(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
2021年6月10日(10.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/112055 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/22 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/044586

(22) 国際出願日： 2020年12月1日(01.12.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-217704 2019年12月2日(02.12.2019) JP

(71) 出願人: アステラス製薬株式会社(**ASTELLAS PHARMA INC.**) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(**RIKEN**) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 秋葉 彩佳(**AKIBA Ayaka**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 奥平 達也(**OKUDAIRA Tatsuya**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 増原 泰英(**MASUHARA Yasuhide**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 大隅 恵介(**OHSUMI Keisuke**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 藤井 眞一郎(**FUJII Shinichiro**); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外 (**OHNO Seiji** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** NY-ESO-1-CONTAINING ARTIFICIAL ADJUVANT VECTOR CELL USED FOR TREATING CANCER

(54) 発明の名称： がんの処置に用いるＮＹ－ＥＳＯ－１含有人工アジュバントベクター細胞

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing an aAVC-NY-ESO-1 cell, which stably expresses NY-ESO-1 and is clinically applicable, in order to use the aAVC-NY-ESO-1 cell to treat a patient with NY-ESO-1 expressing cancer. The present invention provides a human-derived cell including, for example, a polynucleotide encoding CD1d, and a polynucleotide encoding NY-ESO-1 which is operably linked to an inducible promoter or a fragment thereof.

(57) 要約：本発明の課題は、ＮＹ－ＥＳＯ－１発現がんを有する患者の処置にａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を用いるために、ＮＹ－ＥＳＯ－１を安定的に発現し、臨床応用可能なａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を提供することにある。本発明は、例えば、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、ヒト由来細胞を提供する。

WO 2021/112055 A1

明　細　書

発明の名称 ：

がんの処置に用いるＮＹ－ＥＳＯ－１含有人工アジュバントベクター細胞

技術分野

[0001] 本発明は、がんの処置に用いるＮＹ－ＥＳＯ－１含有人工アジュバントベクター細胞（ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ａｄｊｕｖａｎｔ　ｖｅｃｔｏｒ　ｃｅｌｌ：ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞）に関する。

背景技術

[0002] ニューヨーク食道扁平上皮がん１（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ　ｓｑｕａｍｏｕｓ　ｃｅｌｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ　１、ＮＹ－ＥＳＯ－１）はがん／精巣抗原の一つであり、前立腺がん、膀胱がん等の広範囲な腫瘍で発現が認められる。一方で成人の正常細胞においては精巣を除き発現がみられないため、がん治療の好適な標的分子と考えられており、ワクチンをはじめとする薬剤の開発がすすめられている（非特許文献１～３）。

[0003] ＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク質とグルコピラノシル脂質　Ａ（ｇｌｕｃｏｐｙｒａｎｏｓｙｌ　ｌｉｐｉｄ　Ａ、ＧＬＡ）アジュバントを混合したワクチンであるＧ３０５は、ＮＹ－ＥＳＯ－１発現がんを有する患者を対象に臨床試験が実施されており、ワクチン投与後にＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞の誘導が確認されている（非特許文献４）。

[0004] 藤井らは、ヒト由来細胞に外来的にＣＤ１ｄ及びがん抗原を発現させ、さらに該細胞にα－ガラクトシルセラミド（α－Ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ、α－ＧａｌＣｅｒ）をパルスした人工アジュバントベクター細胞（ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ａｄｊｕｖａｎｔ　ｖｅｃｔｏｒ　ｃｅｌｌ：ａＡＶＣ）を作製した（特許文献１～３）。当該ａＡＶＣは、ＣＤ１ｄ／α－ＧａｌＣｅｒ複合体を介してナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞を活性化し、活性化されたＮＫＴ細胞はインターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）等のサイトカインを産生してナチュラルキラー（ＮＫ）細胞等を活性化する。マウス

モデルにおいて、ａＡＶＣ投与によるＮＫ細胞依存的な抗腫瘍効果が示されている（特許文献１～３）。また、マウスに投与されたａＡＶＣは生体内において活性化されたＮＫＴ細胞により速やかに殺傷され、該ａＡＶＣの断片は樹状細胞に取り込まれる。当該ａＡＶＣ断片を取り込んだ樹状細胞は、該細胞表面上の主要組織適合遺伝子複合体（ｍａｊｏｒ　ｈｉｓｔｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ　ｃｏｍｐｌｅｘ、ＭＨＣ）に取り込んだがん抗原の断片を抗原提示し、がん抗原特異的なＴ細胞を誘導する。マウスモデルにおいて、ａＡＶＣ投与によるがん抗原特異的Ｔ細胞の誘導を介した抗腫瘍効果が示されている（特許文献１～３、非特許文献５及び６）。このように、ａＡＶＣはＮＫＴ細胞活性化を介したＮＫ細胞活性化による自然免疫活性化及びがん抗原特異的Ｔ細胞誘導による獲得免疫誘導の二つの免疫機構を強力に誘導し得ることが示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開番号２００７／０９７３７０

特許文献2：国際公開番号２０１０／０６１９３０

特許文献3：国際公開番号２０１３／０１８７７８

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｔｈｏｍａｓ　Ｒ．　ｅｔ　ａｌ．，「フロンティアーズ　イン　イムノロジー（Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）」、（スイス）、２０１８；９：９４７

非特許文献2：Ｇａｓｓｅｒ　Ｏ．　ｅｔ　ａｌ．，「キャンサー　イムノロジー、イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ）」、（ドイツ）、２０１８；６７（２）：２８５－２９８

非特許文献3：Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｐ．Ｆ．　ｅｔ　ａｌ．，「クリニカル　キャンサー　リサーチ（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）」、（米国）、２０１５；２１（５）：１０１９－１０２７

非特許文献4：Ｍａｈｉｐａｌ　Ａ．　ｅｔ　ａｌ．，「キャンサー　イムノロジー、イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ）」、（ドイツ）、２０１９；６８（７）：１２１１－１２２２

非特許文献5：Ｓｈｉｍｉｚｕ　Ｋ．　ｅｔ　ａｌ．，「キャンサー　リサーチ（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）」、（米国）、２０１３；７３（１）：６２－７３

非特許文献6：Ｓｈｉｍｉｚｕ　Ｋ．　ｅｔ　ａｌ．，「キャンサー　リサーチ（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）」、（米国）、２０１６；７６（１３）：３７５６－３７６６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007]　本発明の課題は、ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を安定的に発現するａＡＶＣを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008]　本発明者らは、がん抗原としてＮＹ－ＥＳＯ－１を発現するａＡＶＣの作製において相当の創意検討を重ねた結果、ＮＹ－ＥＳＯ－１を安定的に発現するａＡＶＣを取得することに成功した。具体的には、本発明者らは、恒常的にＮＹ－ＥＳＯ－１を発現させた場合、培養日数を経るに従い発現量及び陽性率の低下が認められるという課題を見出し、鋭意検討してその課題を解決した。詳細には、誘導型プロモーター（特に、薬剤誘導型プロモーター）にて誘導的にＮＹ－ＥＳＯ－１を発現させた細胞は、恒常的にＮＹ－ＥＳＯ－１を発現させた場合よりも高いＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量を示すことを見出し、誘導型プロモーター支配下にてＮＹ－ＥＳＯ－１を安定的に高発現させたａＡＶＣを取得することに成功した（実施例２－２）。すなわち、本発明は、がんの処置に使用し得るａＡＶＣ、該ａＡＶＣの製造方法、該ａＡＶＣを含む医薬組成物、該ａＡＶＣによるがんの処置方法等を提供する。

[0009]　すなわち、本発明は、医学上又は産業上有用な物質又は方法として以下の

発明を含んでもよい。

[0010] ［１］ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、ヒト由来細胞。

［２］ＮＹ－ＥＳＯ－１がヒトＮＹ－ＥＳＯ－１である、［１］に記載の細胞。

［３］ＣＤ１ｄがヒトＣＤ１ｄである、［１］又は［２］に記載の細胞。

［４］誘導型プロモーターが薬剤誘導型プロモーターである、［１］～［３］のいずれか一項に記載の細胞。

［５］薬剤誘導型プロモーターがテトラサイクリン系誘導型プロモーターである、［４］に記載の細胞。

［６］テトラサイクリン系誘導型プロモーターがＴＲＥ３Ｇプロモーターである、［５］に記載の細胞。

［７］ヒト由来細胞が正常細胞である、［１］～［６］のいずれか一項に記載の細胞。

［８］ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に由来する細胞である、［７］に記載の細胞。

［９］ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現している、［１］～［８］のいずれか一項に記載の細胞。

［１０］ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量が10^6細胞当たり２４５ｎｇ～４５０００ｎｇである、［９］に記載の細胞。

［１１］細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している、［９］又は［１０］に記載の細胞。

［１２］ＣＤ１ｄリガンドがα－ＧａｌＣｅｒである、［１１］に記載の細胞。

［１３］［１１］又は［１２］に記載の細胞を含む医薬組成物。

［１４］がんの処置に用いるための、［１３］に記載の医薬組成物。

［１５］がんを処置する方法であって、［１１］又は［１２］に記載の細胞

を対象に投与する工程を含む、方法。

［１６］がんを処置するための、［１１］又は［１２］に記載の細胞。

［１７］がんの処置に用いる医薬組成物を製造するための、［１１］又は［１２］に記載の細胞の使用。

［１８］がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、［１］～［８］のいずれか一項に記載の細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む、方法。

［１９］細胞の表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む、［１８］に記載の方法。

［２０］がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、

ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、又は

内在的にＣＤ１ｄを発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、

を含む、方法。

［２１］前記工程で得られた細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程をさらに含む、［２０］に記載の方法。

［２２］細胞の表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む、［２１］に記載の方法。

［２３］がんを処置する方法であって、［１１］又は［１２］に記載の細胞と免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、方法。

［２４］免疫チェックポイント阻害剤がＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤、又はＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント阻害剤である、［２３］に記載の方法。

［２５］がんの処置に用いる医薬組成物を製造する方法であって、

ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含み、かつ、クローニングされたヒト由来の細胞を含む凍結物を解凍する工程、

凍結物中に含まれていた前記ヒト細胞を増殖させて、ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程、

及び、その細胞の表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程

を含む、方法。

発明の効果

[0011] 本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞及び本発明の医薬組成物は、がんの処置に使用できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1-1]図１－１はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞による抗原特異的Ｔ細胞誘導作用を、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与マウスにおけるＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞の数により示している。縦軸はＥＬＩＳＰＯＴリーダーにてカウントした際の４×１０^{5}脾臓細胞中のスポット数を示す。横軸の溶媒はＢＩＣＡＮＡＴＥを投与したコントロール群を、ａＡＶＣ－ＮＹはａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与群をそれぞれ示す。ＰＡＰ及びＮＹは、それぞれ刺激に用いたＰＡＰペプチド及びＮＹ－ＥＳＯ－１ペプチドを示す。「－」は、ペプチド添加無しを示す。個体ごとのスポット数とスポット数の平均値±平均の標準誤差を示す。

[図1-2]図１－２はＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６担癌マウス及びＢ１６－Ｆ１０担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はがん細胞接種後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示し、括弧内は計測時のマウスの匹数を示す。有意確率Ｐ値（＊＊：Ｐ＜０．０１）は、スチューデントのｔ検定により溶媒投与群とａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与群の２０日目の腫瘍

体積を比較することにより算出した。

[図1-3]図１－３はＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。有意確率Ｐ値（＊＊：Ｐ＜０．０１）は、ダネットの多重比較検定により溶媒投与群とａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与群の１０日目の腫瘍体積を比較することにより算出した。

[図2-1]図２－１～図２－４はＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール（図中のＣＭＶ）及びＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール（図中のＴｅｔ－ｏｎ）の各種指標に対する経時変化を示す。図２－１はＣＭＶ及びＴｅｔ－ｏｎの１×１０^{6}細胞あたりのＮＹ－ＥＳＯ－１発現量を示す。縦軸はＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-2]図２－２はＣＭＶ及びＴｅｔ－ｏｎのＮＹ－ＥＳＯ－１陽性率を示す。縦軸はＮＹ－ＥＳＯ－１陽性率を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-3]図２－３はＣＭＶ及びＴｅｔ－ｏｎの生存率を示す。縦軸は各プールの細胞生存率を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-4]図２－４はＣＭＶ及びＴｅｔ－ｏｎの細胞の倍加時間を示す。縦軸は倍加時間を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図3]図３はＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール（図中のＣＭＶ）とＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール（図中のＴｅｔ－ｏｎ）から単離した各種クローンにおけるＮＹ－ＥＳＯ－１発現量を示す。Ｎｏ．はクローンの番号を示し、数値は１×１０^{6}細胞あたりのＮＹ－ＥＳＯ－１発現量を示す。

[図4-1]図４－１はＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞、抗ＰＤ－１抗体及びそれらを併用した

場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示し、括弧内は計測時のマウスの匹数を示す。

[図4-2]図４－２はＮＹ－ＥＳＯ－１発現ＣＴ２６担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞、抗ＰＤ－１抗体及びそれらを併用した場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。

[図5]図５はＮＹ－ＥＳＯ－１発現ＣＴ２６担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞、抗ＣＴＬＡ－４抗体及びそれらを併用した場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はがん細胞接種後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞、抗ＣＴＬＡ－４抗体の併用群の18日目以降の例数は９とする。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に、本発明について詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書で特段に定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。

[0014] ＜人工アジュバントベクター細胞＞

本明細書において、「人工アジュバントベクター細胞」と「ａＡＶＣ」は、同義であり、相互互換的に用いられ、ＣＤ１ｄポリペプチド（以下、「ＣＤ１ｄ」とも称する）をコードするポリヌクレオチド及び１又は２以上の任意のがん抗原又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む細胞を意味する。

本明細書において、「ポリヌクレオチドを含む」とは、細胞が内在的に該ポリペプチドを有している、又は外来的な方法により該ポリヌクレオチドが導入された状態を表す。ここで「内在」又は「内在的」とは、単離された細

胞が特定の遺伝子又はポリヌクレオチドを含んでいる、又はタンパク質を発現している等の当業者により通常使用される意味で使用されうる。また、「外来性」又は「外来的」とは、人工的に作製された遺伝子又はポリヌクレオチドを遺伝子操作又は遺伝子導入等の操作により目的の細胞内に導入すること、及び目的の細胞内に人為的に導入された遺伝子又はポリヌクレオチドによりそれらがコードするタンパク質を人為的に発現させることを指す用語として相互互換的に使用される。

[0015] ＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞＞

本発明は、

ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド、及び

誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチド

を含む、ヒト由来細胞（本明細書において、「ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞」とも称する）を提供する。

[0016] １．ヒト由来細胞

本発明で使用されるヒト由来細胞は、正常細胞又はがん組織由来の細胞であり、ＣＤ１ｄを内在的に発現していてもよい。

正常細胞としては、任意のヒト組織より単離及び／又は精製された細胞、特定の細胞種由来の細胞、ヒト組織由来の株化細胞、幹細胞より分化させた細胞等のヒト由来の細胞を用いることができる。また、がん組織由来の細胞としては、患者のがん組織より単離及び／又は精製された細胞、又はヒトがん組織由来の株化細胞を用いることができる。ここで、「単離」とは、生体組織からの分離を意味する。また、「精製」とは、ヒト由来の細胞を、細胞が由来する組織に含まれるその他の成分の１以上からの分離を意味する。細胞の単離及び精製は、公知の方法により行うことができる。１つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、正常細胞である。

[0017] 任意のヒト組織より単離及び／又は精製された細胞は、例えば、胃、小腸、大腸、肺、膵臓、腎臓、肝臓、胸腺、脾臓、前立腺、卵巣、子宮、骨髄、

皮膚、筋肉、又は末梢血等の任意のヒト組織由来の細胞であってよい。１つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、非血球細胞である。

[0018] 特定の細胞種由来の細胞は、ヒト組織における特定の細胞種（例えば、上皮細胞、内皮細胞、表皮細胞、間質細胞、線維芽細胞、脂肪組織、乳腺細胞、メサンギウム細胞、膵β細胞、神経細胞、グリア細胞、外分泌上皮細胞、内分泌細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、骨芽細胞、胚細胞、又は免疫細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞等）等）由来の細胞である。

[0019] ヒト組織由来の株化細胞は、当業者により公知の方法を用いて作製することができ、又は商業的に入手することができる。当該株化細胞としては、例えば、ヒト胎児腎細胞２９３（ＨＥＫ２９３）細胞（Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．；１９７７；３６：５９－７４）、ＷＩ－３８細胞、ＳＣ－０１ＭＦＰ細胞、若しくはＭＲＣ－５細胞、又はそれら細胞に由来する細胞が挙げられる。１つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、ＨＥＫ２９３細胞に由来する細胞である。１つの実施形態において、ＨＥＫ２９３細胞に由来する細胞は、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３－Ｆ細胞である。

[0020] 幹細胞より分化させた細胞は、ヒト由来人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）又は胚性幹細胞（ＥＳ細胞）から分化させた細胞である。ｉＰＳ細胞又はＥＳ細胞の作製及び該細胞から分化させた細胞は、当業者により公知の方法を用いて作製することができる。

[0021] がん組織由来の細胞は、当業者に公知の方法により、患者のがん組織より単離及び／又は精製により取得することができる。また、当業者がＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ（登録商標））等の機関より一般的に入手可能なヒトがん組織由来の株化細胞を用いることもできる。

[0022] ２．ＮＹ－ＥＳＯ－１

本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、がん抗原として、ニューヨ

ーク食道扁平上皮がん１（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ　ｓｑｕａｍｏｕｓ　ｃｅｌｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ　１；ＮＹ－ＥＳＯ－１）又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含んでいる。ＮＹ－ＥＳＯ－１は、がん／精巣抗原１（ｃａｎｃｅｒ／ｔｅｓｔｉｓ　ａｎｔｉｇｅｎ　１；ＣＴＡＧ１）とも呼ばれるタンパク質であり、様々ながんにおいて発現が認められるが、成体の正常組織では精巣のみに発現することが知られている。

[0023]　本発明で使用されるＮＹ－ＥＳＯ－１は、天然に存在するＮＹ－ＥＳＯ－１であってもよく、又は、ａＡＶＣとして投与した場合にＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞を誘導する限り、その改変体であってもよい。１つの実施形態において、本発明で使用されるＮＹ－ＥＳＯ－１は、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、チンパンジー等）由来のＮＹ－ＥＳＯ－１である。１つの実施形態において、ＮＹ－ＥＳＯ－１は、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１である。１つの実施形態において、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１は、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。１つの実施形態において、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１は、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである。１つの実施形態において、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１は、配列番号２に示されるアミノ酸配列において１又は数個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～７個、さらにより好ましくは１～５個、１～３個、又は１～２個のアミノ酸の欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである。また、本発明で使用されるＮＹ－ＥＳＯ－１は、ａＡＶＣとして投与した場合にＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞を誘導する限り、ＮＹ－ＥＳＯ－１の断片であってよい。１つの実施形態において、ＮＹ－ＥＳＯ－１の断片は、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１の断片である。１つの実施形態において、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１の断片は、配列番号２に示されるアミノ酸配列の、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、５５％以上、６

０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上の長さを有するポリペプチドである。ａＡＶＣとして投与することによるＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞の誘導は、例えば、後記実施例１－２に記載の方法により評価できる。本発明で使用されるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を用いて、使用されるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片のアミノ酸配列から塩基配列を設計し、作製することができる。１つの実施形態において、ＮＹ－ＥＳＯ－１をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0024] 本明細書における「同一性」とは、ＥＭＢＯＳＳ Ｎｅｅｄｌｅ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．；２０１５；４３：Ｗ５８０－Ｗ５８４）を用いて、デフォルトで用意されているパラメータによって得られたＩｄｅｎｔｉｔｙの値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Ｇａｐ Ｏｐｅｎ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ １０

Ｇａｐ Ｅｘｔｅｎｄ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ ０．５

Ｍａｔｒｉｘ ＝ ＥＢＬＯＳＵＭ６２

Ｅｎｄ Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ ｆａｌｓｅ

[0025] ３．ＣＤ１ｄ

本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドを含んでいる。ＣＤ１ｄは、細胞表面に発現するＭＨＣクラスＩ様糖タンパク質である。本発明で使用されるＣＤ１ｄは、ヒト由来細胞において発現させた場合にＣＤ１ｄの機能を有する限りにおいて、天然に存在するＣＤ１ｄ又はその改変体であってよい。ＣＤ１ｄの機能としては、ＣＤ１ｄリガンド（例えば、α－ＧａｌＣｅｒ）に結合する能力が挙げられる。ＣＤ１ｄのＣＤ１ｄリガンドへの結合能は公知の方法を用いて当業者に容易に評価され得る。また、ＣＤ１ｄの機能は、ａＡＶＣによるヒトＮＫＴ細胞を活性化する能力を指標に評価することもできる。このヒトＮＫＴ細胞の活性化能は、例えば、非特許文献５のＦｉｇ．１に記載のｉｎ ｖｉｔｒｏの

評価系において評価することができる。簡単には、α－ＧａｌＣｅｒ存在下で培養したＣＤ１ｄ発現細胞をＮＫＴ細胞と共培養し、培養液中のＩＦＮ－γの量を測定することにより、ＮＫＴ細胞の活性化を評価することができる。

[0026] １つの実施形態において、本発明で使用されるＣＤ１ｄは哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、チンパンジー等）由来のＣＤ１ｄである。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄはヒトＣＤ１ｄである。１つの実施形態において、ヒトＣＤ１ｄは、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。１つの実施形態において、ヒトＣＤ１ｄは、配列番号４に示されるアミノ酸配列において１～１０個、１～７個、１～５個、１～３個、又は１～２個のアミノ酸の欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ＣＤ１ｄの機能を有するポリペプチドである。１つの実施形態において、ヒトＣＤ１ｄは、配列番号４に示されるポリペプチドと少なくとも９０％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、ＣＤ１ｄの機能を有するポリペプチドである。

[0027] 本発明で使用されるＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドは、使用されるヒト由来細胞に内在するポリヌクレオチドであってもよく、又は、外来的に導入されたポリヌクレオチドであってもよい。ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドをヒト由来細胞に外来的に導入する場合、該ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を用いて、使用されるＣＤ１ｄのアミノ酸配列から塩基配列を設計し、作製することができる。１つ実施形態において、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドは、配列番号３に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0028] ４．プロモーター

本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞において、ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、誘導型プロモーターに作動可能に連結されている。本明細書において、「作動可能に連結された」とは、

宿主細胞におけるポリペプチドの発現をプロモーターによって制御するために当該プロモーターがポリヌクレオチドに連結されている状態を意味する。また、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞において、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドをヒト由来細胞に外来的に導入する場合、該ポリヌクレオチドをプロモーターに作動可能に連結させてもよい。この場合、ＣＤ１ｄを発現させるためのプロモーターとしては、恒常的に発現を促進するプロモーター又は誘導型プロモーターのいずれも用いることができる。

[0029] 「誘導型プロモーター」とは、誘導的に発現を促進するプロモーターであり、当該プロモーターを駆動する誘導因子（本明細書において、「誘導型プロモーターの誘導因子」又は単に「誘導因子」とも称する）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターをいう。誘導型プロモーターとしては、例えば、温熱誘導型プロモーター（例えば、ヒートショックプロモーター）、薬剤誘導型プロモーターが挙げられる。１つの実施形態において、誘導型プロモーターは、薬剤誘導型プロモーターである。本明細書において、「薬剤誘導型プロモーター」とは、誘導因子である薬剤により該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現が調節されるプロモーターを意味する。薬剤誘導型プロモーターとしては、例えば、Ｃｕｍａｔｅオペレーター配列、λオペレーター配列（例えば、１２×λＯｐ）、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系の誘導型プロモーター（以下、「テトラサイクリン系誘導型プロモーター」という）等が挙げられる。Ｃｕｍａｔｅオペレーター配列は、ＣｙｍＲリプレッサー存在下において不活性であるが、誘導因子であるＣｕｍａｔｅの存在下において、ＣｙｍＲリプレッサーと解離して、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。λオペレーター配列は、二量体化により転写活性化能を有するアクチベーター（λＲｅｐ－ＧｙｒＢ－ＡＤ）を二量体化する誘導因子（例えば、クメルマイシン）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。テトラサイクリン系誘導型プロモーターは、誘

導因子であるテトラサイクリン又はその誘導体（例えば、ドキシサイクリン等）及びリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）（例えば、Ｔｅｔ－Ｏｎ　３Ｇ）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。テトラサイクリン系誘導型プロモーターとしては、例えば、ＴＲＥ３Ｇプロモーターが挙げられる。１つの実施形態において、薬剤誘導型プロモーターは、テトラサイクリン系誘導型プロモーターであり、１つの実施形態において、テトラサイクリン系誘導型プロモーターは、ＴＲＥ３Ｇプロモーターである。

[0030] 恒常的に発現を促進するプロモーターとしては、例えば、ＣＭＶ（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）、ＲＳＶ（ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ　ｓｙｎｃｙｔｉａｌ　ｖｉｒｕｓ）、ＳＶ４０（ｓｉｍｉａｎ　ｖｉｒｕｓ　４０）等のウイルス由来プロモーター、アクチンプロモーター、ＥＦ（ｅｌｏｎｇａｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ）１αプロモーター等が挙げられる。

[0031] 本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞において、当該細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現が誘導され得る。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現している。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現している。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量の下限値は、10^6細胞当たり８８ｎｇを超える、９０ｎｇ以上、１００ｎｇ以上、１５０ｎｇ以上、２００ｎｇ以上、２４５ｎｇ以上、２５０ｎｇ以上、３００ｎｇ以上、４００ｎｇ以上、５００ｎｇ以上、６００ｎｇ以上、７００ｎｇ以上、８００ｎｇ以上、９００ｎｇ以上、１０００ｎｇ以上、１５００ｎｇ以上、２０００ｎｇ以上、２５００ｎｇ以上、３０００ｎｇ以上、４０００ｎｇ以上、５０００ｎｇ以上、６０００ｎｇ以上、７０００ｎｇ以上、８０００ｎｇ以上、９０００ｎｇ以上、又は１００００ｎｇ以上であり、上限値は３００００ｎｇ以下、３５０００

ｎｇ以下、４００００ｎｇ以下、４３８９０ｎｇ以下、４５０００ｎｇ以下、５００００ｎｇ以下、５５０００ｎｇ以下、６００００ｎｇ以下である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～５００００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－Ｅ

ＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～３５０００ｎｇである。

[0032] ５．ＣＤ１ｄリガンド

１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、細胞表面にＣＤ１ｄリガンドを積載していてもよい。本明細書において、「細胞表面にＣＤ１ｄリガンドを積載した」とは、ａＡＶＣ細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドが結合している状態を指す。

細胞表面へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法＞の項に記載のように、ＣＤ１ｄを発現する細胞にＣＤ１ｄリガンド（例えば、α－ＧａｌＣｅｒ）をパルスすることによって行い得る。本明細書において、「ＣＤ１ｄリガンドをパルスする」とは、培養培地中にて細胞をＣＤ１ｄリガンドと接触させることを指す。ＣＤ１ｄリガンドをパルスされたａＡＶＣにおいては、すべての、又は少なくとも一部のＣＤ１ｄにＣＤ１ｄリガンドが積載されている。

[0033] 本発明で使用されるＣＤ１ｄリガンドとしては、例えば、α－ガラクトシルセラミド（α－ＧａｌＣｅｒ）、α－Ｃ－ガラクトシルセラミド（α－Ｃ－ＧａｌＣｅｒ）、７ＤＷ８－５、イソグロボトリヘキソシルセラミド（ｉＧｂ３）等が存在する。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。α－ＧａｌＣｅｒは、化学名は（２Ｓ，３Ｓ，４Ｒ）－１－Ｏ－（α－Ｄ－ガラクトシル）－Ｎ－ヘキサコサノイル－２－アミ

ノ－１，３，４－オクタデカントリオールであり、ＣＡＳ　ＲＮ：１５８０２１－４７－７で登録され、分子式：$C_{50}H_{99}NO_9$で表される物質（分子量：８５８．３４）である。α－ＧａｌＣｅｒは、当該分野で公知の技術に従って合成してもよく、商業的に入手可能なもの（例えば、α－Ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ（フナコシ、Ｃａｔ．ＫＲＮ７０００））を使用してもよい。

[0034] ＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法＞

本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチド、及び、必要に応じて、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる。本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法は、さらに、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を培養する工程、細胞をクローニングする工程、及び細胞表面にＣＤ１ｄリガンドを積載させる工程を含んでいてもよい。

[0035] １．ヒト由来細胞へのポリヌクレオチドの導入

本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる（以下、導入されるポリヌクレオチドを「目的ポリヌクレオチド」とも称する）。或いは、ヒト由来細胞としてＣＤ１ｄを内在的に発現する細胞を用いる場合には、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄを内在的に発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる。

[0036] ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、例えば、ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ　ＩＤやＧｅｎＢａｎｋのＡｃｃｅｓｓｉｏｎ番号からアミノ酸配列をコードする塩基配列を取得し、標準的な分子生物学及び／又は化学的手法を用いて設

計及び作製することができる。例えば、前記ポリヌクレオチドは、その塩基配列に基づいてホスホロアミダイト法等を用いて合成することができ、又ｃＤＮＡライブラリーよりポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して得られるＤＮＡ断片を組み合わせて作製することができる。

[0037] ヒト由来細胞への目的ポリヌクレオチドの導入は、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション等の非ウイルスベクター系の方法又はウイルスベクター系のいずれかの方法を用いて行うことができる。非ウイルスベクター系の方法を用いる場合は、目的ポリヌクレオチドは、プラスミドベクター、ｃＤＮＡ等の形態又はｍＲＮＡの形態であってよい。

[0038] プラスミドベクター又はウイルスベクターは、ヒト由来細胞中でＣＤ１ｄ又はＮＹ－ＥＳＯ－１若しくはその断片を外来的に発現させるための発現ベクターとして使用しうる。発現ベクターは、目的とするポリペプチドを発現できるものであれば特に制限されず、当業者により公知の方法を用いて作製することができる。発現ベクターは、プラスミドベクターとしては、例えば、ｐｃＤＮＡシリーズ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）、ｐＡＬＴＥＲ（登録商標）－ＭＡＸ（プロメガ）、又はｐＨＥＫ２９３ Ｕｌｔｒａ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒ（タカラバイオ社）等）を使用することができ、ウイルスベクターとしては、例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、又はアデノ随伴ウイルスを使用することができる。例えば、ヒト由来細胞への目的ポリヌクレオチドの導入にレンチウイルスを使用する場合、該レンチウイルスは、ｐＬＶＳＩＮ－ＣＭＶ／ＥＦ１αベクター（タカラバイオ社）、ｐＬｅｎｔｉベクター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて作製できる。ヒト由来細胞においてＣＤ１ｄとＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を外来的に発現させる場合、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドとＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを、１つの発現ベクターを用いてヒト由来細胞に導入してもよく、別々の発現ベクターを用いて導入し

てもよい。また、発現ベクターには、目的とする遺伝子又はポリヌクレオチドの発現を確認するためのマーカーとなり得る遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、又は蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）を含んでいてもよい。発現ベクターは、さらに、開始コドン及び終止コドン、エンハンサー配列、非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、又は複製可能単位等を含んでいてもよい。

[0039] １つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法は、ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法は、ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法は、内在的にＣＤ１ｄを発現するヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。これらの方法について、１つの実施形態において、発現ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターであり、１つの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターであり、１つの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

[0040] １つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオ

チド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、内在的にＣＤ１ｄを発現するヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。これらの細胞について、１つの実施形態において、発現ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターであり、１つの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターであり、１つの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。１つの実施形態において、作製されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、染色体外又は細胞核のゲノムＤＮＡ上に、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチドと誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを有する。１つの実施形態において、作製された細胞は、その細胞核のゲノムＤＮＡ上にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを有する。

[0041] ２．ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の培養

前記の方法にて作製されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、さらに培養により増殖させることができる。ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を維持するため、又は増殖させるための細胞の培養は、公知の方法により行われる。基礎培地としては、例えば、ＭＥＭ培地（Ｓｃｉｅｎｃｅ；１９５２；１２２：５０１）、ＤＭＥＭ培地（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ；１９５９；８：３９６－３９７）、ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｊ．Ａｍ．Ｍｅｄ．Ａｓｓｏｃ．；１９６７；１９９：５１９－５２４）、１９９培地（Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．；１９５０；７３：１－８）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１２３３８０２２）、ＣＤ ２９３

Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１１９１３０１９）、Ｅｘｐｉ２９３™ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．Ａ１４３５１０１）を使用することができる。培養培地は、例えば、血清（例えば、ウシ胎児血清）、血清代替物（例えば、ＫｎｏｃｋＯｕｔ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ：ＫＳＲ）、脂肪酸又は脂質、アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、２－メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、抗生物質等を含むことができる。１つの実施形態において、培養に使用される培地は、無血清培地又は化学的に定義された培地である。

[0042] 培養条件（例えば、培養時間、温度、培地のｐＨ、CO_2濃度等の培養条件）は当業者により適宜選択され得る。培地のｐＨは約６～８であるのが好ましく、培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約３０～４０℃、好ましくは約３７℃である。また、CO_2濃度は約１～１０％、好ましくは約５％である。培養時間は、特に限定されるものではないが、約１５～３３６時間行なわれる。必要により通気や撹拌を行うこともできる。

[0043] ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の培養時にａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させて、ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させてもよい。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。１つの実施形態において、当該誘導型プロモーターは薬剤誘導型プロモーターであり、当該作製方法は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を薬剤誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養する工程を含む。薬剤誘導型プロモーターを使用する場合、誘導因子であるテトラサイクリン、ドキシサイクリン、Ｃｕｍａｔｅ、クメルマイシン等の薬剤を加えた培地にて細胞を培養し、薬剤誘導型プロモーターに作動可能に連結された遺伝子又はポリヌクレオチドの発現を誘導させても

よい。当該工程は、一般的な遺伝子誘導システムを用いた遺伝子誘導方法に準拠して行うことができる。１つの実施形態において、当該薬剤誘導型プロモーターはテトラサイクリン系誘導型プロモーターであり、当該作製方法は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞をテトラサイクリン又はその誘導体及びｒｔＴＡの存在下で培養する工程を含む。１つの実施形態において、テトラサイクリン系誘導型プロモーターはＴＲＥ３Ｇプロモーターであり、当該作製方法は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞をテトラサイクリン又はその誘導体及びＴｅｔ－Ｏｎ　３Ｇの存在下で培養する工程を含む。得られたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、抗ＣＤ１ｄ抗体又は抗ＮＹ－ＥＳＯ－１抗体を用いたＷｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ法、ＥＬＩＳＡ法、フローサイトメトリー法等の当業者によって公知の方法にて測定することができる。

[0044] ３．ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞のクローニング

細胞にポリヌクレオチドを導入する場合、目的ポリヌクレオチドが導入された細胞及び導入されていない細胞が混在しているため、さらに、目的ポリヌクレオチドを細胞核のゲノムＤＮＡ上に組み込む場合には、その組み込まれている場所も細胞により異なるため、不均質（ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｏｕｓ）な細胞の集団となっている場合がある。本明細書において、前記の不均質な細胞の集団を「細胞プール」と称す。該細胞プールから単一の遺伝子型を有する細胞を取得する方法（本明細書にて、「クローニング」という）により、ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドが導入された１細胞（以下、「クローン化された細胞」という。）を取得し増殖させることにより、単一の遺伝子型を有する細胞集団（以下、「クローン化された細胞の集団」という。）を取得することができる。ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞のクローニングは、当業者によく知られている方法を用いて実施することができ、例えば、限外希釈法、シングルセルソーティング法、又はコロニーピックアップ法を用いることができる。１つの実施

形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞のクローニング方法は限外希釈法、シングルセルソーティング法、又はコロニーピックアップ法の１又は２以上の方法を組み合わせて用いることもできる。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞のクローニング方法は限外希釈法である。

[0045] 前記方法にて取得された各クローン化されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞について、その一部を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させて、得られた細胞におけるＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量を測定することによって、誘導因子の存在下においてＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片について目的の発現量を示す、クローン化されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の集団を選択することができる。選択したクローン化された細胞の集団を凍結状態で保存したもの（又は「凍結物」ともいう）を、リサーチセルバンク（ＲＣＢ）として使用しうる。ＲＣＢの細胞を培養して増殖させ、凍結させたものをマスターセルバンク（ＭＣＢ）として使用しうる。ＭＣＢの細胞を培養して増殖させ、凍結させたものをワーキングセルバンク（ＷＣＢ）として使用しうる。ＷＣＢの細胞を培養したものを医薬品の原料として使用しうる。各セルバンクは、凍結保護剤を含んでもよい。各セルバンクは、複数の容器（例えば、２～１００００の容器、例えば、１０～１０００の容器、例えば、１００～５００の容器）に分注され、凍結状態で保管してもよい。クローン化されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の解凍、培養、及び誘導因子との接触、並びにＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量の測定はそれぞれ、当業者に公知の方法で行うことができ、培養、誘導因子との接触、及び発現量の測定は、例えば、「２．ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の培養」に記載の方法等を使用して行うことができる。１つの実施形態において、クローン化されたａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の培養、及び誘導因子との接触、並びにＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量の測定は、ＲＣＢ及びＷＣＢの解凍後に行うことができる。

[0046] １つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量の下限値は、１０^{6}細胞当たり８８ｎｇを超える、９０ｎｇ以上、１００ｎｇ以上、１５０ｎｇ以上、２００ｎｇ以上、２４５ｎｇ以上、２５０ｎｇ以上、３００ｎｇ以上、４００ｎｇ以上、５００ｎｇ以上、６００ｎｇ以上、７００ｎｇ以上、８００ｎｇ以上、９００ｎｇ以上、１０００ｎｇ以上、１５００ｎｇ以上、２０００ｎｇ以上、２５００ｎｇ以上、３０００ｎｇ以上、４０００ｎｇ以上、５０００ｎｇ以上、６０００ｎｇ以上、７０００ｎｇ以上、８０００ｎｇ以上、９０００ｎｇ以上、又は１００００ｎｇ以上であり、上限値は３００００ｎｇ以下、３５０００ｎｇ以下、４００００ｎｇ以下、４３８９０ｎｇ以下、４５０００ｎｇ以下、５００００ｎｇ以下、５５０００ｎｇ以下、６００００ｎｇ以下である。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～５００００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４００００ｎｇである。１

つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞における
ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～３５０００ｎｇで
ある。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞
におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４５００
０ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ
－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～
４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ
－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４
５ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、得られるａＡＶ
Ｃ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量
は、２４５ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、得られ
るａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片
の発現量は、１０００ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態におい
て、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又
はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施
形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－Ｅ
ＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４００００ｎｇである。
１つの実施形態において、得られるａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけ
るＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～３５０００ｎ
ｇである。

[0047] ４．ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞へのＣＤ１ｄリガンドの積載

ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞にＣＤ１ｄリガンドをパルスすることによって、ＣＤ１ｄリガンドを積載したａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を作製することができる。ＣＤ１ｄリガンドをパルスする条件（例えば、細胞の培養培地にＣＤ１ｄリガンドを添加するタイミング、培養培地中のＣＤ１ｄリガンドの濃度及び培養時間等）は、使用する細胞及び培養時の諸条件を考慮して当業者にて適宜調整され得る。ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の培養培地に添加するＣＤ１ｄリガンドの濃度は、特に限定されないが、例えば

、１ｎｇ／ｍＬ～１００００ｎｇ／ｍＬの範囲で適宜選択され得る。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触の前に行われ得る。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触の後に行われ得る。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触と同時に行われ得る。これらの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、好ましくは、クローン化されている。

[0048] 上記で作製したＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、ＣＤ１ｄリガンドを積載しているａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞において、該細胞の増殖を人為的な方法を用いて停止させてもよい。当該細胞の増殖を停止させる方法は、特に限定されないが、例えば、放射線（例えば、Ｘ線）照射にて細胞増殖を停止させる方法、マイトマイシンＣ等の薬剤を添加する方法等を使用し得る。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、増殖を停止させた細胞であり得る。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、ＣＤ１ｄリガンドを積載し、増殖を停止させた細胞であり得る。

[0049] ＜本発明の医薬組成物等＞

本発明はまた、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を含む医薬組成物を提供する。当該医薬組成物において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、該細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している。１つの実施形態において、当該医薬組成物は、がんの処置に用いるための医薬組成物である。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。当該医薬組成物は、当該分野において通常用いられる賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等

を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。医薬組成物の製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴用剤等の非経口剤が挙げられる。１つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の凍結物を含み得る。１つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の凍結物及び凍結保護剤を含み得る。１つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の懸濁液を含み得る。１つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の懸濁液及び凍結保護剤を含み得る。本発明はまた、がんの処置に用いるための医薬組成物を製造するための本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の使用であって、該細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、該細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している、使用を提供する。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。本発明はまた、がんを処置するための本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞であって、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、該細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している、細胞を提供する。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。

[0050] 本発明はまた、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を対象に投与する工程を含む、がんを処置する方法を提供する。当該方法において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、該細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している。１つの実施形態において、ＣＤ１ｄリガンドは、α－ＧａｌＣｅｒである。本明細書において、「対象」とは、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、チンパンジー等）であり、１つの実施形態において、対象はヒトである。本明細書において、「処置」とは、治療的処置及び予防的処置を含む意味で用いられる。ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を対象へ投与する場合、ａ

ＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の形態で対象に投与することができる。対象へのａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の投与量及び投与回数は、がんの種類、位置、重症度、処置を受ける対象の年齢、体重及び状態などに応じて適宜調節できる。ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の投与量は、例えば、対象への一回の投与において１×10^3ｃｅｌｌｓ／ｋｇ～１×10^9ｃｅｌｌｓ／ｋｇを用いることができる。対象へのａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の投与方法としては、例えば、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、又は動脈内等への注射又は点滴により投与することができる。本発明の処置方法は、他のがん治療方法と併用して用いることができる。他のがん治療方法としては、手術、放射線治療、造血幹細胞移植、又は、他の抗がん剤による治療が挙げられる。

[0051] 本発明の処置の対象となるがんとしては、特に限定はされないが、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ホジキンリンパ腫、ノンホジキンリンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫等の血液がん、骨髄異形成症候群、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、中皮腫、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、頭頸部がん、子宮がん、子宮頸がん、肝臓がん、胆のうがん、胆管がん、腎臓がん、膵臓がん、肺がん、結腸がん、大腸がん、直腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、精巣がん、卵巣がん、脳腫瘍等の固形がん、及び骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんの他、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、及び網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。１つの実施形態において、本発明の処置の対象となるがんは、ＮＹ－ＥＳＯ－１陽性のがんである。

[0052] 本発明の医薬組成物、使用、細胞、及びがんの処置方法において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の10^6細胞当たりの発現量は、例えば、下限値は８８ｎｇを超える、９０ｎｇ以上、

１００ｎｇ以上、１５０ｎｇ以上、２００ｎｇ以上、２４５ｎｇ以上、２５０ｎｇ以上、３００ｎｇ以上、４００ｎｇ以上、５００ｎｇ以上、６００ｎｇ以上、７００ｎｇ以上、８００ｎｇ以上、９００ｎｇ以上、１０００ｎｇ以上、１５００ｎｇ以上、２０００ｎｇ以上、２５００ｎｇ以上、３０００ｎｇ以上、４０００ｎｇ以上、５０００ｎｇ以上、６０００ｎｇ以上、７００ｎｇ以上、８０００ｎｇ以上、９０００ｎｇ以上、又は１００００ｎｇ以上であり、上限値は３００００ｎｇ以下、３５０００ｎｇ以下、４０００ｎｇ以下、４３８９０ｎｇ以下、４５０００ｎｇ以下、５００００ｎｇ以下、５５０００ｎｇ以下、６００００ｎｇ以下である。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量の下限値は、10^6細胞当たり８８ｎｇを超える、９０ｎｇ以上、１００ｎｇ以上、１５０ｎｇ以上、２００ｎｇ以上、２４５ｎｇ以上、２５０ｎｇ以上、３００ｎｇ以上、４００ｎｇ以上、５００ｎｇ以上、６００ｎｇ以上、７００ｎｇ以上、８００ｎｇ以上、９００ｎｇ以上、１０００ｎｇ以上、１５００ｎｇ以上、２０００ｎｇ以上、２５００ｎｇ以上、３０００ｎｇ以上、４０００ｎｇ以上、５０００ｎｇ以上、６０００ｎｇ以上、７０００ｎｇ以上、８０００ｎｇ以上、９０００ｎｇ以上、又は１００００ｎｇ以上であり、上限値は３００００ｎｇ以下、３５０００ｎｇ以下、４０００ｎｇ以下、４３８９０ｎｇ以下、４５０００ｎｇ以下、５００００ｎｇ以下、５５０００ｎｇ以下、６００００ｎｇ以下である。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～５００００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、

ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、８９ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０６ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、２４５ｎｇ～３５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４５０００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４３８９０ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～４００００ｎｇである。１つの実施形態において、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞におけるＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量は、１０００ｎｇ～３５０００ｎｇである。

[0053] ＜がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法＞

本発明はまた、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を誘導型プロモ

ーターの誘導因子に接触させてＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む、がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法を提供する。１つの実施形態において、当該製造方法は、当該ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。１つの実施形態において、当該製造方法は、細胞表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む。細胞表面へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と誘導因子との接触の前でも後でも同時でもよい。本発明はまた、がんの処置に用いる医薬組成物の製造における本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の使用を提供する。

[0054] 本発明はまた、以下の工程を含む、がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法を提供する：

ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、又は

内在的にＣＤ１ｄを発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程。

[0055] １つの実施形態において、当該製造方法は、前記工程で得られた細胞（ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞）を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させてＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程をさらに含む。１つの実施形態において、当該製造方法は、当該ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。１つの実施形態において、当該製造方法は、細胞表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む。細胞表面へのＣＤ１ｄリガンドの積載は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と誘導因子との接触の前でも後でも同時でもよい。

[0056] 本項に記載の製造方法に用いる細胞及び工程等に関する具体的な実施形態

については、前記の＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞＞及び＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製方法＞の項に記載のとおりである。

[0057] ＜本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤との併用＞

本発明はまた、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、がんを処置する方法を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を含むがんを処置するための医薬組成物を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、がんを処置するための本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、がんの処置に用いるための医薬組成物を製造するための本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の使用を提供する。当該方法、医薬組成物、細胞又は使用において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現し、該細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している。

本明細書において、「免疫チェックポイント阻害剤」とは、免疫チェックポイント分子によって引き起こされる免疫細胞の抑制を解除することによって免疫を賦活する薬剤を意味する。免疫チェックポイント分子としては、プログラム細胞死－１（Ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ　ｃｅｌｌ　ｄｅａｔｈ　１；ＰＤ－１）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔ－ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ　４；ＣＴＬＡ－４）、Ｔ細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン－３（Ｔ－ｃｅｌｌ　ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　ｄｏｍａｉｎ　ａｎｄ　ｍｕｃｉｎ　ｄｏｍａｉｎ－３；ＴＩＭ－３）、リンパ球活性化遺伝子３（ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｇｅｎｅ　３；ＬＡＧ－３）、及びＶ型免疫グロブリンドメイン含有Ｔ細胞活性化抑制因子（Ｖ－ｔｙｐｅ　ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　ｄｏｍａｉｎ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎ

ｇ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ Ｔ－ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ；ＶＩＳＴＡ）等が挙げられる。これらの分子が担う免疫チェックポイントはＰＤ－１系免疫チェックポイント、ＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント、ＴＩＭ－３系免疫チェックポイント、ＬＡＧ－３系免疫チェックポイント、及びＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイントと呼ばれる。免疫チェックポイント阻害剤は、例えば免疫チェックポイント分子又はそのリガンドに結合して、免疫チェックポイントの機能を阻害し得る。例えば、ＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１又はＰＤ－Ｌ２との結合を阻害することによりＰＤ－１系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、ＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０又はＣＤ８６との結合を阻害することによりＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、ＴＩＭ－３系免疫チェックポイント阻害剤は、ＴＩＭ－３とガレクチン－９との結合を阻害することによりＴＩＭ－３系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、ＬＡＧ－３系免疫チェックポイント阻害剤は、ＬＡＧ－３とＭＨＣクラスＩＩ分子との結合を阻害することによりＬＡＧ－３系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、ＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイント阻害剤は、ＶＩＳＴＡとＶＳＩＧ－３／ＩＧＳＦ１１との結合を阻害することにより、ＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイントを阻害することができる。免疫チェックポイント阻害剤とは、ＰＤ－１系免疫チェックポイント、ＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント、ＴＩＭ－３系免疫チェックポイント、ＬＡＧ３系免疫チェックポイント、及びＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイント等の１以上の免疫チェックポイントを阻害することができる物質を指し、抗体、抗原結合性タンパク質、及び低分子化合物等が挙げられる。抗体には受容体又はリガンドのいずれかに結合するものが存在する。例えば、ＰＤ－１系免疫チェックポイントを阻害する抗体としては、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、又は抗ＰＤ－Ｌ２抗体が挙げられ、例えば、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、ＭＫ－３４７５、ＡＭＰ－２２４、ピジリズマブ、ＡＭＰ－５１４、ＡＮＢ－０

１１、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＲＥＧＮ－２８１０、ＨＲ３０１２１０、ＰＦ－０６８０１５９１、ＪＳ－００１、ＩＢＩ－３０８、ＣＢＴ－５０１、アベルマブ、アテゾリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５９、ＬＹ－３３００５４、ＪＮＪ－６１６１０５８８、及びデュルバルマブが使用され得る。また、ＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイントを阻害する抗体としては、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ８０抗体、又は抗ＣＤ８６抗体が挙げられ、例えば、イピリムマブ、及びトレメリムマブが使用され得る。また、ＴＩＭ－３系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＴＩＭ－３抗体又は抗ガレクチン－９抗体が挙げられ、例えば、ＭＧＢ４５３が使用され得る。また、ＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＶＩＳＴＡ抗体又は抗ＶＳＩＧ－３／ＩＧＳＦ１１抗体からなる群から選択される抗体が挙げられ、例えば、ＪＮＪ－６１６１０５８８が使用され得る。また、低分子化合物としてＡＵＰＭ－１７０も用いられ得る。

[0058] 本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤との併用は、ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の抗腫瘍作用を増強し得る。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤はＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤は抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、又は抗ＰＤ－Ｌ２抗体である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ、ペムプロリズマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、又はデュルバルマブである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はペムプロリズマブである。また別の実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤はＣＴＬＡ－４系

免疫チェックポイント阻害剤である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤は抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ８０抗体、又は抗ＣＤ８６抗体である。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブ又はトレメリムマブである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブである。

[0059] 例えば、対象に本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤とを投与することを含む、がんを処置する方法について、１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤又はＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント阻害剤である。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤である。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、又は抗ＰＤ－Ｌ２抗体である。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ、ペムプロリズマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、又はデュルバルマブである。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はペムプロリズマブである。また別の実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤はＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント阻害剤である。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ８０抗体、又は抗ＣＤ８６抗体である。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブ又はトレメリ

ムマブである。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。１つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブである。

[0060] 本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、同時に、逐次的に、連続的に、又は重複的に投与され得る。本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、いずれを先に投与してもよい。１つの実施形態では、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の投与を免疫チェックポイント阻害剤の投与よりも先に開始することができる。１つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤の投与を本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の投与よりも先に開始することができる。本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、それぞれ独立して単回投与又は複数回投与され得る。１つの実施形態において、本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と免疫チェックポイント阻害剤による単剤療法の併用療法において、さらなる追加の化学療法剤などの抗がん剤を併用してもよい。

[0061] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0062] ［実施例１：マウス型ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の抗腫瘍作用］

[0063] ［実施例１－１：マウス型ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の作製］

がん抗原であるＮＹ－ＥＳＯ－１を搭載したａＡＶＣのがんワクチンとしての効果をｉｎ　ｖｉｖｏ評価系にて確認するため、マウスＮＩＨ／３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ、Ｃａｔ．ＣＲＬ－１６５８）にＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子及びＣＤ１ｄ遺伝子のｍＲＮＡを導入したマウス型ａＡＶＣ（ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１とも称する）を作製した。

[0064] ＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子（配列番号１）は、配列番号２に示されるヒトＮＹ－ＥＳＯ－１のアミノ酸配列を基に、人工遺伝子合成にて作製した。ｐＧＥＭ（登録商標）－４Ｚプラスミド（プロメガ社、Ｃａｔ．Ｐ２１６１）のＨｉｎｄＩＩＩ又はＥｃｏＲＩ認識配列を含む１５塩基と相補的な配列を付加したプライマーを用い、ＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子をＰＣＲ法にて増幅した。増幅したＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子をｐＧＥＭ（登録商標）－４ＺのＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲＩサイトにＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ社、Ｃａｔ．６３９６４８）を用いて挿入した。得られたプラスミドを、ｐＧＥＭ－４Ｚ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミドと称する。ｐＧＥＭ（登録商標）－４ＺプラスミドのＨｉｎｄＩＩＩ－ＢａｍＨＩサイトに配列番号５に示す塩基配列からなるマウスＣＤ１ｄ遺伝子（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ１１６０９－１のアミノ酸配列（配列番号６）を基に人工遺伝子合成にて遺伝子を合成）を挿入した。得られたプラスミドをｐＧＥＭ－４Ｚ－ｍＣＤ１ｄプラスミドと称する。ｐＧＥＭ－４Ｚ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミド及びｐＧＥＭ－４Ｚ－ｍＣＤ１ｄプラスミドをそれぞれＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで切断して直鎖にしたものをテンプレートとして用い、ｍＭＥＳＳＡＧＥ　ｍＭＡＣＨＩＮＥ™　Ｔ７　ＵＬＴＲＡ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．ＡＭＢ１３４５５）を用いてＮＹ－ＥＳＯ－１　ｍＲＮＡ及びＣＤ１ｄ　ｍＲＮＡを作製した。α－ＧａｌＣｅｒを５００ｎｇ／ｍＬ添加した１０％量のウシ胎児血清を含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１０５６９）にて２日間培養したＮＩＨ／３Ｔ３細胞を回収し、細胞懸濁液にＮＹ－ＥＳＯ－１　ｍＲＮＡとＣＤ１ｄ　ｍＲＮＡを添加し、ＮＥＰＡ２１エレクトロポレーター（ネッパジーン株式会社）を用いてエレクトロポレーション（ポアーリングパルス：電圧１５０Ｖ、パルス幅８ｍｓ、パルス間隔５０ｍｓ、回数２回、減衰率１０％、極性＋、トランスファーパルス：電圧２０Ｖ、パルス幅５０ｍｓ、パルス間隔５０ｍｓ、

回数±５回、減衰率４０％、極性＋／－）を行った。細胞を回収し、Ｘ線照射装置ＭＢＲ－１５２０Ｒ－３（株式会社　日立パワーソリューションズ）を用いて３０Ｇｙ量のＸ線を照射した。前記の方法により得られた細胞をａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１と称する。

[0065] ［実施例１－２：マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１のＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞誘導能］

各群５例の６週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の尾静脈に、ＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ（株式会社大塚製薬工業）に懸濁した５×10^5ｃｅｌｌｓのａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。投与７日後にマウスから脾臓細胞を回収し、ｍｏｕｓｅ　ＩＦＮ－γ　ｓｉｎｇｌｅ－ｃｏｌｏｒ　ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌｙｍｉｔｅｄ社、Ｃａｔ．ｍＩＦＮｇｐ－２Ｍ／５）のプレートに４×10^5ｃｅｌｌｓ／ウェルで播種した。さらに、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞を刺激するために、ＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク配列の全長をカバーするオーバーラッピングペプチドであるＮＹ－ＥＳＯ－１ペプチド（ＰｅｐＴｉｖａｔｏｒ　ＮＹ－ＥＳＯ－１　－　ｐｒｅｍｉｕｍ　ｇｒａｄｅ，　ｈｕｍａｎ（ミルテニーバイオテク社、Ｃａｔ．１３０－０９５－３８１））、又は、抗原非特異的ペプチドとしてＰＡＰペプチド（ＰｅｐＴｉｖａｔｏｒ　ＰＡＰ　－　ｒｅｓｅａｒｃｈ　ｇｒａｄｅ，　ｈｕｍａｎ（ミルテニーバイオテク社、Ｃａｔ．１３０－０９６－７６７））を添加し、３７℃、５％CO_2条件下で１日間培養した。ウェル底のスポット数をカウントすることにより、ＩＦＮ－γ産生細胞数を計測した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与マウスでは、ＮＹ－ＥＳＯ－１ペプチド刺激によりＩＦＮ－γを産生する細胞が増加した（図１－１）。抗原非特異的であるＰＡＰペプチド刺激によるスポット数との差が、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞数を示す。この結果より、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与によりＮＹ

－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞が誘導されることが示唆された。

[0066] ［実施例１－３：ＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６メラノーマ細胞担癌マウスにおけるａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の抗原特異的抗腫瘍効果］

各群１０例の８週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の尾静脈に、ＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎに懸濁した５×１０^{5}ｃｅｌｌｓのａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。投与１４日後、前記マウスの皮下に、Ｄ－ＰＢＳ（－）（富士フイルム和光純薬株式会社、Ｃａｔ．０４５－２９７９５）に懸濁した３×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＢ１６－Ｆ１０メラノーマ細胞（ＡＴＣＣ、Ｃａｔ．ＣＲＬ－６４７５）、又は、Ｄ－ＰＢＳ（－）に懸濁した３×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子を導入して作製したＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク質を発現するＢ１６－Ｆ１０メラノーマ細胞（以下、Ｂ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１又はＢ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と称する）をそれぞれ接種した。がん細胞を接種した日を０日目と設定し、２０日間の腫瘍体積の変化を計測した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与により、Ｂ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大が有意に抑制されたのに対し、ＮＹ－ＥＳＯ－１を発現していないＢ１６－Ｆ１０腫瘍の増大は抑制されなかった（図１－２）。この結果より、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１は、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的免疫の誘導に基づくＮＹ－ＥＳＯ－１特異的抗腫瘍効果を有することが示唆された。

[0067] ［実施例１－４：ＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６メラノーマ細胞担癌マウスにおいて抗腫瘍効果を示すａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の細胞数の検討］

８週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の皮下に、Ｄ－ＰＢＳ（－）に懸濁した３×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＢ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を接種した。細胞接種７日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群１０例の５つの群に分け、尾静脈から、溶媒であるＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎ

ｊｅｃｔｉｏｎに懸濁したａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を、それぞれ５×１０^{2}ｃｅｌｌｓ／マウス、５×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／マウス、５×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／マウス、５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／マウスとなるように投与した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した日を０日目と設定し、１０日間の腫瘍体積の変化を計測した。なお、５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／マウス投与群ではａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与後に２個体の死亡が発生したため、０日目以降の例数は８匹とする。５×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／マウス以上の投与群でＢ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大が有意に抑制された（図１－３）。本実験に用いたａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１のＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量は、２４５ｎｇ／１×１０^{6}ｃｅｌｌｓであった。

[0068] 実施例１の結果より、マウス型ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、マウスｉｎ　ｖｉｖｏ評価系において、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔ細胞を誘導することによりＮＹ－ＥＳＯ－１特異的抗腫瘍効果を示すことが確認された。ヒトにおいても、ヒト型ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、自然免疫を惹起して抗腫瘍効果を奏すると共に、抗原特異的な獲得免疫を誘導し、獲得免疫に基づく抗腫瘍効果を奏することを期待し得るため、ヒトのＮＹ－ＥＳＯ－１発現がんに対してＮＹ－ＥＳＯ－１特異的抗腫瘍効果を示す治療薬の創製を目的とし、以下にヒト型ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製検討を行った。

[0069] ［実施例２：ヒト型ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞の作製及び調製］

ヒト型ａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を以下の方法で作製した。ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤ１ｄ、及びＴｅｔ３Ｇ遺伝子をそれぞれ搭載したプラスミドを用いてレンチウイルスを作製し、該レンチウイルスを用いてＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．Ｒ７９００７）に該遺伝子を導入することにより、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤ１ｄ、及びＴｅｔ３Ｇを発現するａＡＶＣ細胞を構築し

た。

[0070] ［実施例２－１：レンチウイルス作製］

（１）レンチウイルス作製用プラスミドの構築

レンチウイルスプラスミドｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ（配列番号７）を作製した。ＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子（配列番号１）の５’末側にＥｃｏＲＩ認識配列、３’末側にＢａｍＨＩ認識配列を付加したＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子を人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素ＥｃｏＲＩ及びＢａｍＨＩで切り出したＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子を、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶプラスミドのＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩサイトに挿入した。得られたプラスミドをｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミドと称する。ｐＴＲＥ３Ｇ（タカラバイオ社、Ｃａｔ．６３１１７３）の配列に基づき、人工遺伝子合成サービスにて作製したＴＲＥ３Ｇプラスミドから制限酵素ＣｌａＩ及びＥｃｏＲＩで切り出したＴＲＥ３Ｇプロモーターを、制限酵素ＣｌａＩ及びＥｃｏＲＩにてＣＭＶプロモーターを除去したｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミドに挿入した。得られたプラスミドをｐＬＶｓｙｎ－ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミドと称する。

[0071] ＣＤ１ｄ遺伝子（配列番号３）は、配列番号４に示されるヒトＣＤ１ｄのアミノ酸配列を基に設計し、遺伝子の５’末側にＸｈｏＩ認識配列、３’末側にＮｏｔＩ認識配列を付加し人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素ＸｈｏＩ及びＮｏｔＩで切り出したＣＤ１ｄ遺伝子を、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶプラスミドのＸｈｏＩ－ＮｏｔＩサイトに挿入した。得られたプラスミドをｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＣＤ１ｄプラスミドと称する。

[0072] Ｔｅｔ－Ｏｎ　３Ｇ遺伝子は、ｐＣＭＶ－Ｔｅｔ３Ｇプラスミド（タカラバイオ社、Ｃａｔ．６３１３３５）のＴｅｔ－Ｏｎ　３Ｇ遺伝子配列の５’末側にＸｈｏＩ認識配列、３’末側にＮｏｔＩ認識配列を付加し、人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素ＸｈｏＩ及びＮｏｔＩで切り出したＴｅｔ－Ｏｎ　３Ｇ遺伝子を、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶプラスミドのＸｈｏＩ－ＮｏｔＩサイトに挿入した。得られたプラスミドをｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－Ｔｅｔ

３Ｇプラスミドと称する。

[0073] （２）レンチウイルス作製

（１）で作製したｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミド、ｐＬＶｓｙｎ－ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミド、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＣＤ１ｄプラスミド、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－Ｔｅｔ３Ｇプラスミドを用いて、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤ１ｄ及びＴｅｔ３Ｇ遺伝子を搭載したレンチウイルスを作製した。得られたレンチウイルスを、それぞれ、ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス、ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス及びＴｅｔ３Ｇ搭載レンチウイルスと称する。

[0074] ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミド、ｐＬＶｓｙｎ－ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１プラスミド、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－ＣＤ１ｄプラスミド、又はｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶ－Ｔｅｔ３Ｇプラスミドのいずれかのプラスミドを６μｇとＶｉｒａＰｏｗｅｒ Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ Ｐａｃｋａｇｉｎｇ Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．Ｋ４９７５００）１８μＬを混合し、３ｍＬのＯｐｔｉＰＲＯ™ ＳＦＭ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１２３０９０１９）を加えて混合した（Ａ）。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００ ＣＤ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１２５６６－０１４）２８８μＬとＯｐｔｉＰｒｏ™ＳＦＭ １２ｍＬを混合して５分静置した（Ｂ）。（Ａ）と３ｍＬの（Ｂ）を混合して室温で２０分静置後、前日にＦａｌｃｏｎ（登録商標）１００ｍｍ ＴＣ－ｔｒｅａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｄｉｓｈ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、Ｃａｔ．３５３００３）に５×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｐｌａｔｅで播種したＬｅｎｔｉ－Ｘ™ ２９３Ｔ細胞（タカラバイオ社、Ｃａｔ．６３２１８０）に（Ａ）と（Ｂ）の混合液３ｍＬ／ｐｌａｔｅで添加して遺伝子導入を行った。Ｌｅｎｔｉ－Ｘ™ ２９３Ｔ細胞は、１０％量のウシ胎児血清(ＳＡＦＣ Ｂｉｏｓｃｉｅｎ

ｃｅｓ社、Ｃａｔ．１２００７Ｃ（γ線照射品））と０．１％量のゲンタマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１５７５００６０）を含むＤＭＥＭ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１０５６９０１０）にて３７℃、５％CO_2条件下で培養を行った。遺伝子導入後、同条件にて２日間培養し、各遺伝子を搭載したレンチウイルスを含む培養上清を回収した。培養上清を４℃にて８４０×ｇで１０分間遠心した。上清を０．４５μｍのフィルター（Ｍｅｒｃｋ社、Ｃａｔ．ＳＬＨＶ０３３ＲＳ）でろ過し、ＰＥＧ－ｉｔ™ Ｖｉｒｕｓ Ｐｒｅｃｉｐｉｔａｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（５ｘ）（Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、Ｃａｔ．ＬＶ８１０Ａ－１）を上清液量の１／４量添加して混合し、４℃で終夜静置した。１５００×ｇ、４℃で３０分間遠心し、上清を除去し、再度１５００×ｇ、４℃で５分間遠心して上清を完全に除去した。ペレットを５００μＬのＤＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１４１９０１４４）に懸濁し、ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス、ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス、及びＴｅｔ３Ｇ搭載レンチウイルスを得た。

[0075] ［実施例２－２：Ｌｅｎｔｉ　ｖｉｒｕｓ感染細胞の作製とクローニング］

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞に実施例２－１で作製した各レンチウイルスを感染させた。ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス及びＣＤ１ｄ搭載レンチウイルスを感染させた細胞集団をＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール、ＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス、及びＴｅｔ３Ｇ搭載レンチウイルスを感染させた細胞集団をＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールと称する。これらの細胞プールから細胞のクローニングを実施し、各細胞プール由来のクローンを複数取得した。

[0076] （１）ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１

ｄ細胞プールの作製

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞にＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス及びＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルスを感染させ、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を得た。感染方法として、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス及びＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルスを同時に感染させる方法（細胞プールＡ作製方法）と、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルス及びＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルスを順次感染させる方法（細胞プールＣ作製方法）の２つの異なる方法を用いた。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞の培養は、０．１％量のゲンタマイシンを含むＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｃａｔ．１２３３８０１８）にて行った。

[0077]　細胞プールＡ作製を以下の方法で行った。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞を１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、１ｍＬ／ウェル量でＦａｌｃｏｎ（登録商標）セルカルチャー　１２ウェル　細胞培養用マルチウェルプレート　平底　フタ付き（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、Ｃａｔ．３５３０４３、以後１２ウェルプレートという。）に播種し、実施例２－１で得た、ＣＤ１ｄ搭載レンチウイルスとＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルスを各５０μＬ、又は各１００μＬ添加した。５４０×ｇ、室温で３０分間遠心した後、ピペッティングで優しく細胞を懸濁して振盪培養を行った。数日培養後に１２ウェルプレートからＣｏｒｎｉｎｇ（登録商標）ポリカーボネート製三角フラスコベントキャップ１２５ｍＬ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、Ｃａｔ．４３１１４３、以後１２５ｍＬ三角フラスコという。）に継代し、さらに適当な間隔で継代して細胞プールＡを得た。

[0078]　細胞プールＣ作製を以下の方法で行った。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３－Ｆ細胞を１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、１ｍＬ／ウェル量でＦａｌｃｏｎ（登録商標）セルカルチャー　１２ウェル　細胞培養用マルチウェルプレート　平底　フタ付きに播種し、実施例２－１で得たＣＤ１ｄ搭載

レンチウイルスを１００μＬ添加した。５４０×ｇ、室温で３０分間遠心した後、ピペッティングで優しく細胞を懸濁して振盪培養を行った。数日培養後に１２ウェルプレートから１２５ｍＬフラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＤ１ｄ細胞プール（細胞プールＢと称する）を得た。細胞プールＢを再度１２ウェルプレートに播種して、ＣＭＶ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルス５０μＬ又は２００μＬ添加し、１回目と同様の手順で２回目のレンチウイルス感染を行った。数日培養後に１２ウェルプレートから１２５ｍＬ三角フラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代して細胞プールＣを得た。細胞プールＡと細胞プールＣを、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールとした。

[0079] （２）ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールの作製

（１）細胞プールＣ作製方法の過程で得られた細胞プールＢを再度１２ウェルプレートに播種して、実施例２－１で得たＴＲＥ３Ｇ－ＮＹ－ＥＳＯ－１搭載レンチウイルスとＴｅｔ３Ｇ搭載レンチウイルスを各４０μＬ又は各２００μＬ添加し、（１）に記載した手順に準拠してレンチウイルス感染を行った。１日後に１２ウェルプレートから１２５ｍＬ三角フラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代してＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールを得た。

[0080] （３）細胞プールでのＮＹ－ＥＳＯ－１発現安定性と培養特性

（１）、（２）で取得したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール及びＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールについて、レンチウイルス感染後のＮＹ－ＥＳＯ－１発現量（図２－１）及びＮＹ－ＥＳＯ－１陽性率のタイムコースを取得した（図２－２）。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールについては感染後３、７、１０、１４日目にＮＹ－ＥＳＯ－１発現の解析を行った。ＦｒｅｅＳｔｙ

ｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールについては感染後７、１４日目に解析を行った。また、解析の２日前に培地に終濃度１００ｎｇ／ｍＬのドキシサイクリン（タカラバイオ社、Ｃａｔ．６３１３１１）を添加し、Ｔｅｔ－Ｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを介して発現を誘導した。ＮＹ－ＥＳＯ－１発現は、ＥＬＩＳＡ法とフローサイトメトリー法にて測定した。ＥＬＩＳＡ法による測定には、固相化用抗体としてＡｎｔｉ－ＮＹ－ＥＳＯ－１　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社、Ｃａｔ．ＭＡＢＣ１１５１）、一次抗体としてＡｎｔｉ－ＣＴＡＧ１Ｂ　抗体（ＡＢＣＡＭ社、Ｃａｔ．ａｂ１８３７４０）、二次抗体としてＲａｂｂｉｔ　ＩｇＧ　Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社、Ｃａｔ．ＨＡＦ００８）を使用し、サンドイッチＥＬＩＳＡ法の一般的な測定方法に準拠して測定を行った。フローサイトメトリー法による測定には、一次抗体としてＡｎｔｉ－ＮＹ－ＥＳＯ－１抗体、二次抗体としてＡＰＣ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ　Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｌｉｆｅｔｅｃｎｏｌｏｇｙ社、Ｃａｔ．Ａ１０５３９）を使用し、ＦＡＣＳＶｅｒｓｅ™（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いた一般的な測定方法に準拠して測定を行った。また、感染後の継代時に培養特性として生存率の測定（図２－３）と、倍加時間の算出（図２－４）を行った。

[0081] 発現量に関しては図２－１及び陽性率に関しては図２－２に示す通り、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールはレンチウイルス感染直後にはＮＹ－ＥＳＯ－１発現量、陽性率ともにＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールと比較して非常に高い値を示していたが、培養日数を経るに従い発現量及び陽性率の低下が認められた。一方でＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールではこのような発現量と発現率の低下は観察されなかった。

[0082] 生存率に関しては図２－３及び倍加時間に関しては図２－４に示す通り、

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールはレンチウイルス感染後７日目にかけて、生存率の低下と倍加時間の延長が認められた。細胞プールのなかでＮＹ－ＥＳＯ－１発現量の高い細胞の生存率の低下に伴う倍加時間の延長により、培養日数を経るにしたがって細胞プール全体としてのＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量や発現率が低下していったと推測される。一方でＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールではこのような培養特性の変動は観察されなかった。

[0083] （４）クローニング

（１）（２）で作製したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールとＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールから限外希釈法によるシングルセルクローニングを行い、全ての遺伝子が安定的に発現するクローンを選抜した。９６ウェルプレートに１ｃｅｌｌ／ウェルとなるように細胞を播種し、細胞の増殖に合わせて継代を行い、細胞を増殖させた。増殖した細胞のＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク質及びＣＤ１ｄタンパク質の発現量を、ＮＹ－ＥＳＯ－１はＥＬＩＳＡ法にて、ＣＤ１ｄはフローサイトメトリー法にて測定し、ＮＹ－ＥＳＯ－１及びＣＤ１ｄタンパク質を安定的に発現するクローンを選抜した。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール由来のクローンのＮＹ－ＥＳＯ－１は、培地に終濃度１００ｎｇ／ｍＬのドキシサイクリンを添加し、Ｔｅｔ－Ｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを介して発現を誘導して評価を行った。ＥＬＩＳＡ法による測定には固相化用抗体としてＡｎｔｉ－ＮＹ－ＥＳＯ－１　Ａｎｔｉｂｏｄｙ、一次抗体としてＡｎｔｉ－ＣＴＡＧ１Ｂ　抗体、二次抗体としてＲａｂｂｉｔ　ＩｇＧ　Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｙを使用し、サンドイッチＥＬＩＳＡ法の一般的な測定方法に準拠して測定を行った。フローサイトメトリー法による測定には、ＡＰＣ　Ｍｏｕｓｅ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＣＤ１ｄ抗体（ＢＤ　Ｂ

ｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、Ｃａｔ．５６３５０５）を使用し、ＦＡＣＳＶｅｒｓｅ™（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いた一般的な測定方法に準拠して測定を行った。

[0084] （５）取得クローンのＮＹ－ＥＳＯ－１発現量

（４）で取得したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール由来又はＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール由来のクローンについてＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量を測定した。測定は（４）に記載したＥＬＩＳＡ法を用いて実施した（図３）。

[0085] 図３に示す通り、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プールより単離されたクローンのＮＹ－ＥＳＯ－１の発現量は最大でも８８ｎｇ／１０^{6}ｃｅｌｌｓと非常に低かった。一方で、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿Ｔｅｔ－ｏｎ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール由来のクローンは、クローン間の差が大きく、所望の発現量のクローンを選択する余地を与える上に、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ＿ＣＭＶ＿ＮＹ－ＥＳＯ－１＿ＣＤ１ｄ細胞プール由来のクローンに比べて高発現のクローンが多かった。

[0086] ［実施例３：ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１と抗ＰＤ－１抗体の併用効果］

（１）ＮＹ－ＥＳＯ－１発現Ｂ１６メラノーマ細胞担癌マウスにおける併用効果

９週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の皮下に、Ｄ－ＰＢＳ（－）に懸濁した３×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＢ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を接種した。細胞接種７日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群１０例の４つの群に分け、０．１ｍｇの抗ＰＤ－１抗体（ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＰＤ－１（ＣＤ２７９）、Ｂｉｏ　Ｘ　ＣｅｌｌＩ社、Ｃａｔ．ＢＥ０１４６）、又はアイソタイプ抗体（ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ　ｒａｔ　ＩｇＧ２ａ　ｉｓｏｔｙｐｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ、ａｎｔｉ－ｔ

ｒｉｎｉｔｒｏｐｈｅｎｏｌ、Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ社、Ｃａｔ．ＢＥ００８９）を腹腔内投与した。抗体は３～４日間隔で週に２回、合計５回投与した。抗体投与開始３日後、前記マウスの尾静脈に、溶媒であるＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎに懸濁した５×１０^{4}ｃｅｌｌｓのａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した日を０日目と設定し、１１日目までの腫瘍体積の変化を計測した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１＋アイソタイプ抗体の投与及び抗ＰＤ－１抗体の投与によりＢ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大が抑制された。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与と抗ＰＤ－１抗体の併用は、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１＋アイソタイプ抗体投与及び抗ＰＤ－１抗体投与と比較して、Ｂ１６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大をより顕著に抑制した（図４－１）。この結果から、抗ＰＤ－１抗体の併用はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

[0087] （２）ＮＹ－ＥＳＯ－１発現ＣＴ２６大腸がん細胞担癌マウスにおける併用効果

７週齢ＢＡＬＢ／ｃ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の皮下に、Ｄ－ＰＢＳ（－）に懸濁した７×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＮＹ－ＥＳＯ－１遺伝子を導入して作製したＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク質を発現するＣＴ２６大腸がん細胞（ＡＴＣＣ、Ｃａｔ．ＣＲＬ－２６３８）（以下、ＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞と称する）を接種した。細胞接種１４日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群８例の４つの群に分け、０．１ｍｇの抗ＰＤ－１抗体を腹腔内投与した。抗体非投与群には投与は行わなかった。抗体は３～４日間隔で週に２回、合計４回投与した。抗体投与開始日に、前記マウスの尾静脈に、溶媒であるＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎに懸濁した５×１０^{5}ｃｅｌｌｓのａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。

ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した日を０日目と設定し、１４日目までの腫瘍体積の変化を計測した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の単剤の投与及び抗ＰＤ－１抗体の単剤の投与によりＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大が抑制されたのに対し、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与と抗ＰＤ－１抗体の併用は各単剤の投与と比較して、ＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大をより顕著に抑制した（図４－２）。この結果から、抗ＰＤ－１抗体の併用はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

[0088] ［実施例４：ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１と抗ＣＴＬＡ－４抗体の併用効果］

７週齢ＢＡＬＢ／ｃ雌性マウス（日本チャールス・リバー）の皮下に、Ｄ－ＰＢＳ（－）に懸濁した７×１０^{5}ｃｅｌｌｓのＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞を接種した。細胞接種７日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群１０例の４つの群に分け、群分け７日後、０．１５ｍｇの抗ＣＴＬＡ－４抗体（ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＣＴＬＡ－４（ＣＤ１５２）、Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ社、Ｃａｔ．ＢＥ０１６４）を腹腔内投与した。抗体非投与群には投与は行わなかった。抗体は３～４日間隔で週に２回、合計５回投与した。抗体投与開始日に、前記マウスの尾静脈に、溶媒であるＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎに懸濁した５×１０^{5}ｃｅｌｌｓのａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１を投与した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞投与と抗ＣＴＬＡ－４抗体の併用群ではａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与後に1個体の死亡が発生した。コントロール群には２００μＬのＢＩＣＡＮＡＴＥ　Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎを投与した。がん細胞を接種した日を０日目と設定し、３２日間の腫瘍体積の変化を計測した。ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の単剤の投与及び抗ＣＴＬＡ－４抗体の単剤の投与によりＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大が抑制されたのに対し、ａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１投与と抗ＣＴＬＡ－４抗体の併用は各単剤の投与と比較して、ＣＴ２６－ＮＹ－ＥＳＯ－１腫瘍の増大

をより顕著に抑制した（図５）。この結果から、抗ＣＴＬＡ－４抗体の併用はａＡＶＣ（３Ｔ３）－ＮＹ－ＥＳＯ－１の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

産業上の利用可能性

[0089] 本発明のａＡＶＣ－ＮＹ－ＥＳＯ－１細胞は、がんの処置に有用であることが期待できる。

配列表フリーテキスト

[0090] 配列表の配列番号１で示される塩基配列は、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１タンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号２で示されるアミノ酸配列は、配列番号１によりコードされるアミノ酸配列である。配列番号３で示される塩基配列は、ヒトＣＤ１ｄタンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号４で示されるアミノ酸配列は、配列番号３によりコードされるアミノ酸配列である。配列番号５で示される塩基配列は、マウスＣＤ１ｄタンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号６で示されるアミノ酸配列は、配列番号５によりコードされるアミノ酸配列である。配列表の配列番号７で示される塩基配列は、ｐＬＶｓｙｎ－ＣＭＶの塩基配列である。以下の配列表の数字見出し＜２２３＞において、「Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ」の説明として記載される通りである。

請求の範囲

[請求項1] ＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、ヒト由来細胞。

[請求項2] ＮＹ－ＥＳＯ－１がヒトＮＹ－ＥＳＯ－１である、請求項１に記載の細胞。

[請求項3] ＣＤ１ｄがヒトＣＤ１ｄである、請求項１又は２に記載の細胞。

[請求項4] 誘導型プロモーターが薬剤誘導型プロモーターである、請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項5] 薬剤誘導型プロモーターが、テトラサイクリン系誘導型プロモーターである、請求項４に記載の細胞。

[請求項6] テトラサイクリン系誘導型プロモーターがＴＲＥ３Ｇプロモーターである、請求項５に記載の細胞。

[請求項7] ヒト由来細胞が正常細胞である、請求項１～６のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項8] ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に由来する細胞である、請求項７に記載の細胞。

[請求項9] ＣＤ１ｄ及びＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片を発現している、請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項10] ＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現量が10^6細胞当たり２４５ｎｇ～４５０００ｎｇである、請求項９に記載の細胞。

[請求項11] 細胞の表面にＣＤ１ｄリガンドを積載している、請求項９又は１０に記載の細胞。

[請求項12] ＣＤ１ｄリガンドがα－ＧａｌＣｅｒである、請求項１１に記載の細胞。

[請求項13] 請求項１１又は１２に記載の細胞を含む医薬組成物。

[請求項14] がんの処置に用いるための、請求項１３に記載の医薬組成物。

[請求項15] がんを処置する方法であって、請求項１１又は１２に記載の細胞を

対象に投与する工程を含む、方法。

[請求項16] がんを処置するための、請求項１１又は１２に記載の細胞。

[請求項17] がんの処置に用いる医薬組成物を製造するための、請求項１１又は１２に記載の細胞の使用。

[請求項18] がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程を含む、方法。

[請求項19] 細胞の表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、

ヒト由来細胞にＣＤ１ｄをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、又は

内在的にＣＤ１ｄを発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、

を含む、方法。

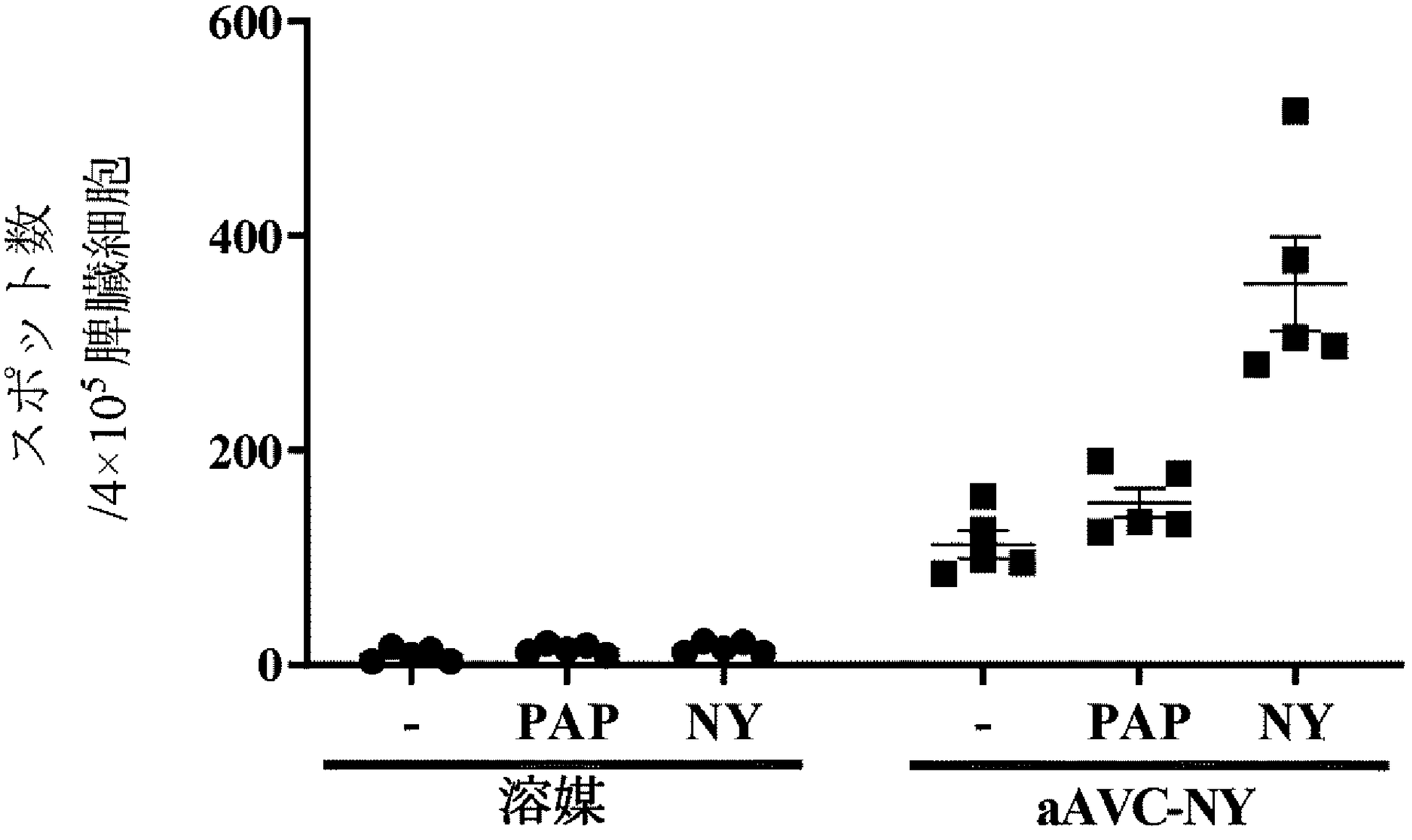
[請求項21] 前記工程で得られた細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりＮＹ－ＥＳＯ－１又はその断片の発現を誘導させる工程をさらに含む、請求項２０に記載の方法。

[請求項22] 細胞の表面にα－ＧａｌＣｅｒを積載する工程をさらに含む、請求項２１に記載の方法。

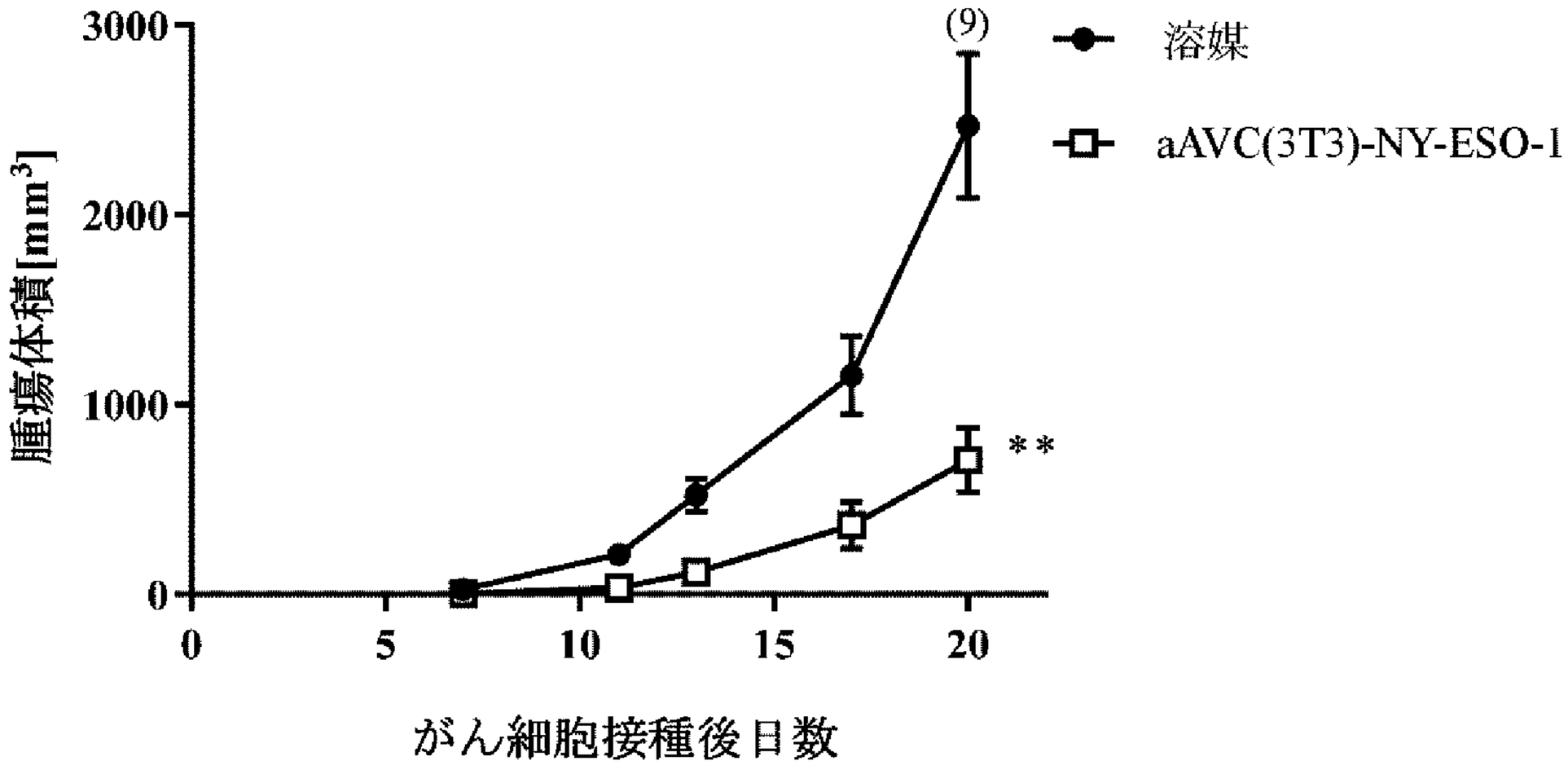
[請求項23] がんを処置する方法であって、請求項１１又は１２に記載の細胞と免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、方法。

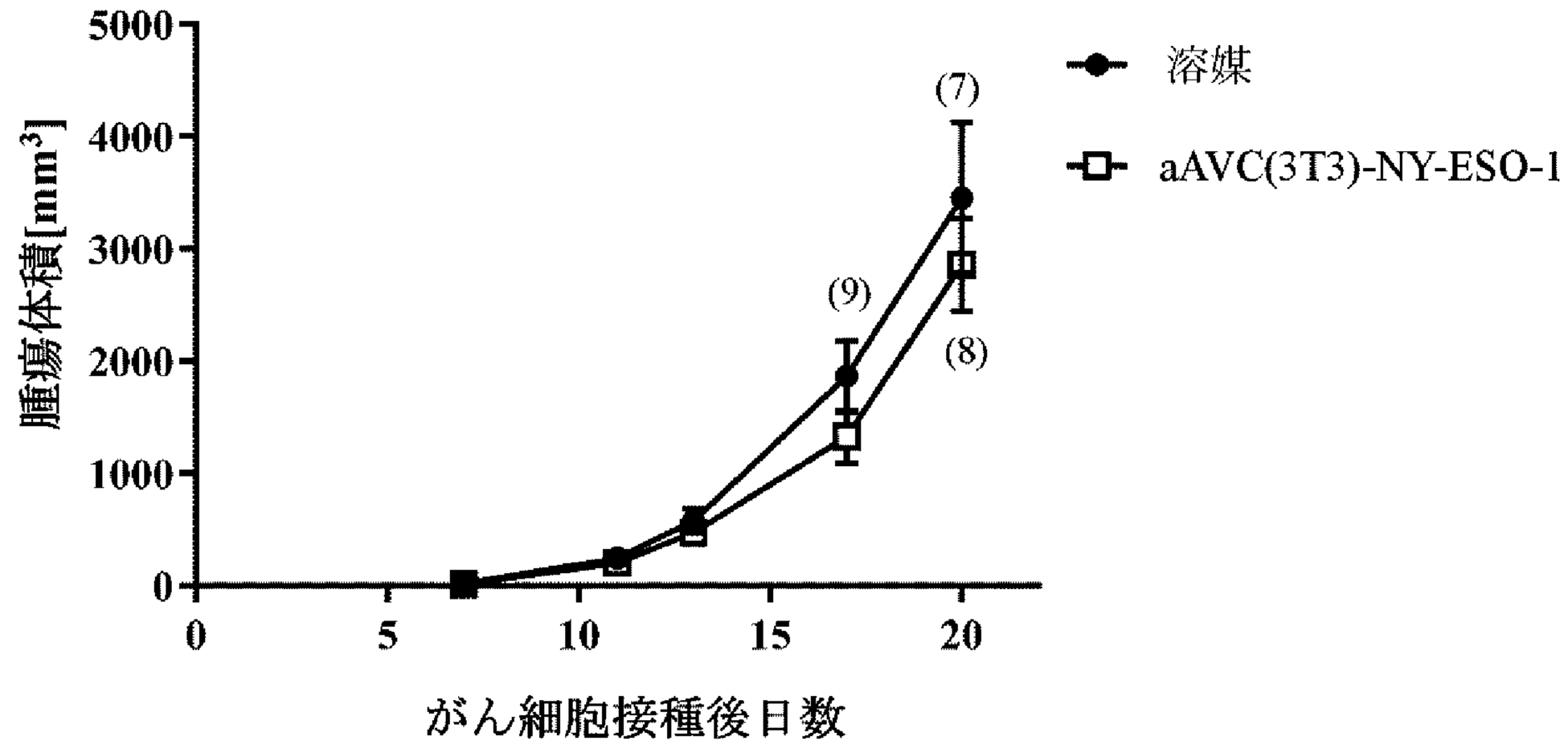
[請求項24] 免疫チェックポイント阻害剤がＰＤ－１系免疫チェックポイント阻害剤、又はＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイント阻害剤である、請求項２３に記載の方法。

[図1-1]

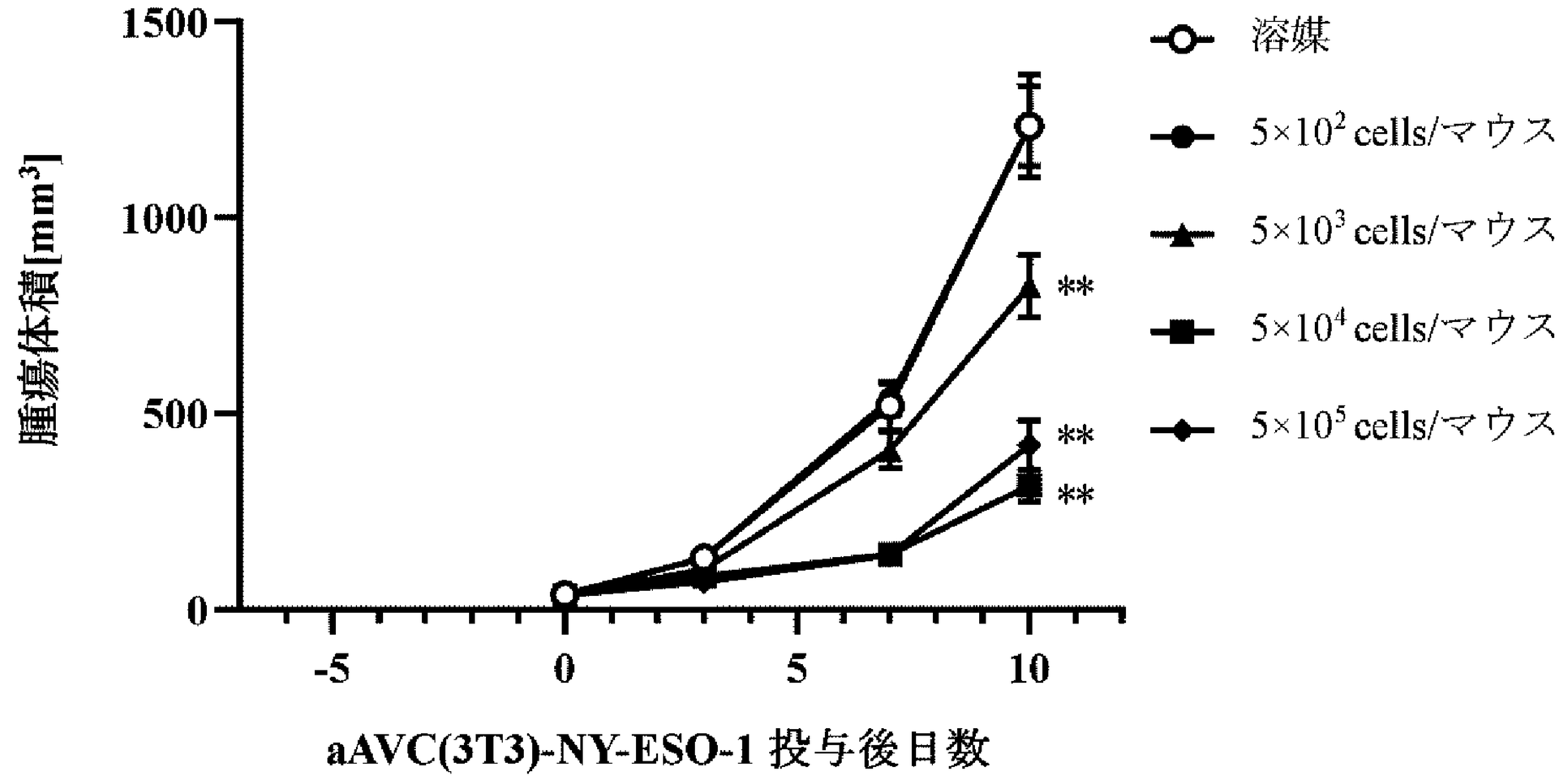

IFN-γ 産生 T 細胞
スポット数
/4×10^5 脾臓細胞
600
400
200
0
-
PAP
NY
-
PAP
NY
溶媒
aAVC-NY

[図1-2]

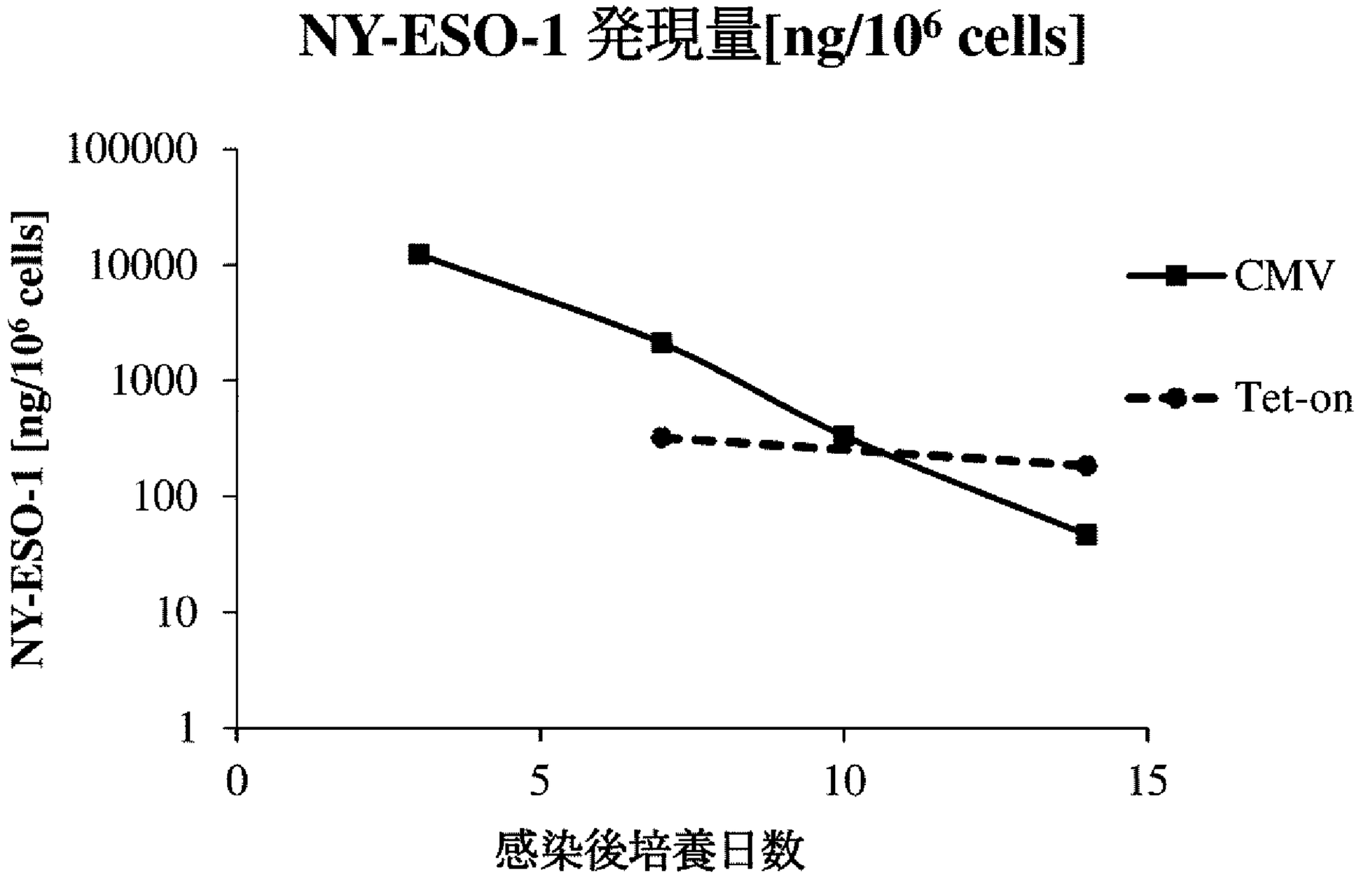

B16-NY-ESO-1
腫瘍体積[mm3]
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
がん細胞接種後日数
(9)
溶媒
aAVC(3T3)-NY-ESO-1
**


B16-F10
腫瘍体積[mm3]
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
がん細胞接種後日数
(7)
(9)
(8)
溶媒
aAVC(3T3)-NY-ESO-1

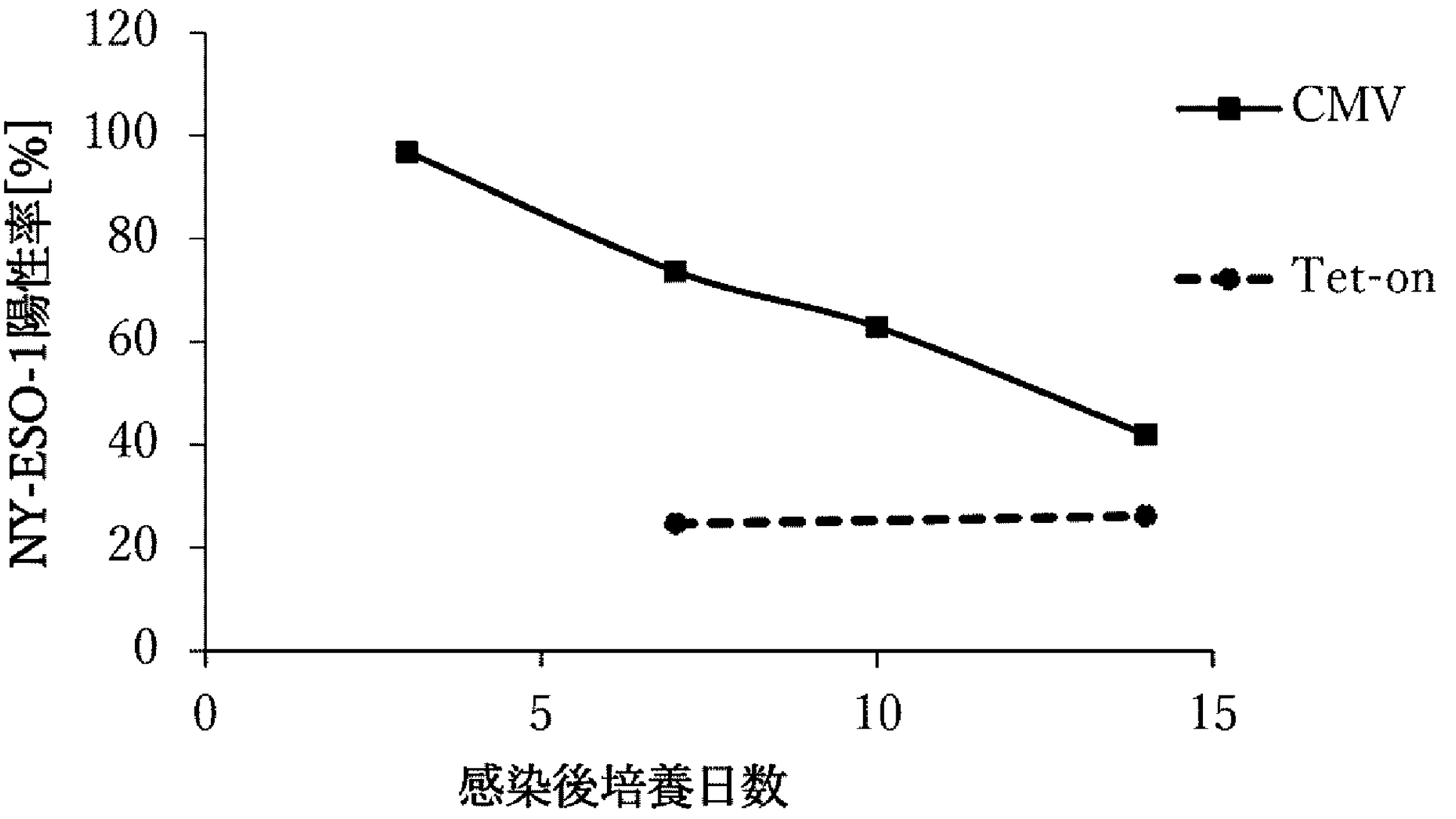
[図1-3]


1500
1000
500
0
腫瘍体積[mm3]
-5
0
5
10
aAVC(3T3)-NY-ESO-1 投与後日数
溶媒
5×10^2 cells/マウス
5×10^3 cells/マウス
5×10^4 cells/マウス
5×10^5 cells/マウス
**
**
**

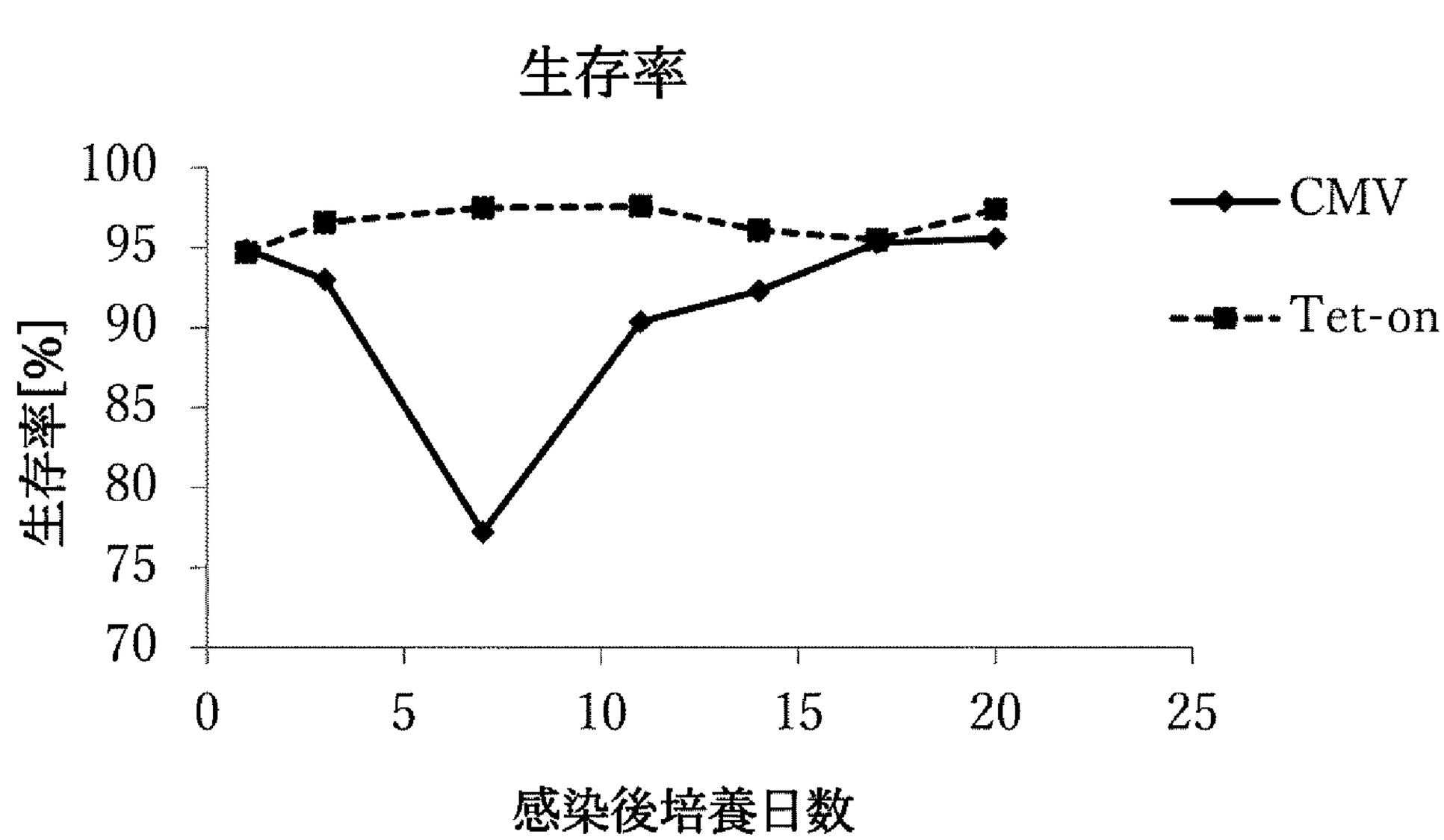
[図2-1]


NY-ESO-1 発現量[ng/10^6 cells]
NY-ESO-1 [ng/10^6 cells]
100000
10000
1000
100
10
1
0
5
10
15
感染後培養日数
CMV
Tet-on

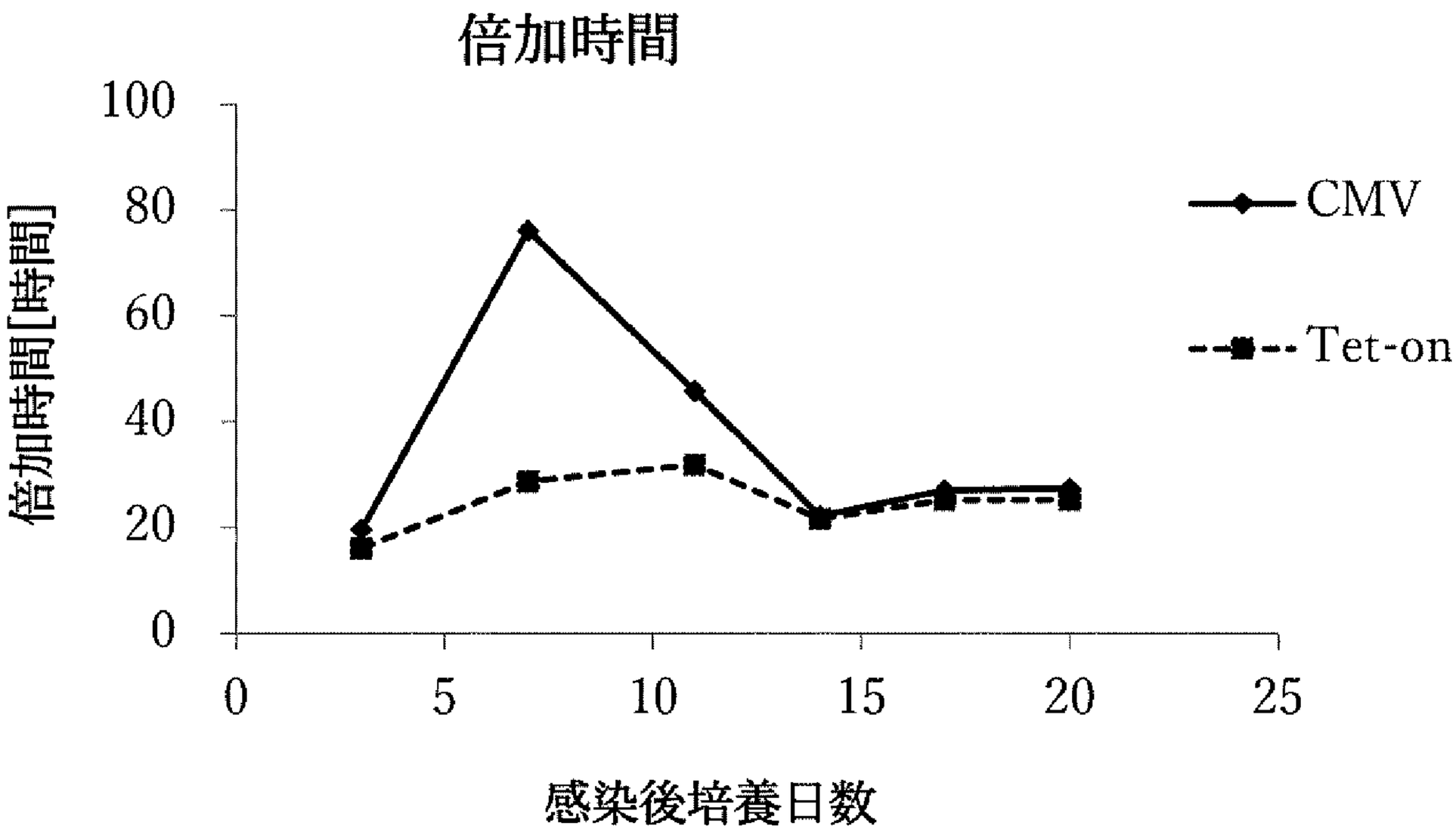
[図2-2]


NY-ESO-1陽性率[%]
NY-ESO-1陽性率[%]
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
感染後培養日数
CMV
Tet-on

[図2-3]


生存率
生存率[%]
100
95
90
85
80
75
70
0
5
10
15
20
25
感染後培養日数
CMV
Tet-on

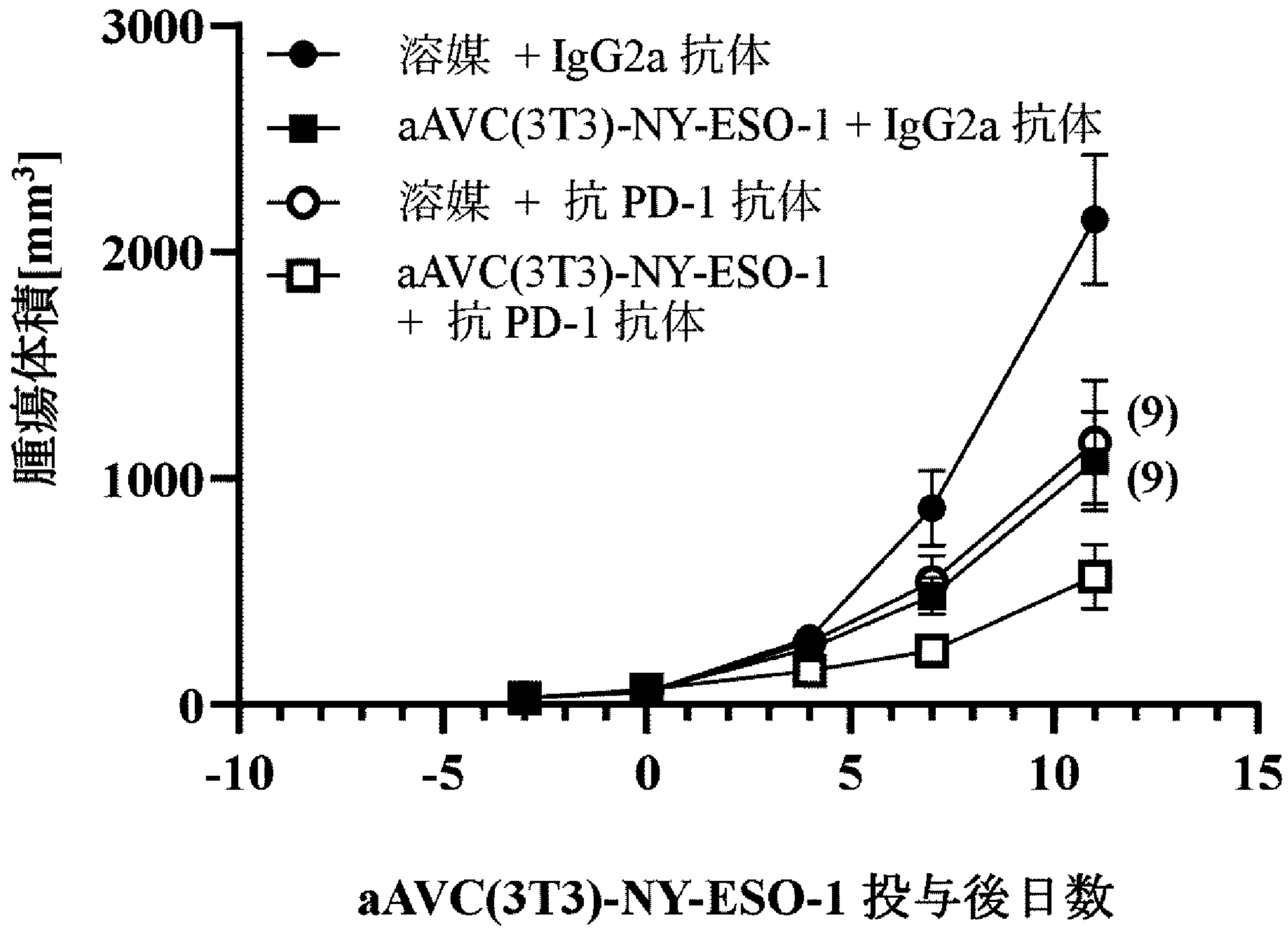
[図2-4]



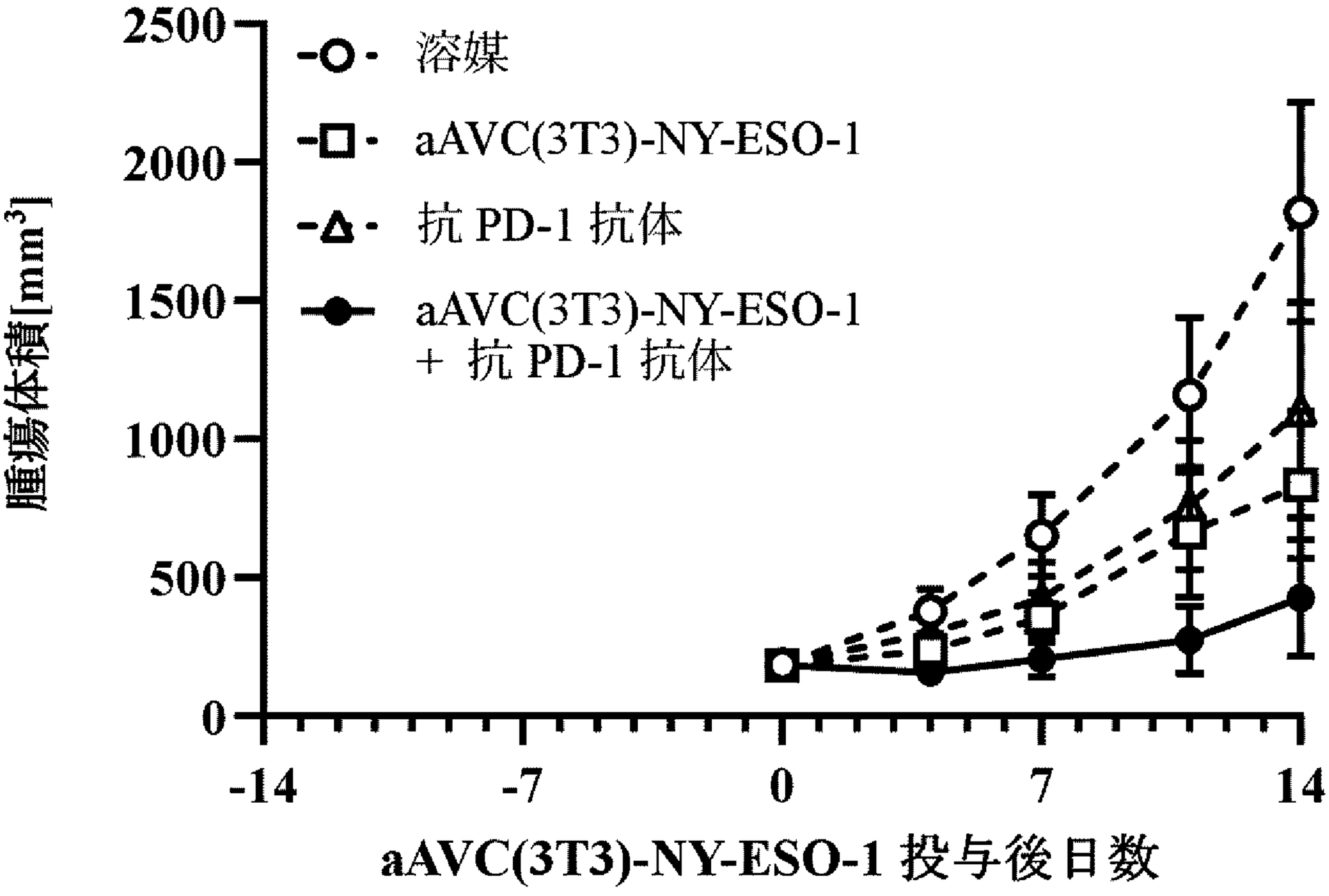
[図3]

プロモーター	No.	NY-ESO1発現量 [ng/10^6 cells]	プロモーター	No.	NY-ESO1発現量 [ng/10^6 cells]
CMV	#01	68	Tet-on	#01	331
	#02	74		#02	106
	#03	25		#03	772
	#04	12		#04	308
	#05	11		#05	2503
	#06	10		#06	2573
	#07	26		#07	111
	#08	15		#08	7813
	#09	45		#09	7324
	#10	23		#10	7281
	#11	18		#11	17021
	#12	42		#12	710
	#13	10		#13	1094
	#14	15		#14	32
	#15	47		#15	19413
	#16	88		#16	43890
	#17	49		#17	1519
				#18	17720
				#19	114
				#20	42
				#21	3460
				#22	629
				#23	16
				#24	5
				#25	844
				#26	1566
				#27	29514
				#28	12313
				#29	995
				#30	33557
				#31	34079
				#32	29538
				#33	30602
				#34	6495
				#35	232
				#36	295
				#37	340
				#38	291
				#39	2550
				#40	747
				#41	2397
				#42	1814
				#43	683

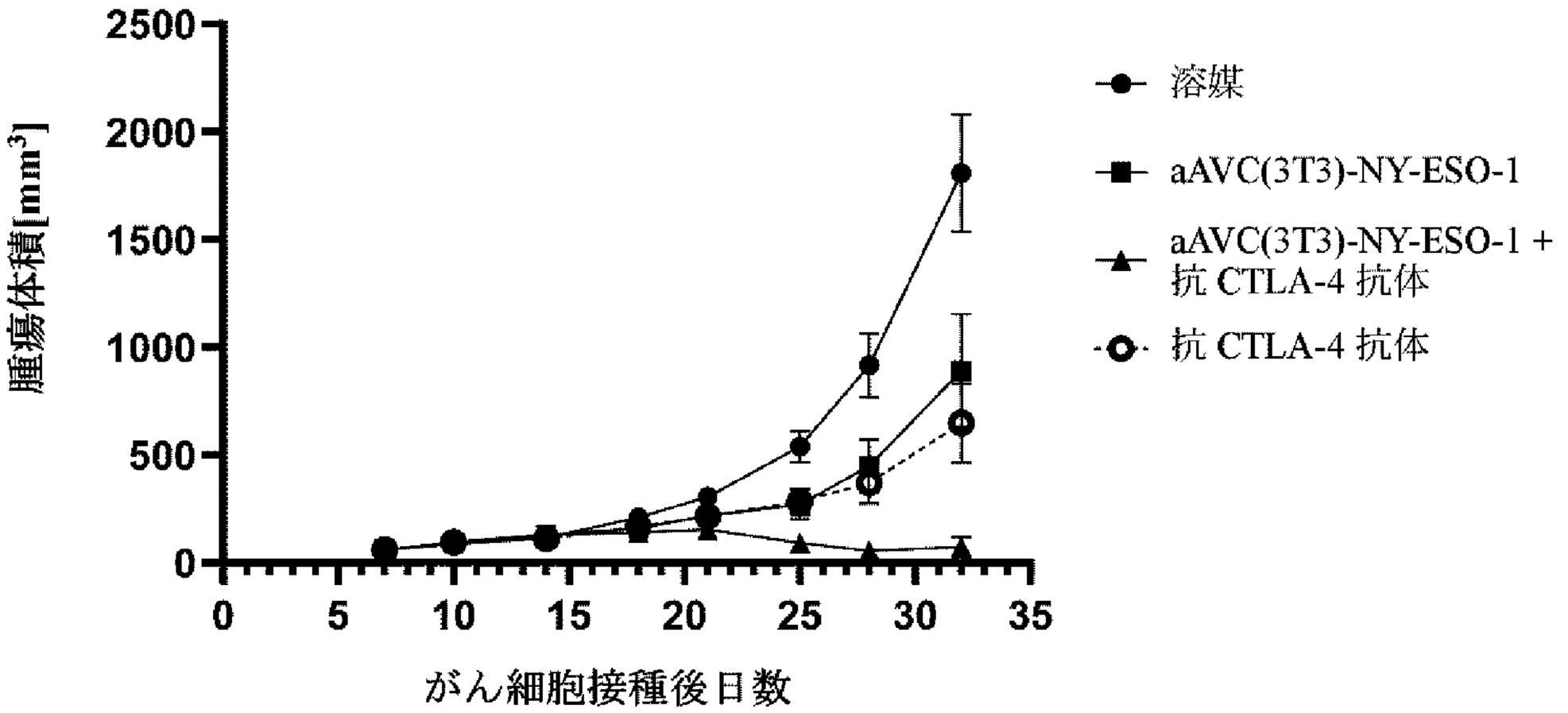
[図4-1]


3000
2000
1000
0
腫瘍体積[mm3]
溶媒 + IgG2a 抗体
aAVC(3T3)-NY-ESO-1 + IgG2a 抗体
溶媒 + 抗 PD-1 抗体
aAVC(3T3)-NY-ESO-1
+ 抗 PD-1 抗体
(9)
(9)
-10
-5
0
5
10
15
aAVC(3T3)-NY-ESO-1 投与後日数

[図4-2]


2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積[mm3]
溶媒
aAVC(3T3)-NY-ESO-1
抗 PD-1 抗体
aAVC(3T3)-NY-ESO-1
+ 抗 PD-1 抗体
-14
-7
0
7
14
aAVC(3T3)-NY-ESO-1 投与後日数

[図5]


腫瘍体積[mm3]
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
がん細胞接種後日数
溶媒
aAVC(3T3)-NY-ESO-1
aAVC(3T3)-NY-ESO-1 +
抗 CTLA-4 抗体
抗 CTLA-4 抗体

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/044586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/15(2015.01)i; A61K 35/22(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: C12N5/10 ZNA; A61K35/22; A61P35/00; A61K30/00 11; A61K30/30; A61K35/15 Z; A61P37 /04; A61P43/00 1071

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)
C12N5/10; A61K35/15; A61K35/22; A61K39/00; A61K39/39; A61P35/00; A61P37/04; A61P43/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/097370 A1 (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 30 August 2007 (2007-08-30) claims, paragraphs [0011], [0015], [0052]	1-24
Y	WO 2010/061930 A1 (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 03 June 2010 (2010-06-03) claims, paragraphs [0013], [0018], [0044], [0047]	1-24
Y	MAHIPAL, A. et al., "First-in-human phase 1 dose-escalating trial of G305 in patients with advanced solid tumors expressing NY-ESO-1", Cancer Immunology, Immunotherapy, 08 May 2019, vol. 68, pp. 1211-1222, abstract, introduction	1-24

☒ 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
14 January 2021 (14.01.2021)	26 January 2021 (26.01.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/044586

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-521674 A (SYNLOGIC OPERATING COMPANY INC.) 09 August 2018 (2018-08-09) paragraphs [0119], [0137], [0167]	1-24
Y	白畑實隆 他, SB-2p-3 汎用高発現動物宿主細胞・ベクター系の開発, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 74 巻臨時増刊号, 社団法人日本農芸化学会, 2000, p. 469, 3) Development of high expression type using an inducible promoter, non-official translation (SHIRAHATA, Sanetaka et al., "SB-2p-3 The animal host cell of high expression for general use and development of a vector system", Lecture abstracts of conference of Japan Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, no. 74 special extra edition, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/044586

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2007/097370 A1	30 Aug. 2007	EP 1990410 A1 claims, paragraphs [0035], [0039], [0076] US 2010/0233215 A1	
WO 2010/061930 A1	03 Jun. 2010	US 2011/0280895 A1 claims, paragraphs [0034], [0039], [0067], [0071] EP 2371945 A1	
JP 2018-521674 A	09 Aug. 2018	WO 2017/023818 A1 paragraphs [0161], [0178], [0206] US 2017/0216370 A1 EP 3328988 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/044586

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/15(2015.01)i; A61K 35/22(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i;
A61K 39/39(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: C12N5/10 ZNA; A61K35/22; A61P35/00; A61K39/00 H; A61K39/39; A61K35/15 Z; A61P37/04; A61P43/00 107

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））

C12N5/10; A61K35/15; A61K35/22; A61K39/00; A61K39/39; A61P35/00; A61P37/04; A61P43/00

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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）

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

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
Y	WO 2007/097370 A1 (独立行政法人理化学研究所) 30.08.2007 (2007-08-30) 請求の範囲、［００１１］、［００１５］、［００５２］	1-24
Y	WO 2010/061930 A1 (独立行政法人理化学研究所) 03.06.2010 (2010-06-03) 請求の範囲、［００１３］、［００１８］、［００４４］、［００４７］	1-24
Y	MAHIPAL, A et al., First-in-human phase 1 dose-escalating trial of G305 in patients with advanced solid tumors expressing NY-ESO-1, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2019.05.08, Vol.68, p.1211-1222 Abstract, Introduction	1-24
Y	JP 2018-521674 A (シンロジック オペレーティング カンパニー インコーポレイテッド) 09.08.2018 (2018-08-09) ［０１１９］、［０１３７］、［０１６７］	1-24
Y	白畑實隆　他, SB-2p-3 汎用高発現動物宿主細胞・ベクター系の開発, 日本農芸化学会大会講演要旨集, ７４巻臨時増刊号, 社団法人　日本農芸化学会, 2000, p.469 3）誘導プロモーターを利用した高発現系の開発	1-24

☐ 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” 国際出願日前で、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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
14.01.2021	26.01.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
坂井田　京 4B 1150
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/044586

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/044586

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2007/097370 A1	30.08.2007	EP 1990410 A1 Claims, [0035], [0039], [0076] US 2010/0233215 A1	
WO 2010/061930 A1	03.06.2010	US 2011/0280895 A1 Claims, [0034], [0039], [0067], [0071] EP 2371945 A1	
JP 2018-521674 A	09.08.2018	WO 2017/023818 A1 [0161], [0178], [0206] US 2017/0216370 A1 EP 3328988 A1	