多岐にわたる特殊化された細胞型に分化可能であるが、他の好適な条件下では自己再生および本質的に未分化の多能性状態の維持が可能である細胞を意味する。「幹細胞」という用語はまた、多能性細胞、複能性細胞、前駆細胞、およびプロジェニター細胞を包含する。例示的なヒト幹細胞は、骨髄組織から得られる造血幹細胞もしくは間葉幹細胞、胚組織から得られる胚性幹細胞、または胎児の生殖器組織から得られる胚性生殖細胞から取得可能である。例示的な多能性幹細胞はまた、多能性に関連するある特定の転写因子を発現して多能性状態にリプログラムすることにより体細胞からも産生可能である。これらの細胞は、「誘導多能性幹細胞」または「ｉＰＳＣもしくはｉＰＳ細胞」と呼ばれる。
【００６７】
「胚性幹（ＥＳ）細胞」とは、初期段階の胚たとえば胚盤胞段階の内部細胞塊から得られる、または人為的手段（たとえば核移行）により産生され、生殖細胞（たとえば精子および卵子）を含めて胚もしくは成人の任意の分化細胞型をもたらしうる、未分化多能性細胞のことである。
【００６８】
「誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣまたはｉＰＳ細胞）」とは、因子（本明細書ではリプログラミング因子という）の組合せを発現してまたは発現を誘導して体細胞をリプログラムすることにより生成される細胞のことである。ｉＰＳ細胞は、胎児、出生直後の産児、新

生児、若年者、または成人の体細胞を用いて生成可能である。ある特定の実施形態では、体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングに使用可能な因子としては、たとえば、Ｏｃｔ４（Ｏｃｔ３／４ということもある）、Ｓｏｘ２、ｃ－Ｍｙｃ、Ｋｌｆ４、Ｎａｎｏｇ、およびＬｉｎ２８が挙げられる。いくつかの実施形態では、体細胞は、体細胞を多能性幹細胞にリプログラムするために少なくとも２つのリプログラミング因子、少なくとも３つのリプログラミング因子、少なくとも４つのリプログラミング因子、少なくとも５つのリプログラミング因子、少なくとも６つのリプログラミング因子、または少なくとも７つのリプログラミング因子を発現することによりリプログラムされる。

【００６９】

「造血プロジェニター細胞」または「造血前駆細胞」とは、造血系列にコミットするがただしさらなる造血分化が可能である細胞を意味し、たとえば、造血幹細胞、複能性造血幹細胞、共通ミエロイドプロジェニター、巨核球プロジェニター、赤血球プロジェニター、およびリンフォイドプロジェニターである。造血幹細胞（ＨＳＣ）とは、ミエロイド系列（単球およびマクロファージ、顆粒球（好中球、好塩基球、好酸球、および肥満細胞）、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）ならびにリンフォイド系列（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）をはじめとするすべての血液細胞型をもたらす複能性幹細胞のことである（たとえば、Ｄｏｕｌａｔｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２、Ｎｏｔｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５を参照されたい）。「マルチリンフォイドプロジェニター」（ＭＬＰ）とは、すべてのリンフォイド系列（Ｂ、Ｔ、およびＮＫ細胞）をもたらすが他の（ミエロイド）潜在能力を有していても有してしなくてもよいかつＣＤ４５ＲＡ$^{+}$／ＣＤ１０$^{+}$／ＣＤ７$^{-}$である、任意のプロジェニターを記述するものとして定義される（Ｄｏｕｌａｔｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。Ｂ、Ｔ、およびＮＫプロジェニターは、ＭＬＰともいいうる。「共通ミエロイドプロジェニター」（ＣＭＰ）とは、顆粒球、単球、巨核球、および赤血球をもたらしうるＣＤ４５＋／ＣＤ３１＋／ＣＤ４３＋／ＣＤ３４$^{-}$細胞の発現により規定される共通ミエロイドプロジェニターを意味する。造血プロジェニター細胞はＣＤ３４を発現しうる。造血プロジェニター細胞は、ＣＤ１３３を共発現しうるとともにＣＤ３８発現に関して陰性でありうる。造血前駆細胞は、ＣＤ３４$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$造血前駆細胞およびＣＤ３４$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ４３$^{+}$造血前駆細胞を含む。ＣＤ３４$^{+}$／ＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$造血前駆細胞は、ミエロイドプロジェニターを高度に富化しうる。造血細胞はまた、ＣＤ３４$^{-}$／ＣＤ１３３$^{+}$／ＣＤ３８$^{-}$（原始造血前駆細胞）、ＣＤ４３（＋）ＣＤ２３５ａ（＋）ＣＤ４１ａ（＋／－）（エリスロ巨核球新生）、ｌｉｎ（－）ＣＤ３４（＋）ＣＤ４３（＋）ＣＤ４５（－）（複能性）、およびｌｉｎ（－）ＣＤ３４（＋）ＣＤ４３（＋）ＣＤ４５（＋）（ミエロイド偏向）細胞、ＣＤ１３３＋／ＡＬＤＨ＋（アルデヒドデヒドロゲナーゼ）をはじめとする原始造血細胞の各種サブセットを含む（たとえば、Ｈｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．２００４、Ｃｈｒｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。これらの原始造血細胞型または造血前駆細胞はいずれも、本明細書に記載のｉＰＳ細胞に変換しうると予想される。いくつかの態様では、細胞は、肥満細胞、ランゲルハンス細胞、破骨細胞、ＮＫ細胞、Ｔ細胞、ＣＩＫ　Ｔ細胞を含みうるか　またはＴ細胞、ＮＫ細胞、およびＢ細胞の他のサブタイプを含みうる。

【００７０】

本明細書で用いられる場合、「免疫細胞」という用語は、限定されるものではないが、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｔ／ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、赤血球、単球、好塩基球、好中球、肥満細胞、好酸球、およびそれらの任意の組合せをはじめとする免疫系の細胞を意味する。

【００７１】

Ｔ細胞の「アクチベーター」またはＴ細胞を活性化する条件とは、Ｔ細胞を活性化する刺激を意味し、抗原提示細胞上または他の表面上に提示されうる抗原、特異性にかかわらず多くのＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）複合体に結合するポリクローナルアクチベーターを含み、かつコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）やフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）などのレクチンおよびＴＣＲまたはＣＤ３タンパク質の不変フレームワークエピトープに特異的に結

合する抗体などの作用剤ならびにかなりの数のＴ細胞を刺激するスーパー抗原を含み、かつたとえばブドウ球菌エンテロトキシンなどのエンテロトキシンを含む。

【００７２】

「Ｔリンパ球」および「Ｔ細胞」という用語は、同義的に用いられ、１つ以上のＭＨＣ分子または１つ以上の非古典的ＭＨＣ分子と共に抗原提示細胞の表面またはマトリックスにディスプレイされたときに抗原を認識可能なＴ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）を発現する細胞を意味する。

【００７３】

「Ｔ細胞」という用語は、当技術分野で定義されるＴリンパ球を意味し、胸腺細胞、未成熟Ｔリンパ球、成熟Ｔリンパ球、休止Ｔリンパ球、または活性化Ｔリンパ球を含むことが意図される。Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ＣＤ４$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、またはＣＤ４$^-$ＣＤ８$^-$細胞でありうる。Ｔ細胞はまた、Ｔヘルパー１（ＴＨ１）細胞やＴヘルパー２（ＴＨ２）細胞やＴＨ１７細胞などのＴヘルパー細胞、さらには細胞傷害性Ｔ細胞、レギュラトリーＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、メモリーＴ細胞、またはγδＴ細胞でありうる（Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００９、Ｗｙｎｎ，２００５、Ｌａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。本明細書では、ＣＤ４などの少なくとも１つのマーカーが互いに異なるＴ細胞をＴ細胞の「サブセット」という。

【００７４】

「ＣＤ４$^+$Ｔ細胞」とは、表面上にＣＤ４を発現して細胞媒介免疫反応に関与するＴ細胞サブセットを意味する。それは刺激後の分泌プロファイルにより特徴付けられ、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１０などのサイトカインの分泌を含みうる。「ＣＤ４」は、Ｔリンパ球上の分化抗原として最初に定義されたものだけでなく単球／マクロファージをはじめとする他の細胞上にも見いだされる５５ｋＤ糖タンパク質である。ＣＤ４抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、連合認識エレメントとしてＭＨＣ（主要組織適合複合体）クラスＩＩ拘束免疫反応に関与する。Ｔリンパ球では、ヘルパー／インデューサーサブセットが定義される。

【００７５】

「ＣＤ８$^+$Ｔ細胞」とは、表面上にＣＤ８を発現し、ＭＨＣクラスＩ拘束であり、かつ細胞傷害性Ｔ細胞として機能するＴ細胞サブセットを意味する。「ＣＤ８」分子は、胸腺細胞上ならびに細胞傷害性Ｔリンパ球上およびサプレッサーＴリンパ球上に見いだされる分化抗原である。ＣＤ８抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合複合体クラスＩ拘束相互作用における連合認識エレメントである。

【００７６】

「多能性幹細胞」とは、１つ以上の組織もしくは器官または好ましくは３つの胚葉：内胚葉（胃内壁、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、もしくは外胚葉（表皮組織および神経系）のいずれかを構成するすべての細胞に分化する潜在能力を有する幹細胞を意味する。

【００７７】

本明細書で用いられる場合、「体細胞」という用語は、卵子や精子などの生殖細胞以外の任意の細胞でありそのＤＮＡを次世代に直接伝達しないものを意味する。典型的には、体細胞は、限られた多能性を有するかまたは多能性をまったく有していない。本明細書で用いられる体細胞は、天然に存在しうるかまたは遺伝子改変しうる。

【００７８】

「プログラミング」とは、細胞により生成可能な後代の型を改変するプロセスのことである。たとえば、プログラミングを用いずに同一の条件下で生成可能な型と比較して少なくとも１つの新しい細胞型の後代を培養下またはｉｎ　ｖｉｖｏのいずれかで生成可能になるように改変されたとき、細胞はプログラムされている。このことは、かかる後代をプログラミング前に本質的にまったく生成できないならば、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合で観測されることを意味し、代替的には、新しい細胞型の特性を有する割合は、プログラミング前よりも多く測定されうる。このプロセ

スは、分化、脱分化、および分化転換を含む。
【００７９】
「分化」とは、あまり特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞型になるプロセスのことである。「脱分化」とは、部分的または最終的に分化された細胞がより初期の発生段階、たとえば、多能性または複能性の段階に戻る細胞プロセスのことである。「分化転換」とは、ある分化された細胞型を他の分化された細胞型に変換するプロセスのことである。典型的には、プログラミングによる分化転換は、細胞が中間的多能性段階を経由することなく行われる。すなわち、細胞は、ある分化された細胞型から他の分化された細胞型に直接プログラムされる。ある特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が高い順に少なくとも約１％、５％、２５％、またはそれ以上でありうる。
【００８０】
「リプログラミング」とは、リプログラミングを用いずに同一の条件下で有しうるよりも少なくとも１つの新しい細胞型の後代を形成する測定可能に向上した能力を培養下またはｉｎ　ｖｉｖｏのいずれかで細胞に付与するプロセスのことである。より具体的には、リプログラミングとは、多能性の潜在能力を体細胞に付与するプロセスのことである。このことは、かかる後代をリプログラミング前に本質的にまったく生成できないならば、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合になることを意味し、さもなければ、新しい細胞型の特性を有する割合は、リプログラミング前よりも多く測定されうる。ある特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が高い順に少なくとも約１％、５％、２５％、またはそれ以上でありうる。
【００８１】
「フォワードプログラミング」という用語は、１つ以上の特定の系列決定遺伝子または遺伝子産物を複能性細胞または多能性細胞に提供することにより多能性をまったく有していない分化された体細胞とは対照的な複能性細胞または多能性細胞をプログラムすることを意味する。たとえば、フォワードプログラミングとは、造血前駆細胞もしくは他の前駆細胞または造血細胞もしくは他の分化された体細胞になるようにＥＳＣまたはｉＰＳＣをプログラムするプロセスを意味しうる。
【００８２】
本明細書で用いられる場合、「被験体」または「必要とする被験体」という用語は、哺乳動物、好ましくは、細胞または組織の移植を必要とする任意の年齢の男性または女性のヒトを意味する。典型的には、被験体（本明細書ではレシピエントともいう）は、細胞または組織の移植による治療に適合しうる障害または病理学的もしくは望ましくない病態、状態、もしくは症候群または物理的、形態学的、もしくは生理学的な異常が原因で細胞または組織の移植を必要とする。
【００８３】
本明細書で用いられる場合、遺伝子の「破壊」とは、破壊の不在下における遺伝子産物の発現レベルと比較して、細胞において被験体の遺伝子によりコードされる１つ以上の遺伝子産物の発現が排除または低減されることを意味する。例示的な遺伝子産物としては、遺伝子によりコードされるｍＲＮＡおよびタンパク質産物が挙げられる。破壊は、いくつかの場合には一過的また可逆的であり、他の場合には永久的である。破壊は、いくつかの場合には、機能性または全長のタンパク質またはｍＲＮＡの破壊であり、トランケート型または非機能性の産物が産生されうるという事実は関係しない。本明細書のいくつかの実施形態では、遺伝子の活性または機能は、発現とは対照的に破壊される。遺伝子破壊は、人工的方法により、すなわち、化合物、分子、複合体、もしくは組成物の添加もしくは導入により、および／またはＤＮＡレベルなどで遺伝子の核酸の破壊もしくは遺伝子との会合により、一般に誘導される。遺伝子破壊の例示的な方法としては、遺伝子サイレンシング、ノックダウン、ノックアウト、および／または遺伝子破壊技術たとえば遺伝子編集が挙げられる。例としては、アンチセンス技術、たとえば、一般に発現の一過的低減をもたらすＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、および／またはリボザイム、さらには標的遺伝子の不活性化または破壊をもたらす遺伝子編集技術、たとえば、破壊および／または相同

組換えの誘導によるものが挙げられる。例としては、挿入、突然変異、および欠失が挙げられる。破壊は、典型的には、遺伝子によりコードされる正常産物または「（野生型」産物の発現の抑制および／または完全欠如をもたらす。かかる遺伝子破壊の例としては、全遺伝子の欠失を含めて、遺伝子または遺伝子の一部の挿入、フレームシフト突然変異およびミスセンス突然変異、欠失、ノックイン、ならびにノックアウトが挙げられる。かかる破壊は、コード領域たとえば１つ以上のエクソンで行うことが可能であり、その結果、停止コドンの挿入などにより全長産物、機能性産物、またはいずれかの産物を産生できなくなる。かかる破壊はまた、遺伝子の転写を防止するようにプロモーターまたはエンハンサーまたは転写の活性化に影響を及ぼす他の領域を破壊することにより行いうる。遺伝子破壊としては、相同組換えによる標的遺伝子の不活性化をはじめとする遺伝子ターゲッティングが挙げられる。

【００８４】

「Ｎｏｔｃｈリガンド」とは、造血幹細胞などのいくつかの異なる哺乳動物細胞の細胞膜に存在するＮｏｔｃｈレセプターポリペプチドに結合可能なタンパク質のことである。ヒト細胞で同定されたＮｏｔｃｈレセプターとしては、Ｎｏｔｃｈ－１、Ｎｏｔｃｈ－２、Ｎｏｔｃｈ－３、およびＮｏｔｃｈ－４が挙げられる。Ｎｏｔｃｈリガンドは、典型的には、アミノ末端に２０～２２アミノ酸を含むＤＳＬドメイン（Ｄ－Ｄｅｌｔａ、Ｓ－Ｓｅｒｒａｔｅ、およびＬ－Ｌａｇ２）および細胞外表面に３～８ＥＧＦ様リピートを有する（Ｆｕｒｉｅ ａｎｄ Ｆｕｒｉｅ，１９８８、Ｋｎｕｓｔ ｅｔ ａｌ．，１９８７、Ｓｕｚｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９８７）。

【００８５】

本明細書では、「スーパードナー」とは、ある特定のＭＨＣクラスＩおよびＩＩ遺伝子がホモ接合である個体のことをいう。こうしたホモ接合個体は、スーパードナーとして機能しうるとともに、その細胞は、その細胞を含む組織および他の物質を含めて、ハプロタイプがホモ接合またはヘテロ接合のいずれの個体にも移植可能である。スーパードナーは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、またはＨＬＡ－ＤＱ遺伝子座／遺伝子座対立遺伝子がそれぞれホモ接合でありうる。

【００８６】

ＩＩ．体細胞誘導ｉＰＳＣ

Ａ．出発体細胞集団

本開示の実施形態は、ｉＰＳＣにリプログラムされる出発体細胞集団（たとえば血液細胞または皮膚細胞）に関する。血液細胞集団は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、混合集団を含有する全血またはその画分、脾臓細胞、骨髄細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球搬出により得られる細胞、生検組織、およびリンパ節、たとえば、腫瘍から排液が流入するリンパ節を含みうる。好適なドナーとしては、免疫ドナー、非免疫（ナイーブ）ドナー、治療ドナー、または未治療ドナーが挙げられる。「治療」ドナーとは、１つ以上の生物学的モディファイヤーに晒されたドナーのことである。「未治療」ドナーとは、１つ以上の生物学的モディファイヤーに晒されていないドナーのことである。

【００８７】

いくつかの態様では、血液細胞集団はＴ細胞を含む。Ｔ細胞は、精製Ｔ細胞集団でありうるか、または代替的にＴ細胞は、異なるタイプの細胞たとえばＢ細胞および／もしくは他の末梢血細胞を含む集団でありうる。Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞などの精製Ｔ細胞サブセット集団でありうるか、または異なるＴ細胞サブセットを含むＴ細胞集団でありえる。他の一実施形態では、Ｔ細胞は、培養下で長期間維持されたＴ細胞クローンである。Ｔ細胞クローンは、さまざまな程度でトランスフォームしうる。特定的な実施形態では、Ｔ細胞は、培養下で無制限に増殖するＴ細胞クローンである。

【００８８】

いくつかの態様では、Ｔ細胞は初代Ｔ細胞である。「初代Ｔ細胞」という用語は、培養下で長期間維持されたＴ細胞とは対照的に、個体から得られたＴ細胞を含むことが意図される。そのため、初代Ｔ細胞は、とくに、被験体から得られた末梢血Ｔ細胞である。初代

Ｔ細胞集団は、主に、１つのＴ細胞サブセットで構成しうる。代替的に、初代Ｔ細胞集団は、異なるＴ細胞サブセットで構成しうる。

【００８９】

Ｔ細胞は、これまで貯蔵されていた血液サンプル、健常個体、または代替的に病態に罹患している個体に由来しうる。病態は、感染疾患、たとえば、ウイルス感染、細菌感染、もしくは任意の他の微生物による感染から生じる病態、または過増殖疾患、たとえば、黒色腫のような癌でありうる。特定的な実施形態では、Ｔ細胞は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）に感染している個体に由来しうる。さらに他の一実施形態では、Ｔ細胞は、自己免疫疾患またはＴ細胞病変に罹患しているまたは罹患しやすい被験体に由来しうる。Ｔ細胞は、ヒト起源、ネズミ起源、または任意の他の哺乳動物種のものでありうる。

【００９０】

Ｔ細胞を含む細胞集団を得る方法は、当技術分野で周知である。たとえば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、当技術分野で公知の方法により記載されるように取得しうる。かかる方法の例は、実施例に示されており、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）、Ｂｉｓｗａｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）、Ｂｉｓｗａｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）で考察されている。

【００９１】

いくつかの態様では、出発血液細胞集団は造血幹細胞（ＨＳＣ）を含む。ＨＳＣは、骨髄に通常存在するが、血液に押し込まれることもあり、このプロセスは動員と称され、末梢血で多数のＨＳＣを採取するために臨床的に使用される。最適な動員剤の１つは、果粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）である。末梢血で循環するＣＤ３４$^{+}$造血幹細胞またはプロジェニターは、非撹乱状態またはＧ－ＣＳＦのような造血成長因子の外部投与に続く動員後のいずれかでアフェレーシス技術により採取可能である。動員後に採取される幹細胞またはプロジェニター細胞の数は、非撹乱状態のアフェレーシス後に得られるよりも多い。いくつかの態様では、造血幹細胞やプロジェニター細胞を富化する必要性がないことから、細胞集団源は、細胞が外因的適用因子により動員されていない被験体である。

【００９２】

細胞集団から造血前駆細胞を得る方法もまた、当技術分野で周知である。造血前駆細胞は、各種サイトカイン、たとえば、ｈＳＣＦ、ｈＦＬＴ３、および／またはＩＬ－３を用いて拡大させうるか、またはＣＤ３４＋細胞は、ＭＡＣＳもしくはＦＡＣＳを用いて富化させうる（Ａｋｋｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）。上述したように、ＣＤ３４$^{+}$細胞を富化するためにネガティブ選択技術も使用しうる。

【００９３】

本明細書に記載の方法に使用される細胞集団は、哺乳動物細胞、たとえば、ヒト細胞、非ヒト霊長動物細胞、齧歯動物細胞（たとえばマウスもしくはラット）、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ細胞、イヌ細胞、およびネコ細胞、またはそれらの混合物でありうる。非ヒト霊長動物細胞はアカゲザル細胞を含む。細胞は、動物たとえばヒト患者から取得しうるかまたは細胞系に由来しうる。細胞を動物から得る場合、そのままで、たとえば、非分離細胞（すなわち混合集団）として使用しうるか、最初にトランスフォーメーションなどにより培養下で樹立されたものでありうるか、または予備精製方法に付されたものでありうる。たとえば、細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づいてポジティブ選択もしくはネガティブ選択により操作しうるか、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｉｎ　ｖｉｖｏで１つ以上の抗原で刺激しうるか、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｉｎ　ｖｉｖｏで１つ以上の生物学的モディファイヤーで処理しうるか、またはこれらのいずれかもしくはすべての組合せでありうる。例示的な実施形態では、細胞集団は、非Ｔ細胞および／または特定のＴ細胞サブセットを枯渇させるためにネガティブ選択に付される。ネガティブ選択は、ＣＤ１９やＣＤ２０などのＢ細胞マーカー、単球マーカーＣＤ１４、ＮＫ細胞マーカーＣＤ５６をはじめとするさまざまな分子の細胞表面発現に基づいて実施可能である。代替的に、細胞集団は、非ＣＤ３４＋造血細胞および／または特定の造血細胞サブセットを枯渇させるためにネガティブ選択に付されうる。ネガティブ選択は、さまざまな分子の細胞表面発現に基づいて、たとえば、抗体のカクテル（たとえば、ＭＡＣＳやカラム

分離などにより他の細胞型の分離に使用しうるＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ５６、ＣＤ１２３、ＣＤ２３５ａ、およびＣＤ４１（たとえば、巨核球系列の細胞に対して））を用いて実施可能である。

【００９４】

被験体から細胞サンプルを得てから所望の細胞型を富化することも可能である。たとえば、本明細書に記載されるようにＰＢＭＣおよび／またはＣＤ３４＋造血細胞を血液から単離可能である。ＰＢＭＣからＴ細胞を富化するために、カウンターフロー遠心分離（水簸）を使用可能である。また、所望の細胞型の細胞表面上のエピトープに結合する抗体により単離および／または活性化を行うなどのさまざまな技術を用いて、細胞を他の細胞から単離可能であり、たとえば、いくつかのＴ細胞単離キットでは、細胞を活性化するために、次いで、同一のビーズを用いてカラム分離も行えるように、抗体コンジュゲートビーズを使用する。使用可能な他の一方法は、レセプターエンゲージメントにより細胞を活性化されることなく特定の細胞型を選択的に富化するために、細胞表面マーカーに対する抗体を用いたネガティブ選択を含む。

【００９５】

骨髄細胞は、腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨、または他の髄腔から取得しうる。骨髄を患者から採取し、各種の分離および洗浄手順により単離しうる。骨髄細胞を単離するための公知の手順は、次の工程：ａ）骨髄懸濁物を３つの画分に遠心分離して中間画分またはバフィーコートを捕集する工程、ｂ）分離流体、通常はＦｉｃｏｌｌ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｆｉｎｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ ＡＢの商標）を用いて工程（ａ）のバフィーコート画分をもう１回遠心分離し、骨髄細胞を含有する中間画分を捕集する工程、およびｃ）再輸液可能な骨髄細胞を回収するために工程（ｂ）の捕集画分を洗浄する工程を含む。

【００９６】

Ｔ細胞が富化された細胞集団を使用することを望むのであれば、かかる細胞集団は、連続フローセル分離器を用いて白血球搬出および機械的アフェレーシスにより混合細胞集団から取得可能である。たとえば、Ｔ細胞は、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（商標）グラジエントによる分離、Ｐｅｒｃｏｌｌグラジエントによる分離、または水簸をはじめとする任意の公知の方法によりバフィーコートから単離可能である。

【００９７】

ある特定の態様では、Ｔ細胞は、Ｔ細胞レセプターに結合してＴ細胞活性化のシグナリングカスケードをトリガーする作用剤により活性化される。たとえば、ＣＤ３抗体を使用しうる。リプログラミングに供すべく有意数および増殖状態にＴ細胞を拡大するために、ＩＬ－２などのサイトカインも使用しうる。ある特定の態様では、共刺激が関与するＴ細胞活性化のために抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８の両方を使用しうる。代替態様では、プレート結合抗ＣＤ３などの抗ＣＤ３の架橋を適用しうる。ＰＢＭＣ中のＴ細胞を活性化するために可溶性抗ＣＤ３を使用する場合、可溶性抗ＣＤ３抗体は、ＰＢＭＣ中のＡＰＣに結合しうるとともに、次いで、Ｔ細胞に抗体を提示する。精製Ｔ細胞集団で可溶性抗ＣＤ３抗体を単独で使用する場合、以上に挙げた理由でアネルギーを生じるであろう。ある特定の実施形態は、抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）およびＩＬ２の存在下でＴ細胞を培養することを含む。これは、コストのかかる厄介なビーズやプレート結合抗体を使用する必要がないので、有利かつ便利である。ＯＫＴ３およびＩＬ２の添加後、ＰＢＭＣの細胞環境は、Ｔ細胞を活性化するのに役立つであろう。次いで、Ｔ細胞は、優先的拡大によりＰＢＭＣ培養で他の細胞型よりも過度に多くなる。

【００９８】

ある特定の態様では、出発血液細胞集団は、リンパ芽球様細胞、たとえば、リンパ芽球様細胞系（ＬＣＬ）のものを含む。ＬＣＬの生成は、当技術分野で公知であり、たとえば、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）をＢ細胞に感染させることにより行われる（Ｆｒｉｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ Ｖｉｒｕｓ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｐａｒｔ ＩＩＩ，１２５－１２７，２００１）。

【００９９】

Ｂ．ＭＨＣハプロタイプマッチング

主要組織適合複合体は、同種異系臓器移植の免疫拒絶の主要因である。３つの主要ＭＨＣクラスＩハプロタイプ（Ａ、Ｂ、およびＣ）ならびに３つの主要ＭＨＣクラスＩＩハプロタイプ（ＤＲ、ＤＰ、およびＤＱ）が存在する。ＨＬＡ遺伝子座はきわめて多型であり、６番染色体上に４Ｍｂにわたり分布する。この領域は自己免疫疾患および感染疾患に関連するため、また、ドナーとレシピエントとの間のＨＬＡハプロタイプの適合性は移植の臨床アウトカムに影響を及ぼす可能性があるため、領域内のＨＬＡ遺伝子のハプロタイプを決定する能力は臨床上重要である。ＭＨＣクラスＩに対応するＨＬＡは、細胞内のペプチドをＴリンパ球に提示し、ＭＨＣクラスＩＩに対応するＨＬＡは、細胞外の抗原をＴリンパ球に提示する。移植片と宿主との間のＭＨＣハプロタイプの不適合は、移植片に対する免疫反応をトリガーしてその拒絶を引き起こす。そのため、拒絶を予防するために患者を免疫抑制剤で治療しうる。ＨＬＡマッチ幹細胞系は、免疫拒絶のリスクを克服しうる。

【０１００】

移植にはＨＬＡが重要であるため、ＨＬＡ遺伝子座は、通常、有利なドナー－レシピエントペアを同定するために血清学およびＰＣＲによりタイプが決定される。ＨＬＡクラスＩおよびＩＩの抗原の血清学的検出は、精製されたＴリンパ球またはＢリンパ球による補体媒介リンパ球傷害性試験を用いて達成可能である。この手順は、ＨＬＡ－Ａおよび－Ｂの遺伝子座のマッチングに主に使用される。分子ベースの組織タイピングは、多くの場合、血清学的試験よりも正確でありうる。一連のオリゴヌクレオチドプローブに対してＰＣＲ産物が試験されるＳＳＯＰ（配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ）法などの低分解能分子法は、ＨＬＡ抗原の同定に使用可能であり、現在、こうした方法は、クラスＩＩ－ＨＬＡタイピングに使用される最も一般的な方法である。ＰＣＲ増幅用の対立遺伝子特異的プライマーを利用するＳＳＰ（配列特異的プライマー）法などの高分解能技術は、特異的ＭＨＣ対立遺伝子を同定可能である。

【０１０１】

ドナー細胞がＨＬＡホモ接合である場合、すなわち、各抗原提示タンパク質に対して同一の対立遺伝子を含有する場合、ドナーとレシピエントとの間のＭＨＣ適合性は有意に増加する。ほとんどの個体は、ＭＨＣクラスＩおよびＩＩの遺伝子がヘテロ接合であるが、ある特定の個体は、こうした遺伝子がホモ接合である。こうしたホモ接合個体は、スーパードナーとして機能しうるとともに、その細胞から生成させた移植片は、ハプロタイプがホモ接合またはヘテロ接合のいずれの個体にもすべて移植可能である。さらに、ホモ接合ドナー細胞が集団で高頻度に見いだされるハプロタイプを有する場合、こうした細胞は多数の個体で移植療法の用途を有しうる。

【０１０２】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法のｉＰＳＣは、治療される被験体または患者のものと同一もしくは実質的に同一のＨＬＡ型を有する他の一被験体の体細胞から産生可能である。ある場合には、ドナーの主要ＨＬＡ（たとえば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－ＤＲの３つの主要遺伝子座）は、レシピエントの主要ＨＬＡと同一である。いくつかの場合には、体細胞ドナーはスーパードナーでありうるので、ＭＨＣホモ接合スーパードナーに由来するｉＰＳＣを用いてＨＰＣおよび続いてＴ細胞などの免疫細胞を生成させうる。そのため、スーパードナーに由来する免疫細胞は、ハプロタイプがホモ接合またはヘテロ接合のいずれの被験体にも移植しうる。たとえば、免疫細胞は、ＨＬＡ－ＡやＨＬＡ－Ｂなどの２つのＨＬＡ対立遺伝子がホモ接合でありうる。したがって、スーパードナーから産生された免疫細胞を本明細書に開示される方法に使用して、多数の潜在的レシピエントに潜在的に「マッチ」しうる免疫細胞を産生可能である。

【０１０３】

したがって、本開示のある特定の実施形態は、ＨＬＡホモ接合免疫細胞（たとえば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、および樹状細胞）のリポジトリー（たとえばライブラリー）を提供する。被験体ライブラリーに提示されるＨＬＡハプロタイプは、ヒト集団に見いだされる最も共通したＨＬＡハプロタイプ、たとえば、共通コーカサス人ＨＬＡハプロタイプ、アフリ

カ系個体に見いだされる共通ＨＬＡハプロタイプ、共通アジア人ＨＬＡハプロタイプ、共通ヒスパニック人ＨＬＡハプロタイプ、共通先住アメリカ人ＨＬＡハプロタイプなどを反映しうる。たとえば、集団のかなりの割合に単一の豊富なハプロタイプが存在しうるので、単一のＨＬＡホモ接合細胞系は、患者の有意なパーセントで組織適合性ドナーとして機能しうる。ライブラリーは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、または３０超の異なる型のＨＬＡホモ接合細胞を含む。被験体ライブラリーは、第１のＨＬＡハプロタイプがホモ接合である第１のＨＬＡホモ接合細胞と、第２のＨＬＡハプロタイプがホモ接合である少なくとも第２のＨＬＡホモ接合細胞と、を含みうる。被験体ライブラリーは、単一細胞型を含みうるか、または２つ以上の異なる細胞型を含みうる。被験体ライブラリーは、たとえば、ＨＬＡハプロタイプに関する情報および任意選択的に追加情報、たとえば、細胞表面マーカー、核型情報などを記憶して検索できる検索可能なコンピューターデータベースにより、カタログ可能である。

【０１０４】

本明細書に記載のＨＬＡホモ接合免疫細胞は、細胞および／または組織の移植を必要とする広範にわたる臨床用途に使用可能である。ＨＬＡホモ接合免疫細胞はレシピエントに適合可能なＨＬＡであるので、免疫抑制療法を必要とすることなくまたは免疫抑制療法の必要性を少なくとも低減させてレシピエントに導入可能である。標準的免疫抑制剤レジメンは、１ヶ月当たり何千ドルものをコストがかかり、しかもしばしば命にかかわるうえに治療費がかかる感染症および癌をはじめとする望ましくない副作用を伴うおそれがある。本ＨＬＡホモ接合免疫細胞は、臨床用途でのヒト細胞の使用を現在制限する障害のいくつかをこうして克服する。

【０１０５】

Ｃ．リプログラミング因子

ある特定の実施形態では、出発体細胞集団は、リプログラミング因子の導入によりｉＰＳ細胞にリプログラムされる。ｉＰＳ細胞の生成は、誘導に使用されるリプログラミング因子にとってきわめて重要である。次の因子またはそれらの組合せは、本開示に開示される方法に使用しうる。ある特定の態様では、ＳｏｘおよびＯｃｔ（とくにＯｃｔ３／４）をコードする核酸がリプログラミングベクターに組み込まれるであろう。たとえば、１つ以上のリプログラミングベクターは、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ４、Ｎａｎｏｇ、および任意選択的にＬｉｎ２８をコードする発現カセット、またはＳｏｘ２、Ｏｃｔ４、Ｋｌｆ４、および任意選択的にｃ－Ｍｙｃをコードする発現カセット、またはＳｏｘ２、Ｏｃｔ４、および任意選択的にＥｓｒｒｂをコードする発現カセット、またはＳｏｘ２、Ｏｃｔ４、Ｎａｎｏｇ、Ｌｉｎ２８、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、および任意選択的にＳＶ４０ラージＴ抗原をコードする発現カセットを含みうる。こうしたリプログラミング因子をコードする核酸は、同一の発現カセット、異なる発現カセット、同一のリプログラミングベクター、または異なるリプログラミングベクターに含まれうる。

【０１０６】

Ｏｃｔ４およびＳｏｘ遺伝子ファミリーのある特定のメンバー（Ｓｏｘ１、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ３、およびＳｏｘ１５）は、誘導プロセスに関与するきわめて重要な転写レギュレーターとして同定されており、それらが存在しないと誘導を引き起こすことが不可能になる。しかしながら、Ｋｌｆファミリーのある特定のメンバー（Ｋｌｆ１、Ｋｌｆ２、Ｋｌｆ４、およびＫｌｆ５）、Ｍｙｃファミリー（ｃ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ、およびＮＭｙｃ）、Ｎａｎｏｇ、およびＬｉｎ２８をはじめとする追加の遺伝子は、誘導効率を向上させるものとして同定されている。

【０１０７】

Ｏｃｔ４（Ｐｏｕ５ｆ１）は、オクタマー（「Ｏｃｔ」）転写因子ファミリーの１つであり、多能性の維持にきわめて重要な役割を果たす。割球や胚性幹細胞などのＯｃｔ４$^{+}$細胞にＯｃｔ４が存在しないと自発的栄養芽細胞分化がもたらされ、その際、Ｏｃｔ４が存在すると胚性幹細胞の多能性および分化潜在能力がもたらされる。Ｏｃｔ４の近縁であ

るＯｃｔ１およびＯｃｔ６をはじめとする「Ｏｃｔ」ファミリーの各種の他の遺伝子は、誘導を惹起できないので、誘導プロセスに対するＯｃｔ－４の排他性が実証される。

【０１０８】

Ｓｏｘ遺伝子ファミリーは、Ｏｃｔ４と同様に多能性の維持に関与するが、多能性幹細胞で排他的に発現されるＯｃｔ４とは対照的に複能性および単能性の幹細胞に関与する。Ｓｏｘ２は、リプログラミング誘導に使用された初期の遺伝子であったが、Ｓｏｘファミリーの他の遺伝子も、誘導プロセスで同様に動作することが見いだされている。Ｓｏｘ１は、Ｓｏｘ２と類似の効率でｉＰＳ細胞を生成し、遺伝子Ｓｏｘ３、Ｓｏｘ１５、およびＳｏｘ１８もまた、効率の減少を伴うがｉＰＳ細胞を生成させる。

【０１０９】

胚性幹細胞では、Ｎａｎｏｇは、Ｏｃｔ４およびＳｏｘ２と共に多能性の促進に必要である。したがって、Ｎａｎｏｇは誘導に不要であると山中らが報告した際、因子の１つとしてＮａｎｏｇを用いてｉＰＳ細胞を生成可能であるとＴｈｏｍｓｏｎらが報告したことは、驚くべきことであった。

【０１１０】

Ｌｉｎ２８は、分化および増殖に関与する胚性幹細胞および胚性癌細胞で発現されるｍＲＮＡ結合タンパク質である。それはｉＰＳ生成の因子であるが不要であることを、Ｔｈｏｍｓｏｎらが実証した。

【０１１１】

ＫｌｆファミリーのＫｌｆ４は、Ｙａｍａｎａｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７で最初に同定され、Ｊａｅｎｉｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８でマウスｉＰＳ細胞の生成の因子として確認され、そしてＹａｍａｎａｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７でヒトｉＰＳ細胞の生成の因子として実証された。しかしながら、Ｋｌｆ４はヒトｉＰＳ細胞の生成に不要であり実際にヒトｉＰＳ細胞を生成できないと、トンプソンらが報告した。Ｋｌｆ２およびＫｌｆ４は、ｉＰＳ細胞を生成可能な因子であり、関連遺伝子Ｋｌｆ１およびＫｌｆ５も同様であったが、効率の低下を伴うことが判明した。

【０１１２】

Ｍｙｃ遺伝子ファミリーは癌に関与する癌原遺伝子である。ｃ－ＭｙｃはマウスｉＰＳ細胞の生成に関与する因子であることが、Ｙａｍａｎａｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７およびＪａｅｎｉｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８で実証され、かつそれはヒトｉＰＳ細胞の生成に関与する因子であることが、Ｙａｍａｎａｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７で実証された。しかしながら、ｃ－ＭｙｃはヒトｉＰＳ細胞の生成に不要であると、Ｔｈｏｍｓｏｎらおよび山中らが報告した。ＳＶ４０ラージ抗原は、ｃ－Ｍｙｃが発現されたときに生じうる細胞傷害性を低減または予防するために使用しうる。

【０１１３】

本開示で使用されるリプログラミングタンパク質は、ほぼ同一のリプログラミング機能を有するタンパク質ホモログで置き換えることが可能である。そうしたホモログをコードする核酸は、リプログラミングに使用可能である。保存的アミノ酸置換は、たとえば、極性酸性アミノ酸としてアスパラギン酸－グルタミン酸、極性塩基性アミノ酸としてリシン／アルギニン／ヒスチジン、非極性または疎水性のアミノ酸としてロイシン／イソロイシン／メチオニン／バリン／アラニン／グリシン／プロリン、極性または非荷電親水性のアミノ酸としてセリン／トレオニンを含みうる。保存的アミノ酸置換はまた、側鎖に基づくグループ化も含む。たとえば、脂肪族側鎖を有する一群のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有する一群のアミノ酸は、セリンおよびトレオニンであり、アミド含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有する一群のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり、塩基性側鎖を有する一群のアミノ酸は、リシン、アルギニン、およびヒスチジンであり、そして硫黄含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、システインおよびメチオニンである。たとえば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、アスパラギン酸をグルタミン酸で、トレオニンをセリンで置き換え

たり、またはアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸で同様に置き換えたりしても、得られるポリペプチドの性質に大きな影響を及ぼさないと予想することは理にかなっている。アミノ酸の変更が機能性ポリペプチドをもたらすかは、ポリペプチドの比活性をアッセイすることにより容易に決定可能である。

【０１１４】

Ｄ．血液細胞のリプログラミング

いくつかの実施形態では、出発血液細胞集団は、米国特許出願公開第２０１４／０３１５３０４号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の方法によりｉＰＳＣにリプログラムされる。本開示のある特定の態様では、リプログラミング因子は、組込みベクターやエピソームベクターなどの１つ以上のベクターに含まれる発現カセットから発現される。さらなる態様では、リプログラミングタンパク質は、タンパク質トランスダクションにより体細胞に直接導入しうる。

【０１１５】

当業者であれば、標準的組換え技術によりベクターを構築すべく十分な設備が整えられるであろう（たとえば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１およびＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６（両方とも参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。ベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（たとえば、ＹＡＣ）、たとえば、レトロウイルスベクター（たとえば、モロニーネズミ白血病ウイルスベクター（ＭｏＭＬＶ）、ＭＳＣＶ、ＳＦＦＶ、ＭＰＳＶ、ＳＮＶなどに由来する）、レンチウイルスベクター（たとえば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ＢＩＶ、ＦＩＶなどに由来する）、アデノウイルス（Ａｄ）ベクター（複製コンピテント、複製欠損、およびガットレスの形態を含む）、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、シミアンウイルス４０（ＳＶ－４０）ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ハーベイネズミ肉腫ウイルスベクター、ネズミ乳房腫瘍ウイルスベクター、ラウス肉腫ウイルスベクターが挙げられる。

【０１１６】

１．ウイルスベクター

本開示のある特定の態様では、ウイルスベクターを提供しうる。組換えウイルスベクターを生成する場合、非本質的遺伝子は、典型的には、異種（または非天然）タンパク質に対する遺伝子またはコード配列で置き換えられる。ウイルスベクターは、核酸および可能であればタンパク質を細胞に導入するためにウイルス配列を利用する類の発現構築物である。細胞に感染してレセプター媒介エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、そして宿主細胞ゲノムに組み込まれて安定かつ効率的にウイルス遺伝子を発現する能力を有するある特定のウイルスは、細胞（たとえば哺乳動物細胞）に外来核酸を移入するための魅力的候補になっている。本開示のある特定の態様の核酸を送達するために使用しうるウイルスベクターの例は、限定されるものではないが以下に記載される。

【０１１７】

レトロウイルスは、遺伝子を宿主ゲノムに組み込んだり、多量の外来遺伝物質を移入したり、広範にわたる種および細胞型に感染したり、特別な細胞系にパッケージしたりできるので、遺伝子送達ベクターとして将来性がある（Ｍｉｌｌｅｒ，１９９２）。

【０１１８】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸をウイルス配列の代わりウイルスゲノムに挿入して複製欠損のウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ遺伝子を含有する（ただし、ＬＴＲやパッケージング成分を有していない）パッケージング細胞系を構築する（Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８３）。レトロウイルスＬＴＲおよびパッケージング配列と共にｃＤＮＡを含有する組換えプラスミドが特別な細胞系に導入されると（たとえば、リン酸カルシウム沈殿により）、パッケージング配列により組換えプラスミドのＲＮＡ転写物がウイルス粒子にパッケージング可能になり、

次いで、培養培地に分泌される（Ｎｉｃｏｌａｓ ａｎｄ Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，１９８８、Ｔｅｍｉｎ，１９８６、Ｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３）。次いで、組換えレトロウイルスを含有する培地は、捕集され、任意選択的に濃縮され、そして遺伝子移入に使用される。レトロウイルスベクターは、広範にわたるさまざまな細胞型に感染可能である。しかしながら、組込みおよび安定発現は、宿主細胞の分裂を必要とする（Ｐａｓｋｉｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９７５）。

【０１１９】

レンチウイルスは、共通のレトロウイルス遺伝子ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖに加えてレギュラトリー機能または構造機能を有する他の遺伝子を含有する複雑なレトロウイルスである。レンチウイルスベクターは当技術分野で周知である（たとえば、Ｎａｌｄｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９６、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９９７、Ｂｌｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９７、米国特許第６，０１３，５１６号明細書、および同第５，９９４，１３６号明細書を参照されたい）。

【０１２０】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染可能であり、ｉｎ ｖｉｖｏおよびｅｘ ｖｉｖｏの両方で遺伝子移入および核酸配列発現に使用可能である。たとえば、非分裂細胞に感染可能な組換えレンチウイルス（この場合、好適な宿主細胞は、パッケージング機能を有する２つ以上のベクター、すなわち、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ、さらにはｒｅｖおよびｔａｔと共にトランスフェクトされる）は、米国特許第５，９９４，１３６号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１２１】

２．エピソームベクター

本開示のある特定の態様では、プラスミドベースまたはリポソームベースの染色体外（すなわちエピソーム）ベクターの使用も提供しうる。かかるエピソームベクターは、たとえば、ｏｒｉＰベースのベクターおよび／またはＥＢＮＡ－１の誘導体をコードするベクターを含みうる。こうしたベクターを用いれば、ＤＮＡの大きな断片を細胞に導入して染色体外に維持したり、１回／細胞周期で複製したり、娘細胞に効率的に分割したり、免疫反応を実質的にまったく誘発しないようにしたりすることが可能になる。

【０１２２】

とくに、ｏｒｉＰベースの発現ベクターの複製に必要とされる唯一のウイルスタンパク質ＥＢＮＡ－１は、ＭＨＣクラスＩ分子上にその抗原を提示するのに必要とされる処理をバイパスする効率的機序を発達させているため、細胞免疫反応を誘発しない（Ｌｅｖｉｔｓｋａｙａ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。さらに、ＥＢＮＡ－１は、トランスに作用してクローン遺伝子の発現を増強し、いくつかの細胞系ではクローン遺伝子の発現を１００倍まで誘導しうる（Ｌａｎｇｌｅ－Ｒｏｕａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．，１９９８、Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。最後に、かかるｏｒｉＰベースの発現ベクターの製造は安価である。

【０１２３】

他の染色体外ベクターとしては、他のリンパ球向性ヘルペスウイルスベースのベクターが挙げられる。リンパ球向性ヘルペスウイルスは、リンパ芽球（たとえばヒトＢリンパ芽球）で複製されてその天然生活環の一部でプラスミドになるヘルペスウイルスである。単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）は「リンパ球向性」ヘルペスウイルスではない。例示的なリンパ球向性ヘルペスウイルスとしては、限定されるものではないが、ＥＢＶ（カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＫＳＨＶ））、リスザルヘルペスウイルス（ＨＳ）、およびマレック病ウイルス（ＭＤＶ）が挙げられる。酵母ＡＲＳ、アデノウイルス、ＳＶ４０、ＢＰＶなどのエピソームベースのベクターの他の供給源も企図される。

【０１２４】

当業者であれば、標準的組換え技術によりベクターを構築すべく十分な設備が整えられるであろう（たとえば、Ｍａｎｉａｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９８８およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９４（両方とも参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい

）。

【０１２５】

ベクターはまた、遺伝子送達および／もしくは遺伝子発現をさらにモジュレートするまたはさもなければ有益な性質を標的細胞に提供する他の成分または機能を含みうる。かかる他の成分としては、たとえば、細胞への結合または標的化に影響を及ぼす成分（細胞型または組織に特異的な結合を媒介する成分を含む）、細胞によるベクター核酸の取込みに影響を及ぼす成分、取込み後の細胞内のポリヌクレオチドの局在化に影響を及ぼす成分（核移行を媒介する作用剤など）、およびポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす成分が挙げられる。

【０１２６】

かかる成分はまた、取り込まれているかつベクターにより送達された核酸を発現している細胞の検出または選択に使用可能な検出可能マーカーおよび／または選択マーカーなどのマーカーを含みうる。かかる成分は、ベクターの天然の特徴として提供可能であるか（たとえば、結合および取込みを媒介する成分または機能を有するある特定のウイルスベクターの使用）、またはベクターは、かかる機能を提供するように改変可能である。多種多様なかかるベクターは当技術分野で公知であり、かつ一般に入手可能である。ベクターが宿主細胞に維持される場合、ベクターは、自律的構造として有糸分裂時に細胞によって安定に複製されるか、宿主細胞のゲノムに組み込まれるか、または宿主の細胞核もしくは細胞質を維持されるか、のいずれかが可能である。

【０１２７】

３．トランスポゾンベースの系

ある特定の態様では、プログラミング因子の送達にトランスポゾン－トランスポザーゼ系を使用可能である。たとえば、トランスポゾン－トランスポザーゼ系は、周知のＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅトランスポゾン－トランスポザーゼ系（後者の説明に関しては、たとえば、欧州特許第１５０７８６５号明細書を参照されたい）、またはＴＴＡＡ特異的トランスポゾンＰｉｇｇｙＢａｃ系でありうる。

【０１２８】

トランスポゾンとは、単一細胞のゲノム内のさまざまな位置に動き回ることが可能なＤＮＡ配列のことである（転位と呼ばれるプロセス）。プロセスでは、突然変異を引き起こしてゲノムのＤＮＡ量を変化させることが可能である。トランスポゾンはまた、以前はジャンピング遺伝子と呼ばれ、可動遺伝エレメントの例である。

【０１２９】

さまざまな可動遺伝エレメントが存在し、転位機序に基づいてグループ分けが可能である。クラスＩ可動遺伝エレメントまたはレトロトランスポゾンは、最初にＲＮＡに転写されることによりそれ自体をコピーし、次いで、逆転写酵素により逆転写されてＤＮＡに戻り、次いで、ゲノムの他の位置に挿入される。クラスＩＩ可動遺伝エレメントは、トランスポザーゼを用いて一方の位置から他方の位置に直接移動され、ゲノム内で「切り貼り」される。

【０１３０】

特定の実施形態では、本開示に提供される構築物（たとえば複系列構築物）では、ＰｉｇｇｙＢａｃ発現系が使用される。ＰｉｇｇｙＢａｃ（ＰＢ）ＤＮＡトランスポゾンは「切り貼り」機序を介して動員され、それにより、トランスポゾン自体によりコードされるトランスポザーゼ酵素（ＰＢトランスポザーゼ）は、トランスポゾンを切除してゲノム内の他の部位に再組込みする。ＰＢトランスポザーゼは、トランスポゾンにフランキングするＰＢ逆位末端リピート（ＩＴＲ）を特異的に認識し、この配列に結合してトランスポゾンの切除を触媒する。次いで、ＰＢは、比較的ランダムにゲノム全体を通じてＴＴＡＡ部位に組み込まれる。遺伝子トラップ突然変異を生成するために（またはトランスジェニック動物の生成に適合化される）、トランスポザーゼは、トランスに一方のプラスミドに供給され、トランスポザーゼの結合部位（ＩＴＲ）にフランキングする遺伝子トラップを含む組換えトランスポゾンであるドナートランスポゾンを含有するプラスミドと共に共トラ

ンスフェクトされる。トランスポザーゼは、プラスミドからのトランスポゾンの切除およびゲノム内への後続組込みを触媒するであろう。コード領域内への組込みは、遺伝子トラップ発現に必要なエレメントをキャプチャーするであろう。ＰＢは、いくつかの理想的性質、すなわち、（１）遺伝子内に優先的に挿入され（挿入の５０～６７％は遺伝子にヒットする）（２）局所ホッピングを示さず（広範にわたるゲノム範囲）（３）高レベルのトランスポザーゼが転位の減少をもたらす過剰産生阻止に対して感受性がなく４）Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙとは異なりドナー部位からクリーンに切除されて「フットプリント」を残さないという性質を有する。

【０１３１】

４．レギュラトリーエレメント

本開示に有用なリプログラミングベクターに含まれる発現カセットは、好ましくは、（５’→３’方向に）タンパク質コード配列に作動可能に結合された真核転写プロモーター、介在配列を含むスプライスシグナル、および転写終止／ポリアデニル化配列を含む。

【０１３２】

ａ．プロモーター／エンハンサー

本明細書に提供される発現構築物は、プログラミング遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含む。プロモーターは、一般に、ＲＮＡ合成の開始部位を位置決めするように機能する配列を含む。この最もよく知られている例はＴＡＴＡボックスであるが、ＴＡＴＡボックスを欠如しているいくつかのプロモーター、たとえば、哺乳動物末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターやＳＶ４０後期遺伝子のプロモーターなどでは、開始部位自体を覆う個別エレメントが開始場所を固定するのに役立つ。追加のプロモーターエレメントは、転写開始の頻度をレギュレートする。典型的には、これらは、開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターは、同様に開始部位の下流に機能エレメントを含有することが示されている。プロモーター「の制御下に」コード配列を配置するために、転写リーディングフレームの転写開始部位の５’末端は、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち３’側）に配置される。「上流の」プロモーターは、ＤＮＡの転写を刺激し、コードＲＮＡの発現を促進する。

【０１３３】

プロモーターエレメント間の間隔は、エレメントが反転されたりまたは互いに移動されたりしたときにプロモーター機能が保存されるようにフレキシブルであることが多い。ｔｋプロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は、活性が低下し始める位置から５０ｂｐ前まで増加させることが可能である。プロモーターに依存して、個々のエレメントは、協同的または独立的のいずれかで転写を活性化するように機能可能であると思われる。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用レギュラトリー配列を意味する「エンハンサー」と組み合わせて使用してもしなくてもよい。

【０１３４】

プロモーターは、コードセグメントおよび／またはエクソンの上流に位置する５’非コード配列を単離することにより取得しうる核酸配列に天然で関連付けられるものでありうる。かかるプロモーターは「内因性」といいうる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する核酸配列に天然で関連付けられるものでありうる。代替的に、組換えプロモーターまたは異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを位置決めすることにより、ある特定の利点が得られるであろう。それはその天然環境で核酸配列に通常は関連付けられないプロモーターを意味する。組換えエンハンサーまたは異種エンハンサーは、その天然環境で核酸配列に関連付けられないエンハンサーも通常は意味する。かかるプロモーターまたはエンハンサー、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他のウイルスまたは原核細胞または真核細胞から単離されるプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在しない」プロモーターまたはエンハンサー、すなわち、異なる転写レギュラトリー領域の異なるエレメントおよび／または発現を改変する突然変異を含有するものを含みうる。たとえば、組換えＤＮＡ構築に最も一般的に使用されるプロモーターとしては、β－ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトー

ス、およびトリプトファン（ｔｒｐ）のプロモーター系が挙げられる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、本明細書に開示される組成物との関連でＰＣＲ（商標）をはじめとする組換えクローニング技術および／または核酸増幅技術を用いて配列を産生しうる（米国特許第４，６８３，２０２号明細書および同第５，９２８，９０６号明細書（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内での配列の転写および／または発現を指令する制御配列も同様に利用可能であることが企図される。

【０１３５】

当然のことながら、発現のために選択されるオルガネラ、細胞型、組織、器官、または生物でＤＮＡ断片の発現を効果的に指令するプロモーターおよび／またはエンハンサーを利用することは重要であろう。タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組合せの使用については、分子生物学分野の当業者に一般に知られている（たとえば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．１９８９（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。利用されるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導的、および／または導入ＤＮＡ断片の高レベル発現を指令するのに適切な条件下で有用でありうる。たとえば、組換えタンパク質および／またはペプチドの大規模生産に有利でありうる。プロモーターは異種または内因性でありうる。

【０１３６】

そのほか、任意のプロモーター／エンハンサーの組合せ（たとえば、真核生物プロモーターデータベースＥＰＤＢに基づく）を用いて発現を駆動することが可能である。Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６細胞質発現系の使用は、他の可能な一実施形態である。送達複合体の一部または追加の遺伝子発現構築物のいずれかとして適切な細菌ポリメラーゼが提供される場合、真核細胞は、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持可能である。

【０１３７】

限定されるものではないがプロモーターの例としては、初期または後期ウイルスプロモーター、たとえば、ＳＶ４０初期または後期プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）初期プロモーター、真核細胞プロモーター、たとえば、βアクチンプロモーター（Ｎｇ，１９８９、Ｑｕｉｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）、ＧＡＤＰＨプロモーター（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８、Ｅｒｃｏｌａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８）、メタロチオネインプロモーター（Ｋａｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９、Ｒｉｃｈａｒｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４）など、ならびにコンカチネート反応エレメントプロモーター、たとえば、サイクリックＡＭＰ反応エレメントプロモーター（ｃｒｅ）、血清反応エレメントプロモーター（ｓｒｅ）、ホルボールエステルプロモーター（ＴＰＡ）、および最小ＴＡＴＡボックス近傍の反応エレメントプロモーター（ｔｒｅ）が挙げられる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列（たとえば、Ｇｅｎｂａｎｋ、受託番号Ｘ０５２４４、ヌクレオチド２８３～３４１に記載のヒト成長ホルモン最小プロモーター）またはマウス乳房腫瘍プロモーター（ＡＴＣＣ、カタログ番号ＡＴＣＣ４５００７から入手可能）を使用することも可能である。

【０１３８】

組織特異的トランスジーン発現は、とりわけ、プログラミングに由来する造血細胞および造血細胞の前駆体におけるレポーター遺伝子発現の場合、誘導された造血細胞および前駆体を同定する方法として望ましいであろう。特異性および活性の両方を向上させるために、シス作用レギュラトリーエレメントの使用が企図されてきた。たとえば、造血細胞特異的プロモーターを使用しうる。多くのかかる造血細胞特異的プロモーターは当技術分野で公知である。

【０１３９】

ある特定の態様では、本開示の方法はまた、エンハンサー配列、すなわち、配向にかかわらず、比較的長い距離（標的プロモーターから数キロ塩基まで離れた距離）でさえも、プロモーターの活性を向上させかつシスに作用する潜在能力を有する核酸配列に関する。しかしながら、エンハンサー機能はまた、所与のプロモーターにごく近接した状態でも機

能しうるので、必ずしもかかる長距離に制限されるとは限らない。
【０１４０】
多くの造血細胞プロモーターおよびエンハンサー配列が同定されており、本方法に有用でありうる。たとえば、米国特許第５，５５６，９５４号明細書、米国特許出願公開第２００２００５５１４４号明細書、米国特許出願公開第２００９０１４８４２５号明細書を参照されたい。
【０１４１】
ｂ．開始シグナルおよび結合発現
コード配列の効率的翻訳のために、本開示に提供される発現構築物で特異的開始シグナルも使用しうる。こうしたシグナルは、ＡＴＧ開始コドンまたは隣接配列を含む。ＡＴＧ開始コドンを含めて外因性翻訳制御シグナルを提供することが必要になることもある。当業者であれば、これを容易に決定して必要なシグナルを提供可能であろう。全インサートの翻訳を確保するために開始コドンが所望のコード配列のリーディングフレームに対して「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドン、は天然または合成のいずれかでありうる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを組み込むことにより向上させうる。
【０１４２】
ある特定の実施形態では、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）エレメントを用いて複遺伝子メッセージまたはポリシストロニックメッセージを生成する。ＩＲＥＳエレメントは、５’メチル化Ｃａｐ依存翻訳のリボソームスキャニングモデルをバイパスして内部部位で翻訳を開始することが可能である（Ｐｅｌｌｅｔｉｅｒ ａｎｄ Ｓｏｎｅｎｂｅｒｇ，１９８８）。ピコルナウイルスファミリーの２つのメンバー（ポリオウイルスおよび脳心筋炎ウイルス）に由来するＩＲＥＳエレメント（Ｐｅｌｌｅｔｉｅｒ ａｎｄ Ｓｏｎｅｎｂｅｒｇ，１９８８）、さらには哺乳動物メッセージに由来するＩＲＥＳ（Ｍａｃｅｊａｋ ａｎｄ Ｓａｒｎｏｗ，１９９１）が記載されている。ＩＲＥＳエレメントは、異種オープンリーディングフレームに結合可能である。ＩＲＥＳによりそれぞれ分離された複数のオープンリーディングフレームを一緒に転写してポリシストロニックメッセージを生成可能である。ＩＲＥＳエレメントにより各オープンリーディングフレームはリボソームにアクセスして効率的翻訳が可能である。単一のプロモーター／エンハンサーを用いて複数の遺伝子を効率的に発現させて単一のメッセージを転写することが可能である（米国特許第５，９２５，５６５号明細書および同第５，９３５，８１９号明細書（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。
【０１４３】
そのほか、ある特定の２Ａ配列エレメントを用いて本開示に提供される構築物でプログラミング遺伝子の結合発現または共発現を引き起こしうる。たとえば、切断配列を用いてオープンリーディングフレームを結合することにより遺伝子を共発現させて単一のシストロンを生成しうる。例示的な切断配列は、Ｆ２Ａ（口蹄疫ウイルス２Ａ）または「２Ａ様」配列（たとえば、トセア・アシグナ（Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａ）ウイルス２Ａ、Ｔ２Ａ）（Ｍｉｎｓｋａｉａ ａｎｄ Ｒｙａｎ，２０１３）である。特定の実施形態では、Ｆ２Ａ切断ペプチドを用いて複系列構築物で遺伝子の発現を結合する。
【０１４４】
ｃ．複製の起点
宿主細胞でベクターを増殖させるために、複製部位の１つ以上の起点（「ｏｒｉ」と称されることが多い）、たとえば、以上に記載のＥＢＶのｏｒｉＰまたはプログラミングで類似機能もしくは高機能を有する遺伝子工学操作ｏｒｉＰに対応する核酸配列（複製が開始される特定核酸配列）を含有しうる。代替的に、以上に記載の他の染色体外複製ウイルスまたは自律複製配列（ＡＲＳ）の複製起点を利用可能である。
【０１４５】
ｄ．選択およびスクリーニング可能マーカー
ある特定の実施形態では、発現ベクターにマーカーを組み込むことによりｉｎ ｖｉｔ

ｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで核酸構築物を含有する細胞を同定しうる。かかるマーカーは、同定可能な変化を細胞に付与して発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にするであろう。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする性質を付与するものである。ポジティブ選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、一方、ネガティブ選択マーカーは、その存在がその選択を防止するものである。ポジティブ選択マーカーの例は薬剤耐性マーカーである。

【０１４６】

通常、薬剤選択マーカーの組込みは、トランスフォーマントのクローニングおよび同定を支援する。たとえば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ＤＨＦＲ、ＧＰＴ、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。状態の具現化に基づいてトランスフォーマントの識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、比色分析に基づくＧＦＰなどのスクリーニング可能マーカーをはじめとする他のタイプのマーカーも企図される。代替的に、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ｔｋ）やクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）などのネガティブ選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素を利用しうる。当業者であればＦＡＣＳ分析と組み合わせて免疫学的マーカーを利用する方法も分かるであろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現可能である限り、使用されるマーカーは重要でないと考えられる。選択およびスクリーニング可能マーカーのさらなる例は、当業者には周知である。

【０１４７】

本開示により造血前駆細胞にプログラムされる多能性幹細胞にＤＮＡやＲＮＡなどの核酸を導入する場合、本明細書に記載されるようにまたは当業者に公知であるように、細胞のトランスフォーメーションに好適な任意の核酸送達方法を使用しうる。かかる方法は、限定されるものではないが、ＤＮＡの直接送達、たとえば、ｅｘ ｖｉｖｏトランスフェクションによるもの（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８９、Ｎａｂｅｌ ｅｔ ａｌ，１９８９）、マイクロインジェクション（Ｈａｒｌａｎｄ ａｎｄ Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，１９８５、米国特許第５，７８９，２１５号明細書（参照により本明細書に組み込まれる））を含めて注入によるもの（米国特許第５，９９４，６２４号明細書、同第５，９８１，２７４号明細書、同第５，９４５，１００号明細書、同第５，７８０，４４８号明細書、同第５，７３６，５２４号明細書、同第５，７０２，９３２号明細書、同第５，６５６，６１０号明細書、同第５，５８９，４６６号明細書、および同第５，５８０，８５９号明細書（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる））、電気穿孔によるもの（米国特許第５，３８４，２５３号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）、Ｔｕｒ－Ｋｓｐａ ｅｔ ａｌ．，１９８６、Ｐｏｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８４）、リン酸カルシウム沈殿によるもの（Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｅｂ，１９７３、Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｍａ，１９８７、Ｒｉｐｐｅ ｅｔ ａｌ．，１９９０）、ＤＥＡＥ－デキストランおよび続いてポリエチレングリコールを使用するもの（Ｇｏｐａｌ，１９８５）、直接超音波ローディングによるもの（Ｆｅｃｈｈｅｉｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７）、リポソーム媒介トランスフェクション（Ｎｉｃｏｌａｕ ａｎｄ Ｓｅｎｅ，１９８２、Ｆｒａｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９７９、Ｎｉｃｏｌａｕ ｅｔ ａｌ．，１９８７、Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８０、Ｋａｎｅｄａ ｅｔ ａｌ．，１９８９、Ｋａｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９９１）およびレセプター媒介トランスフェクション（Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８７、Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８８）によるもの、マイクロプロジェクタイルボンバードメントによるもの（ＰＣＴ国際公開第９４／０９６９９号パンフレットおよび同第９５／０６１２８号パンフレット、米国特許第５，６１０，０４２号明細書、同第５，３２２，７８３号明細書、同第５，５６３，０５５号明細書、同第５，５５０，３１８号明細書、同第５，５３８，８７７号明細書、および同第５，５３８，８８０号明細書（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる））、炭化ケイ素繊維を用いたアジテーションによるもの（Ｋａｅｐｐｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９０、米国特許第５，３０２，５２３号明細書、および同第５，４６４，７６５号明細書（それぞれ参照により本明細書に組

み込まれる））、アグロバクテリウム属（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）媒介トランスフォーメーションによるもの（米国特許第５，５９１，６１６号明細書および同第５，５６３，０５５号明細書（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる））、乾燥／阻止媒介ＤＮＡ取込みによるもの（Ｐｏｔｒｙｋｕｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５）、およびかかる方法の任意の組合せが挙げられる。こうした技術の適用により、オルガネラ、細胞、組織、または生物を安定的または一過的にトランスフォームしうる。

【０１４８】

ＩＩＩ．免疫細胞の産生

Ａ．ＨＰＣの産生

本開示のある特定の実施形態は、体細胞誘導ｉＰＳＣからＨＰＣへの分化に関する。体細胞誘導ｉＰＳＣは、米国特許第８，３７２，６４２号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような当技術分野で公知の方法によりＨＰＣに分化させることが可能である。たとえば、ＢＭＰ４とＶＥＧＦとＦｌｔ３リガンドとＩＬ－３とＧＭ－ＣＳＦとの組合せを用いて、造血分化を促進しうる。ある特定の実施形態では、第１の培地に細胞培養物を暴露して分化用のＰＳＣを調製し、逐次的にＢＭＰ４とＶＥＧＦとＦＧＦとを含む第２の培地に暴露し、続いてＦｌｔ３リガンドとＳＣＦとＴＰＯとＩＬ－３とＩＬ－６とを含む第３の培地で培養することにより、多能性細胞を造血前駆細胞および造血細胞に分化させることが可能である。第２の規定培地はまた、ヘパリンも含みうる。さらに、ＢＭＰ４とＶＥＧＦとを含有する培地にＦＧＦ－２（５０ｎｇ／ｍｌ）を組み込むことにより、多能性細胞から造血前駆細胞を生成させる効率を向上させることが可能である。そのほか、第１の規定培地にグリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤（たとえば、ＣＨＩＲ９９０２１、ＢＩＯ、およびＳＢ－２１６７６３）を組み込むことにより、ＨＰＣの産生をさらに向上させることが可能である。

【０１４９】

多能性細胞から造血前駆細胞への分化は、規定条件または未規定条件を用いて行いうる。一般的には、得られた細胞をヒト被験体に投与することが意図される実施形態では、規定条件が一般に好ましいことは分かるであろう。造血幹細胞は、規定条件下で多能性幹細胞に由来しうるとともに（たとえば、ＴｅＳＲ培地を用いて）、造血細胞は、多能性細胞に由来する胚様体から生成させうる。他の実施形態では、多能性細胞は、ＯＰ９細胞上またはマウス胚性線維芽細胞上で共培養してから分化させうる。

【０１５０】

多能性細胞は、分化プロセスの一部として胚様体または凝集体を形成するようにしうる。分化を誘導するための「胚様体」（ＥＢ）または成長細胞クラスターの形成は、一般に、ヒト多能性幹細胞からＥＢへのｉｎ　ｖｉｔｒｏ凝集を含み、ヒト多能性幹細胞から内胚葉起源、外胚葉起源、および中胚葉起源を呈する複数の組織型への自発的ランダム分化を可能にする。そのため、三次元ＥＢを用いて造血細胞および内皮細胞のいくつかの画分を産生することが可能である。

【０１５１】

次のプロトコルを用いてＥＢを形成しうる。ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）被覆プレート上でのフィーダーフリー成長に適合化された未分化のｉＰＳＣは、室温で約８～１０分間の０．５Ｍ　ＥＤＴＡ処理を用いて集密状態で採取しうる。ＥＤＴＡは、インキュベーション後に吸引され、ＥＢは、ｒｏｃｋ阻害剤またはブレビスタチンを含有するＳＦＤ培地に細胞を採取することにより形成しうる。翌日、培地は、さまざまなサイトカイン配合物を含有するＥＢ１分化培地に変更しうる。細胞は、凝集体形成を促進するために２５万～５０万細胞／ｍｌの密度でプレーティングされる。

【０１５２】

凝集体形成を促進するために、細胞を低付着プレートに移して、７５％ＩＭＤＭ（Ｇｉｂｃｏ）と、０．０５％Ｎ２およびＢ－２７（ＲＡサプリメントなし）、２００ｍＭ　ｌ－グルタミン、０．０５ｍｇ／ｍｌアスコルビン酸－２－リン酸マグネシウム塩（Ａｓｃ２－Ｐ）（ＷＡＫＯ）、ならびに４．５×１０$^{-4}$　ＭＴＧが補充された２５％ハム改変Ｆ

１２（Ｃｅｌｌｇｒｏ）と、からなる血清フリー分化（ＳＦＤ）培地で一晩インキュベーションに付しうる。翌日、各ウェルから細胞を採取して遠心分離しうる。次いで、分化の最初の４日間で、約５０ｎｇ／ｍｌ骨形態形成因子（ＢＭＰ－４）、約５０ｎｇ／ｍｌ血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、および５０ｎｇ／ｍｌ　ｚｂ　ＦＧＦが補充されたＳＦＤ基本培地からなる「ＥＢ分化培地」に細胞を再懸濁させうる。細胞は、４８時間ごとに半分ずつ供給する。分化５日目、培地は、５０ｎｇ／ｍｌ幹細胞因子（ＳＣＦ）、約５０ｎｇ／ｍｌ　Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ－３Ｌ）、５０ｎｇ／ｍｌインターロイキン－６（ＩＬ－６）、５０ｎｇ／ｍｌインターロイキン－３（ＩＬ－３）、５０ｎｇ／ｍｌトロンボポイエチン（ＴＰＯ）が補充されたＳＦＤ培地で構成された第２の培地と交換する。細胞は、４８時間ごとに新鮮な分化培地と共に半分ずつ供給する。培地変更は、分化培養物を３００ｇで５分間遠心沈降させること、分化培養物から体積の半分を吸引すること、およびそれを新鮮培地で補充することにより実施される。ある特定の実施形態では、ＥＢ分化培地は、ＢＭＰ４（たとえば約５０ｎｇ／ｍｌ）、ＶＥＧＦ（たとえば約５０ｎｇ／ｍｌ）、および任意選択的にＦＧＦ－２（たとえば約２５～７５ｎｇ／ｍｌまたは約５０ｎｇ／ｍｌ）を含みうる。上清は、吸引して新鮮な分化培地と交換しうる。代替的に、細胞は、２日ごとに新鮮培地と共に半分ずつ供給しうる。細胞は、分化プロセス時の異なる時間点で採取しうる。

【０１５３】

造血前駆細胞は、規定培地を用いて多能性幹細胞から培養しうる。規定培地を用いて多能性細胞を造血ＣＤ３４$^{+}$幹細胞に分化させる方法は、米国特許出願第１２／７１５，１３６号明細書（権利放棄することなくその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。この方法は、本開示で使用しうると予想される。

【０１５４】

たとえば、規定培地を用いて造血ＣＤ３４＋分化を誘導しうる。規定培地は、成長因子ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、Ｆｌｔ３リガンド、ＩＬ－３、および／またはＧＭＣＳＦを含有しうる。多能性細胞は、ＢＭＰ４、ＶＥＧＦ、および任意選択的にＦＧＦ－２を含む第１の規定培地で培養してから（Ｆｌｔ３リガンド、ＩＬ－３、およびＧＭＣＳＦ）または（Ｆｌｔ３リガンド、ＩＬ－３、ＩＬ－６、およびＴＰＯ）のいずれかを含む第２の培地で培養しうる。第１および第２の培地はまた、ＳＣＦ、ＩＬ－６、Ｇ－ＣＳＦ、ＥＰＯ、ＦＧＦ－２、および／またはＴＰＯの１つ以上を含みうる。実質的に低酸素の条件（たとえば、２０％未満のO_2）は、造血分化または内皮分化をさらに促進しうる。

【０１５５】

細胞は、機械的または酵素的な手段により実質的に個別化しうる（たとえば、トリプシンまたはＴｒｙｐＬＥ（商標）を用いて）。また、ＲＯＣＫ阻害剤（たとえば、Ｈ１１５２またはＹ－２７６３２）も培地に含まれうる。これらの方法は、ロボット自動化などを用いて自動化しうると予想される。

【０１５６】

ある特定の実施形態では、実質的に低酸素の条件を用いて、多能性細胞から造血プロジェニター細胞への分化を促進する。当業者であれば分かるであろうが、約２０．８％未満の大気酸素含有量は、低酸素であるとみなされよう。培養下のヒト細胞は、周囲空気と比較して低減された酸素含有率を有する大気条件で成長させることが可能である。この相対的な低酸素は、培養培地に暴露される大気酸素を減少させることにより達成しうる。胚細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏでは、典型的には低酸素条件下で、一般的には周囲レベルの二酸化炭素を伴って約１％～約６％の大気酸素で発生する。理論により拘束されることを望むものではないが、低酸素条件は、ある特定の胚発生条件の態様をミミックしうると予想される。以下の例に示されるように、ある特定の実施形態では、低酸素条件は、ｉＰＳＣやｈＥＳＣなどの多能性細胞から造血前駆細胞などのより分化された細胞型へのさらなる分化を促進するために使用可能である。

【０１５７】

多能性細胞から造血プロジェニター細胞への分化を促進するために、次の低酸素条件を

使用しうる。ある特定の実施形態では、造血前駆細胞への分化を促進するために、約２０％未満、約１９％未満、約１８％未満、約１７％未満、約１６％未満、約１５％未満、約１４％未満、約１３％未満、約１２％未満、約１１％未満、約１０％未満、約９％未満、約８％未満、約７％未満、約６％未満、約５％未満、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％の大気酸素含有量を使用しうる。ある特定の実施形態では、低酸素大気は約５％の酸素ガスを含む。

【０１５８】

特定の培地がいずれの所与の造血プロジェニター細胞の拡大に使用されるかにかかわらず、使用される培地は、好ましくは約０．１ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ ｍＬ、より一般的には１０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬの濃度の少なくとも１つのサイトカインが追加される。好適なサイトカインとしては、限定されるものではないが、ｃ－ｋｉｔリガンド（ＫＬ）（ｓｔｅｅｌ因子（ＳｔＩ）、肥満細胞成長因子（ＭＧＦ）、および幹細胞因子（ＳＣＦ）とも呼ばれる）、ＩＬ－６、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１α、ＩＬ－１１、ＭＩＰ－１α、ＬＩＦ、ｃ－ｍｐｌリガンド／ＴＰＯ、およびｆｌｋ２／ｆｌｋ３リガンド（Ｆｌｔ２ＬまたはＦｌｔ３Ｌ）が挙げられる（Ｎｉｃｏｌａ ｅｔ ａｌ．，１９７９、Ｇｏｌｄｅ ｅｔ ａｌ．，１９８０、Ｌｕｓｉｓ，１９８１、Ａｂｂｏｕｄ ｅｔ ａｌ．，１９８１、Ｏｋａｂｅ，１９８２、Ｆａｕｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１）。とくに、培養物は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＴＰＯの少なくとも１つを含むであろう。より特定的には、培養物は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＴＰＯを含むであろう。

【０１５９】

一実施形態では、サイトカインは、培地に含まれかつ培地灌流により補充される。代替的に、バイオリアクター系を使用する場合、サイトカインは、培地灌流を行うことなく個別の入口ポートを介して濃厚溶液として個別に添加しうる。灌流を用いることなくサイトカインを添加する場合、典型的には、約２～４日ごとに新鮮なサイトカインを添加しながらバイオリアクターの容積の１／１０～１／１００に等しい量の１０×～１００×溶液として添加されるであろう。さらに、灌流培地のサイトカインに加えて、新鮮な濃厚サイトカインを個別に添加することも可能である。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、ＨＰＣは、破壊されたメチルＣｐＧ結合タンパク質２（ＭｅＣＰ２）を呈し、ミエロイド分化またはリンフォイド分化を促進する条件下で培養される。いくつかの態様では、ＨＰＣは、メチル化ＤＮＡに本質的に結合しない非機能性ＭｅＣＰ２を発現する。ある特定の態様では、ＨＰＣは、ＭｅＣＰ２のＤＮＡ結合活性を発揮するのに十分なレベルでＭｅＣＰ２を発現しない。特定の態様では、ＭｅＣＰ２は、ＭｅＣＰ２遺伝子のトランケーションまたは突然変異により非機能性である。いくつかの態様では、破壊されたＭｅＣＰ２を呈するＨＰＣを得ることは、ＨＰＣとＭｅＣＰ２に対するｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、または低分子阻害剤とを接触させることを含む。

【０１６１】

（ｉ）例示的な３Ｄ分化方法

ＨＰＣへのＰＳＣ分化のための例示的な方法は、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地でＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）被覆プレート上やビトロネクチン被覆プレート上などのフィーダーフリー条件下に維持することを含む。凝集体は、ＦＧＦ２、ＶＥＧＦ、ブレビスタチン、およびＧＳＫ－３阻害剤の存在下、５０万～１００万細胞／ｍｌの密度で、とくに半集密集状態で、たとえば、＜８０％集密度で）、ＰＳＣから作製される。たとえば、細胞は、５０ｎｇ／ｍｌ ＦＧＦ２、５０ｎｇ／ｍｌ ＶＥＧＦ、２μＭ ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３阻害剤）、および１０μＭブレビスタチン（ミオシンＩＩ阻害剤）が補充されたＥｓｓｅｎｔｉａｌ３（Ｅ３）培地（たとえば、Ｅ８培地の８成分のうち３成分：ＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地、アスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、および亜セレン酸ナトリウムのみを含有する）で培養される。とくに、凝集体形成工程および後続工程は、持続アジテーション下、超低付着（ＵＬＡ）フラスコ内で２４時間培養時に行いうる。

【０１６２】
形成された細胞凝集体（すなわち、胚様体－ＥＢ）は、造血中胚葉誘導サイトカイン－２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４、５０ｍｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ、および５０ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ２が補充された、ＢＭＰ４、ＶＥＧＦ、およびＦＧＦ２を含む血清フリー分化培地（たとえば、５０％ＩＭＤＭ、５０％ハムＦ１２培地、１００μｇ／ｍｌポリビニルアルコール、１００μｇ／ｍｌ組換えヒト血清アルブミン、１×非必須アミノ酸サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１×化学的規定脂質サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１２５μＭアスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、０．２５μＭリノール酸、微量元素サプリメントＡ（０．３×）、Ｂ（０．２×）、およびＣ（０．１×）（Ｃｏｒｎｉｎｇ）、５ｍＭ塩化ナトリウム、１００μＭモノチオグリセロール、２０μＭエタノールアミン、１００ｎｇ／ｍｌヘパリン、および１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＧＦ１）にさらに移す。２日目に完全培地交換を行って培養をたとえば４日間継続する。

【０１６３】
造血ＣＤ３４＋プロジェニターの分化および拡大を支持するために、細胞凝集体は、造血支持サイトカイン、たとえば、５０ｎｇ／ｍｌ　ＳＣＦ、２０ｍｇ／ｍｌ　ＴＰＯ、１０ｎｇ／ｍｌ　ＦＬＴ３Ｌ、２０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－３、および２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４が補充された血清フリー分化培地（上記の通り）にさらに移される。２日目に完全培地交換を行って培養をたとえば４日間継続する。

【０１６４】
たとえば９日間の分化プロセスの後に培養物を採取する。たとえばＡｃｃｕｔａｓｅで分化細胞凝集体の消化を行って単一細胞懸濁物を得る。次いで、たとえばＭＡＣＳにより単離された単離ＣＤ３４＋細胞をＴ／ＮＫ分化培養物にプレーティングするか、または後で使用するために単離後１時間以内に凍結保存する。

【０１６５】
（ｉｉ）例示的な２Ｄ分化方法
代替的な例示的方法では、ＰＳＣはＨＰＣ産生用の２Ｄ分化プロトコルに付される。最初に、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）被覆上またはビトロネクチン被覆上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地でＰＳＣをたとえば５～１０継代にわたり低酸素条件に順化させる。ＰＳＣを個別化し、ブレビスタチン（たとえば１～１０μＭ、たとえば５μＭ）の存在下でアミン被覆プレート上に、たとえばＰｕｒｅＣｏａｔアミン被覆６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．）上にプレーティングする。ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦの存在下で細胞を培養する。たとえば、培地は、５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地でありうる。

【０１６６】
造血分化誘導は、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦの存在下で培養することにより１日目に開始される。たとえば、５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地で細胞を培養する。２日目に、培地を吸引し、新鮮なＥＢ１培地（たとえば、５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２

２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地）に細胞をさらに４８時間配置する。

【０１６７】

５～１０日目に、培地を吸引し、Ｆｌｔ－３リガンド、ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、ＴＰＯ、およびヘパリンを含む培地に細胞をさらに４８時間配置する。たとえば、ＥＢ２培地は、５０ｎｇ／ｍｌ　Ｆｌｔ－３リガンド、ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、およびＴＰＯ（各５０ｎｇ／ｍｌ）、ならびに５０００Ｕ／ｍｌヘパリンが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有する新鮮なＳＦＤ基本培地を含みうる。ＴｒｙｐＬＥを用いて分化７、８、９、１０日目に細胞を採取し、ＨＰＣマーカーおよびリンフォイドプロジェニターが存在するものを染色した。

【０１６８】

Ｂ．リンフォイド細胞分化

次いで、体細胞誘導ＰＳＣから分化させたＨＰＣを、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＴ／ＮＫ細胞をはじめとするリンフォイド系列細胞にさらに分化させることが可能である。いくつかの態様では、リンフォイド細胞への分化７～１２日目、たとえば８～１１日目に分化時のＨＰＣを単離する。この段階のＨＰＣは、ＣＤ３４およびＣＤ４３の発現による同定しうる。そのほか、リンフォイド潜在能力を有するＨＰＣは、ＣＤ１４４、ＤＬＬ４、ＣＤ７、およびＣＤ２３５を低レベルで発現可能であり、こうしたレベルが１１日目に低下することから、ＤＬＬ４の存在下でリンフォイド分化の方向に細胞をプライミングするためには、これらのマーカーのある特定の発現閾値レベルが必要であることが示唆される。

【０１６９】

いくつかの態様では、分化プロセスの７～１１日目、たとえば、７日目、８日目、９日目、１０日目、または１１日目に単離されたＨＰＣは、Ｔ細胞やＮＫ細胞などのリンフォイド細胞への分化が可能である。いくつかの態様では、リンフォイドプロジェニターの起源のタイミングは、ＨＰＣ分化時の血液内皮プロジェニターの低下およびエリスロイドプロジェニターの出現に一致する。特定の態様では、９日目のＨＰＣは、増加したＴ細胞生成効率を有しうる。リンフォイド分化可能なＨＰＣは、ある特定のマーカーの発現により単離および／または同定が可能である。たとえば、ＣＤ３４および／またはＣＤ４３の表面発現を有する細胞は、リンフォイド分化用として選択しうる。リンフォイドプロジェニターを検出するための追加のマーカーとしては、ＤＬＬ４、ＣＤ１４４、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ４３^{lo}、ＣＤ４５$^{lo/-}$、ＣＤ２３５、ＣＤ７、Ｆｌｋ－１、ＡＰＮＬＲが挙げられる。特定の態様では、ＣＤ３４／ＣＤ７、ＣＤ２３５／ＣＤ７、ＤＬＬ４／ＣＤ３４、ＤＬＬ４／ＣＤ３１、ＤＬＬ４／ＣＤ１４４、またはＣＤ３４／ＣＤ４３^{lo}の二重陽性集団の存在は、リンフォイドプロジェニターを同定するために使用される。ＨＰＣ上のＣＤ１４４発現をＣＤ３１、ＣＤ３４、およびＤＬＬ４と共に共染色する。ＨＰＣ上のＣＤ７発現をＣＤ２３５、ＣＤ３４、およびＣＤ４３と共に共染色する。そのため、ＣＤ１４４およびＣＤ７を共発現するＨＰＣは、血液内皮マーカーと共に膜結合ｎｏｔｃｈリガンド（ＤＬＬ４）を発現するリンフォイド潜在能力獲得前駆体を示し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで最終的造血系列を生成可能なリンフォイドプロジェニターの出現の表現型シグネチャーを形成する。特定の態様では、ＨＰＣは、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ１４４、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ６、ＣＤ３３５、Ｆｌｋ－１、およびＤＬＬ４を含む表面マーカーを

選別することにより、向上したリンフォイド潜在能力を有する細胞をさらに選別しうる。いくつかの態様では、ＨＰＣのＣＤ１１４／ＣＤ３４、ＣＤ１４４／ＣＤ４５、ＣＤ１４４／ＣＤ７、およびＣＤ１４４／ＣＤ３４／ＣＤ４５／ＣＤ７の陽性画分は、リンフォイド細胞に分化する。特定の態様では、ＨＰＣのＣＤ１４４／ＣＤ７陽性画分は、リンフォイド細胞に分化する。

【０１７０】

ＨＰＣは、リンフォイド分化のための規定フィーダーフリー条件で培養しうる。培養培地は、ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ、フィブロネクチン、ＲＧＤペプチドなどの１つ以上のマトリックス成分を含有しうる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、マトリックス成分は、胚性幹細胞の成長のための固体担体を提供しうる。ある特定の実施形態では、マトリックス成分は、培養表面に適用して培地に細胞を播種する前に培養培地に接触させうる。たとえば、細胞は、細胞を集塊に機械的に分離してまたは細胞を個別化して造血前駆細胞への分化を誘導する前に、フィブロネクチンまたはＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）で被覆されたプレート上の規定培地（たとえばＴｅＳＲ培地）で培養しうる。

【０１７１】

多能性細胞を培養するために、コラーゲン（たとえばコラーゲンＩＶ）、ラミニン、ビトロネクチン、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）、ゼラチン、ポリリシン、トロンボスポンジン（たとえば、ＴＳＰ－１、－２、－３、および／または－４　－５）、および／またはＰｒｏＮｅｃｔｉｎ－Ｆ（商標）をはじめとする各種マトリックス成分を使用しうる。ある特定の実施形態では、細胞生存能に悪影響を及ぼす可能性があることから、事前にＴｅＳＲを用いて培養された細胞と共にＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）、コラーゲンＩＶ、またはラミニンのみを使用することは回避しうるが、それにもかかわらず、これらの組成物は、他のマトリックス成分と組み合わせて有利に使用しうる。これらのマトリックス成分の組合せは、細胞成長および細胞生存能を向上させる追加の利点を提供しうる。ある特定の実施形態では、細胞を培養するために、造血分化の前などに１、２、３、４、５、６、またはそれ以上のマトリックス成分を使用しうる。

【０１７２】

リンフォイド分化のための例示的なフィーダーフリーマトリックスは、実施例４に開示される。特定の態様では、ＨＰＣのリンフォイド分化に使用するために、非組織培養処理プレートをＤＬＬ４：Ｆｃキメラタンパク質およびＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ（フィブロネクチン断片ＣＨ－２９６、日本国の宝酒造株式会社）で被覆しうる。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、リンフォイド分化を向上させるためにアスコルビン酸を使用しうる。規定培地は、約１０μＭ～約１ｍＭ、たとえば約５０μＭ～約１００μＭ、たとえば約９５μＭアスコルビン酸が補充されうる。アスコルビン酸は、アスコルビン酸リン酸マグネシウムなどのさまざまなものアスコルビン酸塩から選択しうる。いくつかの実施形態では、リンフォイド分化を増強するために、たとえば、約０．１ｍＭ～約５ｍＭの濃度でニコチンアミド（たとえばニコチン酸）を使用しうる。

【０１７４】

いくつかの態様では、被験体においてＮｏｔｃｈリガンドの産生を増加させる物質を投与してＮｏｔｃｈリガンドの内因性活性を改変することによりＨＰＣをＴ細胞などのリンフォイド細胞に分化させる。本方法はまた、培地で細胞を培養することを含む。この場合、培地は、有効量のｎｏｔｃｈリガンドと、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＳＣＦ、Ｆｌｔ－３、およびＩＬ－３からなる群から選択される１つ以上のサイトカインと、を含む。いくつかの特定の実施形態、培地は、ＩＬ－６をさらに含みうる。いくつかの実施形態では、ｎｏｔｃｈリガンドは、ＤＬＬ４：Ｆｃキメラなどのｄｅｌｔａ４　ｎｏｔｃｈリガンド（ＤＬＬ４）である。

【０１７５】

Ｔ細胞系列の細胞の分化および増殖を促進および維持するＮｏｔｃｈリガンドが選択される。Ｎｏｔｃｈリガンドは、ヒト起源でありうるか、または他の種、たとえば、齧歯動

物、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、霊長動物などの哺乳動物種に由来しうる。Ｎｏｔｃｈリガンドの特定例としては、ＤｅｌｔａファミリーがＤｅｌｔａファミリーとしては、Ｄｅｌｔａ－１（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ００３５２２、ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ））、Ｄｅｌｔａ－３（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ０８４５７６、ラタス・ノルベギカス（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ））、Ｄｅｌｔａ様１（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００５６１８およびＮＰ＿００５６０９（ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｘ８０９０３、Ｉ４８３２４、Ｍ．ムスクルス（Ｍ．ｍｕｓｃｕｌｕｓ））、Ｄｅｌｔａ様３（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０５３６６６、Ｎ＿４４６１１８、ラタス・ノルベギカス（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ））、Ｄｅｌｔａ－４（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ２７３４５４、ＢＡＢ１８５８０、ムス・ムスクルス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ２７９３０５、ＡＡＦ８１９１２、ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ））、およびＤｅｌｔａ様４（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｑ９ＮＲ６１、ＡＡＦ７６４２７、ＡＦ２５３４６８、ＮＭ＿０１９０７４、ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０１９４５４、ムス・ムスクルス（ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ））が挙げられる。Ｎｏｔｃｈリガンドは、市販されているか、または組換えＤＮＡ技術により産生してさまざまな度合いで精製可能である。

【０１７６】

本方法は、分化されたＮＫ細胞を産生するのに十分な継続時間にわたり以上に記載の培養物中にＨＰＣ細胞を維持する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、分化されたＮＫ細胞は、Ｔ細胞と共に培養物中で出現するが、ＮＫ細胞は、６週間後に増殖を停止しうる。一般に、ＮＫ細胞の数の増加および／またはその分化状態の決定は、当業者に公知の従来の方法を用いて評価される。たとえば、培養細胞は、抗ＣＤ５６抗体および抗ＣＤ３抗体で細胞を染色することによりＮＫ細胞の生成に関してフローサイトメトリーによりモニターしうる。ＣＤ５６$^{+}$／ＣＤ３$^{-}$の細胞は、分化されたＮＫ細胞の指標となるであろう。

【０１７７】

Ｃ．ミエロイド分化

体細胞誘導ＰＳＣから産生されたＨＰＣは、たとえば、ミエロイド分化培地を用いて、ミエロイド細胞に分化させうる。ミエロイド分化培地は、血清フリー培地または規定培地でありうる。また、培地は、ＳＣＦ、ＥＰＯ、ＴＰＯ、インスリン、デキサメタゾンもしくはヒドロコルチゾン、および／またはトランスフェリンを含有しうる。ミエロイド細胞は、樹状細胞、マクロファージ、好中球、単球、好塩基球、好中球、肥満細胞、および／または好酸球でありうる。特定の態様では、ミエロイド細胞は樹状細胞である。例示的なミエロイド分化培地および拡大培地は、たとえば、表４～６に記載されている。

【０１７８】

代表的な一方法では、ＨＰＣは、低付着プレート中でＳＦＥＭ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ヘパリン（たとえば１～１０Ｕ／ｍＬ、たとえば５Ｕ／ｍＬ、Ｓｉｇｍａ）、ＴＰＯ（たとえば５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１００ｎｇ／ｍＬ）、ヒト組換えＳＣＦ（たとえば５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１００ｎｇ／ｍＬ）、ＦＬＴ３Ｌ（たとえば５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－３（たとえば１～２０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１０ｎｇ／ｍＬ）、およびＩＬ－６（たとえば１～２０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１０ｎｇ／ｍＬ）を含有する培地に移される。約５～１５日後、たとえば８日後、ＧＭ－ＣＳＦ（たとえば２５～１５０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１００ｎｇ／ｍＬ）を含有するＳＦＥＭ培地でミエロイド細胞を拡大させる。最後に、ＳＦＥＭ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、Ｅｘｃｙｔｅ（たとえば０．１％～２％、たとえば１％）、ＧＭ－ＣＳＦ（２５～１５０ｎｇ／ｍＬ、たとえば１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－４（１０～３０ｎｇ／ｍＬ、たとえば２０ｎｇ／ｍＬ）、およびＴＮＦα（０．５～５ｎｇ／ｍＬ、たとえば２．５ｎｇ／ｍＬ）を含有する培地で細胞をさらに１～２週間培養して樹状細胞を産生する。樹状細胞は、ＣＤ２０９$^{+}$、ＣＤ１ａ$^{+}$、Ｈ

ＬＡ－ＤＲ$^{+}$、ＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ１４$^{+}$、ＣＤ８３$^{+}$、およびＣＤ８６$^{+}$からなる群から選択される１つ以上のマーカーの発現により特徴付け可能である。これらのマーカーは、主にミエロイドＤＣを染色し、形質細胞様ＤＣ（ＣＤ１２３$^{+}$）を染色しない。樹状細胞の古典的形態を確認するために、サイトスピンサンプルでライト染色を実施可能である。

【０１７９】

Ｄ．細胞培養

ある特定の実施形態では、ＨＰＣからミエロイド系列、またはリンフォイド系列への分化を促進するために、実質的に低酸素の条件を使用しうる。ある特定の実施形態では、造血前駆細胞への分化を促進するために、約２０％未満、約１９％未満、約１８％未満、約１７％未満、約１６％未満、約１５％未満、約１４％未満、約１３％未満、約１２％未満、約１１％未満、約１０％未満、約９％未満、約８％未満、約７％未満、約６％未満、約５％未満、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％の大気酸素含有量を使用しうる。ある特定の実施形態では、低酸素大気は約５％の酸素ガスを含む。

【０１８０】

本明細書に記載されるように、ＨＰＣかミエロイド系列、またはリンフォイド系列への分化を促進するために、１つ以上の規定培養培地を有利に使用しうる。とくに、血清やマウスフィーダー層などの動物産物を排除することにより、動物産物への細胞の暴露に関連付けられるリスクを低減可能であり、より安全にヒト被験体に投与できる細胞の生成を可能にしうる。伝統的な幹細胞培養生成は、幹細胞をさまざまな細胞型に分化させるために、血清産物およびマウスフィーダー層に依拠するので、これらの伝統的な手順では、分化を実施可能なスケール、増大する生物学的多様性および潜在的な汚染、有用性の証明を妨げるおそれのあるトランスレーショナル療法における著しく阻まれるＥＳ細胞の使用が制限されてきた。

【０１８１】

一般に、本開示の細胞は、細胞成長を持続可能な栄養素リッチ緩衝溶液である培養培地で培養される。本明細書に記載の方法に従って多能性幹細胞から造血前駆細胞および造血細胞の単離、拡大、および分化を行うのに好適な培養培地としては、限定されるものではないが、高グルコースダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＤＭＥＭ／Ｆ－１５、ＲＰＭＩ１６４０、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）、およびＯｐｔｉ－ＭＥＭ ＳＦＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｉｎｃ．）が挙げられる。既知組成培地は最少必須培地を含み、たとえば、ヒト血清アルブミン、ヒトＥｘＣｙｔｅリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須および非必須アミノ酸、ナトリウムピルベート、グルタミン、ならびにマイトジェンが補充されたイスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）（Ｇｉｂｃｏ）もまた好適である。本明細書で用いられる場合、マイトジェンとは、細胞分裂を刺激する作用剤を意味する。作用剤は、有糸分裂をトリガーする化学物質、通常は、細胞分裂を開始するように細胞に働きかけるなんらかの形態のタンパク質でありうる。一実施形態では、血清フリー培地、たとえば、米国特許出願第０８／４６４，５９９号明細書および国際公開第９６／３９４８７号パンフレットに記載のもの、ならびに米国特許第５，４８６，３５９号明細書に記載の「完全培地」は、本明細書に記載の方法での使用が企図される。いくつかの実施形態では、培養培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒト自己血清、ヒトＡＢ血清、またはヘパリン（２Ｕ／ｍｌ）補充血小板リッチ血漿が補充される。

【０１８２】

免疫細胞は、ミエロイド系列、またはリンフォイド系列への細胞の分化を促進するのに十分な程度に細胞内因子レベルを増加させた条件下の培地で多能性幹細胞または造血前駆細胞を培養することにより生成可能である。培地はまた、さまざまな種類の成長因子のような１つ以上の造血細胞分化剤および成熟剤を含有しうる。これらの作用剤は、より成熟した表現型にコミットするか－または好ましくは成熟細胞の生存を促進するか－またはこれらの作用の両方を兼備するかのいずれかになるように細胞を誘導するのを支援しうる。分化剤および成熟剤は、造血細胞系列の細胞の成長を促進可能な可溶性成長因子（ペプチ

ドホルモン、サイトカイン、リガンド－レセプター複合体、および他の化合物）を含みうる。限定されるものではないが、かかる作用剤の例としては、造血成長因子または内皮成長因子、たとえば、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）、ＦＬＴ－３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、インターロイキン－３（ＩＬ－３）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－９（ＩＬ－９）、もしくは果粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、またはそれらのアイソフォームもしく変異体が挙げられる。

【０１８３】

ＩＶ．免疫細胞の使用

ある特定の態様の方法および組成物より提供される免疫細胞は、さまざまな用途に使用可能である。こうしたものとしては、わずかではあるが、ｉｎ ｖｉｖｏでの細胞の移植または植込み、細胞傷害性化合物、発癌性物質、突然変異原成長／レギュラトリー因子、医薬化合物などのｉｎ ｖｉｔｒｏスクリーニング、血液疾患および傷害の機序の解明、薬剤および／または成長因子が奏功する機序の研究、患者における癌の診断およびモニター、遺伝子療法、ならびに生物学的活性産物の産生が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０１８４】

Ａ．試験化合物のスクリーニング

本開示の免疫細胞は、本明細書に提供されるリンフォイド細胞の特性に影響を及ぼす因子（たとえば、溶媒、低分子薬剤、ペプチド、およびポリヌクレオチド）または環境条件（たとえば、培養条件または操作）をスクリーニングするために使用可能である。

【０１８５】

本開示の特定のスクリーニング用途は、薬剤研究における医薬化合物の試験に関する。読者は、一般的には、標準的教科書Ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９９７、および米国特許第５，０３０，０１５号明細書を参照されたい。ある特定の態様では、ミエロイド細胞およびリンフォイド細胞は、これまで短期培養で造血細胞および前駆体に対して実施されてきた標準的な薬剤スクリーニングおよび毒性アッセイに供される試験細胞の役割を果たす。候補医薬化合物の活性の評価は、一般的には、ある特定の態様に提供される造血細胞または前駆体を候補化合物と組み合わせること、化合物に帰属可能な細胞の形態、マーカー表現型、または代謝活性の変化を決定すること（未処置細胞または不活性化合物で処理された細胞と比較して）、次いで、化合物の作用を観測された変化と相関付けることを含む。スクリーニングは、化合物が造血細胞または前駆体に対して薬理学的作用を有するように設計されるので、または他の箇所で作用を有するように設計された化合物が造血細胞または前駆体に対して予期せぬ副作用を有することもありうるので、行われうる。可能性のある薬剤間相互作用を検出するために、２種以上の薬剤を組み合わせて（同時にまたは逐次的に細胞と組み合わせることにより）試験することが可能である。

【０１８６】

Ｂ．造血細胞療法

本開示はまた、血液疾患もしくは障害または傷害が原因でかかる療法を必要とする被験体においてある程度の機能を回復するための、本明細書に提供される免疫細胞の使用を提供する。たとえば、本明細書に開示される方法により誘導される免疫細胞は、異常ヘモグロビン症、貧血などの血液疾患および障害を治療するために使用しうる。かかる細胞は、化学療法などの細胞抑制療法により引き起こされる造血細胞欠損の治療に有用でありうる。

【０１８７】

治療用途の本明細書に提供される細胞の好適性を決定するために、最初に好適な動物モデルで細胞を試験することが可能である。あるレベルにおいて、ｉｎ ｖｉｖｏで生存するかつその表現型を維持する能力に関して細胞を評価する。本明細書に提供される細胞は、免疫不全動物（たとえば、ＮＯＧマウスまたは化学的にもしくは照射により免疫不全を起こした動物）のさらなる観察に適した部位、たとえば、腎被膜下、脾臓中、肝小葉中、

または骨髄中に投与される。組織は、数日後～数週間後またはそれよりも後に採取され、赤血球などの出発細胞型が依然として存在するかを評価する。これは、検出可能な標識（たとえば、緑色蛍光タンパク質またはβ－ガラクトシダーゼ）を用いてまたは投与されたヒト細胞に特異的な構成マーカーを測定することにより、実施可能である。本明細書に提供される細胞を齧歯動物モデルで試験する場合、投与された細胞の存在および表現型は、ヒト特異的抗体を用いて免疫組織化学もしくはＥＬＩＳＡにより、またはヒトポリヌクレオチド配列に特異的な増幅を引き起こすプライマーおよびハイブリダイゼーション条件を用いてＲＴ－ＰＣＲ分析により、評価可能である。ｍＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルで遺伝子発現を評価するのに好適なマーカーは、本開示の他の場所に提供される。

【０１８８】

本開示の方法により提供される免疫細胞は、血液障害および傷害を治療するそれらの能力に関して各種動物モデルで試験しうる。たとえば、鎌状赤血球貧血マウスモデルまたはＴ／Ｂ細胞欠損Ｒａｇ－２ノックアウトマウスは、本明細書に開示されるミエロイド細胞、およびリンフォイドの細胞を試験するのにとくに有用な動物モデルでありうる

【０１８９】

動物モデルで望ましい機能特性または有効性を実証する本開示のある特定の態様に提供される免疫細胞は、また、それを必要とするヒト被験体への直接投与に好適でありうる。止血の目的では、細胞は、循環系を適正に利用できる任意の部位に投与可能である。造血細胞またはその前駆体はまた、傷害または疾患の部位に送達しうる。

【０１９０】

本開示のある特定の態様に提供される細胞は、それを必要とするいずれの被験体の治療にも使用可能である。かかる治療に適切でありうるヒト病態としては、各種貧血および異常ヘモグロビン症さらには造血細胞の数の減少により特徴付けられる疾患（たとえば、骨髄異形成症候群、骨髄線維症、好中球減少症、顆粒球減少症、グランツマン血小板無力症、血小板減少症、後天性免疫不全症候群など）が挙げられる。ヒト治療では、用量は、一般的には約10^9～10^{12}細胞、典型的には約5×10^9～5×10^{10}細胞であり、被験体の体重、罹患の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能に合わせて調整される。治療モードおよび適切な用量を決定する最終的な責任は、担当臨床医にある。

【０１９１】

Ｃ．商業、治療、および研究の目的での配布

製造、配布、および使用の目的では、本開示の免疫細胞は、典型的には、輸送または貯蔵を容易にするために任意選択的に凍結されて等張賦形剤中または培養培地中の細胞培養物または懸濁物の形態で供給される。

【０１９２】

本開示はまた、製造時、配布時、または使用時の任意の時点で存在する細胞のセットまたは組合せを含めてさまざまな試薬系を提供する。細胞セットは、本開示に記載の２つ以上の細胞集団の任意の組合せ、たとえば、限定されるものではないが、未分化幹細胞、体細胞誘導造血細胞、または他の分化細胞型と組み合わされたプログラミング誘導細胞（造血系列細胞、その前駆体およびサブタイプ）が挙げられる。セット中の細胞集団は、同一のゲノムまたはその遺伝子改変形態を共有することもある。セット中の各細胞型は、全部まとめてまたは個別の容器に入れて、同一の施設または異なる場所で、同一または異なる時間で、同一のエンティティーまたは取引関係を共有する異なるエンティティーの制御下でパッケージ化しうる。

【実施例】

【０１９３】

Ｖ．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれている。以下の実施例に開示される技術は、本発明者により発見された技術が、本発明の実施で十分に機能することを示しており、したがって、その好ましい実施形態を構成するとみなしうることを、当業者であれば認識すべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らし

て、開示されている特定の実施形態に多くの変更を加えうることかつそれにより本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同一もしくは類似の結果が得られることは分かるはずである。

【０１９４】

実施例１－Ｔ細胞由来ＰＳＣ（ＴｉＰＳＣ）の産生

ｉＰＳ細胞を産生するために、血液サンプルからＴ細胞を単離し、ｉＰＳＣへのレトロウイルス的リプログラミング前に活性化させた。最初に、新たに調製したＡＩＭ－Ｖ培地＋ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ／グルタミン（ＡＩＶ－Ｖ／ｐｓ／ｓ／ｇ培地）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）＋３００ＩＵ／ｍｌ　ｒｈＩＬ２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）および１０ｎｇ／ｍｌ可溶性抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３クローン、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）および抗ＣＤ２８抗体中で末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を拡大させた。活性化の数日後、ＣＥＤＥＸ細胞数により指数成長を検証した。培養下３日後、Ｔ細胞表現型に関して細胞をアッセイし、次いで、リプログラミング因子を用いてトランスデュースした。

【０１９５】

すでに記載されているようにレトロウイルスベクターＮａｎｏｇ　ＲＦＰ、Ｌｉｎ２８ＲＦＰ、Ｏｃｔ４　ｅＧＦＰ、およびＳｏｘ２　ｅＧＦＰを構築した（米国特許出願第６１／０８８，０５４号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。同様に、レトロウイルスベクターｃ－Ｍｙｃ　ＲＦＰ、Ｋｌｆ４　ＲＦＰ、Ｏｃｔ４　ｅＧＦＰ、およびＳｏｘ２　ｅＧＦＰを構築した。

【０１９６】

２％ヒトＡＢ血清および１０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－２を含有するＡＩＭ－Ｖ培地を含むＴ細胞培地でＣＤ３およびＣＤ２８活性化末梢単核細胞を培養した。６日目に、ＡｍａｘａＵ－０１４プログラム（１～５×１０^{6}細胞／トランスフェクション、Ａｍａｘａ　Ｔ細胞トランスフェクション溶液）を用いて電気穿孔により６つのリプログラミング因子をＴ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後２５日目まで、６ウェルプレートのレトロネクチン（０．３μｇ／ｃｍ^{2}）被覆ウェル上およびビトロネクチン（０．２μｇ／ｃｍ^{2}）被覆ウェル上において１トランスフェクション／ウェルで細胞を培養し、１４日目から始めてＴ細胞培地からＥ８　ＰＳＣ培地に徐々に移行した。

【０１９７】

活性化されて拡大するＴ細胞は、特徴的細胞形態およびクラスタリング挙動を呈した。初期トランスダクションの７２時間後、ＧＦＰおよびＲＦＰ発現によりレトロウイルストランスダクション効率の検出を判定し、約３週間にわたりトランスジーンをサイレンシングしたところ、ｈＥＳ細胞表現型を呈する。明確なｉＰＳ細胞コロニーは２３日目に出現し始めた。蛍光顕微鏡法によりＧＦＰおよびＲＦＰサイレンシングを検証し、ピペットチップを用いて解剖フード内でコロニーを採取した。次いで、コロニー片を新鮮な６ウェルプレートに移した。コロニー数をカウントし、投入プレーティング細胞数を考慮してリプログラミング効率を推定した。この時点からクローンコロニーに毎日補給し、手動でもう１回継代させた後、拡大させてＴｉＰＳＣを産生した。

【０１９８】

実施例２－造血前駆細胞（ＨＰＣ）へのＴｉＰＳＣ分化

実施例１のＴｉＰＳＣを含めて各種のエピソーム的およびウイルス的にリプログラムされたｉＰＳＣ（表１）をＨＰＣ産生用の３Ｄ分化プロトコルに付した（図１）。最初に、Ｍａｔｒｉｇｅｌ被覆（商標）またはビトロネクチン被覆の超低付着（ＵＬＡ）プレート上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地でｉＰＳＣを５～１０継代にわたり低酸素条件に順化させた。凝集体は、５μＭブレビスタチンが補充された血清フリー規定（ＳＦＤ）培地の存在下で２５万～５０万細胞／ｍｌの密度の半集密ｉＰＳＣから作製した。プロセスは、超低付着（ＵＬＡ）プレートまたはスピンナーフラスコにおいて７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋Ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８

）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０$^{-4}$Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地で実施された。

【０１９９】

ＥＢが形成されたら、最初の４日間にわたりＳＦＤ基本培地に５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびＦＧＦ２を補充することにより分化を開始した。ＥＢの分化の５日目に、それぞれ５０ｎｇ／ｍｌのＦｌｔ－３リガンド、ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、ＴＰＯ、および５０００ユニットのヘパリンの存在下に培養物を配置した。ＥＢ培養物は、分化１２～１６日目まで低酸素条件下で分化プロセス時に２日ごとにサイトカインを含有する新鮮な分化培地を体積の半分ずつ補充した。分化プロセス後に細胞を採取し、フローサイトメトリーにより表現型を評価し、ＣＦＵアッセイを用いて機能能力を評価した。細胞を採取し、ＣＤ４３／ＣＤ３４細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより定量した（図１Ｂ）。プロセスの効率は、生成したＨＰＣの絶対数を投入ｉＰＳ細胞数で除算することにより計算した（図１Ｃ）。

【０２００】

【表１】

表 1: 複数の iPSC 系を用いたプロセス検証

細胞系	リプログラミング方法	リプログラミング用の原料	
01501.102	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性
TiPSCs1E	ウイルス的	T 細胞	雄性
1.025T	ウイルス的	T 細胞	雌性
2.022B	エピソーム的	LCL	雄性
2.0224B	エピソーム的	LCL	雌性
01279.107.3902	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性
01279.107.3908	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性
01279.107.3904	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性
01279	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性
01629	エピソーム的	血液プロジェニター細胞	雄性

【０２０１】

フローサイトメトリー分析では、細胞を採取し、培地で１回洗浄した。３７℃のインキュベーター内でＴｒｙｐＬＥ（商標）または０．５％トリプシンを用いて細胞ペレットを５～１０分間消化し、続いて、培地で洗浄し、７０μｍ細胞ストレーナーに通した。ＦＡＣＳ緩衝液を含有するＰＢＳ－ＦＢＳ中に細胞を再懸濁させ、カウントして細胞生存能を推定し、そして蛍光色素コンジュゲートモノクローナル抗体：抗ヒトＣＤ４３（１Ｇ１０）、抗ヒトＣＤ３１（ＷＭ－５９）、抗ヒトＣＤ４１（ＨＩＰ８）、抗ヒトＣＤ４５（ＨＩ３０）、抗ヒトＣＤ３４（５８１、８Ｇ１２）（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、および抗ヒトＣＤ２３５で染色した。７－アミノアクチノマイシンＤ（７－ＡＡＤ、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて生存不能細胞を除外した。生細胞分析は、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（商標）またはＡｃｃｕｒｉフローサイトメーター、およびＣｅｌｌ Ｑｕｅｓｔソフトウェアを用いて実施した。

【０２０２】

クローン原性造血プロジェニターアッセイ（ＣＦＵアッセイ）では、ＴｒｙｐＬＥまた

は０．５％トリプシン／ＥＤＴＡを用いてＥＢを単一細胞懸濁物として分散した。生存細胞を定量し、プレーティングし（５０，０００～３００，０００細胞／ｍＬ）、そして幹細胞因子（ＳＣＦ）５０ｎｇ／ｍＬ、エリトロポイエチン（ＥＰＯ）３Ｕ／ｍＬ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）１０ｎｇ／ｍＬ、インターロイキン－３（ＩＬ－３）１０ｎｇ／ｍＬを含有するヒトメチルセルロース完全培地（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用いて加湿チャンバー内で造血ＣＦＣをアッセイした。１４日後、形態に従ってコロニーをスコア付けし、コロニー数／10^5細胞を定量した。

【０２０３】

実施例３－造血前駆細胞（ＨＰＣ）への改変ｉＰＳＣ分化

凝集体懸濁物（３Ｄ）培養を介して１Ｃ　Ｔ細胞由来ｉＰＳＣ（レトロウイルス的リプログラミングに由来するＴｉＰＳＣ）をＣＤ３４$^+$造血プロジェニターに分化させた。Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）被覆またはビトロネクチン被覆の６ウェルプレート上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地に１Ｃ細胞を維持した。５０ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ２、５０ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ、２μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３阻害剤）、および１０μＭブレビスタチン（ミオシンＩＩ阻害剤）が補充されたＥｓｓｅｎｔｉａｌ３（Ｅ３）培地（Ｅ８培地の８成分のうち３成分：ＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地、アスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、および亜セレン酸ナトリウムのみを含有する）で、５０万～１００万細胞／ｍｌの密度で半集密的１Ｃ細胞（＜８０％集密度）から凝集体を作製した。ロッカープラットフォーム上の持続アジテーション下のＵＬＡフラスコ内で１５ｒｐｍで２４時間培養時に凝集体形成を実施した（後続のすべての培養工程を含む）。

【０２０４】

形成された細胞凝集体（すなわち、胚様体－ＥＢ）は、造血中胚葉誘導サイトカイン－２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４、５０ｍｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ、および５０ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ２が補充された血清フリー分化培地（５０％ＩＭＤＭ、５０％ハムＦ１２培地、１００μｇ／ｍｌポリビニルアルコール、１００μｇ／ｍｌ組換えヒト血清アルブミン、１×非必須アミノ酸サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１×化学的規定脂質サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１２５μＭアスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、０．２５μＭリノール酸、微量元素サプリメントＡ（０．３×）、Ｂ（０．２×）、およびＣ（０．１×）（Ｃｏｒｎｉｎｇ）、５ｍＭ塩化ナトリウム、１００μＭモノチオグリセロール、２０μＭエタノールアミン、１００ｎｇ／ｍｌヘパリン、および１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＧＦ１）にさらに移す。２日目に完全培地交換を行って培養を４日間継続させた。

【０２０５】

造血ＣＤ３４＋プロジェニターの分化および拡大を支持するために、造血支持サイトカイン－５０ｎｇ／ｍｌ　ＳＣＦ、２０ｍｇ／ｍｌ　ＴＰＯ、１０ｎｇ／ｍｌ　ＦＬＴ３Ｌ、２０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－３、および２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４が補充された血清フリー分化培地（上記の通り）に細胞凝集体をさらに移した。２日目に完全培地交換を行って培養を４日間継続させた。

【０２０６】

分化プロセスの７～９日目に培養物を採取した。３７℃で分化細胞凝集体をＡｃｃｕｔａｓｅ（またはＡｃｃｕｍａｘ）溶液で１５～２０分間消化させることにより単一細胞懸濁物を得た。ＭＡＣＳ緩衝液（たとえば、５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡおよび1ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するＰＢＳ）で細胞を洗浄し、７０μＭ細胞ストレーナーに通して濾過し、そして４℃でダイレクトＣＤ３４常磁性マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）で３０分間標識した。製造業者（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の推奨に従って、ＭＳまたはＬＳ磁気カラム、適切な磁石、および標準的分離手順を用いて、ＣＤ３４$^+$細胞を単離した。単離されたＣＤ３４$^+$細胞をＴ／ＮＫ分化培養物にプレーティングするか、または後で使用するために単離後１時間以内に凍結保存した。

【０２０７】

実施例４－ＨＰＣのリンフォイド分化

実施例２および実施例３のＨＰＣのリンフォイド分化のパラメーターを決定するために、細胞系をＴおよびＮＫ細胞分化の培養条件に付した。最初に、いくつかの変数をＴ細胞分化に関して試験し、間質依存プロトコルで試験した。ＯＰ９骨髄間質細胞およびＭＳ５ネズミ骨髄間質細胞をはじめとする間質系で、異なる細胞系に由来する１２日目のＨＰＣをＴ細胞潜在能力に関して試験した。２０％ＦＢＳ、１０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦ、５ｎｇ／ｍＬ　Ｆｌｔ－３、および５ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－７を含むαＭＥＭ培地で細胞を培養した。培地の半分を週３回交換することにより細胞をリフレッシュさせた。Ｔ細胞の存在に関して細胞を分析したところ、細胞は、ミエロイド細胞を生成させる傾向を有しＣＤ３$^{+}$細胞の存在が検出できないことが示された。そのほか、間質共培養は、低酸素条件下で不十分な性能であった。

【０２０８】

【表２】

表2: リンフォイド分化用のマトリックスの選択。レトロネクチン−DLL4上にプレーティングされた細胞はプレT細胞の(CD5+/CD7+)細胞の存在を示した。

T細胞分化用のマトリックス	%CD5	%CD7	%CD5/CD7
レトロネクチン−DLL4	11%	40%	11%
テネイシン−DLL4	0.7%	5.2%	0.7%
ビトロネクチン−DLL4	0.6%	6%	0.6%

【０２０９】

【表３】

表3: 低酸素はT細胞分化に有利である。低酸素条件下で分化する細胞はT細胞およびNK細胞の存在を示した。

T細胞分化用のマトリックス	CD3	CD4	CD8	CD3/CD4	CD3/CD4	CD4/CD8	CD56+/CD3-(NK細胞)
低酸素	7%	11.4%	49%	2.6%	2%	5.6%	28%
常酸素	0.2	57%	4.7%	0	0	0	6%

【０２１０】

したがって、フィーダーフリーＴ細胞分化プロトコルを開発した。０．５μｇ／ｃｍ^{2}のレトロネクチンおよびＮｏｔｃｈ　ＤＬＬ４で被覆された未処理組織培養プレート上に約５，０００～約２５，０００の細胞／ｃｍ^{2}の細胞密度でＨＰＣをプレーティングした。１％Ｇｌｕｔａｍａｘ、１％ペニシリンストレプトマイシン、９５μＭアスコルビン酸（ＷＡＫＯ　ｌａｂｓ）、さらには５０ｎｇ／ｍＬＩＬ－７、ＳＣＦ、Ｆｌｔ－３、およびＴＰＯ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）が補充されたＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｓｅｒｕｍ－Ｆｒｅｅ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　ＩＩ（ＳＦＥＭ、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌ

ｏｇｉｅｓ）培地でＨＰＣを培養した。４８時間ごとに培地を補充し、２週間で細胞をスプリットして新しいリガンド被覆プレートに移した。そのほか、２週間と３週間との間で、細胞表面マーカーＣＤ５およびＣＤ７によりプレＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。４週間で、細胞表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、およびＣＤ８によりＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。６～８週間で、細胞表面マーカーＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ９４、およびＣＤ５６を用いてＴ細胞およびＮＫ細胞の存在に関して細胞を分析した。

【０２１１】

Ｔ細胞分化に及ぼす影響に関して試験したパラメーターの１つは、培養プレート上のマトリックスコーティングの選択であった。プレーティングの３週間後、Ｎｏｔｃｈ ＤＬＬ４と臍帯血細胞との各種マトリックスの組合せを用いて血清フリー条件下でプレＴ細胞の出現を分析することにより、比較を行った。その結果、レトロネクチンとＤＬＬ４との組合せは、ビトロネクチンまたはテネイシンを含む組合せよりも臍帯血細胞をプレＴ細胞に分化させるのにより有効であることが示された（表２）。

【０２１２】

驚くべきことに、低酸素条件はフィーダーフリーＴ細胞分化を向上させることが分かった。具体的には、低酸素は、常酸素条件下で分化された細胞と比較して、ＣＤ８が陽性の細胞のパーセントの増加およびＣＤ４が陽性の細胞のパーセントの減少をもたらすことが観測された（表３）。

【０２１３】

実施例２に記載のＨＰＣ分化の５日目、７日目、９日目、１１日目に各種細胞系を採取することにより、リンフォイド系列への血液細胞由来ｉＰＳＣの分化効率を分析した。ＨＰＣ細胞を解凍し、レトロネクチン被覆プレート上およびＤＬＬ４被覆プレート上にプレーティングした。２日ごとに細胞に新鮮培地を供給し、ＨＰＣ細胞解凍後の２週間でプレＴ細胞マーカー、４週間でＴ細胞マーカー、そして６週間でＴ細胞マーカーおよびＮＫ細胞マーカーに関して分析した。Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞の存在に関して、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ５６の表面発現を有する細胞（図３Ａ）、ＣＤ４５、ＣＤ７、ＣＤ５の表面発現を有する細胞（図３Ｂ）、およびＣＤ５６、ＣＤ８、ＣＤ３の表面発現を有する細胞（図３Ｃ）を染色した。ＴｉＰＳＣおよびエピソーム的にリプログラムされた３９０８細胞は、７～１１日目に向上したリンフォイド潜在能力を有することが観測された（図３Ａ）。

【０２１４】

表面マーカーを用いてリンフォイド分化の効率を向上させることができるかを決定するために、ＴｉＰＳＣ１Ｅ系およびエピソーム３９０２系の両方でＣＤ４３／ＣＤ３４、ＣＤ３４、ＤＬＬ４、ＣＤ３１／ＣＤ１４４、およびＣＤ２３５の分析を実施した（図４）。ＤＬＬ４の発現およびＣＤ２３５のレベルは分化１１日目に低下し、一方、分化日と共にＣＤ３４の発現は減少しＣＤ４３の発現は増加することが分かった。分化１１日目にリンフォイド細胞が不在であるので、このことから、これらのマーカーのある特定の発現閾値レベルは、ＤＬＬ４の存在下でリンフォイド分化に向かって細胞をプライミングするうえで本質的なものであることが示唆される。

【０２１５】

表面マーカーＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ１４４、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ６、ＣＤ３５、Ｆｌｋ－１、およびＤＬＬ４の磁気選別により、ＨＰＣ分化時のリンフォイドプロジェニターのさらなる分析を実施した。８日目に、ＨＰＣをＣＤ１１４／ＣＤ３４、ＣＤ１４４／ＣＤ４５、ＣＤ１４４／ＣＤ７、およびＣＤ１４４／ＣＤ３４／ＣＤ４５／ＣＤ７の陽性画分および陰性画分、さらには非選別対照に選別した（図５）。次いで、これらの画分をリンフォイド分化プロセスに付して、１６日目にＣＤ３＋細胞の存在に関して分析した（図６Ａ）。陽性画分はそれぞれ、陰性画分および非選別対照と比較して有意に向上したリンフォイド潜在能力を呈することが観測された。このことは、陽性画分の磁気選別に基づいてＴ細胞生成の富化倍率の増加によりさらに支持された（図６Ｂ）。陽性画分は、さらに２週間にわたり新鮮なＲｅｔ－ＤＬＬ４表面上にプレーティングした。

【０２１６】
４週間のリンフォイド分化で、８日目のＣＤ１４４$^{+}$／ＣＤ７$^{+}$およびＣＤ１４４＋／ＣＤ４５＋のＨＰＣは、図７ＡのＣＤ３陽性細胞のパーセントにより示されるように、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＴ細胞の生成を持続した。ＣＤ３細胞は、ＣＤ３３５陽性、ＣＤ１６１陽性、および不変Ｔ細胞レセプター（６Ｂ１１）陰性であった。そのため、後期状態の培養物は、出現するＮＫ／Ｔ細胞表現型を有する。そのほか、ＣＤ１４４$^{+}$／ＣＤ７$^{+}$ＨＰＣは、ＨＰＣ投入対Ｔ細胞産生の比により測定したとき、１６日目にＴ細胞の産生効率の増加を有することが示された。しかしながら、４週間の終りのプロセスの累積効率は、ＣＤ１４４／ＣＤ３４／Ｃｄ４５／ＣＤ７陽性画分が最も高いことが示された。
【０２１７】
さらなる研究では、機能に関してＴｉＰＳＣ由来Ｔ細胞をアッセイした。ＴｉＰＳＣ（１Ｃ）由来ＣＤ３４＋細胞から２週間のＴ／ＮＫ分化培養で生成させたＴ細胞をＴ細胞拡大培養（固定化抗ＣＤ３ｍＡｂ、ＩＬ２、およびＩＬ７）に移した。並行培養で末梢血Ｔ細胞を拡大させた。２週間の拡大の後にＴ細胞を採取し、洗浄し、カウントし、10^{6}／ｍｌ濃度に調整し、そして活性化サイトカイン産生（Ｔ細胞＋抗ＣＤ３）で固定化抗ＣＤ３ｍＡｂ上での培養で３６時間再刺激するかまたは自発的／構成サイトカイン産生（Ｔ細胞）で抗ＣＤ３ｍＡｂを用いることなく培養した。ＬＥＧＥＮＤｐｌｅｘフローサイトメトリーマルチプレックスサイトカインアッセイ（ＣＤ８／ＮＫパネル、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いて培養上清でサイトカインを測定した。相対サイトカインレベルは図２２のそれぞれのドットプロットに描かれる。同一の培養条件で２週間拡大させた末梢血Ｔ細胞およびＰＳＣ由来Ｔ細胞は両方とも、高レベルのＩＬ２、ＩＦＮγ、およびＴＮＦの産生により特徴付けられる顕しく類似した１型サイトカイン分泌プロファイルを生成した。拡大させたＴ細胞の細胞傷害性もまた、活性化グランザイムＢ分泌により示された。そのため、ＴｉＰＳＣ由来Ｔ細胞は、１型サイトカイン分泌プロファイルにより観測される初代Ｔ細胞に類似した機能を呈する。
【０２１８】
実施例５－ＨＰＣのミエロイド分化
比較的純粋なヒト樹状細胞集団（ＤＣ）を産生するために、実施例２および３のＣＤ３４$^{+}$ＨＰＣをミエロイド分化に付した。全プロセスにわたり低付着組織培養プレート上またはフラスコ上で細胞を培養した。５０ｎｇ／ｍＬ Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ３Ｌ）、５０ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（ＳＣＦ）、５０ｎｇ／ｍＬ Ｔｈｒｏｍｂｏｐｏｅｉｔｉｎ（ＴＰＯ）、５０ｎｇ／ｍＬインターロイキン－３（ＩＬ－３）、および５０ｎｇ／ｍＬインターロイキン－６（ＩＬ－６）を含有する血清フリー培地に０．５～１×10^{6}細胞／ｍＬの密度で細胞を再懸濁させた。
【０２１９】
ミエロイド分化を開始するために、ミエロイドプロジェニター培地（表４）に２５万～５０万細胞／ｍＬの密度で細胞を播種し、約２週間拡大させた。４日目および８日目に生存能およびＣＤ３４$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ４３$^{+}$の発現に関して細胞をモニターした。ＣＤ３４$^{+}$集団は減少が観測され、培養物内にＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ３１$^{+}$集団が出現した。この段階の培養物の表現型は主にＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ３１$^{+}$／ＣＤ３４^{Lo}であった。
【０２２０】

【表４】

表 4: ミエロイドプロジェニター培地

成分	製造業者	カタログ番号	濃度
血清フリー培地*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1%
Pen/Strep	Gibco	15140	1%
SCF	Peprotech	300-07	50 ng/mL
IL-6	Peprotech	200-06	50 ng/mL
TPO	Peprotech	300-18	50 ng/mL
IL-3	Peprotech	200-06	50 ng/mL
Flt-3L	Peprotech	300-19	50 ng/ml

* StemSpan™ SFEM (Stem Cell Technologies、カタログ番号 09650),
Stem Pro 34 (Invitrogen、カタログ番号 10639-011)、または
Stemline II (Sigma、カタログ番号 S0192)は、血清フリー培地として使用可能である。

【０２２１】

細胞がＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ３１$^{+}$／ＣＤ３４$^{-}$細胞表面マーカーに関して５０％超の発現を示したとき、細胞をミエロイド拡大培地（表５）に８日間配置した。１日おきに新鮮培地を細胞に供給した。８日間の終了時に、培養細胞は、８０～９０％のＣＤ４３$^{+}$／ＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ３１$^{+}$／ＣＤ３４$^{-}$を示すミエロイド細胞富化集団を有していた。このミエロイド拡大期の終了時に、細胞数、生存能、および純度を決定した。

【０２２２】

【表５】

表 5: ミエロイド拡大培地

成分	製造業者	カタログ番号	濃度
血清フリー培地*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1%
GM-CSF	Peprotech	300-03	100 ng/mL

* StemSpan™ SFEM (Stem Cell Technologies、カタログ番号 09650), Stem Pro 34 (Invitrogen、カタログ番号 10639-011)、または Stemline II (Sigma、カタログ番号 S0192)は、血清フリー培地として使用可能である。

【０２２３】

最後に、１６日間の培養の終了時に、培養物を樹状細胞富化培地（表６）に配置した。細胞密度を５０万～１００万細胞／ｍＬに維持し、回転工程を用いることなく４日ごとに細胞に新鮮培地を供給した。この分化段階では増殖はほとんど観測されなかった。その代わりに、細胞は低付着プレートへの固着およびサイズの増加が観測された。１週間の終了時に、サンプルを採取し、フローサイトメトリーによりＣＤ２０９$^{+}$、ＣＤ１ａ$^{+}$、ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$、ＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ１４$^{+}$、ＣＤ８３$^{+}$、およびＣＤ８６$^{+}$の存在に関して試験した（図９～１０）。これらのマーカーは、主にミエロイドＤＣを染色し、形質細胞様ＤＣ（ＣＤ１２３$^{+}$）を染色しない。細胞を樹状細胞富化培地に維持し、種々の時間点で分析して収率および純度を定量した。サイトスピンサンプルのライト染色を実施し、樹状細胞の古典的形態を確認した。

【０２２４】
【表６】

表 6: 樹状細胞富化培地

成分	製造業者	カタログ番号	濃度
血清フリー培地*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1%
GM-CSF	Peprotech	300-03	100 ng/mL
Excyte	Millipore	81-129-1	1%
IL-4	Peprotech	200-04	20 ng/mL
TNFα	Peprotech	300-01A	2.5 ng/mL

【０２２５】
実施例６－ＰＳＣ分化およびＴ細胞拡大の方法
ＣＤ３４＋リンフォイド造血プロジェニターへのＰＳＣ分化：凝集体懸濁物（３Ｄ）培養を介して１Ｃ　Ｔ細胞由来ｉＰＳＣ（レトロウイルス的リプログラミングに由来するＴｉＰＳＣ）をＣＤ３４＋造血プロジェニターに分化させた。Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）被覆またはビトロネクチン被覆の６ウェルプレート上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地に１Ｃ細胞を維持した。５０ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ２、５０ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ、２μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３阻害剤）、および１０μＭブレビスタチン（ミオシンＩＩ阻害剤）が補充されたＥｓｓｅｎｔｉａｌ３（Ｅ３）培地（Ｅ８培地の８成分のうち３成分：ＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地、アスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、および亜セレン酸ナトリウムのみを含有する）で、５０万～１００万細胞／ｍｌの密度で半集密的１Ｃ細胞（＜８０％集密度）から凝集体を作製した。ロッカープラットフォーム上の持続アジテーション下の超低付着（ＵＬＡ）フラスコ内で１５ｒｐｍで２４時間培養時に凝集体形成を実施した（後続のすべての培養工程を含む）。
【０２２６】
形成された細胞凝集体（胚様体－ＥＢ）は、造血中胚葉誘導サイトカイン－２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４、５０ｍｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ、および５０ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ２が補充された血清フリー分化培地（たとえば、５０％ＩＭＤＭ、５０％ハムＦ１２培地、１００μｇ／ｍｌポリビニルアルコール、１００μｇ／ｍｌ組換えヒト血清アルブミン、１×非必須アミノ酸サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１×化学的規定脂質サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１２５μＭアスコルビン酸２－リン酸マグネシウム、０．２５μＭリノール酸、微量元素サプリメントＡ（０．３×）、Ｂ（０．２×）、およびＣ（０．１×）（Ｃｏｒｎｉｎｇ）、５ｍＭ塩化ナトリウム、１００μＭモノチオグリセロール、２０μＭエタノールアミン、１００ｎｇ／ｍｌヘパリン、および１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＧＦ１）にさらに移す。２日目に完全培地交換を行って培養を４日間継続させた。
【０２２７】
造血ＣＤ３４＋プロジェニターの分化および拡大を支持するために、造血支持サイトカイン－５０ｎｇ／ｍｌ　ＳＣＦ、２０ｍｇ／ｍｌ　ＴＰＯ、１０ｎｇ／ｍｌ　ＦＬＴ３Ｌ、２０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－３、および２５ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ４が補充された血清フリー分化培地（上記の通り）に細胞凝集体をさらに移した。２日目に完全培地交換を行って培養を４日間継続させた。

【０２２８】
１＋４＋４（合計９日間）分化プロセス後に培養物を採取した。３７Ｃで分化細胞凝集体をＡｃｃｕｔａｓｅ（またはＡｃｃｕｍａｘ）溶液で１５～２０分間消化させることにより単一細胞懸濁物を得た。ＭＡＣＳ緩衝液（５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡおよび１ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するＰＢＳ）で細胞を洗浄し、７０μＭ細胞ストレーナーに通して濾過し、そして４ＣでダイレクトＣＤ３４常磁性マイクロビーズ（Ｍｙｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）で３０分間標識した。製造業者（Ｍｙｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の推奨に従って、ＭＳまたはＬＳ磁気カラム、適切な磁石、および標準的分離手順を用いて、ＣＤ３４＋細胞を単離した。単離されたＣＤ３４＋細胞をＴ／ＮＫ分化培養物にプレーティングするか、または後で使用するために単離後１時間以内に凍結保存した。

【０２２９】
Ｔ／ＮＫ分化培養：Ｔ／ＮＫ分化では、非組織培養処理プラスチックプレートをＰＢＳ中に希釈されたＮｏｔｃｈリガンドｈＤＬＬ４－Ｆｃキメラタンパク質およびレトロネクチンで被覆した（各０．５μｇ／ｃｍ^2）。細胞プレーティング前に、コーティング溶液を吸引し、プレートを細胞培養基本培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２または他のもの）で１回洗浄し、そしてＳｔｅｍＳｐａｎ　ＳＦＥＭ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＧｌｕｍａＭａｘ（１／１００）、ＰｅｎＳｔｒｅｐ（１／２００）、アスコルビン酸リン酸マグネシウム（２５０μＭ）、ニコチンアミド（２ｍＭ）、ならびにサイトカインＳＣＦ、ＴＰＯ、ＦＬＴ３Ｌ、およびＩＬ７（各５０ｎｇ／ｍｌ）からなる０．２５ｍｌ／ｃｍ^2　Ｔ細胞分化培地（ＴＣＤＭ）を充填した。単離されたＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞を５０００細胞／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングし、低酸素（５％O_2）ＣＯ２インキュベーター中で２週間培養し、３日目および６日目に新鮮なＴＣＤＭを培養体積で添加し、続いて３日ごとに培養体積の半分を交換した。穏やかに再懸濁させて非付着細胞を捕集することにより全分化細胞を採取し、続いてＰＢＳ－ＥＤＴＡ（０．５ｍＭ）で１０～１５分間処理することにより付着細胞を脱離させた。

【０２３０】
Ｔ細胞拡大培養：Ｔ細胞拡大では、組織培養プラスチックプレートをＰＢＳ（各０．５μｇ／ｃｍ^2）中に希釈された抗ＣＤ３ｍＡｂ（クローンＯＫＴ３）およびレトロネクチンで被覆した。細胞プレーティングの前に、コーティング溶液を吸引し、プレートを細胞培養基本培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２または他のもの）で２回洗浄し、そしてＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ　ＸＦ培地（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＧｌｕｍａＭａｘ（１／１００）、ＰｅｎＳｔｒｅｐ（１／２００）、ならびにサイトカインＩＬ２およびＩＬ７（各１０ｎｇ／ｍｌ）からなる０．２ｍｌ／ｃｍ^2　Ｔ細胞拡大培地（ＴＣＥＭ）を充填した。拡大を改善するために、ＩＬ１５および／またはＩＬ２１も添加しうる。Ｔ／ＮＫ分化培養物から採取された細胞を２００００細胞／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングし、低酸素（５％O_2）CO_2インキュベーター中で２週間培養し、３日目に新鮮なＴＣＥＭを培養体積で添加し、続いて３日ごとに培養体積の半分を交換した。穏やかに再懸濁させて非付着細胞を捕集することにより、拡大させたＴ細胞を採取した。

【０２３１】
実施例７－ＨＰＣ産生のための２Ｄプロトコル
ＨＰＣを産生するために、０１２７９．１０７．３９０２ＭｅＣＰ２ノックアウト細胞およびＴｉＰＳＣ１Ｅ細胞を２Ｄ分化プロトコルに付した（図１６）。最初に、Ｍａｔｒｉｇｅｌ被覆（商標）上またはビトロネクチン被覆上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地でｉＰＳＣを５～１０継代にわたり低酸素条件に順化させた。ｉＰＳＣを個別化し、５μＭブレビスタチンが補充された血清フリー規定（ＳＦＤ）培地の存在下でＰｕｒｅＣｏａｔアミン被覆６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．）上に２５０００／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングした。ＳＦＤ基本培地は、５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サ

プリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有していた。

【０２３２】

５０ｎｇ／ｍｌ ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地で培養することにより、造血分化の誘導を１日目に開始した。２日目に、培地を吸引し、新鮮なＥＢ１培地に細胞を配置した。（５０ｎｇ／ｍｌ ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地）でさらに４８時間。

【０２３３】

５～１０日目に、培地を吸引し、ＥＢ２培地に細胞をさらに４８時間配置した。ＥＢ２培地は、５０ｎｇ／ｍｌ Ｆｌｔ－３リガンド、ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、およびＴＰＯ（各５０ｎｇ／ｍｌ）、ならびに５０００Ｕ／ｍｌヘパリンが補充された、７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ＋ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、および４．５×１０－４Ｍモノチオグリセロールを含有する新鮮なＳＦＤ基本培地を含んでいた。ＴｒｙｐＬＥを用いて分化７、８、９、１０日目に細胞を採取し、ＨＰＣマーカーおよびリンフォイドプロジェニターが存在するものを染色した。

【０２３４】

Ｔ細胞分化では、０．５μｇ／ｃｍ^{2}のレトロネクチンおよびＮｏｔｃｈ ＤＬＬ４で被覆された未処理組織培養プレート上に約５，０００～約２５，０００細胞／ｃｍ^{2}の細胞密度でＨＰＣをプレーティングした。１％Ｇｌｕｔａｍａｘ、１％ペニシリンストレプトマイシン、９５μＭアスコルビン酸（ＷＡＫＯ ｌａｂｓ）、さらには５０ｎｇ／ｍＬＩＬ－７、ＳＣＦ、Ｆｌｔ－３、およびＴＰＯ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）が補充されたＳｔｅｍＳｐａｎ Ｓｅｒｕｍ－Ｆｒｅｅ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ ＩＩ（ＳＦＥＭ、ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）培地またはＳＦＤでＨＰＣを培養した。４８時間ごとに培地を補充し、２週間で細胞を非酵素的にスプリットして新しいリガンド被覆プレートに移した。そのほか、２週間と３週間との間で、細胞表面マーカーＣＤ５およびＣＤ７によりプレＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。４週間で、細胞表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、およびＣＤ８によりＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。６～８週間で、細胞表面マーカーＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ９４、およびＣＤ５６を用いてＴ細胞およびＮＫ細胞の存在に関して細胞を分析した。

【０２３５】

実施例８－リンフォイド分化に及ぼすＭｅＣＰ２破壊の影響

造血分化プロセスにおけるＭｅＣＰ２の役割を決定するために、ＭｅＣＰ２ノックアウトｉＰＳＣ細胞系を生成させた。ＭｅＣＰ２をノックアウトするように雄性野生型（ＷＴ

）０１２７９ｉＰＳＣ細胞系を工学操作することにより、ＭｙＣｅｌｌ（登録商標）０１２７９．１０７．３９０２細胞系を作製した。ＴＡＬヌクレアーゼを用いてＭｅＣＰ２ＴＡＬＥＮおよび停止コドン挿入を含有するドナープラスミドのトランスフェクションによりＭｅＣＰ２のメチルＣｐＧ結合ドメインの前に一連の停止コドンを挿入し（図１７Ｂ）、続いて、ＬｏｘＰをフランキングさせてＰＧＫｐ－ピューロマイシン－ＳＶ４０ｐＡを逆向きに挿入した。０．１２７９ｉＰＳＣは、ＭｅＣＰ２　ＴＡＬＥＮおよび野生型ＥＢＮＡ１を発現するドナープラスミドｐ１５５３でトランスフェクトした。

【０２３６】

挿入が陽性の細胞をピューロマイシン選択により選択し、次いで、コロニーを採取し、組込みＰＣＲによりスクリーニングした。スクリーニングされたコロニーのうち、９６％は２つのＰＣＲスクリーニング反応で挿入が陽性であった。１４クローンを拡大し、３継代でスクリーニングしたところ、８クローンは骨格プラスミドの取込みに関して陰性であることが分かった。そのため、残りのクローンのうち３つをインサートを介してシーケンスしたところ、２つがポリクローナルであることが分かった。１つのモノクローナル系０．１２７９．１０７．３０２を選択し、さらなる研究で十分に特徴付けした。追加のクローンも取得し、適正に工学操作されたものとして特徴付けた。ＭｅＣＰ２変異体００１、００２、００５、および００８のアミノ酸アライメントは、図１７Ｃに描かれている。変異体００８は、メチルＣｐＧ結合ドメインをコードしていない。

【０２３７】

ＨＰＣを産生するために、実施例１の０１２７９．１０７．３９０２　ＭｅＣＰ２ノックアウト細胞およびＷＴ０１２７９細胞を３Ｄ分化プロトコルに付した（図１７Ａ）。最初に、Ｍａｔｒｉｇｅｌ被覆（商標）上またはビトロネクチン被覆上のフィーダーフリー条件下のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地でｉＰＳＣを５～１０継代にわたり低酸素条件に順化させた。凝集体は、５μＭブレビスタチンが補充された血清フリー規定（ＳＦＤ）培地の存在下で２５万～５０万細胞／ｍｌの密度の半集密ｉＰＳＣから作製した。プロセスは、超低付着（ＵＬＡ）プレートまたはスピンナーフラスコにおいて７５％ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２２００－０６９）（グルタミンおよび２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋Ｐ／Ｓを含む）、２５％ハムＦ１２（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ１０－０８０－ＣＶ）、０．５％Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１７５０２－０４８）、１％Ｂ２７サプリメント（レチノイン酸を含まない）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２５８７－０１０）、０．０５％ＢＳＡ、５０μｇ／ｍｌアスコルビン酸、ＧｌｕｔａＭＡＸ、Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ、および４．５の×10^{-4}Ｍモノチオグリセロールを含有するＳＦＤ基本培地で実施された。

【０２３８】

ＥＢが形成されたら、最初の４日間にわたりＳＦＤ基本培地に５０ｎｇ／ｍｌ　ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦを補充することにより分化を開始した。５日目に、それぞれ５０ｎｇ／ｍｌのＦｌｔ－３リガンド、ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、ヘパリン、およびＴＰＯの存在下にＥＢ培養物を配置した。ＥＢ培養物は、分化１２～１６日目まで低酸素条件下で分化プロセス時に２日ごとにサイトカインを含有する新鮮な分化培地を体積の半分ずつ補充した。

【０２３９】

リンフォイド分化では、０．５μｇ／ｃｍ^{2}のレトロネクチンおよびＮｏｔｃｈ　ＤＬＬ４で被覆された未処理組織培養プレート上に約５，０００～約２５，０００細胞／ｃｍ^{2}の細胞密度でＨＰＣをプレーティングした。１％Ｇｌｕｔａｍａｘ、１％ペニシリンストレプトマイシン、９５μＭアスコルビン酸（ＷＡＫＯ　ｌａｂｓ）、さらには５０ｎｇ／ｍＬＩＬ－７、ＳＣＦ、Ｆｌｔ－３、およびＴＰＯ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）が補充されたＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｓｅｒｕｍ－Ｆｒｅｅ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　ＩＩ（ＳＦＥＭ、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）培地でＨＰＣを培養した。４８時間ごとに培地を補充し、２週間で細胞を非酵素的にスプリットして新しいリガンド被覆プレートに移した。そのほか、２週間と３週間との間で、細胞表面マーカーＣＤ５およ

びＣＤ７によりプレＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。４週間で、細胞表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、およびＣＤ８によりＴ細胞の存在に関して細胞を分析した。６～８週間で、細胞表面マーカーＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ９４、およびＣＤ５６を用いてＴ細胞およびＮＫ細胞の存在に関して細胞を分析した。

【０２４０】

ＨＰＣ分化の５日目、７日目、９日目、および１１日目に０１２７９．１０７．３９０２、０１２７９．１０７．３９０５、０１２７９．１０７．３９０６、０１２７９．１０７．３９０７、および０１２７９．１０７．３９０８のクローンを採取し、リンフォイド系列への分化のＭｅＣＰ２ノックアウトクローンの効率を分析した。以上に記載の時点で凍結保存されていたＨＰＣ細胞を解凍し、レトロネクチン被覆プレート上およびＤＬＬ４被覆プレート上にプレーティングした。２日ごとに細胞に新鮮培地を供給し、ＨＰＣ細胞解凍後の２週間でプレＴ細胞マーカー（図１８Ａ、１８Ｂ）、４週間でＴ細胞マーカーおよびＮＫ細胞マーカーに関して分析した。プレＴ細胞マーカーの分析では、野生型０１２７９．１０７．０９０４細胞以外の細胞はすべて、ＣＤ５$^{+}$ＣＤ７$^{+}$、ＣＤ７$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$、およびＣＤ５$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$として同定されるプレＴ細胞の存在を有していた。ＣＤ４５、ＣＤ７、およびＣＤ５（図１９）、ならびにＣＤ５６、ＣＤ８、およびＣＤ３（図２０）の表面発現を有する細胞を染色し、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫ／Ｔ細胞の存在を定量した。

【０２４１】

投入細胞数は分かったので、Ｔ（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$）、ＮＫ（ＣＤ３$^{-}$／ＣＤ５６$^{+}$）、およびＮＫ／Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ５６$^{+}$）の絶対数を決定した。プロセスの効率は、細胞型（Ｔ、ＮＫ、またはＮＫ／Ｔ）絶対数／全投入細胞数の比または細胞型絶対数／投入ＨＰＣ数の比により計算される。Ｔ細胞（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$）のパーセント（図１７）およびＮＫ細胞（ＣＤ３$^{-}$／ＣＤ５６$^{+}$）のパーセント（図２１）は、ＦＳＣ－ＳＳＣゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより定量した。出現するＮＫ／Ｔ（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ５６$^{+}$）、（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$）、ＮＫ／Ｔ（ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ５６$^{+}$）、およびＮＫ（ＣＤ３$^{-}$／ＣＤ５６$^{+}$）の細胞の量も決定した。さらなる分析を行ったところ、ＣＤ２３５／ＣＤ７、ＣＤ１４４$^{+}$／ＤＬＬ４$^{+}$、およびＦｌｋ１$^{+}$／ＣＤ３４$^{+}$の発現は、分化１１日目に低下することが示された。分化１１日目にリンフォイド細胞が不在であるので、このことから、これらのマーカーのある特定の発現閾値レベルは、ＤＬＬ４の存在下でリンフォイド分化に向かって細胞をプライミングするうえで本質的なものであることが示唆されうる。

【０２４２】

Ｔ細胞マーカーの分析から、ＭｅＣＰ２ＷＴ細胞系ではなくＭｅＣＰ２ＫＯ細胞系がリンフォイド分化の潜在能力を有することが示された。ＭｅＣＰ２ＷＴ細胞由来の９日目のＨＰＣプロジェニターはＣＤ３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を本質的に有していなかったが、試験した他のＨＰＣプロジェニターは、ＣＤ３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞集団に分化した。そのため、ＭｅＣＰ２のメチル結合ドメインのノックアウトは、Ｔ細胞およびＮＫ細胞を産生するＨＰＣプロジェニターの潜在能力を向上させた。

【０２４３】

実施例９－ＨＬＡスーパードナー細胞系の分化

以上で考察されるように、ドナー細胞がＨＬＡホモ接合である場合、すなわち、各抗原提示タンパク質に対して同一の対立遺伝子を含有する場合、ドナーとレシピエントとの間のＭＨＣ適合性は有意に増加する。ほとんどの個体は、ＭＨＣクラスＩおよびＩＩの遺伝子がヘテロ接合であるが、ある特定の個体は、こうした遺伝子がホモ接合である。こうしたホモ接合個体は、スーパードナーとして機能しうるとともに、その細胞から生成させた移植片は、ハプロタイプがホモ接合またはヘテロ接合のいずれの個体にもすべて移植可能である。

【０２４４】

したがって、ＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系のＴ／ＮＫ分化潜在能力が決定された。Ｐ

ＢＭＣからトランスジーンフリーエピソーム法を用いて誘導されたＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系Ｈ、Ｋ、Ｌ、およびＯのＴ／ＮＫ分化潜在能力を評価し、レトロウイルスによりリプログラムされた高Ｔ／ＮＫ産生１Ｃ　ＴｉＰＳＣ（たとえば、実施例１～４に記載のもの）と比較した。ＣＤ３４＋Ｔ／ＮＫリンフォイド造血プロジェニター細胞（ＨＰＣ）へのＰＳＣ分化の既定のプロトコルを用いて、４つのＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系のうち３つ（Ｈ、Ｋ、およびＯ）をＣＤ３４＋ＨＰＣに分化させたところ、１Ｃ　ＴｉＰＳＣに匹敵する効率であった（図２３Ａ）。ＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系に由来するＣＤ３４＋ＨＰＣのＴ／ＮＫ分化は、試験したすべてのＨＰＣで比較的高いＴ／ＮＫリンフォイド潜在能力を示したが（１投入ＣＤ３４＋ＨＰＣ当たり１００～２００Ｔ／ＮＫ）、主にＴ細胞を産生した１Ｃ　ＨＰＣとは対照的に、ＨＬＡスーパードナーＨＰＣはＴ細胞よりもＮＫ細胞を多く生成させた。しかしながら、こうした傾向にもかかわらず、試験した４つのＨＬＡスーパードナーＰＳＣ系の中で、比較的効率的なＴ細胞産生Ｈ系が同定された（＞３０Ｔ／ＨＰＣ）（図２３Ａ）。

【０２４５】

本明細書に開示および特許請求される方法はすべて、本開示に照らして過度の実験を行うことなく実行可能である。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関連して記載されてきたが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく本方法および本明細書に記載の方法の工程または工程の順序に変更を加えうることは、当業者にことは明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連するある特定の作用剤は、本明細書に記載の作用剤の代わりになりうるとともに、同一または類似の結果を達成するであろうことは明らかであろう。当業者に明らかなかかる類似の代替物および改変物はすべて、添付の特許請求の範囲により規定される本発明の趣旨、範囲、および概念に包含されるとみなされる。

【０２４６】

参照文献

以下の参照文献は、本明細書の記載内容を補足する例示的な手順または他の詳細事項を提供する範囲内で参照により本明細書に組み込まれる。

Ａｂｂｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，５８：１１４８－１１５４，１９８１．

Ａｋｋｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７０：２５８１－２５８５，１９９６．

Ａｌｅｘａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５：５０９２－５０９６，１９８８．

Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂｌ．Ａｓｓｏｃ．Ｉｎｃ．＆　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＭＡ，１９９６．

Ｂｉｓｗａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　ＮＹ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，５９０：５８２－５８３，１９９０．

Ｂｉｓｗａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，２９：２２２８－２２３３，１９９１．

Ｂｌｏｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７１（９）：６６４１－６６４９，１９９７．

Ｃｈｅｎ　ａｎｄ　Ｏｋａｙａｍａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，７（８）：２７４５－２７５２，１９８７．

Ｄｏｕｌａｔｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ．１０：１２０－３６，２０１２．

Ｅｒｃｏｌａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６３：１５３３５－１５３４１，１９８８．

Ｅｖａｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎ：　Ｃａｎｃｅｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｄｅｖｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔ－Ｒａｖｅｎ，ＮＹ，１０５４－１０８７，１９９７．

Ｆａｕｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ，１：７３－８０，１９８１

Fechheimer et al.，Proc Natl. Acad. Sci. USA，84：8463－8467，1987.
Fraley et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，76：3348－3352，1979.
Frisan et al.，Epstein－Barr Virus Protocols，Part III，125－127，2001
Furie and Furie，Cell 53： 505－518，1988.
Golde et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，77：593－596，1980.
Graham and Van Der Eb，Virology，52：456－467，1973.
Haddada et al.，in Current Topics in Microbiology and Immunology，1995.
国際公開第９４／０９６９９号パンフレット
国際公開第９５／０６１２８号パンフレット
国際公開第９６／３９４８７号パンフレット
Jaenisch，Science 240：1468－1474，1988.
Kaeppler et al.，Plant Cell Reports 9： 415－418，1990.
Karin et al. Cell，36：371－379，1989.
Kato et al，J. Biol. Chem.，266：3361－3364，1991.
Kim et al.，J. Virol.，66：3879－3882，1992.
Knust et al，EMBO J. 761－766，1987.
Ladi et al.，Nature Immunology，7： 338－343，2006.
Langle－Rouault et al.，J. Virol.，72（7）：6181－6185，1998.
Levitskaya et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，94（23）：12616－12621，1997.
Lusis，Blood，57：13－21，1981.
Macejak and Sarnow，Nature，353：90－94，1991.
Maniatis，et al.，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，N. Y.，1988.
Mann et al.，Cell，33：153－159，1983.
Minskaia and Ryan，2013
Nabel et al.，Science，244（4910）：1342－1344，1989.
Naldini et al.，Science，272（5259）：263－267，1996. Zufferey et al.，Nat. Biotechnol.，15（9）：871－875，1997. Ng，Nuc. Acid Res.，17：601－615，1989.
Nicola，et al.，Blood，54：614－627，1979.
Nicolas and Rubenstein，In： Vectors： A survey of molecular cloning vectors and their uses，Rodriguez and Denhardt，eds.，Stoneham： Butterworth，pp. 494－513，1988.
Nicolau and Sene，Biochim. Biophys. Acta，721：185－190，1982.

Ｎｉｃｏｌａｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１４９：１５７－１７６，１９８７．
Ｎｏｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２１８－２２１，２０１１．
Ｏｋａｂｅ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓ．，１１０：４３－４９，１９８２．
Ｐａｓｋｉｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，６７：２４２－２４８，１９７５．
欧州特許第１５０７８６５号明細書
Ｐｅｌｌｅｔｉｅｒ ａｎｄ Ｓｏｎｅｎｂｅｒｇ，Ｎａｔｕｒｅ，３３４（６１８０）：３２０－３２５，１９８８．
Ｐｏｔｒｙｋｕｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，１９９（２）：１６９－１７７，１９８５．
Ｐｏｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：７１６１－７１６５，１９８４．
Ｑｕｉｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：９５３９－９５４５，１９８９．
Ｒｉｃｈａｒｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，３７：２６３－２７２，１９８４．
Ｒｉｐｐｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１０：６８９－６９５，１９９０．
Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ，２００１．
Ｓｕｚｕｋｉ ｅｔ ａｌ，ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８９１－１８９７，１９８７．
Ｔｅｍｉｎ，Ｉｎ：Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ，Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ（Ｅｄ．），ＮＹ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，１４９－１８８，１９８６．
Ｔｕｒ－Ｋａｓｐａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，６：７１６－７１８，１９８６．
米国特許出願第１２／７１５，１３６号明細書
米国特許出願第０８／４６４，５９９号明細書
米国特許出願第６１／０８８，０５４号明細書
米国特許第４，６８３，２０２号明細書
米国特許第５，０３０，０１５号明細書
米国特許第５，３０２，５２３号明細書
米国特許第５，３２２，７８３号明細書
米国特許第５，３８４，２５３号明細書
米国特許第５，４６４，７６５号明細書
米国特許第５，４８６，３５９号明細書
米国特許第５，５３８，８７７号明細書
米国特許第５，５３８，８８０号明細書
米国特許第５，５５０，３１８号明細書
米国特許第５，５５６，９５４号明細書
米国特許第５，５６３，０５５号明細書
米国特許第５，５８０，８５９号明細書
米国特許第５，５８９，４６６号明細書
米国特許第５，５９１，６１６号明細書
米国特許第５，６１０，０４２号明細書
米国特許第５，６５６，６１０号明細書
米国特許第５，７０２，９３２号明細書
米国特許第５，７３６，５２４号明細書
米国特許第５，７８０，４４８号明細書
米国特許第５，７８９，２１５号明細書
米国特許第５，９２８，９０６号明細書

米国特許第５，９４５，１００号明細書
米国特許第５，９８１，２７４号明細書
米国特許第５，９９４，１３６号明細書
米国特許第５，９９４，６２４号明細書
米国特許第６，０１３，５１６号明細書
米国特許第８，３７２，６４２号明細書
米国特許出願公開第２００２００５５１４４号明細書
米国特許出願公開第２００９０１４８４２５号明細書
Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，９： ９１－１０５，２００９．
Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１３４４－１３４６，１９８９．
Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１０：８７－９４，１９８０．
Ｋａｎｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４３：３７５－３７８，１９８９．
Ｗｙｎｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６：１０６９－１０７０，２００５．
Ｙａｍａｎａｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１３１（５）：８６１－７２，２００７．

【図面】

【図１Ａ】

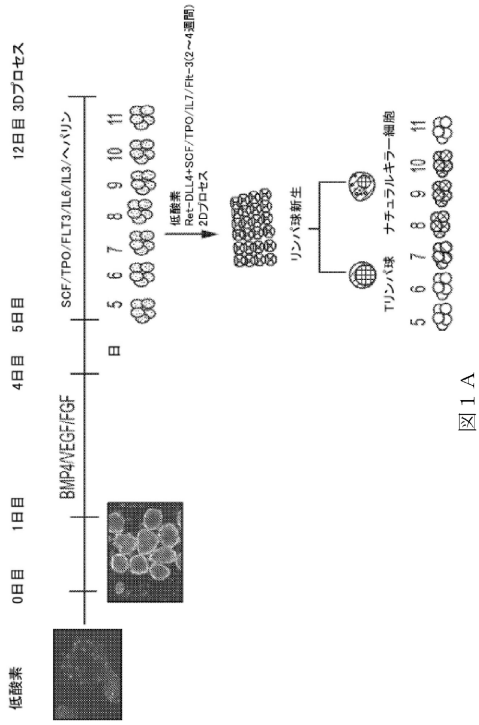


図１Ａ

【図１Ｂ】

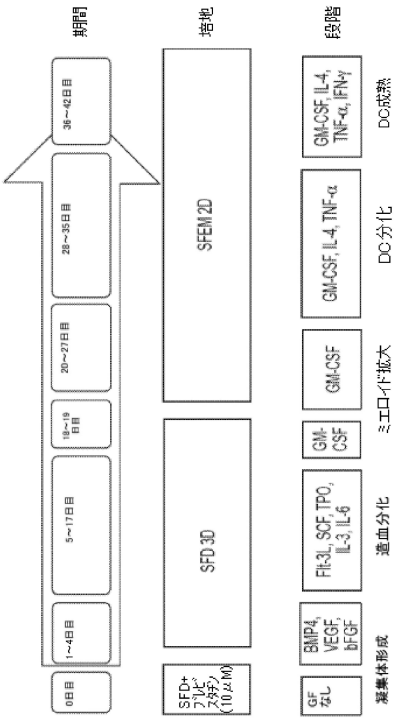


図１Ｂ

【図１Ｃ】

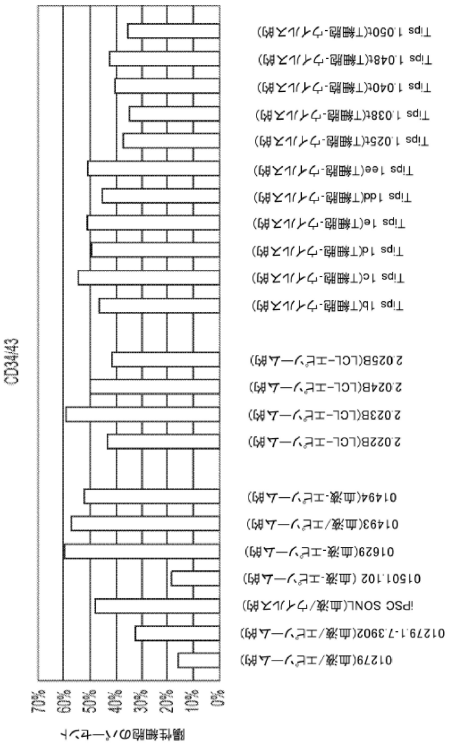


図１Ｃ

【図１Ｄ】

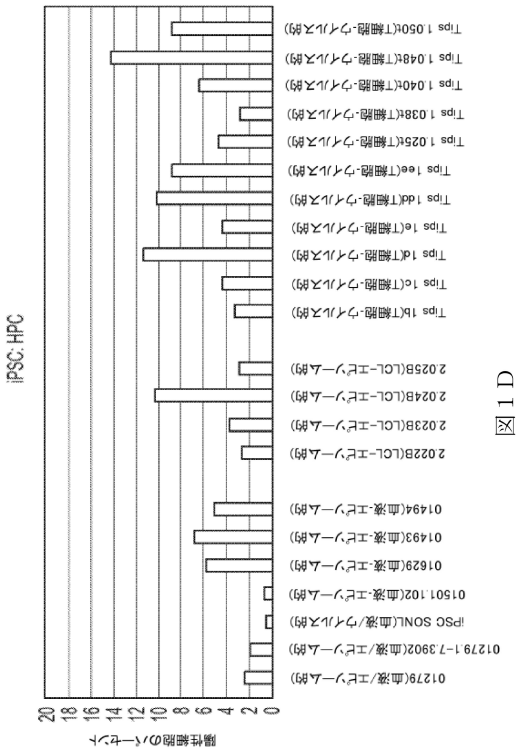


図１Ｄ

【図２】

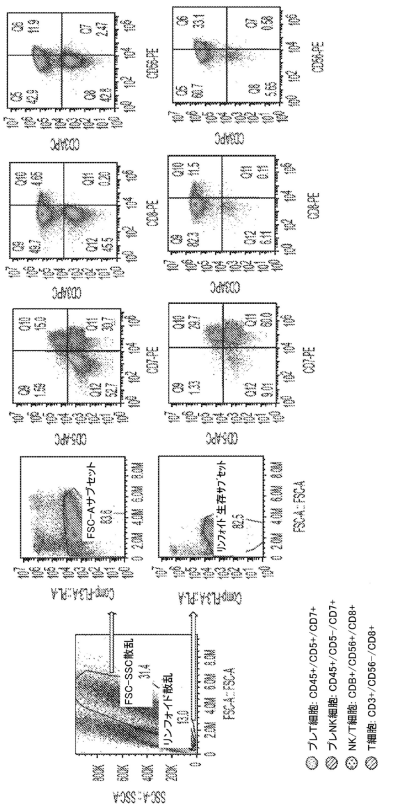


図２

【図３Ａ】

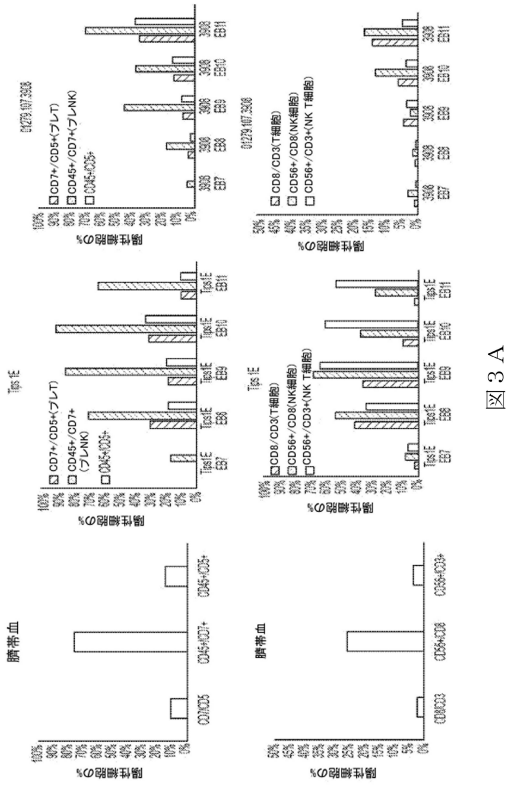


図３Ａ

【図３Ｂ】

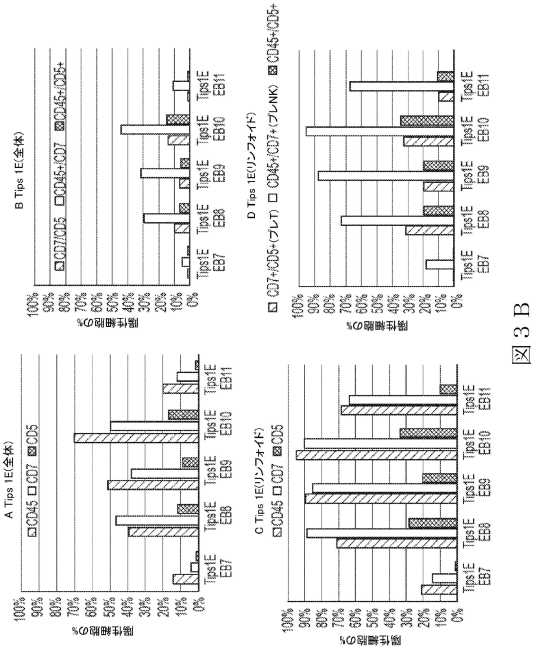


図３Ｂ

【図３Ｃ－１】

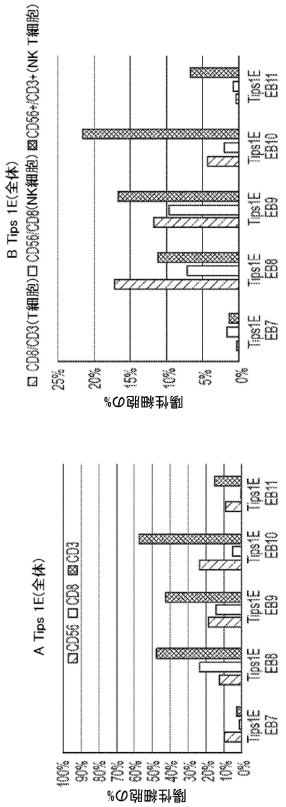


図３Ｃ

【図３Ｃ－２】

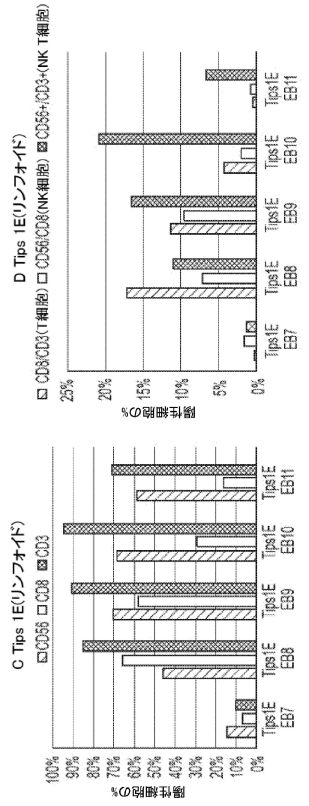


図３Ｃ

【図３Ｄ】

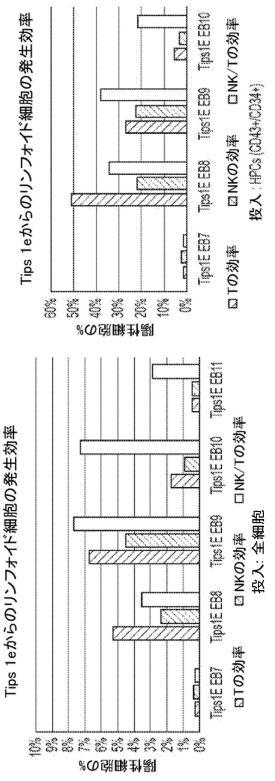


図３Ｄ

【図４】

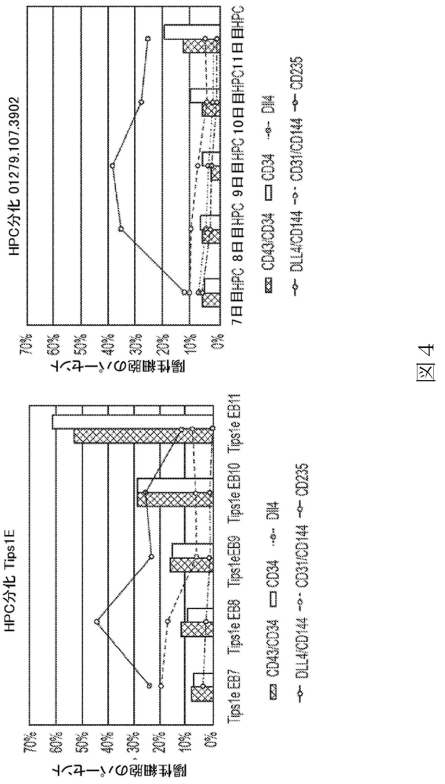


図４

【図５】

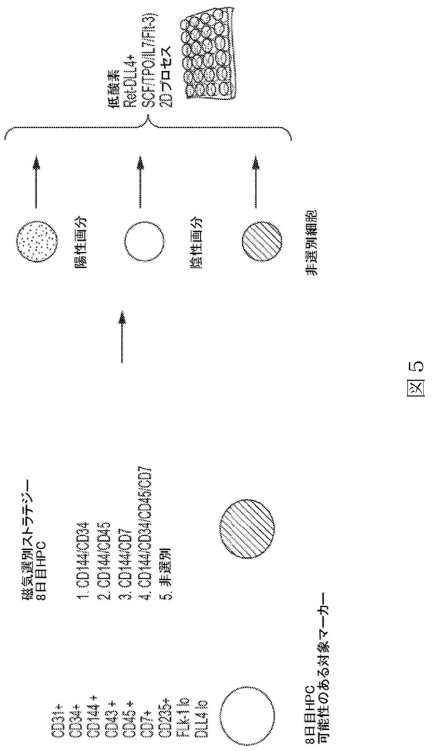


図５

【図６Ａ】

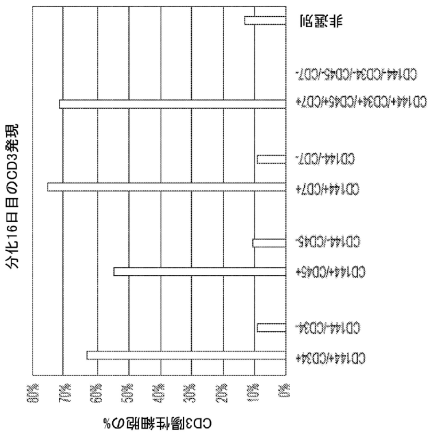


図６Ａ

【図６Ｂ】

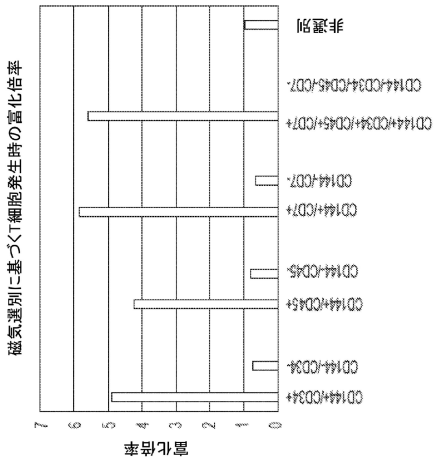


図６Ｂ

【図７Ａ】

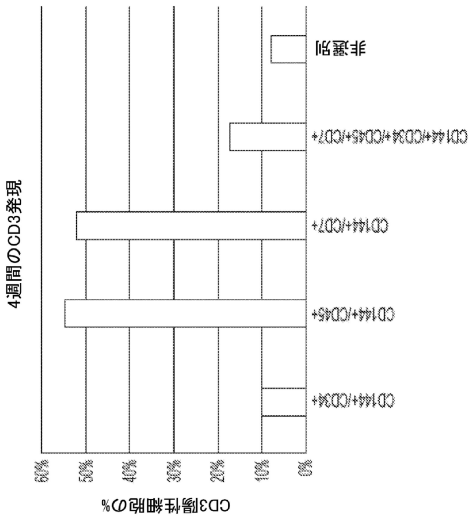


図７Ａ

【図７Ｂ】

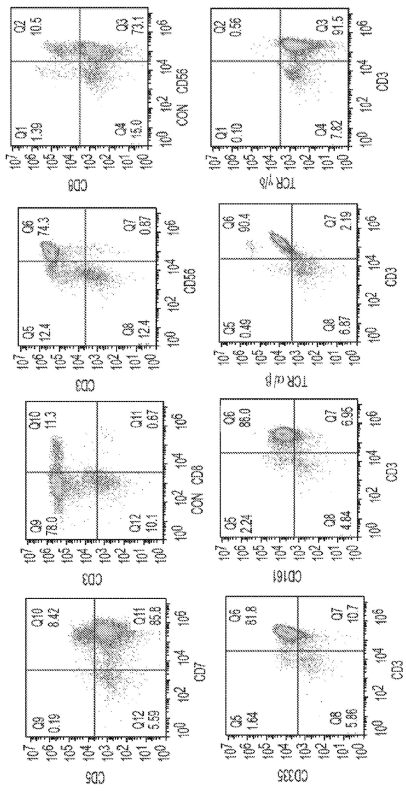


図７Ｂ

【図８Ａ】

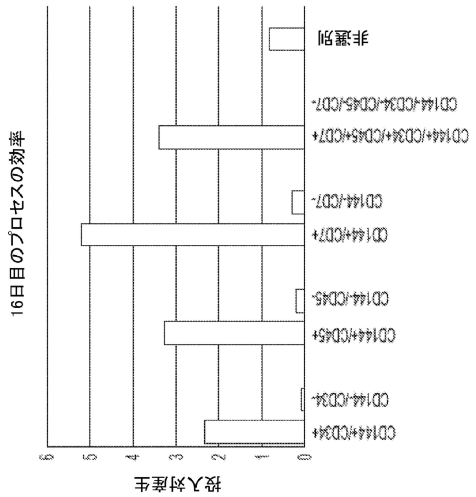


図８Ａ

【図８Ｂ】

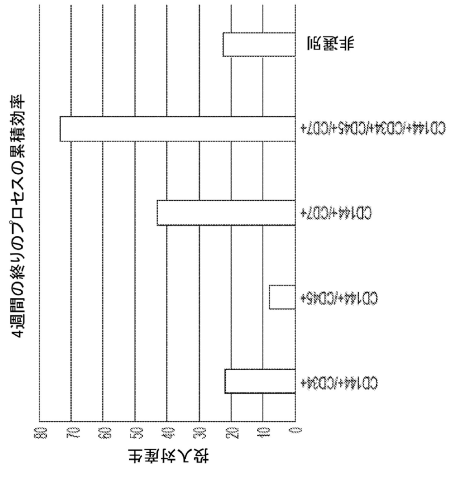


図８Ｂ

【図９Ａ】

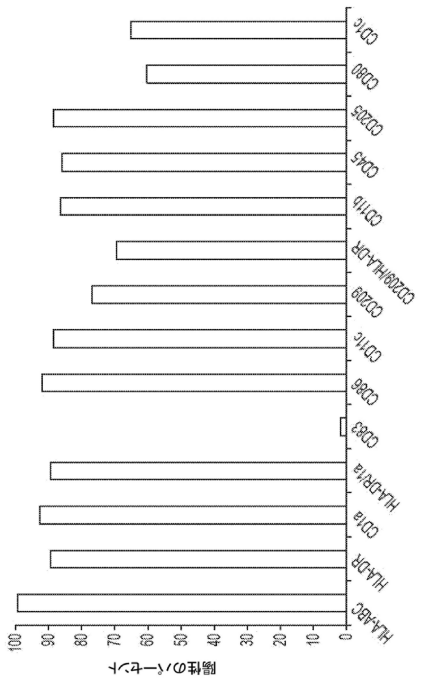


図９Ａ

【図９Ｂ】

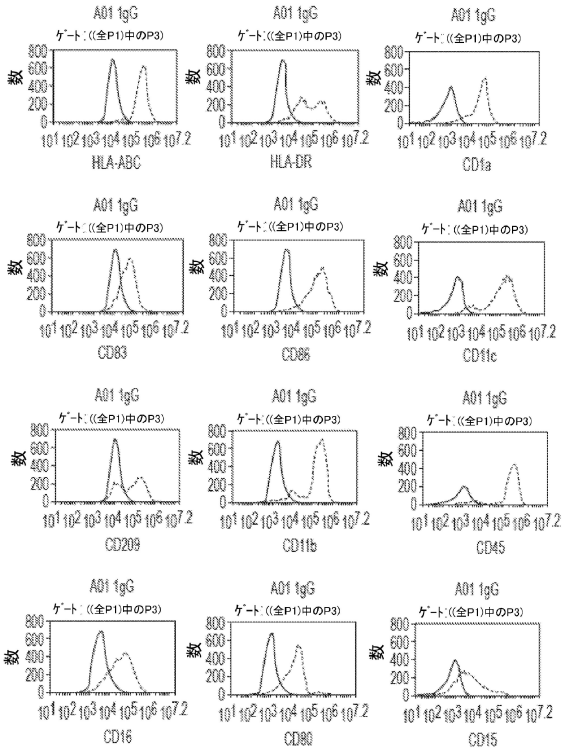


図９Ｂ

【図１０】

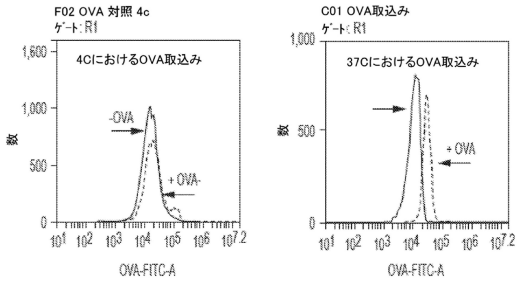


図１０

【図１１】

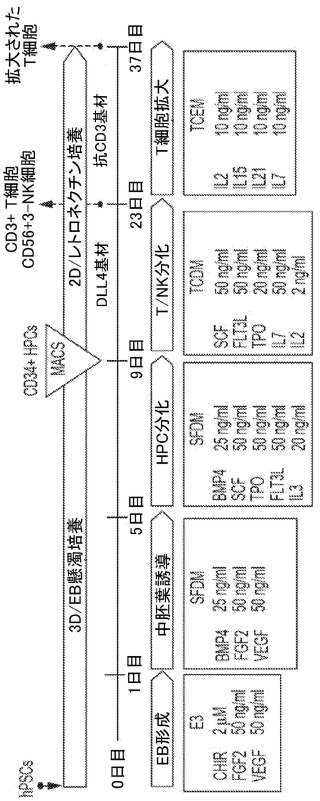


図１１

【図１２】

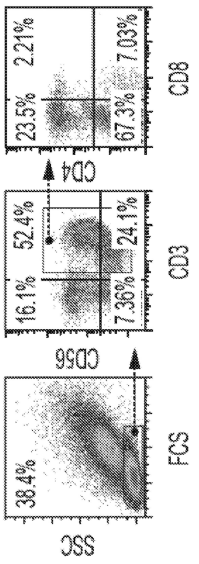


図１２

【図１３】

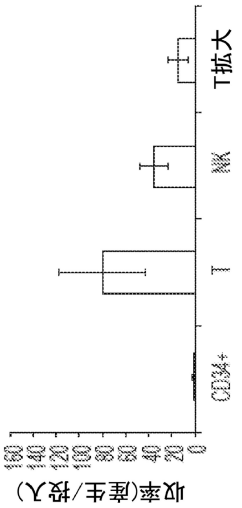


図１３

【図１４】

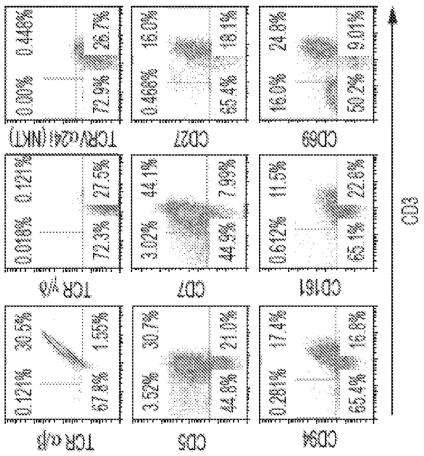


図１４

【図１５】

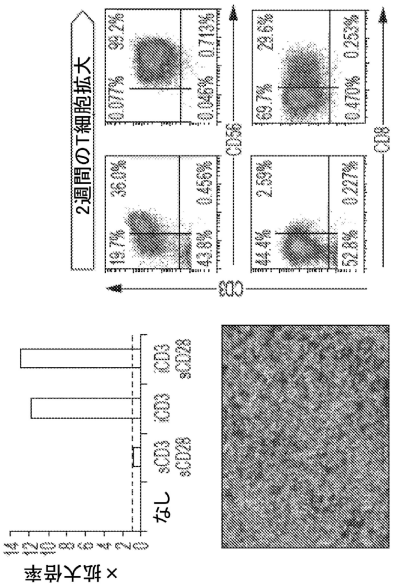


図１５

【図１６Ａ】

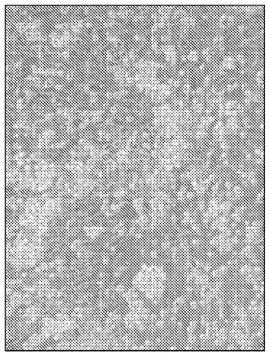


図１６Ａ

【図１６Ｂ】

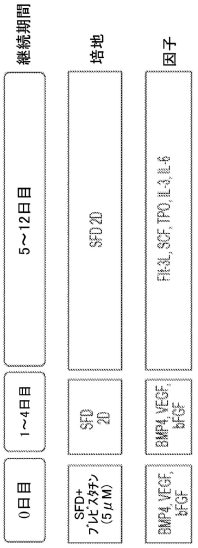


図１６Ｂ

【図１６Ｃ】

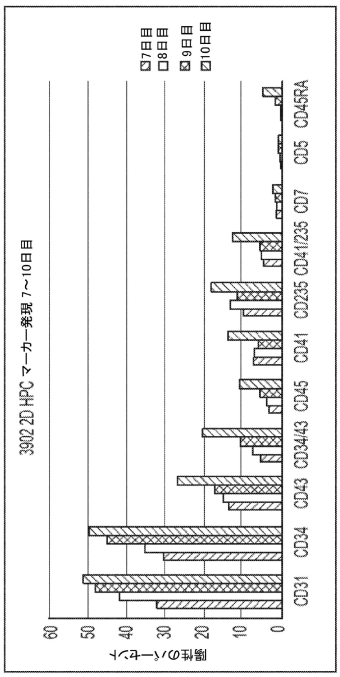


図１６Ｃ

【図１６Ｄ】

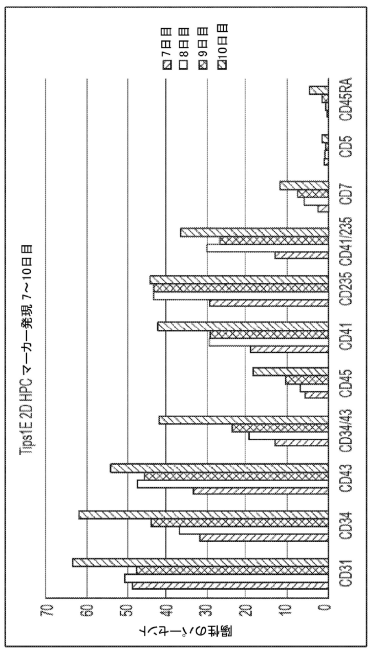


図１６Ｄ

【図１６Ｅ】

	投入:産生 CD4/34+
3902	
7日目	1:0.54
8日目	1:1.07
9日目	1:1.15
10日目	1:3.79
Tips 1e	
7日目	1:0.84
8日目	1:2.51
9日目	1:3.13
10日目	1:9.38

図１６Ｅ

【図１６Ｆ】

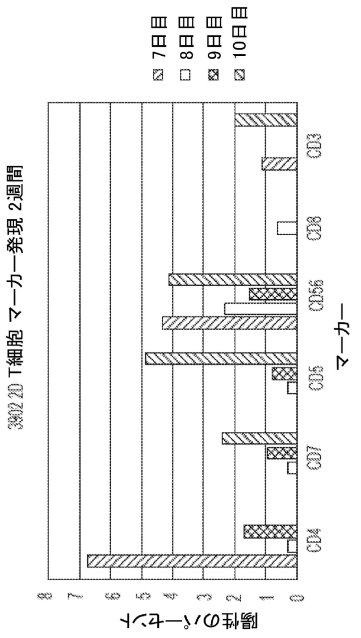


図１６Ｆ

【図１６Ｇ】

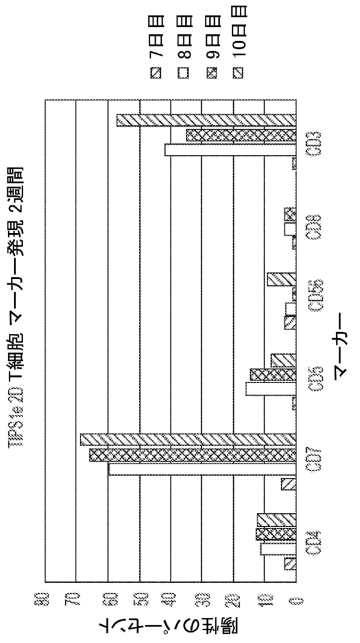


図１６Ｇ

【図１６Ｈ】

	2週間 投入HPC:産生CD3+
3902	
7日目	1:0.11
8日目	1:0
9日目	1:0
10日目	1:0.53
Tips 1e	
7日目	1:0.091
8日目	1:5.88
9日目	1:2.73
10日目	1:1.2

図１６Ｈ

【図１７Ａ－１７Ｂ】

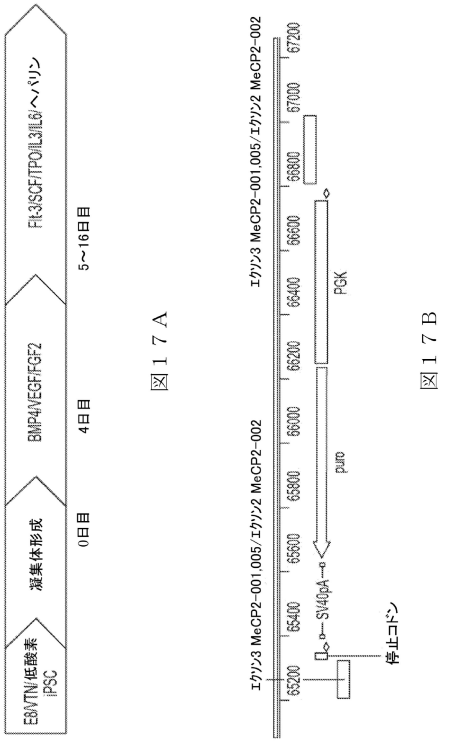


図１７Ａ

図１７Ｂ

【図１７Ｃ】

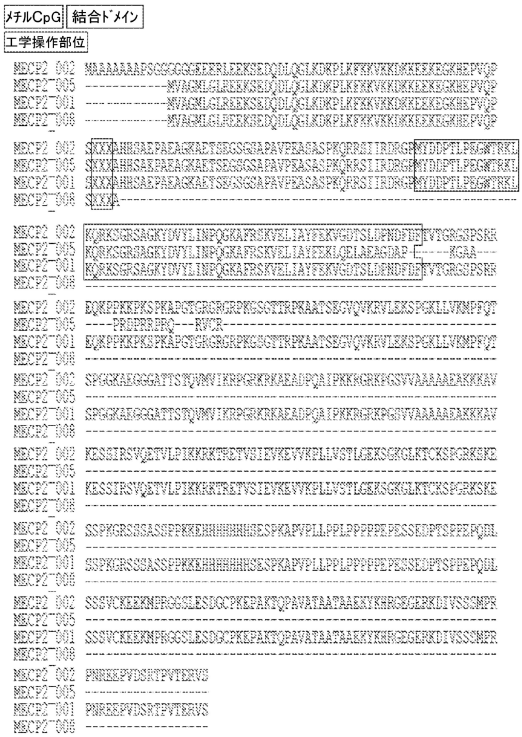


図１７Ｃ

【図１８Ａ－１８Ｃ】

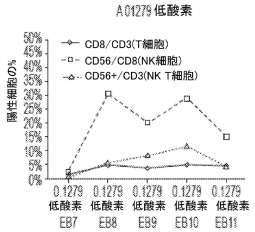


図１８Ａ

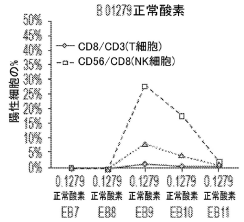


図１８Ｂ

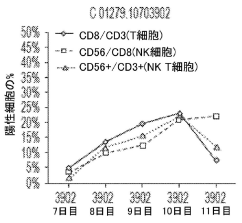


図１８Ｃ

【図１９Ａ】

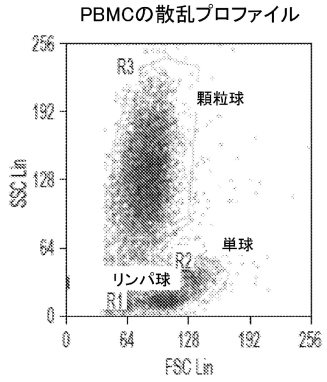


図１９Ａ

【図１９Ｂ－１９Ｃ】

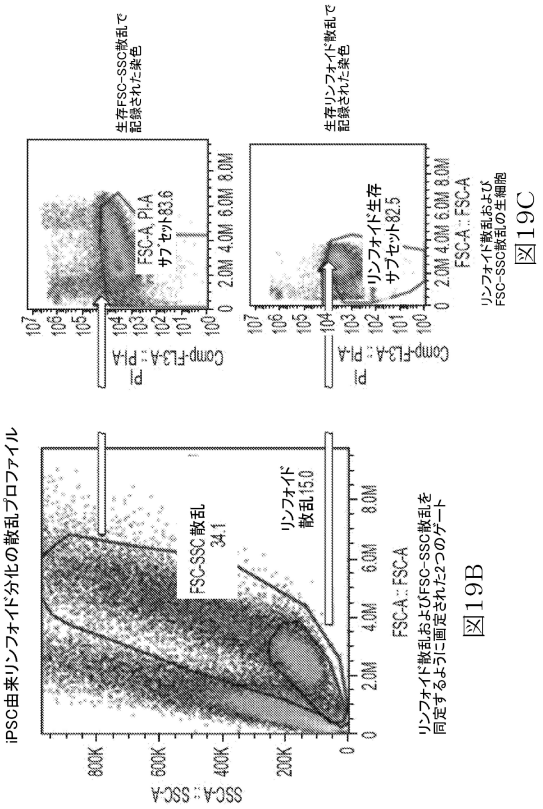


図19B

図19C

【図２０】

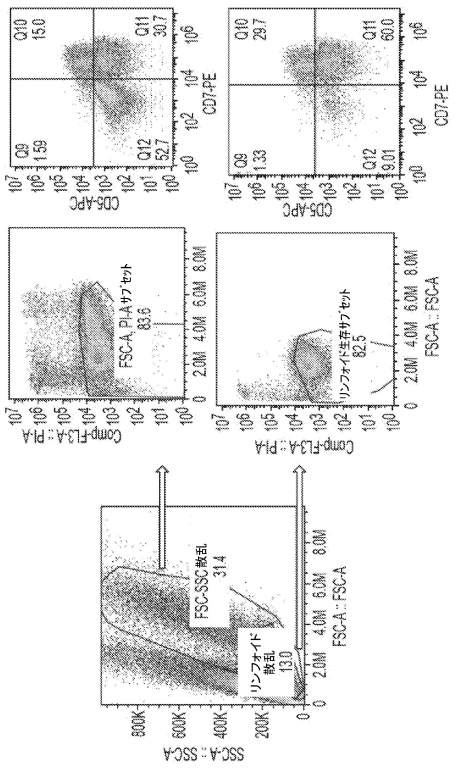


図２０

【図２１Ａ】

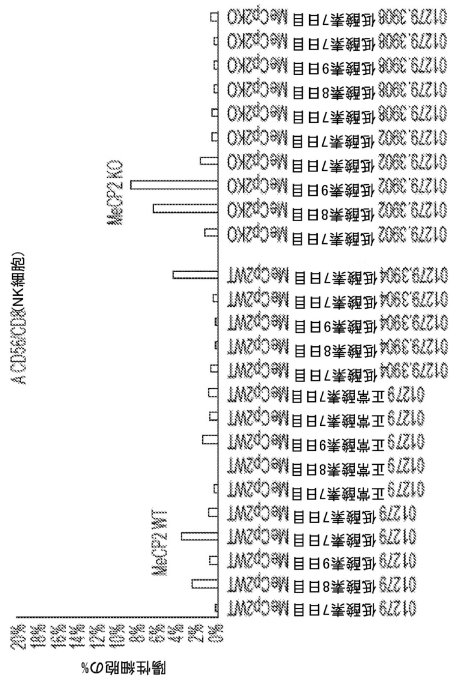


図２１Ａ

【図２１Ｂ】

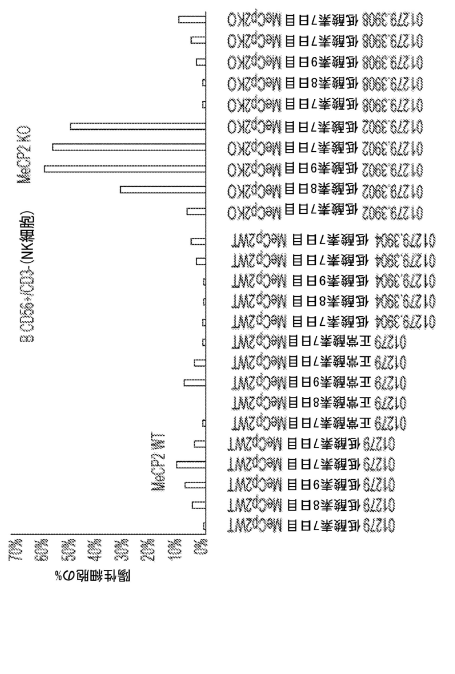


図２１Ｂ

【図２２】

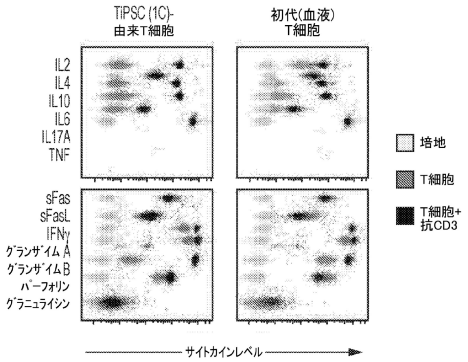


図２２

【図２３Ａ－２３Ｂ】

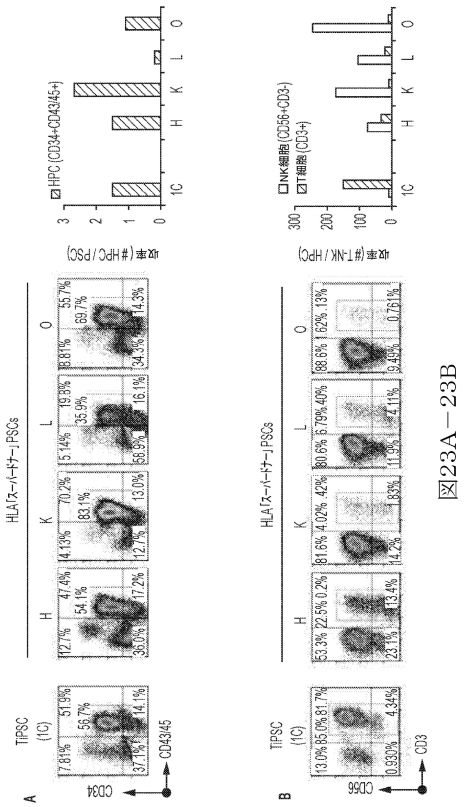


図23A－23B

【配列表】

0007212615000001.app

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者 ツァン シン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 ブランドル アンドリュー ジェイ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 ラジェシュ ディーピカ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 スワンソン ブラッドリー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 マン クリスティー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 バートン サラ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内
(72)発明者 ワン ウェン ボ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１ マディソン サイエンス ドライブ ５２５ スイート２００ セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特表２０１３－５０１５０５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１５／１６４７４０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／０９９５３９（WO，Ａ１）
特表２０１６－５３７３３７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－９０
Ｃ０７Ｋ
Ｃ１２Ｑ
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＣＡＰＬＵＳ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）