

(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
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/146480 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/057858
- (22) 国際出願日: 2013 年 3 月 19 日(19.03.2013)
- (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 2012-076556 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012) JP
- (71) 出願人: タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者: 新村 和久(SHINMURA, Kazuhisa); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 片山 敬章(KATAYAMA, Yoshinori); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 吉岡 広文(YOSHIOKA, Hirofumi); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 高蔵 晃(TAKAKURA, Hikaru); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一(MINENO, Junichi); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号 梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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.
- (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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: GENE INTRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 遺伝子導入方法

(57) Abstract: The present invention provides: a culture medium which contains a retinoic acid compound and a histone deacetylase-inhibiting substance as active ingredients and which can be used for the introduction of a gene into a target cell using a viral vector; a method for introducing a gene into a target cell using a viral vector, wherein the culture medium is used in the introduction of the gene; and a method for producing a cell mass into which a gene has been introduced using a viral vector, wherein the culture medium is used.

(57) 要約: 本発明は、有効成分として、レチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含む、ウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入に使用される培地、当該培地を遺伝子導入時に用いることによるウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入の方法、及び当該培地を用いたウイルスベクターによる遺伝子導入された細胞集団の製造方法を提供する。



WO 2013/146480 A1

明 細 書

発明の名称： 遺伝子導入方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的細胞への外来遺伝子の導入方法、及び外来遺伝子導入のための培地に関する。

背景技術

[0002] 近年、重篤な遺伝子病や癌等の治療のための遺伝子治療法の開発が進められている。これまでにヒトでの臨床応用が研究されてきた遺伝子治療法の多くは、組換えレトロウイルスベクターを用いた細胞への遺伝子導入によるものである。レトロウイルスベクターは、標的細胞の染色体DNA中に目的の外来遺伝子を安定に組み込むことが可能である。従って、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は、特に長期にわたる遺伝子発現が望まれる遺伝子治療にとって好ましい遺伝子導入手段である。

[0003] レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入の効率は、フィブロネクチンやフィブロネクチンフラグメントCH-296 [RetroNectin (登録商標)] のようなレトロウイルスに結合する細胞接着性物質の使用により向上することが報告されている（例えば特許文献1）。また、レトロウイルスベクターを含む溶液を前記RetroNectinでコートした容器に加え、一定時間インキュベートしてウイルスベクターのみをRetroNectin上に結合させ、さらに感染阻害物質を含む上清を除去した後、標的細胞を加える方法（RetroNectin Bound Virus Infection法；RBV法）により、遺伝子導入効率がさらに向上することが報告されている（特許文献2、非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第95／26200号パンフレット

特許文献2：国際公開第00／01836号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1：ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.）、第130巻、第331～334頁（2001年）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、ウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入に使用される培地を開発し、当該培地を用いてウイルスベクターにより遺伝子導入された細胞集団の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意努力した結果、有効成分として、レチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素（以下、ヒストンデアセチラーゼと記載する場合がある）阻害物質を含む培地を用い、ウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入を行うことで、驚くべきことに高い遺伝子導入効率が見られることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] 本発明を概説すれば、本発明は、

[1] ウイルスベクターによる標的細胞への外来遺伝子の導入方法であって、少なくとも外来遺伝子の導入時に標的細胞が、有効成分としてレチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含む培地中に存在している工程を包含する方法、

[2] 標的細胞がT細胞及び／又はT細胞に分化しうる前駆細胞である [1] 記載の方法、

[3] ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである [1] 又は [2] いずれか記載の方法、

[4] ヒストン脱アセチル化酵素阻害物質がトリコスタチンA、酪酸ナトリウム、又はバルプロ酸から選択される少なくとも1種の物質である [1] ～

[3] いずれか記載の方法、

[5] [1] ～ [4] いずれか記載の方法で標的細胞に外来遺伝子を導入す

る工程を包含する、形質導入された細胞集団の製造方法、
〔 6 〕 〔 5 〕 記載の方法で得られた形質導入された細胞集団、
〔 7 〕 医薬に使用するための〔 6 〕 記載の細胞集団、
〔 8 〕 医薬の製造に用いる〔 6 〕 記載の細胞集団、
〔 9 〕 〔 6 〕 記載の細胞集団を有効成分として含有する医薬、
〔 1 0 〕 対象に有効量の〔 9 〕 記載の医薬を投与する工程を含む疾病の治療方法又は予防方法、
〔 1 1 〕 有効成分として、レチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含むことを特徴とする外来遺伝子の導入用培地、
に関する。

発明の効果

[0009] 本発明の培地を用いることにより、容易に高い遺伝子導入効率の実現が可能となる。本発明の培地を用いて形質導入された細胞は遺伝子治療の分野で非常に有用である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に本発明について詳細に説明する。

[0011] 本発明は、ウイルスベクターを用いた標的細胞の形質導入に適した培地を開示する。前記の培地は、細胞の培養に必要な成分を混合して作製された基本培地に、有効成分として、レチノイン酸類及びヒストンデアセチラーゼ阻害物質が含有されてなるものである。

[0012] 本発明において、「レチノイン酸」は、ビタミンA酸とも呼ばれ、鎖部の二重結合がすべて *t r a n s* の *a l l - t r a n s* -レチノイン酸又は9位が *c i s* 構造をとる *9 - c i s* -レチノイン酸のいずれでもよい。また、その他のレチノイン酸異性体及びレチノイン酸誘導体も本発明において使用することができる。前記のレチノイン酸、レチノイン酸異性体及びレチノイン酸誘導体又はそれらの塩を、本明細書ではレチノイン酸類と総称する。更に、本発明において、使用するレチノイン酸類は1種類でもよく、複数種類を組み合わせ使用してもよい。

[0013] 本発明に使用されるレチノイン酸類の培地中の濃度としては、有効成分として作用する濃度を使用すればよく、特に限定はないが、*all-trans*-レチノイン酸（以下、ATRAと記載する）の場合、例えば、好適には1 nM～10 μ M、より好適には5 nM～200 nMであり、特に好適には10～100 nMである。

[0014] 本発明において、「ヒストン脱アセチル化酵素（ヒストンデアセチラーゼ）阻害物質」としては、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有するものであれば良く、（１）脂肪族酸類、例えば酪酸ナトリウム、ブチラート、フェニルブチラート、バルプロ酸、これらの塩、誘導体等、（２）ヒドロキサム酸類、例えばトリコスタチン（*Trichostatin*）A、オキサムフラチン、スベロイルアニリド（*suberoylanilide*）、これらの塩、誘導体等、（３）環状ペプチド、例えばトラポキシン（*trapoxin*）、アピシジン（*apicidin*）、FK228、これらの塩、誘導体等、（４）ベンズアミド、その塩、誘導体等、が使用できる。更に、本発明において、使用するヒストン脱アセチル化酵素阻害物質は１種類でもよく、複数種類を組み合わせ使用してもよい。

[0015] 本発明を限定するものではないが、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質として、酪酸ナトリウム（以下、NaBと記載する）、ヒストンデアセチラーゼのアイソフォーム阻害域の広いトリコスタチンA（以下、TSAと記載する）またはバルプロ酸（以下、VPAと記載する）が好適に使用される。

[0016] 本発明に使用されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質の培地中の濃度としては、有効成分として作用する濃度を使用すればよく、特に限定はないが、TSAの場合、例えば、好適には10 nM～50 μ M、より好適には20 nM～10 μ M、特に好適には100 nM～3 μ Mである。NaBならびにVPAの場合、例えば、好適には1 nM～50 mM、より好適には1 mM～10 mMである。

[0017] 上記基本培地の成分としては、アミノ酸、糖類、有機酸のようなエネルギー源、ビタミン類、pH調整のための緩衝成分、無機塩類等があげられる。

また、フェノールレッドのようなpH指示薬を含有していてもよい。このような基本培地として血清を含有しない公知の培地、例えば、DMEM、IMDM、ハムF12培地等を使用してもよく、これらはインビトロジェン社、シグマ社等から市販品として入手することができる。Opti-Pro SFM、VP-SFM、293 SFMI1（いずれもインビトロジェン社製）、HyQ SFM4 MegaVir（ハイクローン社製）等の市販の培地も使用することができる。血清添加培地を使用してもよいが、血清由来の未知のウイルスの混入を防ぐために、無血清培地の使用が好ましい。無血清培地を使用する場合は、ヒト血液より高度に精製された血清アルブミン（例えば医薬品として認可された血清アルブミン製剤）や動物由来の高度に精製された血清アルブミン、又は組換え血清アルブミンを含有する無血清培地が好適に使用される（特開2007-105033号公報）。

[0018] 本発明の遺伝子導入方法は、標的細胞の培養に上記成分を含む培地を使用することを特徴とする。当該培地はウイルスベクターによる遺伝子導入時、すなわち標的細胞にウイルスベクターを接触させる際に使用される。

[0019] 本明細書においてレトロウイルスとは、ゲノムがRNAで構成され、感染した細胞内で当該RNAをDNAに変換する生活環を有するレトロウイルス科に属するRNAウイルスの総称を示し、オンコレトロウイルス及びレンチウイルスを含む。オンコレトロウイルスとしては、例えばモロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）が挙げられる。また、レンチウイルスとしては、例えばヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）やサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられる。

[0020] 本発明において使用されるウイルスベクターには特に限定はない。例えば、レトロウイルスベクター（オンコウイルスベクター、レンチウイルスベクターやそれらの改変体を包含する）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター又はセンダイウイルスベクター等が挙げられる。好適にはレトロウイルスベクター、すなわち遺伝子組換えレトロウイルスベクターが例示される。特

に、無制限な感染、遺伝子導入を防止された複製能欠損レトロウイルスベクターが本発明に好適に使用される。公知の複製能欠損レトロウイルスベクターとしては、MFGベクターや α -SGCベクター（国際公開第92/07943号パンフレット）、pBabe [ヌクレイック アシドズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第18巻、第3587~3596頁(1990)]、pLXIN（クロンテック社製）、pDON-A1-2（タカラバイオ社製）等のレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター [ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来ベクター、サル免疫不全ウイルス (SIV) 由来ベクター等] あるいはこれらを改変したベクター（例えばシュードタイプベクター）が例示される。該ベクターは、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させてあるので、非病原性である。これらのベクターは脊椎動物細胞、特に、哺乳類動物細胞のような宿主細胞に感染し、その染色体DNA中にベクターに搭載された外来遺伝子を安定に組み込むことができる。

[0021] 標的細胞に導入する外来遺伝子は、適当なプロモーター、例えば、レトロウイルスベクター中に存在するLTRのプロモーターや外来プロモーターの制御下に、組換えレトロウイルスベクター内に搭載して使用することができる。また、効率のよい外来遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と共同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列、イントロン配列がベクター内に存在していてもよい。標的細胞内に導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子が、ライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。

[0022] レトロウイルスベクターに搭載される外来遺伝子は、細胞中に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。例えば、外来遺伝子は、治療の対象となる疾患に関連している酵素やタンパク質をコードするものの他、細胞内抗体（例えば、国際公開第94/02610号パンフレット参照）、T細胞レセプター遺伝子、増殖因子、アンチセンスRNA、RNA干渉を

起こすRNA、リボザイム、フォルスプライマー（例えば、国際公開第90／13641号パンフレット参照）等をコードするものを使用することができる。例えば、配列特異的RNA分解酵素であるMazFを発現する遺伝子を外来遺伝子としてCD4陽性T細胞に導入することにより抗HIV効果を示すCD4陽性T細胞を取得することができる（例えば、国際公開第2007／020873号パンフレット及び国際公開第2008／133137号パンフレット）。さらに、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子を細胞に導入して該薬剤に対する感受性を付与することもできる。

[0023] 本発明に使用されるレトロウイルスベクターは、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を含有していてもよい。マーカー遺伝子としては、例えば、細胞に抗生物質に対する耐性を付与する薬剤耐性遺伝子や、酵素活性や蛍光によって遺伝子導入された細胞を見分けることができるレポーター遺伝子、細胞表面に局在する細胞表面マーカー遺伝子等が利用できる。マーカー遺伝子としてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を用いる場合、遺伝子導入された細胞はG418に対する耐性を指標として確認し、単離、精製することができる。また、細胞表面マーカー遺伝子としてLow affinity Nerve Growth Factor Receptor (LNGFR) の細胞外ドメインをコードする遺伝子を用いる場合、抗LNGFR抗体を利用することにより遺伝子導入された細胞を単離、精製することができる。

[0024] 本発明に使用できるレトロウイルスベクターとしては、例えば、MFGベクター (ATCC No. 68754)、 α -SGCベクター (ATCC No. 68755)、LXSNベクター [バイオテクニクス (BioTechniques)、第7巻、第980～990頁 (1989年)]、タカラバイオ社製のpDON-5、pDON-A1-2、pME1-5レトロウイルスベクターやpLVSI-N-CMVレンチウイルスベクター、クロンテック社製のRetro-X Qベクターシリーズ、Lenti-Xベクターシ

リーズ等のベクターがある。

[0025] また、これらのベクターは、公知のパッケージング細胞株、例えば、PG 13 (ATCC CRL-10686)、PA317 (ATCC CRL-9078)、GP+E-86 (ATCC CRL-9642) や GP+envAm12 (ATCC CRL-9641)、[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第85巻、第6460~6464頁 (1988年)] に記載のφCRIP等の細胞株を使用することにより、調製することができる。また、組換えウイルスの構造タンパクを発現するパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクタープラスミドを293T細胞 (ATCC CRL-11268) やG3T-hi細胞 (タカラバイオ社製) 等に一過性にトランスフェクションを行い、その培養上清を回収することによっても調製することができる。

[0026] 本発明の遺伝子導入方法では、更に、レトロウイルス結合性物質を使用してもよい。本発明に使用されるレトロウイルス結合性物質は、レトロウイルスに結合親和性を示す物質であれば特に限定はなく、例えば、フィブロネクチン、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲン、ポリリジン、DEAE-デキストラン、及びこれらのフラグメントから選択された少なくとも一種の物質が例示される。これらの物質を化学的に修飾することにより、そのウイルスへの結合性を増強することも可能である (例えば特許文献2)。

[0027] フィブロネクチンやそのフラグメントは、レトロウイルス結合性と細胞結合性とを併せ持つ物質として、レトロウイルスによる遺伝子導入に好適である。フィブロネクチンやそのフラグメントは、例えば、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Bio Chem.)、第256巻、第7277頁 (1981年)、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell Biol.)、第102巻、第449頁 (1986年)、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、第105巻、第489頁 (1987年) に記

載の方法によって、天然起源の材料から実質的に純粋な形態で製造することができる。また、米国特許第5, 198, 423号に記載の方法により、組換えDNA技術を利用して製造することもできる。特に、レトロウイルス結合部位であるヘパリンーII領域を含むフィブロネクチンフラグメント、例えば、フィブロネクチンフラグメントCH-296、H-271、H-296、及びCH-271等の組換えポリペプチド、ならびにこれらを取得する方法は、米国特許第5, 198, 423号に詳細に記載されている。なお、上記のフィブロネクチンフラグメントのうちH-296はVLA-4への結合領域ポリペプチドを、CH-271はVLA-5への結合領域ペプチドを、また、CH-296はその両方を有している〔ネイチャー・メディシン (Nature Medicine)、第2巻、第876～882頁(1996年)〕。CH-296はレトロネクチン、RetroNectinの登録商標名で市販されている。

[0028] 本発明に使用される培養容器に特に限定はなく、細胞培養用バッグ、細胞培養用プレート、細胞培養用シャーレ、細胞培養用試験管、及び細胞培養用フラスコが例示される。培養容器の素材にも特に限定はなく、例えばプラスチック製又はガラス製の培養容器を本発明に使用できる。多量の細胞への遺伝子導入が望まれる場合には、細胞培養用バッグ、特にガス透過性の細胞培養用バッグが本発明に好適である。レトロウイルス結合性物質を培養容器の内面に固定化する場合、本発明を特に限定するものではないが、培養容器の素材としては、ポリスチレン、ポリエチレン、シクロオレフィン樹脂、フッ素樹脂が例示される。

[0029] レトロウイルス結合性物質の培養容器への固定化の方法は、物質の種類や使用する培養容器の種類によって適宜選択することができる。例えばレトロウイルス結合性物質がポリペプチドの場合は、培養容器表面への物理吸着により固定化することができる。また、架橋剤等を使用した共有結合によって、レトロウイルス結合性物質を培養容器に固定化してもよい。

[0030] 本発明の方法による遺伝子導入の標的となる細胞も特に制限はない。例え

ば、幹細胞（*stem cells*：造血幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞等）、造血細胞、単核細胞（末梢血単核細胞、臍帯血単核細胞等）、胚細胞、プライモディアル・ジャーム・セル（*primordial germ cell*）、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子、赤血球系前駆細胞、リンパ球母細胞、成熟血球、リンパ球、B細胞、T細胞、NK細胞、線維芽細胞、神経芽細胞、神経細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、癌細胞、骨髓腫細胞及び白血病細胞等を使用することができる。血液や骨髓より得られる造血系の細胞は入手が比較的容易であり、またその培養や維持の手法が確立されていることから、本発明の方法を利用するのに好適である。特に導入された遺伝子の生体内での長期にわたる発現が目的の場合には、多能性を有する幹細胞（造血幹細胞、間葉系幹細胞等）や種々の前駆細胞が標的細胞として適している。また、遺伝子治療法をAIDSの治療に適用する場合には、CD4陽性T細胞等の免疫系細胞やその前駆細胞が標的細胞として好適である。

[0031] T細胞又はその前駆細胞を標的細胞として本発明の遺伝子導入方法を実施する場合には、これら標的細胞の予備刺激（初期刺激とも言う）を行ってもよい。予備刺激の工程は、通常、CD3リガンドの存在下に前記標的細胞又は標的細胞を含有する細胞集団（PBMC等）を培養することにより実施される。CD3リガンドとしては、CD3に結合活性を有する物質であれば特に限定はないが、例えば抗CD3抗体、ConA、PHA、PMA+イオノマイシンなどが例示される。特に好適には抗CD3モノクローナル抗体、例えばOKT3 [サイエンス (Science)、第206巻、第347～349頁 (1979)] が本発明に使用される。また、CD3リガンドに加えてフィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を添加し、予備刺激を実施してもよい。T細胞又はその前駆細胞の培養に有用なフィブロネクチンやそのフラグメントは、例えば国際公開2008/111506号パンフレットに記載されている。さらに、前記の予備刺激の際には培地中にサイトカイン類（例えばIL-2等）やCD28リガンド等の副刺激因子を添

加してもよい。なお、前記の「CD3リガンド」及び「フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物」は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、及び閉鎖系のもののいずれをも含む）、又はビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。

[0032] 本発明の遺伝子導入方法において、ウイルスベクターによる遺伝子導入工程、すなわち標的細胞とウイルスベクターを接触させる工程は、上記のレチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含む培地中で標的細胞をウイルスベクターと共に培養することによって実施される。当該工程は、通常の細胞培養条件で行うことができる。例えば湿度95%、CO₂濃度5%での培養が例示されるが、本発明はこのような条件に限定されるものではない。当該工程は、例えば30～37℃で実施できるが、所望の標的細胞へのウイルスベクターによる遺伝子導入が達成できる範囲であれば前記の範囲以外の温度で実施してもよい。当該工程は、限定するものではないが、例えば、2時間～3日間、好ましくは3時間～2日、さらに好ましくは4～24時間実施される。

[0033] 以上のように、本発明は形質導入された細胞集団の製造方法を提供する。本発明により製造される細胞集団は、所望の外来遺伝子を保持する細胞の含有率が高いことから、当該外来遺伝子が治療上有効である種々の疾患の治療に有用である。すなわち、本発明により製造される細胞集団は、保持する外来遺伝子により付与される形質に応じて、種々の疾患、例えばがん、白血病、悪性腫瘍、肝炎、又は感染症疾患（例えばインフルエンザ、結核、HIV（Human Immunodeficiency Virus、ヒト免疫不全ウイルス）感染症、AIDS、MRSA感染症、VRE感染症、もしくは深在性真菌症）等の治療又は予防に使用することができる。

また、本発明は前記の細胞集団を有効成分として含有する前記疾患用の医薬（治療剤又は予防剤）を提供する。当該医薬は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された細胞集団を有効成分として、公

知の非経口投与に適した有機又は無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合し、点滴剤、注射剤として調製できる。なお、治療剤における本発明の細胞集団の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は適宜、決定することができる。

[0034] 例えば、CD4陽性T細胞を標的細胞とした遺伝子治療法は以下のような操作によって実施することができる。まず、ドナーよりCD4陽性T細胞を含有する材料、例えば、骨髓組織、末梢血液、臍帯血液等を採取する。これらの材料はそのまま遺伝子導入操作に用いることも可能であるが、通常は、密度勾配遠心分離等の方法により単核細胞画分を調製する。さらにCD4分子を指標とした細胞の精製、CD8陽性T細胞及び／又は単球の除去、ならびにCD4陽性T細胞数を拡大する培養操作を行ってもよい。これらの細胞集団について、必要に応じて適当な予備刺激（例えばCD3リガンド、CD28リガンド、又はIL-2による刺激）を行った後、本発明の方法により目的とする遺伝子が搭載された組換えレトロウイルスベクターを感染させる。こうして得られた遺伝子導入された細胞は、例えば、静脈内投与によってレシピエントに移植することができる。レシピエントは、好ましくはドナー自身であるが、同種異系移植を行うことも可能である。

[0035] 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法としては、患者において欠損しているか、異常が見られる遺伝子を補完するものがあり、例えば、ADA欠損症やゴーシェ病の遺伝子治療法がこれにあたる。この他、例えば、癌や白血病の治療に使用される化学療法剤による造血細胞の障害を緩和するために、造血幹細胞への薬剤耐性遺伝子の導入が行われることがある。

[0036] また、癌の遺伝子治療法としては、腫瘍抗原を認識するT細胞レセプターをコードする遺伝子を導入することにより、リンパ球に当該抗原を発現する癌細胞に対する特異的な細胞傷害活性を付与する方法が研究されている〔ジーン・セラピー（Gene Therapy）、第15巻、第695～699頁（2008年）〕。さらに、AIDSを遺伝子治療法によって治療しようという試みも行われている。この場合には、AIDSの原因であるHIV

が感染するCD4陽性T細胞等のT細胞に、HIVの複製や遺伝子発現を妨げるような核酸分子（一本鎖特異的エンドリボヌクレアーゼ、アンチセンス核酸、リボザイム等）をコードする遺伝子を導入することが考えられている（例えば、国際公開第2007/020873号パンフレット、ヒューマン・ジーン・セラピー（Human Gene Therapy）、第22巻、第35～43頁（2011年））。

実施例

[0037] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

[0038] 実施例1 ATRAとVPAを用いた遺伝子導入－1

[0039] (1) DON-ZsGreenレトロウイルスベクターの調製

pZsGreen Vector（クロンテック社製）を制限酵素BamHIとEcoRI（タカラバイオ社製）で切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、緑色蛍光タンパク質ZsGreenをコードする配列を含む約0.7kbpのフラグメントを回収した。回収したフラグメントをDNA Blunting Kit（タカラバイオ社製）を用いて末端平滑化後、pDON-A1 DNA（タカラバイオ社製）に挿入し、組換えレトロウイルスベクタープラスミドpDON-ZsGreenを取得した。次に当該プラスミドとRetrovirus Packaging Kit Eco（タカラバイオ社製）を用いてエコトロピックDON-ZsGreenウイルスを作製した。その後、これをGaLVレトロウイルスパッケージング細胞PG13に感染させた。感染細胞から高力価のウイルス産生細胞をクローニングしてレトロウイルスベクター産生細胞株PG13/DON-ZsGreenを樹立した。さらに当該産生細胞を用いて、5mM NaBを含有する培地で常法によりGaLV/DON-ZsGreenウイルス液を取得した（以下、DON-ZsGreenレトロウイルスベクターと称す）。

[0040] (2) レトロネクチン／抗CD3抗体固定化プレートの作製

フィブロネクチンフラグメントCH-296 [RetroNectin（

登録商標)、タカラバイオ社製)、以下レトロネクチンと記載する]を $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び抗CD3抗体(OKT3、ヤンセンファーマ株式会社)を $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにACD-A(テルモ社製)に溶解した。この溶解液を細胞培養用6ウェルプレート(BD Falcon社製)に $1\text{mL}/\text{ウェル}$ の量で加え、 37°C で5時間放置した。放置後、溶解液をとり除き、GT-T503培地(タカラバイオ社製)を用いて $1\text{mL}/\text{ウェル}$ の量で各プレートを2回ずつ洗浄した。こうして得られたプレートをレトロネクチン/抗CD3抗体固定化プレートとした。

[0041] (3) ウイルス結合プレートの作製

実施例1(1)で取得したウイルス液を10倍希釈したウイルス希釈液を調製した。このとき希釈には、ACD-Aを終濃度が5%となるように、またヒト血清アルブミン「アルブミナー25%」(CSLベーリング社製)をアルブミンの終濃度が2%になるように、それぞれ生理食塩水(テルモ社製)に添加したものをを用いた。次に、予めACD-Aで最終濃度 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように希釈したレトロネクチンを24ウェルノントリートメントプレート(BD Falcon社製)の各ウェルに 0.5mL ずつ添加して 4°C で一晩処理し、プレートからレトロネクチン溶液を取り除いた。さらに、ACD-Aを各ウェルに 0.5mL 添加して取り除くという洗浄作業を2回行った。このプレートの各ウェルに、前記のウイルス希釈液を 1mL ずつ添加し、遠心(32°C 、 $2000\times g$ 、2時間)した。遠心後、各ウェルよりウイルス希釈液上清を取り除き、ヒト血清アルブミン「アルブミナー25%」をアルブミンの終濃度が1.5%になるように生理食塩水に添加したものを 1mL ずつで各ウェルを3回洗浄した。こうして得られたプレートをウイルス結合プレートとした。

[0042] (4) 遺伝子導入用ヒト末梢血単核細胞の初期刺激培養

インフォームドコンセントの得られた健常人から調製したヒト末梢血単核細胞(PBMC)を $0.2\times 10^6\text{cells}/\text{mL}$ となるように0.6%自己血漿、 $600\text{IU}/\text{mL}$ IL-2(NOVARTIS社製)、0.2%

ヒト血清アルブミン「アルブミナー25%」、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ファンギゾン（ブリストルマイヤーズ社製）を含むGT-T503培地（以下、培養用培地と称す）に懸濁し、実施例1（2）で作製したレトロネクチン／抗CD3抗体固定化プレートに 6.7 mL ／ウェルとなるように加えた（PBMCの刺激開始）。プレートは CO_2 インキュベーター中、 37°C で4日間（PBMCの刺激開始後、第4日目まで）培養した。

[0043] （5）遺伝子導入操作

実施例1（3）で作製したウイルス結合プレートに、実施例1（4）で4日間刺激した細胞懸濁液を各ウェルに 0.95 mL （ $0.5 \times 10^6 \text{ cells}$ の細胞を含む）／ウェルとなるように加えた。この後、各ウェルの細胞懸濁液に、添加剤としてATRA（ナカライテスク社製）及び／又はVPA（和光純薬社製）を終濃度が表1記載の条件となるようにそれぞれ添加した。又、陰性対照として、添加剤を加えない細胞懸濁液（CM：Control Medium、以下同じ）及び実施例1（4）で4日間刺激した細胞懸濁液を非遺伝子導入細胞（NGMC：Non Gene Modified Cell、以下同じ）として準備した。これらプレートについてさらに CO_2 インキュベーター（ 37°C 、湿度95%、 CO_2 濃度5%）にて1日間培養を行った（PBMCの刺激開始後、第5日目まで）。培養後の上記プレートについて、各ウェルの細胞懸濁液 0.90 mL ずつを細胞培養用6ウェルプレートの各ウェルにそれぞれ播種し、さらに培養用培地 3.6 mL を各ウェルに加えて5倍希釈した後、 CO_2 インキュベーター（ 37°C 、湿度95%、 CO_2 濃度5%）にて1日間（PBMCの刺激開始後、第6日目まで）培養を行った。その後、細胞懸濁液 2.5 mL ずつを細胞培養用6ウェルプレートの各ウェルにそれぞれ播種し、さらに培養用培地 2.5 mL を各ウェルに加えて2倍希釈した後、 CO_2 インキュベーター（ 37°C 、湿度95%、 CO_2 濃度5%）にて4日間（PBMCの刺激開始後、第10日目まで）培養を行った。

[0044]

[表1]

添加剤の処理	ATRA 100 nM	VPA 600 μ M	VPA 6 mM
V-1		○	
V-2			○
AV-1	○	○	
AV-2	○		○
CM			

[0045] (6) フローサイトメトリー解析

PBMCの刺激開始後第10日目まで培養した細胞について、レトロウイルスによる遺伝子導入効率を調べるために、以下の手順により蛍光レポータータンパク質 (ZsGreen) の発現を調べた。まず、 0.5×10^6 cells分の細胞懸濁液をエッペンドルフチューブに移し、遠心 (4℃、5000×rpm、2分間) にて細胞を沈殿させた。上清を取り除いた後、沈殿した細胞は最終濃度0.5%ウシ血清アルブミン (以下、BSAと称す、シグマ社製) を含むリン酸バッファー (以下、PBSと称す、ギブコ社製) (以下、0.5%BSA/PBSと称す) 950 μ Lに懸濁し、遠心 (4℃、5000×rpm、2分間) にて再度細胞を沈殿させた。上清を再度取り除いた後、0.5%BSA/PBS 9 μ Lに、1 μ LのCD8-APCCy7 (ベクトン ディッキンソン社) を添加した溶液10 μ Lで懸濁し、30分間、4℃遮光にて反応させた。反応後、0.5%BSA/PBS 950 μ Lに懸濁し、遠心 (4℃、5000×rpm、2分間) にて再度細胞を沈殿させる操作を2回行った。その後、0.5%BSA/PBS 400 μ Lに懸濁した。こうして得られた遺伝子導入時に上記添加剤処理した培養細胞と、前記CMとNGMCを陰性対照としてフローサイトメトリー測定に供した。

[0046] フローサイトメトリー解析は、BD FACSCanto II フローサイトメーター (ベクトン ディッキンソン社) を用いて機器指示書に従って行った。ZsGreenの発現率 [以下、遺伝子導入効率 (GT%) と記載することがある] の測定では、初めに前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (

SSC) の2パラメータヒストグラム (x軸: FSC、y軸: SSC) 上で、目的細胞集団をゲートでくくる。そのゲート中の細胞集団をAPC-Cy7、ZsGreen検出パラメーターのヒストグラム (x軸: APC-Cy7の蛍光強度、y軸: ZsGreenの蛍光強度を示す) 上で、まず、アイソタイプコントロール (陰性対照) の測定結果を指標にCD8、ZsGreenを発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合 (%) を測定することにより遺伝子導入効率を求めた。

[0047] CD8陽性細胞中の遺伝子導入効率の測定結果を表2に示す。なお、表2に記載の「MFI」は、ZsGreen発現細胞集団の平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity) を示す。

[0048] [表2]

添加剤の処理	遺伝子導入効率 (GT%)	MFI
V-1	50.6	5169
V-2	38.1	29417
AV-1	52.5	9085
AV-2	43.2	42571
CM	48.2	3179
NGMC	0.0	0

[0049] 表2に示されるように、ATRAとVPAを併用することにより、陰性対照のCMと比較して、またVPA単独添加の条件と比較して遺伝子導入効率、及び導入遺伝子の発現が上昇した。

[0050] 実施例2 ATRAとVPAを用いた遺伝子導入-2

[0051] (1) MS-MA24-siTCRレトロウイルスベクターの調製

国際公開第2008/153029号パンフレット記載のコドン変換型TCR及びsiRNA共発現レトロウイルスベクター (MS-MA24-siTCR) を用いてHEK293T細胞 (ATCC CRL-11268) に、Retrovirus Packaging Kit Ecoを用いて製品

プロトコールに従いトランスフェクションし、各種エコトロピックウイルス上清液を獲得した。このウイルス上清液を $0.45\mu\text{m}$ フィルター（Millex HV、ミリポア社製）にてろ過し、GaLVレトロウイルスパッケージング細胞PG13にポリブレンを使用する方法により感染させ、限界希釈法により細胞のクローン化を行った。さらに当該産生細胞を用いて、 5mM NaBを含有する培地で常法によりGaLV／MS-MA24-siTCRウイルス液を取得した（以下、MS-MA24-siTCRレトロウイルスベクターと称す）。

[0052] (2) ウイルス結合プレートの作製

実施例1(3)と同様にしてウイルス結合プレートを作製した。ここで用いたウイルス液は、実施例1(1)で取得したウイルス液を10倍希釈したもの、及び実施例2(1)で取得したウイルス原液である。

[0053] (3) 遺伝子導入用ヒト末梢血単核細胞の初期刺激培養

実施例1(4)と同様の手順でPBMCの初期刺激培養を第4日目まで行った。

[0054] (4) 遺伝子導入操作

実施例2(2)で作製したウイルス結合プレートに、実施例2(3)で4日間刺激した細胞懸濁液を各ウェルに 1mL (0.5×10^6 cellsの細胞を含む)／ウェルとなるように加えた。この後、各ウェルの細胞懸濁液に各添加剤を終濃度が表3記載の条件になるようにそれぞれ添加した。陰性対照として、CM、及びNGMCを準備し、各細胞液についてさらに CO_2 インキュベーター (37°C 、湿度95%、 CO_2 濃度5%)にて4時間培養を行った。その後、実施例1(5)と同様にしてPBMCの刺激開始後、第10日目まで培養を行った。

[0055]

[表3]

添加剤の処理	ATRA 100 nM	VPA 60 μ M	VPA 600 μ M	VPA 6 mM
V2-1		○		
V2-2			○	
V2-3				○
AV2-1	○	○		
AV2-2	○		○	
AV2-3	○			○
CM				
NGMC				

[0056] (5) フローサイトメトリー解析（遺伝子導入効率）

遺伝子導入効率のフローサイトメトリー解析は、BD FACSCanto II フローサイトメーターを用いて、実施例1（6）と同様の手順で行った。

ZsGreenの発現率は、初めにFSC、SSCの2パラメータヒストグラム（x軸：FSC、y軸：SSC）上で、目的細胞集団をゲートでくくる。そのゲート中の細胞集団をZsGreen検出パラメーターのヒストグラム（x軸：細胞数、y軸：ZsGreenの蛍光強度を示す）上で、まず、アイソタイプコントロール（陰性対照）の測定結果を指標にZsGreenを発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。

[0057] ZsGreen発現遺伝子導入効率の測定結果を表4に示す。

[0058] TCRの発現率は以下のように求めた。レトロウイルスによる遺伝子導入効率を調べるために、実施例2（4）において7日まで培養した細胞をMAGE-A4テトラマーPE（ルードヴィッヒ社製）、及びHuman CD8-FITC（ベクトン デッキンソン社製）にて染色し、フローサイトメーターによりCD8陽性であって、かつテトラマー陽性である細胞の割合を測定した。

具体的には、感染培養後の細胞 0.5×10^6 cells をエッペンドルフチューブに移し、遠心（ 4°C 、 $5000 \times \text{rpm}$ 、2分間）にて細胞を沈殿させた。上清を取り除いた後、沈殿した細胞は $950 \mu\text{L}$ の $0.5\% \text{BSA} / \text{PBS}$ に懸濁し、遠心（ 4°C 、 $5000 \times \text{rpm}$ 、2分間）にて再度細胞を沈殿させた。上清を再度取り除いた後、 MAGE-A4 テトラマー-PE $1 \mu\text{L}$ に $0.5\% \text{BSA} / \text{PBS}$ を $8 \mu\text{L}$ 添加した混合液で懸濁し、30分間、 4°C で反応させた。その後、 Human CD8-FITC を $1 \mu\text{L}$ 加え、15分間、 4°C で反応させた。反応後、 $950 \mu\text{L}$ の $0.5\% \text{BSA} / \text{PBS}$ を添加し、遠心（ 4°C 、 $5000 \times \text{rpm}$ 、2分間）にて上清を取り除く工程を2回行った後、 $400 \mu\text{L}$ の $0.5\% \text{BSA} / \text{PBS}$ に懸濁し、この懸濁液をフローサイトメトリー測定に供した。TCRの発現率測定では、初めにFSC、SSCの2パラメータヒストグラム（x軸：FSC、y軸：SSC）上で、目的細胞集団をゲートでくくる。そのゲート中の細胞集団をFITC、PE検出パラメーターのヒストグラム（x軸：FITC、y軸：テトラマー-PEの蛍光強度を示す）上で、まず、アイソタイプコントロール（陰性対照）の測定結果を指標にCD8陽性、かつテトラマー陽性細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体のCD8陽性細胞のうち、ゲート領域の細胞の割合（%）を測定することによりTCRの発現率を求めた。

[0059] TCR遺伝子導入効率の測定結果を表4に示す。なお、表中のGT%は、CD8陽性細胞中のテトラマー陽性細胞の比率を示す。

[0060]

[表4]

添加剤の処理	Z s G r e e n		MS-MA24-s i TCR
	遺伝子導入効率 (GT%)	MF I	遺伝子導入効率 (GT%)
V2-1	30.4	1683	13.8
V2-2	33.4	2083	13.7
V2-3	40.8	21664	17.3
AV2-1	34.1	3889	12.7
AV2-2	39.0	5438	14.9
AV2-3	43.1	33086	19.3
CM	29.2	1689	14.7
NGMC	0.1	ND	0.0

[0061] 表4に示されるように、ATRAとVPAを併用することにより、陰性対照のCMと比較して、及びVPA単独添加の条件と比較して遺伝子導入効率、及び導入遺伝子の発現が上昇した。また、実施例1と比較して、処理時間を1日から4時間に短くすることで、高濃度のVPAにより、より高い効果が得られた。

[0062] (6) フローサイトメトリー解析（細胞表現型）

PBMCの刺激開始後第10日目まで培養したMS-MA24-s i TCR遺伝子導入細胞懸濁液について、細胞表現型を調べるために、以下の手順により分化に関与する細胞表面タンパク発現を調べた。まず、 0.5×10^6 cells分の細胞懸濁液をエッペンドルフチューブに移し、遠心（4℃、 $5000 \times \text{rpm}$ 、2分間）にて細胞を沈殿させた。上清を取り除いた後、沈殿した細胞は0.5%BSA/PBS $950 \mu\text{L}$ に懸濁し、遠心（4℃、 $5000 \times \text{rpm}$ 、2分間）にて再度細胞を沈殿させた。上清を再度取り除いた後、CD4-PECy7を $1 \mu\text{L}$ 、CD8-APCCy7を $1 \mu\text{L}$ 、CD45RA-PEを $1 \mu\text{L}$ 、CCR7-FITCを $2 \mu\text{L}$ （抗体は全てベクトンディッキンソン社）、0.5%BSA/PBS $5 \mu\text{L}$ を加えた混合溶液 $10 \mu\text{L}$ で懸濁し、30分間、4℃遮光下で反応させた。反応後、0.5%BSA

／PBS 950 μ L に懸濁し、遠心（4℃、5000×rpm、2分間）にて再度細胞を沈殿させる洗浄操作を2回行った。洗浄後、0.5%BSA／PBS 400 μ L に懸濁した。こうして得られた遺伝子導入時に上記添加剤処理した培養細胞と、CM及びNGMCを陰性対照としてフローサイトメトリ測定に供した。

[0063] フローサイトメトリ解析は、BD FACSCanto II フローサイトメーターを用いて機器指示書に従って行った。初めにFSC、SSCの2パラメータヒストグラム（x軸：FSC、y軸：SSC）上で、目的細胞集団をゲートでくくる。

CD8陽性細胞率は、そのゲート中の細胞集団をPECy7、APCCy7検出パラメーターのヒストグラム（x軸：PECy7の蛍光強度、y軸：APCCy7の蛍光強度を示す）上で、PECy7、APCCy7を発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。細胞表現型は、FSC、SSCで定義したゲート中の細胞集団をPE、FITC検出パラメーターのヒストグラム（x軸：PEの蛍光強度、y軸：FITCの蛍光強度を示す）上で、PE、FITCを発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。

[0064] 細胞表現型の測定結果を表5に示す。なお、CCR7＋／CD45RA＋はナイーブT細胞の、CCR7＋／CD45RA－はセントラルメモリーT細胞の、CCR7－／CD45RA－はエフェクターメモリーT細胞の表現型としてそれぞれ知られている。

[0065]

[表5]

添加剤の処理	細胞表現型 (%)					
	CD4	CD8	CCR7+/CD45RA+	CCR7+/CD45RA-	CCR7-/CD45RA-	CCR7-/CD45RA+
V 2-1	3 5. 4	6 1. 9	3 2. 9	5. 8	2 1. 3	4 0. 0
V 2-2	3 4. 6	6 2. 7	3 2. 5	6. 2	2 3. 4	3 8. 0
V 2-3	3 4. 7	6 2. 4	2 0. 4	2 1. 3	2 4. 4	3 4. 0
A V 2-1	3 7. 7	5 9. 5	4. 4	1 2. 3	6 3. 5	1 9. 8
A V 2-2	3 7. 4	6 0. 1	6. 2	6. 2	5 9. 3	2 2. 6
A V 2-3	4 1. 8	5 5. 0	3. 3	3 3. 7	5 5. 9	7. 1
CM	3 5. 0	6 2. 6	3 1. 6	5. 2	2 1. 5	4 1. 6

[0066] 表5に示されるように、高濃度のV P AとA T R Aを併用することにより、陰性対照と比較してセントラルメモリーT細胞の比率が上昇した。

[0067] 実施例3 A T R AとN a Bを用いた遺伝子導入

[0068] (1) 抗C D 3抗体固定化プレート、レトロネクチン／抗C D 3抗体固定化プレートの調製

実施例1 (2)と同様にして、レトロネクチン／抗C D 3抗体固定化プレートを作製した。また、同様の手順でO K T 3のみを5 μ g / m LとなるようにA C D - Aに溶解して、抗C D 3抗体固定化プレートを作製した。

[0069] (2) ウイルス結合プレートの作製

実施例1 (3)と同様にしてウイルス結合プレートを作製した。ここで使用したウイルス希釈液は実施例1 (1)で取得したウイルス液を希釈用溶液にて20倍希釈したものである。

[0070] (3) 遺伝子導入用ヒト末梢血単核細胞の初期刺激培養

実施例1 (4)と同様にしてP B M C細胞液を調製し、実施例3 (1)で作製したレトロネクチン／抗C D 3抗体固定化プレート、抗C D 3抗体固定化プレートに6. 7 m L / ウェルとなるように加えた (P B M Cの刺激開始)。プレートはC O ₂ インキュベーター中、37℃で4日間 (P B M Cの刺激開始後、第4日目まで) 培養した。

[0071] (4) 遺伝子導入操作

実施例3(2)で作製したウイルス結合プレートに、実施例3(3)で4日間刺激した細胞懸濁液を各ウェルに1mL (0.5×10^6 cellsの細胞を含む) /ウェルとなるように加えた。この後、各ウェルの細胞懸濁液に各添加剤として、実施例1(5)記載のATRA及び／又はNaB(和光純薬製)をPBS(ギブコ社製)に溶解させ、500mMに調製後、0.22μmフィルター(ミリポア社製)ろ過した溶液を表6記載の条件となるように添加した。陰性対照として、CM、及びNGMCを準備し、各細胞液についてさらにCO₂インキュベーター(37℃、湿度95%、CO₂濃度5%)にて4時間培養を行った。その後、実施例1(5)と同様にしてPBMCの刺激開始後、第10日目まで培養を行った。

[0072] [表6]

添加剤の処理	ATRA 100nM	NaB 1.25mM	NaB 5mM
N-1		○	
N-2			○
AN-1	○	○	
AN-2	○		○
CM			
NGMC			

[0073] (5) フローサイトメトリー解析

実施例2(5)、(6)と同様にして、PBMCの刺激開始後第10日目まで培養した細胞懸濁液について遺伝子導入効率、及び分化に関与する細胞表面タンパクの発現を調べた。

[0074] フローサイトメトリー解析は、BD FACSCanto II フローサイトメーターを用いて機器指示書に従い行った。初めにFSC、SSCの2パラメータヒストグラム(x軸:FSC、y軸:SSC)上で、目的細胞集団をゲートでくくる。

CD4、およびCD8陽性細胞率は、そのゲート中の細胞集団をPECy7

、APCCy7検出パラメーターのヒストグラム（x軸：PECy7の蛍光強度、y軸：APCCy7の蛍光強度を示す）上で、PECy7、APCCy7を発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。

細胞表現型は、FSC、SSCで定義したゲート中の細胞集団をPE、APC検出パラメーターのヒストグラム（x軸：PEの蛍光強度、y軸：APCの蛍光強度を示す）上で、PE、APCを発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。

ZsGreenの発現率は、FSC、SSCの2パラメータヒストグラム（x軸：FSC、y軸：SSC）上で、目的細胞集団をゲートでくくる。そのゲート中の細胞集団をZsGreen検出パラメーターのヒストグラム（x軸：細胞数、y軸：ZsGreenの蛍光強度を示す）上で、まず、アイソタイプコントロール（陰性対照）の測定結果を指標にZsGreenを発現する細胞集団のゲート領域を設定し、次に被検体の細胞のうちゲート領域の細胞の割合（％）を測定することにより求めた。

[0075] 遺伝子導入効率の測定結果を表7に示す。

[0076] [表7]

添加剤の処理	遺伝子導入効率 (GT%)		MFI	
	RN/ OKT3	OKT3	RN/ OKT3	OKT3
N-1	38.6	44.2	3890	4674
N-2	38.3	52.6	13411	26835
AN-1	40.4	46.3	8616	9125
AN-2	39.5	58.9	23176	38152
CM	26.8	32.9	1289	1401
NGMC	0.0	0.0	ND	ND

[0077] 表7に示されるように、ATRAとNaBを併用することにより、陰性対照のCMと比較して、及びNaB単独添加の条件と比較して遺伝子導入効率

、及び導入遺伝子の発現が上昇した。

[0078] 細胞表現型の測定結果を表 8、9 に示す。

[0079] [表8]

添加剤 の処理	R N / O K T 3 刺激 細胞表現型 (%)					
	CD4	CD8	CCR7+/ CD45RA+	CCR7+/ CD45RA-	CCR7-/ CD45RA-	CCR7-/ CD45RA+
N-1	34.5	58.3	35.8	22.5	30.2	11.4
N-2	41.9	54.5	19.5	39.4	37.3	3.8
AN-1	41.5	53.4	17.6	31.2	47.2	4.0
AN-2	42.7	52.6	10.9	44.4	43.3	1.5
CM	37.6	55.5	38.8	20.3	28.0	12.9
NGMC	38.5	54.5	37.4	19.5	29.8	13.3

[0080] [表9]

添加剤 の処理	O K T 3 刺激 細胞表現型 (%)					
	CD4	CD8	CCR7+/ CD45RA+	CCR7+/ CD45RA-	CCR7-/ CD45RA-	CCR7-/ CD45RA+
N-1	35.3	54.2	19.5	31.0	42.4	7.2
N-2	53.1	39.3	8.3	28.4	58.4	4.9
AN-1	34.9	54.1	10.5	38.2	48.6	2.8
AN-2	41.1	49.8	4.0	31.4	62.1	2.5
CM	36.2	54.3	41.8	22.2	22.9	13.1
NGMC	37.4	52.9	36.9	20.6	27.8	14.7

[0081] 表 8、9 に示されるように、高濃度の N a B と A T R A を併用することにより、陰性対照の CM と比較して、及び N a B 単独添加の条件と比較してセントラルメモリー T 細胞の比率が上昇した。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明により、ウイルスによる効率的な遺伝子導入、導入遺伝子の高発現、および所望の表現型の細胞を高い比率で含む細胞集団の製造方法が提供される。本発明によれば、遺伝子の導入効率及び導入後の発現の制御が可能であり、少量のベクターにより所望の遺伝子導入細胞の調製が可能となり、生

産コストの削減、及び目的遺伝子の効率的な機能発揮等が実現可能である。
本発明は、特に医学、細胞工学、遺伝子工学、及び発生工学等の分野において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] ウイルスベクターによる標的細胞への外来遺伝子の導入方法であって、少なくとも外来遺伝子の導入時に標的細胞が、有効成分としてレチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含む培地中に存在している工程を包含する方法。
- [請求項2] 標的細胞がT細胞及び／又はT細胞に分化しうる前駆細胞である請求項1記載の方法。
- [請求項3] ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである請求項1～2いずれか記載の方法。
- [請求項4] ヒストン脱アセチル化酵素阻害物質がトリコスタチンA、酪酸ナトリウム、又はバルプロ酸から選択される少なくとも1種の物質である請求項1～3いずれか記載の方法。
- [請求項5] 請求項1～4いずれか記載の方法で標的細胞に外来遺伝子を導入する工程を包含する、形質導入された細胞集団の製造方法。
- [請求項6] 請求項5記載の方法で得られた形質導入された細胞集団。
- [請求項7] 医薬に使用するための請求項6記載の細胞集団。
- [請求項8] 医薬の製造に用いる請求項6記載の細胞集団。
- [請求項9] 請求項6記載の細胞集団を有効成分として含有する医薬。
- [請求項10] 対象に有効量の請求項9記載の医薬を投与する工程を含む疾病の治療方法又は予防方法。
- [請求項11] 有効成分として、レチノイン酸類及びヒストン脱アセチル化酵素阻害物質を含むことを特徴とする外来遺伝子の導入用培地。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/057858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)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)

C12N15/09, A61K35/12, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/18, A61P35/00, 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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Science Direct, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2011/024791 A1 (Takara Bio Inc.), 03 March 2011 (03.03.2011), abstract; claims; paragraphs [0138], [0153], [0163] & EP 2471901 A1 & US 2012-0142109 A1	6-9/1-5, 11
Y	Yasushi KANEDA, "Gan Idenshi Chiryo no Tameno Vector Kaihatsu no Genjo", Biotherapy, 2006, vol.20, pages 261 to 269	1-9, 11
Y	WO 2009/048024 A1 (Hiroshima University), 16 April 2009 (16.04.2009), paragraphs [0052] to [0054]; example 3 (Family: none)	1-9, 11



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
24 May, 2013 (24.05.13)

Date of mailing of the international search report
04 June, 2013 (04.06.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/057858

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 2005-519620 A (Ark Therapeutics Ltd.), 07 July 2005 (07.07.2005), paragraph [0053] & EP 1483391 A & US 2005-0201983 A1	1-9, 11
Y	JP 2002-527101 A (Novartis AG.), 27 August 2002 (27.08.2002), paragraph [0009] & EP 1129175 A	1-9, 11
X/A	JP 2011-526786 A (Centocor Ortho Biotech Inc.), 20 October 2011 (20.10.2011), claim 1; paragraph [0222] & EP 2310492 A & US 2010-0015711 A1	11/1-9
X/A	WO 2001/096532 A2 (DOMINKO Tanja), 20 December 2001 (20.12.2001), claims 32, 37 & US 2002-0090722 A1	11/1-9
X/A	JP 2004-535809 A (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)), 02 December 2004 (02.12.2004), claims 1, 12, 17, 19 & EP 1404816 A & US 2005-0064594 A1	11/1-9
A	TOBIAS CA et al., Improved Recombinant Retroviral Titers Utilizing Trichostatin A, BioTechniques, 2000, Vol.29, p.884-890	1-9, 11
A	OLSEN JC et al., Use of Sodium Butyrate to Enhance Production of Retroviral Vectors Expressing CFTR cDNA, Hum Gene Ther., 1995, Vol.6, p.1195-1202	1-9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/057858

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K35/12, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/18, A61P35/00, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, Science Direct, WPI

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/Y	WO 2011/024791 A1 (タカラバイオ株式会社) 2011.03.03, 要約、特許請求の範囲、[0138]、[0153]、[0163] & EP 2471901 A1 & US 2012-0142109 A1	6-9/1-5, 11
Y	金田 安史, がん遺伝子治療のためのベクター開発の現状, Biotherapy, 2006, Vol. 20, p. 261-269	1-9, 11
Y	WO 2009/048024 A1 (国立大学法人広島大学) 2009.04.16, [0052]-[0054]、実施例 3 (ファミリーなし)	1-9, 11

☒ 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

2 4 . 0 5 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 4 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

北田 祐介

4 N

4 8 6 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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
Y	JP 2005-519620 A (アーク・セラピューティックス・リミテッド) 2005.07.07, 【0053】 & EP 1483391 A & US 2005-0201983 A1	1-9, 11
Y	JP 2002-527101 A (ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト) 2002.08.27, 【0009】 & EP 1129175 A	1-9, 11
X/A	JP 2011-526786 A (セントコア・オーソ・バイオテック・インコー ポレーテッド) 2011.10.20, 請求項1、【0222】 & EP 2310492 A & US 2010-0015711 A1	11/1-9
X/A	WO 2001/096532 A2 (DOMINKO Tanja) 2001.12.20, 請求項32、3 7 & US 2002-0090722 A1	11/1-9
X/A	JP 2004-535809 A (アーンステイテュ ナシオナル ド ラ サ ント エ ド ラ ルシエルシエ メディカル (イー. エヌ. エ ス. ウー. エール. エナム.)) 2004.12.02, 請求項1、12、17、 19 & EP 1404816 A & US 2005-0064594 A1	11/1-9
A	TOBIAS CA et al., Improved Recombinant Retroviral Titers Utilizing Trichostatin A, BioTechniques, 2000, Vol.29, p.884-890	1-9, 11
A	OLSEN JC et al., Use of Sodium Butyrate to Enhance Production of Retroviral Vectors Expressing CFTR cDNA, Hum Gene Ther., 1995, Vol.6, p.1195-1202	1-9, 11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項10は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。