

# 三次元自動灌流培養法による 遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞 (HLCN061) の大量製造方法の開発

○倉知建始、福田隆之、陳宣儒、佐々木薫、清水翔太、稲森雅和  
小山直子、伊藤実和子、林里依、香取良介、立田俊也、下地北斗  
芦田侑加子、木村寛子、山崎洋輔、竹野友理子、西垣扶佐子  
山田雅司、木村博信、田村康一  
株式会社ヘリオス・神戸研究所

## [背景]

近年がん免疫療法においてNK細胞療法は、高い抗腫瘍性を持ちながら、副作用のリスクが低いことから有望な治療方法として注目を集めている。そのため、iPS細胞を用いたNK細胞製造法も報告され始めている。我々は、固形がんに対する抗腫瘍効果を増強するために遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞 (HLCN061) を開発している。今回、より安価なOff-the-shelf免疫細胞治療法を目指し、スケールアップ可能な三次元灌流培養法に着目し、従来技術より効率的なiPS細胞由来NK細胞作製技術を確立した。

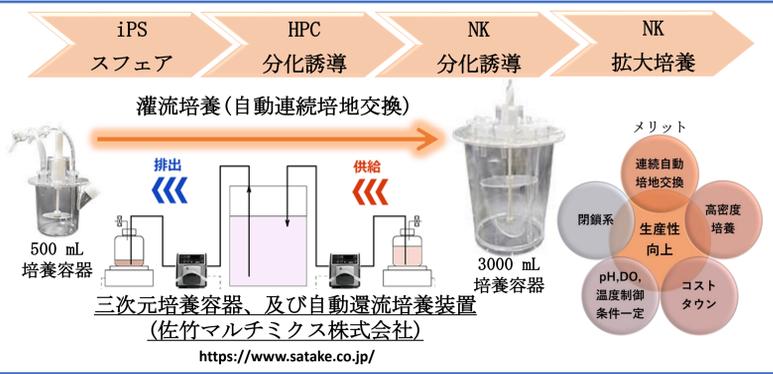


図1. 三次元自動灌流培養装置イメージ

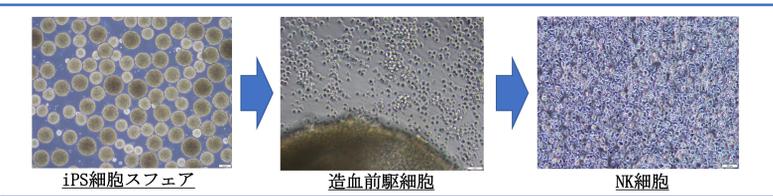


図2. 遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞 (HLCN061)



図4. 各工程に必要な成長因子、サイトカイン、低分子化合物概要  
各工程に必要な成長因子、サイトカイン、低分子化合物を検討の上決定した。灌流培養法では、それぞれの工程で必要な成長因子、サイトカイン、低分子化合物を添加し調製した各培地を、自動灌流培養装置で連続的に供給した。

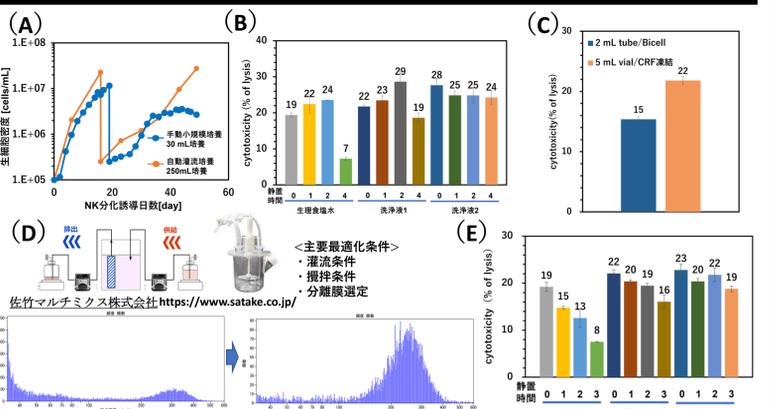


図5. 各種工程の最適化検討

各種工程において、事前に検討を実施。(A)自動灌流培養の有用性評価、(B)細胞洗浄液の選定、(C)プログラムフリーザーの有用性評価、(D) iPS細胞スフェア形成工程の最適化、(E)凍結保存液の組成決定。(A), (B), (C)は遺伝子導入前のiPS細胞で評価、及び最適化を実施し、(D) (E)は遺伝子導入iPS細胞を用いて最適化を実施した。(A)の生細胞密度はNucleoCounter NC-200™ (ChemoMetec) で測定した。(D)スフェアの粒度分布はMultisizer 4e (Beckman Coulter) を用い測定した。(B) (C) (E)の細胞傷害活性評価はヒト肺基底上皮腺癌A549細胞と共培養を実施し、4時間後にLDH assayを用いて評価した。

## [結果]

三次元灌流培養法により得られたHLCN061は、CD56、グランザイムB、及びパーフォリンを高く発現しており (図7)、高純度のNK細胞をiPS細胞から作製できる方法を開発した。最大生細胞密度 $2.0 \times 10^7$  cells/mL以上の濃度を達成し (図6)、3000 mL培養容器1基の培養で約 $5.0 \times 10^{10}$  cells/batchのHLCN061を得ることができた (表1)。また、ヒト肺基底上皮腺癌A549細胞に対する細胞傷害活性を確認した結果、凍結解凍したHLCN061は、ヒト末梢血由来NK細胞 (primary NK) と同等もしくは高い細胞傷害活性を示し、且つ、Cetuximabを添加することで細胞傷害活性の上昇を示した (図8-A)。また、HLCN061は、A549細胞に対し用量依存的な細胞傷害活性を示すことが確認できた (図8-B)。

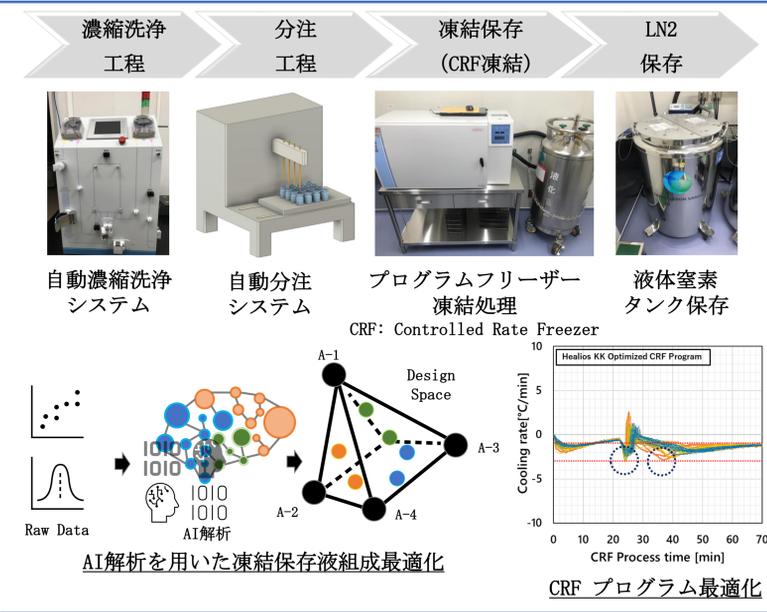


図3. ダウンストリームプロセス開発

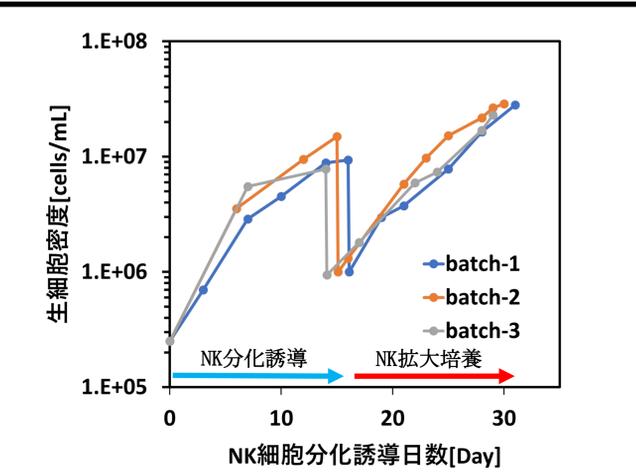


図6. 3000 mL培養容器を用いた拡大培養細胞密度推移

治験薬製造を想定した3000 mL培養容器を用いて、自動灌流培養法を用いてNK細胞の拡大培養を実施した。検討は3回実施し、生細胞密度はNucleoCounter NC-202™ (ChemoMetec) で測定した。

表1. 3000 mL培養容器を用いたHLCN061拡大培養収量

	生細胞密度[cells/mL]	総生細胞数[cells]
batch-1	$2.81 \times 10^7$	$5.62 \times 10^{10}$
batch-2	$2.87 \times 10^7$	$5.74 \times 10^{10}$
batch-3	$2.29 \times 10^7$	$4.58 \times 10^{10}$
Ave	$2.66 \times 10^7$	$5.31 \times 10^{10}$

培養液量2000 mL/容器でNK細胞の拡大培養を実施した結果。回収時の生細胞密度から総生細胞数 (収量) を算出した。

## [結論]

我々は、三次元培養法と自動灌流培養法を組み合わせることにより、細胞傷害活性を有するNK細胞を遺伝子導入iPS細胞から効率的にかつ大量に製造する方法を確立した。また、本方法で作製したiPS細胞由来NK細胞は、凍結保存が可能であり、解凍直後も良好な細胞傷害活性を示すことから、より安価なoff-the-shelf免疫細胞療法の手段として期待される。現在、神戸医療イノベーションセンター (KCMI) において、自動灌流培養装置を導入し (図9)、治験製品製造準備を進めている。

## [方法]

事前に各種工程条件を決定した (図5) 後、遺伝子導入iPS細胞を浮遊細胞用の三次元培養容器に播種し、自動灌流培養装置 (図1) で、iPS細胞スフェロイドを形成させた。得られたiPS細胞スフェロイドを、三次元培養容器に播種し、各種成長因子及びサイトカイン存在下 (図4) で自動灌流培養装置による分化誘導を実施し、遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞 (HLCN061) を作製した (図2)。その後、三次元培養容器からHLCN061を回収し、調製された凍結保存液及びプログラムフリーザーを用いて、HLCN061を凍結保存した (図3)。凍結保存した細胞は解凍後、各種アッセイ系でその機能を確認した。

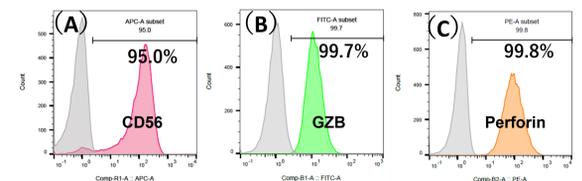


図7. HLCN061 NKマーカー評価

フローサイトメトリーにより、NK細胞表面マーカーCD56 (A)、細胞傷害因子グランザイムB (GZB) (B)、及びパーフォリン (Perforin) (C) の発現を確認した。測定はMACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec) を用いた。

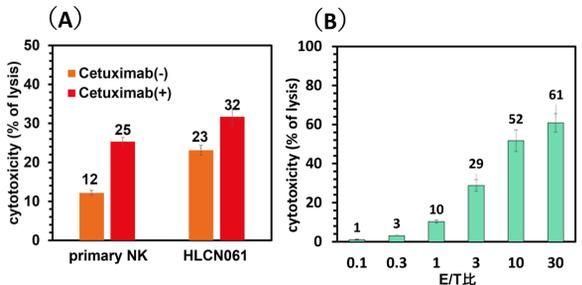


図8. A549に対する傷害活性評価

(A) HLCN061とA549細胞を共培養し、4時間後にLDH assayを用いて細胞傷害活性を測定した。比較対象にヒト末梢血由来NK細胞 (primary NK) を使用し、Cetuximab (抗EGFR抗体) の有無それぞれの条件で測定した (E/T=3)。(B) 更に、用量反応性を確認するため、HLCN061とA549細胞を共培養し、4時間後にLDH assayを用いて、E/T比 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30) それぞれの細胞傷害活性を測定した。



図9. 導入した自動灌流培養装置

演題名: 三次元自動灌流培養法による  
遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞 (HLCN061)  
の大量製造方法の開発

施設名: 株式会社ヘリオス・神戸研究所  
氏名: 倉知 建始

筆頭演者は株式会社ヘリオスの社員です。