

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2016年5月19日(19.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号

WO 2016/076415 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
*C12N 5/0783 (2010.01)*番 10 号 アクロポリス 21 ビル 8 階 Tokyo
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/081959

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2015年11月13日(13.11.2015)

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:

(26) 国際公開の言語: 日本語

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(30) 優先権データ:
特願 2014-230355 2014年11月13日(13.11.2014) JP

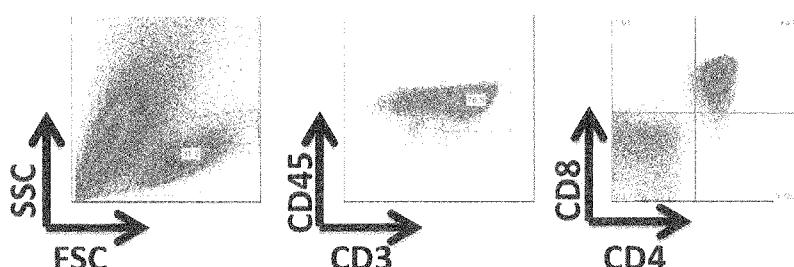
(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 金子 新(KANEKO, Shin); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 南川 淳隆(MINAGAWA, Atsutaka); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 安井 裕(YASUI, Yutaka); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4

(54) Title: METHOD FOR INDUCTION OF T CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞からT細胞への誘導方法



(57) Abstract: Provided is a method for efficiently inducing CD8-positive T cells, said method comprising, in each step for inducing CD8-positive T cells from pluripotent stem cells, adding vitamin C or a derivative thereof to a liquid culture medium and culturing. Also provided is a method for efficiently inducing CD8-positive T cells, said method comprising, in a step for inducing CD8-positive T cells from CD4CD8-double positive T cells, adding an adrenocortical hormone agent to a liquid culture medium and culturing.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞からCD8陽性T細胞の誘導における各工程において、ビタミンC類を培養液へ添加して培養することで、効率よくCD8陽性T細胞を誘導する方法を提供する。さらに、CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞の誘導工程において、副腎皮質ホルモン剤を培養液へ添加して培養することで、効率よくCD8陽性T細胞を誘導する方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：多能性幹細胞からT細胞への誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する各工程においてビタミンC類を添加した培養液を利用してCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法、ならびに当該CD4CD8両陽性T細胞を副腎皮質ホルモン剤を含む培養液中で培養する工程を含むCD8陽性T細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] T細胞は、細菌やウィルスなどの外来の病原体や癌細胞などの異常な細胞に対する免疫システムにおいて中心的な役割を果たしているが、様々な原因によりT細胞の機能が低下し、易感染性やがん等に罹患すると考えられている。このような疾患に対して、免疫細胞等の補充や再生をすれば、疾患の病態改善や治療効果の向上などに極めて有効な手段となる。このような免疫細胞の補充療法において、細胞性免疫を担うTリンパ球の機能補充や再生が強く求められているが、現在有効な治療方法は確立されていない。

このようなTリンパ球の補充療法として、抗原特異的なT細胞受容体（TCR）遺伝子を各種リンパ球系細胞に遺伝子導入し、特異的免疫反応を補充や賦活させることが提案されている（非特許文献1または2）。これらの試みでは遺伝子導入細胞として骨髄前駆細胞であるCD34陽性細胞や、ナイーブTリンパ球などが用いられているが、これらは、Ex-vivoでの自己再生能が低い、遺伝子導入の効率が低い、遺伝子導入による分化の調節が困難である、など多くの課題を有している。

また、iPS細胞などの多能性幹細胞から誘導したTリンパ球を用いた補充療法も提案されている（非特許文献3または特許文献1）。多能性幹細胞からTリンパ球の誘導方法においては、（1）多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程、（2）造血前駆細胞からCD4CD8両陰性細胞を誘導する工程、（3）CD4CD8両陰性細胞からCD4CD8両陽性細胞を誘

導する工程、および(4)CD4CD8両陽性細胞からTリンパ球を誘導する工程が提案されている。

(1)の工程では、多能性幹細胞からネット様構造物サック(ES-sac)を形成させ造血前駆細胞を製造する方法が知られている(非特許文献4)。また、(2)および(3)の工程は、OP9-DL1細胞層上でIL-7およびFlt-3Lを添加した培地で培養する方法が知られている(非特許文献5または6)。さらに、(4)の工程は、抗CD3抗体(OKT-3)およびIL-2を添加した培地で培養する方法が知られている。

しかし、これらの方法によって多能性幹細胞からTリンパ球を製造する効率は十分ではなく、改良が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1: WO 2011096482

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Gattinoni L, et al., Nat Rev Immunol. 6(5):383-393, 2006

非特許文献2: Morgan RA, et al., Science. 314(5796):126-129, 2006

非特許文献3: Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013

.

非特許文献4: Takayama N, et al., Blood. 111(11):5298-5306, 2008

非特許文献5: Timmermans F, et al., J Immunol. 182(11):6879-6888, 2009

非特許文献6: Ikawa T, et al., Science. 329(5987):93-96, 2010

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、多能性幹細胞から造血前駆細胞を効率良く製造することにある。さらなる本発明の目的は、当該方法で得られた造血前駆細胞由来のCD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を効率よく製造することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記目的を達成すべく、多能性幹細胞から造血前駆細胞を効率よく誘導するために有効な物質の探索を行った。その結果、多能性幹細胞から造血前駆細胞への分化の各工程にて、ビタミンC類を培養液へ添加して培養することで、効率よく造血前駆細胞が誘導されることを見出した。さらに、本発明者らは、CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を効率よく誘導するためには有効な物質の探索を行った。その結果、副腎皮質ホルモン剤を培養液へ添加して培養することで、効率よくCD8陽性T細胞が誘導されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

- [1] 以下の工程を含む、多能性幹細胞からCD8陽性T細胞を誘導する方法；
 - (1) 多能性幹細胞を、ビタミンC類を添加した培養液中で培養し、造血前駆細胞を誘導する工程、
 - (2) 前記工程(1)で得られた細胞を、ビタミンC類を添加した培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程、および
 - (3) 前記工程(2)で得られた細胞を、副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中で培養し、CD8陽性T細胞を誘導する工程。

[2] 前記工程(3)において、培養液はさらにビタミンC類を含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、[1]または[2]に記載の方法。[4] 各工程において、ビタミンC類は1日毎に培養液へ補充される、[1]から[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記工程(1)において、多能性幹細胞はC3H10T1/2細胞上で培養される、[1]から[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記工程(1)が、5%以下の低酸素条件で行われる、[1]から[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記工程(1)において、培養液はさらにVEGF、SCFおよびFLT-3Lを含む、[1]から[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 前記工程(2)において、工程(1)で得られた細胞はOP9-DL1細胞上

で培養される、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕前記工程（2）において、培養液はさらにFLT-3L、およびIL-7を含む、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中でCD4CD8両陽性T細胞を培養する工程を含む、CD8陽性T細胞を誘導する方法。

〔11〕前記副腎皮質ホルモン剤がデキサメタゾンである、〔10〕に記載の方法。

〔12〕前記培養液は、さらに抗CD3抗体、ビタミンC類、IL-2およびIL-7を含む、〔10〕または〔11〕に記載の方法。

〔13〕前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、〔12〕に記載の方法。

〔14〕ビタミンC類を添加した培養液中で多能性幹細胞を培養する工程を含む、造血前駆細胞を誘導する方法。

〔15〕前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、〔14〕に記載の方法。

〔16〕ビタミンC類は1日毎に培養液に補充される、〔14〕または〔15〕に記載の方法。

〔17〕前記多能性幹細胞を培養する工程が、C3H10T1/2細胞上で多能性幹細胞を培養する工程である、〔14〕から〔16〕のいずれかに記載の方法。

〔18〕前記多能性幹細胞を培養する工程が、5%以下の低酸素条件で行われる、〔14〕から〔17〕のいずれかに記載の方法。

〔19〕前記培養液は、さらにVEGF、SCFおよびFLT-3Lを含む、〔14〕から〔18〕のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、ビタミンC類を培養液へ添加することで、多能性幹細胞から効率よくCD8陽性T細胞を製造することが可能である。さらに、本発明によれば、副腎皮質ホルモン剤を培養液へ添加することで、CD4CD8両陽性T細胞から効率よくCD8陽性T細胞を製造することが可能である。従って、本発明によ

れば、多能性幹細胞からCD8陽性T細胞を効率よく生産することが可能であり、また、多能性幹細胞由来のCD8陽性T細胞を含む免疫機能を賦活する治療薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、37日間培養した後の細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左図は、FSCとSSCで展開した図を示し、中央図は、CD3とCD45の染色強度で展開した図を示し、右図は、CD4とCD8の染色強度で展開した図を示す。

[図2]図2は、CD4CD8両陽性T細胞を3日間培養した後の細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左図は、FSCとSSCで展開した図を示し、中央図は、CD3とCD45の染色強度で展開した図を示し、右図は、CD4とCD8の染色強度で展開した図を示す。

[図3]図3は、iPS細胞（GPC株）から誘導されたCD4CD8両陽性T細胞を3日間培養した後の細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。FSCとSSC、CD3とCD45の染色強度、CD4とCD8 α の染色強度、CD8 α とCD8 β の染色強度およびCD5とCD7の染色強度で展開した図を示す。

[図4]図4は、iPS細胞（GPC株）から誘導されたCD4CD8両陽性T細胞を3日間培養した後の細胞をGPC3 Dextramerと接触させた後のフローサイトメトリーの結果を示す。左図は、CD4とCD8 α の染色強度で展開した図を示し、右図は、GPC3 DextramerとCD8 α の染色強度で展開した図を示す。

[図5]図5は、iPS細胞（GPC株）から誘導されたCD4CD8両陽性T細胞を3日間培養した後の細胞をGPC3 Dextramerと接触させた後のフローサイトメトリーの結果を示す。FSCとSSC、CD3とCD45の染色強度、CD4とCD8 α の染色強度、CD8 α とCD8 β の染色強度およびGPC3 DextramerとCD8 α の染色強度で展開した図を示す。

[図6]図6は、iPS細胞（TKT3v 1-7株および4GAD 1-8株）からフィーダー細胞を用いずに製造したCD4CD8両陽性T細胞を3日間培養した後の細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。FSCとSSC、CD3とCD45の染色強度、CD4とCD8 α の染色強度、CD8 α とCD8 β の染色強度およびCD5とCD7の染色強度で展開した図

を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、多能性幹細胞からCD8陽性T細胞を製造する方法を提供する。当該製造方法は、（1）多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程、（2）当該造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程、および（3）当該CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導する工程に分割することができる。

[0011] 多能性幹細胞

本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、少なくとも本発明で使用される造血前駆細胞に誘導される任意の細胞が含まれる。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローニング由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、製造工程において胚、卵子等の破壊をしないで入手可能であるという観点から、iPS細胞であり、より好ましくはヒトiPS細胞である。

[0012] iPS細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGli1等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/12

6251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), *Stem Cells*, 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3:475-479、Marson A, (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), *Nat. Cell Biol.*, 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), *Nature*, 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), *Cell Stem Cell*, 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), *Cell Stem Cell*, 6:167-74、Han J, et al. (2010), *Nature*, 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), *Stem Cells*, 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), *Nature*, 474:225-9. に記載の組み合わせが例示される。

[0013] 体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば(1)神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2)組織前駆細胞、(3)血液細胞(末梢血細胞、臍帯血細胞等)、リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、臍細胞(臍外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0014] 本発明では、CD8陽性T細胞を製造する目的に使用するため、T細胞受容体(T cell receptor、TCR)の遺伝子再編成が行われたり

ンパ球（好ましくは、T細胞）を体細胞として用いてiPS細胞を製造することが好ましい。本発明において、リンパ球を用いる場合、初期化の工程に先立ち当該リンパ球をインターロイキン-2（IL-2）の存在下にて抗CD3抗体及び抗CD28抗体によって刺激して活性化することが好ましい。かかる刺激は、例えば、培地中に、IL-2、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を添加して前記リンパ球を一定期間培養することによって行うことができる。また、抗CD3抗体及び抗CD28抗体は磁性ビーズ等が結合されているものであってもよく、さらにこれらの抗体を培地中に添加する代わりに、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を表面に結合させた培養ディッシュ上で前記T細胞を一定期間培養することによって刺激を与えてよい。さらに、ヒトT細胞が認識する抗原ペプチドをフィーダー細胞とともに培地中に添加することによって刺激を与えてよい。

- [0015] 本発明において製造されるCD8陽性T細胞は、所望の抗原特異性を有することが好ましい。従って、iPS細胞の元となるリンパ球は、所望の抗原特異性を有することが望ましく、当該リンパ球は、所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製により特異的に単離されても良い。この精製では、所望の抗原を結合させたMHC（主要組織適合遺伝子複合体）を4量体化させたもの（いわゆる「MHCテトラマー」）を用いて、ヒトの組織より所望の抗原特異性を有するリンパ球を精製する方法も採用することができる。
- [0016] 本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。本発明によって調製されたCD8陽性T細胞を輸血に使用する場合、輸血される患者とヒト白血球型抗原（HLA）の型を適合させ易いという観点から、iPS細胞の元となる体細胞は、CD8陽性T細胞が輸血される対象から単離されることが好ましい。

[0017] 多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程

本発明において、造血前駆細胞（Hematopoietic Progenitor Cells (HPC)）とは、リンパ球、好酸球、好中球、好塩基球、赤血球、巨核球等の血球系細胞に分化可能な細胞である、本発明において、造血前駆細胞と造血幹細胞

は、区別されるものではなく、特に断りがなければ同一の細胞を示す。造血幹細胞／前駆細胞は、例えば、表面抗原であるCD34および/またはCD43が陽性であることによって認識できる。

- [0018] 本発明において、造血前駆細胞は、ビタミンC類を添加した培養液中で多能性幹細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。
- [0019] 本発明において、ビタミンC類とは、L-アスコルビン酸およびその誘導体を意味し、L-アスコルビン酸誘導体とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなるものを意味する。L-アスコルビン酸の誘導体として、リン酸ビタミンC、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコビル、ステアリン酸アスコビルおよびアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が例示される。好ましくは、リン酸ビタミンCであり、例えば、リン酸-L-アスコルビン酸Naまたはリン酸-L-アスコルビン酸Mgなどのリン酸-L-アスコルビン酸塩が挙げられる。
- [0020] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へビタミンC類を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが含まれる。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生素質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。
- [0021] 本発明において好ましい基礎培地は、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含むI

MDM培地である。

- [0022] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いる培養液は、BMP4 (Bone morphogenic protein 4)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、SCF (stem cell factor)およびFLT-3L (Flt3 Ligand)から成る群より選択されるサイトカインがさらに添加されていてもよい。より好ましくは、VEGF、SCFおよびFLT-3Lを添加された培養液である。
- [0023] 本発明において、ビタミンC類は、培養期間中、4日毎、3日毎、2日毎、または1日毎に、別途添加（補充）することが好ましく、より好ましくは1日毎に添加される。当該ビタミンC類は、培養液において、5ng/mlから500ng/mlに相当する量を添加する。好ましくは、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、または500ng/mlに相当する量である。
- [0024] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いるBMP4の培養液中における濃度は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、または100 ng/mlである。好ましくは、20 ng/mlまたは40 ng/mlである。
- [0025] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いるVEGFの培養液中における濃度は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、または100 ng/mlである。好ましくは、20 ng/mlである。
- [0026] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いるSCFの培養液中における濃度は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、または100 ng/mlである。好ましくは、30 ng/mlである。
- [0027] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いるFLT-3Lの培養液中における濃度は、1 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/mlである。好ましくは、10 ng/mlである。

- [0028] 本発明の造血前駆細胞の製造において、多能性幹細胞は、接着培養または浮遊培養であってもよく、接着培養の場合、コーティング剤をコーティングした培養容器を用いて行ってもよく、また他の細胞と共培養してもよい。共培養する他の細胞として、C3H10T1/2 (Takayama N., et al. J Exp Med. 281 7-2830, 2010) 、異種由来のストローマ細胞 (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77.) が例示される。コーティング剤としては、マトリゲル (Niwa A, et al. PLoS One. 6(7):e22261, 2011) が例示される。浮遊培養では、Chadwick et al. Blood 2003, 102: 906-15、Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62、およびSaeki et al. Stem Cells 2009, 27: 59-67に記載の方法が例示される。
- [0029] 本発明では、造血前駆細胞は、多能性幹細胞を培養することで得られるネット様構造物 (ES-sac又はiPS-sacとも称する) から調製することもできる。ここで、「ネット様構造物」とは、多能性幹細胞由来の立体的な囊状（内部に空間を伴うもの）構造体で、内皮細胞集団などで形成され、内部に造血前駆細胞を含む構造体である。
- [0030] 本発明において、造血前駆細胞を製造するための培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば造血前駆細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも6日間以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上であり、好ましくは14日である。培養期間が長いことについては、造血前駆細胞の製造においては問題とされない。また、低酸素条件で培養してもよく、本発明において低酸素条件とは、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%またはそれら以下の酸素濃度が例示される。
- [0031] 本発明の造血前駆細胞を製造するための培養は上記の条件を適宜組み合わせて行うことができる。組み合わせとして、(i) 多能性幹細胞をビタミンC類を添加した基礎培地内で、C3H10T1/2上において低酸素条件下にて培養する

工程、および(ii) VEGF、SCFおよびFLT-3Lを(1)の培養液へさらに添加し、通常の酸素条件下で培養する工程が例示される。当該工程(i)を行う期間は、少なくとも6日間以上あり、好ましくは、7日以上あり、より好ましくは、7日である。当該工程(ii)を行う期間は、少なくとも6日間以上あり、好ましくは、7日以上あり、より好ましくは、7日である。

[0032] 造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程

本発明において、CD4CD8両陽性T細胞とは、T細胞のうち、表面抗原のCD4およびCD8が共に陽性である細胞(CD8⁺CD4⁺)を意味し、T細胞は、表面抗原であるCD3およびCD45が陽性であることによって認識することができることから、CD4CD8両陽性T細胞は、CD4、CD8、CD3およびCD45が陽性である細胞として同定することができる。CD4CD8両陽性T細胞は、誘導によってCD4陽性細胞またはCD8陽性細胞へと分化させることができる。

[0033] 本発明において、CD4CD8両陽性T細胞は、ビタミンC類を添加した培養液中で造血前駆細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0034] 本発明においてCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へビタミンC類を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが含まれる。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。

[0035] 本発明のCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いる好ましい基礎培地は、血清、ト

ランスフェリン、セリン、およびL-グルタミンを含む α MEM培地である。当該基礎培地へ添加するビタミンC類は、上述した造血前駆細胞の誘導の場合と同様である。

- [0036] 本発明のCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いる培養液は、FLT-3LおよびIL-7から成る群より選択されるサイトカインをさらに培養液に添加してもよい。より好ましくは、FLT-3LおよびIL-7を添加された培養液である。
- [0037] 本発明においてCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いるIL-7の培養液中における濃度は、1 ng/mlから50 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、または50 ng/mlである。好ましくは、5 ng/mlである。
- [0038] 本発明においてCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いるFLT-3Lは上述と同じ条件で用いることができる。
- [0039] 本発明のCD4CD8両陽性T細胞の製造において、造血前駆細胞を接着培養または浮遊培養してもよく、接着培養の場合、培養容器をコーティングして用いてもよく、またフィーダー細胞等と共に培養してもよい。共培養するフィーダー細胞として、骨髓間質細胞株OP9細胞（理研BioResource Centerより入手可能）が例示される。当該OP9細胞は、好ましくは、DLL1を恒常に発現するOP-DL1細胞であってもよい（Holmes R1 and Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)）。本発明において、フィーダー細胞としてOP9細胞を用いる場合、別途用意したDLL1またはDLL1とFc等の融合タンパク質を適宜培養液に添加することによっても行い得る。本発明において、DLL1には、NCB Iのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM#005618、マウスの場合、NM#007865に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらと高い配列同一性（例えば90%以上）を有し、同等の機能を有する天然に存在する変異体が含まれる。CD4CD8両陽性T細胞を製造する際にフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞を適宜交換して培養を行うことが好ましい。フィーダー細胞の交換は、予め播種したフィ

ーダー細胞上へ培養中の対象細胞を移すことによって行い得る。当該交換は、5日毎、4日毎、3日毎、または2日毎にて行い得る。

[0040] 本発明において、CD4CD8両陽性T細胞を製造するために造血前駆細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であればCD4CD8両陽性T細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、22日以上、23日以上であり、好ましくは23日である。

[0041] 本発明において、得られたCD4CD8両陽性T細胞は、単離して用いてもよく、他の細胞種が含有される細胞集団としてもよい。単離する場合、CD4、CD8、CD3およびCD45から成るいずれか一つの指標を用いて単離することができ、当該単離の方法は、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、CD4、CD8、CD3およびCD45の抗体により標識し、フローサイトメーターを用いて単離する方法、または所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製する方法が挙げられる。

[0042] CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導する工程

本発明において、CD8陽性T細胞とは、T細胞のうち、表面抗原のCD8が陽性である細胞 (CD8⁺CD4⁻) を意味し、細胞傷害性T細胞とも呼ばれる。T細胞は、表面抗原であるCD3およびCD45が陽性であることによって認識することができるところから、CD8陽性T細胞は、CD8、CD3およびCD45が陽性であり、CD4が陰性である細胞として同定することができる。

[0043] 本発明において、CD8陽性T細胞は、副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中でCD4CD8両陽性T細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0044] 本発明において用いる副腎皮質ホルモン剤は、糖質コルチコイドあるいはその誘導体であり、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、デキ

サメタゾン、ベタメタゾン、プロピオン酸ベクロメタゾンが例示される。好ましくは、デキサメタゾンである。

- [0045] 副腎皮質ホルモン剤が、デキサメタゾンである場合、培養液中におけるその濃度は、1nMから100nMであり、例えば、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nMまたは100nMである。好ましくは、10nMである。
- [0046] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へ副腎皮質ホルモン剤を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが含まれる。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。
- [0047] 本発明において好ましい基礎培地は、血清、トランスフェリン、セリン、L-グルタミン、アスコルビン酸を含む α MEM培地である。
- [0048] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いる培養液は、CD3抗体、ビタミンC類、サイトカインをさらに含有することが好ましい。当該サイトカインは、IL-2およびIL-7等が例示される。CD8陽性T細胞の製造に用いるより好ましいサイトカインは、IL-2およびIL-7の組み合わせである。
- [0049] 本発明において、CD3抗体とは、CD3を特異的に認識する抗体であれば特に限定されないが、例えば、OKT3クローニングから産生される抗体が挙げられる。CD3抗体の培養液中における濃度は、10ng/mlから1000ng/mlであり、例えば、1

0 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/mlまたは1000 ng/mlである。好ましくは、500 ng/mlである。

[0050] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いるビタミンC類は上述と同じ条件で用いることができる。

[0051] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いるIL-2の培養液中における濃度は、10 U/mlから1000 U/mlであり、例えば、10 U/ml、20 U/ml、30 U/ml、40 U/ml、50 U/ml、60 U/ml、70 U/ml、80 U/ml、90 U/ml、100 U/ml、500 U/mlまたは1000 U/mlである。好ましくは、100 U/mlである。

[0052] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いるIL-7の培養液中における濃度は、1ng/mlから100ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/mlまたは100 ng/mlである。好ましくは、10 ng/mlである。

[0053] 本発明において、CD8陽性T細胞を製造するためにCD4CD8両陽性T細胞を培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であればCD8陽性T細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上であり、好ましくは3日である。

[0054] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

実施例 1

[0055] 細胞

iPS細胞(TKT3v 1-7株)は、Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1): 114-126, 2013に記載の方法を用いて、告知後に同意を得て単離されたヒトCD3陽性T細胞より樹立した。

C3H10T1/2細胞およびOP9-DL1細胞は、理化学研究所・理研 BioResource Ce

nter より入手して用いた。

[0056] CD4CD8両陽性細胞の誘導

10cm dishにおいてコンフルエントなC3H10T1/2細胞上にTKT3v 1-7株の小塊を播種し (Day0) 、EB培地 (15%ウシ胎児血清 (FBS) 、10μg/mL ヒトインスリン、5.5μg/mL ヒトトランスフェリン、5ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、2mM L-グルタミンと、0.45mM α-モノチオグリセロール、および50μg/mL アスコルビン酸を添加したIMDM) 中で、低酸素条件下(5% O₂)にて7日間培養した (Day7) 。

[0057] 続いて、20ng/mL VEGF、30ng/mL SCF及び10ng/mL FLT-3L (Peprotech社製) を添加し、常圧酸素条件下にて7日間培養した (Day14) 。

[0058] 得られたネット様構造物 (iPS-SACともいう) に含まれている造血細胞 (CD34⁺造血幹／前駆細胞) を回収し、OP9-DL1細胞上に播種した。10ng/mL FLT-3L 、および5ng/mL IL-7を添加したOP9培地 (15% FBS、2mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、5.5μg/mL ヒトトランスフェリンおよび5ng/mL 亜セレン酸ナトリウムを添加したαMEM) 中で、常圧酸素条件下にて23日間培養した (Day37) 。細胞は、3-4日毎に新たなOP9-DL1細胞上へ播種した。

[0059] Day0からDay37の培養期間中、L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium saltを最終濃度50ng/mlになるよう毎日添加した。

[0060] Day37にて、CD3(+) CD45(+) CD4(+) CD8(+) 分画細胞をFACSを用いて単離し、CD4CD8両陽性 (Double positive) 細胞 (DP細胞という) を得た (図1) 。

[0061] CD4CD8両陽性細胞から分化誘導

上記の方法で得られたDP細胞を24wellプレートに播種し、500ng/ml抗CD3抗体 (OKT3) 、10nM Dexamethasone(デキサートR Fuji Pharma)、15% FBS、2mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、5.5μg/mL ヒトトランスフェリン、5ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、50ng/ml L-Ascorbic acid 2-phosphate、Non essential Amino Acid、100U/ml IL-2、10

ng/ml IL-7を添加した α MEM中で、3日間培養した。得られた細胞をFACSにて調べたところ、CD3(+) CD45(+) CD4(-) CD8(+) 分画細胞であることが確認された（図2）。

実施例 2

[0062] 細胞

iPS細胞(GPC3株)は、Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013に記載の方法を用いて、告知後に同意を得て単離されたヒトCD3陽性T細胞より樹立した。用いたヒトCD3陽性T細胞はCD8陽性のキラーT細胞であり、肝細胞がんでの発現が知られるGPC3抗原に特異的なT細胞受容体を持つ。

[0063] フィーダー細胞上でのCD4CD8両陽性細胞を経たCD8陽性細胞の誘導

C3H10T1/2細胞上にGPC3株の小塊を播種し、実施例1と同様の方法にて培養し、CD4CD8両陽性を得た。さらに、得られたCD4CD8両陽性を実施例1と同様の方法にて培養し、CD8陽性細胞を誘導した。

[0064] CD8陽性細胞の評価

GPC3株から上述の方法で誘導した細胞群をフローサイトメーターにてCD3、CD45、CD4、CD8 α 、CD8 β 、CD5およびCD7の発現を確認したところ、CD8 α β両陽性のCD8陽性細胞が誘導されることが確認された（図3）。

[0065] さらに、得られた細胞にGPC3 Dextramer (Immudex) を加え4°C 30分反応させた後、CD3、CD45、CD4、CD8 α 抗体を加えフローサイトメトリーにて解析したところ、得られたCD8陽性細胞は、MHC-GPC3ペプチドの複合体であるDextramerを特異的に認識できることが確認された（図4および5）。

実施例 3

[0066] 細胞

iPS細胞(4GAD 1-8株)は、Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013に記載の方法を用いて、告知後に同意を得て単離されたヒトCD3陽性T細胞より樹立した。用いたヒトCD3陽性T細胞はCD4陽性のヘルパーT細胞であり、脾臓での発現が知られるGAD65抗原に特異的なT細胞受容体を持つ。

[0067] フィーダー細胞を用いないCD4CD8両陽性細胞を経たCD8陽性細胞の誘導

10cm dishにTKT3v 1-7株または4GAD 1-8株の小塊を播種し (Day0) 、 EB培地 (15%ウシ胎児血清 (FBS) 、 10 μ g/mL ヒトイインスリン、 5.5 μ g/mL ヒトトランスフェリン、 5ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、 2mM L-グルタミン、 0.45mM α -モノチオグリセロール、 および50 μ g/mL アスコルビン酸を添加したIMDM) 中で、 低酸素条件下(5% O_2)にて7日間培養した (Day7) 。

- [0068] 続いて、 20ng/mL VEGF、 30ng/mL SCF及び10ng/mL FLT-3L (Peprotech社製) を添加し、 常圧酸素条件下にて7日間培養した (Day14) 。
- [0069] さらに、 10ng/mL FLT-3L、 および5ng/mL IL-7を添加したOP9培地 (15% FBS、 2mM L-グルタミン、 100U/ml ペニシリン、 100ng/ml ストレプトマイシン、 5.5 μ g/mL ヒトトランスフェリンおよび5ng/mL 亜セレン酸ナトリウム 添加した α MEM) 中で、 常圧酸素条件下にて23日間培養した (Day37) 。
- [0070] Day0からDay37の培養期間中、 L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium saltを最終濃度50ng/mlになるよう毎日添加した。
- [0071] Day37にて、 CD3(+) CD45(+) CD4(+) CD8(+) 分画細胞をFACSを用いて単離し、 CD4CD8両陽性 (Double positive) 細胞 (DP細胞という) を得た (図1) 。
- [0072] 得られたDP細胞を24wellプレートに播種し、 500ng/ml抗CD3抗体 (OKT3) 、 10nM Dexamethasone(デキサートR Fuji Pharma)、 15% FBS、 2mM L-グルタミン、 100U/ml ペニシリン、 100ng/ml ストレプトマイシン、 5.5 μ g/mL ヒトトランスフェリン、 5ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、 50ng/ml L-Ascorbic acid 2-phosphate、 Non essential Amino Acid、 100U/ml IL-2、 10ng/ml IL-7を添加した α MEM中で、 3日間培養した。

[0073] CD8陽性細胞の評価

GPC3株から上述の方法で誘導した細胞群をフローサイトメーターにてCD3、 CD45、 CD4、 CD8 α 、 CD8 β 、 CD5およびCD7の発現を確認したところ、 CD8 α β 両陽性のCD8陽性細胞が誘導されることが確認された (図6) 。

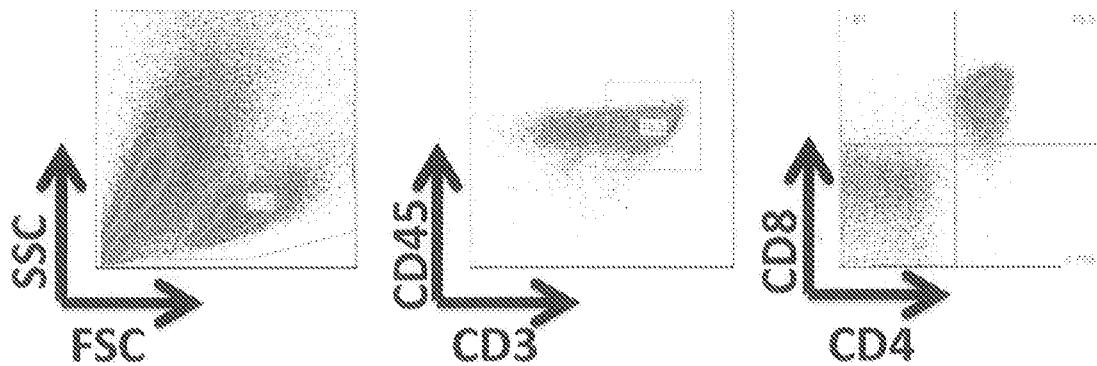
請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、多能性幹細胞からCD8陽性T細胞を誘導する方法；
(1) 多能性幹細胞を、ビタミンC類を添加した培養液中で培養し、造血前駆細胞を誘導する工程、
(2) 前記工程(1)で得られた細胞を、ビタミンC類を添加した培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程、および
(3) 前記工程(2)で得られた細胞を、副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中で培養し、CD8陽性T細胞を誘導する工程。
- [請求項2] 前記工程(3)において、培養液はさらにビタミンC類を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 各工程において、ビタミンC類は1日毎に培養液へ補充される、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程(1)において、多能性幹細胞はC3H10T1/2細胞上で培養される、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程(1)が、5%以下の低酸素条件で行われる、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 前記工程(1)において、培養液はさらにvascular endothelial growth factor (VEGF)、Stem cell factor (SCF) およびFlt3 Ligand (FLT-3L) を含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記工程(2)において、工程(1)で得られた細胞はOP9-DL1細胞上で培養される、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記工程(2)において、培養液はさらにFLT-3L、およびinterleukin (IL)-7を含む、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中でCD4CD8両陽性T細胞を培養する工程を含む、CD8陽性T細胞を誘導する方法。
- [請求項11] 前記副腎皮質ホルモン剤がデキサメタゾンである、請求項10に記載

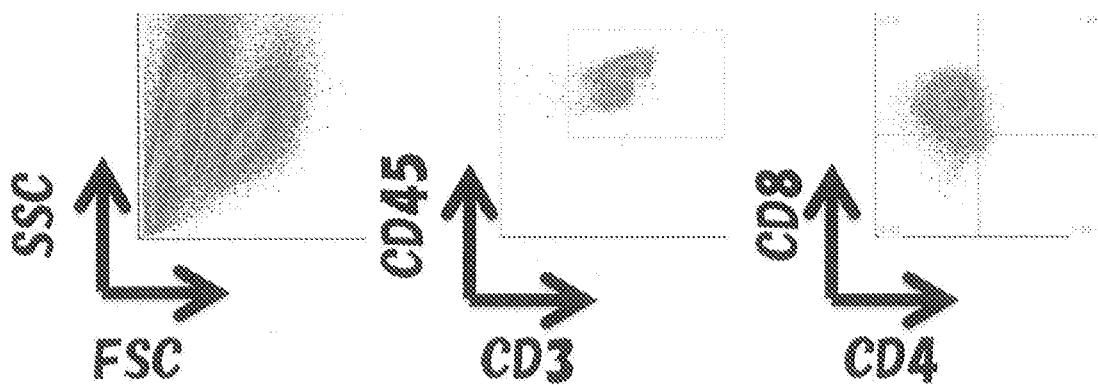
の方法。

- [請求項12] 前記培養液は、さらに抗CD3抗体、ビタミンC類、IL-2およびIL-7を含む、請求項10または11に記載の方法。
- [請求項13] 前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] ビタミンC類を添加した培養液中で多能性幹細胞を培養する工程を含む、造血前駆細胞を誘導する方法。
- [請求項15] 前記ビタミンC類が、リン酸ビタミンCである、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] ビタミンC類は1日毎に培養液へ補充される、請求項14または15に記載の方法。
- [請求項17] 前記多能性幹細胞を培養する工程が、C3H10T1/2細胞上で多能性幹細胞を培養する工程である、請求項14から16のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項18] 前記多能性幹細胞を培養する工程が、5%以下の低酸素条件で行われる、請求項14から17のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項19] 前記培養液は、さらにVEGF、SCFおよびFLT-3Lを含む、請求項14から18のいずれか1項に記載の方法。

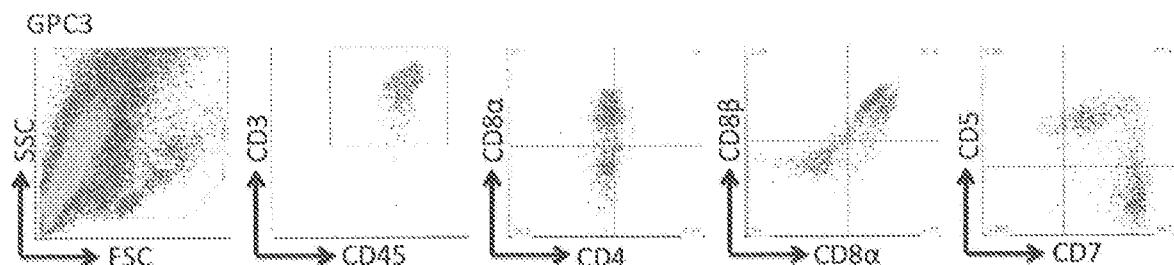
[図1]



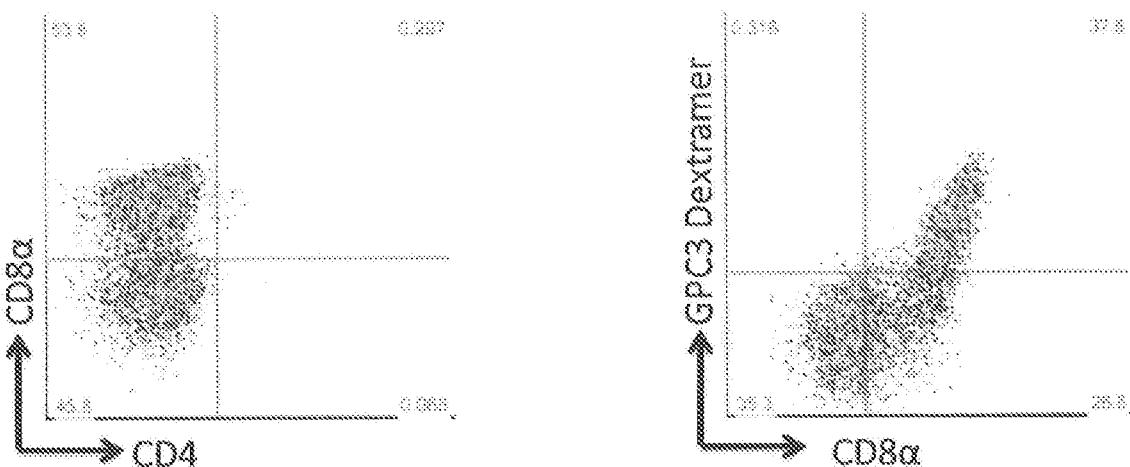
[図2]



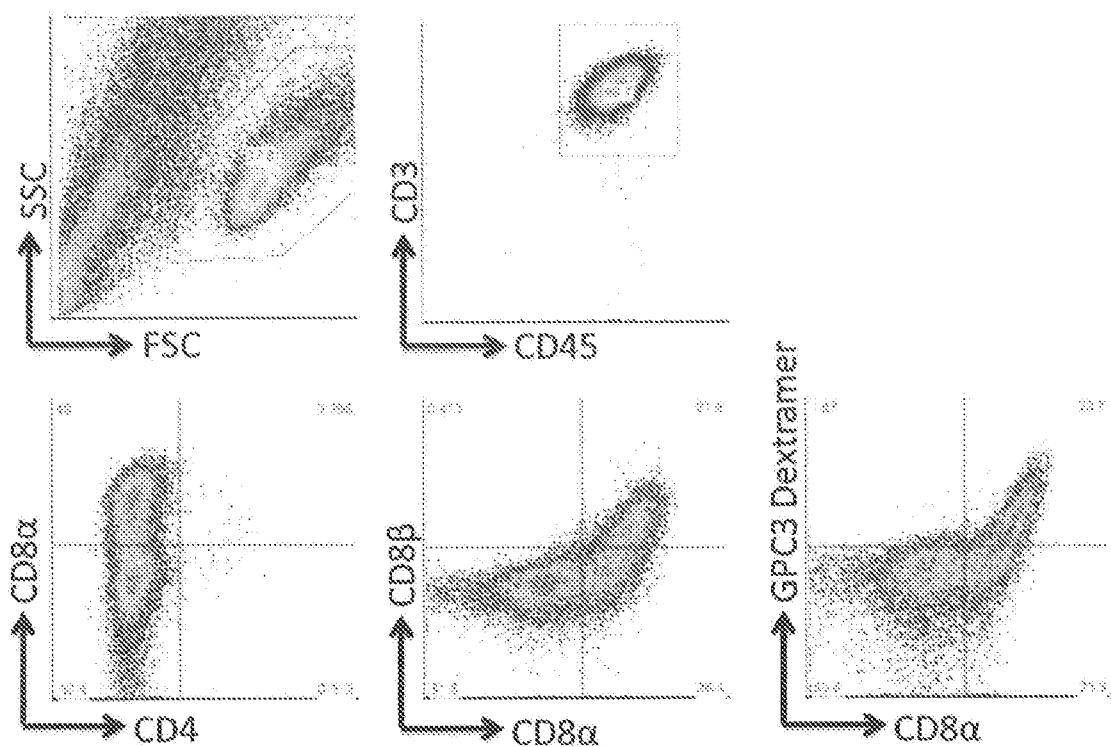
[図3]



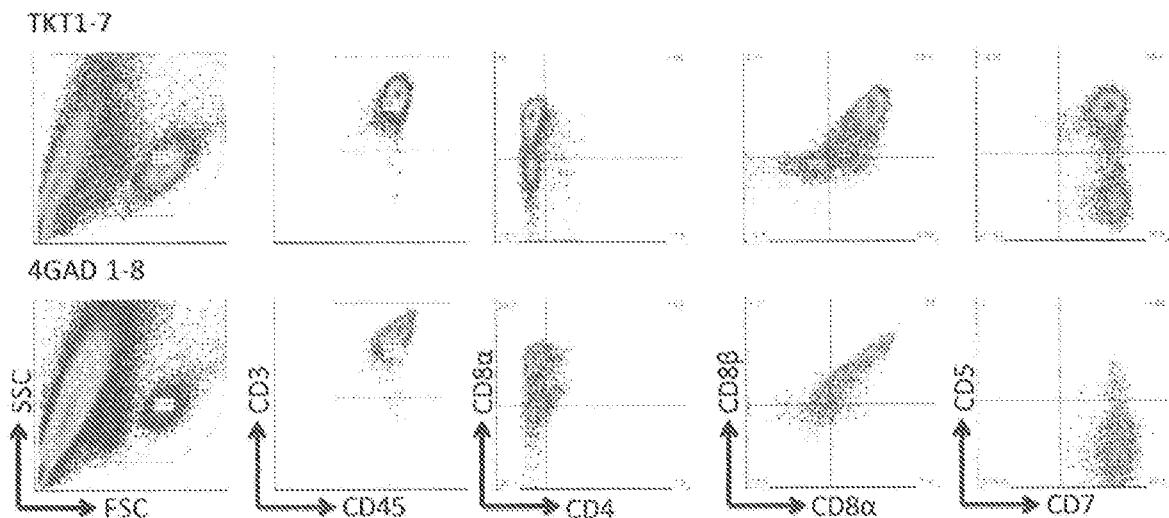
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/081959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0783(2010.01)i,
C12N5/0789(2010.01)i, C12N5/10(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)

C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0783, C12N5/0789, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/A | WO 2013/176197 A1 (The University of Tokyo), 28 November 2013 (28.11.2013), entire text; particularly, paragraphs [0048] to [0050], [0128] to [0130]; examples & US 2013/0078226 A1 entire text; particularly, paragraphs [0130] to [0132]; examples & EP 2853590 A1 | 14-19/1-13 |
| A | HUIJSKENS MJ. et al., Technical advance: ascorbic acid induces development of double- positive T cells from human hematopoietic stem cells in the absence of stromal cells., J Leukoc Biol., 2014.08.25.Epub, 96(6), p.1165-75 | 1-13 |

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

27 November 2015 (27.11.15)

Date of mailing of the international search report

08 December 2015 (08.12.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/081959

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | BERKI T. et al., Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations., Int Immunol., 2002.05, 14(5), p.463-9 | 1-13 |
| A | SCREPANTI I. et al., Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor., J Immunol., 1989.05.15, 142(10), p.3378-83 | 1-13 |

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0789(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0783, C12N5/0789, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2015年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2015年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2015年 |

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|-----------------|---|----------------|
| X/A | WO 2013/176197 A1 (国立大学法人 東京大学) 2013.11.28, 全文、特に [0048] - [0050], [0128] - [0130]、実施例等 & US 2013/0078226 A1, 全文, 特に[0130]-[0132], EXAMPLES & EP 2853590 A1 | 14-19/ 1-13 |
| A | HUIJSKENS MJ. et al., Technical advance: ascorbic acid induces development of double-positive T cells from human hematopoietic stem cells in the absence of stromal cells., J Leukoc Biol., 2014.08.25. Epub, 96(6), p. 1165-75 | 1-13 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 2015

国際調査報告の発送日

08. 12. 2015

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

山本 匠子

4B

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | BERKI T. et al., Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations., Int Immunol., 2002. 05, 14(5), p. 463-9 | 1 - 1 3 |
| A | SCREPANTI I. et al., Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor., J Immunol., 1989. 05. 15, 142(10), p. 3378-83 | 1 - 1 3 |