(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-533363
(P2018-533363A)
(43)公表日　平成30年11月15日(2018.11.15)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	4B065
C12N 15/90	(2006.01)	C12N	15/90	4C087
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	4H045
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/0783	
C12N 5/0786	(2010.01)	C12N	5/0786	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-521543 (P2018-521543)
(86)(22)出願日　平成28年7月26日 (2016.7.26)
(85)翻訳文提出日　平成30年6月20日 (2018.6.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/044122
(87)国際公開番号　WO2017/078807
(87)国際公開日　平成29年5月11日 (2017.5.11)
(31)優先権主張番号　62/251,016
(32)優先日　平成27年11月4日 (2015.11.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2016/14918
(32)優先日　平成28年1月26日 (2016.1.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/337,093
(32)優先日　平成28年5月16日 (2016.5.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　312000284
フェイト　セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２１，サン　ディエゴ，ジェネラル　アトミクス　コート　３５３５，スイート　２００
(74)代理人　110001656
特許業務法人谷川国際特許事務所
(72)発明者　バラマール，バーラム
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２１２１、サン　ディエゴ、ジェネラル　アトミクス　コート　３５３５、スイート　２００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】造血細胞分化を誘導するための方法および組成物

(57)【要約】
本発明は、万能性細胞を造血細胞に分化させる培養プラットフォーム、細胞培地、および方法を提供する。本発明はさらに、ＥＢ形成無しで、無フィーダー単層培養を可能にする本明細書に記載の培養プラットフォームおよび方法を用いて作製される、万能性幹細胞由来造血細胞を提供する。特に、本発明の万能性幹細胞由来造血細胞としては、ｉＨＳＣ、運命確定造血内皮細胞、造血性多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞およびＢ細胞が挙げられ、これらに限定はされない。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
増強された治療特性を有する造血系細胞を作製する方法であって、
ａ）１または複数の遺伝的インプリントを含む誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得ること；
ｂ）ｉＰＳＣを造血系細胞に分化誘導すること、
を含み、前記分化誘導は、
（ｉ）ｉＰＳＣを、ＢＭＰ経路活性化剤および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させることにより、中胚葉細胞を得ること；並びに
（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤を含む組成物と接触させることで、造血系細胞を与えることが可能な、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得ること、
を含み；
中胚葉細胞および運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が段階（ｉ）および（ｉｉ）において胚様体形成段階無しで得られ；
前記造血系細胞は運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＢ細胞を含み；且つ、
前記造血系細胞は前記ｉＰＳＣに含まれていた前記遺伝的インプリントを保持する、方法。
【請求項２】
１または複数の遺伝的インプリントを含む得られるｉＰＳＣが以下をさらに含む、請求項１に記載の方法：
ａ）非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間または後のゲノム編集によって、１または複数の遺伝的インプリントをｉＰＳＣに導入することであって、前記遺伝的インプリントは前記ｉＰＳＣのゲノムにおけるゲノム内挿入、ゲノム内欠失もしくはゲノム内置換を通じて導入された１もしくは複数の遺伝子改変されたモダリティを含む；または
ｂ）１もしくは複数の遺伝的インプリントを以下によってｉＰＳＣに導入すること：
ｉ．　ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的であり、且つ、治療特性を保持可能な供給源特異的免疫細胞を得ること；並びに
ｉｉ．　前記供給源特異的免疫細胞をｉＰＳＣに再プログラム化すること；並びに所望により、
ｉｉｉ．　前記供給源特異的免疫細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の遺伝子編集によって、追加の遺伝的インプリントを段階（ｉｉ）のｉＰＳＣに導入すること。
【請求項３】
前記遺伝子改変されたモダリティが、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記遺伝子改変されたモダリティが、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、$A_{2A}R$、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項５】

前記表面上誘発受容体がＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的な、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項５に記載の方法。

【請求項７】

前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項６に記載の方法。

【請求項８】

前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的であり、且つ、腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項４に記載の方法。

【請求項９】

前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記供給源特異的免疫細胞の治療特性が、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

ｉＰＳＣから造血系細胞への分化誘導が、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞をｂＦＧＦおよびＲＯＣＫ阻害剤を含む組成物と接触させることで、運命確定ＨＥ細胞を得ることをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】

前記運命確定ＨＥ細胞を、ＢＭＰ活性化剤、並びに所望によりＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させることで、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得ること、をさらに含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１または複数を含む組成物と接触させることで、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、および／またはＴ細胞を得ること、をさらに含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１４】

前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１または複数を含む組成物と接触させることで、プレＮＫ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、および／またはＮＫ細胞を得ること、をさらに含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１５】

段階ｂ）の前に、前記万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含む組成物と接触させて、前記細胞を播種および増殖することをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１６】

増強された治療特性を有し、且つ、派生前の万能性幹細胞に含まれていた遺伝的インプ

リントを含む造血系細胞であって、
前記万能性幹細胞の遺伝的インプリントは、
ａ）非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の、前記万能性細胞のゲノムにおけるゲノム内挿入、ゲノム内欠失もしくはゲノム内置換を通じて得られた、１もしくは複数の遺伝子改変されたモダリティ；または
ｂ）ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的な供給源特異的免疫細胞の１または複数の保持可能な治療特性、を含み、
前記万能性細胞は前記供給源特異的免疫細胞から再プログラム化される、
造血系細胞。
【請求項１７】
、前記遺伝子改変されたモダリティが、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含む、請求項１６に記載の造血系細胞。
【請求項１８】
前記遺伝子改変されたモダリティが、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む、請求項１６に記載の造血系細胞。
【請求項１９】
前記表面上誘発受容体がＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的な、請求項１８に記載の造血系細胞。
【請求項２０】
前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項１９に記載の造血系細胞。
【請求項２１】
前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項２０に記載の造血系細胞。
【請求項２２】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項１８に記載の造血系細胞。
【請求項２３】
前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項２２に記載の造血系細胞。
【請求項２４】
前記供給源特異的免疫細胞の治療特性が、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む、請求項１６に記載の造血系細胞。
【請求項２５】
運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、または好中球を含む、請求項１６に記載の造血系細胞。

【請求項２６】
前記Ｔ細胞が制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ）、幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ）、および／またはエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ）を含む、請求項２５に記載の造血系細胞。
【請求項２７】
前記ＮＫ細胞が獲得ＮＫ細胞を含む、請求項２５に記載の造血系細胞。
【請求項２８】
請求項１６～２７に記載の造血系細胞を含む組成物。
【請求項２９】
請求項１６～２７に記載の造血系細胞のうちの１または複数および薬剤的に許容できる培地を含む、医薬組成物。
【請求項３０】
造血系細胞の表面受容体に対する１または複数の二重特異性または多重特異性エンゲージャーをさらに含む、請求項２９に記載の医薬組成物。
【請求項３１】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが、
ａ）造血系細胞型に対して特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、もしくはＣＤ８９を含む表面受容体に対して特異的である；または、
ｂ）普遍的表面上誘発受容体を含む造血系細胞型に対して非依存的であり、且つ、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的である、
請求項３０に記載の医薬組成物。
【請求項３２】
前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項３１に記載の医薬組成物。
【請求項３３】
前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項３２に記載の医薬組成物。
【請求項３４】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項３１に記載の医薬組成物。
【請求項３５】
前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
組成物を養子細胞療法に適した対象に導入することによる２９～３５に記載の医薬組成物の治療用途であって、前記対象は自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；がん、または、ＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、治療用途。
【請求項３７】
細胞治療を必要としている対象を治療する方法であって、
誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）分化から生じた治療上十分な数のＴ細胞前駆細胞を投与すること、
を含む方法。
【請求項３８】
前記対象が、
（ｉ）骨髄移植もしくは幹細胞移植の候補であるか、前記対象が化学療法もしくは放射線療法を受けたことがある；
（ｉｉ）骨髄破壊的もしくは骨髄非破壊的（non-myeolablative）な化学療法もしくは放射線療法を受けたことがある；

（ｉｉｉ）造血系の過剰増殖性疾患もしくはがんを有する；
（ｉｖ）固形腫瘍を有する；または、
（ｖ）ウイルス感染もしくはウイルス感染と関連した疾患を有し；
インビボにおいて、前記投与されたＴ細胞前駆細胞が胸腺を活性化させてＴ細胞を再構成する、
請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ｉＰＳＣが１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれる前記１または複数の遺伝的インプリントがそれから派生したＴ前駆細胞において保持される、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記遺伝的インプリントが、分化のための前記ｉＰＳＣのゲノムにおけるゲノム内挿入、ゲノム内欠失またはゲノム内置換によって得られる１または複数の遺伝子改変されたモダリティを含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記遺伝的インプリントが、ドナー、疾患または治療応答に特異的な供給源特異的免疫細胞から再プログラム化されたｉＰＳＣにおいて保持される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
前記遺伝子改変されたモダリティが、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
前記遺伝子改変されたモダリティが、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４４】
二重特異性または多重特異性エンゲージャーを含む医薬組成物を投与することをさらに含み、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが、
ａ）エフェクター細胞型に対して特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、もしくはＣＤ８９を含む表面受容体に対して特異的である；または、
ｂ）エフェクター細胞型に対して非依存的であり、且つ、前記Ｔ前駆細胞およびそれから派生したＴ細胞に含まれる普遍的表面上誘発受容体に対して特異的である、
請求項３７に記載の方法。
【請求項４５】
前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ

２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

前記供給源特異的免疫細胞からの遺伝的インプリントが、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む、請求項３９に記載の方法。

【請求項５０】

以下から選択される少なくとも１つのマーカーに対して特異的な１または複数の抗体を含む抗体組成物であって：ＣＣＲ１０、ＣＤ１６４、ＣＤ９５、ＣＤ１４４、ＣＤ１６６、リンフォトキシンβ受容体、ＣＤ２５２、ＣＤ５５、ＣＤ４０、ＣＤ４６、ＣＤ３４０、ＣＤ１１９、ＣＤ１０６、ＣＤ６６ａ／ｃ／ｅ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４５ＲＢ、ＤＬＬ４、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ１１６、ＣＤ３２４、ＣＤ１２３、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ２００、ＣＤ７１、ＣＤ１７２ａ、ＣＤ２１、ＣＤ１８４、ＣＤ２６３、ＣＤ２２１、Ｎｏｔｃｈ４、ＭＳＣ、ＣＤ９７、ＣＤ３１９、ＣＤ６９、ＣＤ３３８、ポドプラニン、ＣＤ１１１、ＣＤ３０４、ＣＤ３２６、ＣＤ２５７、ＣＤ１００、ＣＤ３２、ＣＤ２５３、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ８３、ＧＡＲＰ、ＣＤ１８３、ＣＤ３５７、ＣＤ３１、ＣＤ１６５、ＣＤ１０２、ＣＤ１４６、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ１３、ＣＤ５８、インテグリンα９β１、ＣＤ５１、ＣＤ１０、ＣＤ２０２ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ９、ＣＤ２０１、ＣＤ４７、ＣＤ２６２、ＣＤ１０９、ＣＤ３９、ＣＤ３１７、ＣＤ１４３、インテグリンβ５、ＣＤ１０５、ＣＤ１５５、ＳＳＥＡ－４およびＣＤ９３；前記マーカーは運命確定造血内皮を同定するためのものである、抗体組成物。

【請求項５１】

ＣＤ９３に対して特異的な抗体を含み；ＣＤ９３に対して特異的な前記抗体と結合した細胞が、ＣＤ３４＋表現型、ＣＤ４３－表現型、ＣＤ７３－表現型、ＣＸＣＲ４－表現型、およびＣＤ７３－ＣＸＣＲ４－表現型のうちの１または複数を有する、請求項５０に記載の抗体組成物。

【請求項５２】

万能性幹細胞の分化において運命確定造血内皮を特定する方法であって、

（ｉ）分化中である細胞集団を得ること；

（ｉｉ）前記細胞集団にＣＤ９３特異的抗体を導入すること；および

（ｉｉｉ）ＣＤ９３発現レベルが１％未満である細胞集団を特定すること、

を含む方法。

【請求項５３】

前記段階（ｉ）が、

前記分化中の細胞集団からＣＤ３４＋細胞を単離すること；または、

前記分化中の細胞集団からＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞を単離すること、

をさらに含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を作製する方法であって、

運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、Ｗｎｔ経路アゴニストを含む培地中で培養することで、運命確定ＨＥ細胞を得ること、を含み；

Ｗｎｔ経路活性化剤無しでの培養との比較において、前記得られた運命確定ＨＥ細胞が、

（ｉ）細胞集団内の数および割合を増加させている、

（ｉｉ）分化能が増加している；且つ／または、

（ｉｉｉ）ＨＥ細胞性を向上させている、

方法。

【請求項５５】

前記培地が、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインをさらに含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】

前記万能性幹細胞万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項５４に記載の方法。

【請求項５７】

前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、ｉＰＳＣが１もしくは複数の遺伝的インプリントを含む、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが前記万能性幹細胞由来運命確定ＨＥにおいて保持される、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

抗原特異的な誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）および派生造血系細胞を作製する方法であって、

ａ）ドナー特異的、疾患特異的、または治療応答特異的である選択された供給源から初代抗原特異的Ｔ細胞を単離すること；

ｂ）前記初代抗原特異的Ｔ細胞を再プログラム化して万能性幹細胞を得ること；および、

ｃ）段階ｂ）の万能性幹細胞を造血系細胞に分化誘導すること、

を含み、分化誘導が、

（ｉ）前記万能性幹細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させることで、中胚葉細胞を得ること；並びに、

（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤を含む組成物と接触させることで、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得ること、

を含み；

中胚葉細胞および運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が段階（ｉ）および（ｉｉ）において胚様体形成段階無しで得られる、

方法。

【請求項６０】

前記初代抗原特異的Ｔ細胞の単離が、

（ｉ）前記初代抗原特異的Ｔ細胞を、目的の抗原を発現する腫瘍細胞または目的の抗原を発現する非形質転換細胞と共培養することで、細胞によって発現された目的の抗原を認識する抗原特異的なＴ細胞のより速い増殖を可能にすること；

（ｉｉ）前記初代抗原特異的Ｔ細胞を、目的の抗原を発現する、樹状細胞、胸腺上皮細胞、内皮細胞もしくは人工抗原提示細胞、血漿内の粒子もしくはペプチドと共培養すること；または、

（ｉｉｉ）目的の抗原に特異的なＴ細胞受容体特異的結合剤を用いて、前記初代抗原特異的Ｔ細胞を選別すること、

によって前記初代抗原特異的Ｔ細胞を濃縮して、

目的の抗原を認識する、濃縮された、初代抗原特異的Ｔ細胞を得ることをさらに含む、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

転写因子または小分子を用いて、前記初代抗原特異的Ｔ細胞または濃縮された初代抗原特異的Ｔ細胞を調節することで、前記細胞を若返らせること、

をさらに含む、請求項５９または請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

前記段階（ｂ）が、

再プログラム化の間または後の遺伝子編集によって、１または複数の遺伝的インプリントを前記万能性幹細胞に導入すること、をさらに含み、前記遺伝的インプリントは前記万

能性幹細胞のゲノムにおけるゲノム内挿入、ゲノム内欠失またはゲノム内置換を通じて得られる１または複数の遺伝子改変されたモダリティを含む、
請求項５９に記載の方法。
【請求項６３】
前記遺伝子改変されたモダリティが、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；第二もしくは第三の抗原特異性を伝達する細胞表面タンパク質；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記遺伝子改変されたモダリティが、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記表面上誘発受容体がＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的な、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６９】
前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記造血系細胞が、運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、または好中球を含む、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
請求項５９～７０に記載の方法を用いての、抗原特異的な誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）または派生造血系細胞。
【請求項７２】
請求項７１に記載の抗原特異的な誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）または派生造血系細胞を含む、組成物。
【請求項７３】
請求項７１に記載の誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）または派生造血系細胞、および薬剤的に許容できる培地を含む、医薬組成物。
【請求項７４】
造血系細胞の表面受容体との結合のための１または複数の二重特異性または多重特異性

エンゲージャーをさらに含む、請求項７３に記載の医薬組成物。
【請求項７５】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが、
ａ）造血系細胞型に対して特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、もしくはＣＤ８９を含む表面受容体に対して特異的である；または、
ｂ）普遍的表面上誘発受容体を含む造血系細胞型に対して非依存的であり、且つ、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的である、
請求項７４に記載の医薬組成物。
【請求項７６】
前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である、請求項７５に記載の医薬組成物。
【請求項７７】
前記共刺激ドメインがＩＬ２を含む、請求項７６に記載の医薬組成物。
【請求項７８】
前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーが腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である、請求項７５に記載の医薬組成物。
【請求項７９】
前記腫瘍特異的抗原がＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む、請求項７８に記載の医薬組成物。
【請求項８０】
組成物を養子細胞療法に適した対象に導入することによる７３～７９に記載の医薬組成物の治療用途であって、前記対象は自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；がん、または、ＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、治療用途。
【請求項８１】
誘導万能性幹細胞およびその派生細胞のクローン性を決定する方法であって、
ａ）成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞を再プログラム化して、誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得ること；並びに所望により、
ｂ）段階ａ）の万能性幹細胞を造血系細胞に分化誘導すること；
並びに、
ｃ）前記ｉＰＳＣおよび造血系細胞を得るための前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞に含まれていたものと同一の、特定のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成の存在を、前記ｉＰＳＣまたは前記造血系細胞において検出すること、
を含む、方法。
【請求項８２】
派生元の前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞のものと同一のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を含むｉＰＳＣまたは造血系細胞を単離すること、
をさらに含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
再プログラム化のための成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞を得ること；および、
前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞に対して特異的な免疫グロブリン（Ｉｇ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に含まれるＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を決定すること、
をさらに含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８４】
細胞治療においてインビボで養子細胞を追跡する方法であって、
特定のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を含む成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞から再プログラム化された万能性幹細胞に由来する、治療用の養子細胞を与えられている対象から、血液、組織、または腫瘍の生検試料を得ること；

前記試料からエフェクター細胞を単離すること；
前記エフェクター細胞におけるＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を決定すること；を含み、
前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞のものと同一のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成の存在によって、養子細胞のホーミング、残留性および／または増殖が示される、方法。
【請求項８５】
万能性幹細胞を造血系細胞に分化誘導するための方法であって、（ｉ）前記万能性幹細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させることで、中胚葉細胞を得ること；並びに、（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤を含む組成物と接触させることで、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得ること、を含み、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する前記中胚葉細胞は、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＢ細胞を含む造血系細胞を与えることが可能であり；中胚葉細胞および運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が段階（ｉ）および（ｉｉ）において胚様体形成段階無しで得られる、方法。
【請求項８６】
運命確定ＨＥ分化能を有する前記中胚葉細胞を、ｂＦＧＦおよびＲＯＣＫ阻害剤、並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤、ＩＧＦおよびＥＰＯのうちの１または複数を含む組成物と接触させることで、運命確定ＨＥ細胞を得ること、をさらに含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記運命確定ＨＥ細胞を、ＢＭＰ活性化剤、並びに所望によりＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させることで、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得ること、をさらに含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１または複数を含む組成物と接触させることで、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、および／またはＴ細胞を得ること、をさらに含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項８９】
前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１または複数を含む組成物と接触させることで、プレＮＫ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、および／またはＮＫ細胞を得ること、をさらに含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項９０】
段階ｂ）の前に、前記万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含む組成物と接触させて、前記細胞を播種および増殖することをさらに含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項９１】
前記万能性幹細胞、前記中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する前記中胚葉細胞を、約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すこと、をさらに含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項９２】
前記万能性幹細胞の造血系細胞への分化が、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、請求項８５に記載の方法。
【請求項９３】

前記万能性幹細胞の造血系細胞への分化が無フィーダー条件下である、請求項８５に記載の方法。
【請求項９４】
前記万能性幹細胞の造血系細胞への分化が無間質条件下である、請求項８５に記載の方法。
【請求項９５】
前記万能性幹細胞が誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項９６】
前記ｉＰＳＣが、ナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、１もしくは複数の遺伝的インプリントを含む、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが、それから分化した前記造血系細胞において保持される、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
造血系細胞が運命確定造血内皮細胞、造血性多能性前駆細胞、造血幹細胞・前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞；Ｂ細胞、マクロファージ、および好中球のうちの１または複数を含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項９９】
前記ＷＮＴ経路活性化剤がＧＳＫ３阻害剤である、請求項８５に記載の方法。
【請求項１００】
前記ＧＳＫ３阻害剤がＣＨＩＲ９９０２１である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記ＢＭＰ経路活性化剤がＢＭＰ４である、請求項８５に記載の方法。
【請求項１０２】
前記ＲＯＣＫ阻害剤がチアゾビビン（Thiazovivin）またはＹ－２７６３２である、請求項８６に記載の方法。
【請求項１０３】
前記ＲＯＣＫ阻害剤がＹ－２７６３２である、請求項８６に記載の方法。
【請求項１０４】
万能性幹細胞由来Ｔ系細胞を作製するための方法であって、
万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない組成物と接触させることで、万能性幹細胞由来のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞を得ること、を含み；
前記万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞は、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；
前記万能性幹細胞由来運命確定造血内皮は、万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤、ＩＧＦ、およびＥＰＯのうちの１または複数を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；
前記万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ、
前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞は、万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤、および所望に

よりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られる、
方法。
【請求項１０５】
万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記万能性幹細胞を播種および増殖させること、
をさらに含む、１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
万能性幹細胞由来Ｔ系細胞の発生が、（ｉ）胚様体発生段階無し；（ｉｉ）単層培養下；（ｉｉｉ）無フィーダー条件下；および／または（ｉｖ）無間質条件下である、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０７】
前記万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０８】
前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、前記ｉＰＳＣが１または複数の遺伝的インプリントを含む、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが、それから派生した前記Ｔ系細胞において保持される、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞を作製するための方法であって、
万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない組成物と接触させることで、万能性幹細胞由来のＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を得ること；を含み、
前記万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞は、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、を含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；
万能性幹細胞由来運命確定造血内皮は、万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤、ＩＧＦおよびＥＰＯのうちの１または複数を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；
前記万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ、
前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞は、万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られる、
方法。
【請求項１１１】
播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、造血内皮分化能を有する中胚葉細胞、、および／または運命確定造血内皮を、約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む、請求項１１０に記載の方法。

【請求項１１２】
万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記細胞を播種および増殖させることをさらに含む、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１３】
万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞の発生が、（ｉ）胚様体発生無し；（ｉｉ）単層培養下；（ｉｉｉ）無フィーダー条件下；および／または（ｉｖ）無間質条件下である、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１４】
前記万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１５】
前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、前記ｉＰＳＣが１または複数の遺伝的インプリントを含む、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが、それから派生した前記ＮＫ系細胞において保持される、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を作製するための方法であって、
万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、１または複数またはＷｎｔ経路活性化剤、ＩＧＦおよびＥＰＯを含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させることで、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を得ること；を含み、
前記万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ、
前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞は、万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られる、
方法。
【請求項１１８】
万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記万能性幹細胞を播種および増殖させること、
をさらに含む、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】
播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞、、および／または運命確定造血内皮を、約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む、請求項１１７および請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
万能性幹細胞由来運命確定造血内皮の発生が、（ｉ）胚様体発生段階無し；（ｉｉ）単層培養下；（ｉｉｉ）無フィーダー条件下；および／または（ｉｖ）無間質条件下である、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２１】
前記万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２２】
前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、ｉＰＳＣが１または複数の遺伝的インプリントを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】

前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが、それから派生した前記運命確定造血内皮において保持される、請求項１２２に記載の方法。

【請求項１２４】

万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞を作製するための方法であって、

万能性幹細胞由来プレＨＳＣを、ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させることで、万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞を得ること、を含み；

前記万能性幹細胞由来プレＨＳＣは、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；

前記万能性幹細胞由来運命確定造血内皮は、万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；

前記万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；

前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られ；

前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞の接触は、万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、細胞分化および増殖させることによって得られる、

方法。

【請求項１２５】

万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記万能性幹細胞を播種および増殖させること、

をさらに含む、請求項１２４に記載の方法。

【請求項１２６】

播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞、、および／または運命確定造血内皮を、約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む、請求項１２４および請求項１２５に記載の方法。

【請求項１２７】

前記万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞の発生が、（ｉ）胚様体発生段階無し；（ｉｉ）単層培養下；（ｉｉｉ）無フィーダー条件下；および／または（ｉｖ）無間質条件下である、請求項１２６に記載の方法。

【請求項１２８】

前記万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項１２６に記載の方法。

【請求項１２９】

前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、ｉＰＳＣが１もしくは複数の遺伝的インプリントを含む、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１３０】

前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントが、それから派生した前記多能性前駆細胞において保持される、請求項１２９に記載の方法。

【請求項１３１】
請求項１～４６に記載の方法を用いて作製された細胞集団、細胞株またはクローン細胞のうちの１または複数を含む組成物を用いて養子細胞療法を促進する方法であって、前記細胞集団、細胞株またはクローン細胞は以下から選択される：
（ｉ）ＣＤ３４＋、且つ、ＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；
（ｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来多能性前駆細胞；
（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋またはＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞；
（ｉｖ）ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋またはＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞；
（ｖ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞；
（ｖｉ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、且つ、所望によりＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞；
（ｖｉｉ）ＣＤ４５＋Ｖａ２４Ｊａ１８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来ＮＫＴ；並びに、
（ｖｉｉｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である、万能性幹細胞由来Ｂ細胞。
【請求項１３２】
請求項１～４６に記載の方法を用いて作製された前記細胞集団、細胞株またはクローン細胞が、前記細胞集団、細胞株またはクローン細胞の派生元の前記万能性細胞に含まれていた遺伝的インプリントを含む、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
以下を含む組成物：
（ａ）ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない培地；並びに、
（ｂ）以下の、請求項１～４６に記載の方法から作製された１または複数の細胞集団：
（ｉ）ＣＤ３４＋、且つ、ＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；
（ｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来運命確定ＨＳＣ；
（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来多能性前駆細胞；
（ｉｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋またはＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞；
（ｖ）ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋またはＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞；
（ｖｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞；および
（ｖｉｉ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋、且つ所望により、ＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞、
（ｖｉｉｉ）ＣＤ４５＋Ｖａ２４Ｊａ１８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来ＮＫＴ細胞；並びに、
（ｉｘ）ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である、万能性幹細胞由来Ｂ細胞。
【請求項１３４】
請求項１～４６に記載の方法から作製された１または複数の細胞集団が、前記１または複数の細胞集団の派生元の前記万能性細胞に含まれていた遺伝的インプリントを含む、請求項１３３に記載の組成物。
【請求項１３５】
以下からなる群から選択される万能性幹細胞由来造血系細胞および１または複数の培地を含む組成物であって、

（ｉ）ＣＤ３４＋ＨＥ細胞（ｉＣＤ３４）、並びに、ｉＣＤ３４－Ｃ、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１または複数の培地；

（ｉｉ）運命確定造血内皮（ｉＨＥ）、並びに、ｉＣＤ３４－Ｃ、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１または複数の培地；

（ｉｉｉ）運命確定ＨＳＣ、並びに、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１または複数の培地；

（ｉｖ）多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）、およびｉＭＰＰ－Ａ；

（ｖ）Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）、並びに、ｉＴＣ－Ａ２、およびｉＴＣ－Ｂ２から選択される１または複数の培地；

（ｖｉ）Ｔ細胞（ｉＴＣ）、およびｉＴＣ－Ｂ２；

（ｖｉｉ）ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）、並びに、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１または複数の培地；並びに、（ｖｉｉｉ）ＮＫ細胞（ｉＮＫ）、およびｉＮＫ－Ｂ２、

ｉＣＤ３４－Ｃは、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；

ｉＭＰＰ－Ａは、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み；

ｉＴＣ－Ａ２は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み；

ｉＴＣ－Ｂ２は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み；

ｉＮＫ－Ａ２は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦ　ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、ＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み、

ｉＮＫ－Ｂ２は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む、

組成物。

【請求項１３６】

ｉＣＤ３４－ＣがＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず；ｉＴＣ－Ａ２およびｉＮＫ－Ａ２がＢＭＰ活性化剤を含まず；且つ／または、ｉＴＣ－Ｂ２およびｉＮＫ－Ｂ２がＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まない、請求項１３５に記載の組成物。

【請求項１３７】

前記万能性幹細胞万能性幹細胞がｉＰＳＣである、請求項１３５に記載の組成物。

【請求項１３８】

前記ｉＰＳＣがナイーブ型ｉＰＳＣである、且つ／または、ｉＰＳＣが１もしくは複数の遺伝的インプリントを含む、請求項１３７に記載の組成物。

【請求項１３９】

前記ｉＰＳＣに含まれていた１または複数の遺伝的インプリントが前記万能性幹細胞由来造血系細胞において保持されている、請求項１３８に記載の組成物。

【請求項１４０】

請求項８５～１３０のいずれか一項により作製された万能性細胞由来造血系細胞および薬剤的に許容できる培地を含む、医薬組成物。

【請求項１４１】

組成物を養子細胞療法に適した対象に導入することによる１４０に記載の医薬組成物の

治療用途であって、前記対象は自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；がん、または、ＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、治療用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０１５年１１月４日に出願された米国仮特許出願第６２／２５１，０１６号；２０１６年1月２６日に出願された国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ１６／１４９１８；および２０１５年5月１６日に出願された米国仮特許出願第６２／３３７，０９３号に基づく優先権を主張し、これらの開示は参照によってその全体が本明細書に援用される。

【０００２】

本発明は全体として、万能性幹細胞から全ての造血系の細胞を製造するための組成物および方法に関する。具体的には、本発明は、ヒト誘導万能性幹細胞を包含する万能性幹細胞から全ての造血系の細胞を製造するための、改善された培養プラットフォームに関する。

【背景技術】

【０００３】

ヒト誘導万能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）技術は、がんを含む多数の血液系腫瘍および非血液系腫瘍の治療のための、治療的可能性のある造血細胞の、非常に有望な、且つ潜在的に無限の供給源である。造血細胞療法剤の同種供給源としてのｈｉＰＳＣおよびゲノム改変ｈｉＰＳＣ技術の可能性を押し広げるためには、Ｔ、Ｂ、ＮＫＴ、およびＮＫリンパ系細胞、並びにそれらの前駆細胞の多様なサブセットを含んで、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）だけでなく、免疫エフェクター集団をも、効率的に且つ再現性よく作製可能であることが必要不可欠である。

【０００４】

リンパ球を生じ得るＨＳＣのインビトロ誘導は、胚発生中に時空間的に異なる少なくとも２つの血球新生の波（一次造血および二次造血）があるために複雑である。一次造血は胚体外の卵黄嚢で始まり、胚型赤血球系細胞および胚型骨髄系細胞（ただしＨＳＣではない）を主に含む過渡的且つ限定的な造血系レパートリーを生じる。二次造血の波が生じた後に初めて、運命確定造血内皮（ＨＥ）と呼ばれる動脈管構造内の特殊化した内皮前駆細胞から、初期のＨＳＣが現れる。運命確定ＨＥは次に、内皮造血転換を起こしてＨＳＣを生じ、これがその後最終的に骨髄に移動し、そこで、生体型としての一生を通じて、Ｔ、Ｂ、ＮＫＴ、およびＮＫリンパ系細胞を含む多系譜の造血を維持する。従って、万能性幹細胞からのＨＳＣおよびリンパ系エフェクター細胞の発生は、適切に設計され有効とされた方法および組成物を介した、二次プログラムへ向けた入り組んだ初期胚造血発生段階の、正確な再現能に依存している。

【０００５】

インビトロにおけるｈｉＰＳＣの運命確定ＨＥへの分化誘導について説明している研究は、限られた数しかない。係る細胞を、最初に、万能性維持および分化誘導を目的とした不明確な血清含有培地の存在下で、マウス由来またはヒト由来の間質細胞と共培養しなければならないことが、ｈｉＰＳＣを治療目的に利用する際の主な障害となっている。加えて、既存のプロトコルは、ｉＰＳＣを培養することで、外胚葉細胞、中胚葉細胞、および内胚葉細胞を包含する種々の分化細胞を含む不均一な細胞凝集塊である胚様体（ＥＢ）を形成させることからなる戦略を採用している。それらの手順は、例えば、スピンにより凝集塊を形成させる、細胞をウェル内に接着させ凝集させる、または、浮遊培養液中で受動的に集合させ凝集塊を形成させることによる、万能性細胞の凝集を必要とする。形成されたＥＢは、ある一定の期間、典型的には７～１０日間、分化誘導培養系の中で維持されることで適切に分化せられ、その後ＥＢは、続く分化段階への進行を目的として、さらなる成熟のために接着培養に移されるか、または、細胞型選別のために単一細胞に解離される

（Kennedy et al., Cell Reports 2012:1722-1735; Knorr, et al., Stem Cells Translational Medicine 2013 (2):274-283）。例えば、Kennedy et al.では、万能性細胞をコラゲナーゼおよびトリプシンで処理して、細胞を剥離させて小さな凝集塊を形成させた後、それを培養してＥＢを形成させた、ｉＰＳＣ分化のためのＥＢ発生が教示されている。ＥＢ形成は万能性幹細胞の分化を促進することが示されているが、凝集塊形成とその後のＥＢ形成の必要性は手間がかかり、このプロセス中、細胞数は最低限にしか増加せず、三次元的ＥＢ凝集塊内の細胞性内容物は培地中の因子に一貫性無く且つ不均等に曝され、それにより、分化段階が一様でない不均一な細胞産物が生じ、効率的であり且つ合理化されていることが必要とされる製造プロセスの拡張性および再現性の大きな障害となる。

【０００６】

すなわち、共培養または血清含有培地に頼らずに、且つ、中間体として胚様体凝集塊を形成させる必要なく、幹細胞を二次造血まで分化させる方法および組成物が必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

本発明は全体として、幹細胞を造血細胞予定運命へと増殖および分化させるための、細胞培養条件、培地、培養プラットフォーム、および方法に関する。

【０００８】

特に、本発明は、ＥＢ形成の必要無く、無血清／無フィーダー条件下で、且つ、拡張可能且つ単層の培養プラットフォームにおいて、ｈｉＰＳＣを包含する万能性幹細胞に由来する運命確定造血内皮（ＨＥ）を通じて、造血細胞系譜を作製するための方法および組成物を提供する。本発明の方法に従って分化され得る細胞は、万能性幹細胞から、特定の高分化型細胞に運命決定された前駆細胞、および万能性の中間体を経由することなく造血性運命に直接移行した種々の系譜の細胞である分化転換細胞（transdifferentiated cell）まで、多岐にわたる。同様に、幹細胞の分化によって生じる細胞も、多能性幹細胞または多能性前駆細胞から、高分化型幹細胞、および介在する全ての造血細胞系まで、多岐にわたる。

【０００９】

本発明は、万能性幹細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、および所望によりｂＦＧＦと、接触させることを含む、単層培養において万能性幹細胞から造血系細胞を分化および増殖させるための組成物および方法を提供する。従って、万能性幹細胞に由来する中胚葉細胞が、万能性幹細胞から胚様体を形成することなく、獲得し増殖される。前記中胚葉細胞が次に、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤との接触を受けることで、万能性幹細胞からの胚様体の形成なく、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する増殖した中胚葉細胞が得られる。後のｂＦＧＦ、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤、および／またはＷＮＴ経路活性化剤、との接触により、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が運命確定ＨＥ細胞に分化し、これは分化中に増殖もする。

【００１０】

ＥＢ形成が、中程度～最小限の細胞増殖をもたらすこと、集団内の細胞の均一な増殖および均一な分化を必要とする多くの適用にとって重要な単層培養が可能でないこと、並びに、手間がかかり効率が低いことから、造血系細胞を得るための本明細書で提供される方法はＥＢを介した万能性幹細胞分化よりも優れている。

【００１１】

運命確定造血内皮に向けた分化を促進して、造血幹細胞の誘導、並びにＴ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞およびＮＫ細胞等の分化した子孫をもたらす、単層分化プラットフォームが本明細書において提供される。実証される増強された分化効率と大量増殖とを組み合わせた単層分化戦略は、種々の治療適用のための、治療上有意味な数の万能性幹細胞由来造血細胞の送達を可能にする。さらに、本発明によって、本明細書で提供される方法を用いる単層培養が、インビトロでの分化、エキソビボでの調節、並びにインビボでの長期間の造血性自己複製、再構成および生着の全てを可能にする機能的な造血系細胞をもたらすこと

が開示された。本明細書で使用される場合、ｉＰＳＣ由来造血系細胞は、運命確定造血内皮、造血性多能性前駆細胞、造血幹細胞・前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、および好中球を包含するがこれらに限定はされない。

【００１２】

本発明の１つの態様は、万能性幹細胞由来造血系細胞を得るための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは以下を含む：（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞の入手に適した、培地；並びに、（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地。いくつかの実施形態では、上記培養プラットフォームの前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記培養プラットフォームは以下をさらに含む：（ｉｖ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、且つ、万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地。

【００１３】

上記培養プラットフォームのいくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、追加の培地：（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まず、且つ、万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞もしくはＴ細胞への分化に適した、培地；または、（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含み、且つ、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化に適した、培地、をさらに含み；これらの追加の培地は万能性幹細胞由来Ｔ系細胞の発生に適している。

【００１４】

上記培養プラットフォームのいくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、追加の培地：（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まず、且つ、万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞もしくはＮＫ細胞への分化に適した、培地；または、（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含み；且つ、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化に適した、培地、をさらに含んでいてもよく；これらの追加の培地は万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞の発生に適している。

【００１５】

一実施形態では、上記の提供された培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＲＯＣＫ阻害剤を含まず、且つ、万能性幹細胞由来プレＨＳＣの造血性多能性前駆細胞への分化に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩ

Ｌ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮のプレＨＳＣへの分化に適した、培地、をさらに含み；これらの培地は万能性幹細胞由来の造血性多能性前駆細胞の発生を可能にする。

【００１６】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞由来造血細胞を分化および増殖させるための組成物を提供し、前記組成物は以下のうちの１または複数を含む：（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤；並びに、運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記造血内皮分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず；万能性幹細胞由来中胚葉細胞を含み、且つ、万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地；並びに、（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦ；およびｉＰＳＣを含み、且つ、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地。

【００１７】

万能性幹細胞由来造血細胞の分化および増殖のための前記組成物のいくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから派生した造血系細胞において保持される。

【００１８】

万能性幹細胞由来造血細胞の分化および増殖のための前記組成物のいくつかの実施形態では、前記組成物は、（ｖｉ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず；且つ、万能性幹細胞を含み；且つ、前記万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地等の、追加の培地を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから派生した造血系細胞において保持される。

【００１９】

万能性幹細胞由来造血細胞の分化および増殖のための上記組成物のいくつかの実施形態では、前記組成物は、（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まず；且つ、万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞を含み、且つ、前記万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞もしくはＴ細胞への分化に適した、培地；または、（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤；並びに万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を含み、且つ、前記運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化に適した、培地、をさらに含む。これらの追加の培地は万能性幹細胞由来Ｔ系細胞の発生に適している。

【００２０】

万能性幹細胞由来造血細胞の分化および増殖のための上記組成物の一実施形態では、前記組成物は、万能性幹細胞由来の造血多能性前駆細胞を作製するための１または複数の培地をさらに含み、前記培地は、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＲＯＣＫ阻害剤を含まず、且つ、万能性幹細胞由来プレＨＳＣを含み、且つ、プレＨＳＣの造血性多能性前駆細胞への分

化に適した、培地；並びに／または、（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌおよびｌｌ１１からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を含み、且つ、前記運命確定造血内皮のプレＨＳＣへの分化に適した、培地、を含む。

【００２１】

本発明の１つの態様は、万能性幹細胞由来Ｔ系細胞を作製するための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、万能性幹細胞からの万能性幹細胞由来中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記中胚葉細胞からの運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の入手に適した、培地；（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｖ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤；並びに万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を含み、且つ、前記運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化に適した、培地；並びに、（ｖ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず；且つ、万能性幹細胞由来プレＴ細胞前駆細胞を含み、且つ、前記プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞への分化に適した、培地、を含む。

【００２２】

万能性幹細胞由来Ｔ系細胞を作製するための上記培養プラットフォームのいくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｖｉ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来Ｔ系細胞において保持される。

【００２３】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞を作製するための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞の入手に適した、培地；（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化に適した、培地；（ｉｖ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含み、且つ、運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化に適した、培地；並びに、（ｖ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン

を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず、且つ、プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞への分化に適した、培地、を含む。

【００２４】

万能性幹細胞由来ＮＫ細胞を作製するための上記培養プラットフォームのいくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｖｉ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、且つ、万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞において保持される。

【００２５】

本発明のさらに別の態様は、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製するための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞の入手に適した、培地；並びに、（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤、並びにｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、ＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地、を含む。

【００２６】

万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製するための前記培養プラットフォームのいくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｉｖ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、且つ、万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地、をさらに含む。

【００２７】

本発明のさらに別の態様は、万能性幹細胞由来造血多能性前駆細胞を作製するための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、万能性幹細胞からの万能性幹細胞由来中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞の入手に適した、培地；（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まず、且つ、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｖ）ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み；且つ、運命確定造血内皮のプレＨＳＣへの分化に適した、培地；並びに、（ｖ）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まず、且つ、プレＨＳＣの造血性多能性前駆細胞への分化に適した、培地、を含む。いくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは以下をさらに含む：（ｖｉ）ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、

且つ、万能性幹細胞の播種および増殖に適した、培地。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来造血細胞において保持される。

【００２８】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞を運命確定造血系細胞に分化誘導するための方法を提供するものであり、前記方法は、（ｉ）万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、前記万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、所望によりＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、前記中胚葉細胞からの運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉｉ）前記運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含み、所望によりＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖を惹起すること；並びに所望により、万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、造血内皮を有する中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すこと、を含む。

【００２９】

万能性幹細胞を造血系細胞に分化誘導するための前記方法のいくつかの実施形態では、前記方法は、万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含み、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、万能性幹細胞を播種および増殖させること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来造血細胞において保持される。

【００３０】

万能性幹細胞の分化を造血系細胞に配向するための方法のいくつかの実施形態では、万能性幹細胞の造血系細胞への分化は、胚様体を生じず、且つ単層培養形態である。

【００３１】

上記方法のいくつかの実施形態では、得られる万能性幹細胞由来の運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋である。いくつかの実施形態では、得られる運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－である。いくつかの実施形態では、運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－である。いくつかの実施形態では、運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－である。いくつかの実施形態では、運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－である。いくつかの実施形態では、運命確定造血内皮細胞はＣＤ３４＋ＣＤ９３－である。

【００３２】

上記方法のいくつかの実施形態では、前記方法は、（ｉ）万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化因子を含む組成物と接触させて、運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞（pre-T cell progenitor）への分化を惹起すること；並びに所望により、（ｉｉ）前記プレＴ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化因子およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの一つまたは複数を含まない、組成物と接触させて、前記プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞への分化を惹起する

こと、をさらに含む。前記方法のいくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である。前記方法のいくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞はＣＤ４５＋ＣＤ７＋である。

【００３３】

万能性幹細胞の分化を造血系細胞へと配向するための上記方法のさらなるいくつかの実施形態では、前記方法は、（ｉ）万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化因子、を含む組成物と接触させて、運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞（pre-NK cell progenitor）への分化を惹起すること；並びに所望により、（ｉｉ）万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化因子およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの一つまたは複数を含まない、組成物と接触させて、プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞への分化を惹起すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞由来ＮＫ前駆細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞由来ＮＫ細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、所望により、ＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする。

【００３４】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞由来Ｔ系細胞を作製するための方法を提供するものであり、前記方法は、（ｉ）万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、前記中胚葉細胞からの前記運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉｉ）運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖を惹起すること；（ｉｖ）運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む組成物と接触させて、前記運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化を惹起すること；並びに、（ｖ）前記プレＴ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、組成物と接触させて、プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞への分化を惹起すること、を含み；所望により、前記播種された万能性幹細胞、中胚葉細胞、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮は約２％～約１０％の低酸素分圧に曝されてもよい。いくつかの実施形態では、上記方法のグループＩＩは、ｉＰＳＣを、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、万能性幹細胞を播種および増殖させること、をさらに含み；且つ／または、前記万能性幹細胞。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。前記方法のいくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞のＴ細胞系譜への分化は、胚様体を生じず、且つ、単層培養形式である。

【００３５】

本発明のさらに別の態様は、万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞を作製するための方法を提供するものであり、前記方法は、（ｉ）万能性幹細胞を、ＢＭＰ活性化剤および所望により

ｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、前記万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉ）中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、中胚葉細胞からの運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉｉ）運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；ＲＯＣＫ阻害剤；所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、運命確定ＨＥ分化能を有する前記万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの万能性幹細胞由来運命確定造血内皮の分化および増殖を惹起すること；（ｉｖ）万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む組成物と接触させて、前記万能性幹細胞由来運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化を惹起すること；並びに、（ｖ）万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、組成物と接触させて、前記万能性幹細胞由来プレＮＫ細胞前駆細胞の万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞への分化を惹起すること；並びに所望により、播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すこと、を含む。いくつかの実施形態では、グループＩＩの万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞を作製するための前記方法は、ｉＰＳＣを、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記ｉＰＳＣを播種および増殖すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来ＮＫ系細胞を作製するための前記方法は、胚様体を生じず、且つ、単層培養形式である。

【００３６】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を作製するための方法を提供するものであり、前記方法は、（ｉ）ｉＰＳＣを、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、万能性幹細胞からの万能性幹細胞由来中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉ）万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの運命確定ＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉｉ）運命確定ＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；ＲＯＣＫ阻害剤；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を所望により含まない、組成物と接触させて、前記運命確定ＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞からの万能性幹細胞由来運命確定造血内皮の分化および増殖を惹起すること；並びに所望により、播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮を、約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すこと、を含む。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を作製するための上記方法は、ｉＰＳＣを、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記ｉＰＳＣを播種および増殖すること、をさらに含み；且つ／または、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来運命確定造血内皮細胞において保持される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣを運命確定造血内皮細胞に分

化させる上記方法は、胚様体を生じず、且つ、単層培養形式である。

【００３７】

本発明の別の態様は、万能性幹細胞由来造血系多能性前駆細胞を作製するための方法を提供するものであり、前記方法は、（ｉ）ｉＰＳＣを、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させて、ｉＰＳＣからの万能性幹細胞由来中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉ）万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、前記中胚葉細胞からの前記運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化および増殖を惹起すること；（ｉｉｉ）運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物と接触させて、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖を惹起すること；（ｉｖ）運命確定造血内皮を、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させて、運命確定造血内皮のプレＨＳＣへの分化を惹起すること；並びに、（ｖ）プレＨＳＣを、ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含むが、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記プレＨＳＣの造血性多能性前駆細胞への分化を惹起すること；並びに所望により、播種された万能性幹細胞、中胚葉細胞、および／または運命確定造血内皮を、約２％～約１０％の低酸素分圧下にさらすこと、を含む。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来造血多能性前駆細胞を作製するための上記方法は、万能性幹細胞を、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含むが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物と接触させて、前記万能性幹細胞を播種および増殖させること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の遺伝的インプリントを含み、前記ｉＰＳＣに含まれていた前記１または複数の遺伝的インプリントは、それから分化した万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞において保持される。いくつかの実施形態では、上記方法を用いた前記万能性幹細胞の造血多能性前駆細胞への分化は、胚様体を生じず、且つ、単層培養形式である。

【００３８】

本発明のさらなる態様は、本明細書で開示される培養プラットフォームから作製される１または複数の細胞集団を含む組成物を提供するものである：（ｉ）多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞およびＢ細胞への分化能を有し、且つ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－である、万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋運命確定造血内皮（ｉＣＤ３４）；（ｉｉ）ＣＤ３４＋であり、且つ、ＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来運命確定ＨＳＣ；（ｉｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞；（ｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋またはＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞；（ｖｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋またはＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である、Ｔ細胞；（ｖｉｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞；（ｖｉｉｉ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、且つ、所望によりＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞；（ｉｘ）ＣＤ４５＋Ｖａ２４Ｊａ１８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来ＮＫＴ細胞；並びに、（ｘ）ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である、万能性幹細胞由来Ｂ細胞。

【００３９】
本発明のさらに別の態様は、本明細書で開示される方法を用いて作製される１または複数の細胞株、またはクローン細胞を提供するものである：（ｉ）多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫＴ細胞への分化能を有し、且つ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－である、万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋運命確定造血内皮（ｉＣＤ３４）；（ｉｉ）ＣＤ３４＋であり、且つ、ＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来運命確定ＨＳＣ；（ｉｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）；（ｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋またはＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞；（ｖｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋またはＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である、Ｔ細胞；（ｖｉｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞；（ｖｉｉｉ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、且つ、所望によりＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞；（ｉｘ）ＣＤ４５＋Ｖａ２４Ｊａ１８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来ＮＫＴ細胞；並びに、（ｘ）ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である、万能性幹細胞由来Ｂ細胞。

【００４０】
本発明の別の態様は、開示の方法を用いて作製される細胞集団、細胞株またはクローン細胞のうちの１または複数を用いて、造血系の自己複製、再構成および生着を促進する方法を提供するものである：（ｉ）多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫＴ細胞への分化能を有し、且つ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－である、万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋運命確定造血内皮（ｉＣＤ３４）；（ｉｉ）ＣＤ３４＋であり、且つ、ＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来運命確定ＨＳＣ；（ｉｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来造血性多能性前駆細胞；（ｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋またはＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞；（ｖｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋またはＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である、Ｔ細胞；（ｖｉｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞；（ｖｉｉｉ）ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、且つ、所望によりＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、およびＣＤ１６＋をさらなる特徴とする、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞；（ｉｘ）ＣＤ４５＋Ｖａ２４Ｊａ１８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来ＮＫＴ細胞；並びに、（ｘ）ＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である、万能性幹細胞由来Ｂ細胞。

【００４１】
本発明のさらなる態様は、増強された治療特性を有する造血系細胞を作製する方法を提供するものであり、前記方法は、１または複数の遺伝的インプリントを含むｉＰＳＣを得ること；および、ｉＰＳＣを造血系細胞に分化誘導すること、を含む。前記分化誘導段階は、（ｉ）前記万能性幹細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させることで、中胚葉細胞を得ること；並びに、（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤を含む組成物と接触させることで、造血系細胞を与えることが可能な、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得ること、をさらに含む。好ましくは、前記中胚葉細胞および運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞は、段階（ｉ）および段階（ｉｉ）において胚様体形成段階無しで得られ、得られた造血系細胞は、運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＢ細胞を含む。さらに、前記造血系細胞は、分化誘導ための前記ｉＰＳＣに含まれていた前記遺伝的インプリントを保持している。

【００４２】
いくつかの実施形態では、上記方法の分化誘導段階は、（ｉ）前記運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を、ｂＦＧＦおよびＲＯＣＫ阻害剤を含む組成物と接触させることで、運命確定ＨＥ細胞を得ること；（ｉｉ）前記運命確定ＨＥ細胞を、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりＲＯＣＫ阻害剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含む組成物と接触させることで、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得ること；（ｉｉｉ）前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１もしくは複数を含む組成物と接触させることで、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、および／もしくはＴ細胞を得ること；または、（ｉｖ）前記運命確定ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのうちの１もしくは複数を含む組成物と接触させることで、プレＮＫ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、および／もしくはＮＫ細胞を得ること、をさらに含む。

【００４３】
１または複数の遺伝的インプリントを含むｉＰＳＣを得るための１つのアプローチは、１または複数の遺伝子改変されたモダリティを含み、且つ、前記ｉＰＳＣのゲノムにおけるゲノム内挿入、ゲノム内欠失またはゲノム内置換を通じて導入される、１または複数の遺伝的インプリントを、非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の遺伝子編集によってｉＰＳＣに導入すること、であり得る。別のアプローチは、（ｉ）ドナー特異的、疾患特異的、または治療応答特異的であり、且つ、保持可能な治療特性を示す、供給源特異的免疫細胞を得ることによって、１または複数の遺伝的インプリントをｉＰＳＣに導入すること；（ｉｉ）前記供給源特異的免疫細胞をｉＰＳＣに再プログラム化すること；並びに所望により、（ｉｉｉ）前記供給源特異的免疫細胞のｉＰＳＣへの再プログラム化の間または後の遺伝子編集によって、追加の遺伝的インプリントを段階（ｉｉ）のｉＰＳＣに導入すること、であり得る。前記供給源細胞、ｉＰＳＣおよびまたはｉＰＳＣ由来細胞に含まれる前記遺伝子改変されたモダリティに関して、それらは、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含み得る。

【００４４】
いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、$A_{2A}R$、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加のうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、上記の遺伝子改変されたモダリティは、万能性幹細胞由来の運命確定ＨＥ細胞、造血性多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、およびＢ細胞のうちの１または複数において保持される。いくつかの実施形態では、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、１または複数のリンパ系細胞表面受容体に対して特異的であり、且つ、腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である。特定の実施形態では、前記表面上誘発受容体は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的である。ある特定の実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または

多重特異性エンゲージャーに特異的である。いくつかの実施形態では、前記共刺激ドメインはＩＬ２を含む。いくつかの実施形態では、前記リンパ系細胞表面受容体は、表面に発現している改変されたモダリティ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、およびＣＤ８９のうちの１または複数を含み；一方、前記腫瘍特異的抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記供給源特異的免疫細胞の治療特性は、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む。

【００４５】

本発明のさらに別の態様は、増強された治療特性を有し、且つ、派生前の万能性幹細胞に含まれていた同一の遺伝的インプリントを含む、造血系細胞を提供する。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞の遺伝的インプリントは、（ｉ）非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の、万能性細胞のゲノムにおける、ゲノム内の挿入、欠失もしくは置換を通じて得られる、１もしくは複数の遺伝子改変されたモダリティ；または、（ｉｉ）ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的である供給源特異的免疫細胞の１もしくは複数の保持可能な治療特性を含み、前記万能性細胞は前記供給源特異的免疫細胞から再プログラム化されたものである。いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、以下のうちの一つまたは複数を含む：セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質。

【００４６】

いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、$A_{2A}R$、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む。特定の実施形態では、前記表面上誘発受容体は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的である。ある特定の実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体が抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープが前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である。いくつかの実施形態では、前記共刺激ドメインはＩＬ２を含む。さらにいくつかの実施形態では、前記造血系細胞は、以下のうちの一つまたは複数に関連する供給源特異的免疫細胞の治療特性を含む：（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上。

【００４７】

特定の実施形態では、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的であり、且つ、腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記腫瘍特異的抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む。特定の実施形態では、前記供給源特異的免疫細胞の治療特性は、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免

疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む。

【００４８】

特定の実施形態は、万能性幹細胞をＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、およびＲＯＣＫ阻害剤を含む組成物と接触させることで、播種および増殖させた後に、１または複数の遺伝的インプリントをｉＰＳＣに導入することを含む。

【００４９】

特定の実施形態では、前記表面上誘発受容体は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的である。ある特定の実施形態では、普遍的表面上誘発受容体は抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープは前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに特異的である。

【００５０】

いくつかの実施形態では、共刺激ドメインはＩＬ２を含む。

【００５１】

特定の実施形態では、二重特異性または多重特異性エンゲージャーは腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である。

【００５２】

いくつかの実施形態では、前記造血系細胞は、運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、または好中球を含む。いくつかの実施形態では、前記Ｔ細胞は制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ）、幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ）、および／またはエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ）を含む。特定の実施形態では、ＮＫ細胞は獲得ＮＫ細胞を含む。

【００５３】

特定の実施形態では、造血系細胞は、表面受容体に対する１または複数の二重特異性または多重特異性エンゲージャーを含む。いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、ａ）造血系細胞型特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、もしくはＣＤ８９を含む表面受容体に対して特異的である；または、ｂ）普遍的表面上誘発受容体を含む造血系細胞型に非依存的であり、且つ、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的である。

【００５４】

特定の態様は、誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）分化から生じた治療上十分な数のＴ細胞前駆細胞を投与することを含む、細胞治療を必要としている対象を治療する方法に関する。いくつかの実施形態では、前記対象は、（ｉ）骨髄移植もしくは幹細胞移植の候補であるか、化学療法もしくは放射線療法を受けたことがある；（ｉｉ）骨髄破壊的もしくは骨髄非破壊的（non-myeolablative）な化学療法もしくは放射線療法を受けたことがある；（ｉｉｉ）造血系の過剰増殖性疾患もしくはがんを有する；（ｉｖ）固形腫瘍を有する；または、（ｖ）ウイルス感染もしくはウイルス感染と関連した疾患を有し；インビボにおいて、前記投与されたＴ細胞前駆細胞は胸腺を活性化させてＴ細胞を再構成する。いくつかの実施形態では、細胞治療を必要としている対象を治療する前記方法は、ａ）エフェクター細胞型に対して特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、もしくはＣＤ８９を含む表面受容体に対して特異的である；または、ｂ）エフェクター細胞型に対して非依存的であり、且つ、前記Ｔ前駆細胞およびそれから派生したＴ細胞に含まれる普遍的表面上誘発受容体に対して特異的である、二重特異性または多重特異性エンゲージャーを含む医薬組成物を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記供給源特異的免疫細胞からの遺伝的インプリントは、（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）

化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上、のうちの１または複数を含む。

【００５５】

また、薬剤的に許容できる培地、および本明細書に記載の方法を用いて作製された増強された治療特性を有する造血系細胞のうちの１または複数、を含む医薬組成物も提供される。これらの、増強された治療特性を有する造血系細胞としては、運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＢ細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、前記Ｔ細胞は制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ）、幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ）、および／またはエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ）を含む。いくつかの実施形態では、前記ＮＫ細胞は獲得ＮＫ細胞を含む。さらに、自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；がん；またはＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、養子細胞療法に適した対象に組成物を導入することによる、上記医薬組成物の治療用途が提供される。

【００５６】

本発明の別の態様は、以下から選択される少なくとも１つのマーカーに対して特異的な１または複数の抗体を含む抗体組成物を提供し：ＣＣＲ１０、ＣＤ１６４、ＣＤ９５、ＣＤ１４４、ＣＤ１６６、リンフォトキシンβ受容体、ＣＤ２５２、ＣＤ５５、ＣＤ４０、ＣＤ４６、ＣＤ３４０、ＣＤ１１９、ＣＤ１０６、ＣＤ６６ａ／ｃ／ｅ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４５ＲＢ、ＤＬＬ４、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ１１６、ＣＤ３２４、ＣＤ１２３、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ２００、ＣＤ７１、ＣＤ１７２ａ、ＣＤ２１、ＣＤ１８４、ＣＤ２６３、ＣＤ２２１、Ｎｏｔｃｈ４、ＭＳＣ、ＣＤ９７、ＣＤ３１９、ＣＤ６９、ＣＤ３３８、ポドプラニン、ＣＤ１１１、ＣＤ３０４、ＣＤ３２６、ＣＤ２５７、ＣＤ１００、ＣＤ３２、ＣＤ２５３、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ８３、ＧＡＲＰ、ＣＤ１８３、ＣＤ３５７、ＣＤ３１、ＣＤ１６５、ＣＤ１０２、ＣＤ１４６、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ１３、ＣＤ５８、インテグリンα９β１、ＣＤ５１、ＣＤ１０、ＣＤ２０２ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ９、ＣＤ２０１、ＣＤ４７、ＣＤ２６２、ＣＤ１０９、ＣＤ３９、ＣＤ３１７、ＣＤ１４３、インテグリンβ５、ＣＤ１０５、ＣＤ１５５、ＳＳＥＡ－４およびＣＤ９３；前記マーカーは運命確定造血内皮を同定するためのものである。一実施形態では、前記抗体組成物は、ＣＤ９３に対して特異的な抗体を含み；ＣＤ９３に対して特異的な前記抗体と結合した細胞は、ＣＤ３４＋表現型、ＣＤ４３－表現型、ＣＤ７３－表現型、ＣＸＣＲ４－表現型、およびＣＤ７３－ＣＸＣＲ４－表現型のうちの１または複数を有する。

【００５７】

本発明のさらに別の態様は、万能性幹細胞の分化において運命確定造血内皮を特定する方法を提供し、前記方法は、（ｉ）分化中である細胞集団を得ること；（ｉｉ）前記細胞集団にＣＤ９３特異的抗体を導入すること；および（ｉｉｉ）ＣＤ９３発現レベルが１％未満である細胞集団を特定すること、を含む。いくつかの実施形態では、前記分化中である細胞集団は、ＣＤ３４＋細胞またはＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記分化中の細胞集団からＣＤ３４＋細胞を単離すること；または、前記分化中の細胞集団からＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞を単離すること、をさらに含む。

【００５８】

さらに、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を、Ｗｎｔ経路アゴニストを含む培地中で培養することで、運命確定ＨＥ細胞を得ること、を含む、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮を作製する方法が提供される。Ｗｎｔ経路活性化剤の存在下で運命確定ＨＥを得ることによって、Ｗｎｔ経路活性化剤無しでの培養と比較して、細胞集団中のＨＥの数および割合が増加し；ＨＥ分化能が向上し；且つ／または、ＨＥ細胞性が向上する。いくつかの実施形態では、前記培地は、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から

選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは１または複数の上記遺伝的インプリントを含み、前記遺伝的インプリントは前記万能性幹細胞に由来する運命確定ＨＥにおいて保持される。

【００５９】

本発明の特定の態様は、本明細書に記載の方法によって作製される、抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞を対象とする。本発明のある特定の態様は、本明細書に記載の方法によって作製される抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞を含む組成物に関する。本発明のいくつかの態様は、本明細書に記載の方法によって作製される抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞および薬剤的に許容できる培地を含む医薬組成物に関する。

【００６０】

また、抗原特異的な誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）および派生造血系細胞を作製する方法が本明細書で提供され、前記方法は、（ｉ）ドナー特異的、疾患特異的、または治療応答特異的である選択された供給源から初代抗原特異的Ｔ細胞を単離すること；（ｉｉ）前記初代抗原特異的Ｔ細胞を再プログラム化して万能性幹細胞を得ること；および、（ｉｉｉ）前記万能性幹細胞を造血系細胞に分化誘導すること、を含む。いくつかの実施形態では、前記分化誘導段階は、（ｉ）前記万能性幹細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む組成物と接触させることで、中胚葉細胞を得ること；並びに（ｉｉ）前記中胚葉細胞を、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤を含む組成物と接触させることで、胚様体の形成無しに、運命確定造血内皮（ＨＥ）への分化能を有する中胚葉細胞を得ること、を含む。いくつかの実施形態では、前記単離された初代抗原特異的Ｔ細胞は、（ｉ）初代抗原特異的Ｔ細胞を、目的の抗原を発現する目的の抗原を発現する腫瘍細胞、非形質転換細胞、樹状細胞、胸腺上皮細胞、内皮細胞または人工抗原提示細胞、血漿内の粒子もしくはペプチドと共培養すること；または、目的の抗原に特異的なＴ細胞受容体特異的結合剤を用いて、前記初代抗原特異的Ｔ細胞を選別すること、によって濃縮される。いくつかの実施形態では、前記初代抗原特異的Ｔ細胞または濃縮された初代抗原特異的Ｔ細胞を、転写因子または小分子を用いて調節することで、前記細胞を若返らせることができる。

【００６１】

本発明の特定の態様は、本明細書に記載の方法によって作製される、抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞を対象とする。本発明のある特定の態様は、本明細書に記載の方法によって作製される抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞を含む組成物に関する。本発明のいくつかの態様は、本明細書に記載の方法によって作製される抗原特異的なｉＰＳＣまたは派生造血系細胞および薬剤的に許容できる培地を含む医薬組成物に関する。

【００６２】

いくつかの実施形態では、上記方法より得られた前記抗原特異的な万能性幹細胞は、ゲノム内挿入、ゲノム内欠失またはゲノム内置換を介した１または複数の遺伝子改変されたモダリティを含む遺伝的インプリントを含むように再プログラム化される間またはされた後にさらに遺伝子改変され得る。いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；第二もしくは第三の抗原特異性を伝達する細胞表面タンパク質；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質のうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、Ｈ

ＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーは造血系細胞型特異的であり、且つ、ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ６４、またはＣＤ８９から選択される表面受容体に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記表面上誘発受容体は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含む造血系細胞において普遍的である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、造血系細胞型に非依存的であり、且つ、適合する普遍的表面上誘発受容体を含む造血系細胞と結合可能である。いくつかの実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体は抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープは前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーに含まれるエピトープに対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体の共刺激ドメインは、標準（conotical）もしくは非標準(non-conotical)の細胞活性化および／またはエフェクター細胞機能の増強のために、ＩＬ２の全体または一部を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性または多重特異性の普遍的エンゲージャーは腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記腫瘍特異的抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２およびＣＥＡのうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、前記普遍的表面上誘発受容体に対して特異的であり、且つ、腫瘍細胞の表面上の１または複数の腫瘍特異的抗原に対して特異的である。

【００６３】

いくつかの実施形態では、前記抗原特異的ｉＰＳＣ由来造血系細胞は、運命確定造血内皮細胞（ＨＥ）、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、または好中球を含む。

【００６４】

本発明のさらなる態様は、誘導万能性幹細胞およびその派生細胞のクローン性を決定するための方法を提供する。前記通常法は、成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞を再プログラム化して誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得ること；および、前記ｉＰＳＣを得るための前記成熟したＴ細胞またはＢ細胞に含まれていたものと同一の、特定のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成の存在を、前記ｉＰＳＣまたはそれに由来する造血系細胞において検出すること、を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞のものと同一のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を含むｉＰＳＣまたは造血系細胞を単離すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記供給源細胞の再プログラム化の前に、再プログラム化のための成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞を得ること；および、前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞に対して特異的な免疫グロブリン（Ｉｇ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に含まれるＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を決定すること、を含む。

【００６５】

本発明のまたさらに別の態様は、細胞治療においてインビボで養子細胞を追跡する方法を提供し、前記方法は、治療のために養子細胞を与えられている対象から血液、組織、または腫瘍の生検試料を得ること、前記試料中のエフェクター細胞を単離すること；並びに、前記エフェクター細胞のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を決定すること、を含み；前記養子細胞は成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞から再プログラム化された万能性幹細胞に由来し；前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞は特定のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成を含み；前記成熟した供給源Ｔ細胞またはＢ細胞のもとの同一のＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成の存在によって、養子細胞のホーミング、残留性および／または増殖が示される。

【００６６】

また、薬剤的に許容できる培地、並びに、上記方法を用いて作製される前記抗原特異的

な造血系細胞のうちの１または複数を含む医薬組成物が提供され、前記抗原特異的な造血系細胞には、運命確定造血内皮細胞、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＢ細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、前記Ｔ細胞は制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ）、幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ）、および／またはエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ）を含む。いくつかの実施形態では、前記ＮＫ細胞は獲得ＮＫ細胞を含む。さらに、自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；がん；またはＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、養子細胞療法に適した対象に組成物を導入することによる、上記医薬組成物の治療用途が提供される。

【００６７】

要約すると、本発明は、万能性幹細胞からの胚様体形成無しの単層における万能性幹細胞の直接的分化を可能にし、それにより、中胚葉細胞、運命確定ＨＥ、および運命確定ＨＳＣの分化および増殖を達成し、それから、拡張可能な信頼できる様式で、非常に高水準の効率で、他の造血系細胞を得ることができる、方法および組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００６８】

【図１】図１は、誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）の運命確定造血内皮（ｉＨＥ）および多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）への造血分化のための、多段階培養プロセスの模式図を示している。なお、培養液はビトロネクチンがＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）に置換された、完全に定義されたものに変換することができる。

【００６９】

【図２】図２は、誘導万能性幹細胞のＴ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）および完全分化型Ｔ（ｉＴ）細胞への造血分化のための、多段階培養プロセスの模式図を示している。なお、培養液はビトロネクチンがＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）に置換された、完全に定義されたものに変換することができる。

【００７０】

【図３】図３は、誘導万能性幹細胞のＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）および完全分化型ＮＫ（ｉＮＫ）細胞への造血分化のための、多段階培養プロセスの模式図を示している。なお、培養液はビトロネクチンがＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）に置換された、完全に定義されたものに変換することができる。

【００７１】

【図４Ａ】図４Ａ～図４Ｃは、１０日間に亘ってのｉＨＥの出現を示すフローサイトメトリープロファイル、並びに、ｉＰＳＣ分化当たりのｉＣＤ３４細胞およびｉＨＥ細胞の産出量を示している。計算は、代表的な培養物および最適化されていない培養物のスナップショットに基づいている。

【図４Ｂ】同上。

【図４Ｃ】同上。

【００７２】

【図５Ａ】図５Ａ～図５Ｄは、１０日目のＨＥの産出量を向上させるための、播種密度および増殖因子のタイトレーションを含む、前記プロトコルへの修正を示している。Ａ）０日目の播種密度は１０日目のＨＥ集団に影響する。Ｂ）２日目～６日目のＢＭＰ４の濃度は１０日目のＨＥ集団に影響する。Ｃ）３．７５日目のＣＨＩＲの濃度は１０日目のＨＥ集団に影響する。Ｄ）６日目の播種密度は１０日目のＨＥ集団に影響する。

【図５Ｂ】同上。

【図５Ｃ】同上。

【図５Ｄ】同上。

【００７３】

【図６Ａ】図６Ａ～図６Ｂは、１０日目のＨＥが、多分化能を有し且つＮｏｔｃｈシグナ

ル経路に依存的な、二次造血を表すことを示している。Ａ）新生ＣＤ４５造血細胞のフローサイトメトリープロファイルを付随した、７日間に亘るＭＰＰアッセイにおける形態変化。Ｂ）ｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞はｉＭＰＰアッセイ中にＮｏｔｃｈ依存性運命確定ＣＤ４５＋細胞を生じる。

【図６Ｂ】同上。

【００７４】

【図７Ａ】図７Ａ～図７Ｂは、ｉＨＥおよびｉＭＰＰ造血前駆細胞の発生に対する、低酸素条件下での分化の影響を示している。Ａ）低酸素下での単層分化は、１０日目のｉＣＤ３４陽性細胞およびｉＨＥ細胞の両方の割合を増加させる。Ｂ）低酸素条件下で生じた１０日目ｉＣＤ３４＋ＨＥ細胞はｉＭＰＰアッセイでさらに分化が可能である。

【図７Ｂ】同上。

【００７５】

【図８－１】図８Ａ～図８Ｄは、選別された１０日目ｉＣＤ３４細胞の、凍結保存能、並びに、全造血系・リンパ系への分化能を維持する能力を示している。Ａ）凍結保存された１０日目ｉＣＤ３４細胞は、解凍の際、生存し、新鮮なｉＣＤ３４＋細胞に類似した表現型を示すことができる。Ｂ）凍結保存された１０日目の選別ＣＤ３４＋細胞の解凍直後の生存度。Ｃ）凍結保存された１０日目の選別ｉＣＤ３４＋細胞は、ｉＭＰＰアッセイ中に生存してＣＤ４５＋造血細胞を生じることができる。Ｄ）凍結保存された１０日目の選別ｉＣＤ３４＋細胞は、生存してｉＴおよびｉＮＫリンパ球前駆細胞を生じることができる。

【図８－２】同上。

【００７６】

【図９Ａ】図９Ａ～図９Ｂは、１０日目の分化培養物を、ＨＥ分化能を失わせずに、周囲温度で、一晩かけて出荷することが可能であることを示している。Ａ）７日目の培養物を、恒温器内で維持するか（対照）、または、一晩かけた出荷用に加工して恒温器内に再導入し、追加で２日間置いた。１０日目の両方の培養物を、次に、ｉＣＤ３４細胞およびｉＨＥ細胞の存在について解析した。一晩出荷培養物において、Ｔ型フラスコは、３０％の培養液＋７０％の基本培地（base）、または１００％の培養液を含んだ。Ｂ）細胞数の算出。

【図９Ｂ】同上。

【００７７】

【図１０－１】図１０Ａ～図１０Ｃは、ＣＤ４５＋ＣＤ５６－ゲーティング戦略を利用したｈｉＰＳＣから派生した、初期ＣＤ３４＋ＣＤ７＋Ｔ細胞前駆細胞および成熟型ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞サブセットを示している。Ａ）初期Ｔ細胞系譜マーカーはＣＤ３４＋／ＣＤ７＋によって定義されるｉｐｒｏ－Ｔ細胞の存在を標識する。Ｂ）成熟Ｔ細胞マーカーはＣＤ４＋またはＣＤ８＋細胞によって定義される成熟Ｔ細胞の存在を標識する。Ｃ）臍帯血由来ＣＤ３４陽性細胞とｉＣＤ３４陽性細胞との、ｉｐｒｏ－Ｔ細胞を生じる分化能が比較される、５日間のＴ細胞分化。

【図１０－２】同上。

【００７８】

【図１１Ａ】図１１Ａ～図１１Ｃは、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を利用したｈｉＰＳＣから派生した、初期ＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＣＤ１６１＋ＮＫ細胞前駆細胞および成熟ＣＤ５６＋ＣＤ１６＋ＣＤ８＋ＮＫ細胞サブセットを示している。Ａ）初期ＮＫ系譜マーカーはＣＤ７およびＣＤ５６によって定義されるｉｐｒｏ－ＮＫ細胞の存在を標識する。Ｂ）成熟ＮＫ系譜マーカーはＣＤ５７、ＣＤ１６、ＣＤ９４およびＣＤ５６によって定義される成熟ＮＫ細胞の存在を標識する。Ｃ）臍帯血由来ＣＤ３４陽性細胞とｉＣＤ３４陽性細胞との、ｉｐｒｏ－ＮＫ細胞を生じる分化能が比較される、５日間のＮＫ細胞分化。

【図１１Ｂ】同上。

【図１１Ｃ】同上。

【００７９】

【図１２Ａ】図１２Ａ～図１２Ｃは、単層ｈｉＰＳＣ造血分化プラットフォームが、ＥＢ形成中に見られない、拡張可能な増殖戦略を可能にすることを示している。Ａ．　ｈｉＰＳＣを凝集して、胚様体を形成させ、１４日間分化させた後、ＣＤ３４およびＣＤ４３の発現について解析した。Ｂ．　ｈｉＰＳＣを単層に播種し、８日間分化させた後、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＸＣＲ４およびＣＤ７３について解析した。Ｃ．　単層造血分化およびＥＢを介した造血分化の両方について、経時的にＣＤ３４陽性細胞を計数してプロットした。
【図１２Ｂ】同上。
【図１２Ｃ】同上。
【００８０】
【図１３】図１３は、オフザシェルフのｉＮＫ細胞およびｉＴ細胞の生産のための、単層ｈｉＰＳＣ造血分化プラットフォームの拡張可能な増殖戦略の模式図を例示している。計算は、代表的な培養物および最適化されていない培養物(not optimized culture)のスナップショットに基づいている。
【００８１】
【図１４】図１４は、ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４陽性細胞が、ＣＤ３＋Ｔ細胞生存の抑制により、免疫制御特性を有することを示している。
【００８２】
【図１５】図１５は、ＣＤ４５＋ＣＤ５６－ゲーティング戦略を用いた、ＨＥ単離から３０日後のｈｉＰＳＣに由来する、成熟ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞サブセットを示している。
【００８３】
【図１６】図１６は、フィーダーベースの浮遊培養がｉＣＤ３４由来ＮＫ細胞の成熟を支持することを示している。
【００８４】
【図１７】図１７は、ｉＣＤ３４由来ｉＮＫが、末梢血ＮＫ細胞と同様に、サイトカイン刺激に応答して、炎症誘発性サイトカインを分泌し得ることを示している。
【００８５】
【図１８】図１８は、臍帯血ＣＤ３４陽性細胞由来のｐｒｏ－ＮＫ細胞の無間質分化が、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を用いる従来の間質ベースの分化プラットフォームよりも迅速であることを示している。
【００８６】
【図１９】ＮＫ細胞に向けたｉＰＳＣ由来ｉＣＤ３４＋細胞の無間質分化。プレートに結合したＤＬＬ４は、ＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＣＤ１６１＋ＮＫ細胞前駆細胞の分化を支持するが、ＣＤ１１ｂ＋骨髄性細胞の分化は支持しない。
【００８７】
【図２０】図２０は、Ｔ細胞に向けたＵＣＢ　ＣＤ３４＋細胞の無間質分化を示している。
【００８８】
【図２１】図２１は、Ｔ細胞に向けたｉＰＳＣ由来ｉＣＤ３４＋細胞の無間質分化を示している。
【００８９】
【図２２】図２２は、ｈｉＰＳＣ由来ｉＣＤ３４＋細胞の再構成および生着を示している。
【００９０】
【図２３】図２３Ａ～図２３Ｂは、ｉＰＳＣ由来ＮＫ細胞が、細胞刺激に応答して炎症誘発性サイトカインを分泌し、末梢血ＮＫ細胞および臍帯血ＮＫ細胞と同等の細胞傷害機能を有することを示している。Ａ．　ｉＰＳＣ由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）または末梢血由来ＮＫ細胞（ｐｂＮＫ）を、非刺激（ＵＳ）または１：１比のフィーダー細胞による刺激に４時間曝し、その後収集し、ＣＤ４５、ＣＤ５６、およびＴＮＦ－αについて染色し、フロ

ーサイトメトリーで解析した。Ｂ．　１：１、３：１および１０：１のエフェクター細胞対標的細胞比の、ｉＮＫ細胞または臍帯血由来（ＣＢＮＫ）細胞の細胞傷害機能を、２時間毎に９０時間評価した。

【００９１】

【図２４】図２４は、ＦＴＶ１０６を形質導入されたＴ細胞由来のｉＰＳＣにおけるＣＡＲ（ＦＴＶ１０６）組込みのＰＣＲ分析によって、ＣＡＲ－Ｔ細胞の、供給源Ｔ細胞の同じ遺伝的インプリントを保持するｉＰＳＣ（ＴｉＰＳＣ）への再プログラム化を示している。

【００９２】

【図２５】図２５は、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ゲーティング戦略を用いたｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞の細胞表面抗体スクリーニング、およびｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋抗体スクリーニングのワークフローを示しており、３つの別個の分類の代表的な結果が示されている。クラスＩマーカーには、ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞上で１％未満の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。クラスＩＩマーカーには、ＣＤ３４＋細胞上で１％～９９％の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。クラスＩＩＩマーカーには、ＣＤ３４＋細胞上で９９％超の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。

【００９３】

【図２６－１】図２６は、ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞上の細胞表面タンパク質発現の解析に用いられた抗ヒト抗体を示している。

【図２６－２】同上。

【００９４】

【図２７】図２７は、ＣＤ３４＋集団内のＣＤ９３マーカーの発現；並びに、ＣＤ３４＋細胞のＣＤ３４＋ＣＤ９３－画分およびＣＤ３４＋ＣＤ９３＋画分におけるＣＸＣＲ４およびＣＤ７３の発現を示している。

【００９５】

【図２８】図２８Ａ～図２８Ｂは、ＣＤ３４＋集団の運命確定造血分化能がＣＤ９３－画分に濃縮されることを示している。Ａ．　ＣＤ３４＋ＣＤ９３－集団からの１０日間のｉＮＫ細胞分化の後、ＣＤ４５＋造血細胞およびＣＤ４５＋ＣＤ７＋リンパ球前駆細胞の絶対数を評価した。Ｂ．　さらに１０日間のｉＮＫ分化の後、ＣＤ５６マーカーおよびＮＫｐ３０マーカーの発現によって、ｉＮＫ細胞の存在について培養物を評価した。

【００９６】

【図２９】図２９Ａ～図２９Ｂは、ＷＮＴシグナル伝達の調節がｉＣＤ３４細胞の産出量を向上させることを示している。Ａ．　６日目の細胞培養物をＧＳＫ３阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１、Ｗｎｔアゴニスト、またはＷＮＴ阻害剤ＩＷＰ２の存在下で分化させた。Ｂ．　ＣＨＩＲ９９０２１はＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－ＨＥ表現型の数および割合を増加させた。

【００９７】

【図３０】図３０Ａ～図３０Ｂは、ＷＮＴシグナル伝達の調節がｉＣＤ３４細胞からの全造血系・リンパ系の産出量を向上させることを示している。Ａ．　ＣＨＩＲ９９０２１は調節されたＨＥからのＣＤ４５＋細胞の産生を増加させた。Ｂ．　ＣＨＩＲ９９０２１は調節されたＨＥからのＮＫ前駆細胞の産生を増加させた。

【００９８】

【図３１】図３１は、ｉＰＳＣにおけるＢ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）の欠失が、ＨＬＡクラスＩ遺伝子の発現欠如をもたらしたことを示している。

【００９９】

【図３２－１】図３２Ａ～図３２Ｄは、ＨＬＡクラスＩヌルｉＰＳＣが、ｉＣＤ３４ＨＥに分化し、さらに、全ての造血系およびリンパ系の前駆細胞に分化できることを示している。Ａ．　Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣおよび野生型ｉＰＳＣを１０日間分化させて、ＨＥを発生させた。Ｂ．　Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣは、野生型対照と同様の頻度でＣＤ３４＋ＨＥに分化可能である。Ｃ．　Ｂ２Ｍ－／－ＨＥは、野生型ＨＥと同様の効率でＣＤ４５＋全造

血前駆細胞を発生可能である。Ｄ．　Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣ由来ＨＥ細胞は、野生型ＨＥと同様の効率でｉＮＫ前駆細胞を発生可能である。
【図３２－２】同上。
【０１００】
【図３３】図３３は、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣから分化したＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥがＨＬＡクラスＩヌルのままであることを示している。
【０１０１】
【図３４Ａ】図３４Ａ～図３４Ｂは、ｉＰＳＣ上のＨＬＡクラスＩの調節が免疫応答性レシピエントにおけるｉＰＳＣの残留性を増加させることを示している。Ａ．　遺伝子導入されたＨＬＡ改変ｉＰＳＣは、細胞表面上にＨＬＡ－Ｅを発現し、万能性表現型を維持している。Ｂ．　インビボにおける、野生型ｉＰＳＣと比較して増加した残留性を示すＢ２Ｍ－／－ＨＬＡＥ　ｉＰＳＣの注射後７２時間の時点における奇形腫のルシフェリンイメージング。
【図３４Ｂ】同上。
【０１０２】
【図３５】図３５は、ＨＬＡ－Ｅ発現が、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣ由来の１０日目（ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥ細胞）分化細胞および１７日目（ＣＤ４５＋全造血前駆細胞）分化細胞の両方で保持されていることを示している。
【０１０３】
【図３６－１】図３６Ａ～図３６Ｃは、ＨＬＡクラスＩ調節ｉＰＳＣが機能的なＣＤ３４＋ＨＥを発生可能であることを示している。Ａ．は、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣが野生型対照と同様の頻度でＣＤ３４＋ＨＥに分化可能であることを示している。Ｂ．は、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣが野生型対照と同等の数でＣＤ３４＋ＨＥに分化可能であることを示している。Ｃ．　Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ＨＥは、野生型ＨＥと同様の効率でＣＤ４５＋全造血前駆細胞を発生可能である。
【図３６－２】同上。
【０１０４】
【図３７Ａ】図３７Ａ～図３７Ｂは、高親和性ＣＤ１６受容体および４１ＢＢＬ共起刺激分子を発現するように遺伝子改変されたｉＰＳＣがｉＣＤ３４細胞への分化の間ずっと発現を保持することを示している。Ａ．　０日目の未分化細胞。Ｂ．　１０日目の分化細胞。
【図３７Ｂ】同上。
【０１０５】
【図３８Ａ】図３８Ａ～図３８Ｂは、ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）およびＣＡＲの共通識別子としての切断型ＬＮＧＦＲ細胞表面マーカーを発現するように遺伝子改変されたｉＰＳＣが、ｉＣＤ３４細胞への分化を通じて発現を保持することを示している。Ａ．　０日目の未分化細胞。Ｂ．　１０日目の分化細胞。
【図３８Ｂ】同上。
【０１０６】
【図３９】図３９は、内在性ＴＣＲプロモーターによって駆動されるＣＡＲの細胞型特異的な発現、並びに、ＣＡＲの遺伝子座特異的挿入によるＴＣＲの発現および機能のノックアウトを示している。
【０１０７】
【図４０】図４０Ａ～図４０Ｂは、がんおよび他の疾患を標的とするＴ細胞を、全エフェクターレパートリーとエンゲージするための、オフザシェルフ標的戦略を示している。Ａ．　特異的な標的細胞を認識するエンゲージャーに結合可能な、各々の系譜特異的誘発分子を有する、ｉＰＳＣ由来造血エフェクター細胞の図示。Ｂ．　全ての派生造血細胞上で遍在性に発現される、普遍的エンゲージャー（特異的抗エピトープ結合を含む特異的且つ系譜非依存的な誘発分子）の改変の図示。
【０１０８】

【図４１】図４１は、ＨＡＣＤ１６受容体を発現するよう遺伝子改変されたｉＰＳＣが、２０日目ｉＮＫ細胞への分化を通じて、発現を保持することを示している。
【発明を実施するための形態】
【０１０９】
本発明は、全体として、運命確定造血細胞への予定運命に向けて幹細胞を分化させるための方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、様々な発生段階のｉＰＳＣまたはｉＰＳＣ由来細胞が、運命確定造血内皮から、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、およびＮＫ細胞を包含する完全分化型造血細胞にまで及ぶ、運命確定造血系表現型をとるように誘導され得る、多段階分化用プラットフォームを提供する。すなわち、本発明は、細胞を、確定的な造血系予定運命（例えばＣＤ３４＋運命確定造血幹細胞）によりなり易くさせるための、方法および組成物を提供する。あるいは、本発明の方法および組成物は、ＥＢまたは凝集塊の形成を避けることにより、拡張可能な様式で、ナイーブ型ｉＰＳＣから運命確定造血内皮（ＨＥ）を発生させる。

Ａ．定義
【０１１０】
別に規定していない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、この発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと同様の意味を有する。本発明のために、以下の用語を以下で規定する。冠詞“ａ”、“ａｎ”及び“ｔｈｅ”は、本明細書では、冠詞の文法上の対象のうちの１つ又は複数（すなわち、少なくとも１つ）に言及するために用いる。例としては、“要素（ある要素）”は、１つの要素又は複数の要素を意味する。
【０１１１】
択一（例えば、「又は（or）」）の使用は、選択肢のうちの１つ、両方又は任意のそれらの組み合わせのうちのいずれかを意味するということを理解されたい。
【０１１２】
用語「及び／又は」は、選択肢のうちの１つ又は両方のいずれかを意味するということを理解されたい。
【０１１３】
本明細書で使用する場合、用語「約」又は「概ね」は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さと比べて１５％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％又は１％程度異なる、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さをいう。一実施形態では、用語「約」又は「概ね」は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さの前後±１５％、±１０％、±９％、±８％、±７％、±６％、±５％、±４％、±３％、±２％又は±１％である、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さの範囲をいう。
【０１１４】
本明細書で使用する場合、用語「実質的に」又は「本質的に」は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さと比べて約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％以上である、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さをいう。一実施形態では、用語「本質的に同一」又は「実質的に同一」は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さとほぼ同一である、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、大きさ、量、重量又は長さの範囲をいう。
【０１１５】
本明細書で使用される場合、用語「～を実質的に含まない」および用語「～を本質的に含まない」は同義的に使用され、細胞集団または培地等の組成物の記述に使用される場合、特定の物質もしくはその供給源を含まない、例えば、特定の物質もしくはその供給源の９５％を含まない、９６％を含まない、９７％を含まない、９８％を含まない、９９％を

含まない、または、常法で測定された場合に検出不能である、組成物を指す。また、組成物中にある特定の成分または物質「を含まない」または「を本質的に含まない」という用語は、係る成分または物質が、（１）いかなる濃度においても前記組成物中に含まれないこと、または、（２）機能的に不活性な低濃度で前記組成物中に含まれること、を意味する。組成物の特定の物質またはその供給源が存在しないことを指す、用語「～が存在しない（absence of）」にも、同様の意味が当てはまる。

【０１１６】

本明細書で使用される場合、用語「感知できる（appreciable）」とは、１または複数の標準方法により容易に検出可能な、数量（quantity）、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、大きさ、量（amount）、重量もしくは長さの範囲、または事象を指す。用語「感知できない（not-appreciable）」および「感知できない（not appreciable）」およびその同意語は、標準方法によって容易に検出可能でない、または検出不可な、数量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、大きさ、量、重量もしくは長さの範囲、または事象を指す。一実施形態では、ある事象が５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、１％未満、０．１％未満、０．０１％未満、０．００１％未満またはそれ以下の確率で起こる場合、その事象を感知できない。

【０１１７】

本明細書を通して、別の解釈が必要な文脈でない限り、「備える（含む）」及び「備えた（含んだ）」という文言は、記載されているステップ又は要素又はステップもしくは要素の群を包含するが、その他のステップ又は要素又はステップもしくは要素の群を除外しないことを示唆していると理解されるであろう。特定の実施形態では、用語「含む」、「有する」、「含有する」及び「備える」は同義的に用いる。

【０１１８】

「～からなる」とは、「～からなる」という句の前に記載したもの全てを含み、それに限定されることを意味する。そのため、「～からなる」という句は、列記した要素が必要又は必須であり、他の要素は存在し得ないということを示唆する。

【０１１９】

「本質的に～からなる」とは、この句に前に列記した要素と、該列記した要素への開示において特定されている動作又は作用に対して介入又は寄与しないような他の要素に限定される要素とであるあらゆる要素を含むことを意味する。すなわち、「本質的に～からなる」という句は、列記した要素を必要又は必須とするが、その他の要素は随意であって、列記した要素の動作又は作用にそれらが影響するか否かに応じて、存在してもよく又は存在しなくてもよい。

【０１２０】

本明細書全体にわたって「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連の実施形態」、「或る実施形態」、「付加的な実施形態」もしくは「さらなる実施形態」、又はそれらの組み合わせを参照することは、その実施形態に関連して記載した特定の特徴、構造又は特性を、本発明の少なくとも１つの実施形態に含むことを意味する。そのため、この明細書全体にわたって様々な箇所で上述の句が登場するが、必ずしも、全てが同一の実施形態を指すものではない。また、特定の特徴、構造又は特性は、１つ又は複数の実施形態で、任意の好適な方法において組み合わせることができる。

【０１２１】

用語「生体外（ex vivo）」は、概して、好ましくは天然条件との違いを最小限にした有機体外の人工的な環境における生体組織内又は生体組織上で成される実験又は測定などである、有機体外で実行する活動をいう。特定の実施形態では、「生体外」手順は、有機体から取得し、通常無菌状態下で実験室の装置内において、典型的には数時間又は最大で約２４時間であるが、状況に応じて最大４８時間又は７２時間、培養した生体細胞又は組織を必要とする。或る実施形態では、かかる組織又は細胞は、回収して凍結させ、その後生体外処理のために解凍させることができる。生体細胞又は組織を用いる、数日より長く続く組織培養実験又は手順は、典型的には「管内（in vitro）」とみなされるが、或る実

施形態では、この用語を生体外と区別なく用いることがある。

【０１２２】

用語「生体内（in vivo）」は、概して、有機体内で行われる活動をいう。

【０１２３】

本明細書で使用される場合、用語「原始線条」は、原腸形成または三胚葉（中胚葉、内胚葉および外胚葉）の形成が始まる初期胚構造を指す。

【０１２４】

本明細書で使用される場合、用語「中胚葉」とは、初期胚形成期に現れ、循環系の血液細胞、筋肉、心臓、真皮、骨格、並びに他の支持組織および結合組織を含む、種々の特殊化した細胞型を生じる、３つの胚葉のうちの１つを指す。

【０１２５】

本明細書で使用される場合、用語「運命確定造血内皮（definitive hemogenic endothelium）」（ＨＥ）または「万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（pluripotent stem cell-derived definitive hemogenic endothelium）」（ｉＨＥ）とは、内皮造血転換（endothelial-to-hematopoietic transition）と称されるプロセスにおいて造血幹細胞・前駆細胞を生じる内皮細胞のサブセットを指す。胚における造血細胞の発生は、側板中胚葉から、血管芽細胞を介して、運命確定造血内皮および造血前駆細胞まで、順次進行する。

【０１２６】

用語「造血幹細胞」、または「運命確定造血幹細胞（definitive hematopoietic stem cell）」とは、本明細書で使用される場合、成熟骨髄系細胞型、並びにＴ細胞、ナチュラルキラー細胞およびＢ細胞を含む成熟リンパ系細胞型の両方を生じることが可能なＣＤ３４＋幹細胞を指す。

【０１２７】

本明細書で用いる場合、用語「初期化（reprogramming）」又は「脱分化（dedifferentiation）」又は「細胞能力（cell potency）の増加」又は「発生能（developmental potency）の増加」は、細胞の能力を増加させる方法又は細胞を低分化状態に脱分化させる方法をいう。例えば、増加した細胞能力を有する細胞は、非初期化状態にある同一細胞と比較して、発生上の可塑性がより高い（すなわち、より多くの細胞型に分化可能）。すなわち、非初期化状態にある同一細胞よりも低分化状態である細胞が、初期化細胞である。

【０１２８】

本明細書で使用される場合、用語「分化」は、特殊化されていない（「運命決定されていない（uncommitted）」）、または特殊化の程度が低い細胞が、例えば血液細胞または筋細胞等の特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した、または分化誘導された細胞は、細胞の系譜内で、より特殊化された（「運命決定された」）位置付けとなった細胞である。用語「運命決定された（committed）」とは、分化の過程に適用される場合、通常の状況下で、特定の細胞型または細胞型サブセットに分化し続け、且つ、通常の状況下で、異なる細胞型に分化できない、または、より分化程度の低い細胞型に戻ることができない、ポイントにまで分化経路を進んだ細胞を指す。

【０１２９】

本明細書で使用される場合、用語「分化マーカー遺伝子」または「分化遺伝子」は、万能性細胞等の細胞内で細胞分化が起こっていることをその発現によって示す遺伝子を指す。分化マーカー遺伝子として、以下の遺伝子が挙げられるが、これらに限定はされない：ＦＯＸＡ２、ＦＧＦ５、ＳＯＸ１７、ＸＩＳＴ、ＮＯＤＡＬ、ＣＯＬ３Ａ１、ＯＴＸ２、ＤＵＳＰ６、ＥＯＭＥＳ、ＮＲ２Ｆ２、ＮＲ０Ｂ１、ＣＸＣＲ４、ＣＹＰ２Ｂ６、ＧＡＴＡ３、ＧＡＴＡ４、ＥＲＢＢ４、ＧＡＴＡ６、ＨＯＸＣ６、ＩＮＨＡ、ＳＭＡＤ６、ＲＯＲＡ、ＮＩＰＢＬ、ＴＮＦＳＦ１１、ＣＤＨ１１、ＺＩＣ４、ＧＡＬ、ＳＯＸ３、ＰＩＴＸ２、ＡＰＯＡ２、ＣＸＣＬ５、ＣＥＲ１、ＦＯＸＱ１、ＭＬＬ５、ＤＰＰ１０、ＧＳＣ、ＰＣＤＨ１０、ＣＴＣＦＬ、ＰＣＤＨ２０、ＴＳＨＺ１、ＭＥＧＦ１０、ＭＹＣ、ＤＫＫ１、ＢＭＰ２、ＬＥＦＴＹ２、ＨＥＳ１、ＣＤＸ２、ＧＮＡＳ、ＥＧＲ１、ＣＯＬ３Ａ１、ＴＣＦ４、ＨＥＰＨ、ＫＤＲ、ＴＯＸ、ＦＯＸＡ１、ＬＣＫ、ＰＣＤＨ７、ＣＤ１Ｄ

ＦＯＸＧ１、ＬＥＦＴＹ１、ＴＵＪ１、Ｔ遺伝子（ブラキウリ）、ＺＩＣ１、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ２、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ９、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ４、ＰＡＸ５、ＲＢＰＪ、ＲＵＮＸ１、ＳＴＡＴ１およびＳＴＡＴ３。

【０１３０】

本明細書で使用される場合、用語「分化マーカー遺伝子プロファイル」または「分化遺伝子プロファイル」、「分化遺伝子発現プロファイル」、「分化遺伝子発現シグネチャー」、「分化遺伝子発現パネル」、「分化遺伝子パネル」、または「分化遺伝子シグネチャー」は、複数の分化マーカー遺伝子の発現または発現レベルを指す。

【０１３１】

本明細書で使用される場合、用語「分化能（potency）」とは、その細胞が到達できる全ての発生上の選択肢の和（すなわち、発生能）を指す。一連の分化能には、全能性細胞（totipotent cell）、万能性細胞（pluripotent cell）、多能性細胞（multipotent cell）、少能性細胞（oligopotent cell）、単能性細胞（unipotent cell）、および高分化型細胞が含まれるが、これらに限定はされない。

【０１３２】

本明細書で使用される場合、用語「万能性」とは、身体（body）または体細胞（soma）（すなわち、胚本体（embryo proper））の全ての系譜を形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、外胚葉、中胚葉、および内胚葉の三胚葉のそれぞれから細胞を形成することが可能な万能性幹細胞の一種である。万能性は、完全な生物を生じることができない不完全または部分的万能性細胞（例えば、エピブラスト幹細胞またはＥｐｉＳＣ）から、完全な生物を生じることができるより原始的でより万能性の細胞（例えば、胚性幹細胞）まで及ぶ、一連の発生能である。

【０１３３】

本明細書で使用される場合、用語「誘導万能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）」、またはｉＰＳＣ、とは、３つ全ての胚葉または皮層（中胚葉、内胚葉、および外胚葉）の組織に分化可能な細胞へと、誘導または変化、すなわち再プログラム化された、分化型の成熟した新生児期細胞または胎生期細胞から作製された、幹細胞を意味する。作製されたｉＰＳＣは、それが天然に存在する場合の細胞を指さない。ｉＰＳＣは、本明細書で使用される場合、ゲノム改変ｉＰＳＣ、または優先的な（preferential）ドナーもしくは患者の免疫細胞から再プログラム化されたｉＰＳＣ、を包含し、すなわち、特有の遺伝的インプリントが、前記ｉＰＳＣ、および／または派生リンパ系エフェクター細胞に含まれる。

【０１３４】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝的インプリント（genetic imprint）」とは、供給源である細胞またはｉＰＳＣにおける優先的な治療的特性に寄与し、且つ、前記供給源細胞に由来するｉＰＳＣおよび／または前記ｉＰＳＣに由来する造血系細胞において保持可能な、遺伝的または後成的な情報を指す。本明細書で使用される場合、「供給源細胞（source cell）」は、再プログラム化を通じたｉＰＳＣの作製に使用され得る非万能性細胞であり、供給源細胞に由来するｉＰＳＣは、あらゆる造血系細胞を包含する特定の細胞型にさらに分化し得る。文脈によっては、供給源細胞に由来するｉＰＳＣ、およびそれからの分化細胞は、まとめて「派生細胞（derived cell）」と呼ばれる場合がある。本明細書で使用される場合、優先的な治療的特性を与える遺伝的インプリントは、ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的な選択された供給源細胞の再プログラム化を通じて、または、ゲノム編集を用いたｉＰＳＣへの遺伝子改変様式の導入を通じて、ｉＰＳＣに組み込まれる。具体的に選択されたドナー状況、疾患状況または治療状況から得られる供給源細胞の局面において、優先的な治療的特性に寄与している遺伝的インプリントは、根底にある分子現象が特定されているかどうかにかかわらず、選択された供給源細胞の派生細胞に受け継がれた、保持可能な表現型、すなわち優先的な治療的特性を顕在化させる、あらゆる状況特有の遺伝子改変またはエピジェネティックな改変を含み得る。ドナー

特異的、疾患特異的、または治療応答特異的な供給源細胞は、ｉＰＳＣおよび派生造血系細胞において保持可能な遺伝的インプリントを含み得るが、この遺伝的インプリントとしては、限定はされないが、所定の単一特異的ＴＣＲ、例えば、ウイルス特異的Ｔ細胞またはインバリアントナチュラルキラーＴ（ｉＮＫＴ）細胞からのもの；追跡可能且つ望ましい遺伝子多型、例えば、選択されたドナーにおける高親和性ＣＤ１６受容体をコードする点変異についてホモ接合性のもの；並びに、所定のＨＬＡ要求、すなわち、個体群が増加したハプロタイプを示す、選択されたＨＬＡに適合したドナー細胞が挙げられる。本明細書で使用される場合、優先的な治療的特性には、移植の改善、輸送の改善、ホーミングの改善、生存度の改善、自己複製の改善、残留性の改善、免疫応答の制御および調節の改善、生存の改善、並びに派生細胞の細胞毒性の改善が包含される。優先的な治療的特性は、抗原標的化受容体の発現；ＨＬＡ提示またはその欠如；腫瘍内微小環境に対する耐性；傍観者免疫細胞（bystander immune cell）および免疫調節の誘導；腫瘍外効果（off-tumor effect）の減少に伴う、対標的特異性（on-target specificity）の向上；化学療法等の治療に対する耐性にも関連し得る。

【０１３５】

用語「増強された治療的特性」とは、本明細書で使用される場合、同一の通常の細胞型の典型的な免疫細胞と比較した場合に、増強された細胞の治療的特性を指す。例えば、「増強された治療的特性」を有するＮＫ細胞は、典型的な、無改変の、および／または自然発生的なＮＫ細胞と比較した場合に、増強、改善、且つ／または増大された治療的特性を有する。免疫細胞の治療的特性には、細胞の移植、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、生存、並びに細胞毒性が包含され得るが、これらに限定はされない。免疫細胞の治療的特性は、以下によっても顕在化される：抗原標的化受容体発現；ＨＬＡ提示またはその欠如；腫瘍内微小環境に対する耐性；傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；化学療法等の治療に対する耐性。

【０１３６】

本明細書で使用される場合、用語「エンゲージャー（engager）」は、免疫細胞、例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、好中球と、腫瘍細胞との間の連結形成；および免疫細胞の活性化、が可能な分子、例えば融合ポリペプチド、を指す。エンゲージャーの例としては、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、二重特異性キラー細胞エンゲージャー（ＢｉＫＥ）、三重特異性キラー細胞エンゲージャー、もしくは多重特異性キラー細胞エンゲージャー、または複数の免疫細胞型と適合する汎用エンゲージャー（universal engager）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１３７】

本明細書で使用される場合、用語「表面上誘発受容体（surface triggering receptor）」は、免疫応答、例えば細胞傷害反応、を誘発または惹起することができる受容体を指す。表面上誘発受容体は操作されている場合があり、エフェクター細胞上、例えばＴ細胞上、ＮＫ細胞上、ＮＫＴ細胞上、Ｂ細胞上、マクロファージ上、好中球上に発現され得る。いくつかの実施形態では、表面上誘発受容体は、エフェクター細胞の天然の受容体および細胞型とは無関係に、二重特異性抗体または多重特異性抗体による、エフェクター細胞と特異的な標的細胞（例えば腫瘍細胞）との間の結合を促進する。このアプローチを用いて、普遍的な表面上誘発受容体を含むｉＰＳＣを作製した後、係るｉＰＳＣを普遍的な表面上誘発受容体を発現する種々のエフェクター細胞型の集団に分化させてよい。「普遍的（universal）」とは、表面上誘発受容体が、細胞型とは無関係にあらゆるエフェクター細胞で発現され、それを活性化し得ること、並びに、普遍的な受容体を発現する全てのエフェクター細胞が、エンゲージャーの腫瘍結合特異性にかかわらず、表面上誘発受容体によって認識可能な同じエピトープを有するエンゲージャーに共役または連結され得ること、を意味している。いくつかの実施形態では、普遍的な表面上誘発受容体との共役のために、同じ腫瘍標的特異性を有するエンゲージャーが用いられる。いくつかの実施形態では、普遍的な表面上誘発受容体との共役のために、異なる腫瘍標的特異性を有するエンゲー

ジャーが用いられる。従って、１または複数のエフェクター細胞型を結合させることで、一部の例では特定の１種の腫瘍細胞を死滅させることができ、他の一部の例では２種以上の腫瘍を死滅させることもできる。表面上誘発受容体は、通常、エフェクター細胞活性化およびエンゲージャーのエピトープに対して特異的な抗エピトープのための共刺激ドメインを含む。二重特異性エンゲージャーは、一方の端で表面上誘発受容体の抗エピトープに対し特異的であり、もう一方の端で腫瘍抗原に対し特異的である。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、用語「セーフティ・スイッチタンパク質（safety switch protein）」とは、細胞療法の潜在的な毒性またはさもなくば有害作用を防ぐように設計された、操作されたタンパク質を指す。場合によって、セーフティ・スイッチタンパク質の発現は、セーフティ・スイッチタンパク質をコードする遺伝子をそのゲノム内に永続的に組み入れた、移植された被操作細胞に関する安全性の懸念に対処するために、条件的に制御される。この条件的制御は、変じ得るものであり、小分子介在性の翻訳後活性化および組織特異的且つ／または時間的な転写制御を介した制御を包含し得る。前記セーフティ・スイッチは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、ＤＮＡ複製、増殖停止、転写性および転写後の遺伝的調節、並びに／または抗体を介した枯渇を媒介し得る。場合によって、セーフティ・スイッチタンパク質は、活性化された場合に治療用細胞のアポトーシスおよび／または細胞死を引き起こす、外来性分子（例えばプロドラッグ）によって活性化される。セーフティ・スイッチタンパク質の例としては、カスパーゼ９、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、Ｂ細胞ＣＤ２０、改変ＥＧＦＲ等の自殺遺伝子、およびこれらのあらゆる組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。この戦略では、有害事象の場合に投与されるプロドラッグは、自殺遺伝子産物によって活性化され、形質導入細胞を死滅させる。

【０１３９】

本明細書で使用される場合、用語「薬剤的に活性なタンパク質またはペプチド」とは、生物に対し生物学的および／または薬剤的な効果を達成することが可能な、タンパク質またはペプチドを指す。薬剤的に活性なタンパク質は、疾患に対する治癒的な、治療的な、または対症的な性質を有し、疾患の重症度を改善、軽減、緩和、逆転（reverse）または低減するために投与され得る。薬剤的に活性なタンパク質は、予防的な性質も有し、疾患の発生を予防するために、または、実際に発病した場合にそのような疾患もしくは病的状態の重症度を低減するために、使用される。薬剤的に活性なタンパク質として、タンパク質全体もしくはペプチド全体またはその薬剤的に活性な断片が包含される。タンパク質もしくはペプチドの薬剤的に活性な類似体、またはタンパク質もしくはペプチドの断片の類似体も包含される。薬剤的に活性なタンパク質という用語は、協同的または相乗的に作用して治療効果をもたらす、複数のタンパク質またはペプチドのことも指す。薬剤的に活性なタンパク質またはペプチドの例としては、受容体、結合タンパク質、転写因子および翻訳因子、腫瘍成長抑制タンパク質、抗体もしくはその断片、増殖因子、並びに／またはサイトカインが挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１４０】

本明細書で使用される場合、用語「シグナル伝達分子」とは、細胞間情報伝達を調節する、それに関与する、それを阻害する、それを活性化する、それを低減させる、またはそれを増加させる、あらゆる分子を指す。シグナル伝達とは、最終的には細胞における生化学的事象を惹起する経路に沿った、タンパク質複合体のリクルートによる、化学修飾の形態での分子シグナルの伝達を指す。シグナル伝達経路は、当該技術分野において周知であり、Ｇタンパク質共役型受容体シグナル伝達、チロシンキナーゼ受容体シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達、トールゲートシグナル伝達（toll gate signaling）、リガンド開口型イオンチャネルシグナル伝達、ＥＲＫ／ＭＡＰＫシグナル経路、Ｗｎｔシグナル経路、ｃＡＭＰ依存性経路、およびＩＰ３／ＤＡＧシグナル経路が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１４１】

本明細書で使用される場合、用語「標的化モダリティ（targeting modality）」とは、ｉ）ユニークなキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に関する場合の、抗原特異性、ｉｉ）モノクローナル抗体または二重特異性エンゲージャーに関する場合の、エンゲージャー特異性、ｉｉｉ）形質転換細胞の標的化、ｉｖ）がん幹細胞の標的化、および、ｖ）特異的な抗原または表面分子が無い場合の他の標的化戦略、を含むがこれらに限定はされない、抗原特異性および／またはエピトープ特異性を促進するために、細胞に遺伝的に組み込まれた分子、例えばポリペプチド、を指す。

【０１４２】

本明細書で使用される場合、用語「薬剤的に活性なタンパク質またはペプチド」とは、生物に対し生物学的および／または薬剤的な効果を達成することが可能な、タンパク質またはペプチドを指す。薬剤的に活性なタンパク質またはペプチドの例としては、抗体もしくはその断片、増殖因子、および／またはサイトカインが挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１４３】

本明細書で使用される場合、用語「シグナル伝達分子」とは、細胞間情報伝達を調節する、それに関与する、それを阻害する、それを活性化する、それを低減させる、またはそれを増加させる、あらゆる分子を指す。シグナル伝達とは、最終的には細胞における生化学的事象を惹起する経路に沿った、タンパク質複合体のリクルートによる、化学修飾の形態での分子シグナルの伝達を指す。シグナル伝達経路は、当該技術分野において周知であり、Ｇタンパク質共役型受容体シグナル伝達、チロシンキナーゼ受容体シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達、トールゲートシグナル伝達（toll gate signaling）、リガンド開口型イオンチャネルシグナル伝達、ＥＲＫ／ＭＡＰＫシグナル経路、Ｗｎｔシグナル経路、ｃＡＭＰ依存性経路、およびＩＰ３／ＤＡＧシグナル経路が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１４４】

本明細書で使用される場合、用語「特異的」は、非特異的または非選択的な結合と対比して、分子、例えば受容体またはエンゲージャーの、標的分子に選択的に結合する能力を指して用いられ得る。

【０１４５】

本明細書で使用される用語「養子細胞療法（adoptive cell therapy）」とは、本明細書で使用される場合に、輸血前に生体外で増殖された、遺伝子改変されたまたはされていない、Ｔ細胞またはＢ細胞とされる、自己または同種間のリンパ球の輸血に関する、細胞に基づく免疫療法を指す。

【０１４６】

「治療上十分な量（therapeutically sufficient amount）」は、本明細書で使用される場合、その意味の中に、所望の治療効果をもたらすとされる、無毒の、ただし十分量および／または有効量の、特定の治療用および／または医薬組成物を含む。正確な必要量は、患者の全体的な健康、患者の年齢、並びに状態の段階および重症度等の要因に応じて、対象毎に異なる。特定の実施形態では、治療上十分な量は、治療中の対象の疾患または状態に伴う少なくとも１つの症状を改善、低減、および／または改善するのに十分および／または有効である。

【０１４７】

本明細書で使用される場合、用語「胚性幹細胞」は、胚盤胞（embryonic blastocyst）の内部細胞塊の自然発生的な万能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は、万能性であり、且つ、発生中に３つの一次胚葉（外胚葉、内胚葉および中胚葉）の全ての誘導体を生じる。胚性幹細胞は、胚体外膜または胎盤に寄与せず、すなわち全能性ではない。

【０１４８】

本明細書で使用される場合、用語「多能性幹細胞（multipotent stem cell）」とは、３つ全てではないが、１または複数の胚葉（外胚葉、中胚葉および内胚葉）の細胞に分化する発生能を有する細胞を指す。従って、多能性細胞は「部分分化細胞（partially diff

erentiated cell）」とも称され得る。多能性細胞は当該技術分野において周知であり、多能性細胞の例としては、例えば、造血幹細胞および神経幹細胞等の成体幹細胞が挙げられる。「多能性」とは、細胞が、所与の系譜における多くの細胞型を形成し得るが、他の系譜の細胞を形成しないこと、を表す。例えば、多能性造血細胞は、多種様々な血液細胞（赤血球、白血球、血小板等）を形成できるが、ニューロンを形成できない。従って、用語「多能性」とは、発生能の程度が全能性にも万能性にも満たない細胞の状態を指す。

【０１４９】

万能性幹細胞の分化は、培地中の刺激剤または細胞の物理的状態を変化させる等、培養系の変化を必要とする。最もありふれた戦略では、系譜特異的分化を開始させるために、共通且つ決定的な中間体として胚様体（ＥＢ）の形成が利用される。ＥＢは、その三次元領域内に多数の系譜を生じることから胚発生を模倣することが示されている、三次元的なクラスターである。典型的には数時間から数日間の分化プロセスを通じて、単純なＥＢ（例えば、分化するよう誘導された凝集した万能性幹細胞）は、成熟を続けて嚢胞性ＥＢへと発達し、その時点で、典型的には数日から数週間、分化を継続するようにさらに処理される。ＥＢ形成は、万能性幹細胞同士を三次元的多層細胞クラスター内で互いに接近させることで惹起され、典型的には、これは、万能性細胞を液滴中に沈降させ、細胞を「Ｕ」字底ウェルプレートに沈降させることを含むいくつかの方法のうちの１つによって、または機械撹拌によって、達成される。ＥＢ発生を促進するため、万能性幹細胞の凝集体は、万能性培養維持培地中で維持される凝集体は適切なＥＢを形成しないため、さらなる分化の合図を必要とする。従って、万能性幹細胞凝集体は、最適な系譜に向けた誘発合図を供給する分化用培地に移される必要がある。ＥＢベースの万能性幹細胞培地は、典型的には、ＥＢ細胞塊内の中程度の増殖と共に、分化細胞集団（外胚葉、中胚葉および内胚葉）の生成をもたらす。細胞分化を促進することは分かっているが、ＥＢは、三次元構造内での、環境由来の分化合図への一貫しない細胞暴露により、分化状態が一様でない不均一な細胞を生じる。さらに、ＥＢは作製と維持に手間がかかる。さらに、ＥＢを介した細胞分化は中程度の細胞増殖を伴い、これは低い分化効率の一因にもなる。

【０１５０】

比較すると、「凝集体形成」は、「ＥＢ形成」と異なり、万能性幹細胞に由来する細胞集団を増殖させるために使用することができる。例えば、凝集体に基づく万能性幹細胞の増殖中、培地は増殖および万能性を維持するように選択される。細胞増殖は、一般に、より大きな凝集体の形成により凝集体のサイズを増加させるが、これらの凝集体を定期的に機械的または酵素的により小さな凝集体へと分離させることで、培養物内の細胞増殖を維持し、細胞数を増加させることができる。ＥＢ培養と異なり、維持培養液中の凝集体内で培養された細胞は、万能性のマーカーを維持する。万能性幹細胞凝集体は、分化を誘発するためにさらなる分化合図を必要とする。

【０１５１】

本明細書で使用される場合、「単層分化」は、三次元的多層細胞クラスターを介した分化、すなわち「ＥＢ形成」とは異なる分化法を指す用語である。単層分化は、他の利点も本明細書で開示されるが、分化惹起にＥＢ形成の必要がない。単層培養はＥＢ形成等の胚発生を模倣していないため、ＥＢにおける３つ全ての胚葉分化と比較して、特定の系譜に向けた分化は最低限と見なされる。

【０１５２】

多能性は、部分的に、細胞の多能性特性を評価することによって判断することができる。多能性特性には、限定するものではないが、（ｉ）多能性幹細胞形態、（ｉｉ）無限自己複製の可能性、（ｉｉｉ）限定するものではないがＳＳＥＡ１（マウスのみ）、ＳＳＥＡ３／４；ＳＳＥＡ５、ＴＲＡ１－６０／８１；ＴＲＡ１－８５、ＴＲＡ２－５４、ＧＣＴＭ－２、ＴＧ３４３、ＴＧ３０、ＣＤ９、ＣＤ２９、ＣＤ１３３／プロミニン、ＣＤ１４０ａ、ＣＤ５６、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ１０５、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＯＸ２、ＣＤ３０及び／又はＣＤ５０を含む、多能性幹細胞マーカーの発現、（ｉｖ）３体細胞系（外胚葉、中胚葉及び内胚葉）の全てに分化する能力、（ｖ）３体細胞系からなるテラ

トーマ形成、及び（ｖｉ）３体細胞系からの細胞からなる胚様体の形成が含まれる。

【０１５３】

２種類の多能性である、後期の胚盤胞のエピブラスト幹細胞（ＥｐｉＳＣ）に類似である、「初回刺激を受けた」状態の多能性又は「準安定」状態の多能性、及び、初期／着床前の胚盤胞の内細胞塊に類似である、「ナイーブ」状態の多能性又は「基底」状態の多能性について先に述べた。該多能性の状態はいずれも、上記に記載した特性を呈するが、ナイーブ又は基底状態では、（ｉ）雌性細胞内のＸ染色体の事前の不活性化（preinactivation）又は再活性化、（ｉｉ）単一細胞培養中のクローン性及び生存性の向上、（ｉｉｉ）ＤＮＡメチル化の全体的な低下、（ｉｖ）発生上の調節性遺伝子プロモーター上でのＨ３Ｋ２７ｍｅ３抑制型クロマチン標識の局在の低下、及び（ｖ）初回刺激を受けた状態の多能性細胞と比較して分化マーカーの発現が低減すること、をさらに呈する。外因性多能性細胞を体細胞に誘導し、発現し、その後サイレンシングされるか又は得られた多能性細胞から除去されるという、細胞の初期化の標準的な方法論は、概して、初回刺激を受けた状態の多能性の特性を有するものと見られている。標準的な多能性細胞培養条件下では、かかる細胞は、基底状態の特性が観察されるものである外因性導入遺伝子の発現が維持されない限り、初回刺激を受けた状態のままである。

【０１５４】

本明細書で用いる場合、用語「多能性幹細胞形態」は、胚性幹細胞の古典的な形態学的特徴をいう。正常な胚性幹細胞形態は、高いＮＣ比（nucleus-to-cytoplasm ratio）、核小体の顕著な存在、及び典型的な細胞間隙をもつ、球状の小さい形状によって特性決定される。

【０１５５】

本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、フィーダー細胞が第二の細胞型の支持のために増殖因子および栄養分を供給することから、第二の種類の細胞が増殖可能な環境を与えるために、第二の種類の細胞と共培養される、１種の細胞を記述する用語である。フィーダー細胞は、フィーダー細胞が支持している細胞と異なる種由来であってもよい。例えば、幹細胞を含む、ある特定の種類のヒト細胞は、マウス胎仔線維芽細胞の初代培養物、または不死化したマウス胎仔線維芽細胞によって支持することができる。フィーダー細胞は、典型的には、他の細胞と共培養されている時、フィーダー細胞が支持している細胞よりも増殖することを防ぐための、照射またはマイトマイシン等の有糸分裂阻害剤による処理によって、不活性化され得る。フィーダー細胞には、内皮細胞、間質細胞（例えば、上皮細胞または線維芽細胞）、および白血病細胞が包含され得る。上記を制限することなく、１つの特定のフィーダー細胞型はヒト皮膚線維芽細胞等のヒトフィーダーであり得る。別のフィーダー細胞型は、マウス胎仔線維芽細胞（ＭＥＦ）であり得る。一般に、様々なフィーダー細胞を部分的に使用することで、万能性の維持、ある特定の系譜への分化の配向、および、エフェクター細胞等の特殊化した細胞型への成熟の促進が可能である。

【０１５６】

本明細書で用いる場合、「フィーダーフリー（ＦＦ）」環境は、フィーダー細胞を本質的に含まない及び／又はフィーダー細胞の育成によって予め条件付けしていない、細胞培養又は培地などの環境をいう。「予め条件付けした」培地は、例えば少なくとも１日である期間の間、培地内でフィーダー細胞を育成した後、採取した培地をいう。予め条件付けした培地は、培地内で育成したフィーダー細胞によって分泌された増殖因子及びサイトカインを含む多数の介在物質を含有する。

【０１５７】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、あらゆる動物を指し、好ましくは、ヒト患者、家畜（livestock）、または他の家畜化された動物（domesticated animal）を指す。

【０１５８】

「万能性因子（pluripotency factor）」または「再プログラム化因子（reprogramming

factor）」とは、単独で、または他の剤と組み合わせて、細胞の発生能を増加させることが可能な剤を指す。万能性因子には、細胞の発生能を増加させることが可能なポリヌクレオチド、ポリペプチド、および小分子が包含されるが、これらに限定はされない。例示的な万能性因子としては、例えば、転写因子および小分子再プログラム化剤（small molecule reprogramming agent）が挙げられる。

【０１５９】

「接着する（adhere）」とは、細胞が容器に付着すること、例えば、細胞が、適切な培地の存在下で、無菌のプラスチック製（または被覆プラスチック製）の細胞培養皿またはフラスコに付着していること、を指す。ある特定の細胞クラスは、細胞培養容器に接着しない限り、培養下で維持されないし、また増殖もしない。ある特定の細胞クラス（「非接着性細胞」）は、接着無しでも培養下で維持され、且つ／または増殖する。

【０１６０】

「培養」又は「細胞培養」は、管内環境での、細胞の維持、成長及び／又は分化をいう。「細胞培地（培養培地）」、「培地（培養培地）」（いくつかの場合では単に「培地」）、「サプリメント」及び「培地サプリメント」は、細胞培養を育成する栄養成分をいう。

【０１６１】

「育成（培養）する（cultivate）」は、組織外又は体外にある細胞、例えば無菌のプラスチック（又は被覆プラスチック）細胞培養ディッシュ又はフラスコ中にある細胞を、維持すること、繁殖させること（増殖させること）及び／又は分化させることをいう。「育成（培養）」には、栄養、ホルモン及び／又は、細胞を繁殖ならびに／もしくは維持するのに役立つ他の因子の源として、培地が利用され得る。

【０１６２】

本明細書で用いる場合、「解離させた」細胞は、他の細胞又はある面（例えば、培養皿表面）から、実質的に離した又は精製した細胞をいう。例えば、機械的方法又は酵素的方法によって、動物又は組織から細胞を解離させることができる。あるいは、例えばクラスターの、単一細胞の、又は単一細胞とクラスターとの混合物の懸濁液に、酵素的又は機械的に解離させるなどによって、管内で凝集している細胞を、互いに解離させることができる。さらに別の代替的な実施形態では、培養皿又は他の面から接着細胞を解離させる。そのため、解離により、細胞外基質（ＥＣＭ（extracellular matrix））及び培養基質（例えば、培地表面）との細胞相互作用を破壊すること又は細胞間におけるＥＣＭを破壊することに関与する場合がある。

【０１６３】

本明細書で使用される場合、用語「Ｔリンパ球」および「Ｔ細胞」は、同義的に使用され、培養Ｔ細胞、例えば、初代Ｔ細胞、または培養Ｔ細胞株由来のＴ細胞、例えば、Ｊｕｒｋａｔ、ＳｕｐＴ１等、または哺乳動物から得られるＴ細胞、等のあらゆるＴ細胞であり得る。Ｔ細胞は、幹細胞または前駆細胞からも分化され得る。Ｔ細胞はＣＤ３＋細胞であり得る。Ｔ細胞は、あらゆる種類のＴ細胞とすることができ、ＣＤ４＋／ＣＤ８＋ダブルポジティブＴ細胞、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞（例えば、Ｔｈ１細胞およびＴｈ２細胞）、ＣＤ８＋Ｔ細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞）、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、末梢血白血球（ＰＢＬ）、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、メモリーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、制御性Ｔ細胞（regulator Ｔ cell）、γδＴ細胞等を含むがこれらに限定はされない、あらゆる発生段階のＴ細胞とすることができる。ヘルパーＴ細胞のさらなるの種類としては、Ｔｈ３（Ｔｒｅｇ）細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ９細胞、またはＴｆｈ細胞等の細胞が挙げられる。メモリーＴ細胞のさらなる種類としては、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ細胞）、幹細胞メモリーＴ細胞（Ｔｓｃｍ細胞）、およびエフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ細胞およびＴＥＭＲＡ細胞）等の細胞が挙げられる。Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように改変されたＴ細胞等の、遺伝子改変Ｔ細胞も指し得る。

【０１６４】

本明細書で使用される場合、用語「ナイーブ型Ｔ細胞」またはＴｎは、活性化Ｔ細胞またはメモリーＴ細胞と異なり、末梢内でそれらの同種抗原と遭遇していない、成熟Ｔ細胞を指す。ナイーブ型Ｔ細胞は、通常、Ｌ－セレクチン（ＣＤ６２Ｌ）の細胞表面発現；活性化マーカーであるＣＤ２５、ＣＤ４４またはＣＤ６９の不在；およびメモリーＣＤ４５ＲＯアイソフォームの不在によって特徴付けられる。また、ナイーブ型Ｔ細胞は、ＩＬ－７受容体－α（ＣＤ１２７）サブユニットおよび共通γ鎖（ＣＤ１３２）サブユニットからなる機能的なＩＬ－７受容体も発現する。ナイーブ型の状態では、Ｔ細胞は、静止状態且つ非分裂性であると考えられており、恒常的生存機構のために共通γ鎖サイトカインＩＬ－７およびＩＬ－１５を必要とする。

【０１６５】

本明細書で使用される場合、用語「セントラルメモリーＴ細胞」またはＴｃｍは、エフェクターメモリーＴ細胞、またはＴｃｍとの比較において、より少ない発現またはアポトーシス誘発性シグナル伝達遺伝子（例えば、Ｂｉｄ、Ｂｎｉｐ３およびＢａｄ）を有し、且つ、二次リンパ器官への輸送と関連した遺伝子（例えば、ＣＤ６２Ｌ、ＣＸＣＲ３、ＣＣＲ７）の発現がより多い、Ｔ細胞の亜群または亜集団を指す。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、用語「幹メモリーＴ細胞（stem memory Ｔ cell）」、または「幹細胞メモリーＴ細胞（stem cell memory Ｔ cell）」、またはＴｓｃｍは、長期に亘る免疫を媒介するために重要な特性として、自己複製し、Ｔｃｍ、ＴｅｍおよびＴｅｆｆ（エフェクターＴ細胞）を生み出すことが可能であり、且つ、ＣＤ２７並びにＣＣＲ７およびＣＤ６２Ｌ等のリンパ系ホーミング分子を発現する、Ｔ細胞の亜群または亜集団を指す。

【０１６７】

本明細書で使用される場合、用語「ＮＫ細胞」または「ナチュラルキラー細胞」とは、ＣＤ５６またはＣＤ１６の発現およびＴ細胞受容体（ＣＤ３）の不在によって定義される、末梢血リンパ球サブセットを指す。本明細書にて提供されるＮＫ細胞は、幹細胞または前駆細胞からも分化され得る。本明細書で使用される場合、用語「獲得ＮＫ細胞（adaptive NK cell）」および「メモリーＮＫ細胞（memory NK cell）」は置き換え可能であり、表現型がＣＤ３－且つＣＤ５６＋であり、ＮＫＧ２ＣおよびＣＤ５７、並びに所望によりＣＤ１６を発現するが、以下（ＰＬＺＦ、ＳＹＫ、ＦｃｅＲγ、およびＥＡＴ－２）のうちの一つまたは複数の発現を欠く、ＮＫ細胞サブセットを指す。いくつかの実施形態では、単離されたＣＤ５６＋ＮＫ細胞亜集団は、ＣＤ１６、ＮＫＧ２Ｃ、ＣＤ５７、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＣＲリガンド、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４０、ＮＫｐ４６、活性化ＫＩＲおよび抑制ＫＩＲ、ＮＫＧ２Ａ並びにＤＮＡＭ－１の発現を含む。ＣＤ５６＋は、薄暗い発現であっても明るい発現であってもよい。

【０１６８】

本明細書で使用される場合、用語「ＮＫＴ細胞」または「ナチュラルキラーＴ細胞」とは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する、ＣＤ１ｄ制限Ｔ細胞を指す。通常の主要組織適合性（ＭＨＣ）分子により提示されるペプチド抗原を検知する通常のＴ細胞と異なり、ＮＫＴ細胞は、非古典的ＭＨＣ分子である、ＣＤ１ｄにより提示される脂質抗原を認識する。２種類のＮＫＴ細胞が現在認知されている。インバリアントまたはＩ型のＮＫＴ細胞は、非常に限定されたＴＣＲレパートリー、限定された範囲のβ鎖（ヒトではＶβ１１）と結合した標準的なα鎖（ヒトではＶα２４－Ｊα１８）、を発現する。第二のＮＫＴ細胞集団は、非古典的または非インバリアントなＩＩ型のＮＫＴ細胞と呼ばれ、より不均一なＴＣＲαβの使用を示す。Ｉ型ＮＫＴ細胞は、現在、免疫療法に好適と見なされている。獲得またはインバリアント（Ｉ型）ＮＫＴ細胞は、以下のマーカーのうちの少なくとも一つまたは複数の発現により特定することができる：ＴＣＲ　Ｖａ２４－Ｊａ１８、Ｖｂ１１、ＣＤ１ｄ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、αＧａｌＣｅｒ、ＣＤ１６１およびＣＤ５６。本明細書にて提供されるＮＫＴ細胞は、幹細胞または前駆細胞からも分化され得る。

【０１６９】

本明細書で使用される場合、用語「Ｂリンパ球」または「Ｂ細胞」は、同義的に使用され、Ｔ細胞受容体（ＣＤ３）を欠き、免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むＢ細胞受容体（ＢＣＲ、Ｉｇ）であるＣＤ１９またはＣＤ２０の発現を特徴とする、リンパ球の一部を指す。本明細書にて提供されているように、Ｂ細胞は、分化誘導を介して幹細胞または前駆細胞から派生させることもできる。Ｂ細胞は、Ｂ細胞のあらゆるサブタイプを含み、プロＢ細胞、プレＢ細胞、ナイーブ型Ｂ細胞、Ｂ－１　Ｂ細胞、Ｂ－２　Ｂ細胞、辺縁帯Ｂ細胞、濾胞性Ｂ細胞、メモリーＢ細胞、形質芽球性細胞、形質細胞、制御性Ｂ細胞を包含するがこれらに限定はされない、あらゆる発生段階のＢ細胞とすることができる。

Ｂ．概要

【０１７０】

本発明は、全体として、ナイーブ型万能性細胞を、非万能性細胞、または中胚葉細胞、運命確定造血内皮、運命確定造血幹または前駆細胞、ＣＤ３４＋細胞、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）（好中球前駆細胞を包含する、骨髄系に分化可能）、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞を包含する部分分化細胞；または、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、もしくはＮＫ細胞等の完全に分化した終端造血細胞、に分化させる多段階工程に関する。また、本発明は、開示される方法で使用される組成物；および、開示される方法を用いて作製される細胞集団、細胞株、またはクローン細胞に関する。

【０１７１】

当該技術分野において使用されている方法とは異なり、本発明はｉＰＳＣ分化におけるＥＢの形成を回避した。提供されているように、ｉＰＳＣに由来する造血系細胞が、クローナルなｉＰＳＣ細胞を無ＴＧＦβ培地中に播種することで、それらの万能性の基底状態またはナイーブ状態を維持し、該クローナルなｉＰＳＣをＥＢ形成無しの単層形式で分化させ、分化の初期段階および中期段階に低分子化学物質、増殖因子およびサイトカインの適切な組み合わせを適用する段階的な戦略を利用することによって得られた。従って、本発明は、増殖されたクローナルなｉＰＳＣの、ｉＰＳＣからのＥＢの形成を必要としない即時分化のための単層形態の接着性培養への、直接的な移行を可能にする。

【０１７２】

すなわち、本発明は、ＳＢ４３１５３２を包含するＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を使用しない、高効率の、幹細胞から二次造血および機能的造血系細胞への分化を可能にする、培養プラットフォームを提供する。さらに、先の研究と異なり、本発明はまた、ｉＰＳＣからＥＢまたは凝集塊を介する必要のない、単層培養でのｉＰＳＣの直接的な分化を支持する、無フィーダー、無血清条件を用いる、培養プラットフォームを提供する。

Ｃ．培養プラットフォーム

【０１７３】

万能性細胞を培養するための既存の方法は、フィーダー細胞またはフィーダー細胞で事前調整され、且つウシ胎児血清を含有する培地に大きく依存している。しかし、そのような環境は臨床用および治療用の細胞を生産するのに不適当である場合がある。例えば、動物性成分への暴露が、治療された患者に免疫拒絶および未確認病原体の伝染の深刻なリスクを与える場合があり、動物内レトロウイルスを再活性化する可能性があることから、そのような異物混入環境で培養された細胞は、一般に、ヒト細胞移植に不適当と見なされる。本明細書において企図される無フィーダー環境等の、動物質を含まない（animal-free）培地を用いた培養系は、臨床グレードの細胞株、特にｈＥＳＣ、ｈｉＰＳＣ、および万能性幹細胞に由来するＨＳＣ株、Ｔ細胞株、Ｂ細胞株、ＮＫＴ細胞株、またはＮＫ細胞株の製造を促進する。

【０１７４】

特定の実施形態では、前記無フィーダー環境は、ヒトフィーダー細胞を本質的に含まず、マウス胎仔線維芽細胞、ヒト線維芽細胞、ケラチノサイト、および胚性幹細胞を含むがこれらに限定はされないフィーダー細胞によって事前調整されていない。前記無フィーダ

ー細胞培養培地は、万能性細胞の培養、細胞の再プログラム化、万能性細胞の単一細胞培養、解離、および継代、万能性細胞の細胞選別、基底状態万能性細胞の発生、基底状態万能性の維持、万能性細胞分化の誘導での使用に適している。特定の実施形態では、前記無フィーダー環境は、万能性の誘導、再プログラム化の効率の向上、細胞の分化能の増加もしくは維持、および／または、分化の誘導のために使用される。さらに、ある特定の実施形態では、前記無フィーダー環境は、ｂＦＧＦを包含する、サイトカインおよび増殖因子を実質的に含まない。

【０１７５】

本発明のいくつかの態様では、上記のｉＰＳＣ分化段階の１または複数が、無フィーダー条件下で実行され得る。そのような無フィーダー条件は、単層培養および浮遊培養を含むがこれらに限定はされない形態であり得る。本発明の１つの実施形態において、万能性細胞の中胚葉細胞への分化が、単層無フィーダー条件下で実行される。本発明の別の実施形態では、中胚葉細胞の運命確定造血内皮細胞への分化が、単層無フィーダー条件下で実行される。本発明のさらに別の実施形態では、運命確定造血内皮細胞の造血幹細胞への分化が、単層無フィーダー条件下で実行される。本発明の１つの実施形態において、運命確定造血幹細胞の多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞前駆細胞への分化が、浮遊無フィーダー条件下で、または、単層無フィーダー条件とそれに続く浮遊無フィーダー条件の下で、実行される。本発明の別の実施形態において、Ｔ細胞前駆細胞の完全分化型Ｔ細胞への分化、またはＮＫ細胞前駆細胞の完全分化型ＮＫ細胞への分化が、浮遊無フィーダー条件下で、または、単層無フィーダーとそれに続く浮遊無フィーダー条件の下で、実行される。

【０１７６】

あらゆる好適な容器または細胞培養容器が、基本培地および／または細胞培養用添加物中の細胞培養の支持体として使用されてよい。いくつかの実施形態では、培養容器の表面を接着促進マトリクス／基層（例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ＲＧＤ含有ポリペプチド、ゼラチン等）で被覆することによって細胞の付着が促進されるが、特定の実施形態では、本明細書で開示される細胞培養培地および添加物の作用が増強される場合がある。細胞の培養および継代に好適な培養基は、当該技術分野において公知であり、ビトロネクチン、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、エラスチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）等の天然細胞株により産生されるマトリックスの混合物、並びにポリアミン単層およびカルボキシ末端化単層等の合成または人工の表面を包含し、これらに限定はされない。いくつかの実施形態では、無フィーダー条件の準備は、マトリックス被覆表面上での細胞の培養を含む。一実施形態では、本明細書において企図される培養プラットフォームは、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）またはビトロネクチンを含むマトリックス／培養基を含む。培養物のいくつかの実施形態では、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）が使用され、そのため、培養物は完全に定義されたものである。

【０１７７】

本発明のいくつかの態様では、上記の分化段階の１または複数が無血清条件下で実行され得る。細胞接着および／または細胞誘導に適した市販の無血清培地の例としては、ステム・セル・テクノロジーズ社（Stem Cell Technologies）（カナダ、バンクーバー）製のｍＴｅＳＲ（商標）１、ＴｅＳＲ（商標）２またはＳｔｅｍＳｐａｎ（商標）、リプロセル社（ReproCELL）（マサチューセッツ州ボストン）製の霊長類ＥＳ／ｉＰＳ細胞培地、インビトロジェン社（Invitrogen）（カリフォルニア州カールズバッド）製のＳｔｅｍＰｒｏ（登録商標）－３４、インビトロジェン社製のＳｔｅｍＰｒｏ（登録商標）ｈＥＳＣ ＳＦＭ、およびロンザ社（Lonza）（スイス、バーゼル）製のＸ－ＶＩＶＯ（商標）が挙げられる。

【０１７８】

さらなる実施形態では、前記培養プラットフォームの前記培地の１または複数は、無フィーダー環境であり、所望によりサイトカインおよび／または増殖因子を実質的に含まな

い。他の実施形態では、前記細胞培養培地は、血清、抽出物、増殖因子、ホルモン、サイトカイン等の添加物を含有する。概して、前記培養プラットフォームは、１または複数の段階特異的な無フィーダー無血清培地を含み、それらは各々が以下の１または複数をさらに含む：栄養分／抽出物、増殖因子、ホルモン、サイトカインおよび培地添加物。好適な栄養分／抽出物としては、例えば、様々な哺乳類細胞の増殖を支持するために広く使用されている基本培地であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ／Ｎｕｔｒｉｅｎｔ Ｍｉｘｔｕｒｅ Ｆ－１２）；ＫＯＳＲ（Ｋｎｏｃｋｏｕｔ血清代替物）；Ｌ－グルタミン酸（Ｌ－ｇｌｕｔ）；ＮＥＡＡ（可欠アミノ酸）を挙げることができる。他の培地添加物としては、限定はされないが、ＭＴＧ、ＩＴＳ、βＭＥ、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）を挙げることができる。いくつかの実施形態では、本発明の培地は、以下のサイトカインまたは増殖因子のうちの１または複数を含む：上皮増殖因子（ＥＧＦ）、酸性線維芽細胞増殖因子（ａＦＧＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ－１）、インスリン様増殖因子２（ＩＧＦ－２）、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ４）、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）トランスフェリン、種々のインターロイキン（例えばＩＬ－１～ＩＬ－１８）、種々のコロニー刺激因子（例えば顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ））、種々のインターフェロン（例えばＩＦＮ－γ）、並びに、幹細胞因子（ＳＣＦ）およびエリスロポエチン（ＥＰＯ）等の幹細胞に作用を及ぼす他のサイトカイン。これらのサイトカインは、市販品、例えばＲ＆Ｄシステムズ社（ミネソタ州ミネアポリス）製、を入手してもよく、さらに、天然であっても組換えであってもよい。いくつかの他の実施形態では、本発明の培地は、以下のうちの１または複数を含む：骨形成タンパク質（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、造血成長因子（例えば、ＳＣＦ、ＧＭＣＳＦ、ＧＣＳＦ、ＥＰＯ、ＩＬ３、ＴＰＯ、ＥＰＯ）、Ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ３リガンド（Ｆｌｔ３Ｌ）；および、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、ＩＬ３、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ１１、ＩＬ１５からの１または複数のサイトカイン。いくつかの実施形態では、前記増殖因子／分裂促進因子およびサイトカインは、実験的によって決定される、または確立されたサイトカイン分野によって導かれる濃度において、段階特異的且つ／または細胞型特異的である。

【０１７９】

一般的に、誘導万能性細胞を分化させるための手法には、ポリヌクレオチドに基づくアプローチ、ポリペプチドに基づくアプローチおよび／または小分子に基づくアプローチを用いる、直接的または間接的な、特定の細胞経路の調節が含まれる。細胞の発生能は、例えば細胞を１または複数の調節因子と接触させることによって、調節され得る。「接触させる」とは、本明細書で使用される場合、１または複数の因子（例えば、小分子、タンパク質、ペプチド等）の存在下で細胞を培養することを含み得る。いくつかの実施形態では、細胞が１または複数の剤と接触することで、細胞分化が誘導される。そのような接触は、例えば、前記１または複数の剤をインビトロ培養中の前記細胞に導入することによって、起こってもよい。すなわち、接触は、前記１または複数の剤を栄養細胞培養培地中の前記細胞に導入することによって、起こってもよい。前記細胞は、１または複数の剤を含む前記培地中で、前記細胞が所望の分化表現型に達するために十分な期間、維持され得る。いくつかの他の実施形態では、「接触」は、ベクターを介して１または複数の因子が細胞に導入された場合に起こる。いくつかの実施形態では、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソーム、ミニサークル、発現カセットを有するベクター系、またはｍＲＮＡによって、１または複数のベクターが導入される。

【０１８０】

他の実施形態では、本明細書に記載される培養プラットフォームの段階特異的な無フィーダー無血清培地のうちの１または複数は、１または複数の小分子をさらに含む。いくつ

かの実施形態では、前記培養プラットフォームは、ＧＳＫ－３阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、Ｒｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤を含む細胞培養培地を含み、且つ、ＴＧＦβ受容体阻害剤またはＡＬＫ５阻害剤を含むがこれらに限定されないＴＧＦβ／アクチビンシグナル経路の小分子阻害剤を含まない。

【０１８１】

本明細書において企図される培養プラットフォームはまた、自発性の分化が減少した、且つ／または、基底状態の万能性が達成された、産業グレードまたは臨床グレードの万能性細胞の同種（homogenous）集団を利用することにより、数多くの利点を与える。一実施形態では、前記同種の（homogenous）ｉＰＳＣは、ＧＳＫ－３阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、およびＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤を含み、且つＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、組成物中で維持される。本明細書で使用される場合、用語「同種の（homogenous）」とは、各細胞が集団中のその他の細胞と同一または実質的に同一である細胞集団を指す。一実施形態では、各細胞が本明細書において企図される１または複数の同一の万能性マーカー（例えば、ＳＳＥＡ４およびＴＲＡ１－８１）を発現している場合に、細胞は集団中の他の細胞と同一である。一実施形態では、細胞の少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上が集団内の他の細胞と同一または実質的に同一である場合に、集団は同種（homogenous）である。

【０１８２】

種々の実施形態において、本明細書における、運命確定造血内皮を通じて造血細胞系譜を発生させるための培養プラットフォームの細胞培養培地は、ＴＧＦβ受容体（ＴＧＦβＲ）阻害剤およびＡＬＫ５阻害剤を包含するＴＧＦβ／アクチビンシグナル経路の阻害剤を含まない、または実質的に含まない。一実施形態では、前記培養プラットフォームは、ＧＳＫ－３阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、およびＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤を含む、ナイーブ型ｈｉＰＳＣを維持するための播種用培地を含む。特定の理論に束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、ＴＧＦβＲ／ＡＬＫ５阻害剤が、再プログラム化の効率を増加させる一方で、万能性細胞集団の長期の維持、質および均一性を妨害することを見出した。すなわち、ＴＧＦβ経路シグナル伝達の阻害は細胞の再プログラム化の効率を向上させたが、その一方で、この阻害の軽減は、その後の、インビトロ培養系での、特に、自発的分化が減少しており、且つ、「基底」または「ナイーブ」な万能性状態を保っている均一な万能性集団が好ましい、フィーダー細胞を含まない単一細胞の酵素的継代を用いる系での、万能性細胞集団の維持に寄与する。本明細書で使用される場合、限定はされないが継代数によって計られる、用語「長期」は、しばしば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、またはそれ以上の継代を意味する。定義の通り、「継代」は、細胞が望ましい程度にまで増殖した際に、細胞を複数の細胞培養面または容器に小分けして播種する行為を指す。加えて、本明細書に開示されているように、ＧＳＫ３阻害剤およびＭＥＫ阻害剤、並びに所望によりＲＯＣＫ阻害剤を含むが、ＴＧＦβＲ／ＡＬＫ５阻害剤を含まない培地中で、準安定な万能性細胞を培養することで、遷移万能性細胞は、自発的分化の減少を達成し、且つ／または、基底状態の万能性を達成する。

【０１８３】

ＥＢ中間体を形成させずにｉＰＳＣを分化させることによって造血系細胞を得るためには、ｉＰＳＣの基底またはナイーブ型の万能性を達成させることも重要となる。加えて、ナイーブ型ｉＰＳＣの運命確定ＨＥへの分化効率も、ＥＢおよびその凝集塊を形成させない単層培養の使用によって、大きな影響を受ける。いくつかの実施形態では、前記培養プラットフォームは、ＲＯＣＫ阻害剤を含み、且つ、ＴＧＦβＲ／ＡＬＫ５阻害剤を含まない、または本質的に含まない、培地を含む。いくつかの他の実施形態では、前記培養プラットフォームは、ＧＳＫ３阻害剤を含むが、ＴＧＦβＲ／ＡＬＫ５阻害剤を含まず、且つ、本明細書において提供される培養プラットフォームの使用により運命確定ＨＥ細胞およ

び／または運命確定ＨＳＣ細胞の発生を促進する、培地を含む。

１．ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤

【０１８４】

ＴＧＦβ受容体（例えば、ＡＬＫ５）阻害剤には、ＴＧＦβ受容体（例えば、ＡＬＫ５）に対する抗体、ＴＧＦβ受容体（例えば、ＡＬＫ５）のドミナントネガティブな変異体、および、ＴＧＦβ受容体（例えば、ＡＬＫ５）の発現を抑制するアンチセンス核酸が包含され得る。例示的なＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤としては、ＳＢ４３１５４２（例えば、Inman, et al., Molecular Pharmacology 62(1):65-74 (2002)を参照）；Ａ－８３－０１、別名３－（６－メチル－２－ピリジニル）－Ｎ－フェニル－４－（４－キノリニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボチオアミド（例えば、Tojo, et al., Cancer Science 96(11):791-800 (2005)を参照、および、例えば、トクリス・バイオサイエンス社（Tocris Bioscience）から市販）；２－（３－（６－メチルピリジン－２－イル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イル）－１，５－ナフチリジン；Ｗｎｔ３ａ／ＢＩＯ（例えば、参照によって本明細書に援用される、Dalton, et al.、ＷＯ２００８／０９４５９７を参照）；ＧＷ７８８３８８（－｛４－［３－（ピリジン－２－イル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イル］ピリジン－２－イル｝－Ｎ－（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）ベンズアミド）（例えば、Gellibert, et al., Journal of Medicinal Chemistry 49(7):2210-2221 (2006)を参照）；ＳＭ１６（例えば、Suzuki, et al., Cancer Research 67(5):2351-2359 (2007)を参照）；ＩＮ－１１３０（３－（（５－（６－メチルピリジン－２－イル）－４－（キノキサリン－６－イル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）メチル）ベンズアミド）（例えば、Kim, et al., Xenobiotica 38(3):325-339 (2008)を参照）；ＧＷ６６０４（２－フェニル－４－（３－ピリジン－２－イル－１Ｈ－ピラゾール－４－イル）ピリジン）（例えば、de Gouville, et al., Drug News Perspective 19(2):85-90 (2006)を参照）；ＳＢ－５０５１２４（２－（５－ベンゾ［１，３］ジオキソール－５－イル－２－ｔｅｒｔ－ブチル－３Ｈ－イミダゾール－４－イル）－６－メチルピリジンハイドロクロライド）（例えば、DaCosta, et al., Molecular Pharmacology 65(3):744-752 (2004)を参照）；および、ピリミジン誘導体（例えば、参照によって本明細書に援用される、Stiefl, et al.、ＷＯ２００８／００６５８３に列挙されるものを参照）が挙げられるが、これらに限定はされない。さらに、「ＡＬＫ５阻害剤」に非特異的なキナーゼ阻害剤が包含されることは意図されていないが、「ＡＬＫ５阻害剤」には、例えばＳＢ－４３１５４２（例えば、Inman, et al., J, Mol. Pharmacol. 62(1): 65-74 (2002)を参照）等の、ＡＬＫ５に加えてＡＬＫ４および／またはＡＬＫ７を阻害する阻害剤が包含されると理解されるべきである。本発明の範囲を限定することを意図するものではないが、ＡＬＫ５阻害剤は間葉上皮転換／移行（ＭＥＴ）プロセスに影響を与えると考えられている。ＴＧＦβ／アクチビン経路は上皮間葉転換（ＥＭＴ）の駆動体である。従って、ＴＧＦβ／アクチビン経路の阻害はＭＥＴ（すなわち再プログラム化）プロセスを促進する可能性がある。

【０１８５】

ＡＬＫ５阻害の効果を示すデータから、ＴＧＦβ／アクチビン経路の阻害は同様のＡＬＫ５阻害効果を与えると考えられる。すなわち、ＴＧＦβ／アクチビン経路のあらゆる阻害剤（例えば、上流または下流）が、本明細書の各小項目に記載されるＡＬＫ５阻害剤と組み合わせて、またはそれの代わりに、使用可能である。例示的なＴＧＦβ／アクチビン経路阻害剤として、ＴＧＦβ受容体阻害剤、ＳＭＡＤ２／３リン酸化の阻害剤、ＳＭＡＤ２／３およびＳＭＡＤ４の相互作用の阻害剤、並びにＳＭＡＤ６およびＳＭＡＤ７の活性化剤／アゴニストが挙げられるが、これらに限定はされない。さらに、下記の分類は単に組織化を目的としており、当業者であれば、化合物が経路内の１または複数の点に影響を与える可能性があること、および、故に化合物が定義された分類の２つ以上において機能し得ること、を知っているだろう。

【０１８６】

ＴＧＦβ受容体（ＴＧＦβＲ）阻害剤には、ＴＧＦβ受容体に対する抗体、ＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブな変異体、および、ＴＧＦβ受容体を標的とするｓｉＲＮＡ

またはアンチセンス核酸が包含され得る。ＴＧＦβ受容体阻害剤の具体例として、ＳＵ５４１６；２－（５－ベンゾ［１，３］ジオキソール－５－イル－２－ｔｅｒｔ－ブチル－３Ｈ－イミダゾール－４－イル）－６－メチルピリジンハイドロクロライド（ＳＢ－５０５１２４）；レルデリムマブ（lerdelimumb）（ＣＡＴ－１５２）；メテリムマブ（metelimumab）（ＣＡＴ－１９２）；ＧＣ－１００８；ＩＤ１１；ＡＰ－１２００９；ＡＰ－１１０１４；ＬＹ５５０４１０；ＬＹ５８０２７６；ＬＹ３６４９４７；ＬＹ２１０９７６１；ＳＢ－５０５１２４；ＳＢ－４３１５４２；ＳＤ－２０８；ＳＭ１６；ＮＰＣ－３０３４５；Ｋｉ２６８９４；ＳＢ－２０３５８０；ＳＤ－０９３；グリーベック（Gleevec）；３，５，７，２’，４’－ペンタヒドロキシフラボン（Ｍｏｒｉｎ）；アクチビン－Ｍ１０８Ａ；Ｐ１４４；可溶性ＴＢＲ２－Ｆｃ；および、ＴＧＦβ受容体を標的とするアンチセンス導入腫瘍細胞（例えば、Wrzesinski, et al., Clinical Cancer Research 13(18):5262-5270 (2007); Kaminska, et al., Acta Biochimica Polonica 52(2):329-337 (2005);およびChang, et al., Frontiers in Bioscience 12:4393-4401 (2007)を参照）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１８７】

ＳＭＡＤ２／３リン酸化の阻害剤には、ＳＭＡＤ２またはＳＭＡＤ３に対する抗体、ＳＭＡＤ２またはＳＭＡＤ３のドミナントネガティブな変異体、およびＳＭＡＤ２またはＳＭＡＤ３を標的とするアンチセンス核酸が包含され得る。阻害剤の具体例としては、ＰＤ１６９３１６；ＳＢ２０３５８０；ＳＢ－４３１５４２；ＬＹ３６４９４７；Ａ７７－０１；および３，５，７，２’，４’－ペンタヒドロキシフラボン（Ｍｏｒｉｎ）（例えば、参照によって本明細書に援用される、Wrzesinski、同上；Kaminska、同上；Shimanuki, et al., Oncogene 26:3311-3320 (2007)；およびKataoka, et al.、ＥＰ１９９２３６０を参照）が挙げられる。

【０１８８】

ＳＭＡＤ２／３およびＳＭＡＤ４の相互作用の阻害剤には、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３および／またはｓｍａｄ４に対する抗体、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３および／またはｓｍａｄ４のドミナントネガティブな変異体、並びにＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３および／またはｓｍａｄ４を標的とするアンチセンス核酸が包含され得る。ＳＭＡＤ２／３およびＳＭＡＤ４の相互作用の阻害剤の具体例として、Ｔｒｘ－ＳＡＲＡ、Ｔｒｘ－ｘＦｏｘＨ１ｂおよびＴｒｘ－Ｌｅｆ１（例えば、Cui, et al., Oncogene 24:3864-3874 (2005)およびZhao, et al., Molecular Biology of the Cell, 17:3819-3831 (2006)を参照）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１８９】

ＳＭＡＤ６およびＳＭＡＤ７の活性化剤／アゴニストには、限定はされないが、ＳＭＡＤ６またはＳＭＡＤ７のドミナントネガティブな変異体に対する抗体、およびＳＭＡＤ６またはＳＭＡＤ７を標的とするアンチセンス核酸に対する抗体が包含される。阻害剤の具体例として、Ｓｍａｄ７－ａｓ　ＰＴＯ－オリゴヌクレオチド（Smad7-as PTO-oligonucleotide）（例えば、共に参照によって本明細書に援用される、Miyazono, et al.、ＵＳ６５３４４７６、およびSteinbrecher, et al.、ＵＳ２００５１１９２０３を参照）が挙げられるが、これにらに限定はされない。

２．ＷＮＴ経路アゴニスト

【０１９０】

本明細書で使用される場合、用語「Ｗｎｔシグナル促進剤」、「Ｗｎｔ経路活性化剤（activator）」、「Ｗｎｔ経路活性化剤（activating agent）」、または「Ｗｎｔ経路アゴニスト」は、Ｗｎｔシグナル経路のアゴニストを指し、Ｗｎｔｌ、Ｗｎｔ２、Ｗｎｔ２ｂ／１３、Ｗｎｔ３、Ｗｎｔ３ａ、Ｗｎｔ４、Ｗｎｔ５ａ、Ｗｎｔ５ｂ、Ｗｎｔ６、Ｗｎｔ７ａ、Ｗｎｔ７ｂ、Ｗｎｔ７ｃ、Ｗｎｔ８、Ｗｎｔ８ａ、Ｗｎｔ８ｂ、Ｗｎｔ８ｃ、Ｗｎｔ１０ａ、Ｗｎｔｌ０ｂ、Ｗｎｔ１１、Ｗｎｔ１４、Ｗｎｔ１５、およびＷｎｔ１６のうちの１または複数のアゴニストを包含し、これらに限定されない。Ｗｎｔ経路アゴニストにはさらに、限定はされないが、以下のポリペプチドまたはその断片のうちの１または

複数が包含される：Ｄｋｋポリペプチド、クレセントポリペプチド（crescent polypeptide）、ケルベロスポリペプチド（cerberus polypeptide）、アキシンポリペプチド（axin polypeptide）、Ｆｒｚｂポリペプチド、Ｔ細胞因子ポリペプチド（T-cell factor polypeptide）、またはドミナントネガティブ・ディシェベルドポリペプチド（dominant negative disheveled polypeptide）。

【０１９１】

Ｗｎｔ経路アゴニストの非限定例として、以下のうちの１または複数がさらに包含される：Ｗｎｔポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、Ｗｎｔポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチド、活性化Ｗｎｔ受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸、活性化Ｗｎｔ受容体のアミノ酸配列を含むポリペプチド、Ｗｎｔ／β－カテニンシグナル伝達を促進する有機小分子、Ｗｎｔアンタゴニストの発現または活性を阻害する有機小分子、Ｗｎｔアンタゴニストの発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド、Ｗｎｔアンタゴニストの発現を阻害するリボザイム、Ｗｎｔアンタゴニストの発現を阻害するＲＮＡｉコンストラクト、ｓｉＲＮＡ、またはｓｈＲＮＡ、Ｗｎｔアンタゴニストに結合してその活性を阻害する抗体、β－カテニンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、β－カテニンポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチド、Ｌｅｆ－１ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、およびＬｅｆ－１ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【０１９２】

Ｗｎｔ経路アゴニストには、例えば、ドミナントネガティブなＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、ドミナントネガティブなＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチド、ＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３に結合してその発現または活性を阻害する有機小分子、ＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３に結合してその発現および／または活性を阻害するＲＮＡｉコンストラクト、ｓｉＲＮＡ、またはｓｈＲＮＡ、ＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３に結合してその発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３に結合してその発現および／または活性を阻害する抗体、ＧＳＫ－３、ＧＳＫ３α、またはＧＳＫ３に結合してその発現を阻害するリボザイム、並びに、ＧＳＫ－３阻害と効果が似ているβ－カテニン標的遺伝子を活性化するあらゆるＧＳＫ－３非依存的な試薬等の、ＧＳＫ３阻害剤がさらに包含される。

３．ＧＳＫ３阻害剤

【０１９３】

ＧＳＫ３阻害剤は、本明細書において企図される組成物での使用に適したＷｎｔ経路アゴニストの具体例であり、例えば、限定はされないが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および小分子を包含し得る。本明細書において企図されるＧＳＫ３阻害剤は、ＧＳＫ３α／β発現および／またはＧＳＫ３α／β活性を減少させ得る。本明細書において企図されるＧＳＫ３阻害剤の例示として、限定はされないが、抗ＧＳＫ３抗体、ドミナントネガティブなＧＳＫ３変異体、ＧＳＫ３を標的とするｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびアンチセンス核酸が挙げられる。

【０１９４】

他の例示的なＧＳＫ３阻害剤として、ケンパウロン（Kenpaullone）、ｌ－アザケンパウロン（l-Azakenpaullone）、ＣＨＩＲ９９０２１、ＣＨＩＲ９８０１４、ＡＲ－Ａ０１４４１８、ＣＴ９９０２１、ＣＴ２００２６、ＳＢ２１６７６３、ＡＲ－Ａ０１４４１８、リチウム、ＴＤＺＤ－８、ＢＩＯ、ＢＩＯ－アセトキシム（BIO-Acetoxime）、（５－メチル－１Ｈ－ピラゾール－３－イル）－（２－フェニルキナゾリン－４－イル）アミン、ピリドカルバゾール－シクロペナジエニルルテニウム複合体（pyridocarbazole- cyclopenadienylruthenium complex）、ＴＤＺＤ－８　４－ベンジル－２－メチル－１，２，４－チアジアゾリジン－３，５－ジオン、２－チオ（３－ヨードベンジル）－５－（１－ピリジル）－［１，３，４］－オキサジアゾール、ＯＴＤＺＴ、α－４－ジブロモアセト

フェノン、ＡＲ－ＡＯ　１４４－１８、３－（１－（３－ヒドロキシプロピル）－１Ｈ－ピロロ［２，３－ｂ］ピリジン－３－イル］－４－ピラジン－２－イル－ピロール－２，５－ジオン、ＴＷＳ１１９　ピロロピリミジン化合物、Ｌ８０３　Ｈ－ＫＥＡＰＰＡＰＰＱＳｐＰ－ＮＨ２またはそのミリストイル化形態、２－クロロ－１－（４，５－ジブロモ－チオフェン－２－イル）－エタノン、ＧＦ１０９２０３Ｘ、ＲＯ３１８２２０、ＴＤＺＤ－８、ＴＩＢＰＯ、およびＯＴＤＺＴが挙げられるが、これらに限定はされない。

【０１９５】

特定の例示的な実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０２１、ＢＩＯ、またはケンパウロンである。

【０１９６】

好ましい実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０２１である。

【０１９７】

別の実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＢＲＤ０７０５である。

４．ＥＲＫ／ＭＥＫ阻害剤

【０１９８】

本明細書において企図される組成物での使用に適したＥＲＫ／ＭＥＫ阻害剤は、限定はされないが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および小分子を包含する。本明細書において企図されるＥＲＫ／ＭＥＫ阻害剤は、ＭＥＫもしくはＥＲＫの発現および／またはＭＥＫもしくはＥＲＫの活性を減少させ得る。本明細書において企図されるＭＥＫ／ＥＲＫ阻害剤の例示として、限定はされないが、抗ＭＥＫ抗体または抗ＥＲＫ抗体、ドミナントネガティブなＭＥＫ変異体またはＥＲＫ変異体、ＭＥＫまたはＥＲＫを標的とするｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびアンチセンス核酸が挙げられる。

【０１９９】

他の例示的なＥＲＫ／ＭＥＫ阻害剤として、限定はされないが、ＰＤ０３２５９０１、ＰＤ９８０５９、ＵＯ１２６、ＳＬ３２７、ＡＲＲＹ－１６２、ＰＤ１８４１６１、ＰＤ１８４３５２、スニチニブ、ソラフェニブ、バンデタニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、ＧＳＫ１　１２０２１２、ＡＲＲＹ－４３８１６２、ＲＯ５１２６７６６、ＸＬ５１８、ＡＺＤ８３３０、ＲＤＥＡ１　１９、ＡＺＤ６２４４、ＦＲ１８０２０４およびＰＴＫ７８７が挙げられる。

【０２００】

さらなる例示的なＭＥＫ／ＥＲＫ阻害剤として、国際公開第９９／０１４２６号、同第０２／０６２１３号、同第０３／０７７９１４号、同第０５／０５１３０１号および同第２００７／０４４０８４号に開示されている化合物が包含される。

【０２０１】

ＭＥＫ／ＥＲＫ阻害剤のさらなる例示として、以下の化合物が挙げられる：６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２，３－ジヒドロキシ－プロポキシ）－アミド、６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－（テトラヒドロ－ピラン－２－イルメエチル）－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－エトキシ）－アミド、１－［６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－イル］－２－ヒドロキシ－エタノン、６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－１，１－ジメチル－エトキシ）－アミド、６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－（テトラヒドロ－フラン－２－イルメチル）－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－エトキシ）－アミド、６－（４－ブロモ－２－フルオロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－エトキシ）－アミド、６－（２，４－ジクロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－エトキシ）－アミド、６－（４－ブロモ－２－クロロ－フェニルアミノ）－７－フルオロ－

３－メチル－３Ｈ－ベンゾイミダゾール－５－カルボン酸（２－ヒドロキシ－エトキシ）－アミド、以下、ＭＥＫ阻害剤１、２－［（２－フルオロ－４－ヨードフェニル）アミノ］－Ｎ－（２－ヒドロキシエトキシ）－１，５－ジメチル－６－オキソ－１，６－ジヒドロピリジン－３－カルボキサミド（以下、ＭＥＫ阻害剤２）、４－（４－ブロモ－２－フルオロフェニルアミノ）－Ｎ－（２－ヒドロキシエトキシ）－１，５－ジメチル－６－オキソ－１，６－ジヒドロピリダジン－３－カルボキサミド、およびこれらの薬剤的に許容できる塩。

【０２０２】

好ましい実施形態では、前記ＭＥＫ／ＥＲＫ阻害剤はＰＤ９８０５９である。

５．ＲＯＣＫ阻害剤

【０２０３】

Ｒｈｏ関連キナーゼ（ＲＯＣＫ）は、Ｒｈｏキナーゼの下流エフェクターとして働くセリントレオニンキナーゼである（３つのアイソフォームが存在する（ＲｈｏＡ、ＲｈｏＢおよびＲｈｏＣ））。本明細書において企図される組成物での使用に適したＲＯＣＫ阻害剤は、限定はされないが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および小分子を包含する。本明細書において企図されるＲＯＣＫ阻害剤は、ＲＯＣＫ発現および／またはＲＯＣＫ活性を減少させ得る。本明細書において企図されるＲＯＣＫ阻害剤の例示として、限定はされないが、抗ＲＯＣＫ抗体、ドミナントネガティブなＲＯＣＫ変異体、ＲＯＣＫを標的とするｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびアンチセンス核酸が挙げられる。

【０２０４】

本明細書において企図される例示的なＲＯＣＫ阻害剤として、限定はされないが、チアゾビビン、Ｙ２７６３２、ファスジル（Fasudil）、ＡＲ１２２－８６、Ｙ２７６３２　Ｈ－１１５２、Ｙ－３０１４１、Ｗｆ－５３６、ＨＡ－１０７７、ヒドロキシル－ＨＡ－１０７７、ＧＳＫ２６９９６２Ａ、ＳＢ－７７２０７７－Ｂ、Ｎ－（４－ピリジル）－Ｎ’－（２，４，６－トリクロロフェニル）ウレア、３－（４－ピリジル）－１Ｈ－インドール、および（Ｒ）－（＋）－トランス－Ｎ－（４－ピリジル）－４－（１－アミノエチル）－シクロヘキサンカルボキサミド、並びに、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第８，０４４，２０１号に開示されているＲＯＣＫ阻害剤が挙げられる。

【０２０５】

一実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビン、Ｙ２７６３２、またはピリンテグリン（pyrintegrin）である。

【０２０６】

好ましい実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンである。

【０２０７】

本明細書において企図される組成物および細胞培養培地中のこれらの小分子の含量は変動させることができ、使用される特定の分子および組み合わせ、培地中で培養される細胞の種類、および特定の適用を包含する特定の培養条件に応じて最適化されてよい。一実施形態では、小分子は、万能性の誘導、再プログラム化の効率の向上、細胞の分化能の増加もしくは維持、または基底状態の万能性の誘導もしくは維持のために十分な濃度で、組成物中に存在する。

【０２０８】

本発明の別の態様は、本発明と共に使用されるＮｏｔｃｈ活性化剤に関する。Ｎｏｔｃｈには、Ｎｏｔｃｈ１を含むがこれに限定はされない、Ｎｏｔｃｈ受容体ファミリーの全てのメンバーが包含される。Ｎｏｔｃｈ活性化剤としては、限定はされないが、Ｎｏｔｃｈ受容体のアゴニストが挙げられる。前記Ｎｏｔｃｈアゴニストは、Ｎｏｔｃｈ受容体と結合し、さらに、例えばＮｏｔｃｈの細胞内ドメインの切断および核への移行等を引き起こす、該Ｎｏｔｃｈ受容体と関連したシグナル伝達事象を惹起または媒介する。Ｎｏｔｃｈ活性化剤としては、限定はされないが、Ｊａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３およびＤＬＬ－４が挙げられる。Ｎｏｔｃｈ活性化剤としては、限定はされないが、その開示が参照によって本明細書に援用される、ＥＰ２６０６８８４、ＵＳ６６８９７４４、

およびＵＳ５７８０３００に開示されているものが挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｎｏｔｃｈリガンドのうちの１または複数が、可溶性ペプチドとして導入、または固形材上に固定化され得る。前記固形材には、限定はされないが、ポリスチレン製プレート、またはビーズが包含され得る。Ｎｏｔｃｈリガンド固定化用のビーズは、アガロースビーズ、磁気ビーズ、およびラテックスビーズであり得る。一実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈリガンドペプチドはビーズに結合／固定化される。別の実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈリガンドペプチドはポリスチレン製プレートの表面に結合／固定化される。いくつかの実施形態では、Ｎｏｔｃｈリガンドの固定化は非共有結合的である。いくつかの実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈリガンドペプチドは細胞によって与えられる。

【０２０９】

本発明のさらに別の態様は、ＢＭＰ経路活性化剤に関し、例えば、その開示が参照によって本明細書に援用される以下の公報に開示されている剤が挙げられる：国際公開第２０１４０１１５４０号、同第２０１４０６２１３８号、および同第２００５１１７９９４号。本発明で使用されるＢＭＰ経路活性化剤としては、限定はされないが、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、ＢＭＰ－８、ＢＭＰ－２、およびＢＭＰ－４が挙げられる。本発明の１つの非限定的な実施形態では、前記ＢＭＰ経路活性化剤はＢＭＰ－４である。ＢＭＰは多機能性サイトカインであり、トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーのメンバーである。骨形成タンパク質（ＢＭＰ）受容体は、Ｓｍａｄの活性化を通じてＢＭＰシグナル伝達を仲介する。ＢＢＭＰリガンドはＢＭＰ受容体であるＢＭＰＲＩおよびＢＭＰＲＩＩに結合する。ＢＭＰＲＩＩのリン酸化の後、ＢＭＰＲＩの活性化が続く。リン酸化されたＢＭＰＲＩが次に受容体活性化Ｓｍａｄタンパク質（Ｒ－Ｓｍａｄ）をリン酸化し、これが共通介在物質－Ｓｍａｄ（ｃｏ－Ｓｍａｄ）と結合し、核に進入することで、遺伝子発現が制御される。一実施形態では、前記ＢＭＰ経路活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２１０】

本発明は、ｉＰＳＣから分化した運命確定ＨＳＣを経由して、または、ｉＰＳＣから分化した運命確定造血内皮を経由して、ｉＰＳＣから造血系細胞を得るための組成物を提供するものであり、これらのアプローチは各々、所望の細胞分化のためにｉＰＳＣからのＥＢ形成を生じない。

６．ｈｉＰＳＣ分化用プラットフォーム

Ｉ．ｉＣＤ３４プラットフォーム

【０２１１】

本発明の１つの態様は、万能性幹細胞を用いて運命確定造血内皮を得るための培養プラットフォームを提供する。本明細書で使用される場合、運命確定造血内皮は、運命確定ＨＳＣ、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、および／またはＢ細胞を含むがこれらに限定はされない、全ての造血細胞を生じる能力を有する、二次造血へと配向された造血細胞集団である。

【０２１２】

一実施形態では、ｉＰＳＣを包含する万能性幹細胞を用いて運命確定造血内皮を得るための培養プラットフォームは、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む播種用培地を含む。いくつかの実施形態では、前記播種用培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。一実施形態における、本発明の播種用培地中の前記小分子の組み合わせを、予定運命維持培地（Fate Maintenance Medium）（ＦＭＭ）として表９に示す。前記培地の成分は、表１に示される濃度範囲内の量で培地中に存在し得る。一実施形態では、運命確定造血内皮を得るために使用されるｉＰＳＣは、予定運命再プログラム化培地（Fate Reprogramming Medium）（ＦＲＭ）の使用によって発生し、さらにＦＭＭ中で維持されることで、ｉＰＳＣ細胞株の基底状態またはナイーブ状態が確立および維持された、且つ、本明細書に記載されるような段階特異的な分化に適した、細胞株であった。そのようにして得られた基底状態またはナイーブ型のｉＰＳＣは凍結保存に適している。本発明において、保存されたｉＰＳＣ細胞株またはクローナルなｉＰＳＣは、

後の運命確定造血内皮への分化のために、ＦＭＭ中に播種され得る。

【表１】

表１：ＣＤ３４＋運命確定造血内皮、多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞およびＮＫ細胞前駆細胞を得るためのナイーブ型ｉＰＳＣ用の播種用培地：

従来のhESC培地(Conv.)	予定運命再プログラム化培地（FRM）	予定運命維持培地（FMM）
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
ノックアウト血清代替物（20％）	ノックアウト血清代替物（20％）	ノックアウト血清代替物（20％）
	N2	
	B27	
グルタミン	グルタミン	グルタミン（1×）
可欠アミノ酸（1×）	可欠アミノ酸（1×）	可欠アミノ酸（1×）
β-メルカプトエタノール（100μM）	β-メルカプトエタノール（100μM）	β-メルカプトエタノール（100μM）
bFGF（0.2～50ng/mL）	bFGF（2～500ng/mL）	bFGF（2～500ng/mL）
	LIF（0.2～50ng/mL）	LIF（0.2～50ng/mL）
	チアゾビビン（0.1～25μM）	チアゾビビン（0.1～25μM）
	PD0325901（0.005～2μM）	PD0325901（0.005～2μM）
	CHIR99021（0.02～5μM）	CHIR99021（0.02～5μM）
	SB431542（0.04～10μM）	
MEFフィーダー細胞との組み合わせ	フィーダー非含有、Matrigel（商標）またはビトロネクチンとの組み合わせ	

【０２１３】

本発明の１つの態様は、ｉＰＳＣを包含する万能性幹細胞からの中胚葉への分化および増殖のための培地を提供する。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。一実施形態では、前記培地は、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦ、並びに、表２に示される組み合わせで小分子を含むＣＤ３４基本培地、を含む。いくつかの実施形態では、前記培地は細胞外マトリックスタンパク質を含む。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表２に示される濃度範囲で含む。いくつかの実施形態では、前記培地は、ビトロネクチンがＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）に置換された、完全に定義されたものである。

【表２】

表２：ナイーブ型ｉＰＳＣから中胚葉を得るためのｉＣＤ３４－Ａ培地	
iCD34基本培地	StemPro34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
BMP4（0.05～15ng/ml）	
Matrigel（商標）またはビトロネクチンと組み合わせた、無フィーダー培地	

【０２１４】

一実施形態では、万能性幹細胞からの中胚葉の分化および増殖のための上記培地は、０．２～５０ｎｇのｂＦＧＦをさらに含む。

【０２１５】

本発明の１つの態様は、ｉＰＳＣを包含する万能性幹細胞から運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を得るための培地を提供する。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。一実施形態では、前記培地はＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤、およびｂＦＧＦを含む。一実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。一実施形態では、ＧＳＫ３阻害剤を含む培地は、運命確定ＨＥへの分化能を獲得するために、中胚葉細胞の分化決定の後に初めて適用される。一実施形態では、ＢＭＰ活性化剤、ＧＳＫ３阻害剤およびｂＦＧＦを含む前記培地は、表３に示される組み合わせで小分子を含むＣＤ３４基本培地をさらに含む。一実施形態では、上記の培地はＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない。いくつかの実施形態では、前記培地は細胞外マトリックスタンパク質を含む。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表１１に示される濃度範囲で含む。いくつかの実施形態では、前記培地は、ビトロネクチンがＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）に置換された、完全に定義されたものである。

【表３】

表3：運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を得るためのiCD34-B培地	
iCD34基本培地	StemPro 34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
BMP4（0.05～15ng/ml）	
bFGF（0.2～50ng/ml）	
CHIR99012（0.04～10μM）	
Matrigel（商標）またはビトロネクチンと組み合わせた、無フィーダー培地	

【０２１６】

本発明の１つの態様は、中胚葉細胞から運命確定造血内皮を得るための培地を提供する。一実施形態では、前記培地は、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、

ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む。一実施形態では、前記培地は、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、ＩＬ１１およびＲＯＣＫ阻害剤、並びに、表４に示される組み合わせで小分子を含むＣＤ３４基本培地、を含む。一実施形態では、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む前記培地は、Ｗｎｔ経路活性化剤、ＩＧＦ、およびＥＰＯのうちの１または複数をさらに含む。いくつかの実施形態では、中胚葉細胞から運命確定ＨＥを発生させるための培地は、ＲＯＣＫ阻害剤、Ｗｎｔ経路活性化剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１、並びに、ＩＧＦおよびＥＰＯのうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＣＨＩＲ９９０２１である。一実施形態では、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、ＩＬ１１およびＲＯＣＫ阻害剤を含む前記培地は、Ｗｎｔ経路活性化剤、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤、ＩＧＦ１、およびＥＰＯのうちの１または複数を含まない。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表4に示される濃度範囲で含む。

【表４】

表4：中胚葉から運命確定造血内皮を得るためのiCD34-C培地	
iCD34基本培地	StemPro 34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
VEGF（0.2～50ng/ml）	
bFGF（0.1～25ng/ml）	
SCF（1～250ng/ml）	
IL6（0.2～50ng/ml）	
IL11（0.2～50ng/ml）	
Y27632（0.2～50μM）	
Matrigel（商標）またはビトロネクチンと組み合わせた、無フィーダー培地	

【０２１７】

本発明の１つの態様は、運命確定造血内皮から多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得るための培養プラットフォームを提供する。前記ＭＰＰは、好中球前駆細胞を包含する骨髄系にさらに分化させることができる。一実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、運命確定造血内皮からのプレＨＳＣへの分化に適した、培地を含む（表５）。別の実施形態では、運命確定造血内皮をプレＨＳＣに分化させるための培地を含む前記培養プラットフォームは、（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１を含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まず、且つ、プレＨＳＣからの多能性前駆細胞への分化に適した、培地をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表5に示される濃度範囲で含む。

【表５】

表5：運命確定HEから多能性前駆細胞を得るためのiMPP−A培地	
iCD34基本培地	StemPro 34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
VEGF（0.2～50ng/ml）	
bFGF（0.2～25ng/ml）	
SCF（1～250ng/ml）	
Flt3L（0.5～150ng/ml）	
IL6（0.2～50ng/ml）	
IL11（0.2～50ng/ml）	
Y27632（0.2～50μM）*プレHSCを多能性前駆細胞に分化させる場合には含まれない	
BMP4（0.5～150ng/ml）	
TPO（0.5～150ng/ml）	
IL3(0.5～150ng/ml)	
GMCSF（0.1～25ng/ml）	
EPO（0.02～5ng/ml）	
Matrigel（商標）またはビトロネクチンと組み合わせた、無フィーダー培地	

ＩＩ．ｉＮＫ／ｉＴプラットフォーム

【０２１８】

本発明の１つの態様は、運命確定造血内皮からＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための培養プラットフォームを提供する。一実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み；且つ、運命確定造血内皮からのプレＴ細胞前駆細胞（ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴ）への分化に適した、培地；並びに／または、（ｉｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まず、且つ、前記プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞もしくはＴ細胞への分化に適した、培地、を含む（表６）。いくつかの実施形態では、運命確定ＨＥをｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させる前記培地は、ＲＯＣＫ阻害剤、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７を含み；且つ、ＢＭＰ活性化剤を含まない。いくつかの実施形態では、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴをＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞に分化させる前記培地はＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７を含む。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表６に示される濃度範囲で含む。

【表６】

表６：運命確定ＨＥからプレＴ細胞前駆細胞を得るためのｉＴＣ－Ａ２培地	
iCD34基本培地	StemPro 34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
Flt3L（0.2～50ng/ml）	
IL7（0.2～50ng/ml）	
SCF（1～250ng/ml）	
TPO（0.2～50ng/ml）	
*：プレＴ前駆細胞～Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を得るためのiTC-B2には含まれず	BMP4（0.5～150ng/ml）*
	VEGF（0.2～50ng/ml）*
	bFGF（0.1～25ng/ml）*
	Y27632（0.2～50μM）*
無フィーダー、浮遊または単層	

【０２１９】

本発明の１つの態様は、運命確定造血内皮からＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための培養プラットフォームを提供する。一実施形態では、前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み、且つ、運命確定造血内皮からのプレＮＫ細胞前駆細胞（ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ）への分化に適した、培地；並びに、（ｉｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１もしくは複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１もしくは複数を含まず、且つ、前記プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞もしくはＮＫ細胞への分化に適した、培地、を含む。いくつかの実施形態では、運命確定ＨＥをｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させる前記培地は、ＲＯＣＫ阻害剤、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５を含み；且つ、ＢＭＰ活性化剤を含まない。いくつかの実施形態では、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫをＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞に分化させる前記培地はＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ１５を含む。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。他の実施形態では、本明細書における前記培地は、小分子、増殖因子、および／またはサイトカインを、表７に示される濃度範囲で含む。

【表７】

表7：運命確定HEからプレＮＫ細胞前駆細胞を得るためのiNK-A2培地	
iCD34基本培地	StemPro 34
	グルタミン
	可欠アミノ酸
	アスコルビン酸（1～250ng/ml）
	MTG（10～2500μM）
SCF（1～250ng/ml）	
Flt3L（0.2～50ng/ml）	
TPO（0.1～25ng/ml）	
IL7（0.2～50ng/ml）	
IL15（0.4～100ng/ml）	
IL3（0.1～25ng/ml）	
*:プレＮＫ前駆細胞～ＮＫ前駆細胞またはＮＫ細胞を得るためのｉＮＫ－Ｂ２には含まれず	VEGF（0.2～50ng/ml）*
	bFGF（0.1～25ng/ml）*
	BMP4（0.5～150ng/ml）*
	Y27632（0.2～50μM）*
無フィーダー、浮遊、単層	

【０２２０】

本発明の別の態様は、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を得るための培養プラットフォームを提供するものであり、前記培養プラットフォームは、以下のうちの１または複数を含む：（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず、または本質的に含まず、且つ、プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞への分化に適した、培地；（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み、且つ、運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化に適した、培地；（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含み、且つ、中胚葉細からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｖ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得るのに適した、培地；（ｖ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の発生および増殖に適した、培地；並びに、（ｖｉ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、または本質的に含まず、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖に適した、培地。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２２１】

一実施形態では、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ

、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず、または本質的に含まず、且つ、プレＴ細胞前駆細胞のＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞への分化に適した、培地を含む。別の実施形態では、培地（ｉ）を含む、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含み；且つ、運命確定造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化に適した、培地をさらに含む。別の実施形態では、培地（ｉ）および（ｉｉ）を含む、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み、且つ、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地をさらに含む。さらなる別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）を含む、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｖ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得るのに適した、培地をさらに含む。さらに別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）および（ｉｖ）を含む、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｖ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の発生および増殖に適した、培地をさらに含む。別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）および（ｖ）を含む、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｖｉ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、または本質的に含まず、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖に適した、培地をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞前駆細胞またはＴ細胞を発生させるための前記培養プラットフォーム中にＮｏｔｃｈ因子が使用される。いくつかの実施形態では、Ｊａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３およびＤＬＬ－４を包含するＮｏｔｃｈ因子を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。

【０２２２】

本発明の別の態様は、以下のうちの１または複数を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を得るための培養プラットフォームを提供する：（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず、または本質的に含まず、且つ、プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞への分化に適した、培地；（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み、且つ、運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化に適した、培地；（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、中胚葉細からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地；（ｉｖ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得るのに適した、培地；（ｖ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、ｉＰＳＣ

からの中胚葉細胞の発生および増殖に適した、培地；（ｖｉ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、または本質的に含まず、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖に適した、培地。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入された、ＮＫの増殖、発生、および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数を用いて、ＮＫ成熟が実行される。

【０２２３】

一実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まず、または本質的に含まず、且つ、プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞への分化に適した、培地を含む。いくつかの実施形態では、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入された、ＮＫの増殖、発生、および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数を用いて、ＮＫ成熟が実行される。別の実施形態では、培地（ｉ）を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化剤を含み；且つ、運命確定造血内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化に適した、培地をさらに含む。別の実施形態では、培地（ｉ）および（ｉｉ）を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｉｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；且つ、所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地をさらに含む。さらなる別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｖ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得るのに適した、培地をさらに含む。さらに別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）および（ｉｖ）を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｖ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の発生および増殖に適した、培地をさらに含む。別の実施形態では、培地（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）および（ｖ）を含む、ＮＫ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｖｉ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず、または本質的に含まず、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖に適した、培地をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２２４】

本発明の１つの態様は、運命確定造血内皮を発生させるための培養プラットフォームを提供し、前記培養プラットフォームは、以下のうちの１または複数を含む：（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含む、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖のための培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含む、中胚葉細胞において運命確定造血系への分化能を得るための培地；（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む、ナイーブ型ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の分化および増殖のための培地；並びに、（ｉｖ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、播種培養液はＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖培養液。いくつかの実施形態では、前記運命確定造血内皮はＣＤ３４＋である。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２２５】

一実施形態では、運命確定造血内皮を得るための前記培養プラットフォームは、（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み；且つ、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖に適した、培地を含む。一実施形態では、前記培地（ｉ）を含む前記培養プラットフォームは、（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血系への分化能を得るのに適した、培地をさらに含む。別の実施形態では、前記培地（ｉ）、および（ｉｉ）を含む前記培養プラットフォームは、（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含み、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の分化および増殖に適した、培地をさらに含む。さらに別の実施形態では、前記培地（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）を含む前記培養プラットフォームは、（ｉｖ）、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含ず、または本質的に含まず、且つ、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種および増殖に適した、培地をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２２６】

本発明の１つの態様は、ＣＤ３４＋運命確定造血内皮を発生させるための培養プラットフォームを提供し、前記培養プラットフォームは、以下のうちの１または複数を含む：（ｉ）ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化剤を含み、運命確定造血内皮がＣＤ３４＋運命確定造血内皮を含む、中胚葉細胞からの運命確定造血内皮の分化および増殖のための培地；（ｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含む、中胚葉細胞において運命確定造血系への分化能を得るための培地；（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む、ナイーブ型ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の分化および増殖のための培地；並びに、（ｉｖ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、播種培養液はＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種

または増殖培養液。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。

【０２２７】

本発明の１つの態様は、中胚葉細胞を発生させるための培養プラットフォームを提供し、前記培養プラットフォームは以下のうちの１または複数を含む：（ｉ）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む、ナイーブ型ｉＰＳＣからの中胚葉細胞の分化および増殖のための培地；並びに、（ｉｉ）ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、播種培養液はＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、ナイーブ型ｉＰＳＣの播種または増殖培養液。いくつかの実施形態では、上記の全ての培地は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２またはＢＩＯである。いくつかの実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０１２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はチアゾビビンまたはＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２である。いくつかの実施形態では、前記ＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、中胚葉細胞を発生させるための前記培養プラットフォームは、（ｉｉｉ）ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含み、且つ、中胚葉細胞において運命確定造血系への分化能を得るための、培地をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＧＳＫ３阻害剤を含む前記培地はＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない。

Ｃ．運命確定造血内皮、多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞もしくはＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞および／またはＮＫ細胞を得る方法

【０２２８】

本発明は、１または複数の培地を含む多段階式培養プラットフォームを用いる、万能性幹細胞由来運命確定造血細胞を作製する方法を提供する。前記方法は無フィーダー条件に適している。前記方法はまた単層培養にも適しており、そのため、当該技術分野において公知の方法と比較して、万能性幹細胞の分化のためにＥＢ形成または凝集中間体を必要としない。提供される前記方法は、多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）、ナチュラルキラー細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）、Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）、成熟ＮＫ細胞（ｉＮＫ）および成熟Ｔ細胞（ｉＴ）へのさらなる分化が可能である、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）、ＣＤ３４＋ＨＥ（ｉＣＤ３４）を、生み出し、同時に増殖させる。また本発明のさらなる態様は、万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋、ＨＥ、ＨＳＣ、および／またはＭＰＰから分化した骨髄性細胞を作製する方法を提供する。

【０２２９】

一実施形態では、本発明は、単層培養において万能性細胞から造血系細胞を分化および増殖させるための方法を提供し、前記方法は、前記万能性細胞をＢＭＰ経路活性化剤、および所望により、ｂＦＧＦと接触させることで、万能性幹細胞からの胚様体の形成無しに、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を入手および増殖し、次に、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、およびＷＮＴ経路活性化剤と接触させることで、万能性幹細胞からの胚様体の形成無しに、運命確定造血内皮（ＨＥ）分化能を有する増殖した万能性幹細胞由来中胚葉細胞を得ること、を含む。後のｂＦＧＦ、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤、および／またはＷＮＴ経路活性化剤、との接触により、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が運命確定ＨＥ細胞に分化し、これは分化中に増殖もする。

【０２３０】

ＥＢ形成は細胞増殖を引き起こさず、単層培養も可能でなく、且つ、手間がかかり低効率であることから、提供される造血系細胞を得るための方法はＥＢを介した万能性幹細胞

分化よりも優れている。さらに、本発明によって、本明細書で提供される方法を用いる単層培養が、インビボでの長期間の造血性自己複製、再構成および生着を可能にする機能的な造血系細胞をもたらすことが開示された。

【０２３１】

以下で詳述されるように、本発明は、運命確定造血内皮の入手を介して万能性細胞から造血系細胞を得る方法を提供する。特に、本発明は、分化のためのＥＢ形成が無い、万能性細胞からの造血系細胞の分化誘導法を提供する。

Ｉ．ｉＣＤ３４プラットフォーム

１．運命確定ｉＨＥの派生および増殖

【０２３２】

本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞が播種および増殖される第一工程から始まる。前記万能性幹細胞は次に中胚葉細胞に分化され、この工程中に増殖する。増殖した中胚葉集団は次に、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉集団へと分化され、これが後に運命確定造血内皮へと分化および増殖される。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。本発明はさらに、運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を発生および増殖させる方法を提供し、前記方法は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を分化および増殖すること、並びに、運命確定ｉＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を得た後にこれをｉＨＥに分化させること、を含む。あるいは、本発明は、運命確定造血内皮を発生および増殖させる方法を提供し、前記方法は、運命確定ＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を運命確定ｉＨＥに分化させることを含む。本明細書で開示される方法は、ＥＢが形成されず、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、最適化された単層ｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。

【０２３３】

万能性幹細胞から運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、万能性幹細胞から中胚葉集団を分化および増殖させること；（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、中胚葉集団を分化および増殖させて、前記中胚葉細胞に運命確定ＨＥ分化能を得ること；（３）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、運命確定ＨＥ分化能を有する前記中胚葉細胞を運命確定ＨＥ細胞へと分化および増殖させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ９３－を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＧＳＫ３阻害剤を含む培地と細胞の接触は、運命確定ＨＥ分化能を獲得するために、中胚葉細胞の分化決定の後に限る。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種されたｉＰＳＣ

、および／または中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含み、且つ、万能性幹細胞が増殖する培地と万能性細胞を接触させることにより、万能性幹細胞を播種することをさらに含む。

【０２３４】

播種された万能性幹細胞から運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と万能性幹細胞を接触させることで、万能性幹細胞から中胚葉細胞を分化および増殖させること；（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と前記中胚葉細胞を接触させることで、運命確定ｉＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を得ること；（３）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と前記中胚葉細胞を接触させることで、前記ｉＨＥ分化能を有する中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法はＣＤ３４陽性を使用した選別をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種されたｉＰＳＣ、および／または中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

【０２３５】

万能性幹細胞由来中胚葉細胞から運命確定造血内皮（ｉＨＥ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と中胚葉細胞を接触させることで、運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞を得ること；（２）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と中胚葉細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ分化能を有する中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること、を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭ

Ｐ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

【０２３６】

万能性幹細胞由来中胚葉細胞において運命確定造血内皮（ｉＨＥ）分化能を得る方法の１つの実施形態では、前記方法は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と中胚葉細胞を接触させ、その中で前記中胚葉細胞を増殖させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

２．運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞の派生および増殖

【０２３７】

本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて万能性幹細胞由来中胚葉細胞を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞の播種から始まる。播種された万能性幹細胞は次に中胚葉に発生せられ、さらに、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞へと分化される。あるいは、本発明は、播種された万能性幹細胞を中胚葉に分化させ、次に中胚葉を運命確定造血系分化能を有する中胚葉細胞に分化させることを含む、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を作製する方法を提供する。本発明はさらに、運命確定ＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を作製する方法を提供し、前記方法は、万能性幹細胞由来中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させることを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。本明細書で開示される方法は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、最適化されたｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。

【０２３８】

万能性幹細胞に由来する中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得る方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と万能性幹細胞を接触させることで、万能性幹細胞から中胚葉細胞を分化および増殖させること；並びに、（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と前記細胞を接触させることで、前記中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得ること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記万能性幹細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む培地と細胞を接触させることにより、万能性幹細胞を播種することをさらに含む。

【０２３９】

万能性幹細胞由来中胚葉から運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、前記中胚葉を運命確定

造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させることを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

３．万能性幹細胞から中胚葉の派生および増殖

【０２４０】

本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて万能性幹細胞由来中胚葉を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞が播種される第一工程から始まり、播種された細胞は次に第二工程にて中胚葉に分化される。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。本明細書で開示される方法は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、最適化されたｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。

【０２４１】

万能性細胞から万能性幹細胞由来中胚葉を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、播種された万能性幹細胞から中胚葉細胞を分化および増殖させることを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記播種されたｉＰＳＣを約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む培地と前記万能性細胞を接触させることで、前記ｉＰＳＣを播種および増殖することをさらに含む。

４．造血性多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）の派生

【０２４２】

本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞の播種から始まる。播種された細胞は中胚葉細胞へと増殖および分化せられる。前記中胚葉は運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞へと増殖および分化せられ、次いで、運命確定造血内皮へと分化せられる。前記運命確定ＨＥ細胞はプレＨＳＣへと増殖および分化せられ、次いで、好中球前駆細胞を包含する骨髄性細胞に分化することが可能な多能性前駆細胞へと分化せられる。あるいは、本発明は、播種された万能性細胞を中胚葉に分化させること、中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、次いで、前記中胚葉細胞を運命確定ｉＨＥに分化させること、次いで、それをｉＭＰＰに分化させること、を含む、万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法を提供する。本発明はさらに、万能性幹細胞由来中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、次いで、前記中胚葉細胞を運命確定ｉＨＥに分化させること、次いで、それをｉＭＰＰに分化させること、を含む、万能性幹細胞由来ｉＭＰＰを作製する方法を提供する。あるいは、本発明は、万能性幹細胞由来中胚葉細胞を運命確定ｉＨＥに分化させること、次いでそれをｉＭＰＰに分化させること、を含む、万能性幹細胞由来ｉＭＰＰを作製する方法を提供する。さらに、本発明は、万能性幹細胞由来ｉＨＥをｉＭＰＰに分化させることを含む、万能性幹細胞由来ｉＭＰＰを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。本明細書で開示される方法は、ＥＢが形成されず、且つ、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まな

い、最適化された単層ｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。

【０２４３】

万能性幹細胞から造血多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と万能性細胞を接触させることで、万能性幹細胞から中胚葉細胞を分化および増殖させること；（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地を中胚葉細胞と接触させることで、中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得ること；（３）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること；並びに、（４）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉＭＰＰに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む培地と細胞を接触させることにより、万能性幹細胞を播種および増殖することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることを含む前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、培地と前記プレＨＳＣ細胞を接触させることで、前記プレＨＳＣをｉＭＰＰに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種された万能性幹細胞、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。

【０２４４】

万能性幹細胞由来中胚葉から万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地を中胚葉細胞と接触させることで、万能性幹細胞由来中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得ること；（２）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞

を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること；（３）ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉＭＰＰに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることを含む前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、培地と前記プレＨＳＣ細胞を接触させることで、前記プレＨＳＣをｉＭＰＰに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、上記の方法は、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

【０２４５】

運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞から万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること；並びに、（２）ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉＭＰＰに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることを含む前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、培地と前記プレＨＳＣ細胞を接触させることで、前記プレＨＳＣをｉＭＰＰに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、上記の方法は、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

【０２４６】

万能性幹細胞由来運命確定ＨＥ細胞から万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１

からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＲＯＣＫ阻害剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉＭＰＰに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をプレＨＳＣに分化させることを含む前記方法は、ＢＭＰ活性化剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、培地と前記プレＨＳＣ細胞を接触させることで、前記プレＨＳＣをｉＭＰＰに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。いくつかの実施形態では、上記の方法は、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。

５．万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞の入手‐ｉＣＤ３４プラットフォームおよびｉＴプラットフォーム

【０２４７】

本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞から始められ、それから中胚葉細胞が分化および増殖せられる。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。前記中胚葉は次に、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化せられる。前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞はその後、運命確定造血内皮に分化せられ、同時に前記培地中で増殖せられる。前記運命確定ＨＥ細胞は、次にｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化せられ、次いでＴ細胞前駆細胞（ｐｒｏ－Ｔ）に分化せられ、連続的に同一培地中でＴ細胞に分化せられ得る。あるいは、本発明は、播種された万能性幹細胞を中胚葉に分化させること、中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、次いで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞をｉＨＥに分化させること、次いで、それをＴ細胞前駆細胞またはＴ細胞に分化させること、を含む、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法を提供する。本発明はさらに、万能性幹細胞由来中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、次いで、これをｉＨＥに分化させること、次いで、これをｉｐｒｏ－ＴまたはＴ細胞に分化させること、を含む、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法を提供する。あるいは、本発明は、運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞をｉＨＥに分化させること、次いで、これをｉｐｒｏ－ＴまたはＴ細胞に分化させること、を含む、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法を提供する。さらに、本発明は、万能性幹細胞由来ｉＨＥをｉｐｒｏ－ＴまたはＴ細胞に分化させることを含む、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。本明細書で開示される方法は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、最適化されたｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。いくつかの実施形態では、Ｊａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３およびＤＬＬ－４を含むがこれらに限定はされないＮｏｔｃｈ因子を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。

【０２４８】
万能性幹細胞から万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞（ｉＴ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、前記播種された万能性幹細胞を中胚葉に分化させること；（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、前記中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること；（３）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を運命確定ＨＥ細胞に分化させること、並びに、（４）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地と前記ＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む培地と細胞を接触させることで、万能性幹細胞を播種および増殖させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉproＴ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴをｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、万能性幹細胞由来ｐｒｏ－Ｔを１または複数のＮｏｔｃｈ因子と含む。いくつかの実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈ因子はＪａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３、またはＤＬＬ－４である。いくつかの実施形態では、ＤＬＬ－１およびＤＬＬ－４を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種された万能性幹細胞、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２４９】
万能性幹細胞由来中胚葉から万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、前記中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること；（２）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ

経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を運命確定ＨＥ細胞に分化させること、並びに、（３）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地と前記ＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉproＴ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴをｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、万能性幹細胞由来ｐｒｏ－Ｔを１または複数のＮｏｔｃｈ因子と含む。いくつかの実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈ因子はＪａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３またはＤＬＬ－４である。いくつかの実施形態では、ＤＬＬ－１およびＤＬＬ－４を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。いくつかの実施形態では、上記の方法は、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５０】

運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞から万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞（ｉＴ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を運命確定ＨＥ細胞に分化させること；並びに、（２）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地と前記ＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させる

ことを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＴ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴをｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、万能性幹細胞由来ｐｒｏ－Ｔを１または複数のＮｏｔｃｈ因子と含む。いくつかの実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈ因子はＪａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３またはＤＬＬ－４である。いくつかの実施形態では、ＤＬＬ－１およびＤＬＬ－４を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５１】

万能性幹細胞由来ＨＥ細胞から万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）または万能性幹細胞由来Ｔ細胞（ｉＴ）を作製する方法の一実施形態では、前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地と運命確定ＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＴまたはＴに分化させることを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＢＭＰ活性化剤を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＴに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＴ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴをｉｐｒｏ－ＴまたはｉＴに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、万能性幹細胞由来ｐｒｏ－Ｔを１または複数のＮｏｔｃｈ因子と含む。いくつかの実施形態では、前記Ｎｏｔｃｈ因子はＪａｇ１、Ｊａｇ２、ＤＬＬ－１、ＤＬＬ－３またはＤＬＬ－４である。いくつかの実施形態では、ＤＬＬ－１およびＤＬＬ－４を、可溶性ペプチド、ビーズに結合したペプチド、面に結合したペプチド、または細胞によって提示されたペプチドとして導入することができる。いくつかの実施形態では、上記の方法は、前記万能性幹細胞由来ＨＥ細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、

ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。
６．万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞の入手‐ｉＣＤ３４プラットフォームおよびｉＮＫプラットフォーム
【０２５２】
本発明の１つの態様は、最適化された多段階工程を用いて万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）を作製する方法を提供する。概して、前記方法は万能性幹細胞から始められ、いくつかの実施形態では万能性幹細胞が播種される。前記万能性幹細胞は中胚葉細胞へと発生せられ、増殖せられた後、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化せられる。運命確定造血内皮が次に前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞から分化および増殖せられる。前記ＨＥ細胞はｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫへの、次いでＮＫ細胞前駆細胞（ｐｒｏ－ＮＫ）への分化が可能であり、連続的に同一培地中でＮＫ細胞に分化させることができる。あるいは、本発明は、播種された万能性幹細胞を中胚葉に分化させること、中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、次いで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞をｉＨＥに分化させること、次いで、それをＮＫ細胞前駆細胞に分化させること、を含む、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞を作製する方法を提供する。本発明はさらに、万能性幹細胞由来中胚葉を運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞に分化させること、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞をｉＨＥに分化させること、次いで、これをｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させること、を含む、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞を作製する方法を提供する。あるいは、本発明は、運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞をｉＨＥに分化させること、次いで、これをｉｐｒｏ－ＮＫ細胞またはｉＮＫに分化させること、を含む、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞またはｉＮＫを作製する方法を提供する。さらに、本発明は、万能性幹細胞由来ｉＨＥをｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させることを含む、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞を作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞を得るための前記培養プラットフォームは、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入される、ＮＫの増殖、発生および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数と、ｐｒｏ－ＮＫ細胞との接触により、派生中のＮＫ細胞を含む。本明細書で開示される方法は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない、または本質的に含まない、最適化されたｉＣＤ３４培養プラットフォームを利用する。
【０２５３】
播種されたｉＰＳＣから万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、および所望によりｂＦＧＦを含む培地と細胞を接触させることで、万能性幹細胞から中胚葉細胞を分化および増殖させること；（２）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と中胚葉細胞を接触させることで、前記中胚葉細胞において運命確定造血内皮への分化能を得ること；（３）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞から運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること；並びに、（４）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実

施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫをｐｒｏ－ｉＮＫまたはｉＮＫに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞を得るための前記培養プラットフォームは、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入される、ＮＫの増殖、発生および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数と、ｐｒｏ－ＮＫ細胞との接触により、派生中のＮＫ細胞を含む。一実施形態では、上記の方法は、ＭＥＫｉ、ＧＳＫｉ、およびＲＯＣＫｉを含む培地と万能性細胞を接触させることで、ナイーブ型万能性細胞を播種および増殖させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種されたｉＰＳＣ、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５４】

万能性幹細胞由来中胚葉から万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＢＭＰ活性化剤、Ｗｎｔ経路活性化剤およびｂＦＧＦを含む培地と中胚葉を接触させることで前記中胚葉を分化させて、運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を得ること；（２）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と細胞を接触させることで、前記運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を分化させて、運命確定ＨＥ細胞を得ること；並びに、（３）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞を分化させて、ｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫを得ること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数

を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫをｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞を得るための前記培養プラットフォームは、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入される、ＮＫの増殖、発生および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数と、ｐｒｏ－ＮＫ細胞との接触により、派生中のＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５５】

運命確定造血内皮への分化能を有する万能性幹細胞由来中胚葉細胞から万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）を作製する方法の１つの実施形態では、前記方法は、（１）ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、およびＩＬ１１からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数；並びに所望によりＷｎｔ経路活性化剤を含む培地と運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を接触させることで、運命確定ＨＥ細胞を分化および増殖させること；並びに、（２）ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させること、を含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫをｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞

を得るための前記培養プラットフォームは、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入される、ＮＫの増殖、発生および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数と、ｐｒｏ－ＮＫ細胞との接触により、派生中のＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種された万能性幹細胞、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５６】

万能性幹細胞由来ＨＥ細胞から万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）または万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）を作製する方法の一実施形態では、前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数、並びに所望により、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤からなる群から選択される１または複数の因子を含む培地と運命確定ＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させることを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、並びに、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＶＥＧＦ、およびｂＦＧＦからなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含む培地とＨＥ細胞を接触させることで、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることをさらに含む。他の実施形態では、前記運命確定ＨＥ細胞をｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫに分化させることを含む前記方法は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される増殖因子およびサイトカインのうちの１または複数を含み、且つ、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化剤、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの１または複数を含まない、または本質的に含まない、培地とｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ細胞を接触させることで、前記ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫをｉｐｒｏ－ＮＫまたはｉＮＫに分化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞前駆細胞を得るための前記培養プラットフォームは、ビーズ結合体、原形質膜粒子および／または抗原提示細胞の形態で導入される、ＮＫの増殖、発生および成熟を刺激するための、人工抗原のうちの１または複数と、ｉｐｒｏ－ＮＫ細胞との接触により、派生中のＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法は、播種された万能性幹細胞、中胚葉、および／または運命確定造血内皮への分化能を有する中胚葉細胞を約２％～約１０％の低酸素分圧下に曝すことをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記の方法から得られた前記ｉＨＥ細胞はＣＤ３４を発現する。いくつかの実施形態では、上記の方法は、ＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用して、得られたｉＨＥ細胞を選別することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記

選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記方法のＢＭＰ活性化剤はＢＭＰ４である。いくつかの実施形態では、前記Ｗｎｔ経路活性化剤はＧＳＫ３阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記ＲＯＣＫ阻害剤はＹ２７６３２またはチアゾビビンである。いくつかの実施形態では、上記方法中の培地は、ＴＧＦβ受容体阻害剤を含まない、または本質的に含まない。

【０２５７】

上記に照らし合わせて、本明細書において企図される前記培養プラットフォームが与える利点の１つは、万能性幹細胞の分化のためのＥＢ形成が無く、単一万能性細胞の培養、継代、および解離の生存度（viability）および生存(survival)が増強されることある。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはゲノム改変される。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣは特定のドナーまたは患者の免疫細胞から再プログラム化される。単一細胞懸濁液等、単一細胞への細胞の解離は、酵素的手段または機械的手段によって達成することができる。単一細胞に細胞を解離させる、当該技術分野において公知のいかなる酵素剤も、本発明の方法で使用されてよい。一実施形態では、前記解離剤は、トリプシン／ＥＤＴＡ、ＴｒｙｐＬＥ－Ｓｅｌｅｃｔ、コラゲナーゼＩＶおよびディスパーゼから選択される。本明細書において企図される方法に従って細胞を解離する際に、ＥＤＴＡ、Ａｃｃｕｔａｓｅ、またはＡｃｃｕＭａｘ等のキレート剤が、単独で、または酵素剤との組み合わせで、使用されてもよい。単一細胞への解離を促進するために、前記解離剤はカルシウムおよびマグネシウム非含有ＰＢＳ中に溶解されてよい。解離中および解離後の細胞の生存を増強するために、いくつかの実施形態では、生存促進物質、例えば、１または複数の増殖因子、細胞死およびアポトーシスに関与する細胞経路の阻害剤、または条件培地、が添加される。一実施形態では、前記生存促進物質は、チアゾビビンを含むがこれに限定はされないＲＯＣＫ阻害剤である。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、分化のための前記ｉＰＳＣは遺伝的インプリントを含む。いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞の遺伝的インプリントは、（ｉ）非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の、万能性細胞のゲノムにおける、ゲノム内の挿入、欠失もしくは置換を通じて得られる、１もしくは複数の遺伝子改変されたモダリティ；または、（ｉｉ）ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的である供給源特異的免疫細胞の１もしくは複数の保持可能な治療特性を含み、前記万能性細胞は前記供給源特異的免疫細胞から再プログラム化されたものであり、前記ｉＰＳＣは前記供給源治療特性を保持しており、前記供給源治療特性は前記ｉＰＳＣから派生した造血系細胞にも含まれる。いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、以下のうちの一つまたは複数を含む：セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質。いくつかの他の実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、Ａ２ＡＲ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーに対する表面上誘発受容体の発現の導入または増加、のうちの１または複数を含む。いくつかの実施形態では、前記表面上誘発受容体は普遍的、すなわち、あらゆるエフェクター細胞型と適合し、この普遍的表面上誘発受容体を発現するエフェクター細胞は、その細胞型に関係なく、同一の二重特異性または多重特異性エンゲージャーと結合できる。いくつかの実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体は抗エピトープおよび共刺激ドメインを含み、前記抗エピトープは前記二重特異性または多重特異性エ

ンゲージャーのエピトープに対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記普遍的表面上誘発受容体の共刺激ドメインは、標準もしくは非標準(non-cononical)の細胞活性化およびエフェクター細胞機能の増強のために、ＩＬ２を含む。さらに別のいくつかの実施形態では、前記造血系細胞は、以下のうちの一つまたは複数に関連する供給源特異的免疫細胞の治療特性を含む：（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、前記エンゲージャーは細胞型特異的である、すなわち、前記エンゲージャーは、特定の免疫細胞型に結合し、且つ／または、それを活性化する。特定の実施形態では、前記エンゲージャーは、細胞型非依存的である、すなわち、前記エンゲージャーは、複数の免疫細胞、例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、または好中球に結合し、且つ／または、それを活性化する。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、Ｂ２Ｍヌル、ＨＬＡ－Ｅ／Ｇ、ＰＤＬ１、$A_{2A}R$、ＣＤ４７、ＬＡＧ３ヌル、ＴＩＭ３ヌル、ＴＡＰ１ヌル、ＴＡＰ２ヌル、タパシンヌル、ＮＬＲＣ５ヌル、ＰＤ１ヌル、ＲＦＫＡＮＫヌル、ＣＩＴＴＡヌル、ＲＦＸ５ヌルおよびＲＦＸＡＰヌルのうちの１または複数を含む。改変ＨＬＡクラスＩおよび／または改変ＨＬＡクラスＩＩを有するこれらの細胞は、免疫検出に対する耐性が増加していることから、インビボ残留性の向上を示す。さらに、そのような細胞は、養子細胞療法におけるＨＬＡ適合要求を回避可能であることから、普遍的な、既製の治療用投与計画の源を与える。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＡＲ、ＴＣＲ、ＣＤ１３７またはＣＤ８０のうちの１または複数を含む。そのような細胞は向上した免疫エフェクター能を有する。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、二重特異性または多重特異性エンゲージャーとの結合のための表面上誘発受容体を含む。そのような細胞は向上した腫瘍標的特異性を有する。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、抗原特異的である。

【０２６４】

細胞培養および培地収集の手法は、以下に概要がある：Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:148, 1997; K. Kitano, Biotechnology 17:73, 1991; Curr. Opin. Biotechnol. 2:375, 1991; Birch et al., Bioprocess Technol. 19:251, 1990; “Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach” (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); “Guide to Techniques in Mouse Development” (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993); “Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro” (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); “Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy” (P. D. Rathjen et al., al., 1993). Differentiation of stem cells is reviewed in Robertson, Meth. Cell Biol. 75:173, 1997;およびPedersen, Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998。

【０２６５】

本発明では、明確な特徴付けをしながら細胞集団を濃縮するための戦略が、前記方法の種々の段階で提供される。一実施形態では、細胞集団から万能性幹細胞を濃縮する方法は、前記集団中の前記細胞を解離すること、および、前記細胞を再懸濁することによる、単一細胞懸濁液の作製を含む。解離された細胞は、細胞の維持または細胞選別の実行のため

に、あらゆる適切な溶液または培地に再懸濁させ得る。特定の実施形態では、前記万能性単一細胞懸濁液は、ＧＳＫ３阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、およびＲｏｃｋ阻害剤を含み、且つ、ＴＦＧβ阻害剤を含まない。ある特定の実施形態では、前記ＧＳＫ３阻害剤はＣＨＩＲ９９０２１であり、前記ＭＥＫ阻害剤はＰＤ０３２５９０１であり、且つ／または、前記Ｒｏｃｋ阻害剤はチアゾビビンである。

【０２６６】

特定の実施形態では、細胞集団は選別により万能性細胞がポジティブに選択されており、且つ／または、前記集団は非再プログラム化細胞または非万能性細胞が枯渇しており、これにより、万能性細胞について濃縮された細胞集団が得られる。一実施形態では、単一細胞懸濁液が調製され、次に、例えば適切な抗体を用いる、万能性マーカーの染色等によって、前記単一細胞が選別用に準備される。細胞は、磁気ビーズ選別またはフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）選別等によるあらゆる適切な細胞選別法によって、選別され得る。

【０２６７】

細胞は、１または複数の万能性マーカー、または細胞分化を示すマーカー、例えば、限定はされないが、ＳＳＥＡ３／４発現、ＴＲＡ１－６０／８１発現、ＴＲＡ１－８５発現、ＴＲＡ２－５４発現、ＧＣＴＭ－２発現、ＴＧ３４３発現、ＴＧ３０発現、ＣＤ９発現、ＣＤ２９発現、ＣＤ１３３／プロミニン発現、ＣＤ１４０ａ発現、ＣＤ５６発現、ＣＤ７３発現、ＣＤ１０５発現、ＯＣＴ４発現、ＮＡＮＯＧ発現、ＳＯＸ２発現、ＫＬＦ４発現、ＳＳＥＡ１発現（マウス）、ＣＤ３０発現、ＳＳＥＡ５発現、ＣＤ９０発現および／またはＣＤ５０発現、に基づいて選別され得る。種々の実施形態において、細胞は少なくとも２種、少なくとも３種、または少なくとも４種の万能性マーカーまたは分化マーカーに基づいて選別される。細胞は、ある特定の実施形態ではＳＳＥＡ４の発現に基づいて選別され、ある特定の実施形態ではＴＲＡ１－８１および／またはＴＲＡ１－６０と組み合わされたＳＳＥＡ４の発現に基づいて選別される。ある特定の実施形態では、細胞はＳＳＥＡ４発現、ＴＲＡ１－８１発現、もしくはＴＲＡ１－６０発現、および／またはＣＤ３０発現に基づいて選別される。一実施形態では、細胞はＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－８１およびＣＤ３０に基づいて選別される。別の実施形態では、細胞はＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－６０およびＣＤ３０に基づいて選別される。ある特定の実施形態では、１または複数の表面上分化マーカーを用いる細胞選別は、ＣＤ１３、ＣＤ２６、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ３１、ＣＤ４６およびＣＤ７、並びに、ＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－８１および／またはＣＤ３０等の万能性マーカーを含むが、これらに限定はされない。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、再プログラム化を起こしている細胞集団または万能性細胞集団は分化細胞が枯渇している。一実施形態では、万能性細胞集団または再プログラム化するよう誘導された細胞集団は、分化細胞の１または複数の細胞表面マーカーを有する細胞が枯渇している可能性がある。分化中細胞の細胞表面マーカーの例示として、ＣＤ１３、ＣＤ２６、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ３１、ＣＤ４６、およびＣＤ７が挙げられるが、これらに限定はされない。特定の実施形態では、ＣＤ１３は分化中細胞の表面マーカーとして使用される。

【０２６９】

他の実施形態では、細胞集団を、所望の系譜に分化するように誘導し、万能性細胞を枯渇させることで、分化中または分化後の細胞が濃縮された集団が得られる。いくつかの実施形態では、分化細胞集団は特定の系譜に分化するよう誘導されたＥＳＣまたはｉＰＳＣ等の細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、万能性マーカーに基づく磁気ビーズまたはＦＡＣによる前記集団における細胞選別等の、上記のネガティブ細胞選別法（「パニング」）を用いて、細胞集団から万能性細胞が枯渇され得る。いくつかの実施形態では、分化細胞を含む細胞集団が万能性マーカーを用いるＦＡＣによって選別され、万能性マーカーを発現する細胞が枯渇した画分が得られる。他の実施形態では、細胞集団が、ＣＤ１３、ＣＤ２６、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ３１、ＣＤ４６、およびＣＤ７を含むがこれらに限定はされない系譜特異的マーカー等の、分化マーカーに基づくＦＡＣによって選別され

て、万能性マーカーが枯渇した画分が得られる。本発明のいくつかの特定の実施形態では、ＣＤ１３が分化中細胞の表面マーカーとして使用される。

Ｄ．本明細書で提供される方法およびプラットフォームから作製される細胞集団および細胞株

【０２７０】

いくつかの実施形態では、再プログラム化後に培養された前記細胞は、少なくとも１日間、少なくとも２日間、少なくとも３日間、少なくとも４日間、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少なくとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１５日間、少なくとも１８日間、少なくとも２０日間、少なくとも２２日間、少なくとも２４日間、少なくとも２６日間、少なくとも２８日間、少なくとも３０日間、少なくとも３２日間、少なくとも３５日間、少なくとも４０日間、少なくとも４２日間、もしくは少なくとも４５日間、または間にあるあらゆる日数間、分化するように誘導される。いくつかの実施形態では、再プログラム化後に培養された前記細胞は、約１～４２日間、約２～４０日間、約２～３５日間、約２～２０日間、約２～１０日間、約４～３０日間、約４～２４日間、約６～２２日間、または約８～約１２日間、誘導される。いくつかの実施形態では、前記細胞はｉＰＳＣを含む万能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣはナイーブ型ｉＰＳＣである。一実施形態では、濃縮は、クローナルな万能性幹細胞由来分化中細胞コロニーを比較的短時間に得るための、それにより、種々の段階における万能性幹細胞由来分化細胞を生じさせる効率を向上させる、方法を提供する。一実施形態では、濃縮は、ＣＤ３４を発現するＨＥ細胞、ＣＤ３４を発現するＨＳＣ細胞、Ｔ細胞前駆細胞またはＮＫ細胞前駆細胞およびＴ細胞またはＮＫ細胞を派生させるための、それにより、前記細胞集団の各々を作製する効率を向上させる、方法を提供する。濃縮は、細胞集団を選別して、分化段階／細胞型を示す特定の特徴的マーカーを発現する細胞を特定および入手することを含み得る。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４、ＣＤ４３、ＣＤ７３、ＣＸＣＲ４、および／またはＣＤ９３を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ４３陰性を使用する。いくつかの実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ７３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、ＣＤ７３陰性、およびＣＸＣＲ４陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、ＣＤ４３陰性、およびＣＤ９３陰性を使用する。いくつかの他の実施形態では、前記選別はＣＤ３４陽性、およびＣＤ９３陰性を使用する。さらなる濃縮法は、望まれない細胞型を表すマーカーを発現する細胞の枯渇により、濃縮された所望の細胞型集団を得ることを含む。

【０２７１】

従って、本発明の１つの態様は、以下の１または複数の細胞集団、細胞株、またはクローン細胞を含む組成物を提供する：（ｉ）多能性前駆細胞への分化能を有し、且つ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－である、万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋ＨＥ細胞（ｉＣＤ３４）；（ｉｉ）ＣＤ３４＋、且つ、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、およびＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－のうちの少なくとも１つである、万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）；（ｉｉｉ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である、万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）；（ｖ）ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）；（ｉｖ）ＣＤ４５＋ＣＤ４＋ＣＤ３＋またはＣＤ４５＋ＣＤ８＋ＣＤ３＋である、万能性幹細胞由来Ｔ細胞（ｉＴ）；（ｖｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＣＤ３－である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）；並びに、（ｖｉｉ）ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＮＫｐ４６＋である、万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）。いくつかの実施形態では、上記の組成物、細胞集団、細胞株またはクローン細胞は凍結保存が可能である。いくつかの実施形態では、前記組成物、細胞集団、細胞株またはクローン細胞は、１２時間超、２４時間超、３６時間超、４８時間超の周囲保存条件は可能であるが、３日間超、４日間超、５日間超、６日間超、または１週間超の周囲保存条件は可能でな

い。

【０２７２】

本発明の別の態様は、以下のうちの１または複数を含む混合物を提供する：（ｉ）万能性幹細胞由来ＣＤ３４＋ＨＥ細胞（ｉＣＤ３４）、並びに、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１もしくは複数の培地；（ｉｉ）万能性幹細胞由来運命確定造血内皮（ｉＨＥ）、並びに、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１もしくは複数の培地；（ｉｉｉ）万能性幹細胞由来運命確定ＨＳＣ、並びに、ｉＭＰＰ－Ａ、ｉＴＣ－Ａ２、ｉＴＣ－Ｂ２、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１もしくは複数の培地；（ｉｖ）万能性幹細胞由来多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）、およびｉＭＰＰ－Ａ；（ｖ）万能性幹細胞由来Ｔ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－Ｔ）、並びに、ｉＴＣ－Ａ２、およびｉＴＣ－Ｂ２から選択される１もしくは複数の培地；（ｖｉ）万能性幹細胞由来Ｔ細胞（ｉＴＣ）、およびｉＴＣ－Ｂ２；（ｖｉｉ）万能性幹細胞由来ＮＫ細胞前駆細胞（ｉｐｒｏ－ＮＫ）、並びに、ｉＮＫ－Ａ２、およびｉＮＫ－Ｂ２から選択される１もしくは複数の培地；並びに／または、（ｖｉｉｉ）万能性幹細胞由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）、およびｉＮＫ－Ｂ２。いくつかの実施形態では、前記培地：

ａ．　ｉＣＤ３４－Ｃは、ＲＯＣＫ阻害剤、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、ＩＬ１１、ＩＧＦ、およびＥＰＯからなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン、並びに所望により、Ｗｎｔ経路活性化因子を含み；ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まず；

ｂ．　ｉＭＰＰ－Ａは、ＢＭＰ活性化因子、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ１１からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み；

ｃ．　ｉＴＣ－Ａ２は、ＲＯＣＫ阻害剤；ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化因子を含み；

ｄ．　ｉＴＣ－Ｂ２は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、およびＩＬ７からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含み；前記組成物はＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＢＭＰ活性化因子、およびＲＯＣＫ阻害剤のうちの一つまたは複数を含まず；

ｅ．　ｉＮＫ－Ａ２は、ＲＯＣＫ阻害剤、並びにＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカイン；並びに所望により、ＢＭＰ活性化因子を含み、

ｆ．　ｉＮＫ－Ｂ２は、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ７およびＩＬ１５からなる群から選択される１または複数の増殖因子およびサイトカインを含む。

Ｅ．ｉＰＳＣ由来免疫細胞の治療用途

【０２７３】

本発明は、開示される方法および組成物を用いてｉＰＳＣから派生した、且つ、細胞に基づいた養子療法に好適である、免疫細胞の単離された集団または亜集団を含む組成物を提供する。一実施形態では、前記免疫細胞の単離された集団または亜集団は、ｉＰＳＣ由来ＨＳＣ細胞を含む。一実施形態では、前記免疫細胞の単離された集団または亜集団は、ｉＰＳＣ由来Ｔ細胞を含む。一実施形態では、前記免疫細胞の単離された集団または亜集団は、ｉＰＳＣ由来ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣ由来免疫細胞は、治療能の向上のためにエキソビボでさらに調節される。一実施形態では、ｉＰＳＣから派生した免疫細胞の単離された集団または亜集団は、ナイーブＴ細胞、幹細胞メモリーＴ細胞、および／またはセントラルメモリーＴ細胞の数または割合が増加している。一実施形態では、ｉＰＳＣから派生した免疫細胞の単離された集団または亜集団は、Ｉ型ＮＫＴ細胞の数または割合が増加している。別の実施形態では、ｉＰＳＣから派生した免疫細胞の単離された集団または亜集団は、獲得ＮＫ細胞の数または割合が増加している。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣ由来のＨＳＣ細胞、Ｔ細胞、またはＮＫ細胞の単離された集団または亜集団は、同種他家由来である。いくつかの他の実施形態では、ｉＰＳＣ由

来のＨＳＣ細胞、Ｔ細胞、またはＮＫ細胞の単離された集団または亜集団は、自己由来である。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、分化用のｉＰＳＣは、エフェクター細胞において望ましい治療特性を伝達する遺伝的インプリントを含み、前記遺伝的インプリントは前記ｉＰＳＣから派生した分化後の造血細胞において保持されており且つ機能的である。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、前記万能性幹細胞の遺伝的インプリントは、（ｉ）非万能性細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化の間もしくは後の、万能性細胞のゲノムにおける、ゲノム内の挿入、欠失もしくは置換を通じて得られる、１もしくは複数の遺伝子改変されたモダリティ；または、（ｉｉ）ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的である供給源特異的免疫細胞の１もしくは複数の保持可能な治療特性を含み、前記万能性細胞は前記供給源特異的免疫細胞から再プログラム化されたものであり、前記ｉＰＳＣは前記供給源治療特性を保持しており、前記供給源治療特性は前記ｉＰＳＣから派生した造血系細胞にも含まれる。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、以下のうちの一つまたは複数を含む：セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の移植、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質。いくつかの他の実施形態では、前記遺伝子改変されたモダリティは、以下のうちの一つまたは複数を含む：（ｉ）Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、またはＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；（ｉｉ）ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、Ａ２ＡＲ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーとの結合のための表面上誘発受容体の導入または発現増加。

【０２７７】

さらに別のいくつかの実施形態では、前記造血系細胞は、以下のうちの一つまたは複数に関連する供給源特異的免疫細胞の治療特性を含む：（ｉ）抗原標的受容体の発現；（ｉｉ）ＨＬＡの提示またはその欠如；（ｉｉｉ）腫瘍内微小環境に対する耐性；（ｉｖ）傍観者免疫細胞および免疫調節の誘導；（ｉｖ）腫瘍外効果の減少に伴う、対標的特異性の向上；（ｖ）化学療法等の治療に対する耐性；並びに（ｖｉ）ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、前記ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、またはＢ２Ｍヌル、ＨＬＡ－Ｅ／Ｇヌル、ＰＤＬ１ヌル、Ａ２ＡＲヌル、ＣＤ４７ヌル、ＬＡＧ３ヌル、ＴＩＭ３ヌル、ＴＡＰ１ヌル、ＴＡＰ２ヌル、タパシンヌル、ＮＬＲＣ５ヌル、ＰＤ１ヌル、ＲＦＫＡＮＫヌル、ＣＩＴＴＡヌル、ＲＦＸ５ヌルおよびＲＦＸＡＰヌルのうちの一つまたは複数を含む。改変ＨＬＡクラスＩおよび／または改変ＨＬＡクラスＩＩを有するこれらの細胞は、免疫検出に対する耐性が増加していることから、インビボ残留性の向上を示す。さらに、そのような細胞は、養子細胞療法におけるＨＬＡ適合要求を回避可能であることから、普遍的な、既製の治療用投与計画の源を与える。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＡＲ、ＴＣＲ、ＣＤ１３７、またはＣＤ８０のうちの一つまたは複数を含む。そのような細胞は向上した免疫エフェクター能を有する。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣおよびその派生造血細胞は、抗原特異的である。

【０２８１】
本発明の免疫細胞を養子細胞療法に適した対象に導入することによって、様々な疾患が改善され得る。疾患の例としては、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病（１型）、ある種の若年性特発性関節炎、糸球体腎炎、グレーヴス病、ギラン・バレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、ある種の心筋炎、多発性硬化症、天疱瘡／類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、関節リウマチ、強皮症／全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身紅はん性、エリテマトーデス、ある種の甲状腺炎、ある種のブドウ膜炎、白斑、多発性血管炎を伴う（ウェゲナー）肉芽腫症を含むがこれらに限定はされない、種々の自己免疫障害；急性白血病および慢性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫および骨髄異形成症候群を含むがこれらに限定はされない、造血器腫瘍；脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、膵臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭部、頸部、胃、子宮頸部、直腸、喉頭、または食道の腫瘍を含むがこれらに限定はされない、固形腫瘍；並びに、ＨＩＶ（ヒト免疫不全ウイルス）関連障害、ＲＳＶ（呼吸器合胞体ウイルス）関連障害、ＥＢＶ（エプスタイン‐バーウイルス）関連障害、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）関連障害、アデノウイルス関連障害およびＢＫポリオーマウイルス関連障害を含むがこれらに限定はされない、感染症が挙げられる。

【０２８２】
本発明の特定の実施形態は、本明細書に記載の細胞のいずれかを含む組成物を対象に投与することによる、治療を必要とする対象を治療する方法を対象とする。特定の実施形態では、用語「治療する」、「治療」等は、本明細書においては、所望の薬理的および／または生理的効果を得ることを一般に意味するように使用される。前記効果は、疾患の完全もしくは部分的な防止という観点では、予防的であり、並びに／または、疾患および／もしくは該疾患に起因する有害作用の部分的もしくは完全な治癒という観点では、治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物における疾患のあらゆる治療を包含しており、前記疾患に罹患し易いが、それに罹患しているとはまだ診断されていない対象において、前記疾患が生じることを予防すること；前記疾患を抑制すること、すなわち、その発達を抑止すること；または、前記疾患を軽減すること、すなわち、前記疾患の後退を引き起こすこと、を包含する。治療薬または組成物は、疾患または傷害の発生の前、間または後に投与され得る。患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減する、進行中の疾患の治療は、特に重要である。

【０２８３】
特定の実施形態では、前記対象は、細胞療法により治療、寛解、および／または改善可能な疾患、状態、および／または傷害を有する。いくつかの実施形態では、細胞療法を必要としている対象が、ある傷害、疾患、または状態を有する対象であること、それによって、細胞療法（例えば、細胞性物質が前記対象に投与される療法）が、前記傷害、疾患、または状態と関連した少なくとも１つの症状を治療、寛解、改善する、および／またはその重症度を低減することが可能であることが企図される。ある特定の実施形態は、細胞療法を必要としている対象が、限定はされないが、骨髄移植または幹細胞移植の候補、化学療法または放射線療法を受けた対象、過剰増殖性疾患もしくはがん（例えば造血系の過剰増殖性疾患もしくはがん）に罹患している、またはそれに罹患する危険性がある対象、腫瘍（例えば、固形腫瘍）を有する、またはそれを発生する危険性がある対象、ウイルス感染またはウイルス感染と関連した疾患に罹患している、またはそれに罹患する危険性がある対象を包含することが企図される。

【０２８４】
従って、本発明はさらに、本明細書で開示される方法および組成物によって作製された万能性細胞由来造血系細胞を含み、薬剤的に許容できる培地をさらに含む、医薬組成物を提供する。一実施形態では、前記医薬組成物は、本明細書で開示される方法および組成物によって作製された万能性細胞由来Ｔ細胞を含む。一実施形態では、前記医薬組成物は、本明細書で開示される方法および組成物によって作製された万能性細胞由来ＮＫ細胞を含

む。一実施形態では、前記医薬組成物は、本明細書で開示される方法および組成物によって作製された万能性細胞由来ＣＤ３４ＨＥ細胞を含む。一実施形態では、前記医薬組成物は、本明細書で開示される方法および組成物によって作製された万能性細胞由来ＨＳＣ細胞を含む。

【０２８５】

加えて、本発明は、自己免疫障害；造血器腫瘍；固形腫瘍；またはＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、もしくはＢＫポリオーマウイルスと関連した感染症を有する、養子細胞療法に適した対象に組成物を導入することによる、上記医薬組成物の治療用途を提供する。

【０２８６】

前記単離された万能性幹細胞由来造血系細胞は、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含み得る。いくつかの実施形態では、前記単離された万能性幹細胞由来造血系細胞は、約９５％～約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含む。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞療法を必要としている対象を治療するための、約９５％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣの単離された集団を含む組成物等の、精製されたＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞、またはＨＳＣを含む医薬組成物を提供する。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、前記医薬組成物は、約０．１％未満、約０．５％未満、約１％未満、約２％未満、約５％未満、約１０％未満、約１５％未満、約２０％未満、約２５％未満、または約３０％未満のｉＰＳＣ由来のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含む、万能性幹細胞由来造血系細胞の単離された集団を含む。前記派生造血系細胞の単離された集団は、いくつかの実施形態では、約０．１％超、約０．５％超、約１％超、約２％超、約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、または約３０％超のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含み得る。他の実施形態では、前記派生造血系細胞の単離された集団は、約０．１％～約１％、約１％～約３％、約３％～約５％、約１０％～約１５％、約１５％～２０％、約２０％～２５％、約２５％～３０％、約３０％～３５％、約３５％～４０％、約４０％～４５％、約４５％～５０％、約６０％～７０％、約７０％～８０％、約８０％～９０％、約９０％～９５％、または約９５％～約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含み得る。

【０２８８】

特定の実施形態では、前記派生造血系細胞は、約０．１％、約１％、約３％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、約９８％、約９９％、または約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞またはＨＳＣを含み得る。

【０２８９】

当業者には理解されることであるが、自己由来免疫細胞および同種他家由来免疫細胞の両方が、細胞療法に使用可能である。自己由来細胞療法は、感染が低減され、ＧｖＨＤの確率が低く、且つ、免疫再構築が速い可能性がある。同種他家由来細胞療法は、免疫介在性の移植片対悪性腫瘍（ＧＶＭ）効果を有し、且つ、再発率が低い可能性がある。細胞療法を必要としている患者または対象の特定の条件に基づいて、当業者であれば、どちらの特定タイプの療法を施行するかを決定することができる。

【０２９０】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物の前記派生造血系細胞は、対象に対して同種他家由来である。特定の実施形態では、本発明の医薬製剤の前記派生造血系細胞は、対象に対して自己由来である。自家移植において、前記派生造血系細胞の単離された集団は、

患者と、完全ＨＬＡ適合または部分ＨＬＡ適合である。別の実施形態では、前記派生造血系細胞は、対象とＨＬＡ適合ではない。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、少なくとも０．１×１０^{5}細胞、少なくとも０．５×１０^{5}細胞、少なくとも１×１０^{5}細胞、少なくとも５×１０^{5}細胞、少なくとも１０×１０^{5}細胞、少なくとも０．５×１０^{6}細胞、少なくとも０．７５×１０^{6}細胞、少なくとも１×１０^{6}細胞、少なくとも１．２５×１０^{6}細胞、少なくとも１．５×１０^{6}細胞、少なくとも１．７５×１０^{6}細胞、少なくとも２×１０^{6}細胞、少なくとも２．５×１０^{6}細胞、少なくとも３×１０^{6}細胞、少なくとも４×１０^{6}細胞、少なくとも５×１０^{6}細胞、少なくとも１０×１０^{6}細胞、少なくとも１５×１０^{6}細胞、少なくとも２０×１０^{6}細胞、少なくとも２５×１０^{6}細胞、または少なくとも３０×１０^{6}細胞である。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、約０．１×１０^{5}細胞～約１０×１０^{5}細胞；約０．５×１０^{6}細胞～約５×１０^{6}細胞；約１×１０^{6}細胞～約３×１０^{6}細胞；約１．５×１０^{6}細胞～約２．５×１０^{6}細胞；または約２×１０^{6}細胞～約２．５×１０^{6}細胞である。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、約１×１０^{6}細胞～約３×１０^{6}細胞；約１．０×１０^{6}細胞～約５×１０^{6}細胞；約１．０×１０^{6}細胞～約１０×１０^{6}細胞、約１０×１０^{6}細胞～約２０×１０^{6}細胞、約１０×１０^{6}細胞～約３０×１０^{6}細胞、または約２０×１０^{6}細胞～約３０×１０^{6}細胞である。

【０２９４】

いくつかの他の実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、約１×１０^{6}細胞～約３０×１０^{6}細胞；約１．０×１０^{6}細胞～約２０×１０^{6}細胞；約１．０×１０^{6}細胞～約１０×１０^{6}細胞、約２．０×１０^{6}細胞～約３０×１０^{6}細胞、約２．０×１０^{6}細胞～約２０×１０^{6}細胞、または約２．０×１０^{6}細胞～約１０×１０^{6}細胞である。

【０２９５】

さらに他の実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、約１×１０^{6}細胞、約２×１０^{6}細胞、約５×１０^{6}細胞、約７×１０^{6}細胞、約１０×１０^{6}細胞、約１５×１０^{6}細胞、約１７×１０^{6}細胞、約２０×１０^{6}細胞　約２５×１０^{6}細胞、または約３０×１０^{6}細胞である。

【０２９６】

一実施形態では、前記医薬組成物中の派生造血系細胞の数は、部分的または一本の臍帯内血液中の免疫細胞の数であり、すなわち、少なくとも０．１×１０^{5}細胞／体重ｋｇ、少なくとも０．５×１０^{5}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１×１０^{5}細胞／体重ｋｇ、少なくとも５×１０^{5}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１０×１０^{5}細胞／体重ｋｇ、少なくとも０．５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも０．７５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１．２５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１．５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１．７５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも２×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも２．５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも３×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも４×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１０×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも１５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも２０×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、少なくとも２５×１０^{6}細胞／体重ｋｇ、または少なくとも３０×１０^{6}細胞／体重ｋｇである。

【０２９７】

本発明により与えられた前記派生造血系細胞は、投与前にエキソビボまたはインビトロで増殖させることなく、対象に投与することができる。特定の実施形態では、派生造血系細胞の単離集団は、治療能が改善した免疫細胞を得るための１または複数の剤を用いて、

エキソビボで調節および処理される。前記調節された派生造血系細胞集団を洗浄することで前記処理剤を除去することができ、前記改善された集団は、前記集団のインビトロでのさらなる増殖なしで、患者に投与される。

【０２９８】

他の実施形態では、本発明は、１または複数の剤によるＴリンパ球の単離された集団または亜集団の調節の前に増殖される、派生造血系細胞の単離集団を提供する。派生造血系細胞の単離集団は、ＴＣＲ、ＣＡＲまたは他のタンパク質を発現するように、組換えにより作製できる。

【０２９９】

組換えＴＣＲまたはＣＡＲを発現する遺伝子改変された派生造血系細胞について、細胞の遺伝子改変の前であっても後であっても、前記細胞は、例えば、米国特許第６，３５２，６９４号；同第６，５３４，０５５号；同第６，９０５，６８０号；同第６，６９２，９６４号；同第５，８５８，３５８号；同第６，８８７，４６６号；同第６，９０５，６８１号；同第７，１４４，５７５号；同第７，０６７，３１８号；同第７，１７２，８６９号；同第７，２３２，５６６号；同第７，１７５，８４３号；同第５，８８３，２２３号；同第６，９０５，８７４号；同第６，７９７，５１４号；同第６，８６７，０４１号；および米国特許出願公開第２００６０１２１００５号に記載の方法を用いて、活性化および増殖可能である。

【０３００】

ある特定の実施形態において、派生遺伝子改変造血系細胞に対する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、様々なプロトコルによって与えることができる。例えば、各シグナルを与える剤は、溶液中にあってもよく、または表面に結合させてもよい。表面に結合させる場合、前記剤は、同一表面に結合させてもよいし（すなわち、「シス」構造）、または別々の表面に結合させてもよい（すなわち、「トランス」構造）。あるいは、一方の剤を表面に結合させ、他方の剤を溶液としてもよい。一実施形態では、共刺激シグナルを与える剤は細胞表面に結合させることができ、一次活性化シグナルを与える剤は、溶液とするか、または表面に結合させる。ある特定の実施形態では、両方の剤が溶液とされ得る。別の実施形態では、これらの剤は、可溶形態にした後、これらの剤に結合する、Ｆｃ受容体を発現する細胞または抗体または他の結合剤等の表面に架橋結合することができ、例えば、米国特許出願公開第２００４０１０１５１９号および同第２００６００３４８１０号に開示されている人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）は、本発明のＴリンパ球の活性化および増殖において使用が企図される。

【０３０１】

本発明の派生造血系細胞の集団を含む組成物は、無菌にすることができ、且つ、ヒト患者への投与に適し、且つ投与可能な状態の（すなわち、さらなる処理無しで投与できる）ものにすることができる。いくつかの実施形態では、前記治療用組成物は、患者に点滴可能な状態である。投与可能な状態の細胞ベースの組成物とは、対象への移植または投与の前にいかなる追加の処理も操作も必要としない組成物を意味する。

【０３０２】

患者への投与に適した、無菌の治療上許容できる組成物は、１もしくは複数の薬剤的に許容できる担体（添加剤）および／もしくは希釈剤（例えば、薬剤的に許容できる培地、例えば、細胞培養培地）、または他の薬剤的に許容できる成分を含み得る。薬剤的に許容できる担体および／または希釈剤は、部分的には、投与される特定の組成物、および治療用組成物の投与に使用される特定の方法によって決定される。従って、本発明の治療用組成物には種々様々な好適な製剤が存在する（例えば、Remington’s Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985を参照、この開示はその全体が参照によって本明細書に援用される）。

【０３０３】

特定の実施形態では、派生造血系細胞の単離集団を含む治療用細胞組成物は、薬剤的に許容できる細胞培養培地も含む。本明細書に開示される派生造血系細胞集団を含む治療用

組成物は、所望の治療目的を果たすために、経腸投与法もしくは非経口投与法によって単独で、または他の好適な化合物と共に、投与することができる。

【０３０４】

前記薬剤的に許容できる担体および／または希釈剤は、治療されるヒト対象への投与に好適とするために、純度が十分に高く、且つ毒性が十分に低くなければならない。それによって、治療用組成物の安定性がさらに維持または増加されるはずである。前記薬剤的に許容できる担体は液体であっても固体であってもよく、本発明の治療用組成物の他の成分と組み合わされた際に所望の嵩、稠度等を与えるように、予定の投与様式を考慮して、選択される。例えば、前記薬剤的に許容できる担体は、限定はされないが、以下とすることができる：結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース等）、賦形剤（例えば、ラクトースおよび他の糖類、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、リン酸水素カルシウム等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム等）、または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）。本発明の組成物に適した他の薬剤的に許容できる担体としては、限定はされないが、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘稠性パラフィン、ヒロドキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

【０３０５】

そのような担体溶液は、緩衝液、希釈剤および他の好適な添加剤も含有できる。緩衝液とは、ＰＨを大きく変化させずに酸または塩基を中和する化学的構成を有する溶液または液体を指す。本発明により想定される緩衝液の例としては、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、リンゲル液、５％ブドウ糖水溶液（Ｄ５Ｗ）、生理食塩水（０．９％ＮａＣｌ）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０３０６】

これらの薬剤的に許容できる担体および／または希釈剤は、治療用組成物の約３～約１０のＰＨを維持するのに十分な量で存在してもよい。すなわち、前記緩衝剤は、重量対重量ベースで、組成物全体の約５％ほどもあってよい。限定はされないが、塩化ナトリウムおよび塩化カリウム等の電解質も、治療用組成物に含ませることができる。一態様において、治療用組成物のＰＨは約４～約１０の範囲内である。あるいは、治療用組成物のＰＨは、約５～約９、約６～約９、または約６．５～約８の範囲内である。別の実施形態では、治療用組成物は、前記ＰＨ範囲の１つに含まれるＰＨを有する緩衝液を含む。別の実施形態では、治療用組成物は約７のＰＨを有する。あるいは、治療用組成物は約６．８～約７．４の範囲内のＰＨを有する。さらなる別の実施形態では、治療用組成物は、約７．４のＰＨを有する。

【０３０７】

本発明の無菌組成物は、無毒の薬剤的に許容できる培地中の、無菌溶液または無菌懸濁液であり得る。懸濁液は、細胞が固相に接着していない非接着状態を指し得る。例えば、懸濁液で維持された細胞は、撹拌が可能であり、培養皿等の支持体に接着していない。

【０３０８】

懸濁液は、微細な化学種が別の化学種と組み合わされた分散液（混合物）であり、前者は非常に細かく分割され混合されているために急速には沈降しない。懸濁液は、溶液を包含する液体培地等のビヒクルを用いて調製できる。いくつかの実施形態では、本発明の治療用組成物は、幹細胞および／または前駆細胞が、許容できる液体培地または溶液（例えば、食塩水または無血清培地）中に分散し、固相に付着していない、懸濁液である。日常生活において、最も一般的な懸濁液は、液体の水の中の固形物の懸濁液である。使用が可能な許容できる希釈剤（例えば、ビヒクルおよび溶媒）としては、水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム（食塩水）溶液、および無血清細胞培養培地がある。いくつかの実施形態

では、高張液が懸濁剤の作製で使用される。加えて、無菌の不揮発性油が溶媒または懸濁媒として従来より使用されている。非経口適用において、特に好適なビヒクルは、溶液、好ましくは油性溶液または水性溶液、および懸濁液、乳濁液、またはインプラントからなる。水性懸濁剤は、前記懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することがあり、例えば、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランが含まれる。いくつかの実施形態では、前記輸液は対象組織と等張である。いくつかの実施形態では、前記輸液は対象組織に対して高張である。

【０３０９】

本発明の投与可能な状態の医薬組成物を含む薬剤的に許容できる担体、希釈剤、および他の成分は、治療用組成物の臨床療法での使用を可能にする、米国医薬品グレードの試薬類から得られる。典型的には、あらゆる培地、溶液、または他の薬剤的に許容できる担体および／または希釈剤を含む、これらの最終試薬は、濾過滅菌等の、当該技術分野において慣行の方法で滅菌され、使用前に、マイコプラズマ汚染、エンドトキシン汚染、またはウイルス汚染等の、種々の望まれない汚染物質について検査される。薬剤的に許容できる担体は、一実施形態では、ヒトまたは動物起源の天然タンパク質を実質的に含まず、造血幹細胞・前駆細胞を包含する、医薬組成物の細胞集団の保存に適している。前記医薬組成物はヒト患者に投与されることが意図されているため、ウシ血清アルブミン、ウマ血清、およびウシ胎児血清等の細胞培養液成分を実質的に含まない。

【０３１０】

また本発明は、部分的には、本発明の薬剤的に許容できる細胞培養培地、特に組成物および／または培養液、の用途を提供する。そのような組成物はヒト対象への投与に適している。一般的に、本発明の前記派生造血系細胞の維持、増殖、および／または健康を支持するあらゆる培地が、医薬品用細胞培地としての使用に適している。特定の実施形態では、薬剤的に許容できる細胞培養培地は、無血清、且つ／またはフィーダー非含有の培地である。

【０３１１】

前記医薬組成物は、調節された派生造血系細胞の単離集団の保存に適した無血清培地を含むことができる。種々の実施形態において、前記無血清培地は動物質を含まず、所望により無タンパク質であってもよい。所望により、前記培地は生物製剤的に許容できる組換えタンパク質を含有してもよい。動物質を含まない培地とは、成分が非動物供給源に由来している培地を指す。組換えタンパク質が、動物質を含まない培地中の元々含まれていた動物性タンパク質を代替しており、これらの栄養分は合成供給源、植物供給源または微生物供給源から得られる。無タンパク質培地は、対照的に、タンパク質を実質的に含まないものと定義される。

【０３１２】

上記の培地の例が、例示であって、本発明における使用に適した培地の配合を限定するものではないこと、および、当業者に公知であり利用可能な多くの好適な培地が存在することは、当業者には理解される。

【０３１３】

前記医薬組成物は、マイコプラズマ汚染、エンドトキシン汚染、および微生物汚染を実質的に含まない。特定の実施形態では、前記治療用組成物は、約１０、約５、約４、約３、約２、約１、約０．１、または約０．０５μｇ／ｍｌ未満のウシ血清アルブミンを含有する。

【０３１４】

マイコプラズマ汚染および微生物汚染に関して、「を実質的に含まない」とは、本明細書で使用される場合、当業者に公知の一般に認められた検査での測定値が陰性であることを意味する。例えば、マイコプラズマ汚染は、適切なポジティブコントロールおよびネガティブコントロールと共に、ブロス培地中で治療用組成物の試料を継代培養し、３７℃で

１日目、３日目、７日目、および１４日目に寒天板上に播くことによって、判定される。試料の見た目が、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールの見た目と、１００×の顕微鏡で比較される。さらに、指標細胞培養物の播種物が３日間および５日間インキュベートされ、マイコプラズマの有無について、ＤＮＡ結合性蛍光色素を用いる落射蛍光顕微鏡法によって６００×で検査される。前記寒天および／またはブロス培地の手順、並びに前記指標細胞培養の手順がマイコプラズマ汚染の証拠を何も示さない場合に、試料は満足のいくものと見なされる。

【０３１５】

有機溶剤または好適な有機溶剤は、全体として、固形、液状、またはガス状の溶質を溶解し、溶液をもたらす、炭素を含有する液体または気体に関する。好適な有機溶剤は、哺乳類細胞へのエキソビボ投与、または哺乳類細胞とのインキュベーションに適した有機溶剤であり、インキュベーションまたは投与の時間、選択された濃度において、エキソビボ条件（例えば、細胞培養）下またはインビボにおいて毒性または他の阻害効果が最小であること等により、対象へのインビボ投与にも適したものであり得る。好適な有機溶剤は、本明細書に記載の剤の保存安定性および取り扱いにも適したものであるべきである。

【０３１６】

好適な有機溶剤の例としては、限定はされないが、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメトキシエタン（ＤＭＥ）、およびジメチルアセトアミドが挙げられ、これらの混合物または組み合わせも含まれる。ある特定の実施形態では、組成物または有機溶剤は酢酸メチルを実質的に含まず、これは、組成物または溶媒中に微量の酢酸メチルしか存在すべきでないこと、好ましくは検出不能な量であること、を意味している（例えば、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）等で測定）。

【０３１７】

エンドトキシンを含まない容器または組成物とは、容器または組成物が、高々微量（すなわち、対象に対して有害生理作用を示さない量）のエンドトキシン、または検出不能な量のエンドトキシンを含有すること、を意味する。「実質的にエンドトキシンを含まない」とは、生物製剤についてＦＤＡによって許可されている、５ＥＵ／ｋｇ体重／日の全エンドトキシン、平均７０ｋｇの人の場合で３５０ＥＵ／細胞総用量、よりも細胞の用量当たりのエンドトキシンが少ないことを意味する。

【０３１８】

一実施形態では、エンドトキシンを含まない容器および／または組成物は、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％エンドトキシン非含有である。エンドトキシンはリステリア菌（Listeria monocytogenes）等のグラム陽性細菌に存在し得るが、エンドトキシンは、ある特定の細菌、典型的にはグラム陰性細菌、と関連した毒素である。最も多く見られるエンドトキシンは、種々のグラム陰性細菌の外膜に存在し、且つ、これらの細菌の疾患を引き起こす能力において中心的な病原特性を示す、リポ多糖類（ＬＰＳ）またはリポオリゴ糖（ＬＯＳ）である。少量のエンドトキシンは、ヒトにおいて、他の有害生理作用の中でも、発熱、血圧低下、並びに炎症および凝固の活性化、を引き起こし得る。従って、少量であってもヒトにおいて有害作用を引き起こし得ることから、微量のエンドトキシンの大部分または全てを製剤容器から除去することが、しばしば望ましい。エンドトキシンは、当該技術分野において公知の方法を用いて容器から除去可能であり、例えば、容器は、エンドトキシンを含まない水を用いるＨＥＰＡ除菌洗浄装置内で洗浄され、２５０℃で脱パイロジェン処理され、クラス１００／１０クリーンルーム（例えば、クラス１００クリーンルームは、１立方フィートの空気中に０．５ミクロンより大きい粒子を１００個しかない）内に設置されたＨＥＰＡ除菌ワークステーションでクリーンパッケージされ得る。

【実施例】

【０３１９】

以下の実施例は例示であり、限定を目的とするものではない。

実施例１：ｈｉＰＳＣの作製および維持

【０３２０】

線維芽細胞および血液細胞を含む体細胞を、ＲＯＣＫ、ＭＥＫ、ＧＳＫ３経路およびＴＧＦβ受容体の阻害剤を含有する再プログラム化用培地の存在下で、ＯＣＴ４／ＳＯＸ２／ＬａｒｇｅＴ、ＯＣＴ４／ＳＯＸ２またはＯＣＴ４／ＳＯＸ２／ＮＡＮＯＧ／ＬａｒｇｅＴを含むがこれらに限定はされない種々の因子の組み合わせを用いて、万能性状態に向かって再プログラム化するように誘導した（Valamehr et al. Sci Rep. 2012; 2: 213）。誘導の１４日後、再プログラム化中の集団を、ＲＯＣＫ、ＧＳＫ３、およびＭＥＫ経路の阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、並びに白血病抑制因子（ＬＩＦ）を含有する維持培地に切り替えた（Valamehr et al. Stem Cell Reports 2014, 2(3): 366-381）。細胞を維持培地中で不確定に維持した。

【０３２１】

誘導のおよそ３週間後、この再プログラム化中集団を９６ウェルプレートの個々のウェルに選別した。選択されたクローンを特徴付けし、ナイーブ型ｈｉＰＳＣの代表となる完全に再プログラム化されたクローンを、分化研究のために選択した（Valamehr et al. Stem Cell Reports 2014, 2(3): 366-381）。維持中および分化後の％未分化細胞を決定するために、ＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１８１およびＣＤ３０の表面上共発現についてフローサイトメトリー解析を行った。

【０３２２】

体細胞の再プログラム化の間または後に、例えば、参照によりその全体が援用される米国出願シリアル番号６２／２５１，０３２および６２／３３７，２５８に開示されている方法を用いて、ゲノム改変ｉＰＳＣを作製することもできる。

【０３２３】

さらに、がんを含む種々の疾患の治療に寄与する特異な特性を有し、且つ／または、同じ特異な特性を有するリンパ系エフェクター細胞に分化可能であるために、優先的なドナーまたは患者の、Ｔ細胞等の免疫系細胞を含む、選択された体細胞から再プログラム化されたｈｉＰＳＣを得てもよい。

実施例２：ｉＣＤ３４培養プラットフォームを用いた造血分化および再構成および生着能を有するＨＥ集団の同定

【０３２４】

このｉＣＤ３４プラットフォームは造血系細胞分化用に最適化された系である。造血系への分化を惹起するため、０日目にｈｉＰＳＣを維持培地中に単層に播種し、約２４時間接着および増殖させた。この時点（１日目）で、前記維持培地を除去し、維持因子を含有しない基本培地で置換した。２日目頃に、培地をｉＣＤ３４－Ａ（図１参照）に切り替えることによって造血分化を惹起した。図１に示されるように、この培地には、３日目に増殖因子ｂＦＧＦを添加し、分化のために後にｉＣＤ３４－Ｂ培地に切り替えた。これらの単層を５～６日目頃まで維持し、その時点で、単一細胞に解離させ、ｉＣＤ３４－Ｃ培地中、低密度単層に播種し、１０日目頃まで分化させた。２日目頃の造血分化の開始から分化の１０日目頃まで、低酸素分圧（２～１０％O_2）を維持した。

【０３２５】

培養プロセス中、単層を単一細胞に解離し、ＣＤ３４、並びに所望により、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＸＣＲ４、ＣＤ７３および／またはＣＤ９３の表面マーカー発現を解析することによって、造血系への分化誘導をモニターした（図４Ａ）。分化の８日目頃に、細胞表面発現シグネチャーＣＤ３４＋によって、ＨＥを示す細胞集団の出現が観察された。このＣＤ３４＋細胞ではＣＤ４３－ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－も観察された。このＣＤ３４＋集団を１０日目頃まで維持した（図４Ａ）。１０日目に（この時点は約９日目に短縮することもできるし、あるいは約１２日まで延長することもできる）、細胞を単一細胞に解離させ、ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ａｒｉａを用いるＦＡＣＳによって、さらなる解析および機能評価のためのＣＤ３４＋ＨＥ集団を選別した。図４Ａは例示的な造血出力能を示している。単一ｉＰＳＣの入力につき、４６３個の全ＣＤ３４＋細胞および４１個のＣＤ３４＋ＣＤ

４３－ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－細胞が生じ、これは、運命確定ＨＥ細胞への変換率が少なくとも２．５％であることを示している（図４Ａ）。

【０３２６】

ｈｉＰＳＣ由来ｉＨＥの生着能を示すために、１０日目のＣＤ３４＋細胞を選別し、上記のようにｉＭＰＰアッセイにおいて７日間培養した。計１７日間の培養後（１０日間のｉＣＤ３４＋７日間のｉＭＰＰ）、後眼窩注射によっておよそ４００，０００個の細胞をＮＳＧに注射した。コントロールとして、２００，０００個の臍帯血ＣＤ３４＋細胞を別々のマウスに注射した。図２２は、マウスの末梢血中のヒトＣＤ４５マーカーを発現する細胞の存在によって示される、生着したＣＤ３４陽性細胞の５週に亘る再構成を示している。

実施例３：小分子、サイトカインおよび播種密度の調節によるＨＥ発生の最適化

【０３２７】

ｈｉＰＳＣからＨＥの効率的発生を最適化するため、約１０日間の分化の後、いくつかのパラメーターを調べた。分化０日目の単層の最適播種密度を、７．５×１０^{4}／ウェルから１．５×１０^{5}／ウェルまでの漸増数のｈｉＰＳＣをｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）被覆６ウェル培養皿上に播種し、次いで、約１０日にＣＤ３４＋ＨＥ集団の発生を解析することによって、評価した。図５Ａは、細胞播種密度の増加が、ＣＤ３４＋細胞の合計割合を増加させるが、ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－ＨＥ亜集団を減少させることを示している。この減少にもかかわらず、１０日間の単層分化後のｈｉＰＳＣのＨＥへの最も高い変換率は、１．５×１０^{5}／ウェルで試験された最も高い播種密度での変換率であった（図４Ｃ）。

【０３２８】

造血分化の初期段階におけるＢＭＰ４濃度調節のＨＥ発生に対する影響を、培養物を分化の約２日目から約６日目まで０ｎｇ／ｍｌから３０ｎｇ／ｍｌまでの範囲の漸増濃度のＢＭＰ４で処理することによって、評価した。１０日目のＨＥの発生を、ＣＤ３４＋ＨＥ集団の検出によって評価した。図５Ｂは、２日目から６日目までの漸増濃度のＢＭＰ４が、閾値ＢＭＰ４濃度以下で、１０日目のＨＥ集団を増加させることを示しており、最適濃度が約３ｎｇ／ｍＬであることを示している。

【０３２９】

Ｗｎｔ経路活性化剤ＣＨＩＲ９９０２１は、ｈｉＰＳＣからの運命確定造血プログラムの誘導に関与する。造血分化プロトコルの誘導段階におけるＣＨＩＲの調節の影響を、培養物を約３．７５日目から約６日目まで漸増濃度のＣＨＩＲで処理することによって、を評価した。図５Ｃは、ＣＨＩＲ９９０２１濃度の増加が、ＣＤ３４＋細胞の合計割合を増加させる一方で、ＨＥ亜集団の割合を減少させ、ＣＨＩＲ９９０２１の最適濃度がおよそ１ｕＭであることを示している。

【０３３０】

分化誘導プロトコルの６日目に、単層培養物を単一細胞に解離させ、ＨＥへのさらなる分化のために再び単層に播種した。図５Ｄに示されるように、細胞濃度を１．５×１０^{5}から７．４×１０^{4}に減少させるにつれてＨＥ集団の割合は増加しており、６日の播種密度がＨＥの発生に影響することが示された。

実施例４：Ｎｏｔｃｈ依存的造血およびＭＰＰ分化によるＨＥの造血分化能の判定

【０３３１】

ｈｉＰＳＣ由来運命確定集団ＨＥの造血分化能を判定するため、ＦＡＣＳを用いて細胞を選別し、図１の多能性前駆細胞アッセイ（ｉＭＰＰ）に記載のように、内皮造血転換（endothelial to hematopoietic transition）を起こしてＣＤ４５＋造血前駆細胞を生じる能力について評価した。およそ３０，０００個のＣＤ３４＋ＨＥ細胞を、ｉＭＰＰ－Ａ培地中で単層に播種し、さらに６～８日間培養した。図６Ａでは、円形の造血細胞が出現した単層培養物における表現型の変化が示されており、フローサイトメトリー染色法によって６～８日間の培養期間に亘るＣＤ４５＋の割合が確認されている。

【０３３２】

分化誘導プロトコルの１０日目に生じたＨＥ集団が運命確定ＨＥであるかどうかを評価

するため、ＣＤ３４＋ＨＥ選別細胞を、７～９日目のｉＭＰＰアッセイの期間中、Ｎｏｔｃｈ経路阻害剤であるγセクレターゼ阻害剤（ｇＳＩ）で処理した。新たなｇＳＩを２日毎にｉＭＰＰ－Ａ培地に添加した。約８日後、単層培養物をＣＤ４５＋造血細胞の出現についてフローサイトメトリーで評価した。ビヒクルコントロールとの比較において、有意に少ないＣＤ４５＋細胞がｇＳＩ処理培養物中に見られ、これは、Ｎｏｔｃｈシグナル経路への依存と、それ故の、運命確定ＨＥの存在を示すものである（図６Ｂ）。

実施例５：酸素条件の操作によるＨＥおよびｉＭＰＰ発生の最適化

【０３３３】

酸素環境が運命確定ＨＥおよびｉＭＰＰ造血前駆細胞の発生に影響を与えるかどうかを評価するために、正常酸素圧条件（２１％O_2）または低酸素条件（５％O_2）の下で、図１に記載の通りにｈｉＰＳＣを分化させた。分化の１０日目頃に、ＣＤ３４＋ＨＥ集団の存在についてフローサイトメトリーで単層を計数および評価した。図７Ａに示されるように、低酸素条件下での分化は、ＣＤ３４＋ＨＥの発生量を増加させる結果となった。低酸素条件下で生じたＨＥがＣＤ４５＋造血前駆細胞を生じる能力を保持していることを確認するため、ＣＤ３４＋細胞を、正常酸素圧分化条件および低酸素分化条件からＦＡＣＳで単離し、ｉＭＰＰアッセイで評価した。両条件下で生じたＨＥは、等しいｉＭＰＰ分化能を有しており、これは、低酸素条件下での造血分化が運命確定ＨＥの産出量を増加させることを示すものである（図７Ｂ）。

実施例６：８日目の分化培養物およびＨＥの凍結保存

【０３３４】

直接的分化プロトコルの１０日目頃に、培養物全体を解離させ、８日目の１０％ＤＭＳＯ添加培地における凍結保存後の造血分化能の維持能を評価した。解凍した細胞を再懸濁した後、図１に記載の通りにｉＭＰＰ－Ａ培地中で７日間培養し、その後フローサイトメトリー解析にかけた。図８Ａに示されるように、凍結保存された１０日目の細胞は凍結／解凍プロセスを生存し、ＣＤ４５＋細胞の存在によって示される、未凍結コントロールに匹敵する造血分化能を有した。

【０３３５】

選別されたＣＤ３４＋細胞を、凍結保存後に造血分化能を維持する能力について、評価した。低酸素条件下で生じた１０日目のｉＣＤ３４を、図１に記載の通りに単離してｉＭＰＰアッセイに直接播種するか、または、ｉＭＰＰ－Ａ培地中で７日間凍結保存した後に解凍してｉＭＰＰアッセイに播種した。図８に示されるように、凍結保存された１０日目のｉＣＤ３４細胞は、解凍の際、生存し、新鮮なｉＣＤ３４＋細胞に類似した表現型を示すことができる（図８Ａ）。凍結保存された１０日目の選別ＣＤ３４＋細胞の解凍直後の生存度は７０％を上回る（図８Ｂ）。また、凍結保存された１０日目の選別ｉＣＤ３４＋細胞が、ｉＭＰＰアッセイの間に生存してＣＤ４５＋造血細胞を生じることが可能であり（図８Ｃ）、且つ、ｉＴリンパ球前駆細胞およびｉＮＫリンパ球前駆細胞を生じることが可能である（図８Ｄ）ことが示されている。この凍結保存プロセスは、６～１２日目の中間体細胞、または、ｉＨＳＣ、ｉＭＰＰ、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴ、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ、ｉｐｒｏ－Ｔ、ｉｐｒｏ－ＮＫ、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞およびＢ細胞を含む誘導分化中の他の下流の細胞に適用可能である。

実施例７：一晩の出荷後の８日目の分化培養物の回復

【０３３６】

６ウェルプレートの６日目分化培養物を、２００，０００細胞／フラスコの播種密度でＴ２５培養フラスコ内に継代し、次いで、８日目に培地で完全に満たし、発泡スチロール内に一晩置いて、凍結保存の必要なく新鮮細胞を直接出荷できるかどうかを評価した。３７℃の温度をできるだけ長く保つために、初めに３７℃水浴中で維持したコールドパックも発泡スチロールボックスに加えた。３７℃恒温器内に置かれたコントロールフラスコと共に、２種の培地組成物を試験した：８日目の工程で利用された３０％濃度のサイトカインおよびモルフォゲンを含むフラスコ並びに１００％濃度のフラスコ。９日目に、これらのフラスコをボックスから取り出し、培地を１０ｍＬの８日目培地と交換し、それと一緒

に新しいキャップをフラスコに嵌め、回復させた後、１０日目にＣＤ３４＋ＨＥ集団の存在についてのフローサイトメトリー解析用に加工した。図９から分かるように、ＨＥの全体産出量は全ての条件の間で同等であったが、このことは、ＨＥ細胞を搬送するための有効な手段として、８日目培養物を新鮮なまま一晩かけて出荷することが可能であることを示している。この新鮮なままの出荷および取扱いのプロセスは、ｉＨＳＣ、ｉＭＰＰ、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＴ、ｐｒｅ－ｉｐｒｏＮＫ、ｉｐｒｏ－Ｔ、およびｉｐｒｏ－ＮＫを含む誘導分化中に得られる他の中間体細胞の分化能に影響を与えない。新鮮なままの出荷はｉＰＳＣ由来のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞またはＢ細胞にも適用できる。

実施例８：ＤＬＬ４発現間質細胞を用いた成熟Ｔリンパ系および成熟ＮＫリンパ系に向けたＨＥの分化の継続

【０３３７】

選別されたＣＤ３４＋ＨＥ細胞をＴリンパ系およびＮＫリンパ系に向けてさらに分化させた。Ｔ細胞においてのみ、選別後、ＨＥ細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、およびＩＬ７を含むｉＴＣ－Ａ２無血清分化培地中、低接着組織培養プレートに移した（図２）。５日後、細胞を、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ７を含有するｉＴＣ－Ｂ２分化培地中の、ＤＬＬ４発現間質細胞を含有する接着性培養物に移して、Ｔ細胞分化を完了させた。（ＨＥ単離後）およそ１０日間の培養の後、この細胞培養物を、細胞表面マーカーであるＣＤ３４およびＣＤ７の共発現によって、Ｔ細胞前駆細胞の発生について評価した。およそ１５～２０日間さらに分化させた後、これらのＣＤ３４＋ＣＤ７＋Ｔ細胞前駆細胞は、ＣＤ４およびＣＤ８の発現によって示される、明確な成熟Ｔ細胞集団を生じた。図１０は、前記共培養物において生じたＣＤ４５＋ＣＤ５６－集団の解析による、初期Ｔ細胞前駆細胞サブセット（図１０Ａ）および成熟Ｔ細胞サブセット（図１０Ｂ）を生じる、１０日目ＨＥ集団のインビトロにおける分化能を示している。図１５は、（ＨＥ単離の後）およそ３０日間培養した後の前記共培養物において生じたＣＤ４５＋ＣＤ５６－集団の解析による、成熟Ｔ細胞サブセットを生じる、１０日目ＨＥ集団のインビトロにおける分化能を示している。

【０３３８】

ＮＫ細胞においてのみ、選別後、ＨＥ細胞を、ＳＣＦ、ＴＰＯ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ１５、およびＩＬ７を含有するｉＮＫ－Ａ２無血清分化培地中、低接着組織培養プレート上で培養した（図３）。５日後、細胞を、ＳＣＦ、ＩＬ３、ＩＬ１５、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ７を含有するｉＮＫ－Ｂ２分化培地中の、ＤＬＬ４発現間質細胞を含有する接着性培養物に移して、ＮＫ細胞分化を完了させた。（ＨＥ単離後）およそ１０～１５日間の培養の後、この細胞培養物を、ＮＫ細胞前駆細胞の発生と、それに続く、追加の１０～１５日間の培養後の成熟ＮＫサブセットの発生について評価した。ＣＤ５６およびＣＤ１６１（ＮＫＲ－Ｐ１Ａ）が初期ＮＫ細胞発生中に発現される最初の細胞表面マーカーであり、その後、後期成熟ＮＫ細胞サブセット上でのＣＤ１６、ＫＩＲ、ＣＤ８およびＮＫＧ２Ｄ（ＣＤ３１４）の発現が続く。図１１は、前記共培養物において生じたＣＤ４５＋集団の解析による、初期ＮＫ細胞前駆細胞サブセットおよび成熟ＮＫ細胞サブセットを生じる、１０日目ＨＥ集団のインビトロにおける分化能を示している。

【０３３９】

ＮＫ細胞前駆細胞の成熟を増進する代わりの方法として、浮遊培養液中でのフィーダー細胞との共培養がある。２０日目のｉＮＫ細胞を、ＤＬＬ４－間質細胞培養物から、ＳＣＦ、ＩＬ１５、Ｆｌｔ３ＬおよびＩＬ７を含有するｉＮＫ－Ｂ２培地中のフィーダーをベースとした浮遊培養物に移し、さらに１２日間培養した。図１６は、末梢血由来ＮＫ細胞と比較した、間質ベースの共培養物およびフィーダーベースの共培養物中に生じたＣＤ４５＋集団の解析による、フィーダー浮遊培養物を用いて成熟ＮＫ細胞サブセットを生じる、１０日目ＨＥ集団のインビトロにおける分化能を示している。ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞を、ＮＫ細胞系譜に向けて２０日間分化させ、その後、さらなる成熟のために浮遊培養で播種した。成熟ＮＫ系譜マーカーによって、ＣＤ５６、ＣＤ１２２、ＮＫｐ３０、ＣＤ９４、ＣＤ１６、ＮＫＧ２ＤおよびＫＩＲにより定義される成熟ＮＫ細胞の存在が確

認される。

実施例９：単層ｈｉＰＳＣ造血分化プラットフォームは高度に拡張性のある増殖戦略を可能にする

【０３４０】

図１～３に記載の既知組成の無血清無フィーダー培養物中で、単層に播種し、造血細胞に向けて分化させたｈｉＰＳＣを、造血分化を惹起するために凝集させ胚様体を形成させたｈｉＰＳＣと比較した（Kennedy et al., Cell Reports 2012:1722-1735）。両方の培養セットが１００，０００個のｈｉＰＳＣを最初の開始数として用いた。各々の系の増殖能を示すために、造血分化プロセスの間、細胞計数および表現型評価を定期的に行った。図１２に示されるように、分化の６日目までに、単層培養物中にはかなりの数のＣＤ３４陽性細胞が検出されたが（２×１０^{6}個超のＣＤ３４＋細胞）、それ対して、ＥＢ形式ではＣＤ３４陽性細胞は検出されなかった。分化の８日目に、単層形式はおよそ２．４×１０^{6}個の細胞を生じたが、一方、ＥＢ形式では、出発材料としてのｉＰＳＣがおよそ同数であるにもかかわらず、およそ１００，０００個のＣＤ３４陽性細胞しか検出されず、およそ２４倍の差異が示された。加えて、評価の時間として、単層形式が二次造血を示すＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞のみを生じた一方で、ＥＢ形式は二次造血を示す多数のＣＤ３４＋ＣＤ４３＋細胞を生じた（Kennedy et al., 2012）。図１３はさらに、オフザシェルフのｉＮＫ細胞およびｉＴ細胞の生産のための、本明細書に開示される単層ｈｉＰＳＣ造血分化プラットフォームの拡張可能な増殖を例示している。本明細書にて提供された万能性細胞クローン増殖プラットフォームは、例えば、単一万能性細胞クローンから、治療上機能的な１０^{6}個ものＮＫ細胞またはＴ細胞をそれぞれ含む約１００万個の治療量バイアルまで、オフザシェルフ（off-the-shelf）の拡張性をさらに確実にする。開示のクローン増殖は、広範な均一性をさらにもたらし、これにより、製品整合性、品質管理および品質保証が確実とされる。いくつかの実施形態では、単一万能性細胞クローンは、再プログラム化の間もしくは後の遺伝子改変を通じて得られる、または、万能性細胞が由来するドナー特異的供給源細胞から保持される、所望の遺伝的インプリントを含有する。

実施例１０：活性化Ｔ細胞の増殖抑制におけるｉＣＤ３４＋細胞の免疫制御特性

【０３４１】

ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４陽性細胞（ｉＣＤ３４；ＣＤ３４＋ＣＤ４３－）の免疫制御能を決定するため、１０日目のＣＤ３４選別細胞を、活性化された末梢血由来ＣＤ３発現Ｔ細胞と、ｉＭＰＰ－Ａ培地中で１：１の比で共培養した。３７℃で５日間のインキュベーションの後、共培養物を計数用ビーズと混合し、フローサイトメトリーでアッセイして、各試料中のＴ細胞の絶対数を決定した。図１４は、前記共培養物とＣＤ３＋Ｔ細胞単独を含有する培養物との比較によって示される、ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞の免疫制御能を示している。ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞と共培養されたＣＤ３＋Ｔ細胞は、細胞生存を減少させたが、培養物中のＣＤ３４＋細胞の総数は影響されなかった（図１４）。

実施例１１：サイトカイン放出および脱顆粒によって示されるサイトカイン誘起性活性化によるｉＮＫ細胞機能の決定

【０３４２】

ｈｉＰＳＣ由来成熟ｉＮＫ細胞の機能性を示すために、２０日目（ＨＥ単離後）ｉＮＫ細胞を、フィーダーベースの浮遊培養に移し、追加で１０日間、ＳＣＦ、ＩＬ１５、ＩＬ７およびＦｌｔ３Ｌを含有するｉＮＫ－Ｂ２培地中に置いた。１０日間の追加培養の後、ｉＮＫ細胞をＩＬ１２およびＩＬ１８で刺激して、ｉＮＫ細胞活性化を誘導した。末梢血ＮＫ細胞と同様に、ｉＣＤ３４由来ｉＮＫはサイトカイン刺激に応答し、炎症誘発性サイトカインを分泌した。図１７は、ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ゲーティング戦略に基づく、ＣＤ１０７Ａ（脱顆粒を示す細胞表面マーカー）の発現および細胞内インターフェロンγ染色から分かるｉＮＫ細胞の活性化を、同一の間質およびフィーダーの浮遊共培養物並びに末梢血由来ＮＫ細胞を用いて作製された臍帯血由来ＮＫ細胞と比較して示している。

実施例１２：Ｔ細胞およびＮＫ細胞を作製するための無フィーダー分化培養の確立

【０３４３】

上記のＴおよびＮＫリンパ系分化プラットフォームを、間質細胞も含まない無フィーダー分化プラットフォームを用いる、臍帯血由来およびｈｉＰＳＣ由来のｉＴ前駆細胞およびｉＮＫ前駆細胞の作製のために、さらに最適化した。

【０３４４】

ＮＫ細胞においてのみ、濃縮された臍帯血ＣＤ３４＋細胞を、ＤＬＬ４タンパク質または対照タンパク質を含有する培養プレート内で、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ１５およびＩＬ７を含有するｉＮＫ－Ａ２無血清分化培地中に、播種した。５日後、ｉＮＫ－Ｂ２培地を維持して、ＮＫ細胞分化を完了させた。およそ１０～１５日間の培養後、培養物をＮＫ細胞前駆細胞の発生および骨髄性細胞の非存在について評価した。ＣＤ５６、ＣＤ７およびＣＤ１６１はＮＫ細胞の発生中に発現される最初の細胞表面マーカーである。ＣＤ１１ｂおよびＣＤ１４は骨髄性細胞サブセット上に発現される細胞表面マーカーである。図１８は、ＮＫ細胞に向けた臍帯血ＣＤ３４＋細胞の無間質分化を示している。間質ベースの培養および無間質対照培養と比較して、プレートに結合したＤＬＬ４がＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＣＤ１６１＋ＮＫ細胞前駆細胞のより迅速且つ効率的な分化を支持していること、並びに、臍帯血ＣＤ３４＋細胞が、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を用いる間質ベースの分化プラットフォームと同様に（表現型の面で）、ＤＬＬ４発現無間質分化プラットフォームにおいて初期ＮＫ細胞前駆細胞（ｐｒｏ－ＮＫ）を生じるインビトロ分化能を有していること、が示された。初期ＮＫ系譜マーカーによって、ＣＤ５６、ＣＤ７およびＣＤ１６１、並びに骨髄マーカーであるＣＤ１１ｂおよびＣＤ１４の非存在によって定義される、ｉｐｒｏ－ＮＫ細胞の存在が確認される。

【０３４５】

無間質分化プラットフォームにおいてｉＮＫ細胞前駆細胞を生じるｈｉＰＳＣ由来ＨＥ細胞の能力を示すために、１０日目ＣＤ３４＋ｉＨＥ選別細胞を、ＤＬＬ４タンパク質または対照タンパク質を含有する培養液中のｉＮＫ－Ａ２培地中で、培養した。次に、このｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞をＮＫ細胞系譜に向けて２０日間分化させ、その後、さらなる成熟のために浮遊培養で播種した。図１９は、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を用いる、ＣＤ５６、ＣＤ１６１およびＣＤ９４の発現から分かる、ｉＮＫ細胞前駆細胞を生じるｈｉＰＳＣ由来ｉＨＥの能力を示している。プレートに結合したＤＬＬ４は、ＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＣＤ１６１＋ＮＫ細胞前駆細胞の分化を支持するが、ＣＤ１１ｂ＋骨髄性細胞の分化は支持しない。５日後、ｉＮＫ－Ｂ２培地を維持して、ＮＫ細胞分化を完了させた。成熟ＮＫ細胞の存在を確認するためのマーカーとしては、ＣＤ５６、ＣＤ１２２、ＮＫｐ３０、ＣＤ９４、ＣＤ１６、ＮＫＧ２ＤおよびＫＩＲが挙げられる。

【０３４６】

Ｔ細胞においてのみ、臍帯血から濃縮されたＣＤ３４＋細胞を、ＤＬＬ４タンパク質または対照タンパク質を含有する培養液中のｉＴ－Ａ２培地中に播種した。５日後、Ｔ細胞前駆細胞（ｐｒｏＴ）の作製のためにｉＴ－Ｂ２培地を維持した。およそ１０～１５日間の培養の後、この培養物を、細胞表面マーカーであるＣＤ３４およびＣＤ７の共発現によって、Ｔ細胞前駆細胞の発生について評価した。図２０は、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を用いるＤＬＬ４発現無間質分化プラットフォームにおいてＴ細胞前駆細胞を生じるＣＤ３４＋臍帯血細胞の能力を示している。臍帯血ＣＤ３４陽性細胞由来ｐｒｏＴ細胞の無間質分化プラットフォームは、ＣＤ４５＋ＣＤ５６－ゲーティング戦略を用いる間質ベースの分化プラットフォームよりも迅速であることが示された。初期Ｔ系譜マーカーによって、ＣＤ３４、ＣＤ５およびＣＤ７により定義されるｐｒｏＴ細胞の存在が確認される。

【０３４７】

無間質プラットフォームにおいてｉＴ細胞を生じるｈｉＰＳＣ由来ＨＥ細胞の能力を示すために、１０日目ＣＤ３４＋ｉＨＥ選別細胞を、ＤＬＬ４タンパク質または対照タンパク質を含有する培養液中のｉＴ－Ａ２培地中で、培養した。図２１は、ＣＤ４５およびＣＤ７の発現から分かる、ｉＴ前駆細胞を生じるｈｉＰＳＣ由来ｉＨＥの能力を示している。

実施例１３：ｉＰＳＣ由来ｉＮＫは細胞刺激に応答して炎症誘発性サイトカインを分泌し

、末梢血ＮＫ細胞および臍帯血ＮＫ細胞と同等の細胞傷害機能を有する

【０３４８】

ｉＰＳＣ由来（ｉＮＫ）または末梢血由来（ｐｂＮＫ）ＮＫ細胞を、非刺激（ＵＳ）または１：１比のフィーダー細胞による刺激に４時間曝した。Ｇｏｌｇｉｓｔｏｐ（ＢＤバイオサイエンス社）およびＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ　６４７結合型抗ＣＤ１０７ａ抗体（バイオレジェンド社（BioLegend）を、共培養期間中に含めた。４時間後、細胞を収集し、ＣＤ４５、ＣＤ５６、およびＴＮＦ－αについて染色し、フローサイトメトリーで解析した（図２３Ａ）。細胞傷害機能を評価するため、ｉＮＫまたは臍帯血由来（ＣＢＮＫ）細胞を、ＣＦＳＥで標識された標的細胞と、１：１、３：１および１０：１のエフェクター細胞対標的細胞比（effector:target ration）で、９０時間共培養した。標的細胞の定量化を、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ　ＺＯＯＭ細胞解析システムで２時間毎に解析した（図２３Ｂ）。本明細書で提供されたプラットフォームを用いたｉＰＳＣ由来ＮＫ細胞（ｉＮＫ）が、細胞刺激に応答して、ＴＮＦαを含むがこれに限定はされない炎症誘発性サイトカインを分泌し、且つ、末梢血ＮＫ細胞および臍帯血ＮＫ細胞と同等の細胞傷害機能を有することが示された。

実施例１４：ｉＰＳＣ由来Ｔ細胞前駆細胞はインビボにおいて胸腺を活性化させ、Ｔ細胞を再構成する

【０３４９】

ｈｉＰＳＣ由来ｉｐｒｏ－Ｔ細胞が、機能的なＴ細胞前駆細胞として、免疫無防備状態ＮＳＧレシピエントマウスの胸腺にホーミングし、そこでコロニー形成し、そこで分化することが可能であることが示される。１０日目（ＣＤ３４＋ＨＥ単離後）ＣＤ３４＋ＣＤ７＋ｉｐｒｏ－Ｔ細胞をＦＡＣＳにより単離し、新生仔（生後２～５日）ＮＳＧマウスに肝内注射する。注射の８週間後、マウスを、フローサイトメトリーで、ヒトＣＤ４５＋ＣＤ４－ＣＤ８－ダブルネガティブ（ＤＮ）、ＣＤ４５＋ＣＤ４＋ＣＤ８＋ダブルポジティブ（ＤＰ）、ＣＤ４５＋ＣＤ４＋ＣＤ８－またはＣＤ４５＋ＣＤ４－ＣＤ８＋シングルポジティブ（ＳＰ）Ｔ細胞サブセットの発現によって、胸腺生着について解析する。加えて、シングルポジティブなＴ細胞を、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ２７およびＣＣＲ７の発現について評価し、それらのナイーブ状態および成熟状態を評価する。成熟シングルポジティブＴ細胞の機能性を、抗ＣＤ３／ＣＤ２８刺激後に、増殖能力およびＣＤ２５活性化マーカーの発現上昇をモニターすることにより、評価する。

【０３５０】

胸腺細胞と胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）との間には、胸腺環境の発生および改善をもたらし、胸腺内再構成を引き起こし得る、重要な相互関係がある。１０日目ＣＤ３４＋ＣＤ７＋ｈｉＰＳＣ由来ｉｐｒｏ－Ｔ細胞を、胸腺機能に対するそれらの影響について評価する。上記と同様に、ＦＡＣＳで選別されたｉｐｒｏ－Ｔ細胞を新生仔ＮＳＧレシピエントマウスに肝内注射する。注射の８～１０週間後、抗サイトケラチン５（Ｋ５）および抗サイトケラチン８（Ｋ８）を用いる染色により、コントロール（未注射）またはｉｐｒｏ－Ｔを注射されたマウスの胸腺に対する免疫組織学的分析を行い、胸腺の皮質、髄質および明確な皮髄境界の形成を確認する。ｉｐｒｏ－Ｔ細胞の非存在下では、無秩序な上皮細胞構造の存在が予想される。加えて、リンパ球前駆細胞の胸腺へのリクルートに要求される、重要なＴＥＣ由来ケモカインであるＣＣ１９、ＣＣＬ２１およびＣＣＬ２５の発現を評価する。最後に、ＴＥＣ成熟に影響する相互作用である、ｉｐｒｏ－Ｔ細胞上のＲＡＮＫリガンド（ＲＡＮＫＬ；Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ｏｆ　Ｎｕｃｌｅａｒ　ｆａｃｔｏｒ　Ｋａｐｐａ－ｌｉｇａｎｄ（破骨細胞分化因子））およびＴＥＣ上のＲＡＮＫの発現は、胸腺内再構成の増加を示すものである。

実施例１５：ｉＰＳＣ由来ｉＴ細胞は成熟Ｔ細胞として細胞刺激に応答し、ＶＤＪ組換えを示す。

【０３５１】

ｈｉＰＳＣ由来ｉＴ細胞の機能性を示すために、３５日目（ＣＤ３４＋ＨＥ単離後）ｉＴ細胞を、細胞増殖をモニターするためにＣｅｌｌ　Ｔｒａｃｋｅｒ　Ｖｉｏｌｅｔで処

理し、次いで、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで７日間刺激してｉＴ細胞の活性化および増殖を誘導する。ｉＣＤ３４由来ｉＴ細胞は、臍帯血由来Ｔ細胞および末梢血Ｔ細胞と同様にＣＤ３／ＣＤ２８刺激に応答する。ｉＴ細胞の活性化は、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ゲーティング戦略に基づく、ＣＤ２５およびＣＤ６２Ｌ（活性化を示す表面マーカー）の発現、並びに細胞内インターフェロンγ染色によって示される。細胞分裂中のｃｅｌｌ　ｔｒａｃｋｅｒ　ｖｉｏｌｅｔの枯渇から分かるように、ｉＴの活性化は増殖を引き起こす。

【０３５２】

ｈｉＰＳＣ由来ｉＴ細胞の発生の程度をさらに特徴付けするため、３５日目ｉＴ細胞をＴ細胞受容体遺伝子座の組換えについて解析する。ＣＤ３＋選別３５日目ｉＴ細胞から得られたゲノムＤＮＡを、内在性Ｔ細胞受容体遺伝子座の再構成を示すＴＣＲ　Ｄｂ２－Ｊｂ２再構成の有無について解析した。ポリクローナルなＤｂ２－Ｊｂ２再構成を示す複数のＰＣＲ産物は、臍帯血ＣＤ３４＋ＨＳＣ由来Ｔ細胞で観察されたものと同様である。

実施例１６：運命確定造血内皮の新規マーカーの細胞表面抗体スクリーニング

【０３５３】

細胞マーカーは細胞の同定および分類を助けるモノグラムとして働く。細胞マーカーの大部分は細胞の原形質膜内の分子または抗原である。多くの表面マーカーは、特定の抗体によって認識されるそれらの表面抗原分類（ＣＤ）によって分類される。一般に、特定のマーカーの組み合わせは種々のＴ細胞型に独特なものである。

【０３５４】

インビトロにおいて万能性幹細胞が中胚葉由来内皮を経由して分化する中で、これらの不均一な内皮細胞は、動脈性、静脈性、および造血性の予定運命を獲得し、表現型的および機能的に特殊化した各サブタイプの内皮細胞を形成する。これらの細胞サブタイプは、空間的および時間的に近接して形成され、現在では、主に細胞マーカー欠如についての遺伝子発現プロファイリングを通じて識別される。造血細胞は、造血内皮（ＨＥ）として知られるユニークな内皮細胞集団から、内皮造血転換（ＥＨＴ）を通じて生じる。ＥＨＴは、内皮の特徴を有する細胞が造血性の形態と表現型を徐々に獲得していく連続的なプロセスである。ＨＥ細胞サブタイプに特異的なマーカーの特定は、後の造血細胞分化のための、所望の質および純度を有する初期細胞集団の単離効率を大いに向上させるだろう。従って、これら全ての様々な細胞系譜を識別するための、追加の潜在的にユニークなマーカーが望まれる。

【０３５５】

造血細胞を生じる能力を有するＣＤ３４＋およびＨＥ細胞の濃縮のための追加のマーカーを特定するために、本明細書で開示されたプラットフォーム、組成物および方法を用いる方法および組成物を用いて、ｈｉＰＳＣを単層に播種し、造血細胞に向けて分化させた。

【０３５６】

ＣＤ３４＋細胞においてのみ、ｈｉＰＳＣ分化の１０日目に、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞を抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した（図２５）。解析で用いた抗ヒト抗体を図２６に列挙する。図２５に示されるように、クラスＩマーカーには、ｈｉＰＳＣ由来ＣＤ３４＋細胞上で１％未満の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。クラスＩＩマーカーには、ＣＤ３４＋細胞上で１％～９９％の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。クラスＩＩＩマーカーには、ＣＤ３４＋細胞上で９９％超の発現である細胞表面タンパク質が含まれる。ｉＣＤ３４＋集団におけるこれらのマーカーの発現レベルを図２６に示す。造血分化能を有するｉＣＤ３４＋細胞上で発現され得る細胞表面タンパク質が、クラスＩＩマーカーによって確認される。

【０３５７】

この解析では、マーカーは、選択された集団で少なくとも１％の発現を示した場合、陽性と見なされる。選択された集団で１％未満の発現を示した場合、マーカーは陰性と見なされる。染色の平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、陽性マーカーの発現レベルを定量化または分類することもできる。これは対数スケール上の値として示される。本明細書で使

用される場合、高いまたは明るいと見なされるマーカーは、約10^4～10^5のＭＦＩを有するであろう。中等または中間と見なされるマーカーは、約10^2～10^4のＭＦＩを有するであろう。低いまたは暗いと見なされるマーカーは、約10^1～10^2のＭＦＩを有するであろう。

【０３５８】

クラスＩＩ内のマーカー候補の中から、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－集団内でのＣＤ９３マーカーの発現が図２７に示される。ＣＤ３４＋ＣＤ９３－集団およびＣＤ３４＋ＣＤ９３＋集団を単離し、続いて、ＣＸＣＲ４およびＣＤ７３の発現について解析した。ＣＤ３４＋ＣＤ９３－集団が、目的の運命確定ＨＥ細胞集団を表すＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－集団の大部分を含有することが確認された。しかし、ＣＤ９３のマウス相同体の、欠如ではなく、その発現が、初期リンパ球造血系前駆細胞の可能性のあるマーカーであると以前に特定されている（Yamane T et al, PNAS, 2009; 106(22): 8953-8958）。

【０３５９】

ＣＤ９３の発現またはその欠如によって表される運命確定造血分化能をさらに決定するため、本明細書に記載の通りに、１０日目のＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－画分およびＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３＋画分を、ＦＡＣＳで単離し、ｉＮＫ分化培養物、ｉＮＫ－Ａ２およびｉＮＫ－Ｂ２中に播種した。１０日間の分化の後、ＣＤ４５＋造血細胞およびＣＤ４５＋ＣＤ７＋リンパ球前駆細胞の絶対数を評価した（図２８Ａ）。さらに１０日間のｉＮＫ分化の後、ＣＤ５６マーカーおよびＮＫｐ３０マーカーの発現によって、ｉＮＫ細胞の存在について培養物を評価した。ＣＤ３４＋集団の運命確定造血分化能はＣＤ９３－画分に濃縮されることが示された（図２８Ｂ）。従って、造血細胞へ向けたｉＰＳＣ誘導分化の初期段階では、ＣＤ３４＋ＣＤ９３－細胞が運命確定ＨＥ集団を表し；ＣＤ９３の発現を、ＨＥ亜集団を同定するために、ＣＤ７３、またはＣＤ７３／ＣＸＣＲ４の代替マーカーとして使用することができる。

【０３６０】

ｉＰＳＣ分化の１０日目のＣＤ３４＋集団中に存在するＣＤ３４＋ＣＤ９３－細胞画分の割合に基づいて、１０日目以前のＣＤ３４＋集団中の運命確定ＨＥの割合は約３０％以下であろうと推定した。従って、陽性であっても陰性であっても、１０日目ＣＤ３４＋集団を用いた本明細書におけるスクリーニングで約１％～約３０％の発現を有するマーカーも、運命確定ＨＥ亜集団の同定に有用であろう（図２６）。従って、ＣＤ３４＋集団内の運命確定ＨＥを同定するための陽性マーカーには、以下が含まれる：ＣＣＲ１０、ＣＤ１６４、ＣＤ９５、ＣＤ１４４、ＣＤ１６６、リンフォトキシンβ受容体、ＣＤ２５２、ＣＤ５５、ＣＤ４０、ＣＤ４６、ＣＤ３４０、ＣＤ１１９、ＣＤ１０６、ＣＤ６６ａ／ｃ／ｅ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４５ＲＢ、ＤＬＬ４、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ１１６、ＣＤ３２４、ＣＤ１２３、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ２００、ＣＤ７１、ＣＤ１７２ａ、ＣＤ２１、ＣＤ１８４、ＣＤ２６３、ＣＤ２２１、Ｎｏｔｃｈ４、ＭＳＣ、ＣＤ９７、ＣＤ３１９、ＣＤ６９、ＣＤ３３８、ポドプラニン、ＣＤ１１１、ＣＤ３０４、ＣＤ３２６、ＣＤ２５７、ＣＤ１００、ＣＤ３２、ＣＤ２５３、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ８３、ＧＡＲＰ、ＣＤ１８３、およびＣＤ３５７。あるいは、ＣＤ３４＋集団内の運命確定ＨＥを同定するための、ＣＤ９３に類似した、追加の陰性マーカーには、以下が含まれる：ＣＤ３１、ＣＤ１６５、ＣＤ１０２、ＣＤ１４６、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ１３、ＣＤ５８、インテグリンα９β１、ＣＤ５１、ＣＤ１０、ＣＤ２０２ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ４９ａ、ＣＤ９、ＣＤ２０１、ＣＤ４７、ＣＤ２６２、ＣＤ１０９、ＣＤ３９、ＣＤ３１７、ＣＤ１４３、インテグリンβ５、ＣＤ１０５、ＣＤ１５５、およびＳＳＥＡ－４。

実施例１７：ＷＮＴシグナル伝達の調節はｉＰＳＣ由来ｉＣＤ３４（運命確定ＨＥ）の産出量および分化能を向上させる

【０３６１】

１０日間の分化誘導後のｈｉＰＳＣからの運命確定ＨＥの効率的発生を最適化するために、ＷＮＴシグナル経路の調節の影響を調べた。分化の６日目に、細胞培養物をＧＳＫ３阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１、Ｗｎｔアゴニスト、またはＷＮＴ阻害剤ＩＷＰ２の存在下で

分化させた（図２９Ａ）。ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－ＨＥの発生を１０日目に解析した。図２９Ｂは、ＩＷＰ２によるＷＮＴ経路の阻害が、フローサイトメトリーから分かる１０日目の表現型的なＨＥ（phenotypic HE）の割合には影響を与えなかったが、ＨＥ細胞数の全体的な減少をもたらしたことを示している（図２９Ｂ）。逆に、ＣＨＩＲ９９０２１によるＷＮＴ経路の活性化はＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞の割合をわずかに減少させたが、表現型的にＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－のＨＥの数および割合を約２～３倍に増加させ、さらに、ＨＥ細胞性を活性化、すなわち、結果として総ＨＥ細胞数の増加およびＨＥ増殖の増加を引き起こした。

【０３６２】

ＷＮＴを調節されたＨＥの分化能を決定するため、未処理ＨＥ、ＩＷＰ２処理ＨＥおよびＣＨＩＲ９９０２１処理ＨＥの全造血系・リンパ系への分化能をそれぞれ評価した。１０日目ＣＤ３４＋ＣＤ４３－細胞を、本明細書に提供された通りに、ＦＡＣＳで単離し、ＭＰＰ分化培養液およびｉＮＫ分化培養液中に播種した。図３０Ａは、７日間のＭＰＰ分化の後、ＣＨＩＲ９９０２１で調節されたＨＥが、ＣＤ４５＋細胞の約５～６倍の存在の増加によって示される、造血系分化能の増加を示したことを、示している。図３０Ｂは、２０日間のｉＮＫ分化の後、ＣＨＩＲ９９０２１で処理されたＨＥが、ＣＤ５６＋ＣＤ７＋ＮＫ前駆細胞の約５～６倍の存在の増加によって示される、リンパ系分化能の増加を示したことを、示している。

実施例１８：免疫療法用のための特性が増強された造血細胞を作製するための遺伝子調節またはドナー特性を有するｉＰＳＣ

【０３６３】

種々の疾患の治療において優先されるユニークな特性は、Ｔ細胞等の免疫系細胞を包含する、選択されたドナーに由来する細胞からもたらされ得る。ドナーの特徴には分化後の子孫に伝わり得る遺伝的インプリントが含まれ、限定はされないが、所定の単一特異的ＴＣＲ、例えば、ウイルス特異的Ｔ細胞またはインバリアントナチュラルキラーＴ（ｉＮＫＴ）細胞からのもの；追跡可能且つ望ましい遺伝子多型、例えば、選択されたドナーにおける高親和性ＣＤ１６受容体をコードする点変異についてホモ接合性のもの；並びに、所定のＨＬＡ要求、すなわち、集団被覆率（population coverage）が増加したハプロタイプを示す、選択されたＨＬＡ適合ドナー細胞が挙げられ得る。さらに、細胞療法において、新しいまたは増強された治療特性を有する遺伝子改変細胞は、疾患の転帰改善に望ましい。しかし、ｉＰＳＣまたはそれを供給している細胞のレベルで存在する、ドナー特性または遺伝子改変されたモダリティのいずれもが、ｉＰＳＣから派生した分化細胞において保持され機能性を維持することが可能であるかどうかは、遺伝子サイレンシング、ｍＲＮＡ分解、遺伝子変異、不適当なタンパク質の輸送および切断、分化能の減少、並びに異種遺伝子型集団における細胞成長抑制に及ぶ多くの理由により、不明であった。供給源特異的な体細胞に由来する、または、本開示の分化プラットフォームおよび組成物を用いた分化誘導を通じた遺伝子編集から生じる、ｉＰＳＣによって保持された遺伝的インプリントを含む、ｉＰＳＣ由来エフェクター細胞を作製する方法が、本明細書で示される。これらの分化細胞は、ｉＰＳＣまたはそれらのオリジナルの供給源親集団に存在した遺伝的インプリントを保持していたことが示され、且つ、増殖および生存の能力が増強されてより若返っている。さらに、誘導万能性幹細胞の形態で存在する場合、所望の特性を有する優先的な供給源細胞を、拡張可能で、且つ、再現性と有効性の向上を伴ってＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４、Ｔ前駆細胞、およびＮＫ前駆細胞を包含する選択されたエフェクター細胞型に容易に分化させることが可能な、純粋／クローン集団において、不確定に維持することができる。

【０３６４】

また、本明細書における例示として、本発明によって提供される分化プラットフォームから得られたエフェクター細胞のいくつかの望ましい特性、例えば生体内細胞残留性を、前記細胞の、患者の免疫細胞に認識も破壊もされない同種移植での使用を可能にする小分子調節を通じて、得ることもできる。

【０３６５】
本明細書で提供される分化法と関連して、優先的な細胞供給源（ドナー特異的、患者特異的、疾患特異的、または状態（condition）特異的）の、公知且つユニークな刷り込まれた特徴は、再プログラム化ｉＰＳＣおよび種々の分化段階の中間細胞のクローン性またはクローン検出（clonal detection）のマーカーとして働くこともでき、さらに、選択された前記刷り込みマーカーを用いてインビトロまたはインビボで追跡することもできる。これらのマーカーは、ＶＤＪ組換え等のＤＮＡ再構成、および／または導入遺伝子挿入部位の複数のうちの１つ（one of more）を含む。
１．　ＨＬＡクラスＩヌルｉＰＳＣはｉＣＤ３４ＨＥに分化し、さらに、全ての造血系およびリンパ系の前駆細胞に分化させることができる
【０３６６】
ｉＰＳＣ由来エフェクターリンパ球の免疫耐性および残留性を向上させるため、ＨＬＡクラスＩ欠失の影響を調べた。図３１から分かるように、ｉＰＳＣにおけるＢ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）の欠失は、ＨＬＡクラスＩ（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃ）の発現欠如をもたらした。このＢ２Ｍ－／－ｉＰＳＣ株がＮＫ細胞認識を誘導することなくＴ細胞介在性死滅を回避可能であることを以前に示したが、これは、インビトロおよびインビボの両方において残留性が向上した、普遍的にドナー／レシピエント適合性のｈｉＰＳＣクローン株を示している（データ未記載）。
【０３６７】
次に、ｉＰＳＣの分化能に対するＢ２Ｍ欠失の影響を、本明細書に記載の分化プラットフォームおよび方法を用いて評価した。Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣおよび野生型ｉＰＳＣを１０日間分化させることでＨＥを発生させ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥ細胞の発現をフローサイトメトリーで解析した。図３２Ａおよび図３２Ｂは、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣが野生型対照と同様の頻度でＣＤ３４＋ＨＥに分化可能であることを示している。図３３は、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣから分化したＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥがＨＬＡクラスＩヌルのままであることを示している。
【０３６８】
Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣ由来ＨＥの造血分化能を判定するため、ＦＡＣＳを用いて細胞を選別し、図１の多能性前駆細胞アッセイ（ｉＭＰＰ）に記載のように、内皮造血転換を起こしてＣＤ４５＋造血前駆細胞を生じる能力について評価した。図３２Ｃは、Ｂ２Ｍ－／－ＨＥが、野生型ＨＥと同様の効率でＣＤ４５＋全造血前駆細胞を発生可能であることを示している。
【０３６９】
最後に、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣ由来ＨＥのリンパ系分化能を評価した。図３に示されるように、ＦＡＣＳで選別したＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥ細胞をさらに、ＮＫ細胞前駆細胞に向けて分化させた。およそ１０日間の分化の後、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略に基づくフローサイトメトリーを用いて、ＣＤ５６およびＣＤ７の発現によって、ＮＫ前駆細胞の存在について培養物を評価した（図３２Ｄ）。野生型ｉＰＳＣ由来ＨＥと比較した場合に、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣ由来ＨＥが、同等のｉＮＫ前駆細胞発生能を有することが示された。
【０３７０】
本実施例により、ｉＰＳＣの分化能が、ゲノム編集を通じた、その保持された遺伝的インプリントの影響を受けないこと、本明細書で開示された分化プラットフォームによって、遺伝的インプリントを受けたｉＰＳＣを、遺伝的インプリント無しのｉＰＳＣと同等のレベルで、分化させることが可能であること、並びに、前記ｉＰＳＣの遺伝的インプリントがその分化細胞において保持されること、が明らかにされた。
２．免疫応答性レシピエントにおけるｉＰＳＣおよびその派生細胞の残留性を増加させるための、ｉＰＳＣ上のＨＬＡクラスＩの調節、並びに調節されたｉＰＳＣの分化
【０３７１】
ＨＬＡクラスＩ改変ｉＰＳＣ（Ｂ２Ｍ－／－　ｉＰＳＣまたはＨＬＡ　Ｉ改変ｉＰＳＣ

）の免疫耐性および残留性をさらに向上させるため、Ｂ２Ｍ－／－ｉＰＳＣに、ＨＬＡ－Ｅ／Ｂ２Ｍ融合タンパク質を含有するレンチウイルスを形質導入した。形質導入ＨＬＡ－Ｉ改変ｉＰＳＣ（Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣ）の品質（すなわち、万能性状態）を、万能性マーカーであるＴＲＡ－１８１およびＳＳＥＡ４、並びにＨＬＡ－Ｅの発現について、フローサイトメトリーで評価した。図３４Ａは、形質導入ＨＬＡ－Ｉ改変ｉＰＳＣが細胞表面上にＨＬＡ－Ｅを発現しており、万能性表現型を維持していることを示している。

【０３７２】

形質導入ＨＬＡ－Ｉ改変ｉＰＳＣがインビボにおいて増加された残留性を有するかどうかを確かめるため、ルシフェラーゼを導入した野生型ｉＰＳＣおよびＢ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣを、奇形腫アッセイにおける免疫応答性のＣ５７ＢＬ／６レシピエントの対立する側腹部に皮下注射した。マウスを毎日、ルシフェリン注射と併せたＩＶＩＳイメージングで分析し、発達してゆく奇形腫を可視化した。図３４Ｂには、注射後７２時間の時点で、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣが、野生型ｉＰＳＣと比較して約６倍の量的残留性の増加を示すことが示されている。また、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣ奇形腫を有する、増強されたルシフェリンイメージングを示す３匹の代表的なマウスを図３４Ｂに示した。

【０３７３】

調節されたＨＬＡ　Ｉ改変ｉＰＳＣの分化能を評価するため、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣおよび野生型ｉＰＳＣを１０日間分化させることでＨＥを発生させ、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥ細胞の発現をフローサイトメトリーで解析した。図３５は、ＨＬＡ－Ｅ発現が、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣ由来の１０日目（ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＨＥ細胞）分化細胞および１７日目（ｉＭＰＰアッセイで発生したＣＤ４５＋全造血前駆細胞）分化細胞の両方で保持されていることを示している。図３６Ａおよび図３６Ｂは、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣが野生型対照と同様の頻度でＣＤ３４＋ＨＥに分化可能であることを示している。Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ｉＰＳＣ由来ＨＥの造血分化能を判定するため、ＦＡＣＳを用いて細胞を選別し、図１の多能性前駆細胞アッセイ（ｉＭＰＰ）に記載のように、内皮造血転換を起こしてＣＤ４５＋造血前駆細胞を生じる能力について評価した。図３６Ｃは、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅ　ＨＥが、野生型ＨＥと同様の効率でＣＤ４５＋全造血前駆細胞を発生可能であることを示している。従って、Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅにより伝えられる免疫耐性は、同一の遺伝的インプリントを有するｉＰＳＣから分化した派生細胞において保持される。Ｂ２Ｍ－／－ＨＬＡ－Ｅを含むＨＥ細胞が、増加した残留性を有することが示されている。ＨＬＡ－Ｅの代わりにＨＬＡ－Ｇを使用した場合も同様の残留性向上が観察された。加えて、切断を回避するための改変型のＨＬＡ－ＥまたはＨＬＡ－Ｇを適用することで、ＨＬＡクラスＩ改変ｉＰＳＣのインビボ残留性はさらに増強される。

３．標的化された外来性分子の発現および／または内在性遺伝子の調節を介した、増強された特性を有するｉＰＳＣおよび派生細胞の作製

【０３７４】

現行の分化プラットフォームを介して得られた誘導リンパ球を用いる免疫療法で望ましい特性を増強するために、ｉＰＳＣレベルで改変または調節された分子が使用され得る。これらの分子には、セーフティ・スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬剤的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補；または、ｉＰＳＣもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存度、自己複製、残留性、免疫応答の制御および調節、並びに／もしくは生存を促進するタンパク質が包含され得る。Ｂ２Ｍ／ＨＬＡ－ＩおよびＨＬＡ－Ｅ／Ｇに加えて、所望の特性に寄与する標的分子として、ＣＤ１６受容体および４１ＢＢＬ副刺激分子、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ（キメラ抗原受容体）、ＴＣＲ（Ｔ細胞受容体）、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、並びに、二重特異性ま

たは多重特異性エンゲージャーを結合するための表面上誘発受容体がさらに包含されるが、これらに限定されない。より具体的には、ｉＰＳＣにおける標的分子の遺伝子改変は、以下のうちの１または複数を包含する：Ｂ２Ｍ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、タパシン、ＮＬＲＣ５、ＰＤ１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＲＦＸＡＮＫ、ＣＩＴＴＡ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰの発現の欠失または減少；ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、A_{2A}Ｒ、ＣＡＲ、ＴＣＲ、または二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャーとの結合のための表面上誘発受容体の導入または発現増加。標的分子の発現の増加または減少は、永続的でも、一過的でも、時間的でも、または誘導性であってもよく、内在性プロモーターに制御されるものでも、または外来性プロモーターに制御されるものでもよい。

【０３７５】

ｉＰＳＣ由来リンパ系エフェクター細胞を最適化するため、前記所望のモダリティーが当該技術分野において公知の様々な送達法を用いてｉＰＳＣに導入され得る。この典型的な例として、ｉＰＳＣに、切断不可な高親和性ＣＤ１６受容体（ＨＡＣＤ１６）および４１ＢＢＬ共起刺激分子を含有するレンチウイルスを形質導入して、細胞毒性が増強されたｉＰＳＣおよび派生細胞を作製した。図３７Ａは、フローサイトメトリー解析による、レンチウイルス形質導入後のｉＰＳＣ表面上のＨＡＣＤ１６および４１ＢＢＬの効率的な発現を示している。図３７Ｂは、本明細書で提供されるプラットフォームを用いた１０日間の分化の後に、ＨＡＣＤ１６および４１ＢＢＬの発現が、維持され、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞を生じるｉＰＳＣの能力を撹乱しないことを示している。さらに、図４１は、ＣＤ４５＋ゲーティング戦略を用いて、ＨＡＣＤ１６の発現が、維持され、１０日目ＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞を生じるｉＰＳＣの能力を撹乱しないことを示している。

【０３７６】

Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、および好中球を含むｉＰＳＣ由来エフェクター細胞の細胞傷害活性は、エフェクター細胞を標的腫瘍細胞に向け直すことが可能な二重特異性または多重特異性エンゲージャーを結合することにより、さらに増強できる。一般的に、二重特異的または多重特異的結合の概念は、腫瘍関連抗原およびエフェクター細胞の表面にある活性化受容体を同時に標的とする二重特異性または多重特異性抗体を用いる、エフェクター細胞の特定の腫瘍細胞への再標的化が焦点となる。また、この二重特異的結合はエフェクター細胞機能を刺激し、有効なエフェクター細胞活性化をもたらし、最終的には腫瘍細胞の破壊をもたらす。エフェクター細胞活性化および腫瘍細胞死滅は、エフェクターおよび標的細胞が二重特異性エンゲージャーによって架橋結合された時にのみ起るため、安全制御機構が与えられる。さらに、この再標的化エンゲージャーを通じて、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）拘束的な活性化が回避される。

【０３７７】

二重特異性エンゲージャーを介したエフェクター細胞の再標的化は、エフェクター細胞の面上の表面受容体の結合を含む。天然に存在する表面受容体として、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、および好中球上にそれぞれ発現される、ＣＤ３、ＦｃｇＲＩＩＩ（ＣＤ１６）、ＦｃｇＲＩ（ＣＤ６４）、およびＦｃａＲ（ＣＤ８９）が挙げられるが、これらに限定はされない（図３９Ａ）。加えて、エンゲージャー結合の再標的化を目的として、エフェクター細胞の表面上に発現するように、改変された表面上誘発受容体を導入することができる。遺伝子改変された表面上誘発受容体は、エフェクター細胞の天然の受容体および細胞型とは無関係に、二重特異性抗体または多重特異性抗体による、エフェクター細胞と特異的な標的細胞との間の結合を促進する。このアプローチを用いて、普遍的な表面上誘発受容体を含むｉＰＳＣを作製した後、係るｉＰＳＣを普遍的な表面上誘発受容体を発現する種々のエフェクター細胞型の集団に分化させてよい。細胞療法では、１種または複数種のエフェクター細胞を用いることができ、これらは全て、普遍的表面上誘発受容体を介して同一の二重特異性または多重特異性エンゲージャーと結合することで（図３９Ｂ）、１または複数の腫瘍細胞を標的とすることができる。前記普遍的誘発受容体は、米国出願第６２／３６６，５０３号に記載の方法を用いるゲノム編集を通じて

ｉＰＳＣに導入することができる。一般に、改変された普遍的な表面上誘発受容体は、抗エピトープと、共刺激ドメインとを含有する。表面上（suface）誘発受容体の抗エピトープは、該受容体を発現しているあらゆるエフェクター細胞の、一方の端に適合するエピトープを有する二重特異性または多重特異性エンゲージャーとの結合を方向付ける。他方の端のエンゲージャーの標的特異性は、死滅を目的に、結合したエフェクター細胞を、特異的抗原を有する１種または複数種の腫瘍細胞に方向付ける。普遍的な表面上誘発受容体において、１つの実施例では、共刺激ドメインがＩＬ２タンパク質またはその一部を含むことで、標準もしくは非標準の細胞活性化が達成され得る、および／または、エフェクター細胞型に関わらずエフェクター細胞機能が増強され得る。

【０３７８】

腫瘍細胞側で、二重特異性エンゲージャー結合に使用できる確立された腫瘍関連抗原としては、固形腫瘍に関しては、造血器腫瘍のＣＤ１９、ＣＤ２０またはＣＤ３０；ＥＧＦＲ（上皮増殖因子受容体）、ＨＥＲ２／ＥＲＢＢ２／ｎｅｕ（ヒト上皮増殖因子受容体２）、ＥＰＣＡＭ（上皮細胞接着分子）、ＥｐｈＡ２（エリスロポエチン産生肝細胞癌Ａ２）およびＣＥＡ（癌胎児性抗原（carcinoembrantigen））が挙げられるがこれらに限定されない。加えて、表面二重特異性抗体／エンゲージャーはさらに、二重特異的な会合および結合を増強するためのビオチン化タンパク質、長期の表面提示のための表面膜アンカードメイン、二重特異的相互作用後のシグナル伝達を増強するための同時刺激ドメイン、並びにエンゲージャーの誘導性または時間的発現制御のためのオンオフスイッチ機構等の、さらなる特徴を含み得る。

【０３７９】

二重特異性または多重特異性エンゲージャーで認識可能な、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージおよび好中球を含む様々な種類のｉＰＳＣ由来エフェクター細胞は、腫瘍標的に特異的なエンゲージャーの結合後に１または複数の液性腫瘍および固形腫瘍を標的化するためのがん免疫療法において、個々にまたは組み合わせにおいて適用され得る。

４．ＣＡＲを保持するＣＡＲ－Ｔ由来ｉＰＳＣの分化

【０３８０】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、特異性をＴ細胞またはＮＫ細胞等の免疫エフェクター細胞上に向ける働きをする、改変された膜貫通受容体である。ＣＡＲは、典型的には、抗原認識を与えるためのモノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、および免疫エフェクター細胞に活性化シグナルを与えるための細胞内シグナル伝達ドメインの組み合わせからなる融合タンパク質である。ＣＡＲ－免疫エフェクター細胞は、あらゆる腫瘍関連抗原を認識するように改変可能であり、それ故、ＨＬＡ適合の必要なく、改変された免疫エフェクター細胞を腫瘍細胞のみに標的化可能であることから、ＣＡＲには強力な普遍的がん免疫療法として大いなる可能性がある。

【０３８１】

供給源細胞の同一の遺伝的インプリント、すなわち同一のキメラ抗原受容体、を保持するｉＰＳＣへのＣＡＲ－Ｔ細胞の再プログラム化を示した（図２４）。ＣＤ１９キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）およびＣＡＲの共通識別子としての切断型ＬＮＧＦＲ細胞表面マーカーを発現するよう遺伝子改変されたｉＰＳＣは、ｉＣＤ３４細胞への分化を通じて発現を保持する（図３８）。すなわち、本明細書で開示された分化プラットフォーム、方法および組成物を用いることで、所望の遺伝的インプリントを有するｉＰＳＣを、前記ｉＰＳＣおよびその供給源免疫細胞に含まれていた同一の遺伝的インプリントを保持する様々な免疫細胞型に分化させることができる。

【０３８２】

また、内在性ＴＣＲ遺伝子座にＣＡＲを含むｉＰＳＣから分化された派生Ｔ細胞も本明細書で提供される。Ｔ細胞のレベルにおいて遺伝子座に特異的なＣＡＲ挿入を達成し、後にそれを、ＣＡＲの標的挿入を含むｉＰＳＣに再プログラム化した。あるいは、ＣＡＲの遺伝子座特異的挿入はｉＰＳＣレベルで起こり得る。発現性のＴＣＲ遺伝子座はただ１つ

であるため、発現性のＣＡＲ挿入のコピー数は遺伝子座特異的挿入を通じた制御下にある。さらに、ＣＡＲはＴＣＲの定常領域内に挿入される。ＴＣＲ定常領域の切断はＴＣＲノックアウトをもたらし、これにより、細胞療法におけるＨＬＡ適合要求が排除される。さらに、ＣＡＲ発現はＴＣＲ内在性プロモーターによる制御を受けるため、ＴＣＲと同レベルで、且つＴＣＲと同じ発生段階に存在する。内在性ＴＣＲを模倣する制御されたＣＡＲ発現は、ｉＰＳＣ分化の過程において分化能が影響を受ける可能性を避ける。図２０は、親株におけるＴＣＲ発現と比較して同等レベルでのＣＡＲの発現、並びに、改変された細胞株におけるＴＣＲの発現および機能の両方の除去を示している。改変されたＴ細胞を次に、ｉＰＳＣに再プログラム化し、次にＴＣＲヌルであるＣＡＲ発現Ｔ細胞に分化する。

５．ドナー特異的、疾患特異的、または状態特異的な遺伝的インプリントを含有するｉＰＳＣを用いた増強された特性を有するエフェクターリンパ系細胞の作製

【０３８３】

ｉＰＳＣのゲノム編集を介した遺伝的インプリントの誘導組込み以外で、特異的なドナー、疾患、または状態から得られた免疫細胞に存在する遺伝的インプリント（治療応答性等）も、本開示の分化プラットフォームを勘案して、ｉＰＳＣに基づく細胞療法で利用され得る。選択された供給源由来のＴ細胞等の免疫細胞におけるある特定の遺伝的インプリントは、種々の疾患の治療において優先されるユニークな特性へと転換される。これらの優先的な特性としては、固有の抗原標的受容体の発現；固有のＨＬＡ提示またはその欠如；腫瘍内微小環境に対する耐性；傍観者免疫細胞（bystander immune cell）および免疫調節の誘導；腫瘍外効果（off-tumor effect）の減少に伴う、対標的特異性（on-target specificity）の向上；化学療法等の治療に対する耐性；ホーミング、残留性、および細胞毒性の向上が挙げられるが、これらに限定はされない。例えばＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６５９００に開示されている方法を用いて、遺伝的インプリントを受けた免疫細胞を、好ましい供給源から収集し、誘導万能性幹細胞に、好ましくは基底状態万能性にまで、再プログラム化することができる。

【０３８４】

従って、特定のドナーまたは患者の抗原特異的Ｔリンパ球から、誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、Ｔ細胞前駆細胞または若返ったＴ細胞を作製するアプローチ、方法および効用もまた、本明細書で提供される。前記ドナーは、健常であっても疾患状態であってもよく、あるいは、治療に対して感受性であっても抵抗性であってもよい。例えば、再プログラム化／調節／改変されたＴ細胞を含む細胞集団で治療され、その結果として疾患排除を経験した患者は、ドナー特異的なインプリントによって伝えられる前記疾患の負担の排除における利点のために、有効な、疾患排除を通じて自然に選択され増殖した前記Ｔ細胞亜集団を有することが予想される。疾患排除後にドナーからこれらのＴ細胞を得て、それらをｉＰＳＣに再プログラム化することで、望ましい疾患排除関連インプリントを有するＴ細胞を無限量に作製することができる。

【０３８５】

ドナーまたは患者から得られたＴ細胞の供給細胞集団に関連する抗原特異性は、ｉＰＳＣ誘導、脱分化、および後の分化の間維持される。そのような派生細胞をさらに改変して、安全性、有効性、残留性または特異性を増強してもよい。

【０３８６】

前記方法を実行するため、まず、初代抗原特異的Ｔ細胞を選択されたドナーから単離する。前記ドナーは、健常であっても疾患状態であってもよく、あるいは、治療に対して感受性であっても抵抗性であってもよい。次いで、所望により、単離された初代抗原特異的細胞を、種々の方法で、例えば、ポリクローナルＴ細胞を、目的抗原を発現する腫瘍細胞または目的抗原を有する非形質転換細胞と、許容培地中で共培養することで、抗原特異的Ｔ細胞を、前記細胞によって発現された目的抗原を認識しないＴ細胞よりも速く増殖させることによって、濃縮する。前記単離された初代抗原特異的細胞は、許容培地中のポリクローナルＴ細胞を、目的抗原を発現またはコードする、樹状細胞、胸腺上皮細胞、内皮細胞または人工抗原提示細胞または血漿中の粒子もしくはペプチドと共培養することで、抗

原特異的Ｔ細胞を、前記細胞によって発現された目的抗原を認識しないＴ細胞よりも速く増殖させることによって、濃縮されてもよい。前記単離された初代抗原特異的細胞は、Ｔ細胞受容体に特異的なＳｔｒｅｐｔａｍｅｒ、またはＴ細胞受容体に特異的な融合ペプチドもしくは抗体もしくは他の高分子結合剤を用いる免疫蛍光的（immunoflourescent）または免疫磁気的な選別法によって、濃縮されてもよい。一例では、前記Ｔ細胞受容体特異的Ｓｔｒｅｐｔａｍｅｒはがん／精巣（ＣＴ）抗原を標的とする。加えて、前記単離された初代抗原特異的細胞は、転写因子および小分子を含む１または複数の剤を用いて、調節または若返らせてもよい。

【０３８７】

次に、誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を前記単離および／または濃縮された初代抗原特異的Ｔ細胞から作製し、好ましくは、例えばＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６５９００に開示されている方法を用いて、基底状態の万能性を達成する。前記初代抗原特異的Ｔ細胞由来のｉＰＳＣは、永続的、一過的、時間的または誘導性とすることができる導入遺伝子の導入を通じて、第二もしくは第三の抗原特異性、または、安全性、有効性および残留性に関連する活性化もしくは抑制的モダリティ、を含有するように遺伝子編集してもよい。

【０３８８】

遺伝子編集を受けたまたは受けていない前記ｉＰＳＣを次に、本発明の分化プラットフォーム、方法および組成物を用いて、ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞集団にまで、培養、増殖、および分化させる。前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、ＴＳＣＭ、ＴＣＭ、および／または制御性Ｔ細胞を特に含むサブセットを含む。ドナーまたは患者由来の初代抗原特異的Ｔ細胞に付随した抗原特異性は、ｉＰＳＣ誘導または脱分化の間だけでなく、後の分化の間も、維持および保持されることが好ましい。

【０３８９】

ｉＰＳＣまたはｉＰＳＣ由来Ｔ細胞のレベルで、安全性、有効性、残留性または特異性を増強するために、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞をさらに改変することができる。例えば、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体またはキメラ抗原受容体をコードする導入遺伝子の発現によって増強される。あるいは、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、１または複数のサイトカイン受容体をコードする導入遺伝子の発現によって増強される。さらに、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、残留性、必要細胞量、または安全スイッチに寄与する導入遺伝子の発現によって増強される。あるいは、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、ＣＤ１３７またはＣＤ８０を含む１または複数の共起刺激分子をコードする導入遺伝子の発現によって増強される。前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、ヒト白血球抗原の欠失、挿入または発現減少によって増強される。前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、ＰＤ１、ＬＡＧ３、およびＴＩＭ３を含むがこれらに限定はされないチェックポイント分子の欠失、または発現減少によって増強される。前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、ＣＤ３、ＣＤ８、および／またはＣＤ４の発現によって増強される。前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞における関連分子の調節された発現は、永続的でも、一過的でも、時間的でも、または誘導性であってもよい。

【０３９０】

遺伝的増強を受けたまたは受けていない上記のｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞は、自己免疫障害、造血器腫瘍、固形腫瘍、がん、または感染を含むがこれらに限定はされない種々の疾患または状態を治療するための養子細胞移植に適している。造血器腫瘍または固形腫瘍の治療を目的として、前記ｉＰＳＣ由来抗原特異的Ｔ細胞を、抗腫瘍薬または造血幹細胞移植処置を含む追加の処置の前、間または後に移植してもよい。

６．　ｉＰＳＣおよびその派生細胞のクローン性またはクローン検出のマーカーとして働く遺伝的インプリント

【０３９１】

誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）に基づく治療法は、様々な疾患に苦しむ患者に対する有効な治療選択肢として、勢いを増している。しかし、ｉＰＳＣに基づく治療法を生み出し利用する技術的な現実性においては、ｉＰＳＣおよびその派生細胞の不均一性を考慮した

、係る産物の一貫性および安全性の問題にまだ取り組めていない。現在使用されている方法として、単一細胞選別およびクローニング、並びに限界希釈によるクローニングが挙げられるが、これらは全て、所与の集団における不均一性が大きい場合は特に、手間がかかり、非効率的であり、失敗に終わることが多い。本開示の分化プラットフォーム、方法および組成物を用いて実行される、分化のあらゆる中間段階で保持可能な遺伝的インプリントを利用した、ｉＰＳＣ由来細胞集団のクローン性を特徴付けする新規の技術が、本明細書で提供される。

【０３９２】

Ｔリンパ球およびＢリンパ球は、通常の成熟の間に、Ｖ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成による特定の不可逆的なゲノム配列変異を起こすという点で、哺乳類細胞集団の中で独特であり、このプロセスは体細胞再構成（somatic rearrangement）としても知られている。これは、Ｔ細胞成熟およびＢ細胞成熟の初期段階にある発生中のリンパ球においてのみ起る、独特な遺伝的組換え機構である。このプロセスにより、Ｂ細胞およびＴ細胞上にそれぞれ見られる抗体／免疫グロブリン（Ｉｇ）およびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）のレパートリーが、多様性に富んだものとなる。Ｖ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成は、一次リンパ器官（Ｂ細胞は骨髄、Ｔ細胞は胸腺）で起り、ほぼランダムに、可変性（variable）（Ｖ）遺伝子断片、連結（joining）（Ｊ）遺伝子断片、および、場合によっては、多様性（diversity）（Ｄ）遺伝子断片を再編成する。このプロセスによって最終的には、ＩｇおよびＴＣＲの抗原結合領域に、細菌、ウイルス、寄生虫（parasite）、および蠕虫（worm）、並びにがんに見られる「異常自己細胞」を含むほとんど全ての病原体の抗原認識を可能にする、新規のアミノ酸配列が生じる。α／βＴＣＲ受容体の独特な多様性は、別個の組み合わせが２Ｅ７を超えると推定され、免疫グロブリンの多様性は、別個の組み合わせが１Ｅ１１を超えると推定される。

【０３９３】

Ｂ細胞成熟およびＴ細胞成熟で生じた遺伝子再編成が永続的なものであるとすると、そのような細胞に由来するｉＰＳＣ集団は、個々の開始リンパ球に独特なＩｇ配列およびＴＣＲ配列を含有する、ｉＰＳＣを含むであろう。すなわち、成熟リンパ球に由来する推定上のｉＰＳＣクローン集団の、特定のＴＣＲ遺伝子またはＩｇ遺伝子の、配列決定または相同性比較によって、その集団が真にクローナルであるかどうかが決定され得る。同様に、本プラットフォームおよび本方法を用いて刷り込みが起こったｉＰＳＣを分化させた後に、分化後の子孫のクローン性も、ｉＰＳＣ由来分化細胞における保持された体細胞再構成の遺伝子の配列決定または相同性比較によって、評価され得る。特定された体細胞再構成は、治療法の有効性および規制対応と関わりのある一貫性および安全性の問題に取り組むための対応する評価を下すことを目的とした、患者の血液生検、組織生検または腫瘍生検を独特な遺伝的組換えサインについてサンプリングおよび分析し、そのサインを、開始Ｔ細胞集団、派生ｉＰＳＣおよびｉＰＳＣ分化細胞型における体細胞再構成と一致させることによる、インビボにおける養子細胞のホーミング、残留性および増殖の追跡にも使用され得る。

【０３９４】

当業者であれば、本明細書に記載の方法、組成物、および製品が、例示的な実施形態の代表的なものであり、本発明の範囲に対する限定を意図していないことを、容易に理解するだろう。本発明の範囲および精神から逸脱しない範囲で、本明細書にて開示される本開示に様々な置換および変更を加えてよいことは、当業者には容易に理解される。

【０３９５】

明細書に記載した特許及び公報の全てが、本開示が属する技術分野の当業者のレベルを示唆している。特許及び公報の全ては、個々の公報が参照することによって組み入れられるように、あたかもそれぞれ明確かつ独立に示したかのように、同程度に参照することによって本明細書に組み入れられるものである。

【０３９６】

本明細書に例示的に記載した本開示は、本明細書に明文で開示されていない、任意のあ

る要素又は要素、ある限定又は限定が欠如している状態で、適宜実施してもよい。すなわち、例えば本明細書の各例において、用語「含む」、「本質的に～からなる」及び「からなる」のいずれか１つは、他の２つのうちのいずれかと置換することができる。使用した用語及び表現は、説明の点で用いたものであって限定するためではなく、またかかる用語及び表現の使用において、図示又は記載した特徴又はその一部分についてのあらゆる均等物の除外を意図しているものではないが、請求する本開示の範囲内で様々な変形が可能であるものと考える。したがって、本開示は、好ましい実施形態及び選択自由な特徴によって明確に開示したが、本明細書で開示した概念の変形及び変化物が、当業者によって主張されてもよいこと、またかかる変形及び変化物は、添付の請求項によって規定されるこの発明の範囲内として考えられるものであることとを理解されたい

【図１】

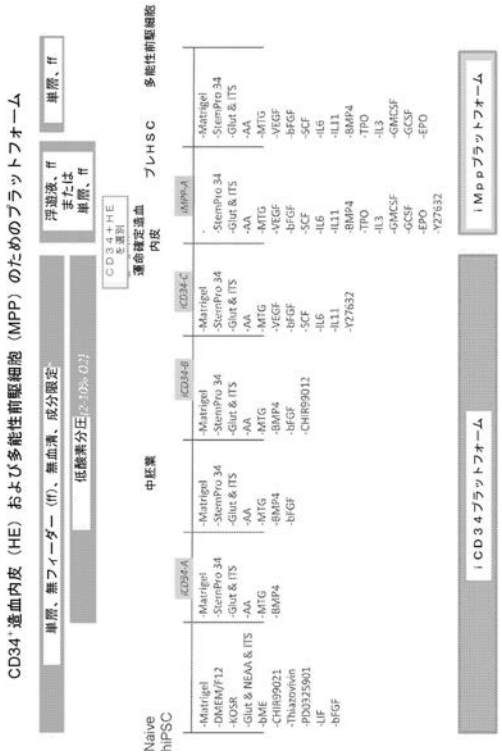


図１

【図２】

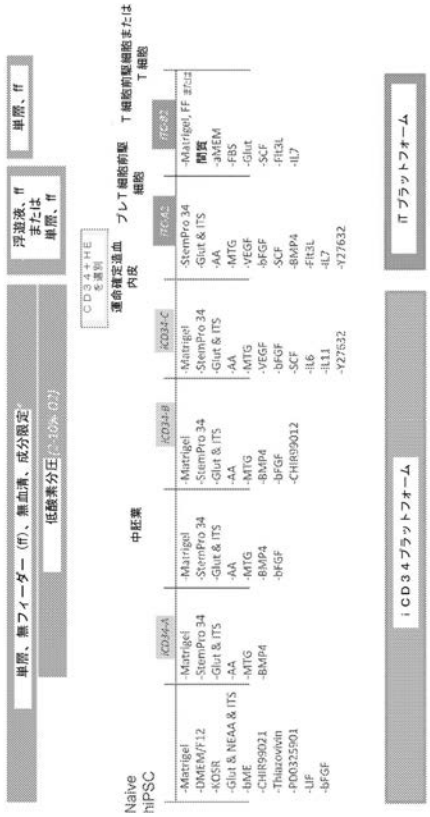


図２

【図３】

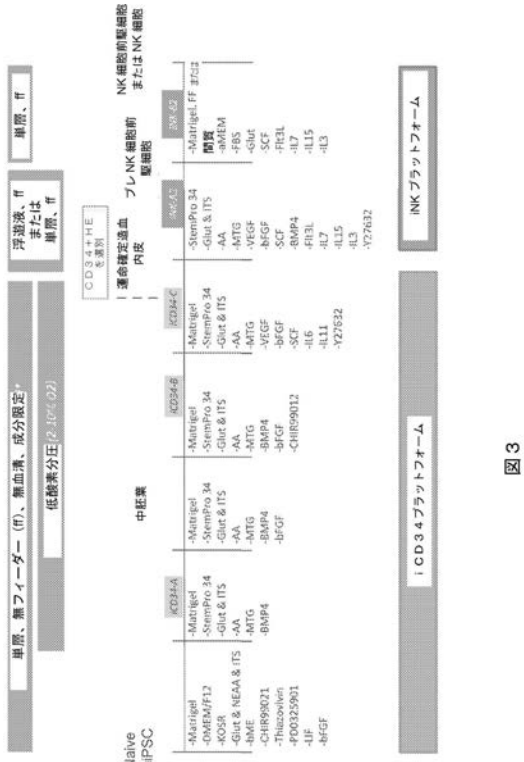


図３

【図４Ａ】

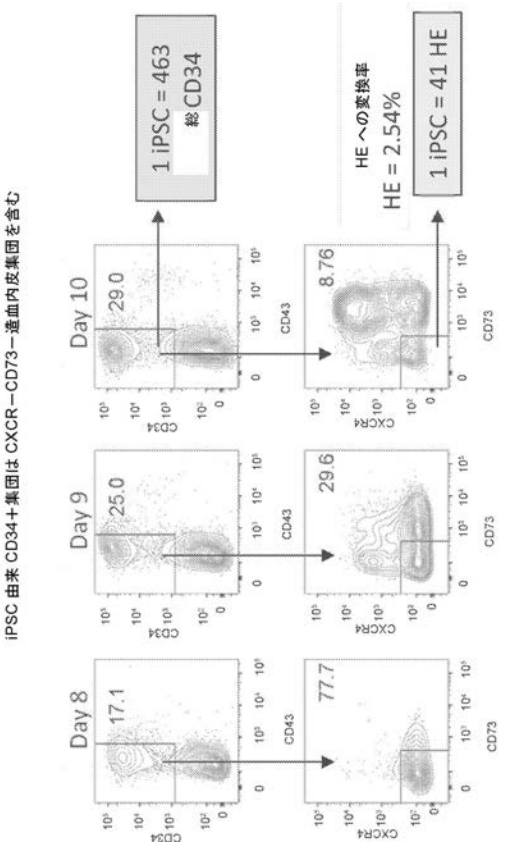


図４Ａ

【図４Ｂ】

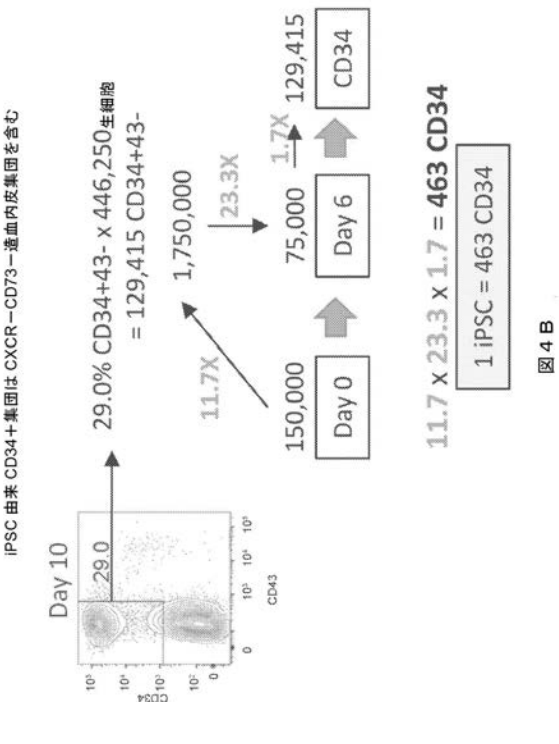


図４Ｂ

【図４Ｃ】

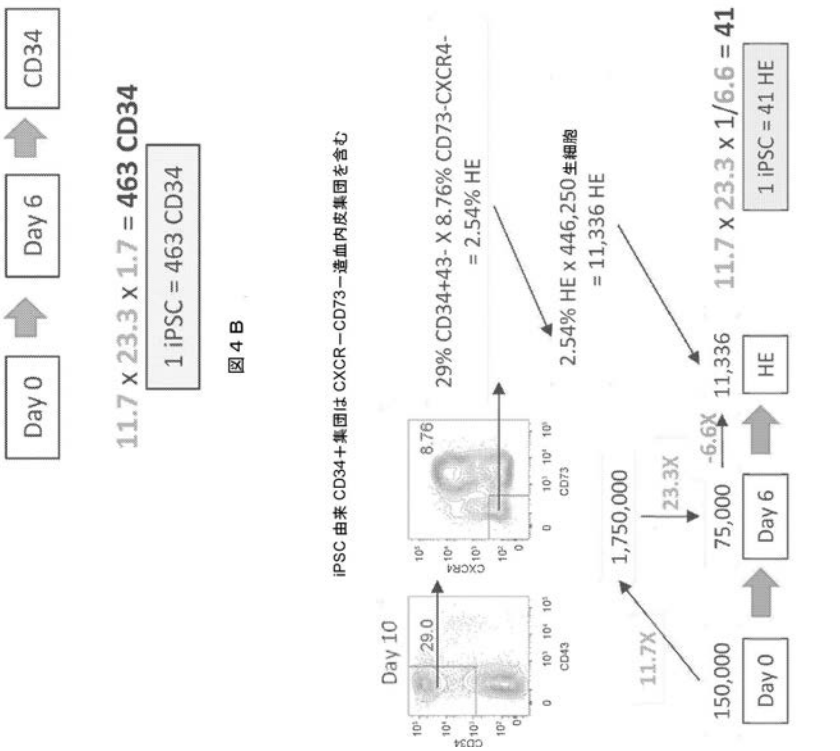


図４Ｃ

【図５Ａ】

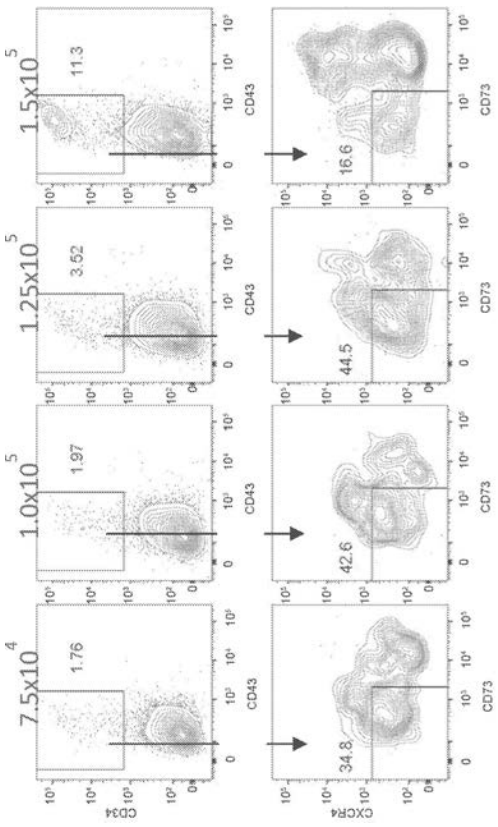


図５Ａ

【図５Ｂ】

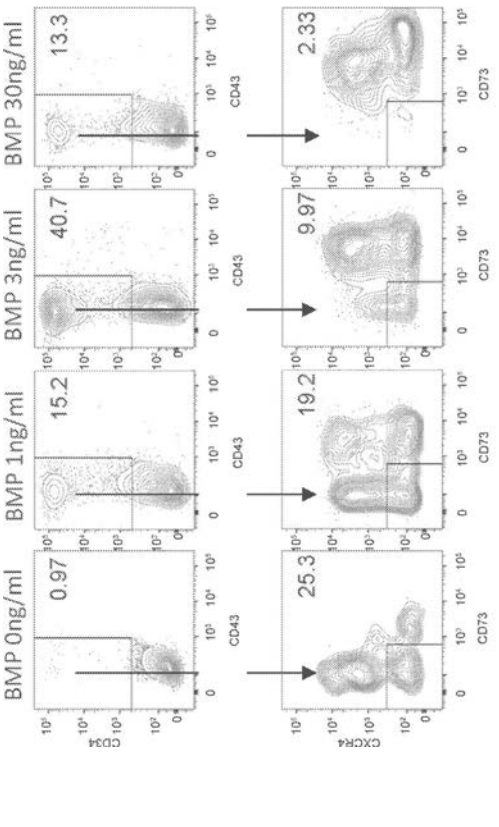


図５Ｂ

【図５Ｃ】

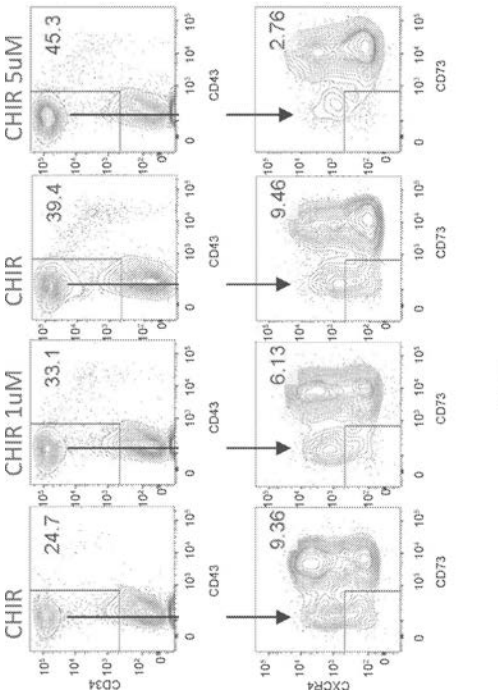


図５Ｃ

【図５Ｄ】

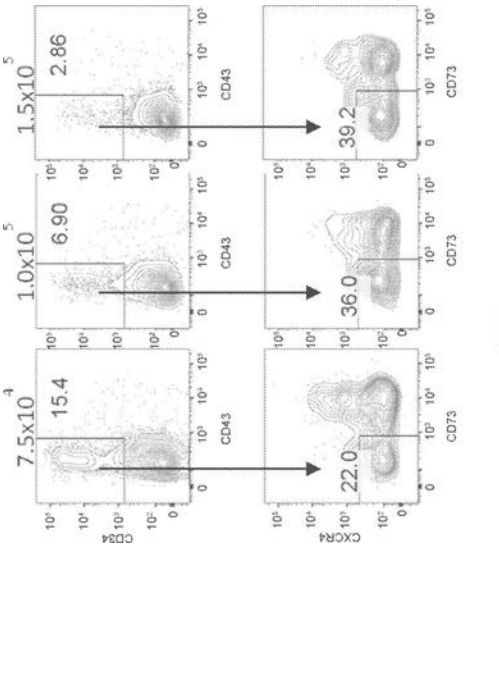


図５Ｄ

【図６Ａ】

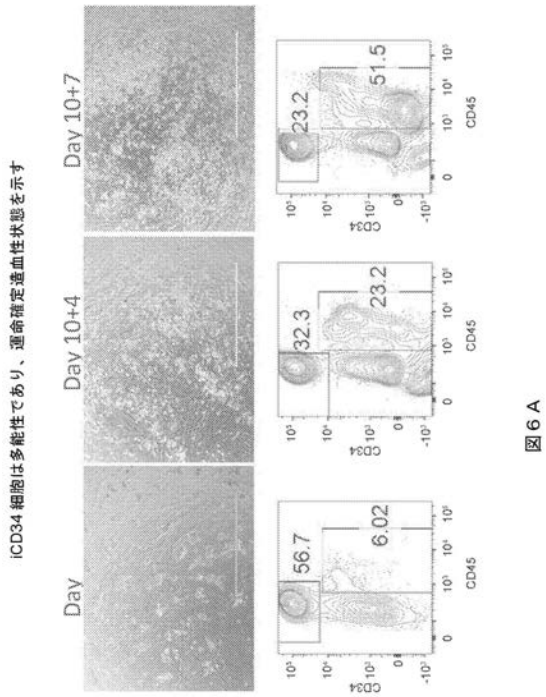


図６Ａ

【図６Ｂ】

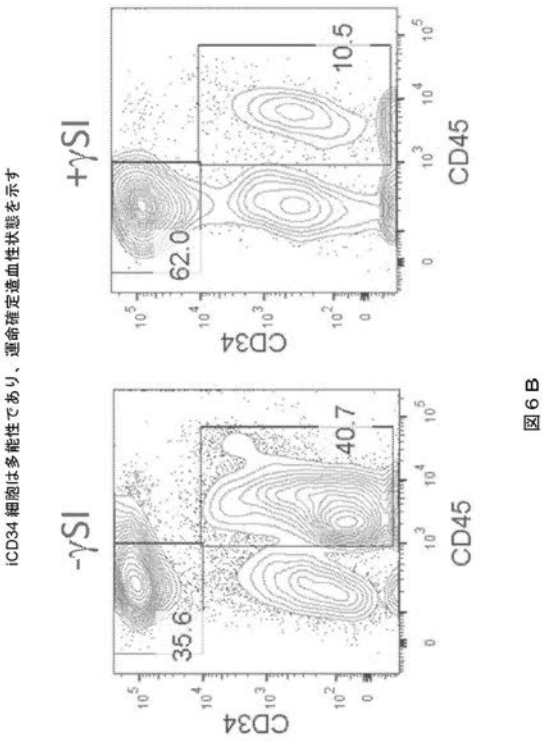


図６Ｂ

【図７Ａ】

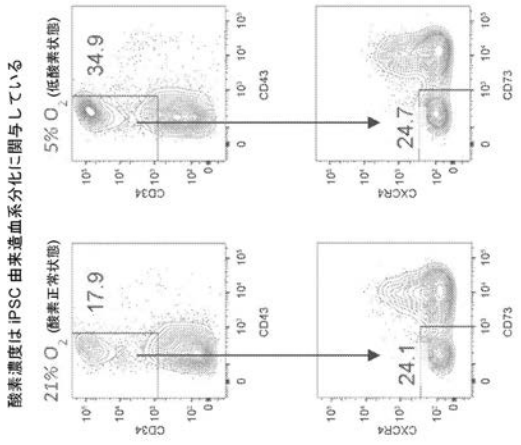


図７Ａ

【図７Ｂ】

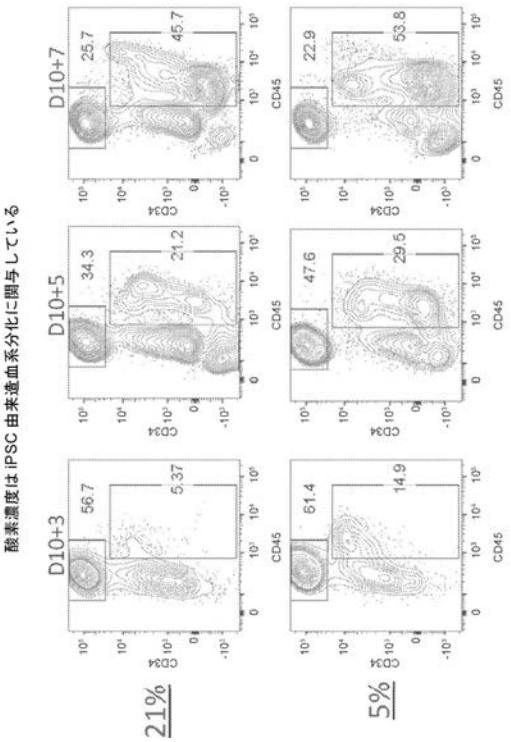


図７Ｂ

【図８－１】

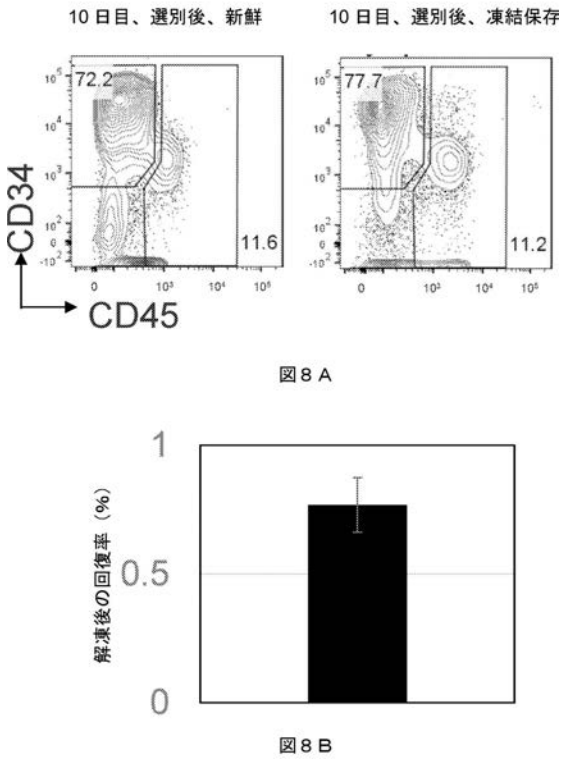


図８Ａ

図８Ｂ

【図８－２】

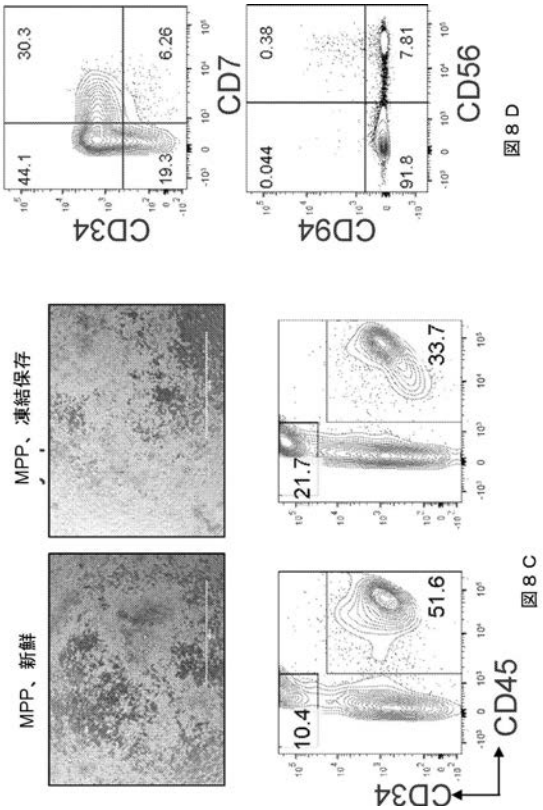


図８Ｄ

図８Ｃ

【図９Ａ】

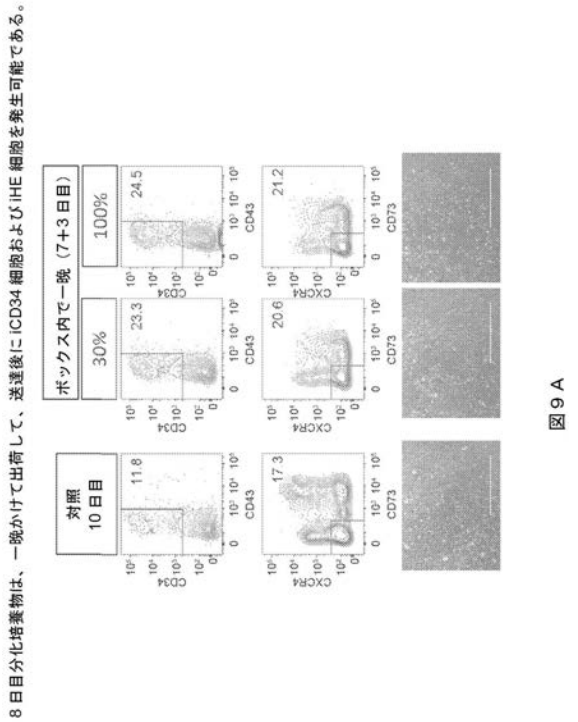


図９Ａ

【図９Ｂ】

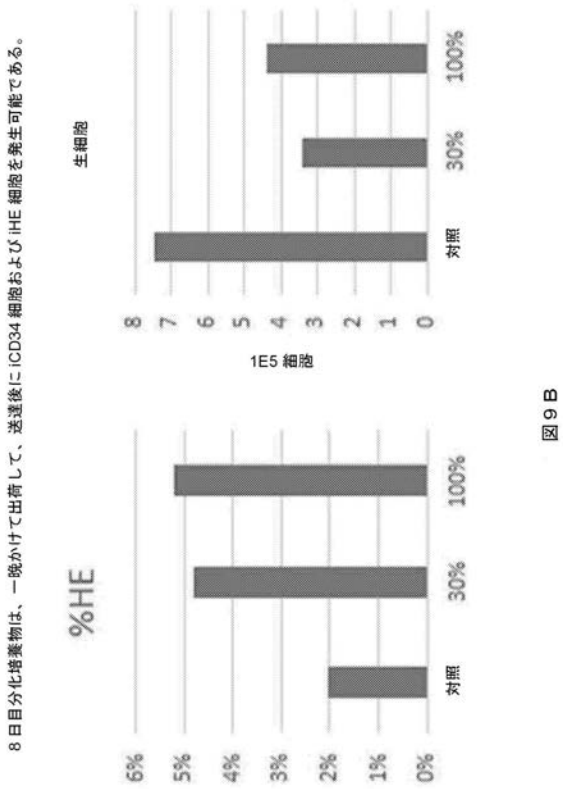


図９Ｂ

【図１０－１】

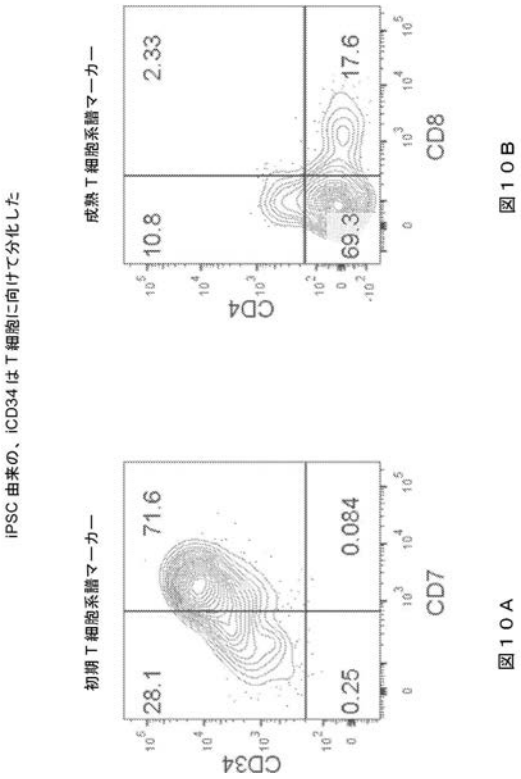


図１０Ｂ

図１０Ａ

【図１０－２】

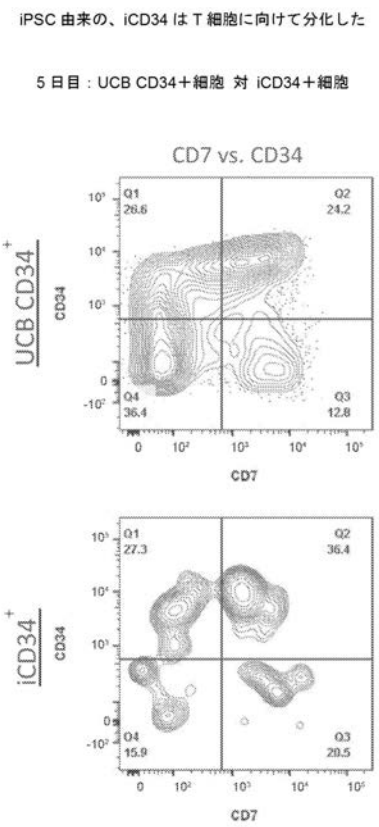


図１０Ｃ

【図１１Ａ】

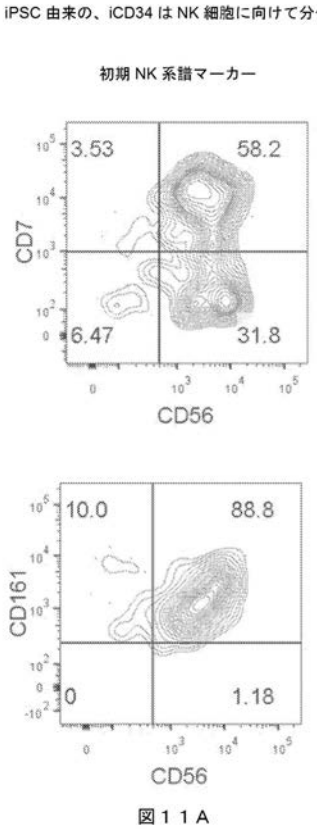


図１１Ａ

【図１１Ｂ】

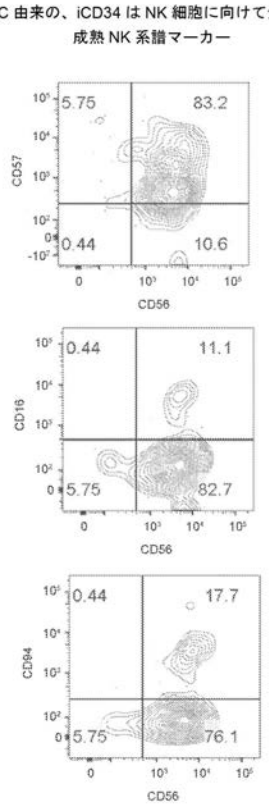


図１１Ｂ

【図１１Ｃ】

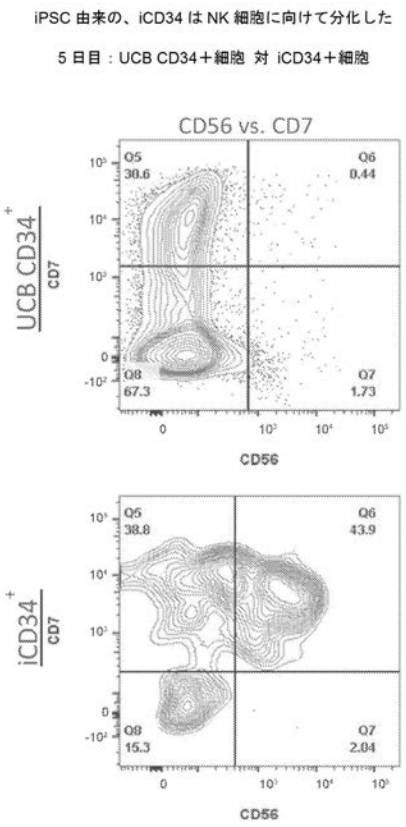
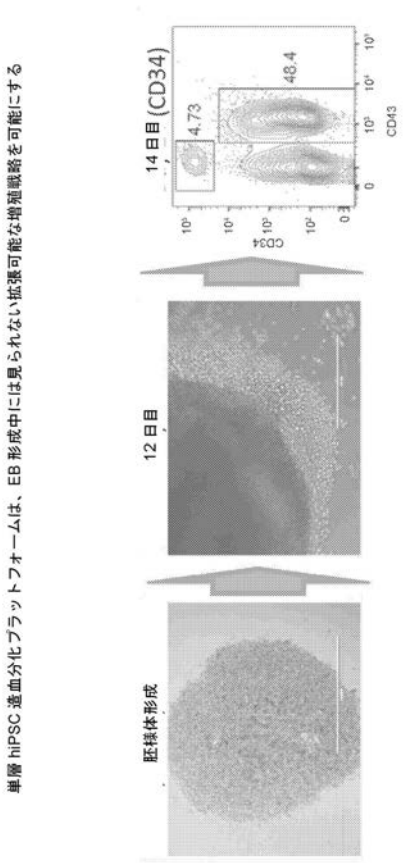


図１１Ｃ

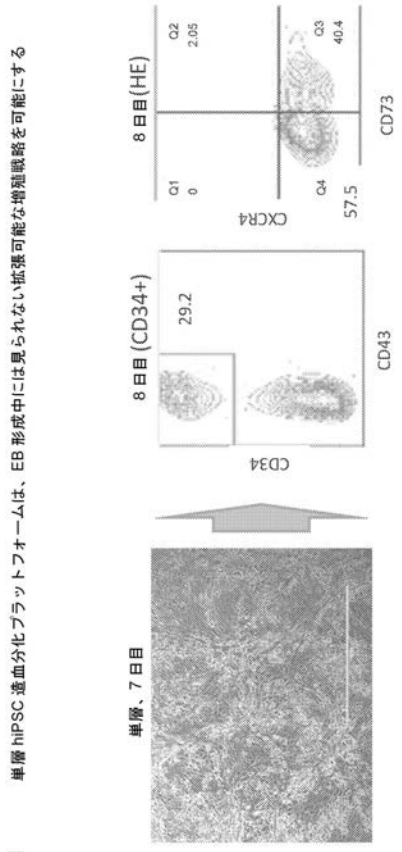
【図１２Ａ】



hiPSC を凝集させて胚様体を形成させ、14 日間分化させた後に、CD34 および発現について解析した。

図１２Ａ

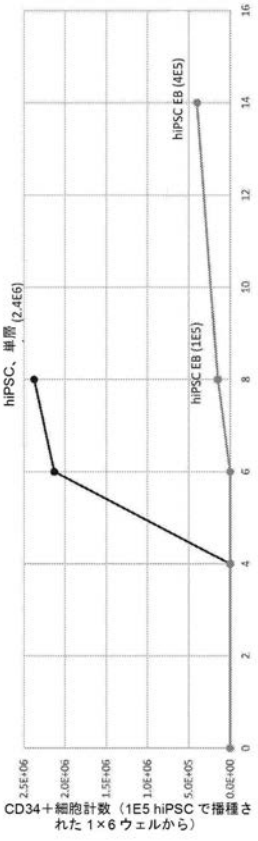
【図１２Ｂ】



hiPSC を単層に播種し、8 日間分化させた後、CD34、CD43、CXCR4 および CD73 について解析した。

図１２Ｂ

【図１２Ｃ】



単層を介した造血分化および EB を介した造血分化の両方について、CD34 陽性細胞を計数し、経時的にプロットした

図１２Ｃ

【図１３】

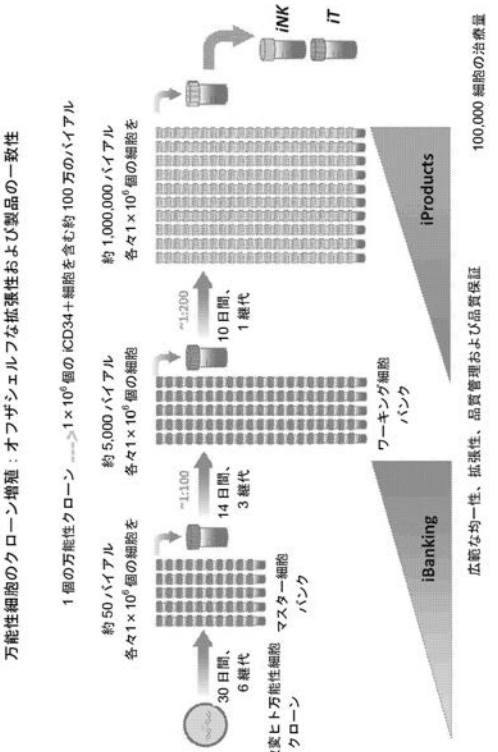


図１３

【図１４】

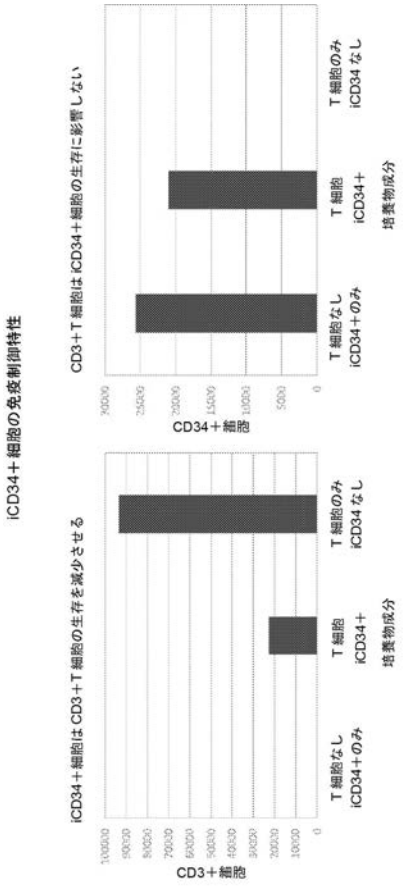


図１４

【図１５】

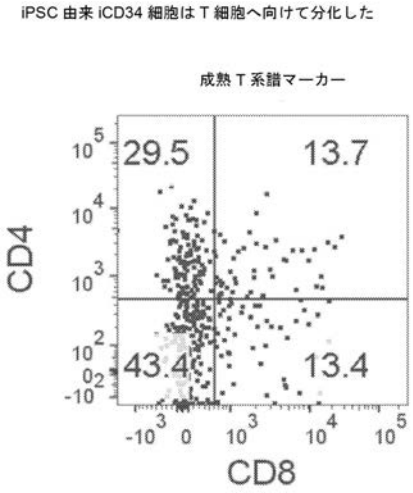


図１５

【図１６】

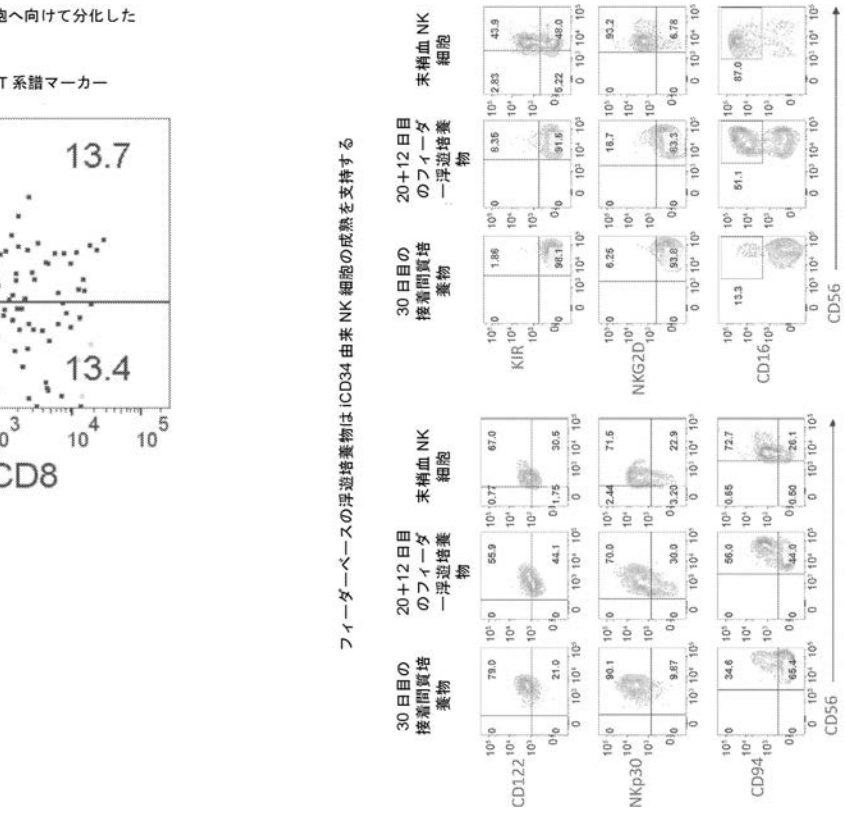


図１６

【図１７】

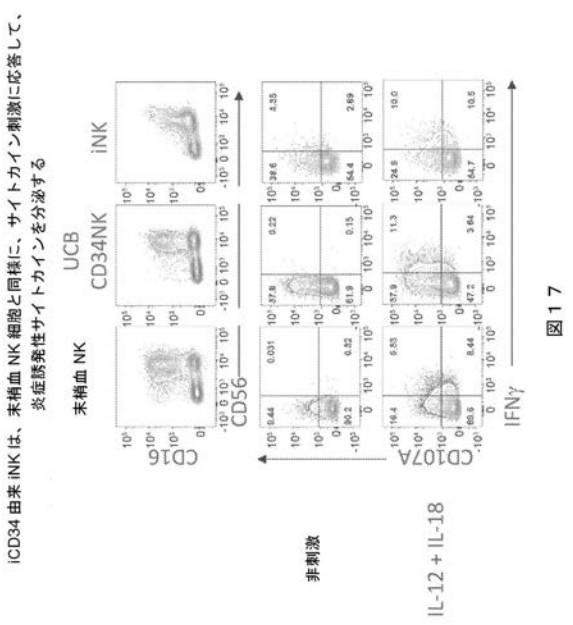


図１７

【図１８】

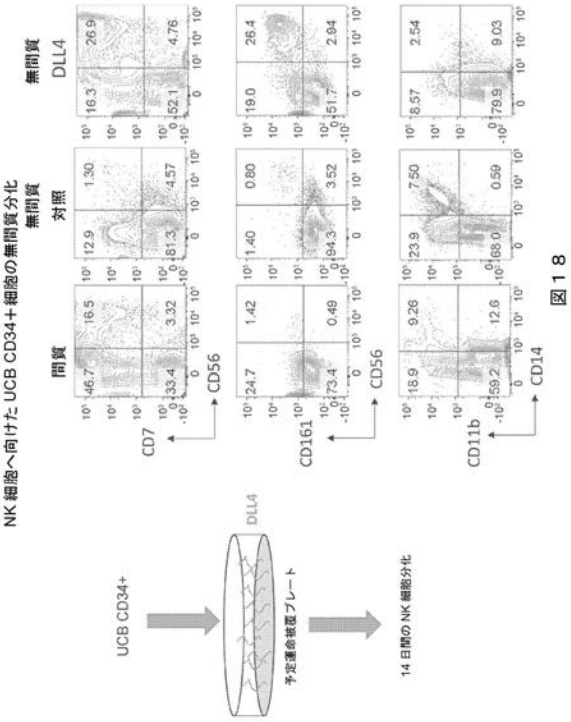


図１８

【図１９】

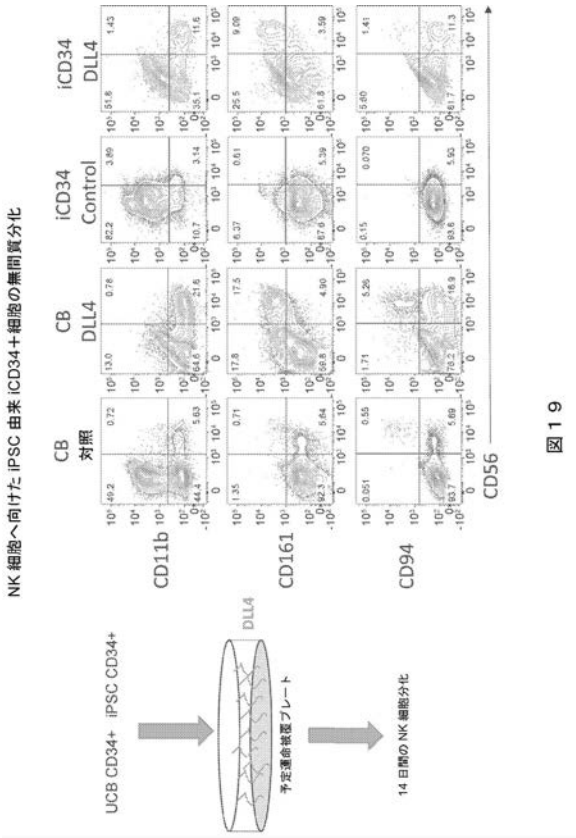


図１９

【図２０】

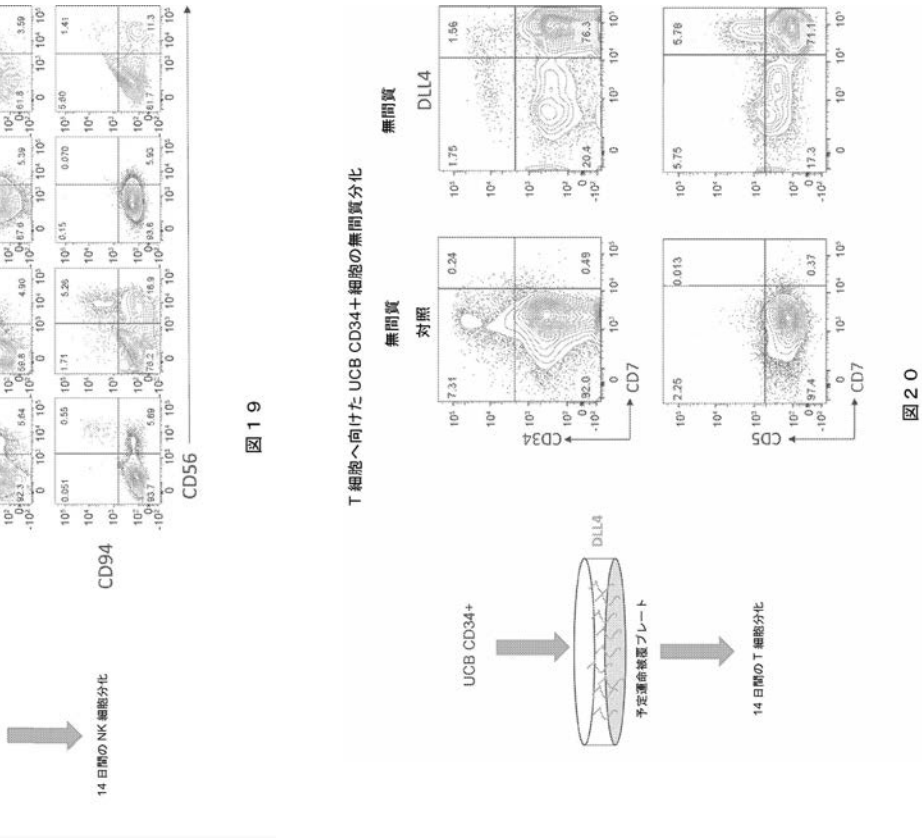


図２０

【図２１】

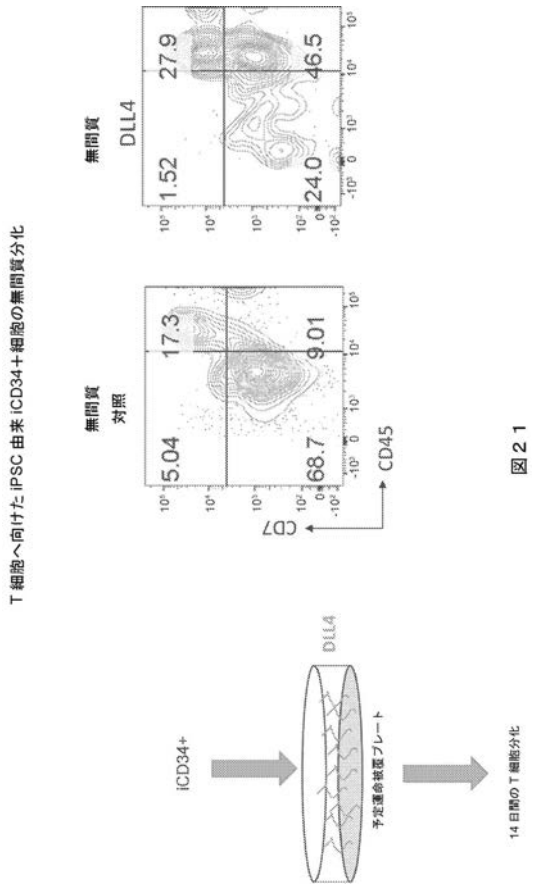


図２１

【図２２】

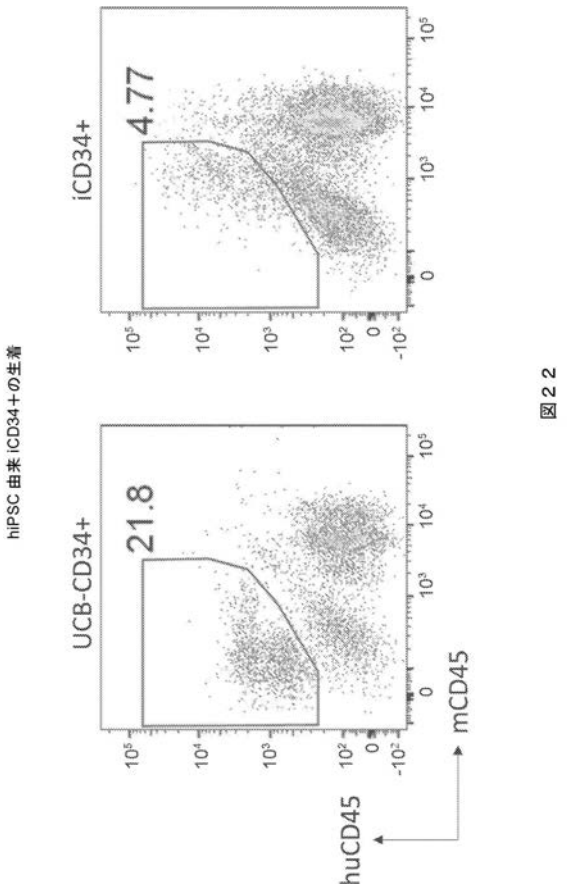


図２２

【図２３】

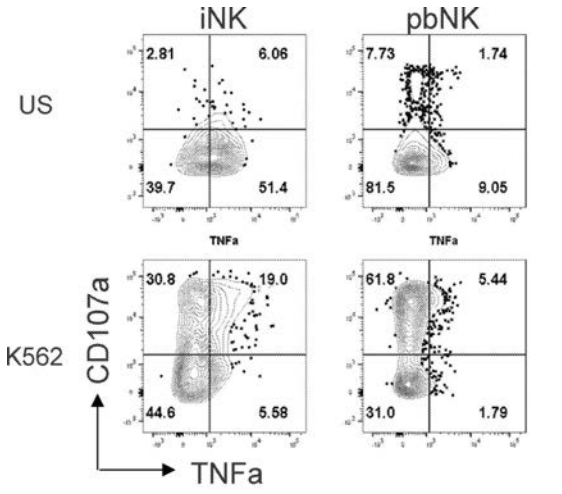


図２３Ａ

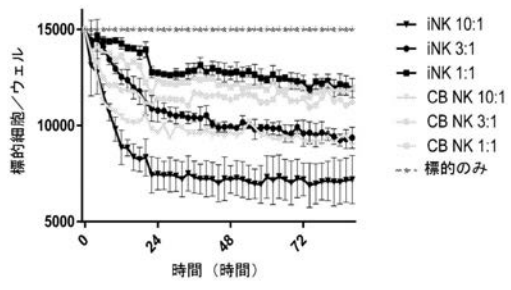


図２３Ｂ

【図２４】

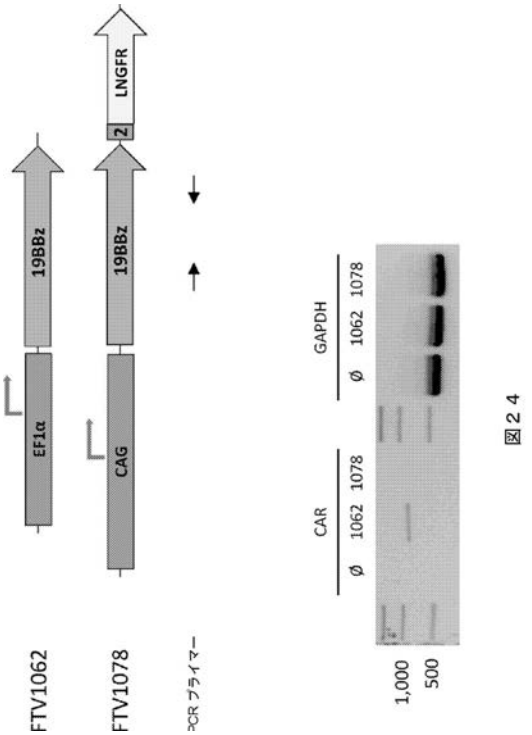


図２４

【図２５】

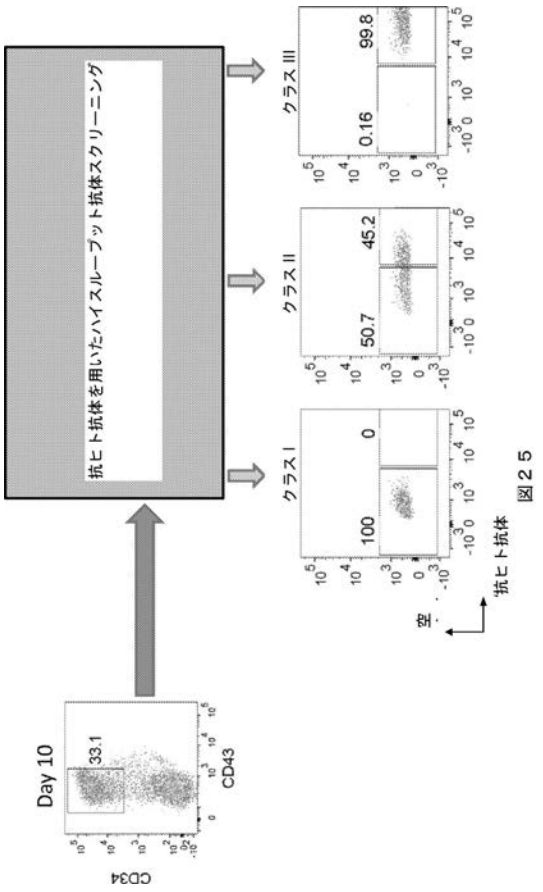


図２５

【図２６－１】

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー-	CD34+ CD43- マーカー+
CD39	733-76	100	0
CD39+	NTU-MM-1	100	0
CD59	p282 (H15)	100	0.027
CD34	581	99.9	0.1
CD34	581	99.9	0.12
CD34	581	99.9	0.12
CD276	MIH42	99.7	0.2
CD276	MIH42	99.7	0.2
CD288	LNH-94	99.7	0.28
CD81	1.46	99.5	0.31
CD112	TX31	99.6	0.34
CD155C	SHH-I-4	99.4	0.43
CD63	H5C6	99	0.76
CD99	HCD99	99.1	0.78
CD31	WM59	98.8	1
CD105	2H2 (N6-D11)	98.4	1.12
CD105	MJ7/18	98.4	1.32
CD146	SHM-57	97.5	1.82
CD49c	ASC-1	96.5	2.62
CD13	WM15	94.6	4.16
CD38	T2/38	87.7	12.2
37-			
microglobulin	2M7	90.9	5.66
integrin v963	VPA2	91.5	5.94
CD31	WM59	90.7	6.58
CD105	2H2 (N6-D11)	89.4	8.32
CD146	SHM-57	87.5	9.82
CD49c	ASC-1	86.5	10.3
CD13	WM15	84.6	12.1
CD38	T2/38	77.7	20.2
CD99	HCD99	77.2	20.8
CD31	WM59	76.5	21.5
CD105	2H2 (N6-D11)	75.3	22.8
CD105	MJ7/18	74.8	23.3
CD146	SHM-57	73.4	24.6
CD49c	ASC-1	72.5	25.6
CD13	WM15	70.3	27.8
CD38	T2/38	63.2	34.8
CD99	HCD99	62.4	35.6
CD44	BJ18	51.7	44.4
CD82	ASL-24	43.7	47.2
CD54	HA58	42	51.2
CD34	581	41.7	51.2
CD56	HCD56	39.3	51.4
CD200	OX-90	39.2	51.8
CD73	AD2	42.1	52.8
CD105	43.688.5	33	55.9
CD164	67D2	33.3	59.7
CD95	DX2	30.5	61.2
CD144	BV9	23.3	66.1
CD166	3A6	21.4	74.5
Lymphotoxin			
β Receptor	1164408	21.2	67.5
CD252	11C3.1	19.7	74
CD55	1H4	13.9	73.8
HLA-ABC	W6/32	13.9	79.6
CD40	HB14	13.7	78.1
CD46	TRA-2-10	13	75.3
CD340	2A62	12	74.9
CD119	GIR-208	11.9	76.3
CD106	STA	14.8	80
CD66a/c/e	ASL-32	14	82.5
CD315	TEA2/48	13.9	79.6
CD183	G025H7	13.3	78.1
CD326	AY13	13.2	83
CD107a	H4A3	12.2	82
CD171	4H1	9.98	84.7
CD146	67.04	9.43	87.2
CD49d	Goh3	9.17	86.8
CD200	OX-104	8.72	87.8
CD340	205G6	8.7	87.6
CD326	11A49	8.65	88.9
CD44	IM7	8.75	89.1
CD337	P30-15	8.68	89.3
CD184	12G5	7.16	91.5
CD200	OX-104	7.44	87.8
CD21	Bu32	7.39	89.2
CD172a	SE5A5	7.44	87.8
CD31	WM59	6.98	89.6
HLA-A2	BB7.2	5.98	89.6
CD183	1C6/CXCR3	0.6	99.2
CD167a	5G6	0.58	99.2
CD158d	mAB 11(31)	0.56	99.2
CD152	BNI3	0.56	99.3

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー+	CD34+ CD43- マーカー-
CD90	YKMD3b	3.295	95.7
CD319	162.1	3.95	95.7
CD69	FN50	3.34	94.2
CD338	5D3	3.29	95.7
Podoplanin	NC-08	3.16	95.3
CD90	5E10	2.79	94.6
CD304	12C2	2.7	94.6
CD326	9C4	2.49	95.2
CD317	1T2.4E1	2.14	97.4
CD100	A8	2.08	96.4
CD144	1D4.7	2.02	97.5
CD152	BNI-2	1.71	97.8
CD79b	CB3-1	1.59	98.3
CD33	WM53	1.5	97.8
CD81	TAPA-1/1H4	1.37	98.5
CD183	G025H7	1.34	98.6
CD183	G025H7	1.33	98.5
CD326	AY13	1.01	98.9
CD261	DR5	0.98	98.8
CD158a	GD149	0.97	98.8
MSC-MPC	W4A5	0.97	99
CD158a	H44	0.96	98.9
CD315	TEA2/48	0.94	99
CD326	HEA-125	0.9	98.6
CD326	AY13	0.84	98.9
CD107a	H4A3	0.8	99
CD271	ME20.4	0.79	98.8
CD271	20H1	0.79	99
CX3	109-f41-2	0.78	98.9
CD49f	Goh3	0.76	99.2
CD244	H1.2F3	0.75	99.1
CD105	43A3	0.75	99.1
CD226	11A8	0.65	98.9
CD337	P30-15	0.68	99.3
CD49f	GoH3	0.62	99.1
CD105	43A3	0.6	99.2
CD183	1C6/CXCR3	0.6	99.2
CD158d	mAB 11(31)	0.56	99.2
CD152	BNI-3	0.56	99.3

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー+	CD34+ CD43- マーカー-
CX3CR1	2A9-1	0.31	99.6
CD124	GD7/FR	0.26	99.6
CD1d	51.1	0.25	99.7
CD49d	9F10	0.24	99.7
CD154	24-31	0.24	99.7
CD197	G043H7	0.28	99.6
MICA/A/B	6D4	0.38	99
CD84	CD84.1.21	0.27	99.6
CD49d	9F10	0.27	99.6
CD124	GD7/FR	0.31	99.5
TCR gamma/delta	B1	0.31	99.6
CD270	86.2/70	0.3	99.5
CD150	A12	0.28	99.6
CD197	G043H7	0.28	99.6
MICA/A/B	6D4	0.38	99
CD84	CD84.1.21	0.27	99.6
CD49d	9F10	0.27	99.6
CD124	GD7/FR	0.26	99.6
CD1d	51.1	0.25	99.7
CD49d	9F10	0.24	99.7
CD154	24-31	0.24	99.7
CD197	G043H7	0.28	99.6
CD62L	DREG-56	0.23	99.5
CD85	ZD110	0.23	99.7
CD85d	42D1	0.23	99.7
CD85	699	0.23	99.7
CD1d	51.1	0.25	99.7
CD49d	9F10	0.24	99.7
CD154	24-31	0.24	99.7
CD62L	DREG-56	0.23	99.5
CD85	ZD110	0.23	99.7
CD85d	42D1	0.23	99.7
CD85	699	0.23	99.7
CD1b	ZHI8-159	0.23	99.6
CD28	CD28.2	0.22	99.6
CD85	GHI/75	0.22	99.5
CD158	MKB2-150	0.22	99.7
CD1d	51.1	0.21	99.7
CD64	10.1	0.21	99.7
CD83	HB15	0.21	99.7
Siglec-9	K8	0.21	99.8
Tim-3	F38-2E2	0.21	99.8

図２６

【図２６－２】

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー+	CD34+ CD43- マーカー-
CD81	TAPA-1	0.1	99.8
CD146/Mi	HAP-SAM1	0.2	99.8
CD49f	GoH3/4B10	0.2	99.8
CD205	HD30	0.2	99.8
CD355	CAM1-1	0.2	99.7
CD300f	IgR-102	0.2	99.4
CD49d/E3	mAb9F10	0.2	99.8
CD62L	DREG-56	0.19	99.7
CD1d	51.1	0.19	99.7
CD45RO	UCHL1	0.18	99.7
CD132	TUGh4	0.18	99.7
CD85h	J4	0.17	99.7
N/A	ID12	0.17	99.7
MICA/B	6D4	0.16	99.8
CD20	2H7	0.16	99.8
CD2L	BA5b	0.16	99.6
CD117	104D2	0.16	99.3
CD49d	9F10/A4-1/17	0.16	99.8
CD66b	G1/10F5	0.15	99.7
CD70	113-16	0.15	99.8
CD85k	ZM4.1	0.14	99.8
CD85j	ILT2	0.14	99.8
IgG1κ-8	P2G1	0.14	99.9
IgG2a, Ctrl	MOPC-173	0.14	99.7
CD193	Aven67	0.13	99.7
CD183	G025H7	0.13	99.8
CD109	W7C5	0.13	99.8
LAP	TW4-9E10	0.13	99.7
CD114	LMM741	0.12	99.8
CD154	24-31	0.12	99.8
gD	HSV-2	0.12	99.9
Mac-2	Gal3/97	0.12	99.8
IgG2b, Ctrl	MPC-11	0.12	99.9
CD18	TS1/18-1B5	0.11	99.8
CD49c	ASC-1	0.11	99.8
CD278	DC98.1	0.11	99.7
CD355	CrTh-1	0.11	99.9
IgG1, Ctrl	MOPC-21	0.11	99.8
CD146	SHM-57	0.1	99.8
CD96	NK92.39	0.1	99.9
CD122	TU27	0.1	99.9

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー+	CD34+ CD43- マーカー-
CD110	1A5	0.1	99.8
CD200R	OX-108	0.1	99.8
CD49f	GoH3	0.098	99.9
Integrin β7	FIB504	0.098	99.9
Notch-1	MHN1-519	0.092	99.9
IgG2a, Ctrl	MOPC-173	0.091	99.8
CD49f	GoH3	0.089	99.9
CD180	MHR73-11	0.087	99.9
N/A	J143	0.085	99.9
Ng/p80	SG12	0.084	99.9
CD44	A3D8	0.083	99.9
CD314	1D11	0.083	99.9
CD272	MIH26	0.082	99.8
CD178γ	HKL96	0.081	99.9
IgG3, Ctrl	B4B-D8	0.081	99.9
CD38	HIT2	0.078	99.8
CD37	CD37.487	0.078	99.8
CD135	BV10A4H2	0.078	99.8
CD57	HNK-1	0.077	99.9
CD172β	LSB2.20	0.072	99.9
CD304	NP41D6	0.072	99.8
IgG1, Ctrl	MOPC-21	0.072	99.9
CD31	WM59	0.071	99.9
TCR Vδ2	B6	0.071	99.9
CD45	HI30	0.069	99.9
CD54	HA58	0.069	99.9
IgG3, Ctrl	HIT3A	0.069	99.9
CD137	4B4-1	0.067	99.9
CD38	T5/28	0.067	99.9
TCR Vα7.2	3C10	0.067	99.9
CD154	24-31	0.067	99.9
IgG1, Ctrl	MG1-33	0.06	99.9
IgG, Ctrl	HTK888	0.059	99.9
CD182	1B1/CXCR2	0.058	99.8
Blank		0.057	99.9
CD45	F10-89-4	0.056	99.9
CD30	BY88	0.053	99.9
CD150	A12 (7D4)	0.052	99.9
CD158	GL183	0.052	99.9
CD172α	1A1	0.051	99.9
IL-28RA	MHR28A-1	0.051	99.9
TRA1-60-R	TRA1-60-R	0.049	100

名称	クローン	CD34+ CD43- マーカー+	CD34+ CD43- マーカー-
CD58	1H12	0.048	99.9
CD146s	8A4	0.048	99.9
CD45	17A10.2	0.046	99.9
CD3	HIT3a	0.045	99.9
CD31	1C1	0.045	99.9
CD45	MEM-28	0.044	99.9
CD45	MEM-75.1	0.044	99.8
CD229	Hy-1.1.25	0.044	100
CD35	E11	0.042	99.9
CD183b	49H7	0.042	99.9
CD360	2G4.412	0.042	99.9
CD27	O323	0.038	100
CD326	HEA-125	0.035	99.9
CD127	A019D5	0.034	99.9
CD127	A019D5	0.034	99.9
CD103	1E8	0.032	100
CD11	44D1.31H	0.028	99.9
CD137	4B4-1	0.027	99.9
CD137	4B4-1	0.027	99.9
CD38c	1L96.127	0.027	99.9
CD161	DX12	0.027	99.9
CD40a	16A1	0.03	100
CD38c	P44-8	0.024	99.9
CD49d	9F10	0.024	99.9
CD56	MEM-188	0.024	99.9
CD8a	3-298	0.025	100
CD11b	CBRM1/5	0.023	99.9
CD49d	9F10	0.023	99.9
CD158	11.1/D3	0.022	100
CD45	HI30	0.021	100
CD150	A12 (7D4)	0.021	100
CD158a	HP-MA4	0.02	99.8
CD152	BNI-3	0.02	100
IL-28RA	MHR28A-1	0.02	100
CD2	RPA-2.10	0	100

図２６（続き）

【図２７】

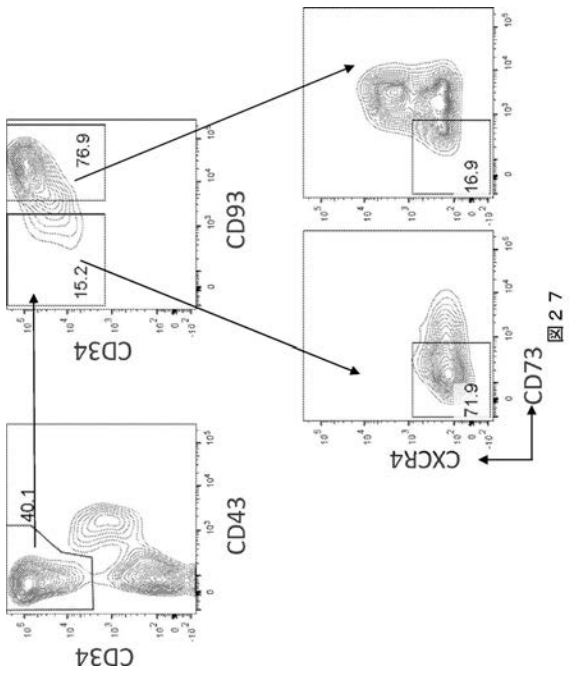


図２７

【図２８】

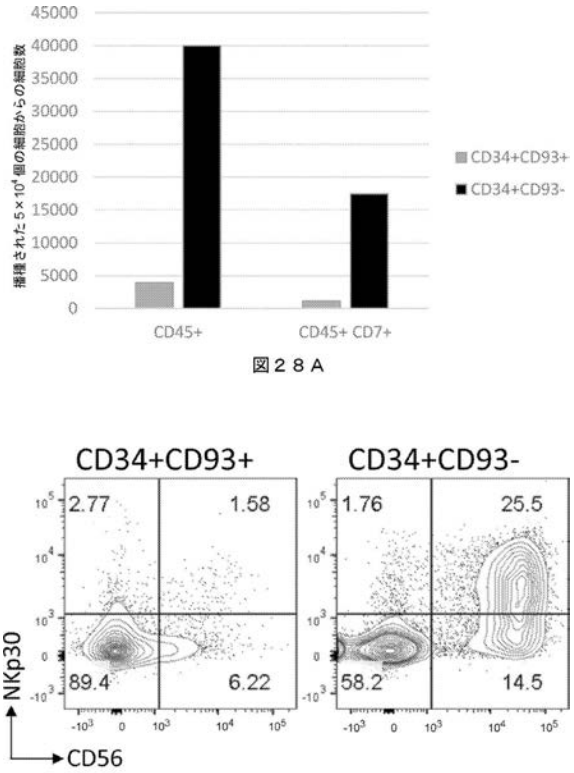


図２８Ａ

図２８Ｂ

【図２９】

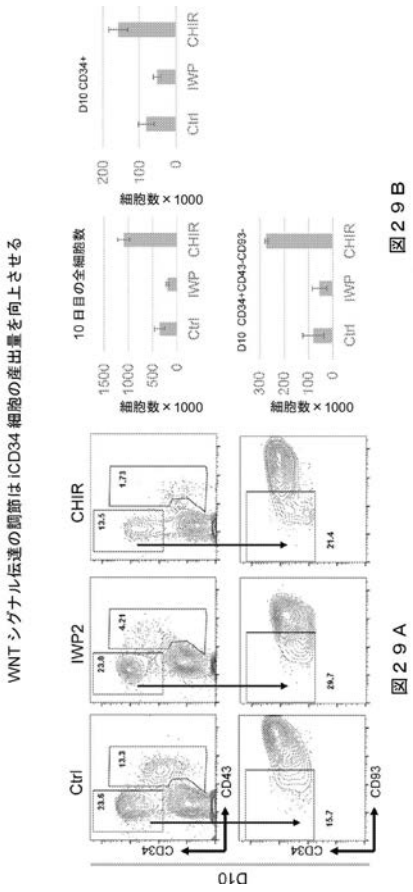


図２９Ａ

図２９Ｂ

【図３０】

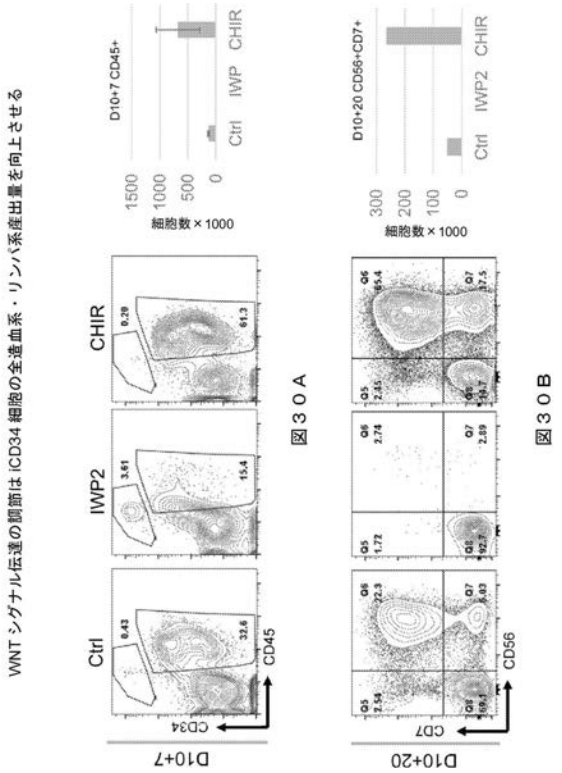


図３０Ａ

図３０Ｂ

【図３１】

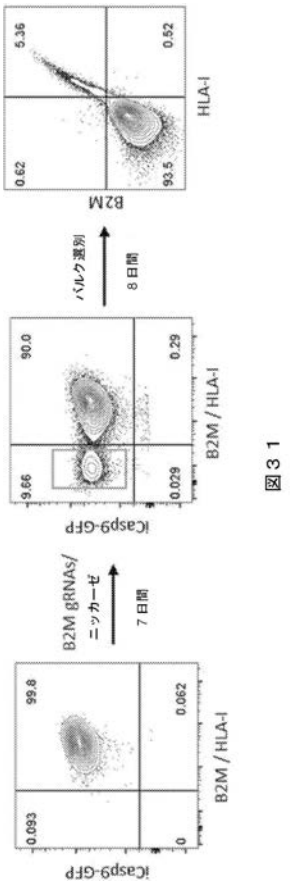


図３１

【図３２－１】

HLA クラスⅠヌル iPSC は iCD34HE に分化し、さらに、
全造血系・リンパ系前駆細胞に分化することができる

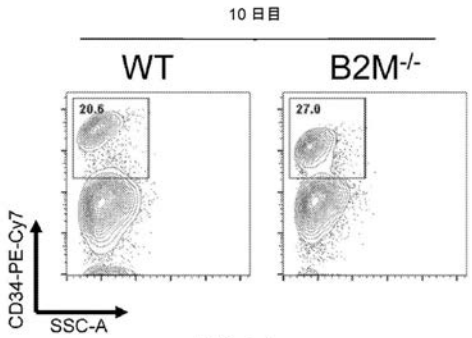


図３２Ａ

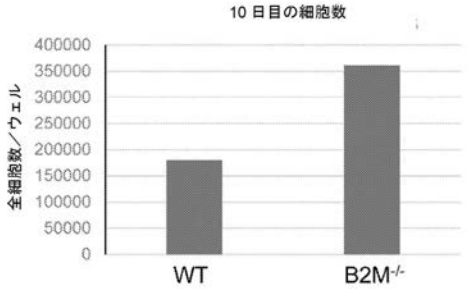


図３２Ｂ

【図３２－２】

HLA クラスⅠヌル iPSC は iCD34HE に分化し、さらに、全造血系・リンパ系
前駆細胞に分化することができる

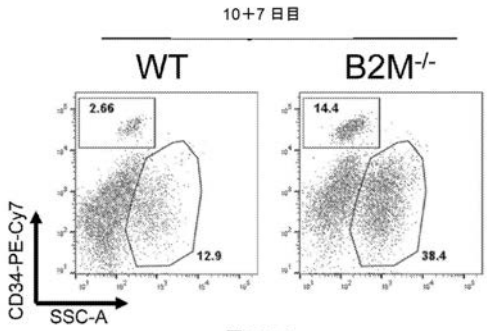


図３２Ｃ

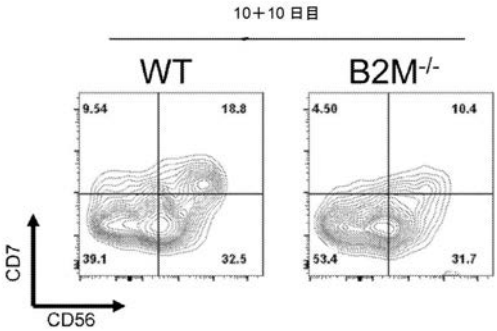


図３２Ｄ

【図３３】

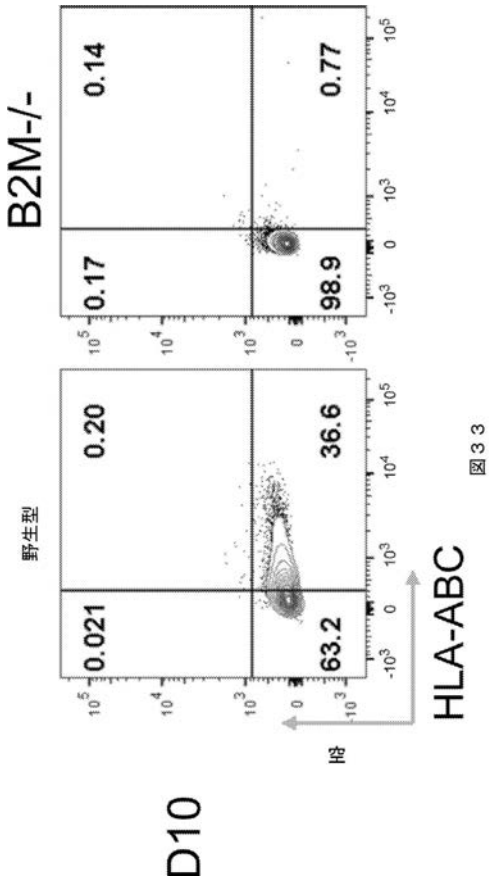


図３３

【図３４Ａ】

iPSC 上の HLA クラスⅠの調節は免疫応答性レシピエントにおける iPSC の残留
性を増加させる

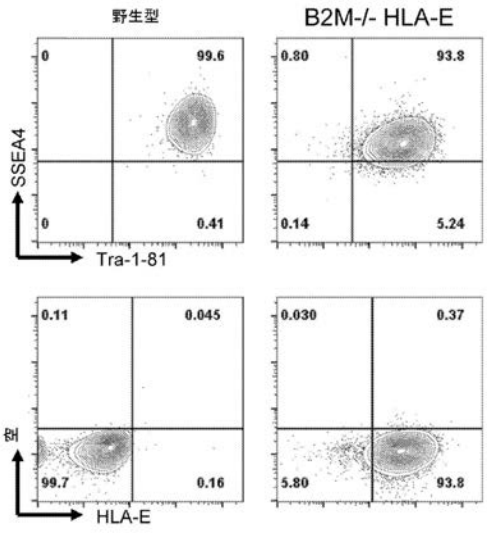


図３４Ａ

【図３４Ｂ】

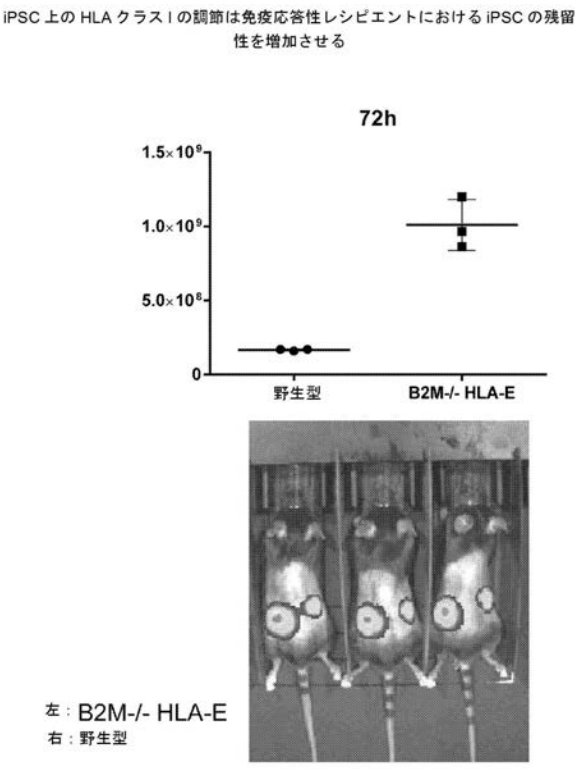


図３４Ｂ

【図３５】

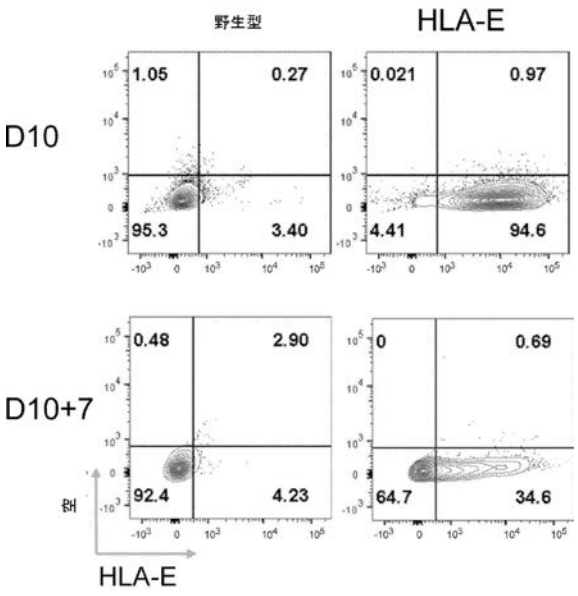


図３５

【図３６－１】

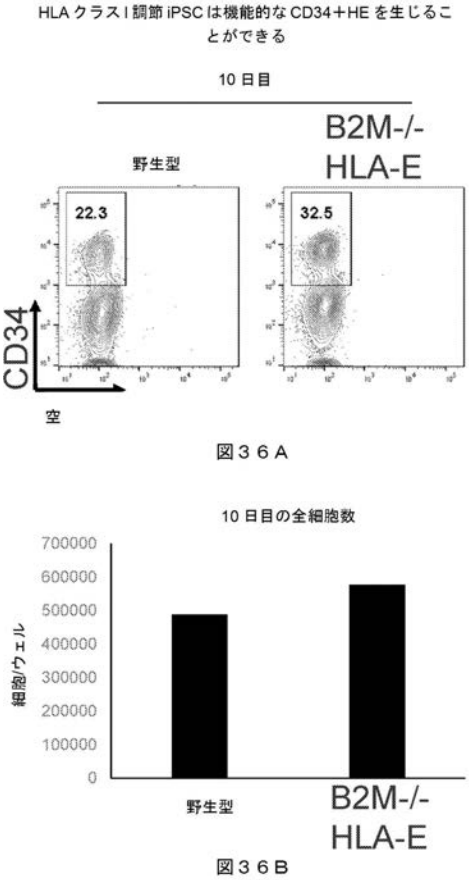


図３６Ａ

図３６Ｂ

【図３６－２】

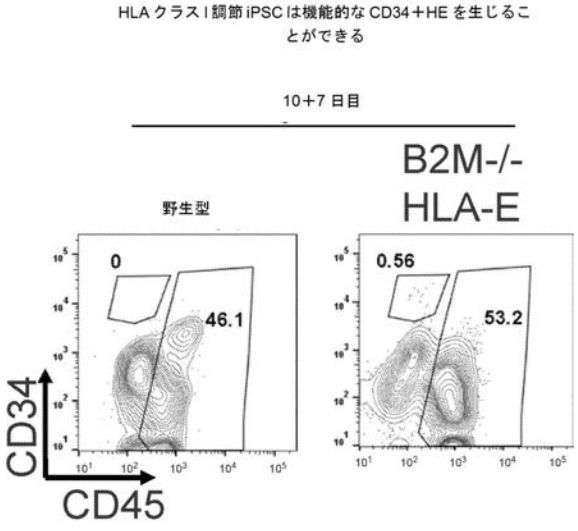


図３６Ｃ

【図３７Ａ】

高親和性 CD16 受容体および 41BBL 共起刺激分子を発現するように遺伝子改変された iPSC は iCD34 細胞への分化の全体に亘って発現を保持する

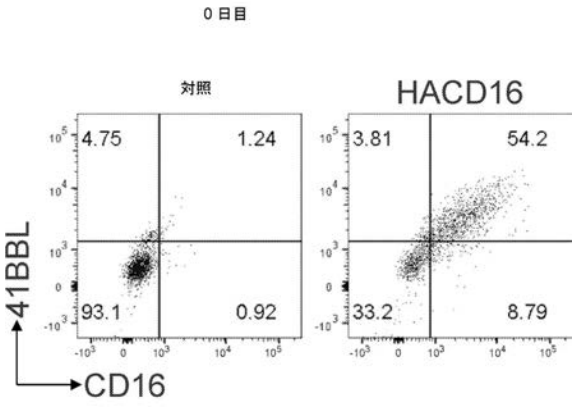


図３７Ａ

【図３７Ｂ】

高親和性 CD16 受容体および 41BBL 共起刺激分子を発現するように遺伝子改変された iPSC は iCD34 細胞への分化の全体に亘って発現を保持する

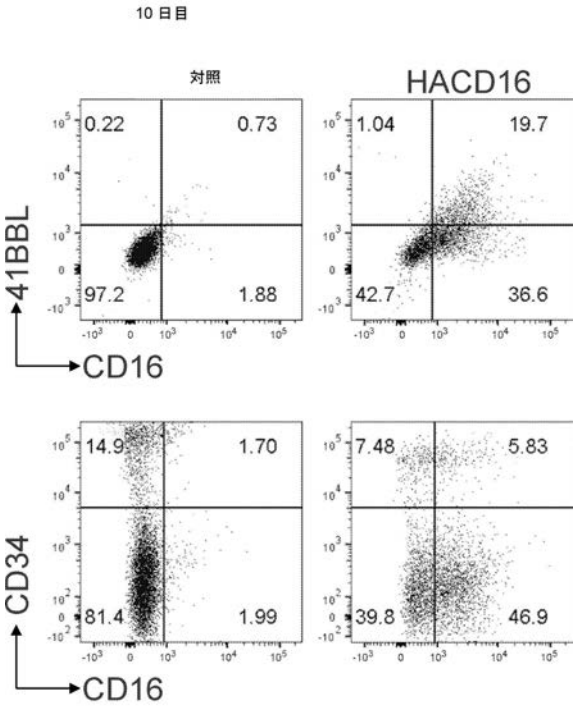


図３７Ｂ

【図３８Ａ】

CAR−T 由来 iPSC は CAR を保持する

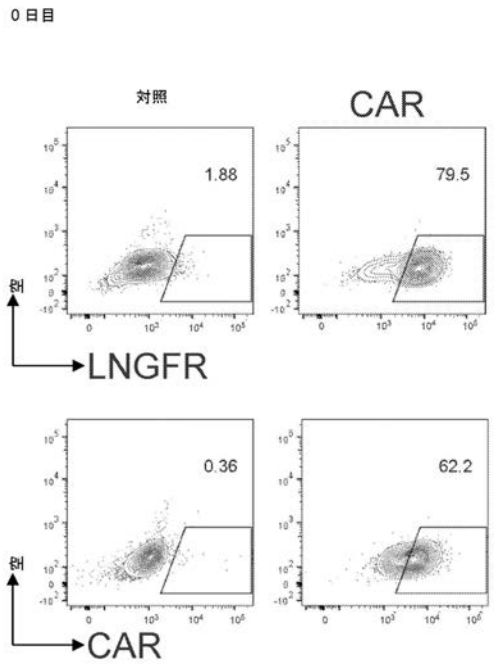


図３８Ａ

【図３８Ｂ】

CAR−T 由来 iPSC は CAR を保持する

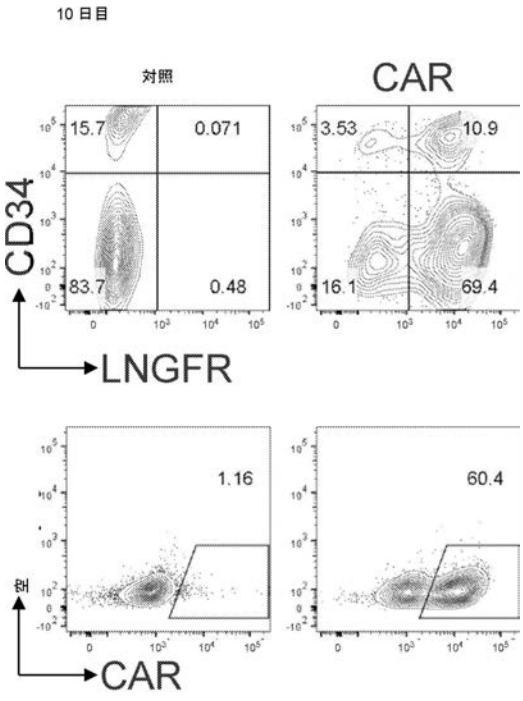


図３８Ｂ

【図３９】

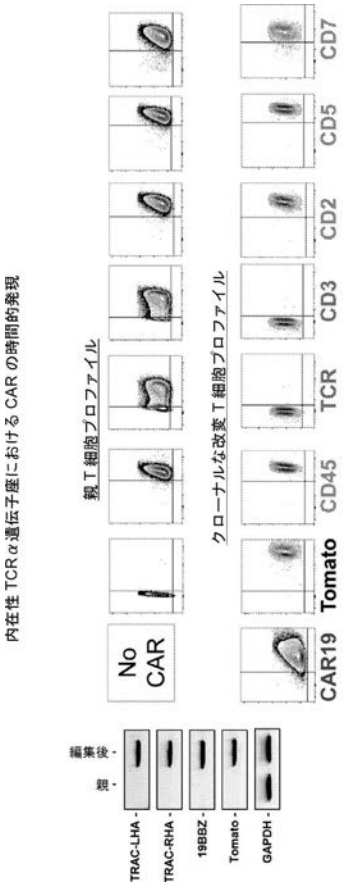


図３９

【図４０】

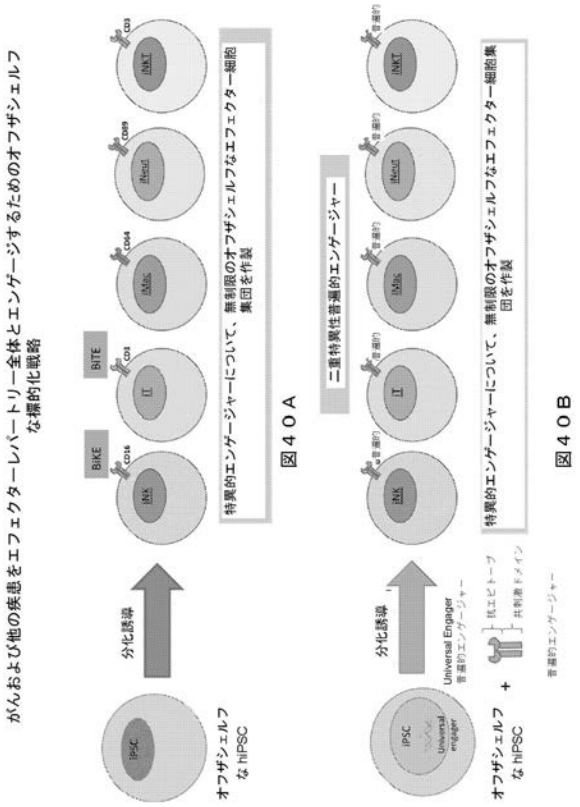


図４０Ａ

図４０Ｂ

【図４１】

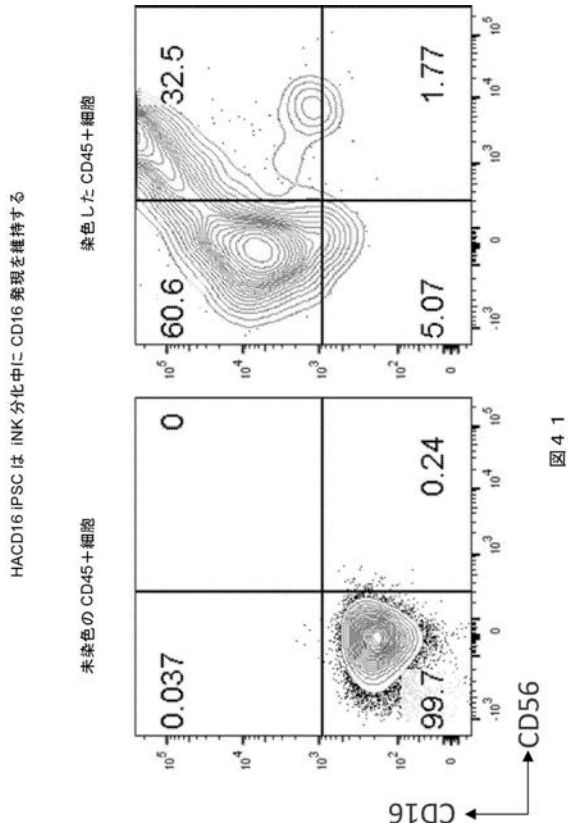


図４１

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/044122

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 37-49, 84
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 37-49 and 84 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☒ Claims Nos.: 30-35, 72-79, 127-130, 141
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 30-35, 72-79, 127-130 and 141 are unclear since they each refer to a multiple dependent claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 28-29, 36, 71, 80, 119, 126, 131-134, 140
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/044122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0789(2010.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N 5/0789; A61K 39/395; C12N 5/00; C07H 21/02; A61K 35/28; G01N 33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: hematopoietic, iPSC, genetic imprint

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014-165131 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 09 October 2014 See abstract; claims 1-4; paragraphs [0057], [0061]-[0062].	85,91,95,98,101
A		1-27,50-70,81-83,86-90,92-94,96-97,99-100,102-118,120-125,135-139
Y	WANG, YI et al., 'WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells', Stem Cell Research, 2009, Vol.3, Issue 2, pages 113-125 See abstract; fig. 4.	85,91,95,98,101
A	US 2012-0039911 A1 (PARK, YOUNG WOO et al.) 16 February 2012 See abstract; paragraphs [0005], [0047].	1-27,50-70,81-83,85-118,120-125,135-139
A	CHOI, KYUNG-DAL et al., 'Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures', Cell Reports, 2012, Vol.2, Issue 3, pages 553-567 See the whole document.	1-27,50-70,81-83,85-118,120-125,135-139

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 November 2016 (09.11.2016)	**10 November 2016 (10.11.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR
International Application Division
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer
LEE, EUN KYU
Telephone No. +82-42-481-3580

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/044122

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BROWN, MATTHEW E. et al., 'Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes', PloS One, 2010, Vol.5, Issue 6, e11373 (inner pages 1-9) See the whole document.	1-27,50-70,81-83,85-118,120-125,135-139
A	FRENCH, ANNA et al., 'Human induced pluripotent stem cell-derived B lymphocytes express sIgM and can be generated via a hemogenic endothelium intermediate', Stem Cells and Development, 2014, Vol.24, No.9, pages 1082-1095 See the whole document.	1-27,50-70,81-83,85-118,120-125,135-139

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2016/044122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014-165131 A1	09/10/2014	AU 2014-248651 A1	01/10/2015
		CA 2905786 A1	09/10/2014
		CN 105209609 A	30/12/2015
		EP 2970912 A1	20/01/2016
		JP 2016-512031 A	25/04/2016
		KR 10-2015-0126943 A	13/11/2015
		US 2014-0273211 A1	18/09/2014
US 2012-0039911 A1	16/02/2012	EP 2392352 A2	07/12/2011
		EP 2392352 A4	26/06/2013
		JP 2012-516322 A	19/07/2012
		JP 5752052 B2	22/07/2015
		KR 10-1398545 B1	27/05/2014
		KR 10-1526307 B1	11/06/2015
		US 8993343 B2	31/03/2015
		WO 2010-087594 A2	05/08/2010
		WO 2010-087594 A3	21/10/2010
		WO 2010-087594 A9	10/11/2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	
A61P 39/06	*(2006.01)*	A61P	39/06	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 7/00	*(2006.01)*	A61P	7/00	
A61P 31/18	*(2006.01)*	A61P	31/18	
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P	31/12	
A61P 31/22	*(2006.01)*	A61P	31/22	
A61K 35/545	*(2015.01)*	A61K	35/545	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/02	
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 クラーク, レイダン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、ジェネラル アトミクス コート ３５３５、スイート ２００
(72)発明者 ビョーダール, リャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、ジェネラル アトミクス コート ３５３５、スイート ２００

Fターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 BA30 BB04 BB19 BD14 CA44
4C087 AA01 AA02 BB65 MA55 MA66 NA14 ZA51 ZB08 ZB26 ZB27
ZB33 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA50 DA75 DA76 EA50 EA60 FA74

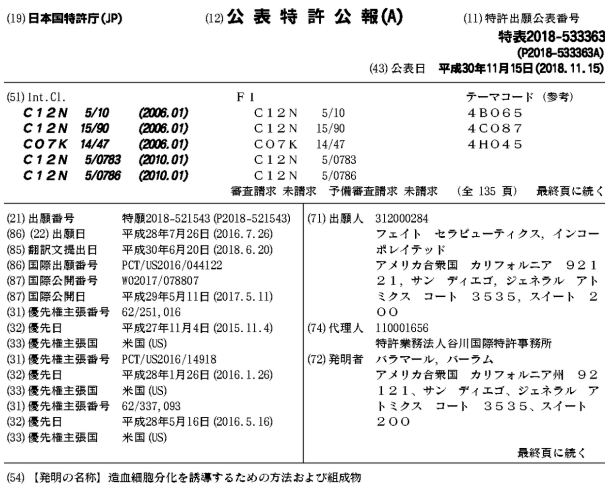
专利名称(译)	用于诱导造血细胞分化的方法和组合物

公开(公告)号	JP2018533363A	公开(公告)日	2018-11-15
申请号	JP2018521543	申请日	2016-07-26

[标]申请(专利权)人(译)	菲特治疗公司
申请(专利权)人(译)	命运Therapeutics公司
[标]发明人	バラマールバーラム クラークレイダン ビョーダールリャン
发明人	バラマール,バーラム クラーク,レイダン ビョーダール,リャン
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/90 C07K14/47 C12N5/0783 C12N5/0786 C07K16/28 A61P39/06 A61P35/00 A61P7/00 A61P31/18 A61P31/12 A61P31/22 A61K35/545 A61P35/02 G01N33/53
CPC分类号	C12N5/0647 A61K35/28 A61K35/545 A61K39/0011 A61K2039/5158 C12N2501/115 C12N2501/125 C12N2501/14 C12N2501/145 C12N2501/155 C12N2501/165 C12N2501/22 C12N2501/2302 C12N2501/2303 C12N2501/2306 C12N2501/2311 C12N2501/235 C12N2501/415 C12N2501/727 C12N2501/999 C12N2506/45 C12N2510/00 C12N2533/90 G01N33/5073 Y02A50/467
FI分类号	C12N5/10 C12N15/90 C07K14/47 C12N5/0783 C12N5/0786 C07K16/28 A61P39/06 A61P35/00 A61P7/00 A61P31/18 A61P31/12 A61P31/22 A61K35/545 A61P35/02 G01N33/53.Y
F-TERM分类号	4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/BB04 4B065/BB19 4B065/BD14 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/MA55 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA51 4C087/ZB08 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB33 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA60 4H045/FA74
优先权	62/251016 2015-11-04 US PCT/US2016/014918 2016-01-26 WO 62/337093 2016-05-16 US
其他公开文献	JP2018533363A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了用于将多能细胞分化为造血细胞的培养平台，细胞培养基和方法。 本发明进一步提供了使用本文所述的培养平台和方法制备的多能干细胞来源的造血细胞，其允许无饲养层的单层培养而没有EB形成。特别地，本发明的多能干细胞来源的造血细胞包括iHSC，命运决定的造血内皮细胞，造血多能祖细胞，T细胞祖细胞，NK细胞祖细胞，T细胞，NK细胞，NKT细胞和B. 单元格包括但不限于。 [选择图]无



(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-533363
(P2018-533363A)
(43)公表日　平成30年11月15日(2018.11.15)

(51)Int.Cl.　F I　テーマコード（参考）
C12N 5/10 (2006.01)　C12N 5/10　4B065
C12N 15/90 (2006.01)　C12N 15/90　4C087
C07K 14/47 (2006.01)　C07K 14/47　4H045
C12N 5/0783 (2010.01)　C12N 5/0783
C12N 5/0786 (2010.01)　C12N 5/0786
審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-521543 (P2018-521543)
(86)(22)出願日　平成28年7月26日(2016.7.26)
(85)翻訳文提出日　平成30年6月20日(2018.6.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/044122
(87)国際公開番号　WO2017/078807
(87)国際公開日　平成29年5月11日(2017.5.11)
(31)優先権主張番号　62/251,016
(32)優先日　平成27年11月4日(2015.11.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2016/14918
(32)優先日　平成28年1月26日(2016.1.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/337,093
(32)優先日　平成28年5月16日(2016.5.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　312000284
フェイト　セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２１，サン　ディエゴ，ジェネラル　アトミクス　コート　３５３５，スイート　２００
(74)代理人　110001656
特許業務法人谷川国際特許事務所
(72)発明者　バラマール，バーラム
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２１２１、サン　ディエゴ，ジェネラル　アトミクス　コート　３５３５、スイート　２００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】造血細胞分化を誘導するための方法および組成物