(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
2024年8月15日(15.08.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/166936 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/19* (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01) *C12N 15/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/0786* (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/004080

(22) 国際出願日： 2024年2月7日(07.02.2024)

(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 2023-017913 2023年2月8日(08.02.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 新居 輝樹(**NII Teruki**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 谷戸 謙太(**TANITO Kenta**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 片山 佳樹(**KATAYAMA Yoshiki**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

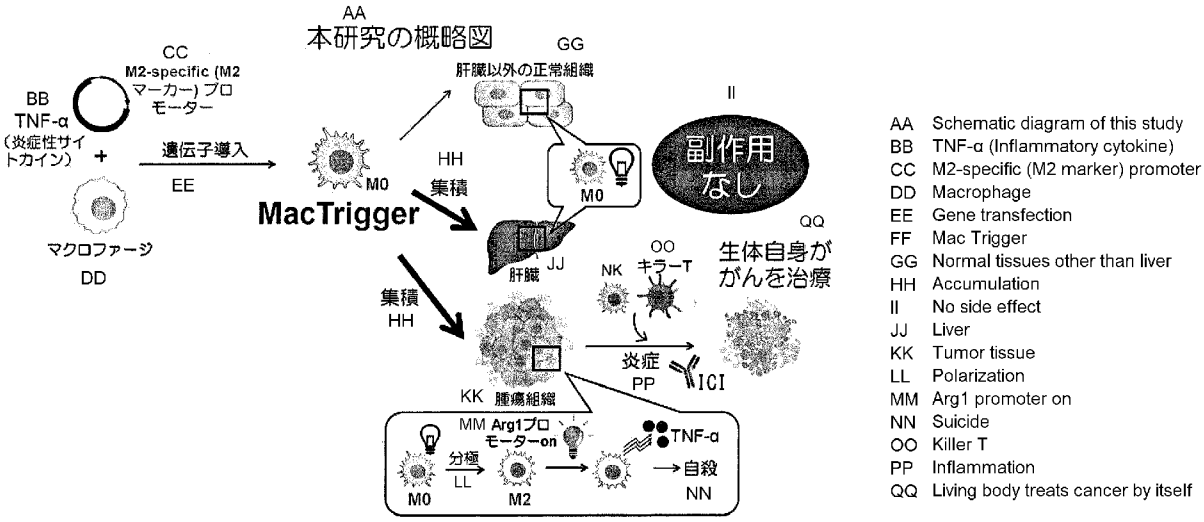
(74) 代理人: 森田 裕(**MORITA Yutaka**); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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,

WO 2024/166936 A1

(54) **Title:** CELL CAPABLE OF BEING DIFFERENTIATED INTO M2 MACROPHAGE IN TUMOR TISSUE AND HAVING PROPERTY SUCH THAT M2 MACROPHAGE DIFFERENTIATED FROM SAID CELL EXPRESS INFLAMMATORY CYTOKINE, AND COMPOSITION CONTAINING SAID CELL

(54) 発明の名称： 腫瘍組織内においてＭ２マクロファージに分化することができ、Ｍ２マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物



AA Schematic diagram of this study
BB TNF-α (Inflammatory cytokine)
CC M2-specific (M2 marker) promoter
DD Macrophage
EE Gene transfection
FF Mac Trigger
GG Normal tissues other than liver
HH Accumulation
II No side effect
JJ Liver
KK Tumor tissue
LL Polarization
MM Arg1 promoter on
NN Suicide
OO Killer T
PP Inflammation
QQ Living body treats cancer by itself

(57) **Abstract:** The present disclosure provides: a cell which can be differentiated into an M2 macrophage in a tumor tissue and has a property such that an M2 macrophage differentiated from the cell can express an inflammatory cytokine; and a composition containing the cell.

(57) 要約：本開示は、腫瘍組織内においてＭ２マクロファージに分化することができ、Ｍ２マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物を提供する。

［続葉有］

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

明　細　書

発明の名称 ：

腫瘍組織内においてＭ２マクロファージに分化することができ、Ｍ２マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物

技術分野

[0001] 本開示は、腫瘍組織内においてＭ２マクロファージに分化することができ、Ｍ２マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物（例えば、がんを処置することに用いる医薬組成物）に関する。

背景技術

[0002] 抗がん剤を用いた現在のがん治療では、一定の治療効果を得るために、通常、薬剤を何度も（例えば２週間おき）、あるいは高用量で投与している［１－３］。これは、腫瘍組織での薬物代謝や薬効低下によるものである［４，５］。しかし、薬物投与量を多くすれば高い効果が得られる反面、副作用のリスクも高くなる［６，７］。このような大きなリスクと負担から、薬物に依存しないがん治療が求められている。このような背景から、がん免疫療法は有望な解決策のひとつとされている。

[0003] しかし、通常、腫瘍組織は免疫抑制的であり、腫瘍は免疫系から「異物」として認識されない［８－１３］。このため、がん免疫療法は十分に有効とはなっていない。これは主に、Ｍ２マクロファージ（抗炎症性）などの腫瘍内間質細胞や、インターロイキン（ＩＬ）－１０やトランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）などの抗炎症性サイトカインを分泌する制御性Ｔ細胞によるものである［８，１４］。

[0004] 腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）は、最も重要な炎症性サイトカインの一つであり、周辺組織の免疫活性化作用に大きな役割を担っている［１５，１６］。ＴＮＦ－αがＴＮＦ受容体１および２に結合すると、核因子κＢ（ＮＦ

－κＢ）経路などのシグナル伝達カスケードを活性化し、ＩＬ－６やＩＬ－１などの炎症性サイトカインを発現させる［１６－１９］。これらの炎症性サイトカインは、Ｍ１マクロファージを誘導したり（炎症性）、他の免疫細胞を活性化して、組織を炎症性環境に変化させる［１５］。このようなＴＮＦ－αの炎症誘発機能は、生体自身による異物のクリアランスに基づくがん治療にとって魅力的であるが、治療域をはるかに下回る量であっても、全身投与後に重度の毒性を示すことが、臨床応用を阻んでいるのが現状である［２０］。さらに、体内に投与されたＴＮＦ－αの半減期は約１５～３０分であるため、腫瘍組織に十分なＴＮＦ－αを送達することは困難である［２１，２２］。

[0005] この問題に対して、最近、ＴＮＦ－α－抗体結合体が腫瘍組織に効率的にＴＮＦ－αを送達することが報告されている［２３，２４］。これらの技術は、がん細胞に発現する抗原に特異的にＴＮＦ－αを送達することができるが、抗原に変異や欠損がある場合には効果が大幅に減少するため、技術的な改善の余地が残されている［２５，２６］。

[0006] マクロファージは主要な免疫細胞の一つであり、組織における炎症と免疫反応に重要な役割を果たす［２７］。特に腫瘍組織におけるマクロファージの大きな特徴として、（１）マクロファージは、癌細胞や間質細胞から分泌されるＣ－Ｃケモカインリガンド２（ＣＣＬ２）や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を介して腫瘍組織へ移動すること［２８，２９］、（２）腫瘍組織においてマクロファージが抗炎症性Ｍ２表現型に分極し得ることが挙げられる［１８，３０，３１］。マクロファージは、組織環境の炎症状態に応じてＭ１またはＭ２表現型に変化し、炎症環境を制御している。Ｍ２マクロファージは、創傷治癒、組織再生、および免疫抑制に関与している［３０，３２］。特に腫瘍組織では、マクロファージがＭ２マクロファージに極性化し、免疫抑制環境の構築に重要な役割を果たす［３０］。

[0007] さらに、マウスのＭ２マクロファージは、アルギナーゼ１（Ａｒｇ１）活

性が非常に高いことが知られている［３３］。Ａｒｇ１は、アルギニンの尿素とオルニチンへの加水分解を触媒する。このため、アルギニンの量が少なくなり、免疫抑制が促進される［３４］。Ａｒｇ１はＭ０やＭ１マクロファージではあまり発現しないため、Ａｒｇ１活性はマウスＭ２表現型を識別するための重要なマーカーの１つである［３５］。

発明の概要

[0008] 本開示は、腫瘍組織内においてＭ２マクロファージに分化することができ、Ｍ２マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物を提供する。

[0009] 本開示によれば、例えば、以下の発明が提供される。

（１）Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞であって、制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる、細胞。

（２）Ｍ０マクロファージ、単球、共通単球前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、骨髄系前駆細胞、および造血幹細胞、並びに造血幹細胞からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞、からなる群から選択されるいずれかの細胞である、上記（１）に記載の細胞。

（３）ｉＮＯＳ、ＣＤ２０６、およびＡｒｇ－１陰性のマクロファージである、上記（１）または（２）に記載の細胞。

（４）単球からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞である、上記（１）～（３）のいずれかに記載の細胞。

（５）炎症性サイトカインが、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１７、およびＩＬ－２３からなる群から選択される炎症性サイトカインである、上記（１）～（４）のいずれかに記載の細胞。

（６）炎症性サイトカインが、ＴＮＦ－αである、上記（１）～（５）のいずれかに記載の細胞。

（７）制御配列が、Ｍ２マクロファージ特異的に前記炎症性サイトカインを発現する、上記（１）～（６）のいずれかに記載の細胞。

（８）制御配列が、ＣＤ１６３、ＣＤ２００　Ｒ１、ＣＤ３０１、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＤ２０９、デクチン－１、Ｆｃｅ　ＲＩａ、ＩＬ－１ＲＩＩ、ＣＤ２０６、アルギナーゼ１、ＩＦＲ４、ＰＰＡＲγ、ＳＴＡＴ６、ＦＩＺＺＩ、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＣＬ１、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ２２、ＣＣＣＬ２３、ＣＣＬ２４、ＣＣＬ２６、およびＹＭ１からなる群からなる遺伝子の制御配列であるか、または、好ましくはＣＣＬ－２２、ＬＯＸ、ＣＩＳＨ、ＦＣＥＲ１５、ＡＬＯＸ１５、Ｆ１３Ａ１、ＩＤＯ１、ＭＭＰ１、ＡＬＤＨ１Ａ２、ＣＤ２０９、ＴＧＭ２、ＶＣＡＭ１、ＭＭＰ１２、及びＳＰＩＮＴ２からなる群から選択される遺伝子の制御配列である、上記（１）～（７）のいずれかに記載の細胞。

（９）上記（１）～（８）のいずれかに記載の細胞を含む組成物。

（１０）がんを処置することに用いるための、上記（９）に記載の組成物。

（１１）がんを有する対象において、がんを処置することに用いるための、上記（９）に記載の組成物。

（１２）がんを有する対象が、がん免疫療法を受けた対象、がん免疫療法を受ける予定を有する対象、または受けている対象である、上記（１１）に記載の組成物。

（１３）がん免疫療法が、キメラ抗原受容体発現細胞療法、Ｔ細胞養子免疫療法、および免疫チェックポイント阻害剤療法からなる群から選択されるいずれか１以上である、上記（１２）に記載の組成物。

（１４）がん免疫療法と組み合わせるための、上記（１１）に記載の組成物。

（１５）がんが、免疫抑制的な環境を有する、上記（１０）～（１４）のいずれかに記載の組成物。

（１６）がん組織中のＭ１マクロファージの個数／Ｍ２マクロファージの個数比が１未満である、上記（１０）～（１５）のいずれかに記載の組成物。

（１７）対象が、免疫チェックポイント阻害剤療法に耐性を有する、上記（１０）～（１６）のいずれかに記載の組成物。

（１８）ヒト細胞である、上記（１）～（８）のいずれかに記載の細胞。

（１９）細胞がヒト細胞である、上記（１０）～（１８）のいずれかに記載の組成物。

（２０）がんを有する対象においてがんを処置する方法であって、前記対象に上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の有効量を投与して、前記対象が有する少なくとも１つの免疫抑制的な腫瘍をより炎症性にすること（例えば、前記腫瘍中のＭ１／Ｍ２マクロファージ個数比を増大させること）と、前記対象（好ましくは、より炎症性になった腫瘍を有する前記対象）に対して有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む、方法。

（２１）上記（２０）に記載の方法において用いるための、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の有効量を含む、組成物。

（２２）上記（２０）に記載の方法において用いるための、免疫チェックポイント阻害剤の有効量を含む、組成物。

（２３）上記（２０）に記載の方法において用いるための、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の有効量と、免疫チェックポイント阻害剤の有効量を含む、キット。

（２４）上記（２０）に記載の方法において用いるための、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の有効量を含む医薬組成物と、免疫チェックポイント阻害剤の有効量を含む医薬組成物を含む、キット。

（２５）上記（２０）に記載の方法において用いるための、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の有効量と、免疫チェックポイント阻害剤の有効量を含む、医薬組成物。

（２６）上記組成物またはキットの製造における、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞の使用。

（２７）上記組成物またはキットの製造における、がん免疫療法薬（例えば

、免疫チェックポイント阻害剤）の使用。

（２８）上記組成物またはキットの製造における、上記（１）～（８）および（１８）のいずれかに記載の細胞、およびがん免疫療法薬（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）の使用。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、腫瘍組織内は、免疫抑制的環境であり、制御性Ｔ細胞およびＭ２マクロファージが存在し、Ｔ細胞の浸潤が少ないことを示す。

[図2]図２は、腫瘍組織が炎症性環境下に置かれると個体に元々備わっていた免疫の効果により腫瘍組織が縮小または消滅しうることを示す。

[図3]図３は、マクロファージが腫瘍組織に遊走し、腫瘍組織内でＭ２マクロファージへ分極することを示す。

[図4]図４は、正常組織においてＭ０であるマクロファージが、腫瘍組織ではＭ２型へ分極することを示す。

[図5A]図５Ａは、Ｍ２特異的プロモーターの制御下に炎症性サイトカイン（例えばＴＮＦ－α）をコードする遺伝子を有する核酸をＭ０マクロファージに導入し、その後、Ｍ２マクロファージに誘導して、炎症性サイトカイン（例えば、ＴＮＦ－α）の発現を評価するスキームを示す。

[図5B]図５Ｂは、Ｍ２誘導サイトカインであるＩＬ－４、またはＩＬ－１３で処理したＭ０マクロファージがＭ２マクロファージに分化し、Ｍ２特異的にＴＮＦ－αを産生すること、および、がん細胞の培養上清（ＴＣＭ）で処理したＭ０マクロファージがＭ２マクロファージに分化し、Ｍ２特異的にＴＮＦ－αを産生することを示す。

[図5C]図５Ｃは、Ｍ２誘導サイトカインであるＩＬ－４、またはＩＬ－１３で処理したＭ０マクロファージがＭ２マクロファージに分化し、Ｍ２特異的プロモーターに作動可能に連結した外来遺伝子に由来するサイトカイン（ＩＬ－２およびＩＬ－１２）をＭ２特異的に産生することを示す。

[図6A]図６Ａは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の腫瘍組織においてＭ１マーカーが増強することを示す。

[図6B]図６Ｂは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の腫瘍組織におけるＭ１／Ｍ２比の増大を示す。

[図6C]図６Ｃは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒが腫瘍組織においてＭ２マクロファージに分極し、腫瘍組織においてＴＮＦ－αを分泌するようになることを示す。

[図7A]図７Ａは、担がんマウスにＭａｃＴｒｉｇｇｅｒを投与して、腫瘍サイズを測定するスキームを示す。

[図7B]図７Ｂは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群における腫瘍サイズの経時変化と、生存曲線を示す。

[図7C]図７Ｃは、Ｍ２誘導サイトカイン存在下またはＴＣＭ存在下で培養したＭａｃＴｒｉｇｇｅｒの細胞生存率の推移を示すインビトロ実験の結果である。

[図7D]図７Ｄは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の腫瘍組織における細胞増殖マーカーＫｉ６７の発現を示す。

[図7E]図７Ｅは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の体重変化の推移を示す。

[図8A]図８Ａは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の腫瘍組織内におけるＮＫ細胞と細胞傷害性Ｔ細胞の割合を求めるスキームである。

[図8B]図８Ｂは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の腫瘍組織内におけるＮＫ細胞と細胞傷害性Ｔ細胞の割合を示す。

[図9A]図９Ａは、VT-680標識マクロファージ投与後のマウスの体内におけるVT-680標識マクロファージの動態を示す。

[図9B]図９Ｂは、VT-680標識マクロファージ投与後のマウスの非腫瘍組織と腫瘍組織のそれぞれにおけるVT-680標識マクロファージの存在量を示す。

[図9C]図９Ｃは、VT-680標識マクロファージ投与後のマウスの各組織におけるVT-680標識マクロファージの存在量を示す。

[図10A]図１０Ａは、マクロファージ投与群の腫瘍組織および肝臓における細胞の解析スキームを示す。

[図10B]図１０Ｂは、マクロファージ投与マウスにおけるＡＳＴ活性を示す。

[図10C]図１０Ｃは、マクロファージ投与群の腫瘍組織および肝臓におけるＣＤ２０６（Ｍ２マーカー）の発現量を示す。

[図10D]図１０Ｄは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群における肝肥大の有無および血中ＡＳＴ値を示す。

[図10E]図１０Ｅは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与群の肝臓における免疫細胞の浸潤の程度を示す。

[図11A]図１１Ａは、担がん操作１０日後のより大きなサイズを有する腫瘍に対するＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与の効果を示す。左パネルは腫瘍体積の経時変化を示し、右パネルは腫瘍におけるＭ１マクロファージ／Ｍ２マクロファージ比を示す。

[図11B]図１１Ｂは、4T1細胞またはColon-26細胞をグラフトした担がんマウスに対するＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与の効果を示す。図１１Ｂでは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与後の腫瘍体積の経時変化が示されている。

[図12A]図１２Ａは、免疫チェックポイント阻害剤耐性を有する腫瘍細胞をグラフトした担がんマウスにおけるＭａｃＴｒｉｇｇｅｒと抗ＰＤ－１抗体の併用効果を示す。図１２Ａでは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与後の腫瘍体積の経時変化が示されている。

[図12B]図１２Ｂは、ＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与後のＣＤ４単独陽性Ｔ細胞におけるＰＤ－１陽性細胞の割合の変化を示す。

[図12C]図１２Ｃは、免疫チェックポイント阻害剤耐性を有する腫瘍細胞をグラフトした担がんマウスにおけるＭａｃＴｒｉｇｇｅｒと抗ＰＤ－１抗体の併用後の体重変化を示す。

[図12D]図１２Ｄは、図１２Ｄは、免疫チェックポイント阻害剤耐性を有する腫瘍細胞をグラフトした担がんマウスにおけるＭａｃＴｒｉｇｇｅｒと抗ＰＤ－１抗体の併用の肝臓重量（左）および脾臓重量（右）に対する影響を示す。

[図13]図１３は、トリプルネガティブ乳がん細胞担持マウスに対するＭａｃＴｒｉｇｇｅｒ投与、およびＭａｃＴｒｉｇｇｅｒと抗ＰＤ－１抗体の併用

投与の効果を示す。図１３では、投与後の腫瘍体積の経時変化が示されている。

[図14A]図１４Ａはヒトマクロファージにおける遺伝子発現量の比（M2における発現量/M0における発現量）を示す。****はp<0.001を表す。

[図14B]図１４Ｂはヒトマクロファージにおける遺伝子発現量の比（M2における発現量/M1における発現量）を示す。****はp<0.001を表す。

[図14C]図１４Ｃはヒトマクロファージにおける遺伝子発現量の比（M2における発現量/M0における発現量）を示す。****はp<0.001を表す。

[図15]図１５は、ヒトＭａｃＴｒｉｇｇｅｒによるＭ２マクロファージ特異的なサイトカイン産生を示す。

[図16]図１６は、本開示におけるがんの治療戦略の概略図を示す。

発明の具体的な説明

[0011] 本発明では、「対象」は、脊椎動物であり、例えば、鳥類または哺乳動物、例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、イヌ、およびネコ、並びにサル、チンパンジ、ゴリラ、オランウータン、ボノボ、ヒトなどの霊長類、特に、ヒトが挙げられる。本明細書では、対象は上述のようにヒトを含む意味で用いられ、ヒトを排除する場合には、用語「非ヒト」を用いる。

[0012] 本明細書では、「処置」とは、予防的処置および治療的処置を意味し得る。予防的処置は、病気の発症を防止すること、発症を遅延させること、発症率を低下させること、を含む意味で用いられる。治療的処置は、病気の悪化の速度の低下、悪化の遅延、悪化の防止、病気の症状の軽減、病気の治癒、および病気の寛解を含む意味で用いられる。

[0013] 本明細書では、「マクロファージ」とは、白血球の１種であり、生体内をアメーバ様運動により遊走する細胞である。マクロファージは、食作用を有し、細菌、ウイルス、死んだ細胞などの異物を取り込むことができる。マクロファージは、マクロファージは主要な免疫細胞の一つであり、組織における炎症と免疫反応に重要な役割を果たす[27]。特に腫瘍組織におけるマクロ

ファージの大きな特徴として、（1）マクロファージは、癌細胞や間質細胞から分泌されるC-Cケモカインリガンド2（CCL2）や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を介して腫瘍組織へ移動すること [28,29]、（2）腫瘍組織においてマクロファージが抗炎症性M2表現型に偏極し得ることが挙げられる [18,30,31]。マクロファージは、組織環境の炎症状態に応じてM1またはM2表現型に変化し、炎症環境を制御している。M2マクロファージは、創傷治癒、組織再生、免疫抑制に関与している[30,32]。特に腫瘍組織では、マクロファージがM2マクロファージに極性化し、免疫抑制環境の構築に重要な役割を果たす[30]。さらに、マウスのM2マクロファージは、アルギナーゼ1（Arg1）活性が非常に高いことが知られている[33]。Arg1は、アルギニンの尿素とオルニチンへの加水分解を触媒する。このため、アルギニンの量が少なくなり、免疫抑制が促進される[34]。Arg1はM0やM1マクロファージではあまり発現しないため、Arg1活性はマウスM2表現型を識別するための重要なマーカーの1つである[35]。Ｍ１マクロファージは、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＴＬＲ－２、ＴＬＲ－４，ｉＮＯＳ、およびＭＨＣ－ＩＩからなる群から選択される１以上または全ての分子を発現し、好ましくは、インターフェロン－α（ＴＮＦ－α）、インターロイキン－１α（ＩＬ－１α）、ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＣＸＣＬ９、ＣＸＣＬ１６、およびＣＣＬ５からなる群から選択される１以上または全てのサイトカインを分泌する。Ｍ２マクロファージは、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、ＣＤ２０９、ＦＩＺＺ１、およびＹｍ１／２からなる群から選択される１以上または全ての分子を発現し、好ましくは、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＣＬ１、ＣＣＬ１７、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ２４、ＣＸＣＬ１３、およびＶＥＧＦからなる群から選択される１以上または全てのサイトカインを分泌する。Ｍ１マクロファージは、例えば、単球からＬＰＳ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－αにより誘導され、Ｍ２マクロファージは、例えば、単球からＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－１０、またはＩＬ－２１により誘導されることが知られている。Ｍ２マクロファージには

、４種類のサブタイプ（Ｍ２ａ、Ｍ２ｂ、Ｍ２ｃ、およびＭ２ｄ）が知られている。ヒトＭ２マクロファージマーカーとして、ＩＤＯ、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＤ１１５、ＣＤ２０４、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、ＣＤ２０９、ＦｃｅＲ１、ＶＳＩＧ４、ＩＲＦ４、およびＳＴＡＴ６が挙げられる。したがって、ヒトＭ２マクロファージは、ＩＤＯ、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＤ１１５、ＣＤ２０４、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、ＣＤ２０９、ＦｃｅＲ１、ＶＳＩＧ４、ＩＲＦ４、およびＳＴＡＴ６からなる群から選択される１以上、２以上、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、１０以上、１１以上、または１２により特定することができる。ナイーブなマクロファージ（刺激を受けていないマクロファージ）はＭ０マクロファージと呼ばれ、Ｍ０マクロファージはＭ１マクロファージ、およびＭ２マクロファージに可逆的に分極する。Ｍ０マクロファージは、単球から分化する。単球は、造血幹細胞から、骨髄系前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、共通単球前駆細胞を介して、分化する。Ｍ０マクロファージは、単球をホルボール12-ミリスタート13アセタート（ＰＭＡ）またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）で刺激することにより得られ得る。Ｍ０マクロファージは、Ｍ１マクロファージのマーカーおよびマクロファージのマーカーが陰性であることで特徴付けられ得る。

[0014] 本明細書では、「制御配列」は、それに作動可能に連結された遺伝子を駆動し、当該遺伝子からＲＮＡを転写する活性を有する配列をいう。制御配列は、例えば、プロモーターである。プロモーターは、例えば、クラスＩプロモーター（ｒＲＮＡ前駆体の転写に用いられ得る）、クラスＩＩプロモーター（コアプロモーターと上流プロモーターエレメントから構成され、ｍＲＮＡの転写に用いられ得る）、およびクラスＩＩＩプロモーター（Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型にさらに大別される）が挙げられる。制御配列は、調節配列とも呼ばれ、動物細胞や植物細胞などの細胞内でｍＲＮＡを転写することができるプロモーターであればよい。例えば、第１の制御配列として、様々なｐｏｌ　ＩＩプロモーターを用いることができる。ｐｏｌ　ＩＩプロモ

ーターとしては、ＣＭＶプロモーター、ＥＦ１プロモーター（ＥＦ１αプロモーター）、ＳＶ４０プロモーター、ＭＳＣＶプロモーター、ｈＴＥＲＴプロモーター、β－アクチンプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＢｈプロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、プロモーターには、Ｔ７プロモーター、Ｔ３プロモーター、ＳＰ６プロモーターなどのバクテリオファージ由来のＲＮＡポリメラーゼを駆動するプロモーターや、Ｕ６プロモーターなどのｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターも含めることができる。Ｔ７プロモーターは環状ＤＮＡからの転写に好ましく用いられ、ＳＰ６プロモーターは直鎖状ＤＮＡからの転写に好ましく用いられる。また、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。誘導性プロモーターとは、プロモーターを駆動するインデューサーの存在下でのみ、プロモーターに動作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である。誘導性プロモーターの中には、プロモーターの活性を抑制する阻害剤の非存在下でのみ、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できるものがある。誘導性プロモーターには、ヒートショックプロモーターなど、加熱により遺伝子発現を誘導するプロモーターが含まれるが、これに限定されるものではない。また、誘導可能なプロモーターには、薬剤で駆動可能なプロモーターも含まれる。このような薬物誘導可能なプロモーターとしては、例えば、クメートオペレーター配列、ラムダオペレーター配列（例えば、１２×ラムダＯｐ）、テトラサイクリン誘導可能なプロモーターなどが挙げられる。テトラサイクリン誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリンまたはその誘導体（例えば、ドキシサイクリン）または逆テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）の存在下で遺伝子発現を駆動するプロモーターが挙げられる。テトラサイクリン誘導性プロモーターの例としては、ＴＲＥ３Ｇプロモーターが挙げられる。制御配列は、それに作動可能に連結した遺伝子を、少なくともＭ２マクロファージにおいて発現させることができる。作動可能に連結するとは、遺伝子発現が制御配列により駆動されるように制御配列に遺伝子を

連結することを意味する。

[0015] 本明細書では、「細胞」は、脊椎動物細胞であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒト細胞である。Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞とは、造血幹細胞、骨髄系前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、共通単球前駆細胞、単球、もしくはＭ０マクロファージ、またはこの分化過程のいずれかの細胞である。これらの細胞は、いずれも個体に投与すると当該個体の体内でその少なくともその一部がＭ２マクロファージに分化し得る。特に造血幹細胞は骨髄において骨髄系前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、および共通単球前駆細胞を経て単球へ分化する。分化した単球は、末梢組織でマクロファージへ分化する。マクロファージは腫瘍組織に遊走し、Ｍ２マクロファージに分極する。

[0016] 本明細書では、「分化能／分極能」は、分化能または分極能か、あるいは、分化能および分極能を意味する。本明細書では、「分化／分極」は、分化または分極か、あるいは、分化および分極を意味する。分極は、Ｍ０、Ｍ１、およびＭ２間への可逆性を有する変化に対して用いる。分化は、分極以外の細胞のステージの変化に対して用いる。

[0017] 本開示によれば、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞が提供される。好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、制御配列に作動可能に連結した核酸、より好ましくは炎症性サイトカインをコードする核酸を含む。本開示によれば、制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含む、細胞が提供される。ある好ましい態様では、これらの細胞は、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる。

[0018] 本開示によれば、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞であって、制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる、細胞が提供される。このような細胞は、腫瘍組織では、Ｍ２マクロファージへ分化／分極し得、これにより、腫瘍組織におい

て炎症性サイトカインを発現し、腫瘍組織の炎症抑制状態を緩和、好ましくは、腫瘍組織を炎症性環境（またはＭ１マクロファージ数／Ｍ２マクロファージ数比（Ｍ１数／Ｍ２数比）＞１の環境）へ変更し得る。腫瘍組織を炎症性環境に変更し、腫瘍組織にはＮＫ細胞またはＴ細胞がリクルートされ、腫瘍組織への抗腫瘍効果が発揮または増強され得る。本開示の細胞を受けた対象における腫瘍組織に対する抗腫瘍効果は、好ましくは、主に投与細胞以外の前記対象の免疫系の活性化（具体的には、前記対象が有するＮＫ細胞やＴ細胞などの免疫細胞のリクルートと活性化）により得る。

[0019] ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、Ｍ０マクロファージ、単球、共通単球前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、骨髄系前駆細胞、および造血幹細胞、並びに造血幹細胞からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞、からなる群から選択されるいずれかの細胞である。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、造血幹細胞から骨髄系前駆細胞の間の分化状態を有する細胞であり得る。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、骨髄系前駆細胞から単球樹状細胞前駆細胞の間の分化状態を有する細胞であり得る。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、単球樹状細胞前駆細胞から共通単球前駆細胞の間の分化状態を有する細胞であり得る。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、共通単球前駆細胞から単球の間の分化状態を有する細胞であり得る。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、単球からＭ０マクロファージの間の分化状態を有する細胞であり得る。より好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、単球からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞であり、さらに好ましくは、Ｍ０マクロファージであり得る。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞は、ｉＮＯＳ、ＣＤ２０６、およびＡｒｇ－１陰性のマクロファージ（すなわち、非Ｍ１マクロファージであり

、かつ非Ｍ２マクロファージ）であり得る。

[0020] ある態様では、炎症性サイトカインは、腫瘍組織の炎症抑制状態を緩和（軽減）することができる。ある好ましい態様では、炎症性サイトカインは、腫瘍組織を免疫抑制的環境から炎症性環境へ変更することができる。ある好ましい態様では、炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１（例えば、ＩＬ－１β）、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、ＩＬ－１７、およびＩＬ－２３からなる群から選択される炎症性サイトカインである。ある好ましい態様では、炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１（例えば、ＩＬ－１β）、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１７、およびＩＬ－２３からなる群から選択される炎症性サイトカインである。ある好ましい態様では、炎症性サイトカインは、ＴＮＦ－αであり得る。ヒトＴＮＦ－αは、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ： ＱＣＩ５５７９３．１に登録された配列、または当該配列に対応するＴＮＦ－αの配列を有し得る。ヒトＴＮＦ－αには、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ： ＱＣＩ５５７９３．１に登録された配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ、ヒトＴＮＦ－αの機能を有するペプチドが含まれる。ヒトＴＮＦ－αの機能とは、ヒト対象において炎症を惹起する機能であり得る。ヒトに投与される場合には炎症性サイトカインはヒトに炎症を誘発できるサイトカインであれば特に限定なく用い得るが好ましくはヒトサイトカインであり得る。

[0021] ある好ましい態様では、制御配列は、Ｍ２マクロファージで前記制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインなどの遺伝子を発現することができる。ある好ましい態様では、Ｍ２マクロファージ選択的または特異的に炎症性サイトカインなどの制御配列に作動可能に連結した遺伝子を発現することができる。ここで、Ｍ２マクロファージ選択的および特異的は、少なくともＭ０マクロファージおよびＭ１マクロファージにおけるよりも、Ｍ２マクロファージにおいて強い遺伝子発現（２倍以上、３倍以上、４倍以上、５倍以上、６倍以上、７倍以上、８倍以上、９倍以上、１０倍以上、２０倍以上

、３０倍以上、４０倍以上、５０倍以上、１００倍以上、５００倍以上、または１０００倍以上の強い遺伝子発現）を駆動することを意味する。ある態様では、制御配列は、ＣＤ１６３、ＣＤ２００　Ｒ１、ＣＤ３０１、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＤ２０９、デクチン－１、Ｆｃｅ　ＲＩａ、ＩＬ－１ＲＩＩ、ＣＤ２０６、アルギナーゼ１、ＩＦＲ４、ＰＰＡＲγ、ＳＴＡＴ６、ＦＩＺＺＩ、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＣＬ１、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ２２、ＣＣＣＬ２３、ＣＣＬ２４、ＣＣＬ２６、およびＹＭ１からなる群からなる遺伝子の制御配列である。ある態様では、制御配列は、ＣＣＬ－２２、ＬＯＸ、ＣＩＳＨ、ＦＣＥＲ１５、ＡＬＯＸ１５、Ｆ１３Ａ１、ＩＤＯ１、ＭＭＰ１、ＡＬＤＨ１Ａ２、ＣＤ２０９、ＴＧＭ２、ＶＣＡＭ１、ＭＭＰ１２、及びＳＰＩＮＴ２からなる群から選択される遺伝子のプロモーターであり得る。ある好ましい態様では、制御配列は、ＣＣＬ－２２、ＣＩＳＨ、ＡＬＯＸ１５、およびＴＧＭ２からなる群から選択される遺伝子のプロモーターであり得る。制御配列は好ましくはヒトゲノムに由来する。制御配列は好ましくはＣＣＬ－２２、ＣＩＳＨ、ＡＬＯＸ１５、およびＴＧＭ２からなる群から選択されるヒト遺伝子のプロモーターであり得る。ある態様では、制御配列は、ＣＣＬ－２２であり得る。ある態様では、制御配列は、ＣＤ２０９であり得る。

[0022]　ある好ましい態様では、本開示によれば、単球からＭ０マクロファージまでのいずれかの分化段階を有する細胞であって、Ｍ２マクロファージ選択的または特異的制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる、細胞が提供される。ある好ましい態様では、本開示によれば、単球からＭ０マクロファージまでのいずれかの分化段階を有する細胞であって、Ｍ２マクロファージ選択的または特異的制御配列に作動可能に連結したＴＮＦ－αをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記ＴＮＦ－αを発現することができる、細胞が提供される。細胞は、ある好ましい態様では、単球またはＭ０マクロファージであ

る。細胞は、ある好ましい態様では、非Ｍ１かつ非Ｍ２であるマクロファージである。細胞はある好ましい態様では、例えば、ｉＮＯＳ、ＣＤ２０６、およびＡｒｇ－１陰性のマクロファージである。

[0023] ある好ましい態様では、本開示によれば、Ｍ０マクロファージであって、Ｍ２マクロファージ選択的または特異的制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる、Ｍ０マクロファージが提供される。ある好ましい態様では、本開示によれば、Ｍ０マクロファージであって、Ｍ２マクロファージ選択的または特異的制御配列に作動可能に連結したＴＮＦ－αをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記ＴＮＦ－αを発現することができる、Ｍ０マクロファージが提供される。

[0024] 本開示の細胞は、ある態様では、腫瘍組織において炎症性サイトカインを放出する。本開示の細胞は、ある態様では、腫瘍組織においてＭ１マクロファージ数／Ｍ２マクロファージ数比（Ｍ１数／Ｍ２数比）を１以上にする。本開示の細胞は、ある態様では、腫瘍組織を炎症性環境に変化させる。本開示の細胞は、ある態様では、腫瘍組織においてＮＫ細胞および／またはＴ細胞などの免疫細胞を増加させる。

[0025] 本開示によれば、本開示の細胞を含む組成物が提供される。本開示の組成物は、前記細胞に加えて、薬学的に許容可能な溶液を含んでいてもよい。本開示の組成物は、前記細胞に加えて、薬学的に許容可能な添加剤（例えば、塩、緩衝剤、増粘剤、等張剤、分散剤等の医薬品添加剤）を含んでいてもよい。本開示の組成物は、前記細胞に加えて、薬学的に許容可能な溶液および薬学的に許容可能な添加剤（例えば、塩、緩衝剤、増粘剤、等張剤、分散剤等）を含んでいてもよい。

[0026] 本開示によれば、腫瘍組織において炎症性サイトカインを放出することに用いる組成物であって、本開示の細胞を含む組成物が提供される。本開示によれば、腫瘍組織を炎症性環境に変化させることに用いる組成物であって、

本開示の細胞を含む組成物が提供される。本開示によれば、腫瘍組織のＭ１マクロファージ数／Ｍ２マクロファージ数を１以上にすることに用いるための組成物であって、本開示の細胞を含む組成物が提供される。本開示によれば、腫瘍組織においてＮＫ細胞および／またはＴ細胞などの免疫細胞を増加させることに用いるための組成物であって、本開示の細胞を含む組成物が提供される。

[0027] ある態様では、本開示の組成物は、がんを処置することに用いることができる。ある態様では、本開示の組成物は、がん患者を処置することに用いることができる。ある態様では、本開示の組成物は、がん患者において、がん組織の炎症抑制状態を緩和することに用いることができる。ある態様では、本開示の組成物は、がん患者のがん組織における炎症抑制状態を炎症状態に変更することに用いることができる。ある態様では、本開示の組成物は、がん患者のがん組織に免疫細胞をリクルートすることに用いることができる。ある態様では、本開示の組成物は、がん患者においてがんを処置（例えば、治療に処置）することに用いることができる。

[0028] 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、メラノーマ、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（トリプルネガティブ乳がんを含む）、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、膀胱がん、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、網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。

[0029] 本開示によれば、本開示の組成物または細胞は、対象に非経口投与され得る。非経口投与としては、特に限定されないが例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、胸腔内投与、関節内投与、心筋内投与、心室内投与、脳室内投与、骨髄内投与、および脳脊髄液内投与が挙げられる。ある好ましい態様では、非経口投与は、静脈内投与であり得る。

[0030] 本開示によれば、その必要のある対象においてがんを処置する方法であって、当該対象に治療上有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。ある態様では、当該対象のがん組織は、炎症性環境に移行する。

[0031] 本開示によれば、がんを有する対象を処置する方法であって、当該対象に治療上有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。ある態様では、当該対象のがん組織は、炎症性環境に移行する。

[0032] 本開示によれば、がんを有する対象の腫瘍組織において炎症性サイトカインを産生する方法であって、当該対象に有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。本開示によれば、がんを有する対象の腫瘍組織の炎症抑制状態を緩和する方法であって、当該対象に有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。本開示によれば、がんを有する対象の腫瘍組織を（例えば、炎症抑制状態から）炎症性環境に変化させる方法であって、当該対象に有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。本開示によれば、がんを有する対象の腫瘍組織においてＭ１マクロファージ数／Ｍ２マクロファージ数を１以上にする方法であって、当該対象に有効量の本開示の細胞を投与することを含む方法が提供される。

[0033] 本開示によれば、がんを有する対象は免疫療法の前、最中、または後の対象であり得る。本開示によればまた、がんを有する対象は本開示の細胞の投与とがん療法とを組み合わせて治療され得る。本開示によれば、がんを有する対象は、有効量の本開示の細胞の投与とがん療法を受ける。がんを有する対象への有効量の本開示の細胞の投与は、腫瘍を炎症性腫瘍とすることを保証し、炎症性腫瘍には体内の免疫系が応答し、腫瘍への攻撃を開始し得る。

したがって、がんを有する対象への有効量の本開示の細胞の投与は、あらゆるがん免疫療法や抗体療法の併用がより有効となり得るのである。がん療法は例えば、抗体療法であり得る。抗体療法では、がん抗原に結合する抗体であって、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）または補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ活性）を有する抗体をがん患者に投与することができる。本開示の細胞の投与は非炎症性腫瘍を炎症性に変化させることにより、腫瘍組織へのＮＫ細胞のリクルートを促進し、これにより腫瘍組織内でがん細胞に結合した抗体のＡＤＣＣ活性を発揮させ得る。抗体はがん抗原に対して例えば、１０$^{-7}$Ｍ以下、１０$^{-8}$Ｍ以下、１０$^{-9}$Ｍ以下、１０$^{-10}$Ｍ以下、もしくは１０$^{-11}$Ｍ以下、または１０$^{-8}$Ｍ～１０$^{-12}$Ｍの結合解離定数（ＫＤ）で結合し得る。抗体は好ましくはがん細胞への高い結合選択性を有し、正常細胞には有意な結合を示さないことが望まれる。がん免疫療法は例えば、Ｔ細胞養子免疫療法、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）発現免疫細胞療法、または免疫チェックポイント阻害剤療法であり得る。Ｔ細胞養子免疫療法は、がんを有する対象に有効量のがん抗原に結合するＴ細胞を投与することを含む。Ｔ細胞は、細胞培養により増殖されたものであり得るが、ｉＰＳ細胞への初期化を経て若返らせたＴ細胞としてもよく、例えば、がん抗原に結合するＴ細胞をがん患者から得て初期化し、ｉＰＳ細胞を得て、ｉＰＳ細胞を分化誘導して得られ得るＴ細胞とすることができる（例えば、ＵＳ９，２０６，３９３４Ｂ参照）。Ｔ細胞は、ｉＰＳ細胞をクローン化することにより、および／または、ＲＡＧ１および２の発現を抑制または停止することにより、均質なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有するＴ細胞となり得る（例えば、ＵＳ９，２０６，３９３４Ｂ参照）。キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）発現免疫細胞療法は、がんを有する対象に有効量のがん抗原に結合するＣＡＲ免疫細胞（例えば、ＣＡＲ発現Ｔ細胞、およびＣＡＲ発現ＮＫ細胞等）を投与することを含む。免疫チェックポイント阻害剤療法は、がんを有する対象に有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む。免疫チェックポイント阻害剤は、免疫の抑制を解除する、すなわち、ブレーキを解除するが、そもそも免疫

が活性化していない場合には有効性が低いと考えられている。本開示の細胞の有効量の投与は、腫瘍の炎症性を高め、腫瘍への免疫を活性化し得るため、免疫チェックポイント阻害剤の有効性を改善すると期待できる。

[0034] 本開示によれば、有効量の本開示の細胞の投与とがん免疫療法を含むがんの治療方法において用いるための本開示の細胞もしくはがん免疫療法剤、またはこれらを含む医薬組成物が提供される。本開示によれば、有効量の本開示の細胞の投与とがん免疫療法を含むがんの治療方法において用いるための医薬の製造における、本開示の細胞もしくはがん免疫療法剤、またはこれらの両方の使用が提供される。

[0035] 前記抗体としては、特に限定されないが、リツキシマブ、トラスツズマブ、セツキシマブ、アレムツズマブ、オファツムマブ、オビヌツズマブ、ダラツムマブ、エトツズマブ、およびアベルマブが挙げられる。抗体療法では、その他、がん抗原に結合するヒト化またはヒトキメラＩｇＧ１抗体が投与され得る。

[0036] ＣＡＲ発現細胞としては、ＣＡＲ発現免疫細胞が挙げられる。免疫細胞は特に限定されないが、例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、好中球、マクロファージなどが挙げられる。「キメラ抗原受容体」（ＣＡＲ）は、がん抗原に結合する抗体の抗原結合性断片（特に、ｓｃＦｖ）と免疫細胞の活性化ドメインとを有するキメラ分子である。ＣＡＲは、一般的には、ｓｃＦｖ、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ８αまたはＣＤ２８）、および活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ζ）が連結してなる分子である。ＣＡＲは、細胞に導入し、細胞表面に発現させることができる。ＣＡＲを発現した細胞は特定の抗原に対して標的化し得る。ＣＡＲは、例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞などの免疫細胞に導入され、Ｔ細胞またはＮＫ細胞などの免疫細胞をがんに標的化する。第１世代ＣＡＲでは、ｓｃＦｖ、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ８αまたはＣＤ２８）、および活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ζ）が連結していたが、第２世代ＣＡＲは、ＣＡＲが導入された免疫細胞活性化のために、共刺激分子

シグナル伝達ドメインをさらに含む。共刺激分子シグナル伝達ドメインとしては、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、およびＩＣＯＳなどの共刺激因子が用いられている。第３世代ＣＡＲでは、共刺激因子が複数組込まれている。このように、ＣＡＲにおいては、ＣＡＲを導入した免疫細胞を生体内で持続的に増殖させるための改良が加えられてきている。ｓｃＦｖ部分以外のいずれのドメインもヒトタンパク質由来であることが好ましい。

[0037] 抗体または抗体の抗原結合性断片（例えば、ｓｃＦｖ）の抗原は、がん細胞の表面に発現する抗原（例えば、がん抗原）であり得る。がん抗原としては、例えば、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、特にＥＧＦＲｖＩＩＩ、３型ＥＧＦＲ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、ＣＳ１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、Ｂ７Ｈ６、ＭＵＣ－１６（ＣＡ１２５）、受容体チロシンキナーゼ用オーファン受容体１（ＲＯＲ－１）、ＧＤ３、ＧＭ２、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、メソテリン、ＩＬ１３Ｒ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－ＭＥＴ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＷＴ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＨＰＶのＥ６、ＨＰＶのＥ７、ＣＭＶ、ＡＦＰ、ＰＲＡＭＥ、ＳＳＸ２、ＫＲＡＳ、ＨＥＲ２、およびＰＤ－Ｌ１からなる群から選択される１以上であり得る。抗体または抗体の抗原結合性断片（例えば、ｓｃＦｖ）はまた、例えば、タンパク質性のタグであってもよい。抗体または抗体の抗原結合性断片（例えば、ｓｃＦｖ）は例えば、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）などの蛍光タンパク質であり得る。

[0038] 米国食品医薬庁（ＦＤＡ）から承認されたＣＡＲ－Ｔ療法薬としては以下が挙げられる：アベクマ（一般名：イデカブタゲンビクルユーセル）、ブレヤンジ（一般名：リソカブタゲンマラルユーセル）、Ｃａｒｖｙｋｔｉ（一般名：シルタカブタゲンオートルユーセル）、キムリア（一般名：チサゲンルクルユーセル）、Ｔｅｃａｒｔｕｓ（一般名：ブレクスカブタゲンオートルユーセル）、イエスカルタ（一般名：アキシカブタゲンシロルユーセル）

。これ以外のＣＡＲ－Ｔ療法薬も、本開示の細胞の投与と有利に組み合わせることができると考えられる。

[0039] 免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）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。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（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およびムチンドメイン－３（Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｄｏｍａｉｎ ａｎｄ ｍｕｃｉｎ ｄｏｍａｉｎ－３、またはＴＩＭ－３）、リンパ球活性化遺伝子３（ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｇｅｎｅ ３、またはＬＡＧ－３）、および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－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ Ｔ－ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ、またはＶＩＳＴＡ）並びに樹状細胞特異的タンパク質シグナル調節タンパク質アルファ（ＳＩＲＰα）が挙げられる。それぞれ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、およびＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイント、並びにＳＩＲＰα系免疫チェックポイントとよばれる。例えば、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とＶＳＩＧ－３／ＩＧＳＦ１１との結合を阻害することにより、ＶＩＳ

ＴＡ系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、ＳＩＲＰαとＣＤ４７との結合を阻害することによりＳＩＲＰα系免疫チェックポイントを阻害することができる。このようにして、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、およびＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイント、並びにＳＩＲＰα系免疫チェックポイントからなる群から選択される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。２つのタンパク質の結合を阻害する抗体は、受容体またはリガンドに結合することができる。例えば、ＰＤ－１系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、および抗ＰＤ－Ｌ２抗体からなる群から選択される抗体（例えば、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、およびデュルバルマブ）であり得る。また、ＣＴＬＡ－４系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＣＤＬＡ－４抗体、抗ＣＤ８０抗体、および抗ＣＤ８６抗体からなる群から選択される抗体（例えば、イピリムマブ、およびトレメリムマブ）であり得る。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抗体および抗ガレクチン－９抗体からなる群から選択される抗体（例えば、ＭＧＢ４５３）であり得る。また、ＶＩＳＴＡ系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＶＩＳＴＡ抗体および抗ＶＳＩＧ－３／ＩＧＳＦ１１抗体からなる群から選択される抗体（例えば、ＪＮＪ－６１６１０５８８）であり得る。また、ＳＩＲＰα系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗ＳＩＲＰα抗体および抗ＣＤ４７抗体からなる群から選択される抗体（例えば、マグロリマブ、ＣＣ－９０００２）が挙げられる。ＳＩＲＰα系免疫チェックポイントを阻害する分子は他にも開発されており、ヒトＳＩＲＰαのＣＤ４７結合ドメインとヒトＩｇＧ１のＦｃ領域を結合させ、ＳＩＲＰαとＣＤ４７との結合を阻害するタンパク質（例えば、オントロパセプト、マプリルパセプト、エボルパセプト）が挙げられる。

[0040] 対象は、好ましくは免疫チェックポイント分子を発現するがん細胞を有す

る。対象の腫瘍が免疫抑制状態（すなわち非炎症性腫瘍（cold tumor））である場合であっても、当該腫瘍を炎症性腫瘍（hot tumor）に変換することができ、したがって、非炎症性腫瘍を有する対象または免疫チェックポイント阻害剤抵抗性腫瘍を有する対象を含めてあらゆる対象が、免疫チェックポイント阻害剤の適応となり得る。したがって、ある態様では対象は、免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を有する対象である。免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を有する対象は、医師などの医療従事者により投与後の治療経過に基づいて適宜判別され得るであろう。あるいは、対象が免疫チェックポイント分子を発現しない場合やほとんど発現しない場合（すなわち、免疫チェックポイント阻害剤が有効でない場合）であっても、本開示の細胞の投与は有効であり、免疫系を腫瘍に誘導することを可能とし得る。また、本開示の細胞の投与と免疫細胞との相互作用はがんに免疫チェックポイント分子を発現させ得、本開示の細胞の免疫チェックポイント阻害剤との併用投与は有効であり得る。がんは接触した免疫細胞を抑制するために免疫チェックポイント分子を発現する機構を有する。ある態様では、免疫チェックポイント分子を発現しない、またはほとんど発現しないがん細胞を有する対象においてがんを処置する方法は、有効量の本開示の細胞を当該対象に投与することと、有効量の免疫チェックポイント阻害剤を当該対象に投与することを含む。細胞の投与と免疫チェックポイント阻害剤の投与の順番は問われないが、好ましくは、細胞が先に投与され、その後、免疫チェックポイント阻害剤が投与される。本開示の細胞の投与は、それを受けた対象のがん細胞の免疫を活性化させ、および／または免疫チェックポイント分子のがん細胞での発現を増強させ、これにより、免疫チェックポイント阻害剤の有効性が向上すると考えられるためである。ある態様では、対象には、細胞がされ、がん細胞における免疫チェックポイント分子の発現向上が認められた対象に対して、免疫チェックポイント阻害剤を投与してもよい。がん細胞における免疫チェックポイント分子の発現向上は、免疫組織化学染色、フローサイトメトリー、および酵素連結免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）などの常法により確

認することができる。本開示の細胞の投与にも関わらず、対象が免疫チェックポイント分子を発現しない場合やほとんど発現しない場合（すなわち、免疫チェックポイント阻害剤が有効でない場合）には、当該対象には免疫チェックポイント阻害剤を投与しなくてもよい。

[0041] 本開示によれば、上記方法において用いるための本開示の細胞が提供される。本開示によれば、上記方法において用いるための本開示の組成物が提供される。

[0042] 本開示によれば、上記方法において用いるための医薬の製造における本開示の細胞の使用が提供される。本開示に寄れば、がんを処置することに用いるための医薬の製造における本開示の細胞の使用が提供される。

実施例

[0043] 2.材料と方法

2.1.材料

ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）、ロスウェルパーク記念研究所-1640（RPMI-1640）培地、抗生物質-抗菌剤混合ストック液、4%-パラホルムアルデヒドリン酸緩衝食塩水（4%-FA PBS）、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（DPBS）はナカライテスク株式会社（京都、日本）より購入した。牛胎児血清（FBS）はGibco Inc（米国マサチューセッツ州ウォルサム）から購入した。Escherichia coli serotype O55:B5由来のLipopolysaccharide（LPS）およびTriton X-100は、Sigma Aldrich Co.（St.Louis, MO, USA）から購入した。マウスIL-4、IL-13、TNF-α、およびIFN-γは、Peprotech（Rocky Hill、NJ、USA）より購入した。Cell Counting Kit-8（CCK-8）は同仁堂研究所（日本、熊本）から購入した。Lipofectamine 3000およびSuperScript III First-Strand Synthesis Systemは、Thermo Fisher Scientific Inc.（米国マサチューセッツ州ウォルサム）から購入した。NucleoBond Xtra Maxi Plus EF, In-Fusion Snap Assembly Master Mix, PrimeSTAR Max DNA Polymerase, DNase I, and RNAiso plusはタカラバイオ株式会社（日本、滋賀県）から購入した。G418 Sulfateは、富士フイルム和光純薬株式会社（日本、大阪）より購入した。Ligh

tCycler FastStart DNA Master SYBR Green KitおよびLiberase DH Research GradeはRoche Diagnostics (Basel, Switzerland)から購入した. Vivo-Trac k 680 (VT-680) は PerkinElmer, Inc.フィコエリスリン (PE) 標識抗マウスCD206抗体、ブリリアントバイオレット (BV) 421標識抗マウスF4/80抗体、Al exa Fluor 700標識抗マウスCD86抗体、Alexa Fluor 488標識抗マウスCD11b抗体、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗マウスNKp46抗体、PE標識反マウス NK1.1抗体、Alexa Fluor 700標識抗マウスCD3抗体、Alexa Fluor 488標識抗マウスCD8抗体、Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) MAX™ Deluxe Set Mouse TNF-α、および Stop Solution for TMB SubstrateはBioL egend, Inc. (San Diego, CA, USA) から購入したものです。VersaLyseはBec kman Coulter Inc. (Brea, CA, USA)から購入した。Aspartate aminotransfe rase (AST) Colorimetric Activity Assay Kitは、Cayman Chemical (Ann Ar bor, MI, USA)から購入した。ゴールデンロッド動物ランセットは、MEDIpoin t, Inc. (Mineola, NY, USA)から購入した。CD206/MRC1 (E6T5J) XP(商標) Rabb it mAb, CD86 (E5W6H) Rabbit mAb, および Ki-67 (D3B5) Rabbit mAb は Ce ll Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)から購入した。3, 3-Di aminobenzidine (DAB) およびHRP標識ウサギ抗体は、Dako, Inc (Glostrup, Denmark) から購入した。pGL3-mArg1 promoter/enhancer (-31/-3810) は Pe ter Murray から贈られた(Addgene plasmid # 34571; http://n2t.net/addge ne:34571; RRID: Addgene_34571) [36]。その他の化学物質は、市販の最高グレードのものを使用した。

[0044] 2.2.細胞培養

RAW264.7マウスマクロファージおよびCT-26マウス結腸癌細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。RAW264.7細胞はDMEMで培養した。CT-26細胞は、RPMI-1640で培養した。すべての培地に10%熱不活性化FBSと1%抗生物質-抗菌剤混合ストック溶液を添加した。細胞は5%CO_2と95%空気を含む雰囲気中、37℃で培養された。培養液は2日ごとに交換し、90%コンフルエントに達した細胞をセルスクレイパーで剥離し、再培養した。

[0045] THP-1ヒト単球細胞は、JCRBから購入した。THP-1はRPMI 1640で培養した。培地に10%熱不活化FBSと1%抗生物質-抗菌剤混合ストック溶液を添加した。細胞は5%CO_2と95%空気を含む雰囲気中、37℃で培養された。培養液は2日ごとに交換し、90%コンフルエントに達した細胞を回収し、再培養した。

[0046] 2.3.マクロファージの薬物担体としての評価

2.3.1 In vitro発現アッセイ

RAW264.7細胞におけるArg1 mRNAの発現は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）により評価した。RAW264.7細胞は、2.5 mLの培地中、6ウェルプレートに1×10^6 cells/wellの密度でプレーティングされた。24時間後、培地を6ウェルプレートでCT-26（3×10^6細胞、2.5mL培養液）を24時間培養して調製した腫瘍培養液（TCM）に交換し、他のウェルには25 ng/mL IL-4 またはIL-13、200 ng/mL LPSおよび100 ng/mL TNF-αを補充した。3時間、6時間、12時間、24時間の培養後、細胞を回収し、RNAiso Plusを用いて、製造者のプロトコルにしたがって全リボ核酸（RNA）を抽出した。次に、5μgのRNAをSuperScript III First-Strand Synthesis Systemを使用して逆転写した。PCR増幅反応には、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Greenキットを使用した。以下のPCR条件を使用した。ハウスキーピング遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を用い、比較CT法[37]により標的遺伝子の相対発現量を決定した。Arg1及びGAPDHのプライマーはFasmac社から購入した。全てのプライマー配列を表1 [33,38]に示す。

[0047] [表1]

表１：PCRのためのプライマー配列

Name	Sequence (5'→3')
GAPDH F（配列番号１）	CCCAGCAAGGACACTGAGCAAG
GAPDH R（配列番号２）	GGTCTGGGATGGAAATTGTGAGGG
Arg1 F（配列番号３）	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG
Arg1 R（配列番号４）	CAGATATGCAGGGAGTCACC

[0048] ヒトTHP-1誘導マクロファージのsingle cell RNA sequenceのデータをNCBIデータバンクGEO Data sets（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）から選択し、出力した。テキストファイルに書き換えたのちに、iDEP.96（http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/）を用いてヒートマップ解析を実施した。

[0049] ヒトマクロファージの遺伝子発現評価は以下の通り実施した。20 ng/mLのホルボール12-ミリスタート13-アセタート（PMA）を培地に添加することでTHP-1からマクロファージへと分化させた。THP-1細胞は、2,5 mLの培地中、6 wellプレートに5×10^6 cells/wellの密度で培養した。16時間後、IL-4ならびにIL-13（それぞれ25 ng/mL）でマクロファージを刺激することでM2マクロファージへと分極させた。M1マクロファージへの分極については、LPS（200 ng/mL)ならびにIFN-γ（100 ng/mL)を4時間刺激した。CCL-22, LOX, CISH, FCER15, ALOX15, F13A1, IDO1, MMP1, ALDH1A2, CD209, TGM2, VCAM1, MMP12, 及びSPINT2については72時間、CCL-22, CISH, ALOX15, 及びTGM2については24, 28, 及び72時間の培養後、細胞を回収し、RNAiso Plusを用いて、製造者のプロトコルにしたがった全リボ核酸（RNA）を抽出した。次に、5 µgのRNAをSuperScrpit III First-Standard Synthesis Systemを使用して逆転写した。PCR増幅反応には、LightCycler FastStart SNA Master SYBR Greenキットを使用した。以下のPCR条件を使用した。ハウスキーピング遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH)を用い、比較C_T法により標的遺伝子の相対発現量を決定した。プライマーは以下の通りである。

[0050]

[表2]

表２：用いたプライマー配列

Name	Sequence (5'→3')
GAPDH F（配列番号５）	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
GAPDH R（配列番号６）	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
CCL-22 F（配列番号７）	GAGCATGGATCGCCTACAG
CCL-22 R（配列番号８）	CAGACGGTAACGGACGTAATC
CISH F（配列番号９）	GCATAGCCAAGACCTTCTCCTAC
CISH R（配列番号１０）	ACGTGCCTTCTGGCATCTTCTG
ALOX15 F（配列番号１１）	ACCTTCCTGCTCGCCTAGTGTT
ALOX15 R（配列番号１２）	GGCTACAGAGAATGACGTTGGC
TGM2 F（配列番号１３）	TGTGGCACCAAGTACCTGCTCA
TGM2 R（配列番号１４）	GCACCTTGATGAGGTTGGACTC
LOX F（配列番号１５）	GATACGGCACTGGCTACTTCCA
LOX R（配列番号１６）	GCCAGACAGTTTTCCTCCGCC
FCER1A F（配列番号１７）	GTGGAGAATACAAATGTCAGCACC
FCER1A R（配列番号１８）	CTCCATCACCACCTCAGCAGAG
F13A1 F（配列番号１９）	CAACAGCCACAACCGTTACACC
F13A1 R（配列番号２０）	CTTGGATCAGCACCGCCTCTTT
ALDH1A2 F（配列番号２１）	GAGTAACTCTGGAACTTGGAGGC
ALDH1A2 R（配列番号２２）	ATGGACTCCTCCACGAAGATGC
CD209 F（配列番号２３）	GCAGTCTTCCAGAAGTAACCGC
CD209 R（配列番号２４）	GCTCTCCTCTGTTCCAATACTGC
VCAM1 F（配列番号２５）	GATTCTGTGCCCACAGTAAGGC
VCAM1 R（配列番号２６）	TGGTCACAGAGCCACCTTCTTG
MMP12 F（配列番号２７）	GATGCTGTCACTACCGTGGGAA
MMP12 R（配列番号２８）	CAATGCCAGATGGCAAGGTTGG
SPINT2 F（配列番号２９）	GTGCCTCAAGAAATGTGCCACTG
SPINT2 R（配列番号３０）	GGAGTGGTCTTCAGAATCCTGC

[0051] 2.3.2 マクロファージの遊走と肝障害のin vivo評価

すべての動物実験は、九州大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認を得て行った。6～8週齢の雌BALB/cAJclマウスを九道株式会社（佐賀県）から入手した。飼育1週間後、CT-26細胞（1×10^6細胞、100μL PBS中）を腹部に皮下（s.c.）注射した。そして腫瘍接種の5日後に、VT-680標識RAW264.7マクロファージ（100μL PBS中1×10^6細胞）を静脈内（i.v.）に投与した。マクロファージ投与1、4、7日後にIVIS Spectrum（IVIS Lumina II、ゼノゲン株式会社）を用いてin vivo蛍光イメージングを行い、マクロファージの腫瘍組織への遊走を可視化した。その後、マクロファージ投与4日後と7日後に、動物用ランセットを用いて採血を行った。マウスを犠牲にした後、腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、肺を抽出し、IVIS Spectrumを用いてマクロファージの集積を評価した。血中AST活性は、ASTアッセイキットを用いて、製造者のプロトコルに従って分析した。

[0052] 2.3.3 フローサイトメトリーによるマクロファージ極性化の評価

腫瘍と肝臓を抽出し、PBSで洗浄した。洗浄後、腫瘍を小片に切断し、Liberase（0.15 mg/mL)とDNase I（1.4 unit/mL)を含むDMEMで37℃、60分間消化した。60分後、溶液を100μmのフィルターでろ過し、300×gで5分間遠心分離した。上清を除去した後、4 mLのVersaLyseを加え、室温で5分間インキュベートした。インキュベーション後、300×gで5分間遠心し、FACSバッファー（2%FBS含有DPBS）に再懸濁した。肝臓は100μmフィルター上でプランジャーを使用してホモジナイズし、冷DPBSに懸濁した。200×gで5分間遠心した後、4mLのVersaLyseを加え、室温で5分間インキュベートした。インキュベーション後、溶液を200×gで5分間遠心し、FACSバッファーに再懸濁した。再懸濁後、蛍光標識抗体（Alexa Fluor 488標識抗マウスCD11b抗体、BV421標識抗マウスF4/80抗体、PE標識抗マウスCD206抗体）を添加し、4℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、FACSバッファーに再懸濁した。投与したマクロファージ（CD11b+、F4/80+、VT-680+）におけるCD206（M2マクロファージマーカー）の発現をフローサイトメトリー（Beckman Coulter社、CytoFLEX）により評価した。

[0053] 2.4. MacTriggerの製造とin vitroでの特性評価

2.4.1 プラスミドの調製とマクロファージへのトランスフェクション

M2マクロファージ特異的プロモーターとしてpGL3-mArg1のmArg1プロモーター／エンハンサー（-31／-3810）をPrimeSTAR Max DNA Polymeraseを用いたPCRにより増幅し、in-fusion snap assembly master mixを用いてpcDNA3.1のサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター-ターゲット遺伝子領域へ挿入した。炎症性サイトカインとしてマウスTNF-αをコードする遺伝子をIntegrated DNA Technology, Inc (Coralville, IA, USA)から購入し、M2マクロファージ特異的なArg1プロモーターの下流にクローニングしてpcDNA3.1-mArg1p-TNF-αを作製した。さらに、マウスTNF-α遺伝子および強化型緑色蛍光タンパク質（EGFP）コード配列をCMVプロモーターの下流に挿入し、それぞれpcDNA3.1-CMVp-TNF-αおよびpcDNA3.1-CMVp-EGFPを生成した。プラスミドDNAの抽出は、NucleoBond Xtra Maxi Plus EFを用いて行った。トランスフェクトしたRAW264.7細胞は、Arg1プロモーターに応答してTNF-αを（Arg1p-TNFα）またはCMVプロモーターに応答して（CMVp-TNFα）、またはCMVプロモーターに応答してEGFPを（CMVp-EGFP）発現した。RAW264.7 細胞を 2.0×10^5 cells/well の密度で24-well プレートに播種した。24時間後、Arg1p-TNF-α、CMVp-TNF-α、またはCMVp-EGFPベクターを、Lipofectamine 3000試薬を用いて、製造者のプロトコルに従ってRAW264.7細胞へトランスフェクションを行なった。そして、トランスフェクションから6時間後に、培地を新鮮な培地に交換した。この細胞を400μg/mL G418で処理し、安定な細胞株を得た。TNF-αに代えた以外は同様にしてIL-1β（NCBI Reference Sequence: NP_032387.1）、IL-2（NCBI Reference Sequence: NP_032392.1）、IL-6（GenBank: ABG81953.1）、IL-12（IL-12αサブユニット：NCBI Reference Sequence: NP_001152896.2、IL-12βサブユニット：NCBI Reference Sequence: NP_001290173.1）、およびIFN-γ（NCBI Reference Sequence: NP_032363.1）をそれぞれ発現する安定細胞株を作製した。トランスフェクションしていないマクロファージ、CMVp-TNF-αトランスフェクションマクロファージ、CMVp-EGFPトランスフェクショ

ンマクロファージ、Arg1p-TNF-αトランスフェクションマクロファージをそれぞれMac（UTD）、Mac（CMVp）、Mac（EGFP）、MacTriggerと命名した。

[0054] またヒト型MacTriggerを作成した。具体的には以下の通りであった。pcDNA 3.1のpromoter-MCS（multi cloning cite）以外の領域をPrime STAR Max DNA Polymeraseを用いて、PCRにより増幅し、線状化ベクターを作製した。ベクターの増幅後、増幅産物をDpnI制限酵素で処理した。CCL-22プロモーター（配列番号３１）に作動可能に連結したヒトTNF-α（配列番号３２）（CCL22p-hTNF-α）をコードする合成遺伝子はIDT社から購入した。購入した合成DNAを上記と同様にPCRにより増幅した。増幅した線状化ベクターと合成DNAにin fusion snap assembly master mixを混合し、60℃で15分インキュベートしin fusion法によりプラスミドDNAを作製した。作製したプラスミドDNAをJM109コンピテントセルに添加し、アンピシリンを含むLB寒天培地上で一晩培養した。シングルコロニーをピックし、5 mLのLB培地で6時間培養した。培養した大腸菌からQIAGENのプラスミド抽出試薬を用いてプラスミドDNAを抽出した。配列解析により目的の配列が得られていることを確認したのちに、再度JM109に形質転換し、培養を行なった。培養後、NucleoBond（商標） Xtra Maxi Plus EFキットを用いてエンドトキシンフリーの状態でプラスミドDNAを抽出した。

[0055]

[表3]

表３：用いたヒト配列

ヒトCCL-22プロモーター（配列番号３１）
GGCGCATGCCATCACACCCGGCCAATTTTTGTATTTTTGGTAGAGATGGGGTTTCTCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTT GAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCTGGGCCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGTCATGAATCACTGCACCCAG CCCATGTGTTCTGAGCACCCAACATGTGCCTGATCCTCAGAGGGCCCTGGGAATGCCAAGAAAAATGAAGGGAGACCC CAGCCTCCTAGAGCTTGGAGTCTGACTTCTAGGGAGGGGCTTGAGAAAGAGAAAACCTGACCCAGTCTGCTCAGGGCC ACATTCCAGGTCCCCTAGAAGGCTTTGAAGTCCTGAGAGGGTGTGCTTACCAAGGACATGACATTTCAAACAGCTTTG ACGCATAAGTAGGAGTTTATGTGGTAGAGATGTGGAAAGTGACATTAAAGGCCAGGGACAGGCCGCAGTCCCTTTTGA GGAAGTGTGAGGAGTGTGGTGTGATCCCTCAGGGGAAGGAGACCAGTGGGGAAAGGCCTGTCCGGAAACGGGGCCTTG AAGGCCACAGACAGGAGCCCGGGACCTGCCTTTAGGTGAATGGGGAGCCACGGCAGGGTTCTGAAGCAGGAGAGAGAG TGTGTAGCTCTGGACCACTCACGCTGGCTGCTGCAGGGTGGGGATGGCATTGAGGAGGCCAGCATCCCAGCCTGAGGT GGAGGTGGCCTGGACTGGGCAGGAACAGTGGGGTTGGAGAGAAGGAGCAGATCTGAGAGAGATTTAGGAAGCAGAATC AACGGGACATGGACATGGTGAGGGACTGAGACAGGAGTGGGGGAGGGAGAGCCCGGCAGCCACTGGGAAGGAAGATCA GGCAGGACAGAAGTGTGGGTAGATGCTTTCCATAAACCGTTGAGAAATCCACGACCTGGCCCAAATGTGGACTTCACG AGAAGCCCCAGATGGGTCAATGGGTCCATAGGCCTCTCCCATTGAAGAGAGACCAGTAATGCCGTCATTAAGGGTACA AGACAGGCCTCAATTCTAGGTGAGGGTTGGTCCACGTTCTCACTTGATTTACAACCAGTGAAGTCAACAGAGCTGTGA AACCATCTCCCCCATTTCCAGATGGGGAAACCAAGTCCCAGAGACACCCAGACATGGCCAAGGCCACACAGTGCAGAG ACCCTGGGGAGCACAAGCCTCTAAGAGGGGGATTTTACAAGTCTGTCTGAAACCAGAGGCGAGGACAGAGTTGAGGGG GGGTCCCCTCTGAGTGGTTCCCCGCCAAAGAGAATTTCTCCACTTTGGAGGAAGTGGGAGGTAGTTCTTCTTTTGAGA TGTGAATGTCAAGTGACTCTGGGCACCCCGGTGACTAAGAGGTAAGTAAGTGAGGCTTGTGGGTGGAGCCAGCACCTT AAATAGCAGGTCTTCCTATGTCCCTTTGCAGACACCTGGGCT
ヒトTNF-α（配列番号３２）
ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTTCAACTGAATCCATGATA AGAGACGTAGAACTTGCCGAAGAAGCCCTCCCCAAAAAGACAGGTGGCCCCCAAGGAAGTCGGAGGTGCCTGTTCCTG TCACTTTTTTCATTTCTTATAGTGGCCGGTGCTACAACCTTGTTCTGTCTCCTGCACTTTGGTGTGATCGGTCCCCAA CGAGAAGAGTTTCCTCGAGACCTTTCCCTGATAAGCCCCTTGGCCCAGGCCGTGAGGTCATCTAGTAGGACACCAAGC GATAAGCCTGTAGCACATGTCGTTGCCAACCCCCAAGCAGAAGGACAGCTCCAGTGGCTGAACCGGCGAGCTAATGCA TTGTTGGCTAACGGAGTAGAACTTCGAGATAACCAACTCGTAGTTCCATCCGAAGGTTTGTACTTGATTTATTCCCAA GTTCTTTTTAAGGGGCAAGGTTGTCCCTCAACCCACGTATTGTTGACTCATACAATATCACGAATAGCTGTTAGCTAT CAAACAAAAGTAAATTTGCTTTCCGCTATCAAGTCTCCTTGTCAACGGGAAACTCCAGAGGGCGCCGAAGCTAAACCT TGGTACGAGCCCATTTACCTCGGGGGCGTCTTCCAACTGGAAAAGGGGGACCGCTTGTCTGCCGAGATCAACCGGCCC GATTATTTGGATTTTGCCGAGAGTGGGCAGGTGTATTTTGGCATCATTGCTCTCTAA

[0056] 作製したプラスミドをTHP-1細胞にトランスフェクションするために、THP-1細胞を5.0×10^6 cells/wellの密度で24 wellプレートに播種した。24時間後、CCL-22-TNF-αベクターを、TransIT-Jurkat試薬を用いて、製造者のプロト

コルに従ってTHP-1細胞へトランスフェクションを行った。そして、トランスフェクションから6時間後に、培地を新鮮な培地に交換した。この細胞をG418で処理し、安定な細胞株を得た。この細胞株にPMA（20 ng/mL）を16時間刺激することでヒト型MacTriggerを得た。

[0057] 2.4.2 In vitro TNF-α産生能評価

MacTrigger細胞は、500μLの培地とともに24ウェルプレートに1×10^5 cells/wellの密度でプレーティングされた。24時間後、培地に新鮮な培養液、TCM、または25 ng/mL IL-4もしくはIL-13を含む培地を補充した。24、48、72時間後、上清を回収し、製造元のプロトコルに従い、ELISA MAX™ Deluxe Set Mouse TNF-αでTNF-αの濃度を測定した。ヒト型MacTrigger細胞によるTNF-α産生能評価も同様に行った。

[0058] 2.4.3 MacTriggerのin vitroにおける炎症誘発能の評価

Mac（EGFP）細胞を、500μL の培地とともに 24 ウェルプレートに 2×10^5 cells/wellの密度でプレーティングした。24時間後、培地に25ng/mL IL-13を添加した。24時間後、細胞を回収し、IL-13を含む培地500μLで24ウェルプレートに1×10^5細胞／ウェルの密度でプレーティングした。次に、Mac（UTD）、Mac（CMVp）、またはMacTrigger細胞を、個別に、1×10^5細胞／ウェル、2×10^5細胞／ウェル、または4×10^5細胞／ウェル（それぞれエフェクター／ターゲット比が1、2、または4）の密度でIL-13を含むDMEMと共に24wellプレート中にプレーティングした。72時間培養後、細胞を回収し、PE標識抗マウスCD206抗体とAlexa Fluor 700標識抗マウスCD86抗体を添加した。4℃で60分間インキュベート後、CD206+細胞/EGFP+細胞、CD86+細胞/EGFP+細胞の割合をCytoFLEXで解析した。

[0059] 2.4.4 MacTriggerのin vitroにおける生存時間の評価

MacTrigger細胞を5×10^3 cells/wellの密度で96 well plateに植え、200 μLの培地を加えた。24時間後、新鮮な培養液、TCM、または25 ng/mL IL-4もしくはIL-13を含む培地を加え、1～6日間培養した。培養後、製造元のプロトコルに従って、CCK-8を用いて細胞生存率を評価した。Infinite(商標) 200 PRO M

Plex（TECAN社製）を用いて450 nmの吸光度を測定した。細胞生存率は、以下の式で算出した。

[0060] [数1]

$$\%\ \text{cell viability} = \frac{A_1 - A_0}{A_{ctrl} - A_0} \times 100$$

[0061] ここで、A1はサイトカインやTCMを含む吸光度、Actrlはサイトカインや TCMを含まない吸光度、A0はサイトカインや細胞を含まない吸光度である。

[0062] 2.5. 担癌マウスにおける人工マクロファージの抗腫瘍効果

人工マクロファージの抗腫瘍効果を担癌マウスで評価した。8週齢の雄BALB/cマウスの腹部にCT-26細胞、4T1細胞、またはColon-26細胞（それぞれ100μL PBS中1.0×10^6個）を皮下注射した。腫瘍接種5日後（Day 0）または１０日後にPBS（100μL）、Mac（UTD）、Mac（CMVp）、MacTrigger（100μL PBS中1.0×10^6細胞）を静脈内投与した。腫瘍体積と体重は2日ごとに測定し、さらに4日ごとに血液を採取した。

[0063] [数2]

$$\text{Tumor volume} = \frac{(Major\ axis) \times (Minor\ axis)^2}{2}$$

[0064] 投与後0日目の腫瘍体積を1とし、各群の相対的な腫瘍体積をそれぞれ算出した。PBS投与群の腫瘍が1000mm^3（人道的エンドポイント）に達した時点で実験を終了し、全マウスを犠牲にした。犠牲後、腫瘍組織と肝臓を摘出し、肝臓重量を測定した。腫瘍組織からの細胞の抽出は、2.3.3に記載したプロトコルで行った。FACSバッファーに再懸濁した後、蛍光標識抗体（Alexa Fluor 488標識抗マウスCD11b抗体、BV421標識抗マウスF4/80抗体、PE標識抗マウスCD206抗体。とAlexa Fluor 700標識抗マウスCD86抗体、またはAlexa Fluor 700標識抗マウスCD3抗体とAlexa Fluor 488標識抗マウスCD8抗体、またはFITC標

識抗マウスNKp46抗体とPE標識抗マウスNK1.1抗体）を加えてインキュベートした。1抗体）を添加し、4℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を2回洗浄し、FACSバッファーに再懸濁した。CD206、CD86、CD3、CD8、NK1.1、およびNKp46の発現をフローサイトメトリーで評価した。

[0065] 2.6. 組織学的解析

ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色と免疫組織化学（IHC）は、一般的なプロトコルに従って行った。腫瘍および肝組織は4%-PFA PBSで固定した。IHCでは、パラフィンブロックに包埋した切片をCD86、CD206、Ki67の染色に使用した。腫瘍組織を脱パラフィンし、水和して、クエン酸緩衝液（pH6.0）で95℃、15分間加熱し、3%スキムミルクで10分間ブロッキングした。スライドを抗CD86抗体（1:100）、抗CD206抗体（1:200）、または抗Ki67抗体（1:200）と共に一晩インキュベートした。PBSで洗浄後、スライドを0.3%過酸化水素-メタノール緩衝液で30分間インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。PBSで洗浄後、HRP標識二次抗体を添加し、30分間インキュベートした。PBSで洗浄後、酵素基質としてDABを添加した。HE染色では、腫瘍と肝組織を脱パラフィンし、水で洗浄した。ヘマトキシリンを添加し、5分間インキュベートした。インキュベーション後、スライドを洗浄し、水和した。エオシンを添加し、5分間インキュベートした後、洗浄した。HEおよびIHC切片の画像はすべて，オールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800, KEYENCE, 大阪, 日本）を用いて観察した。

[0066] 2.7.統計解析

統計的に有意な差は、両側Studentのt-testを用いて検定した。記号*、**、***はそれぞれ0.05、0.01、0.005より小さいp値を示し、N.S.は有意差なしを示す。

[0067] 結果

図５Ａに示されるスキームのように、マクロファージに対して、M2マクロファージ特異的プロモーターに駆動される炎症性サイトカインをコードする遺伝子を導入してM0マクロファージ（MacTrigger）を得た。炎症性サイトカ

インとしては一例としてTNF-α、IL-1β（NCBI Reference Sequence: NP_032387.1）、IL-2（NCBI Reference Sequence: NP_032392.1）、IL-6（GenBank: ABG81953.1）、IL-12（αサブユニット：NCBI Reference Sequence: NP_001152896.2、及びβサブユニット：NCBI Reference Sequence: NP_001290173.1）、およびIFN-γ（NCBI Reference Sequence: NP_032363.1）を用いた。図５Ａに示されるように、Ｍ２マクロファージ誘導サイトカインとしてIL-4またはIL-13存在下で培養するか、またはがん細胞の培養上清（TCM）存在下で、MacTriggerを培養した。培養開始24時間後、48時間後、および72時間後に培養醸成を回収し、2.4.2に基づいて、細胞から産生されるTNF-α、IL-2、およびIL-12のそれぞれの量（濃度）を決定した。結果は、図５Bに示される通りであった。図５Bに示されるように、Ｍ２マクロファージ誘導サイトカインである、IL-4またはIL-13の存在下では、MacTriggerは、TNF-αを産生した。また、TCM存在下でも、MacTriggerは、TNF-αを産生した。このことから、MacTriggerは、IL-4またはIL-13の存在下またはTCM存在下で、M2マクロファージに分化し、これにより、TNF-αを産生したことが示唆された。また、TCM存在下でＭ２マクロファージへの分化が促進されたことは、腫瘍組織がM2マクロファージへの分極を促進する環境を有していることを示唆する。また、図５Ｃに示されるように、IL-2およびIL-12をそれぞれ組み込んだMacTriggerもM2特異的にこれらのサイトカインを産生したことから、これらのMacTriggerも腫瘍組織特異的にサイトカインを放出すると考えられる。このようにM2特異的プロモーターでサイトカイン産生を駆動させることにより、MacTriggerは腫瘍に集積し、腫瘍組織内でM2マクロファージへ分極し、サイトカインを放出を開始する。サイトカインが炎症性サイトカインであれば、MacTriggerは腫瘍を炎症性環境を有するものへと変化させると期待される。

[0068] 2.4.4に記載の投与方法にしたがってMac（UTD）、Mac(CMVp)、またはMacTriggerを担癌マウスに投与した。投与１６日後に腫瘍組織を回収し、免疫組織化学染色により、CD86とCD206の発現を確認した。結果は、図６Aに示される通りであった。図６Aに示されるように、MacTrigger投与群では、M1マーカー

であるCD86の発現が顕著に増加した。また、上記染色結果に基づいてM1マクロファージ数とM2マクロファージ数の比（M1/M2）を決定した。図６Bに示されるように、Mac（UTD）およびMac(CMVp)のいずれか一方を投与した群では、M1/M2が１未満であり、Ｍ２優勢であったが、MacTrigger投与群ではM1/M2が１を超え、Ｍ１優勢であった。このことは、MacTrigger投与群でのみ、腫瘍組織が炎症状態に変化したことを示唆する。図６Cに示されるように、MacTriggerは、正常組織では炎症性サイトカインを放出せず、腫瘍組織内においてのみM2マクロファージへ分化し、腫瘍組織内で炎症性サイトカインを分泌して腫瘍組織を炎症状態にして、M1マクロファージなどの炎症性細胞の腫瘍組織内での増加を誘導する。

[0069] 図７Ａに示されるスキームおよび2.4.4に記載の方法にしたがって、Mac（UTD）、Mac(CMVp)、またはMacTriggerを担癌マウスに投与した。投与１６日後までマウスの腫瘍サイズを測定した。その結果、図７Ｂ左パネルに示されるように、MacTrigger投与群ではもっとも強く腫瘍サイズの増加を抑制した。また、担癌マウスの生存率を確認したところ、図７B右パネルに示されるように、PBS投与群ではほとんどのマウスが死亡したが、MacTriggerでは死亡例が認められなかった。このように、MacTrigger投与により腫瘍組織を炎症性に変更する操作は、その後の腫瘍サイズの増大と死亡率を顕著に抑制した。

[0070] インビトロ実験で、MacTriggerをIL-4またはIL-13の存在下、またはTCM存在下で培養し、MacTriggerの生存率をWST-8アッセイにより確認した。結果は、図７Ｃに示される通りであった。図７Ｃに示されるように、投与後のMacTriggerは、４日程度でほぼ死滅することが明らかになった。MacTriggerの死滅は、自身が分泌するTNF-αの影響であると考えられる。このMacTriggerの寿命を考慮すると、図７Bで示された腫瘍サイズ増大の継続的な抑制と、生存率の維持は、MacTriggerの死滅後にも継続しており、MacTriggerにより誘発された腫瘍組織内の炎症環境の継続と、それによる効果であることが示唆される。このことと一致するように、MacTrigger投与１６日後の腫瘍組織では、M1マクロファージが優勢であった（図６Aおよび６B参照）。

[0071] MacTrigger投与１６日後に腫瘍組織を取り出し、免疫組織化学染色により、増殖マーカーであるKi67の発現を確認した。結果は、図７Dに示される通りであった。図７Dに示されるように、MacTrigger投与群では、明らかにKi67の発現が他の群と比較して低下しており、腫瘍組織における細胞増殖が抑制されていることが示唆された。担癌マウスの体重を経時的に確認した。図７Ｅに示されるように、MacTrigger投与による体重減少は認められなかった。

[0072] MacTriggerを投与した個体の腫瘍組織内への免疫細胞数を評価した。具体的には、上記のMacTrigger投与１６日後のマウスから腫瘍組織を回収し、図８Ａに記載のようにフローサイトメトリーによりＮＫ細胞と細胞傷害性Ｔ細胞をゲーティングした。結果は、図８Ｂに示される通りであった。図８Ｂに示されるように、MacTrigger投与群では、腫瘍組織におけるＮＫ細胞と細胞傷害性Ｔ細胞の割合がそれぞれ顕著に増加した。このことから、MacTrigger投与により誘発される腫瘍組織における炎症は、腫瘍組織内M1マクロファージ数の増加のみならず、NK細胞および細胞傷害性T細胞数の増加をもたらすことが明らかになった。

[0073] VT-680標識マクロファージ投与後のマウスの体内におけるマクロファージの動態を調べた。具体的には、2.3.2に記載の方法と同様の方法で、担癌マウスおよび非担癌マウスそれぞれにVT-680標識マクロファージを投与し、投与1日後、4日後、および7日後にIVIS spectrumを用いてin vivoイメージングを行った。結果は、図９Ａおよび９Ｂに示されるように、マクロファージは、腫瘍組織に蓄積した。

[0074] マクロファージ投与４日後、および７日後のマウスから腫瘍組織を含む各種臓器を摘出して、VT-680の発現に基づいてマクロファージの分布を分析した。その結果、図９Ｃに示されるように、マクロファージは、腫瘍と肝臓に多く蓄積した。上記の結果から、マクロファージは肝臓に遊走されている可能性が示唆された。

[0075] マクロファージの肝臓への集積による肝毒性を評価した。2.3.2に記載の方法と同様の方法で、担癌マウスおよび非担癌マウスそれぞれにマクロファー

ジを投与し、投与4日後、および7日後に血中のAST活性を測定した。図１０Ｂに示されるように、マクロファージ投与群と非投与群とでASTレベルに有意な相違は認められなかった。このことは、マクロファージは、肝臓に蓄積するものの、肝臓に損傷を及ぼさないことを示唆する。腫瘍組織と肝臓におけるM2マクロファージマーカーCD206レベルを検討した。図１０Ｃに示されるように、腫瘍組織においてM2マクロファージの顕著な増加を認めた。これに対して、肝臓ではM2マクロファージの顕著な増加は認められなかった。このことは、マクロファージが腫瘍組織内においてのみM2マクロファージに分極することを示唆する。

[0076] 実際に、MacTrigger投与の肝臓への影響を確認すると、図１０Ｄに示されるように、投与１６日後のマウスの肝臓重量、ＡＳＴ値は、MacTrigger投与群とPBS投与群とで有意な差は認められなかった。また、図１０Ｅに示されるように、肝臓の組織切片において、MacTrigger投与群では、免疫細胞の浸潤は認められなかった。このことからMacTriggerは肝臓ではM2マクロファージへは有意には分化せず、肝障害を誘発するには至らないことが明らかになった。これに対して、Mac(CMVp)投与群では、投与したマクロファージが恒常的にTNF-αを分泌する構成となっており、肝臓においてもTNF-αを分泌し、肝肥大と血中AST値の増大を認め（図１０Ｄ参照）、かつ肝臓への免疫細胞の浸潤を誘発した（図１０Ｅ参照）。

[0077] 図７Ａおよび７Ｂでは、担がん操作の５日後にMacTriggerを投与したが、腫瘍をより大きく増大させてからのMacTrigger投与の効果を評価するため、担がん操作の１０日後にMacTriggerを同量投与した。１０日後の腫瘍体積は、５日後の腫瘍体積の約２倍であった。その結果は図１１Ａに示される通りであった。図１１Ａに示されるように、MacTrigger投与は有意な抗腫瘍効果を奏した。腫瘍組織のM1/M2比はMacTrigger投与群において１を超えた（図１１Ａ参照）ことから、MacTriggerは腫瘍内環境を抗炎症性の環境から炎症性の環境に変え、これにより抗腫瘍効果を発揮するものと考えられた。

[0078] MacTriggerをトリプルネガティブ乳がん細胞株である4T1細胞または結腸が

ん細胞株であるColon-26細胞をグラフトしたマウスに対して投与した。その結果、MacTrigger投与群では、陰性対照（PBS投与群）と比較して有意な抗腫瘍効果が認められた（図１１Ｂ参照）。

[0079] 免疫チェックポイント阻害剤との併用を試みた。免疫チェックポイント阻害剤としては抗ＰＤ－１抗体（InVivoMAb anti-mouse PD-1、BioXcell社、BE0146）を用いた。４Ｔ１細胞は、ＰＤ－Ｌ１低発現性細胞であり、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して非応答性である。２×１０^{5}の４Ｔ１細胞をＢＡＬＢ／ｃマウス（雌、ｎ＝５）にi.d.投与してトリプルネガティブ乳がん担持モデルを作製した。投与５日後に(i) ＰＢＳ、(ii) 抗ＰＤ－１抗体（50μｇ）、もしくは(iii) MacTrigger（10^{6}細胞）、または(iv) 抗ＰＤ－１抗体（50μｇ）とMacTrigger（10^{6}細胞）との組合せをそれぞれ静脈内投与した。2日に1回の頻度で腫瘍体積と体重を測定した。図１２Ａに示されるように、抗ＰＤ－１抗体投与群は予想される通りにほとんど効果を示さなかった。これに対して、MacTrigger投与群では有意な抗腫瘍効果が認められた（図１２Ａ参照）。また、抗ＰＤ－１抗体とMacTriggerの組合せの投与群では、MacTrigger投与群と比較して有意な抗腫瘍効果の増大を認めた（図１２Ａ参照）。がん組織中のＴ細胞におけるＣＤ４単独陽性／ＰＤ－１陽性Ｔ細胞の割合を確認した。その結果、MacTrigger投与群ではＣＤ４単独陽性／ＰＤ－１陽性Ｔ細胞の割合の増加が認められた（図１２Ｂ参照）。このように腫瘍に対する免疫細胞のリクルートが促進しているが、免疫チェックポイント分子を発現している免疫細胞の割合も向上していた。なお、これらの投与群のいずれにおいても体重の有意な減少は認められず（図１２Ｃ参照）、その他の毒性は確認されなかった（図１２Ｄ参照）。抗ＰＤ－１抗体が単剤では奏功しないのに対して、抗ＰＤ－１抗体とMacTriggerの組合せの投与群では、MacTrigger投与群と比較して有意な抗腫瘍効果の増大を認めたことは意外な結果であった。MacTriggerが腫瘍特異的に免疫学的に活性な腫瘍に変化させると共に、抗ＰＤ－１抗体非応答性の腫瘍組織にＰＤ－１陽性Ｔ細胞のリクルートや増加をもたらし、これにより腫瘍内環境が、抗ＰＤ－１抗体が作用を発揮でき

る環境に変化したと考えられた。

[0080] トリプルネガティブ乳がん担持モデルを用いて更なる実験を行った。４Ｔ１細胞投与５日後に陰性対照にはPBSを投与し、比較対照群にはドキシルビシン４０μｇとシクロホスファミド２ｍｇの併用を投与し、試験群には抗ＰＤ－１抗体（50μｇ）とMacTrigger（10^6細胞）との組合せをそれぞれ静脈内投与した。結果は図１３に示される通りであった。図１３に示されるように、比較対照群は最も強力な抗腫瘍効果を発揮したものの、血便および血尿と体重減少などの強い副作用が奏され、比較対照群における試験を中止した。これに対して試験群では、確認できる副作用無しで、有意な抗腫瘍効果を奏した。

[0081] ヒト型MacTriggerを調製した。single cell RNA sequenceのデータからM0、M1、およびM2マクロファージのうち、M2マクロファージに特異的発現を示す遺伝子を抽出した。61の遺伝子がM2特異的発現を示すものであった。ボルケーノプロット解析を行い、ｐ値が小さく倍数変化の大きな遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子発現の倍数変化（log2(FC)）およびｐ値は表３に示される通りであった。

[0082]

[表4]

表４：各候補遺伝子のM2発現/M0発現比

Gene	log2(FC)	Adj.Pval	Gene	log2(FC)	Adj.Pval
FCER1A	6.24	8.26E-12	MMP1	2.96	4.13E-09
F13A1	4.64	5.16E-11	ARRDC4	2.93	3.79E-10
ALDH1A2	4.58	1.84E-12	AQP9	2.88	4.25E-09
CD209	4.49	1.08E-11	ZNF366	2.84	2.67E-10
TGM2	4.36	1.08E-11	CCL5	2.79	1.02E-09
VCAM1	3.90	9.22E-12	SOCS1	2.78	1.61E-08
LOX	3.86	3.66E-11	IL1RN	2.78	3.56E-09
CISH	3.68	9.91E-11	IL1R1	2.69	1.18E-09
ALOX15	3.62	1.39E-10	CLEC19A	2.66	3.20E-09
MMP12	3.56	5.66E-09	FABP4	2.62	6.53E-08
SPINT2	3.55	3.66E-11	GLUD1P3	2.57	4.64E-07
FGL2	3.21	1.74E-10	DUSP8P5	2.57	6.10E-09
SCIMP	3.14	5.60E-10	IGFBP5	2.52	9.91E-11
SIGLEC10	3.07	9.91E-11	PPFIBP1	2.51	4.35E-09
IL4I1	3.05	5.60E-10	CD274	2.48	8.71E-09
FN1	3.02	4.07E-10	CCL22	2.46	9.91E-11
SERPINB4	2.97	2.49E-10			

[0083] 表3において下線で特定された遺伝子についてRT-PCRによりさらに詳細に発現を分析した。その結果、図14Ａ～Ｃに示されるように、確認したほとんどの遺伝子がM2特異的な発現を示した。中でも、CCL-22、CISH、ALOX15、およびTGM2はM2マクロファージ特異的であり、かつM2における発現量/M0における発現量比が大きく、プロモーターとして特に好ましいことが明らかになった。CCL-22はケモカインC-Cモチーフリガンド22を表し、CISHはサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質を表し、ALOX15はアラキドナート15-リポキシゲナーゼを示し、TGM2はトランスグルタミナーゼ2を表す。

[0084] ヒトCCL-22プロモーターにヒトTNF-αをコードする遺伝子を連結し、THP-1細胞に導入し、遺伝子が導入されたTHP-1細胞をPMA処理（20ng/mLで16時間）

によりマクロファージを誘導した。ヒトTNF-αのM2は、25 ng/mLのIL-4もしくはIL-13を含む培地中で誘導した。ヒトTNF-αのM2およびM0マクロファージにおける発現量をELISAにより確認したところ、M2特異的なTNF-αの発現を認めた（図15参照）。

[0085] MacTriggerは、免疫系を腫瘍組織に誘導してがんを治療するトリガーとして機能する新しいタイプの細胞医薬品である。今回、本実施例では、マクロファージを操作し、腫瘍組織のみに炎症環境を誘導するトリガーとして機能させた「MacTrigger」を報告した。これにより、異物除去能に基づく強力な抗腫瘍効果を発揮することができた。この研究の強みは、マクロファージが持つ2つのユニークな機能、すなわち、（1）免疫抑制的な環境を有する腫瘍組織への移動能力、（2）当該腫瘍組織の存在下で抗炎症性のM2表現型に極性化すること、を利用している点である。MacTriggerは、M2表現型に偏極すると、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子-α（TNF-α）の放出を促進した。このMacTriggerを担癌マウスに投与したところ、非投与群、マクロファージ未導入群、TNF-αをランダムに放出することができる人工マクロファージ群と比較して、腫瘍の成長が有意に抑制された。さらに、腫瘍組織におけるM1表現型とM2表現型の比率は、MacTrigger群のみ>1であった。さらに、腫瘍組織におけるナチュラルキラー細胞およびCD8+T細胞の比率は、MacTrigger投与群において他のグループと比較して増加していた。これらの結果は、MacTriggerが腫瘍組織において炎症を誘発し、効果的な抗腫瘍効果をもたらすことを示している。また、正常組織、特に肝臓では、顕著な副作用は認められなかった。これは、肝臓では、MacTriggerがM2表現型に極性化せず、炎症を誘発できなかったためであると考えられる。これらの結果から、MacTriggerは、腫瘍組織でのみ炎症を誘発し、自然免疫系を介して腫瘍組織を攻撃することができる「トリガー」であることが示唆された。

[0086] 本明細書で引用された文献は、引用によりその全体が本明細書に組込まれる。

[0087] 参考文献

[1] J. Fu et. al., J Control Release 204 (2015) 11-19.

[2] P. G. Rose et. al., Oncologist 10 (2005) 205-214.

[3] L. Yang et. al., ACS Nano 16 (2022) 9799-9809.

[4] B. Mansoori et. al., Adv Pharm Bull 7 (2017) 339-348.

[5] D. W. Edwardson et. al., Curr Drug Metab. 16 (2015) 412-426.

[6] M. Markman et. al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121 (1995) 631-63 2.

[7] A. H. M. de Vries Schultink et. al., Eur J Clin Pharmacol 72 (201 6) 645-653.

[8] W. Zou, Nat Rev Cancer 5 (2005) 263-274.

[9] T. L. Whiteside, Oncogene 27 (2008) 5904-5912.

[10] T. Wu, Y. Dai, Cancer Lett. 387 (2017) 61-68.

[11] D. H. Munn, V. Bronte, Curr Opin Immunol. 39 (2016) 1-6.

[12] T. L. Whiteside, Semin Cancer Biol 16 (2006) 3-15.

[13] A. Facciabene et. al., Cancer Res. 72 (2012) 2162-2171.

[14] R. A. Flavell et. al., Nat Rev Immunol. 10 (2010) 554-567.

[15] S. F. Josephs et. al., J Transl Med. 16 (2018). doi:10.1186/s129 67-018-1611-7

[16] T. Liu et. al., Signal Transduct Target Ther. 2 (2017) 17023.

[17] S. Devaraj, I. Jialal, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31 (2011) 1397-1402.

[18] A. Sica et. al., Semin Cancer Biol. 18 (2008) 349-355.

[19] X. Chen et. al., Cancer Lett. 456 (2019) 69-79.

[20] W. Cai et. al., Biochem Insights. 1 (2008) 5-21.

[21] Y. Ma et. al., Sci Rep. 5 (2015) 13595.

[22] R. Gordon et. al., J Neuroinflammation 9 (2012).

[23] Y. Q. Luo et. al., IUBMB Life 58 (2006) 647-653.

[24] M. A. Lyu et. al., Biochem Pharmacol. 75 (2008) 836-846.

[25] F. Loganzo et. al., Mol Cancer Ther. 14 (2015) 952-963.

[26] C. Montagu et. al., Nat Med. 18 (2012) 221-223.

[27] L.C. Davie et. al., Nat Immunol. 14 (2013) 986-995.

[28] M. Santoni et. al., Biomed Res Int. (2014). doi:10.1155/2014/768758

[29] A. Aalipour et. al., Nat Biotechnol. 37 (2019) 531-539.

[30] C. Yunna et. al., Eur J Pharmacol. 877 (2020) 173090.

[31] P. J. Murray et. al.. Immunity, 41 (2014) 14-20.

[32] T. Roszer, Mediators Inflamm. (2015). doi:10.1155/2015/816460

[33] J. Maloney et. al., Microbes Infect. 17 (2015) 462-467.

[34] M. Munder, Br J Pharmacol. 158 (2009) 638-651.

[35] T. Veremeyko et. al., Front Immunol. 9 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02515

[36] A. L. Pauleau et. al., J. Immunol. 172 (2004) 7565-7573.

[37] T. D. Schmittgen, K. J. Livak, Nat Protoc. 3 (2008) 1101-1108.

[38] R. W. Knackstedt et. al., Cancer Prevention Research. 6 (2013) 585-593.

[39] O. R. Colegio et. al., Nature 513, (2014) 559-563.

[40] C. Murdoch et. al., Blood 104 (2004) 2224-2234.

[41] M. R. McGill, EXCLI J. 15 (2016) 817-828.

[42] S. J. Lin et. al., J. Immunol 171 (2003) 4708-4716.

[43] J. Lee, S. Kim, Arch Virol 161 (2016) 1151-1158.

[44] M. M. Alvarez et. al., J Control Release. 240 (2016) 349-363.

[45] N. Wang, H. Liang Front Immunol. 5 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00614

[46] S. Wang et. al., Science Translational Medicine, 13 (2021).

[47] R. Horssen et. al., Oncologist. 11 (2006) 397-408.

[48] S. Setrerrahmane, H. Xu, Mol Cancer. 16 (2017).

[49] A. Suzuki et. al., Cytokine. 75 (2015) 79-88.

[50] H. Patel et. al., Cancer Biol Ther. 19 (2018) 3-12.

[51] J. Shi et. al., Int J Mol Sci. 22 (2021) 1-16.

[52] R. Sugimoto et. al., Liver International. 25 (2005) 420-428.

[53] I. M. Wang et. al., Mol Immunol. 41 (2004) 873-884.

請求の範囲

[請求項1] Ｍ２マクロファージへの分化能／分極能を有する細胞であって、制御配列に作動可能に連結した炎症性サイトカインをコードする核酸を含み、Ｍ２マクロファージへの分化／分極後に前記炎症性サイトカインを発現することができる、細胞。

[請求項2] Ｍ０マクロファージ、単球、共通単球前駆細胞、単球樹状細胞前駆細胞、骨髄系前駆細胞、および造血幹細胞、並びに造血幹細胞からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞、からなる群から選択されるいずれかの細胞である、請求項１に記載の細胞。

[請求項3] ｉＮＯＳ、ＣＤ２０６、およびＡｒｇ－１陰性のマクロファージである、請求項１または２に記載の細胞。

[請求項4] 単球からＭ０マクロファージへの分化工程のいずれかの細胞である、請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項5] 炎症性サイトカインが、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１７、およびＩＬ－２３からなる群から選択される炎症性サイトカインである、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項6] 炎症性サイトカインが、ＴＮＦ－αである、請求項１～５のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項7] 制御配列が、Ｍ２マクロファージ特異的に前記炎症性サイトカインを発現する、請求項１～６のいずれか一項に記載の細胞。

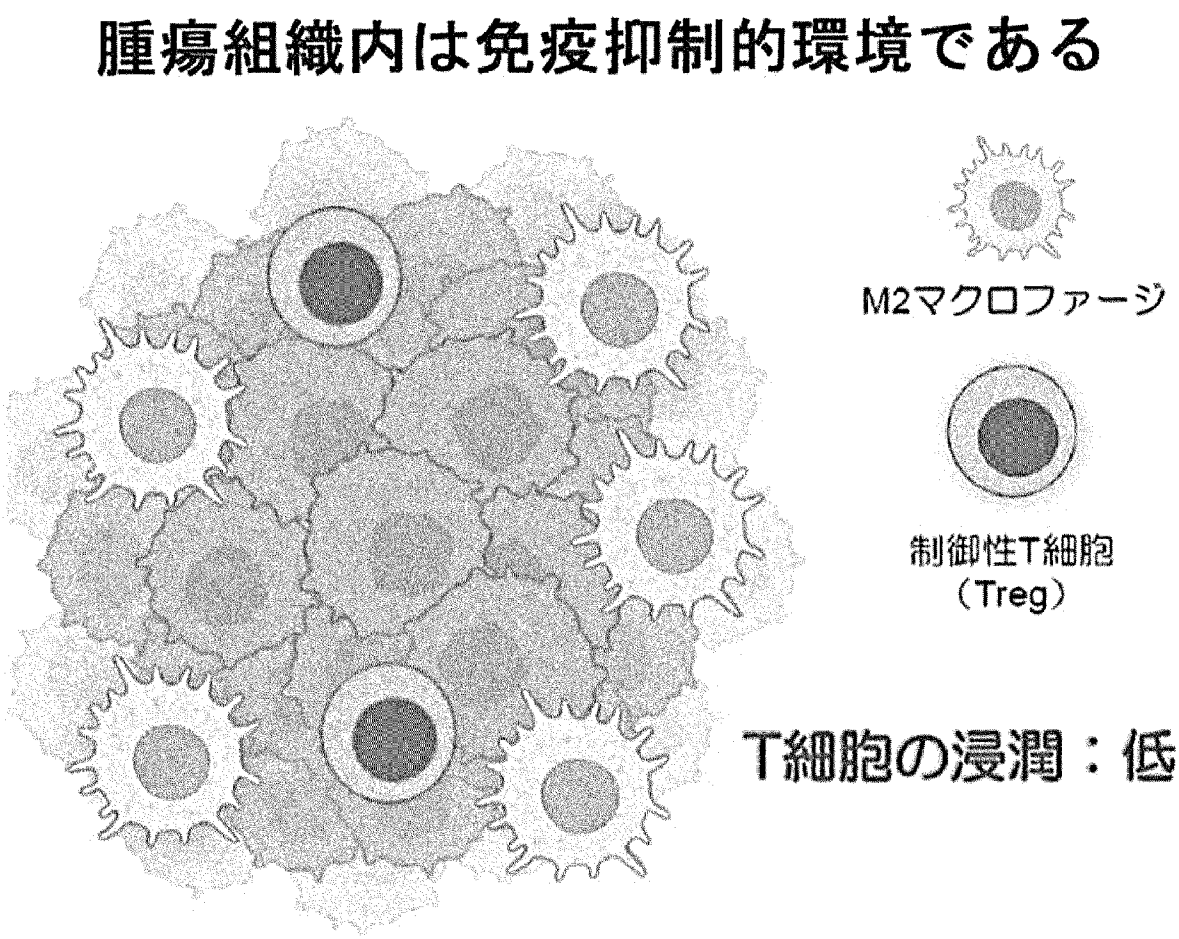
[請求項8] 制御配列が、ＣＤ１６３、ＣＤ２００　Ｒ１、ＣＤ３０１、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＤ２０９、デクチン－１、Ｆｃｅ　ＲＩａ、ＩＬ－１ＲＩＩ、ＣＤ２０６、アルギナーゼ１、ＩＦＲ４、ＰＰＡＲγ、ＳＴＡＴ６、ＦＩＺＺＩ、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＣＣＬ１、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ２２、ＣＣＣＬ２３、ＣＣＬ２４、ＣＣＬ２６、およびＹＭ１からなる群からなる遺伝子の制御配列である、請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物。

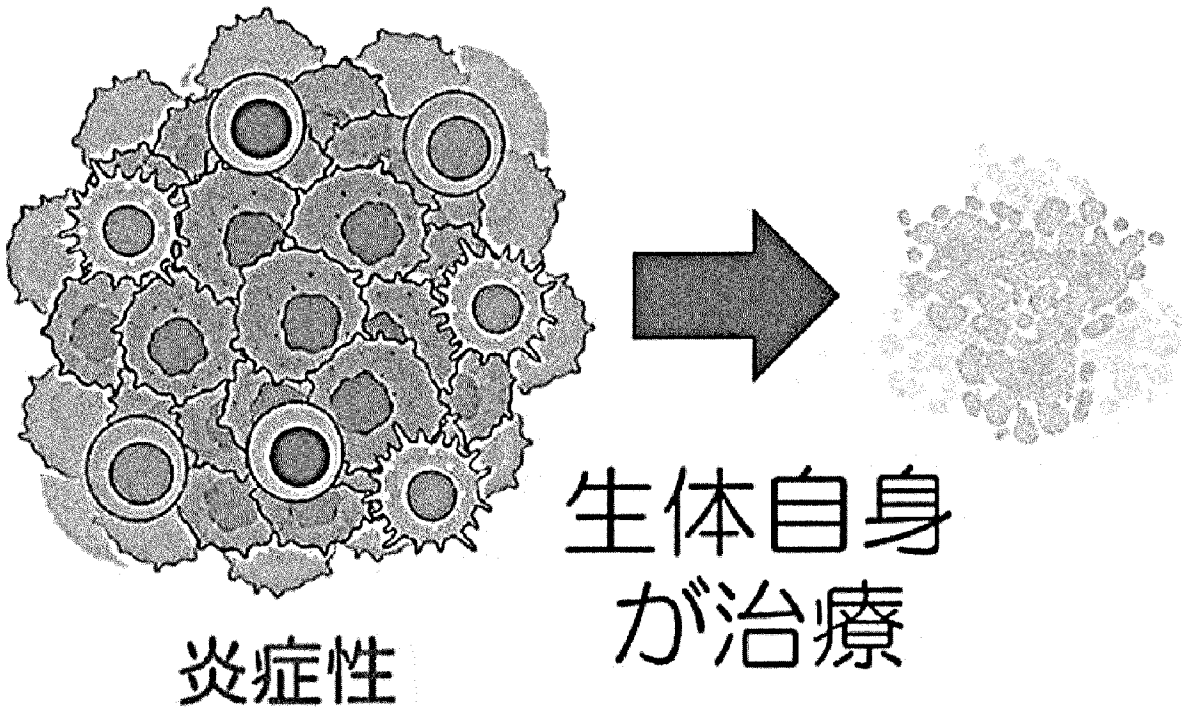
[請求項10] がんを処置することに用いるための、請求項９に記載の組成物。

WO 2024/166936 PCT/JP2024/004080

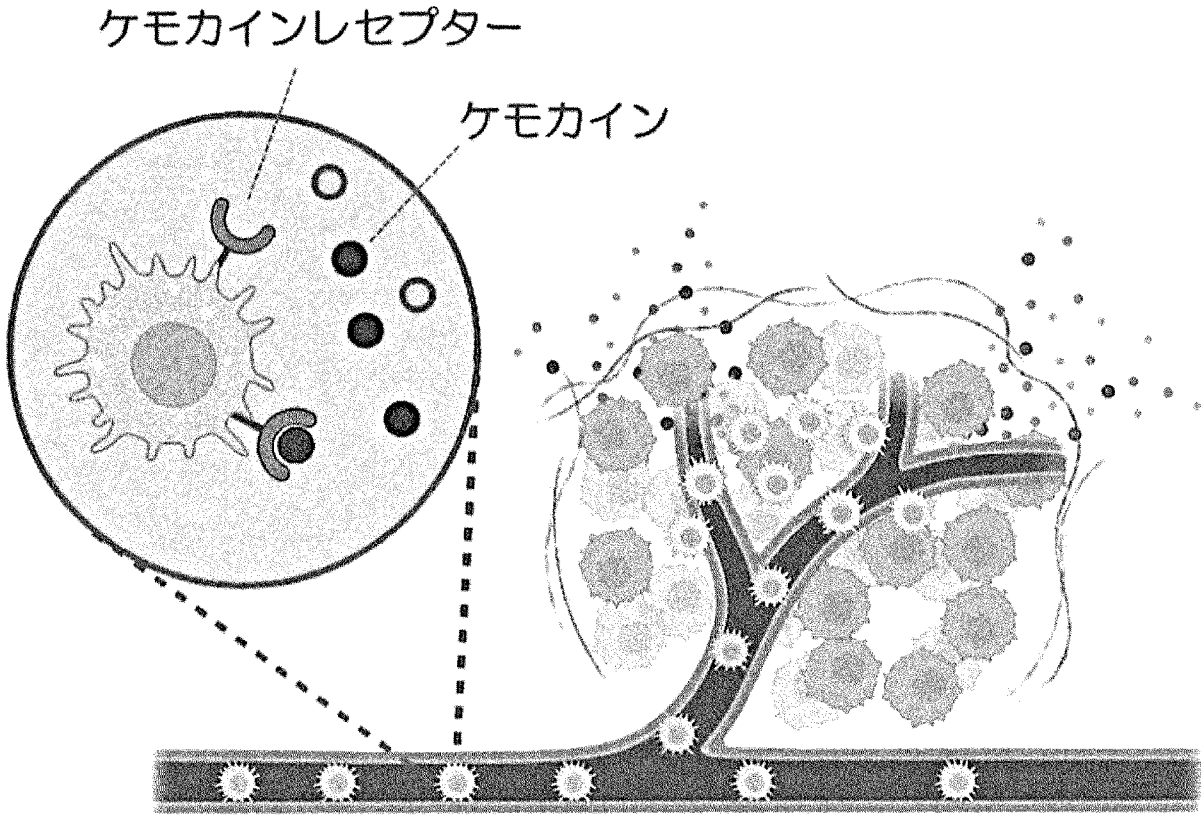
[図1]



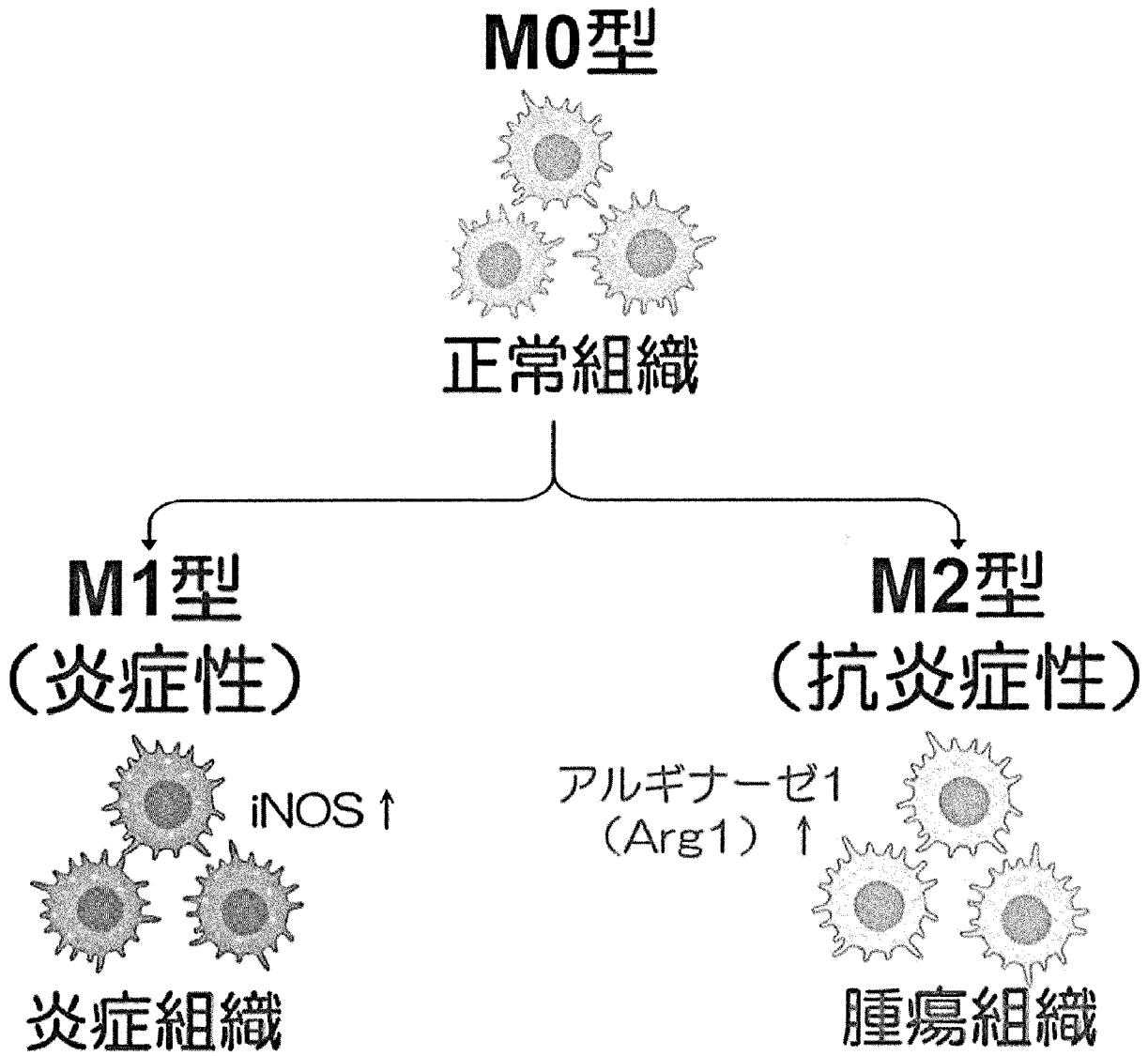
[図2]



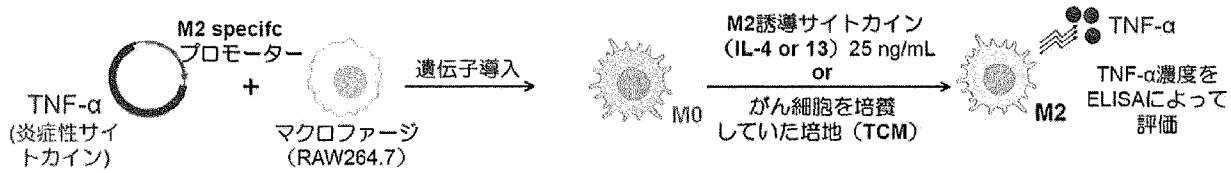
[図3]



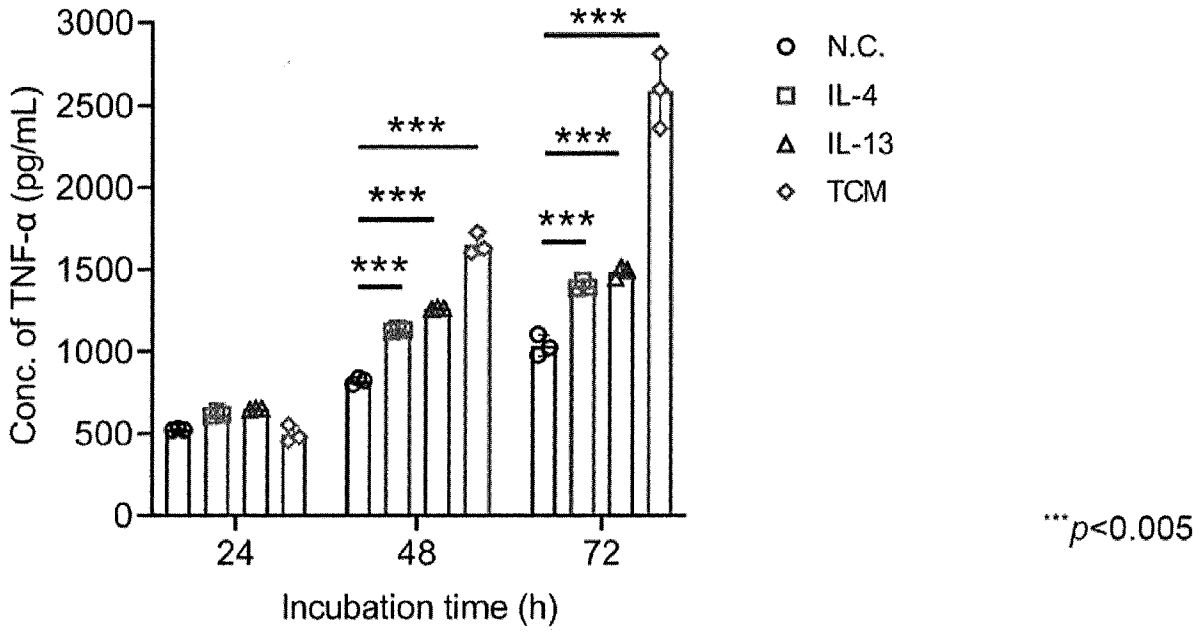
[図4]


M0型
正常組織
M1型
（炎症性）
M2型
（抗炎症性）
iNOS↑
アルギナーゼ1
（Arg1）↑
炎症組織
腫瘍組織

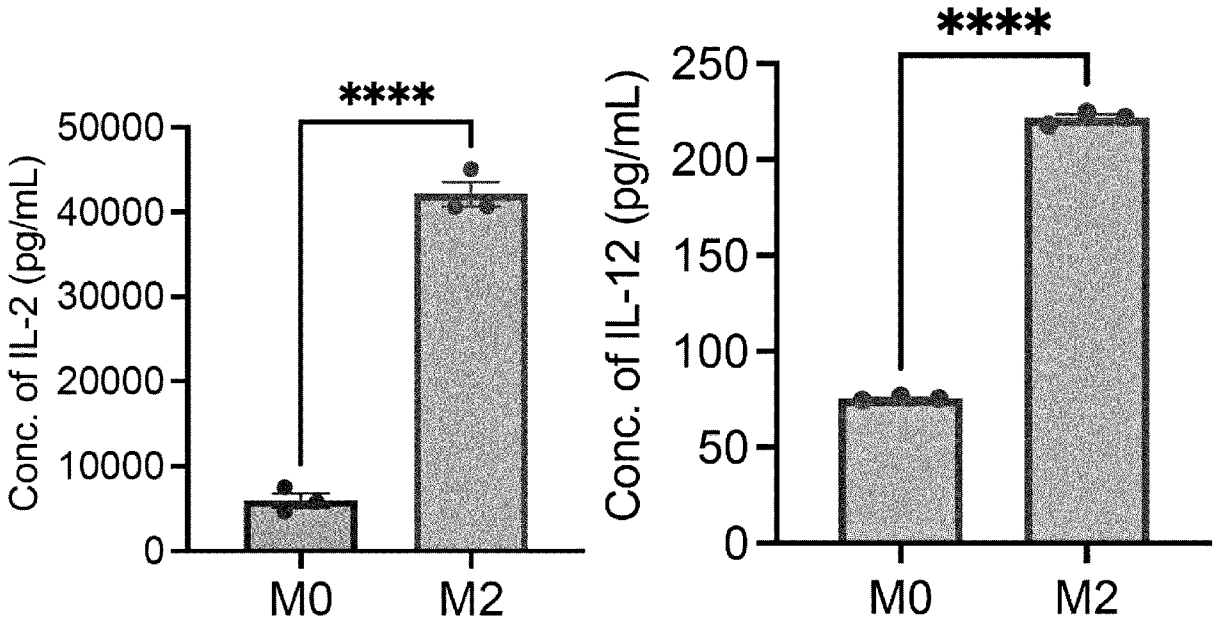
[図5A]


M2 specifc
プロモーター
+
TNF-α
(炎症性サイトカイン)
マクロファージ
（RAW264.7）
遺伝子導入
M0
M2誘導サイトカイン
（IL-4 or 13）25 ng/mL
or
がん細胞を培養していた培地（TCM）
M2
TNF-α
TNF-α濃度をELISAによって評価

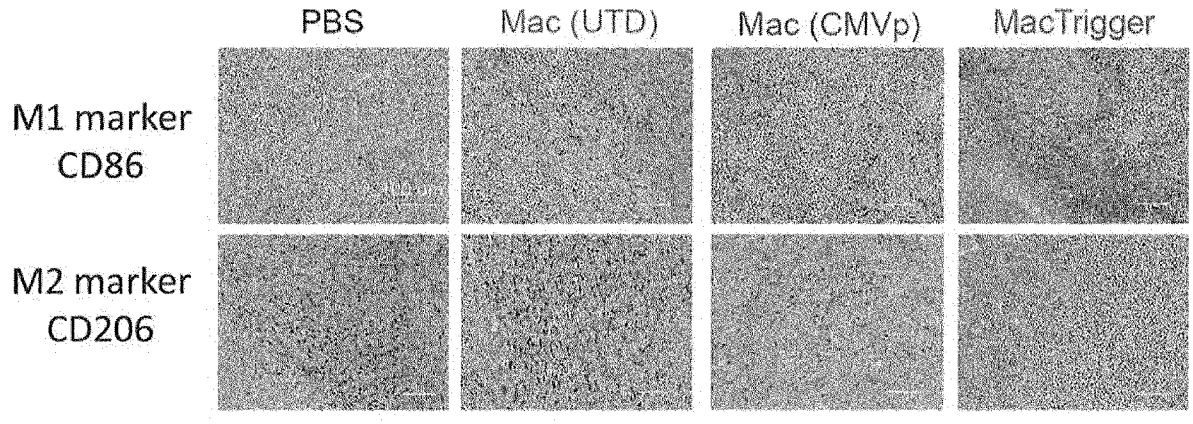
[図5B]


Conc. of TNF-α (pg/mL)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
24
48
72
Incubation time (h)
***
N.C.
IL-4
IL-13
TCM
***p<0.005

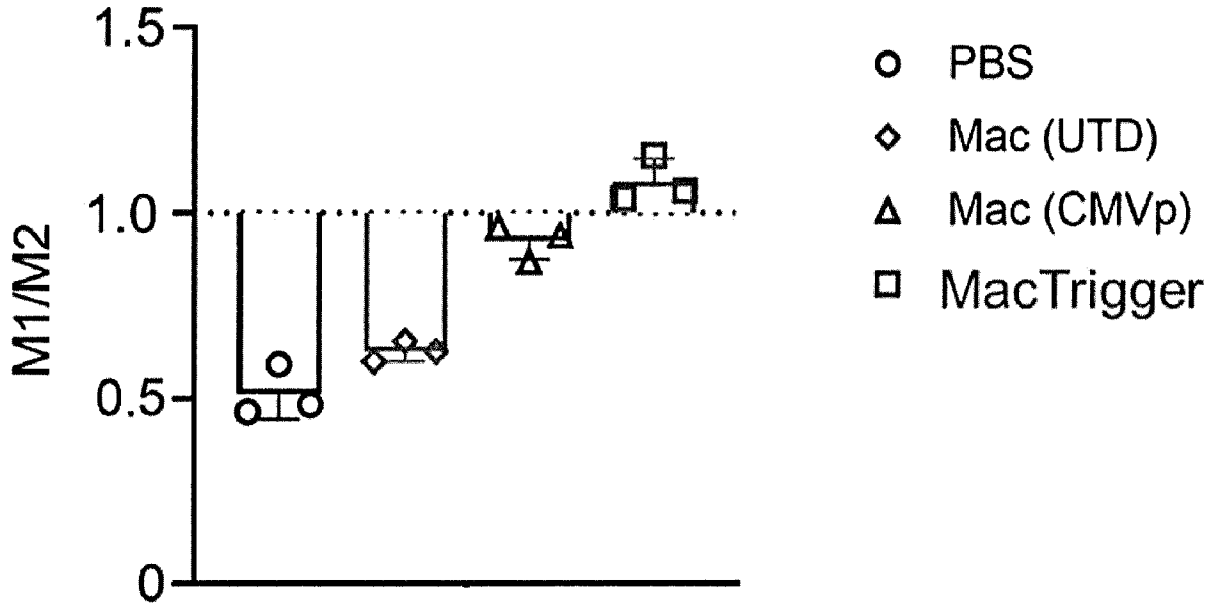
[図5C]


Conc. of IL-2 (pg/mL)
50000
40000
30000
20000
10000
0
M0
M2
****
Conc. of IL-12 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
M0
M2
****

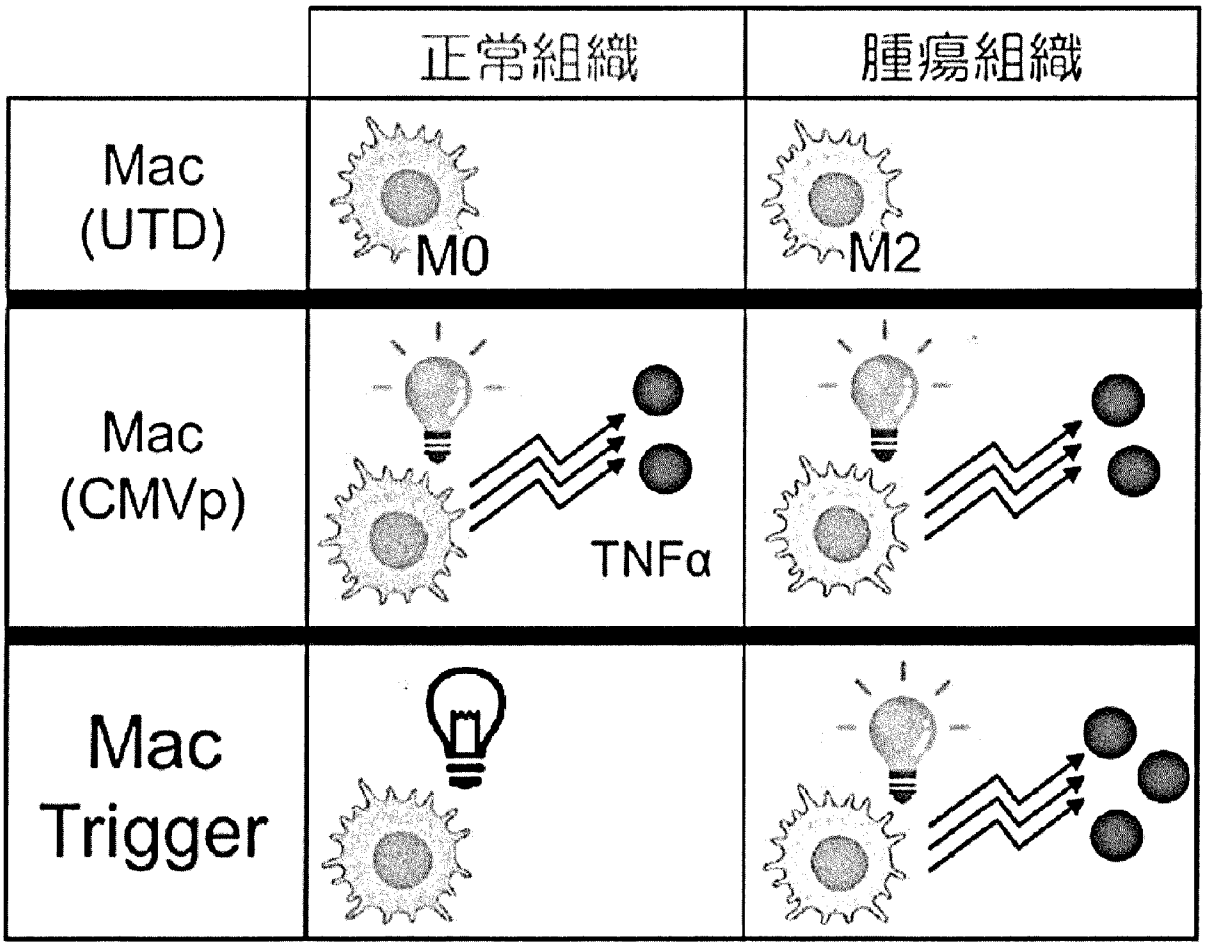
[図6A]


PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
M1 marker
CD86
M2 marker
CD206

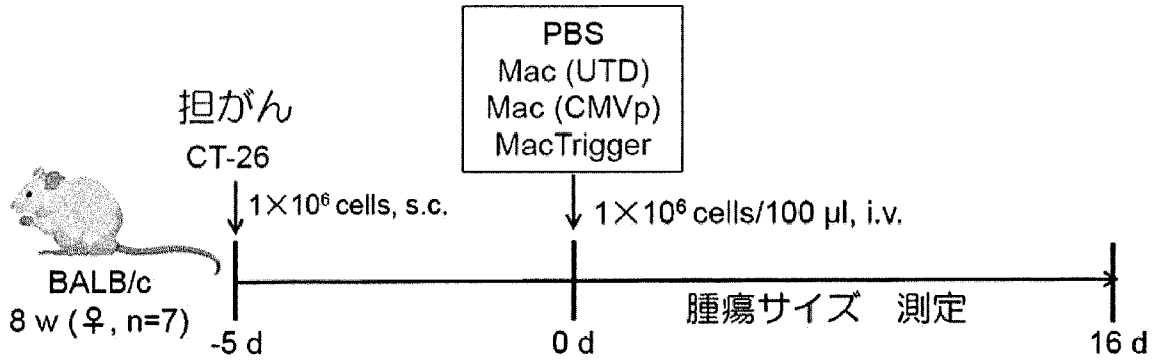
[図6B]


1.5
1.0
0.5
0
M1/M2
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger

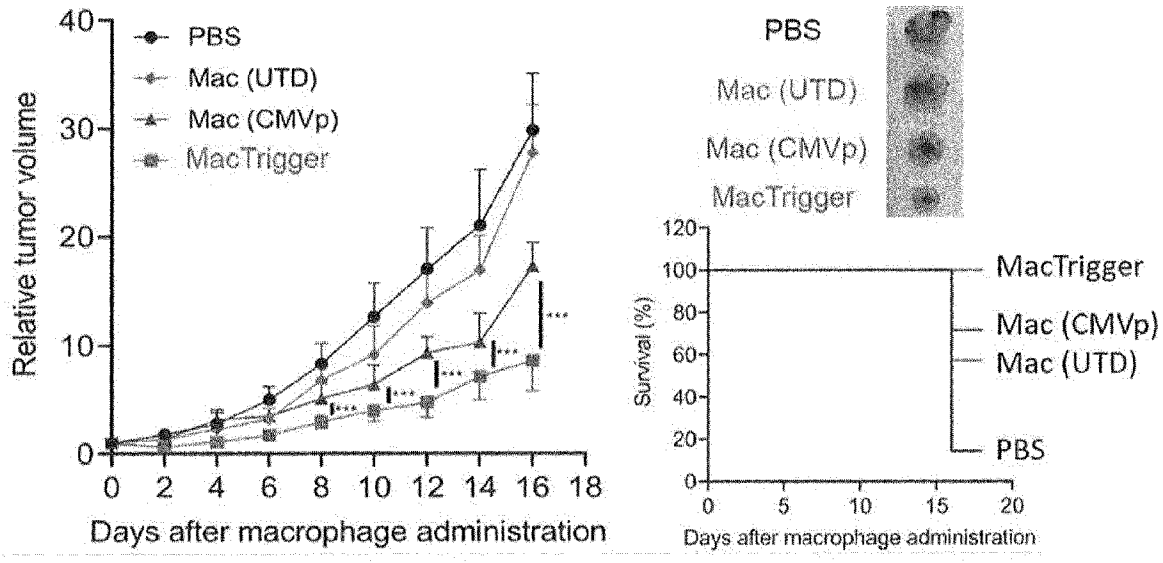
[図6C]


正常組織
腫瘍組織
Mac (UTD)
M0
M2
Mac (CMVp)
TNFα
Mac Trigger

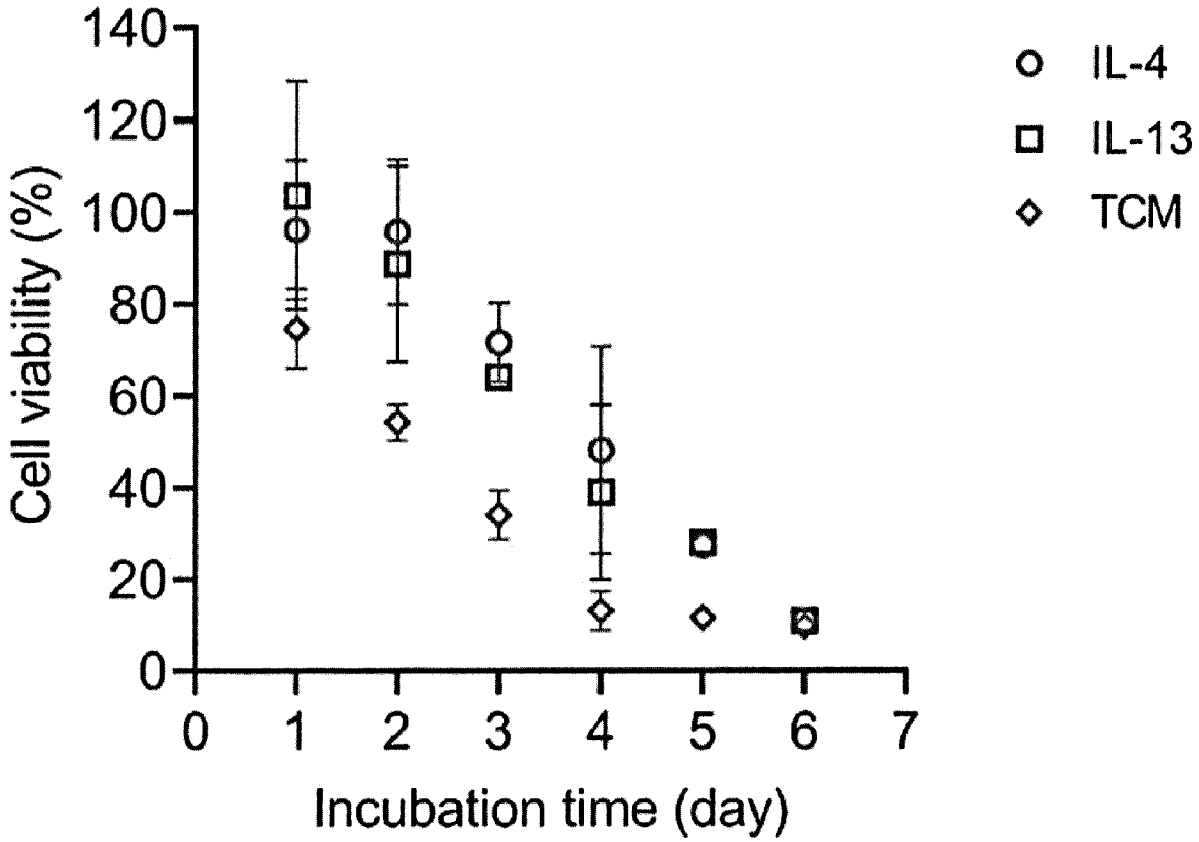
[図7A]


PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
担がん
CT-26
1×10⁶ cells, s.c.
1×10⁶ cells/100 µl, i.v.
BALB/c
8 w (♀, n=7)
腫瘍サイズ 測定
-5 d
0 d
16 d

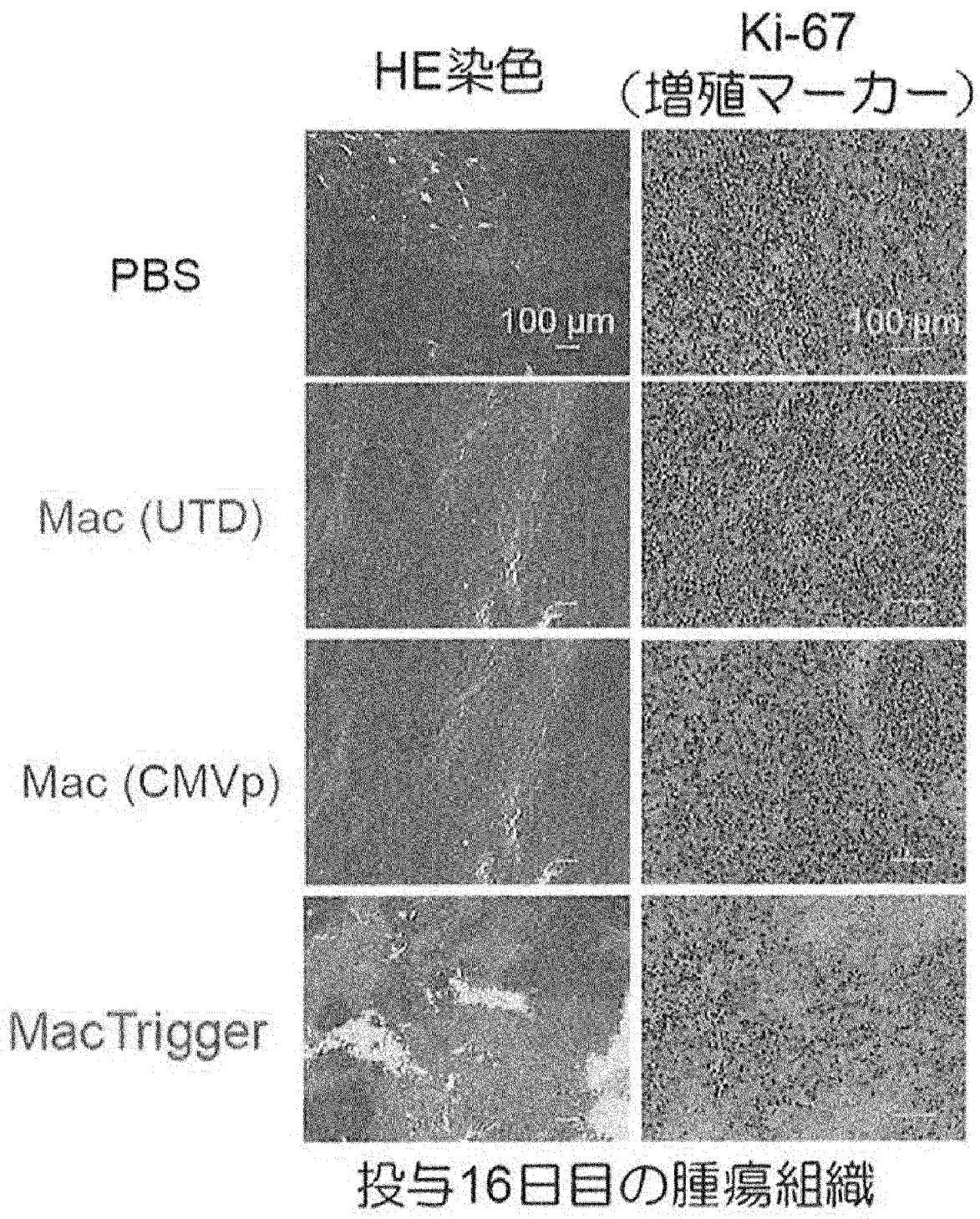
[図7B]


PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
Relative tumor volume
Days after macrophage administration
Survival (%)
Days after macrophage administration

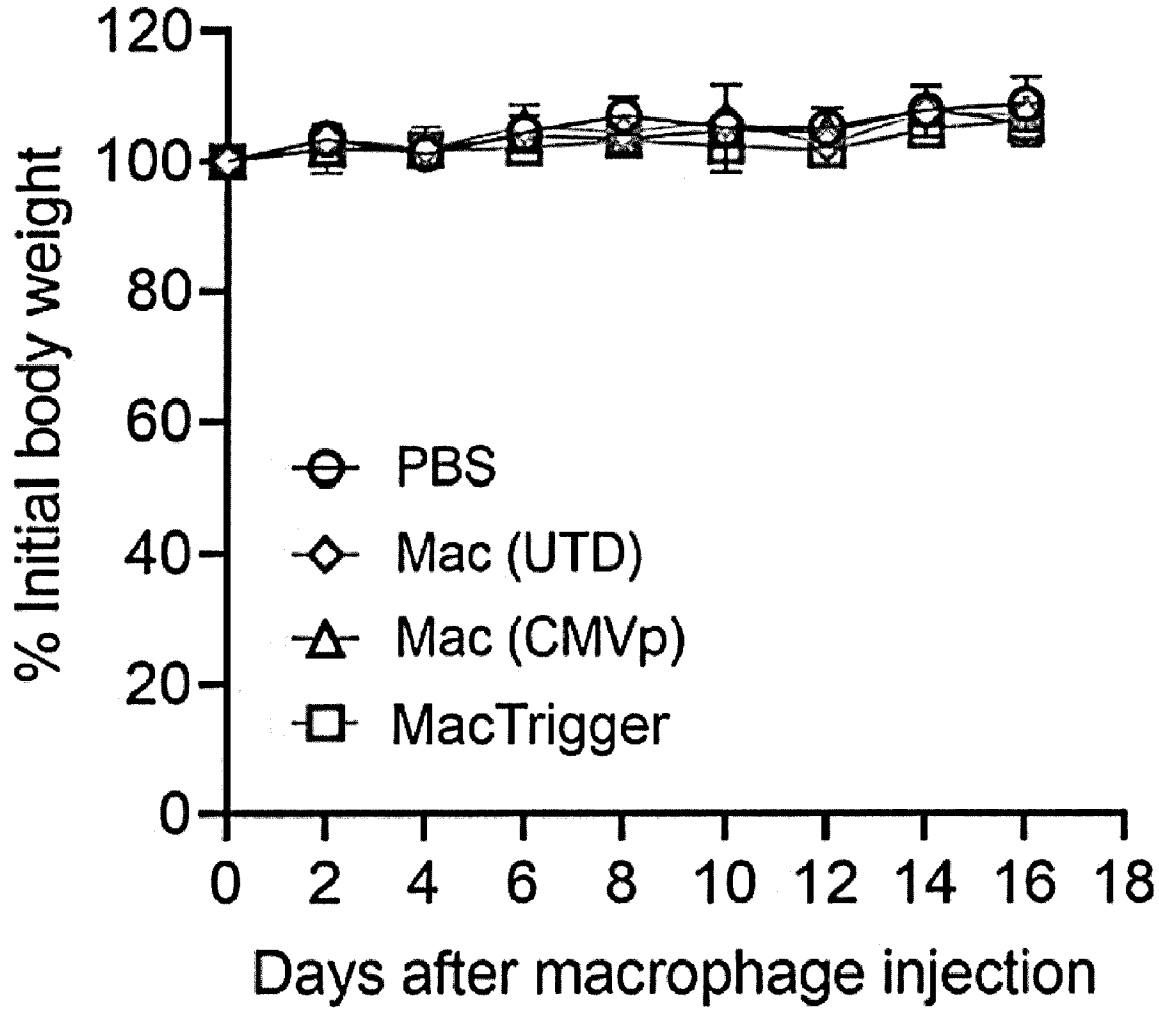
[図7C]


140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
Incubation time (day)
IL-4
IL-13
TCM

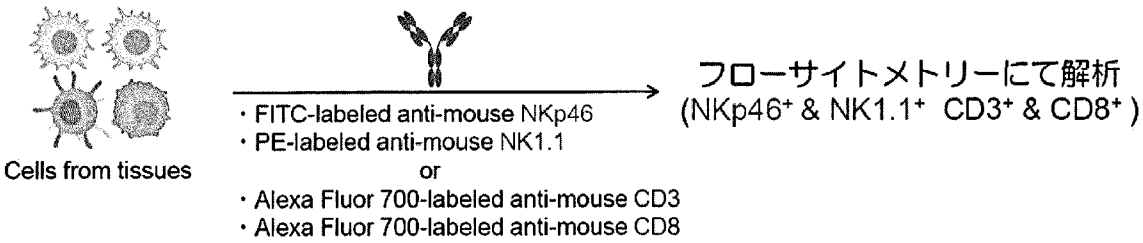
[図7D]


HE染色
Ki-67
（増殖マーカー）
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
100 μm
100 μm
投与16日目の腫瘍組織

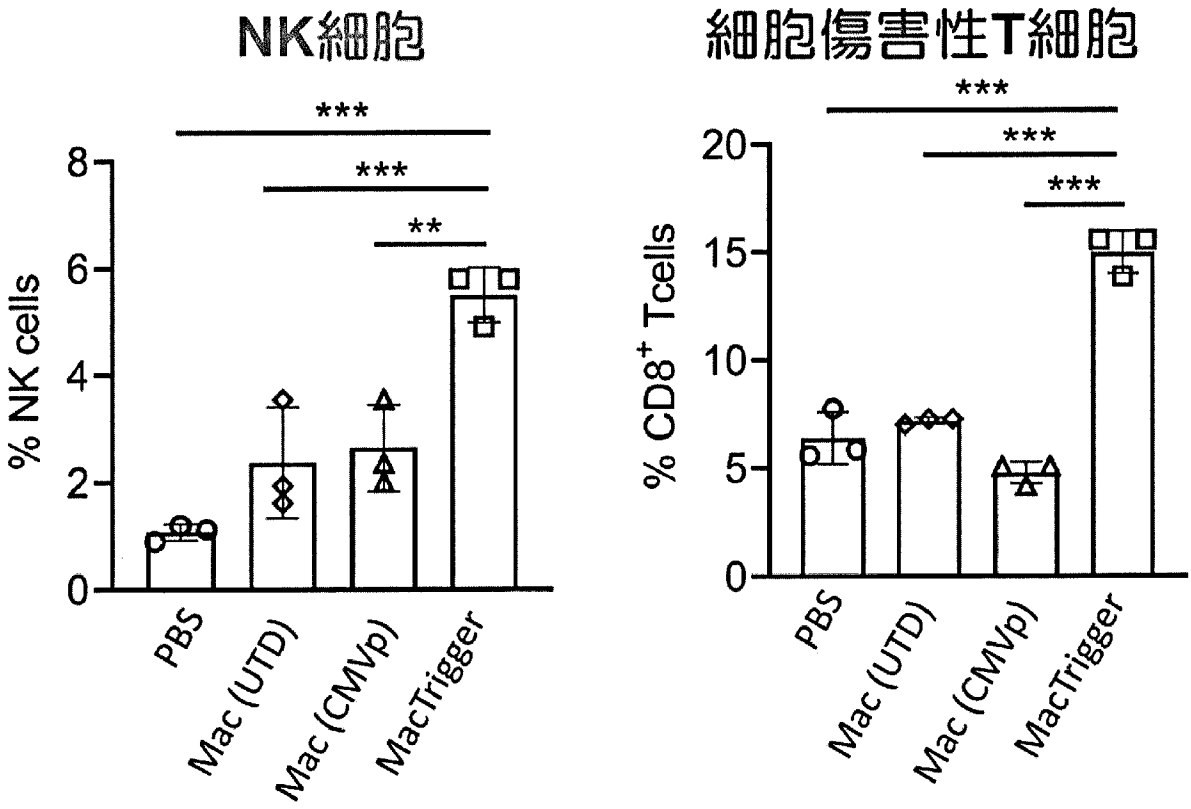
[図7E]


120
100
80
60
40
20
0
% Initial body weight
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Days after macrophage injection

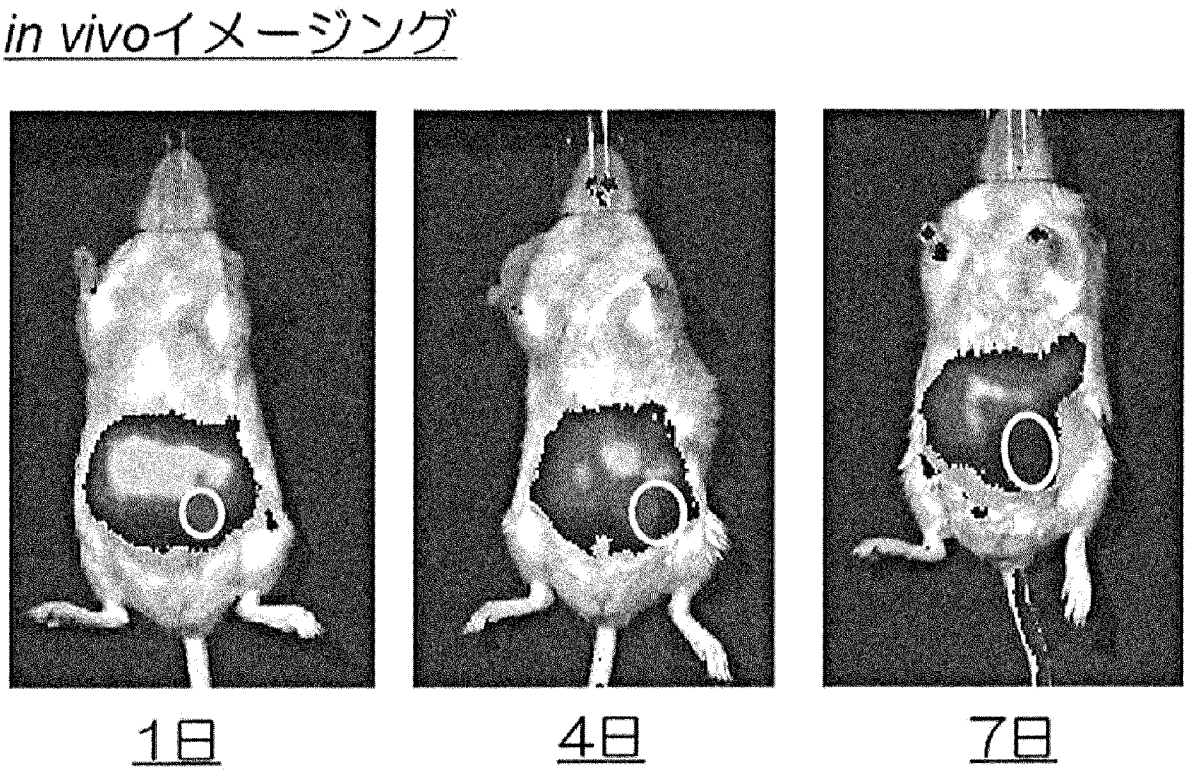
[図8A]


Cells from tissues
・FITC-labeled anti-mouse NKp46
・PE-labeled anti-mouse NK1.1
or
・Alexa Fluor 700-labeled anti-mouse CD3
・Alexa Fluor 700-labeled anti-mouse CD8
フローサイトメトリーにて解析
(NKp46+ & NK1.1+ CD3+ & CD8+)

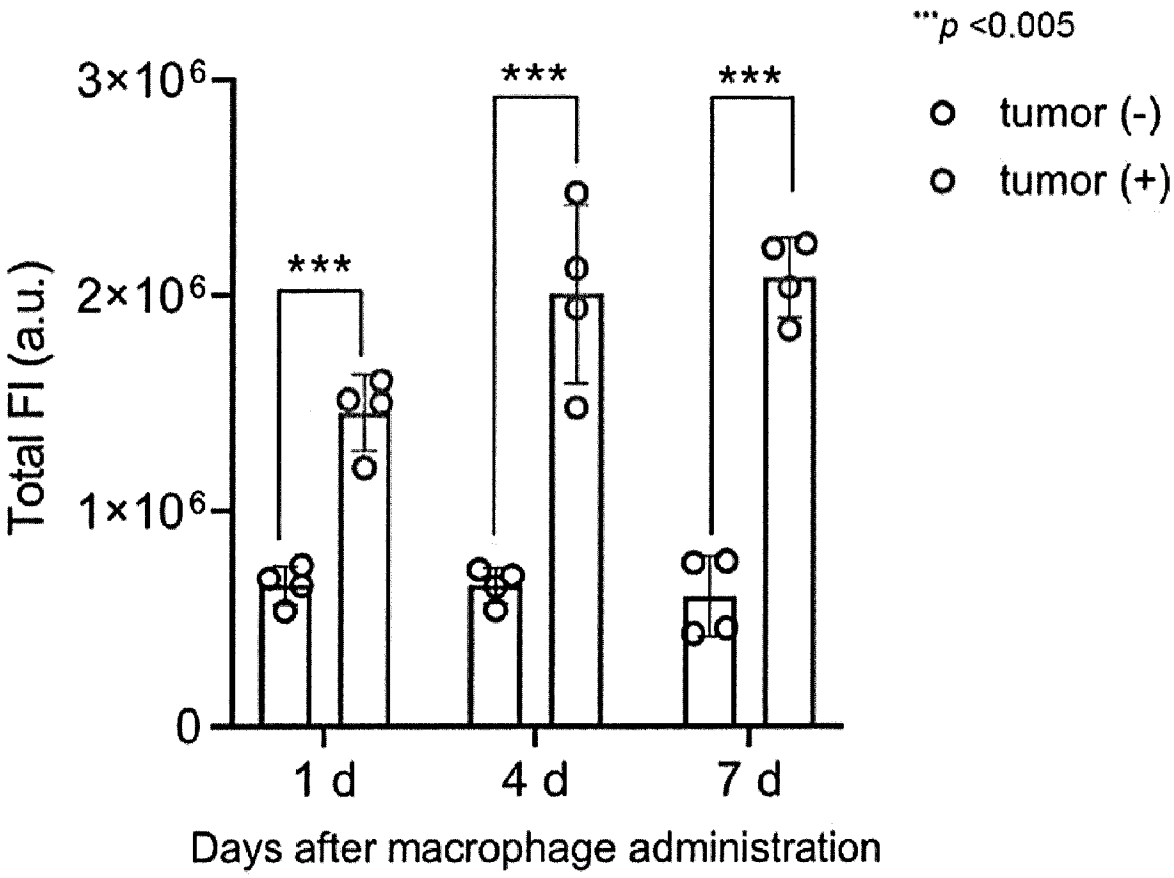
[図8B]


NK細胞
***
***
**
% NK cells
0
2
4
6
8
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
細胞傷害性T細胞
***
***
***
% CD8+ Tcells
0
5
10
15
20
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger

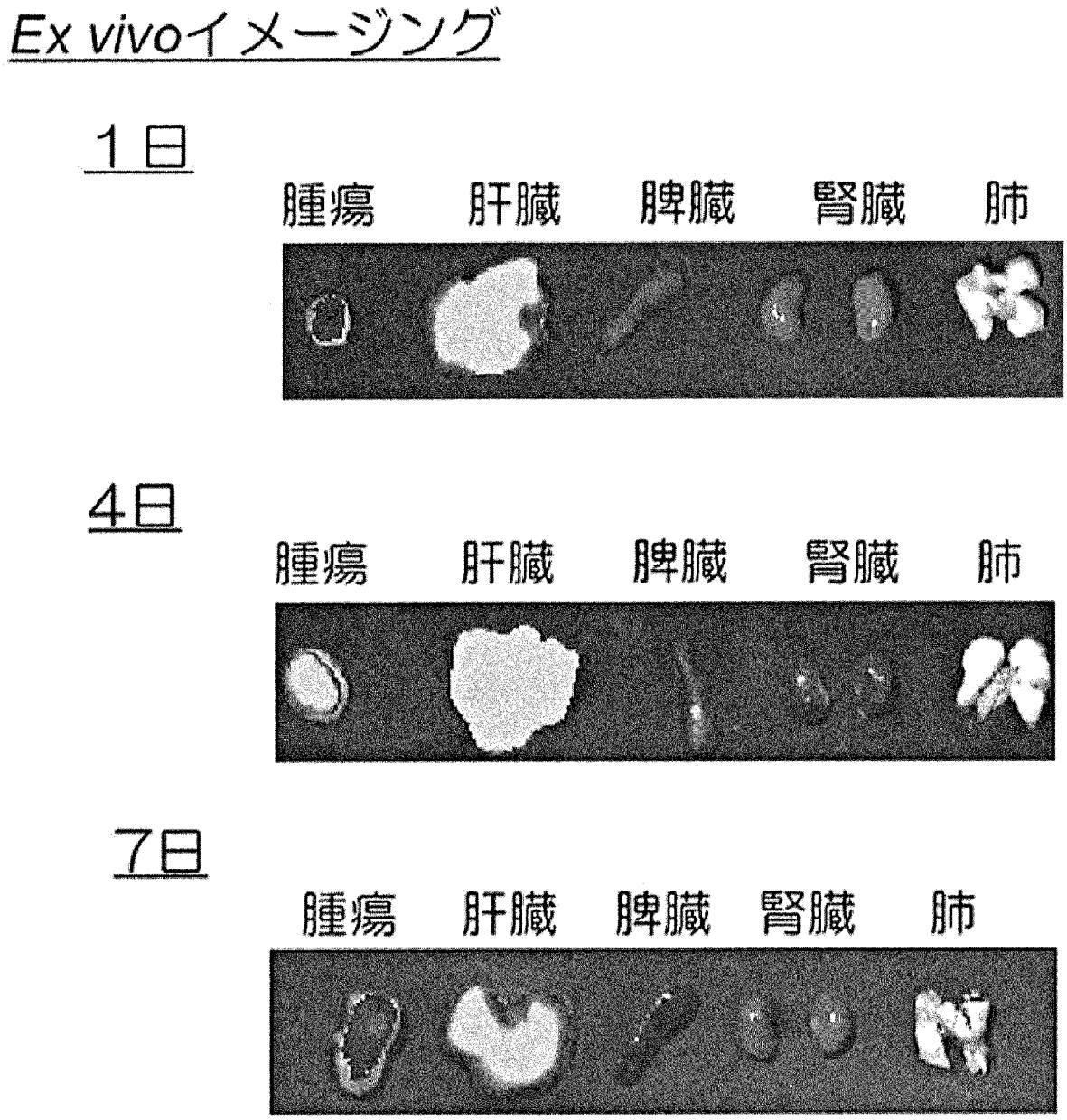
[図9A]


in vivoイメージング
1日
4日
7日

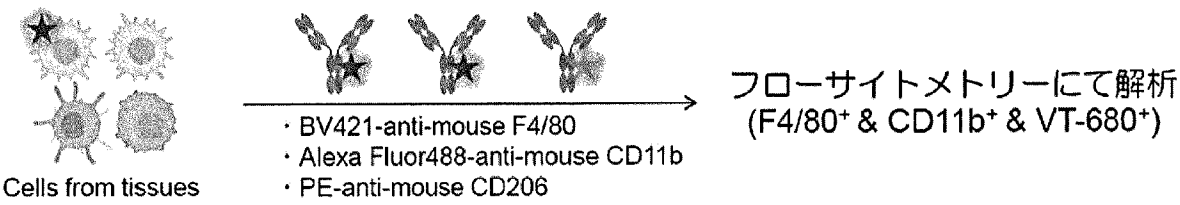
[図9B]


***p <0.005
tumor (-)
tumor (+)
***
***
***
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
Total FI (a.u.)
1 d
4 d
7 d
Days after macrophage administration

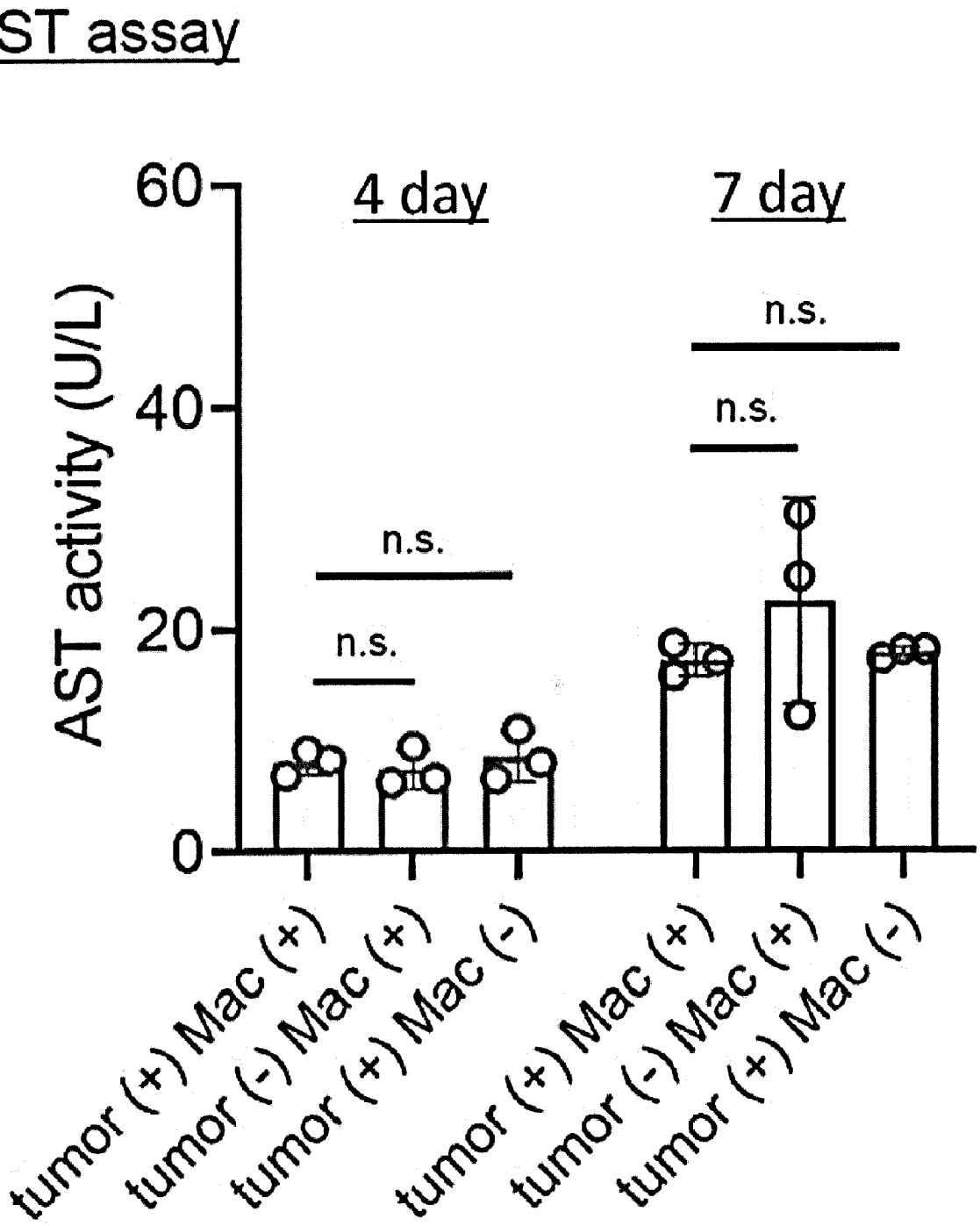
[図9C]


Ex vivoイメージング
1日
腫瘍
肝臓
脾臓
腎臓
肺
4日
腫瘍
肝臓
脾臓
腎臓
肺
7日
腫瘍
肝臓
脾臓
腎臓
肺

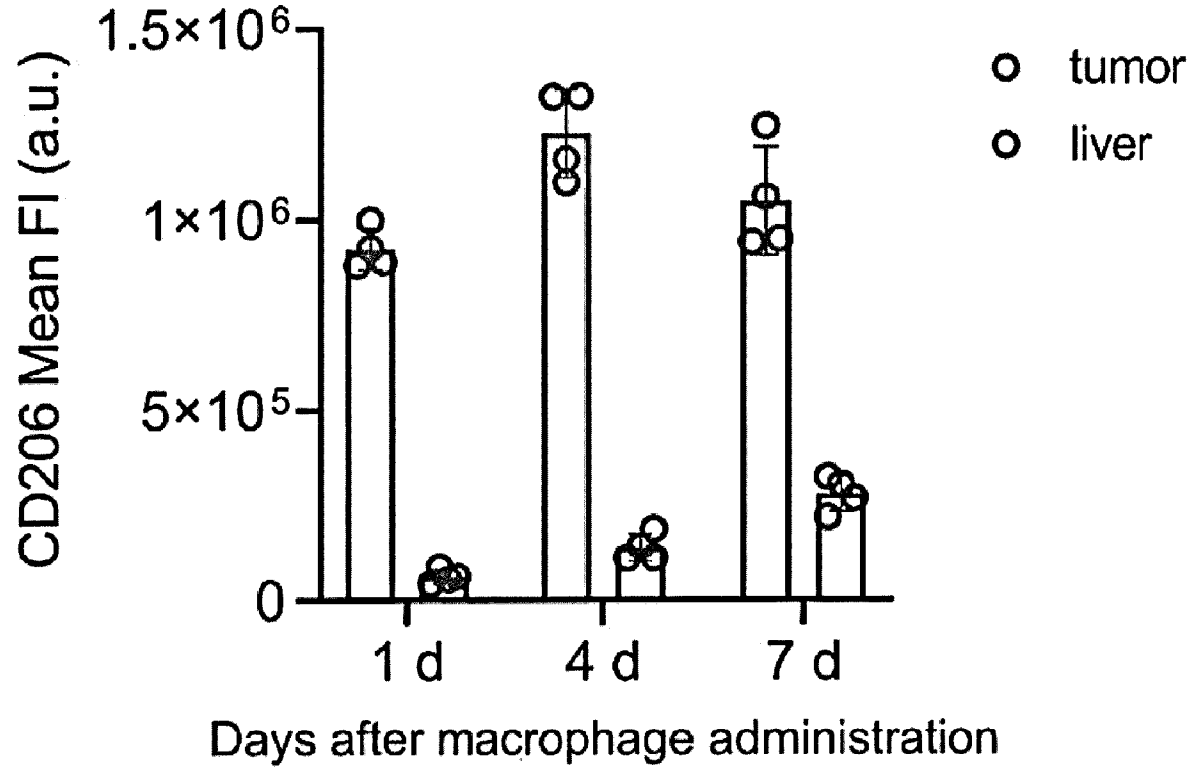
[図10A]


Cells from tissues
・BV421-anti-mouse F4/80
・Alexa Fluor488-anti-mouse CD11b
・PE-anti-mouse CD206
フローサイトメトリーにて解析
(F4/80+ & CD11b+ & VT-680+)

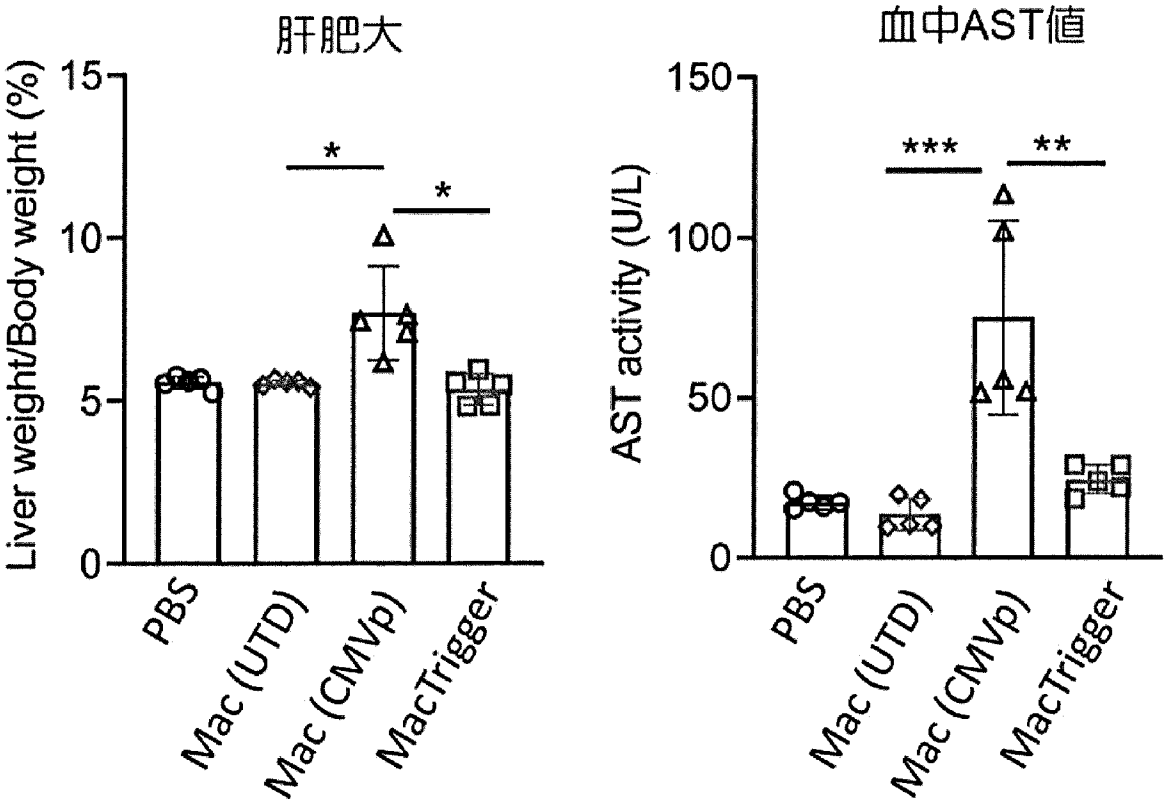
[図10B]


AST assay
4 day
7 day
AST activity (U/L)
60
40
20
0
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
tumor (+) Mac (+)
tumor (-) Mac (+)
tumor (+) Mac (-)
tumor (+) Mac (+)
tumor (-) Mac (+)
tumor (+) Mac (-)

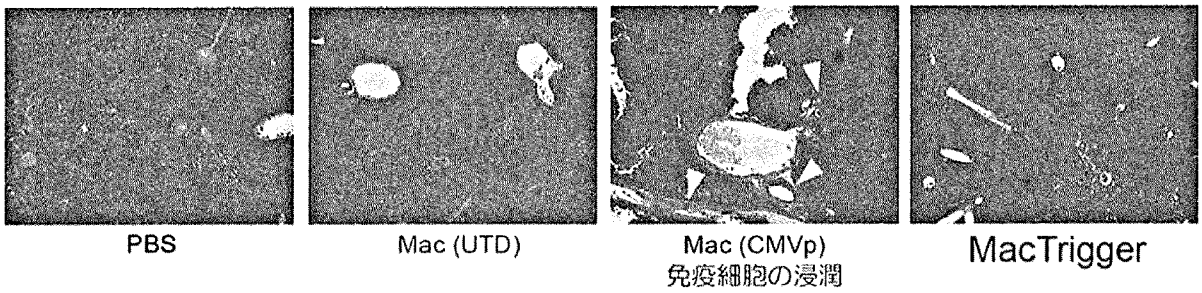
[図10C]


CD206 Mean FI (a.u.)
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
tumor
liver
1 d
4 d
7 d
Days after macrophage administration

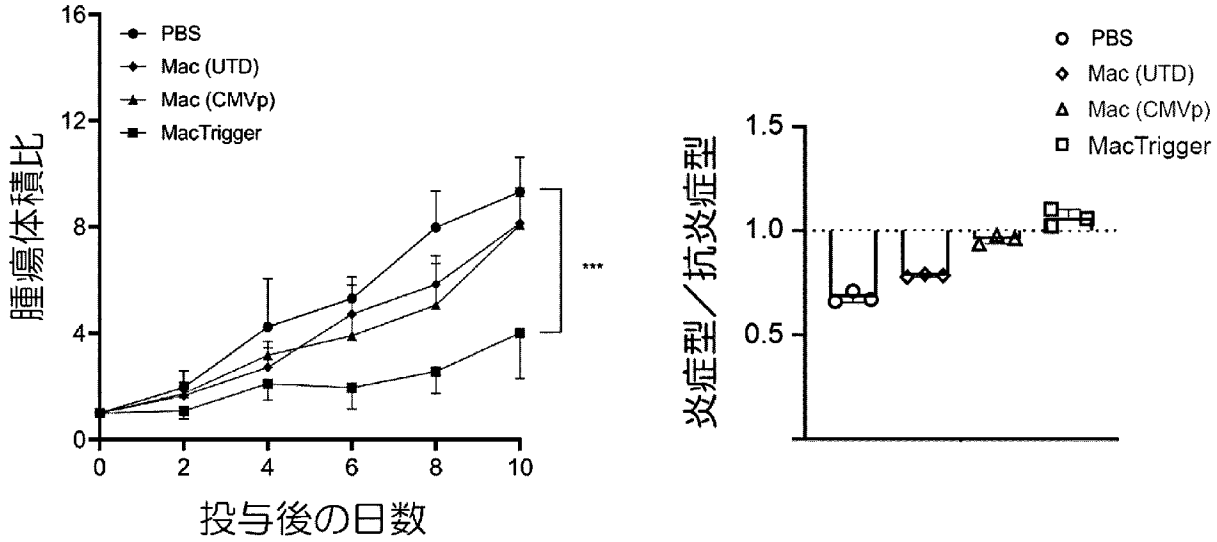
[図10D]


肝肥大
Liver weight/Body weight (%)
15
10
5
0
*
*
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger
血中AST値
AST activity (U/L)
150
100
50
0
***
**
PBS
Mac (UTD)
Mac (CMVp)
MacTrigger

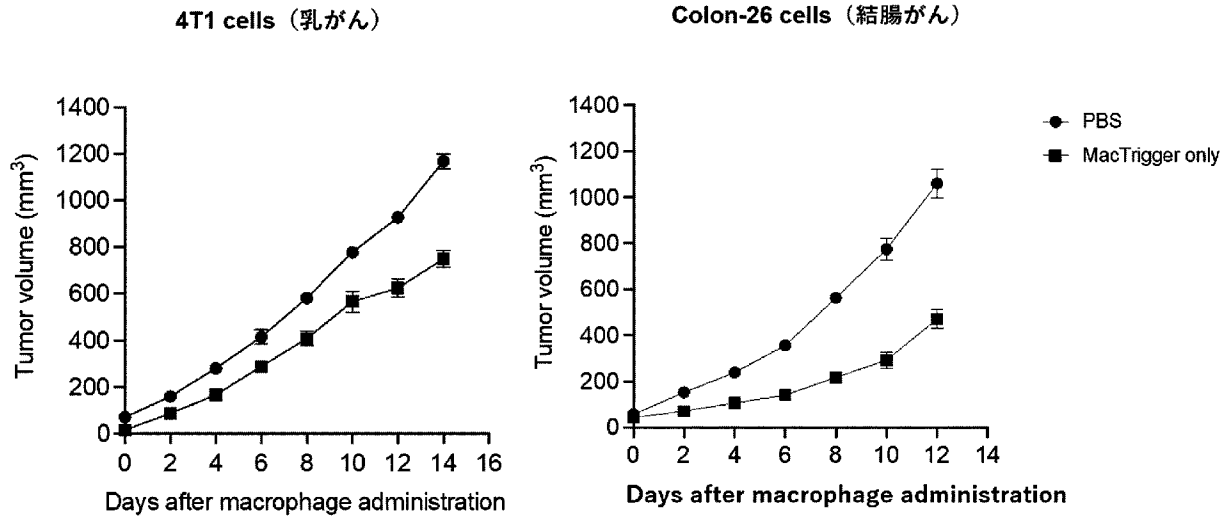
[図10E]



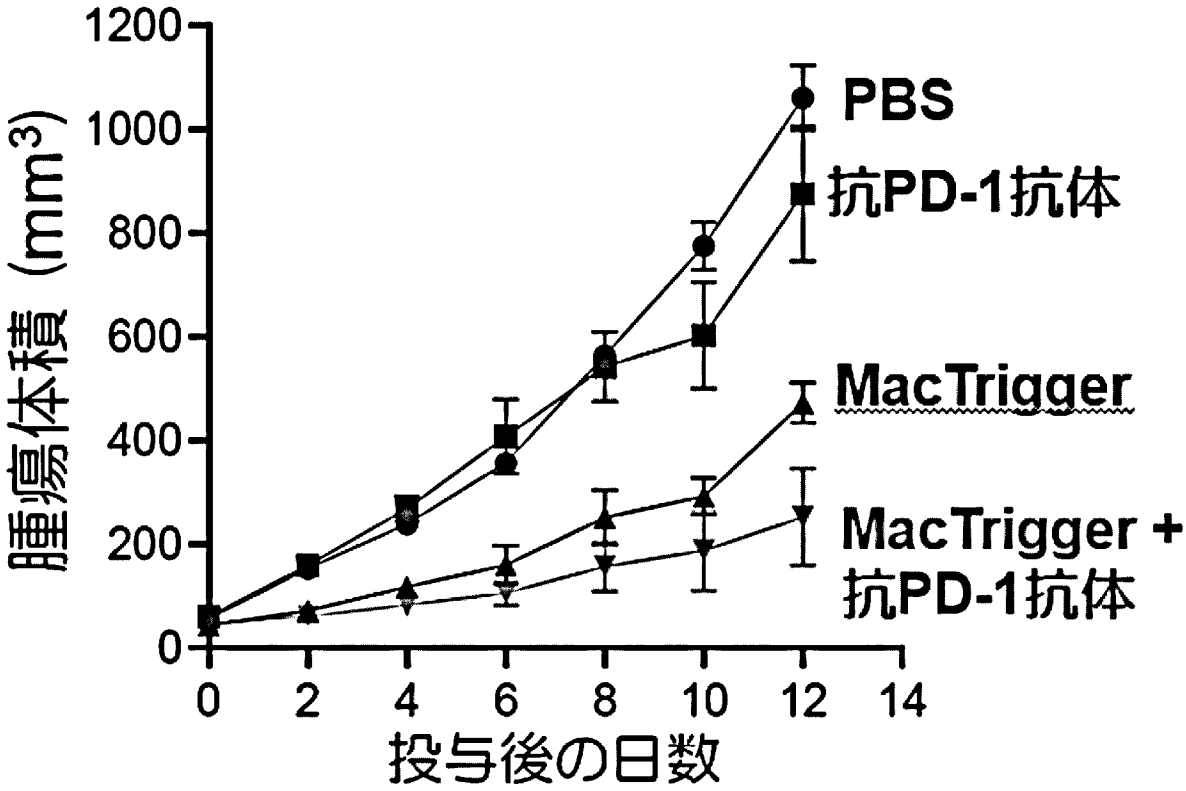
[図11A]



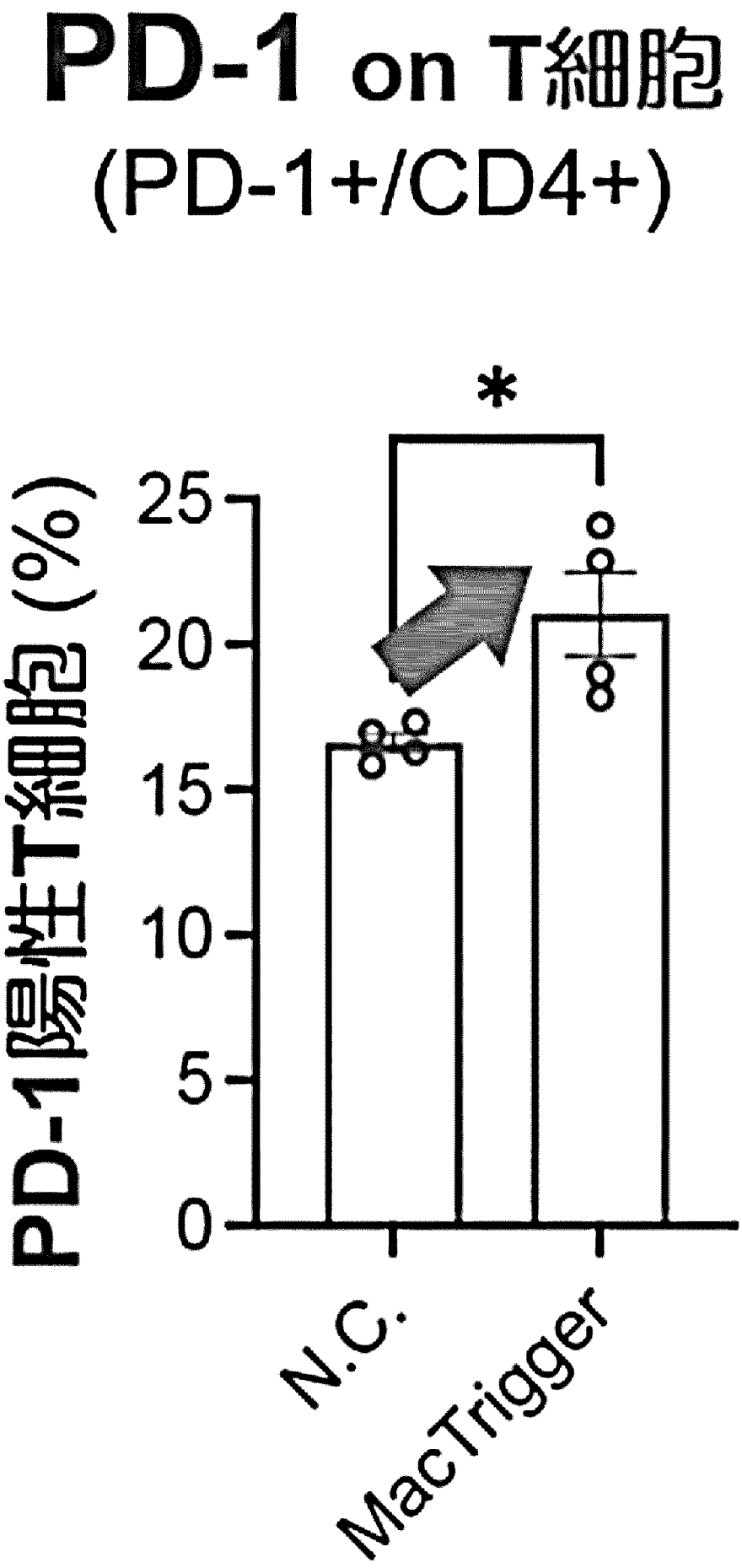
[図11B]



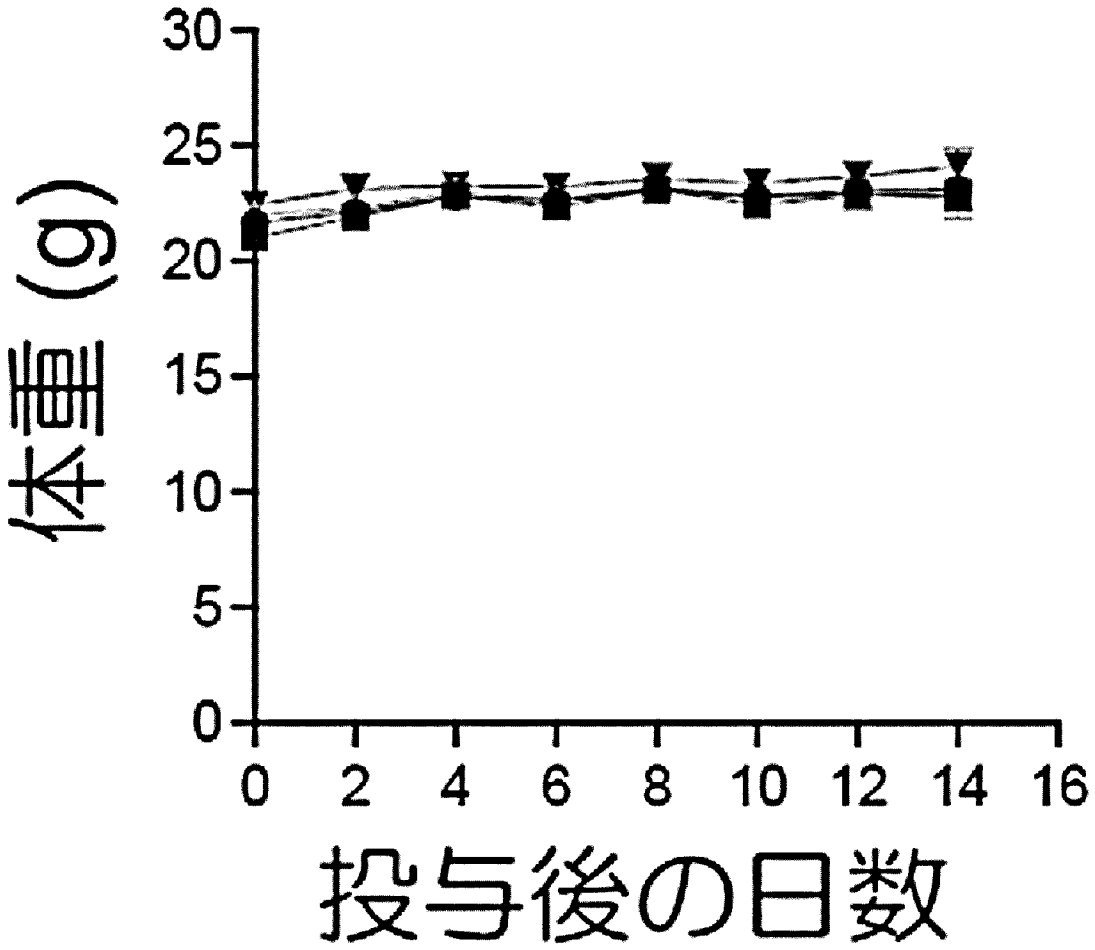
[図12A]


1200
1000
800
600
400
200
0
腫瘍体積 (mm3)
0
2
4
6
8
10
12
14
投与後の日数
PBS
抗PD-1抗体
MacTrigger
MacTrigger +
抗PD-1抗体

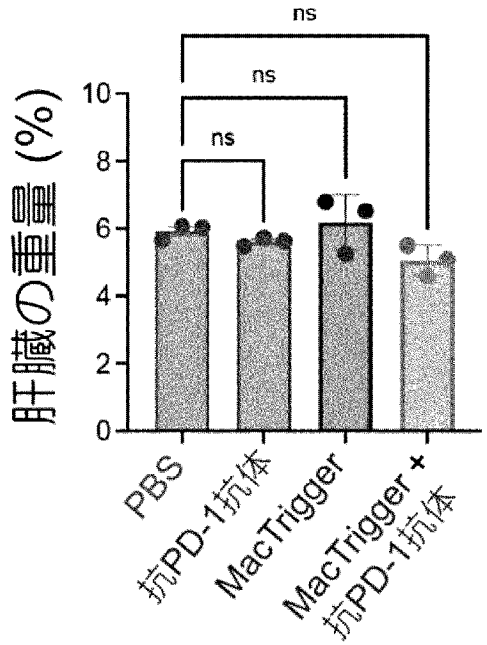
[図12B]

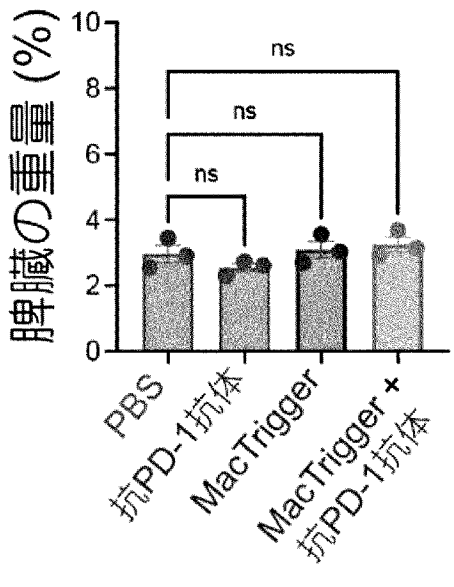


[図12C]

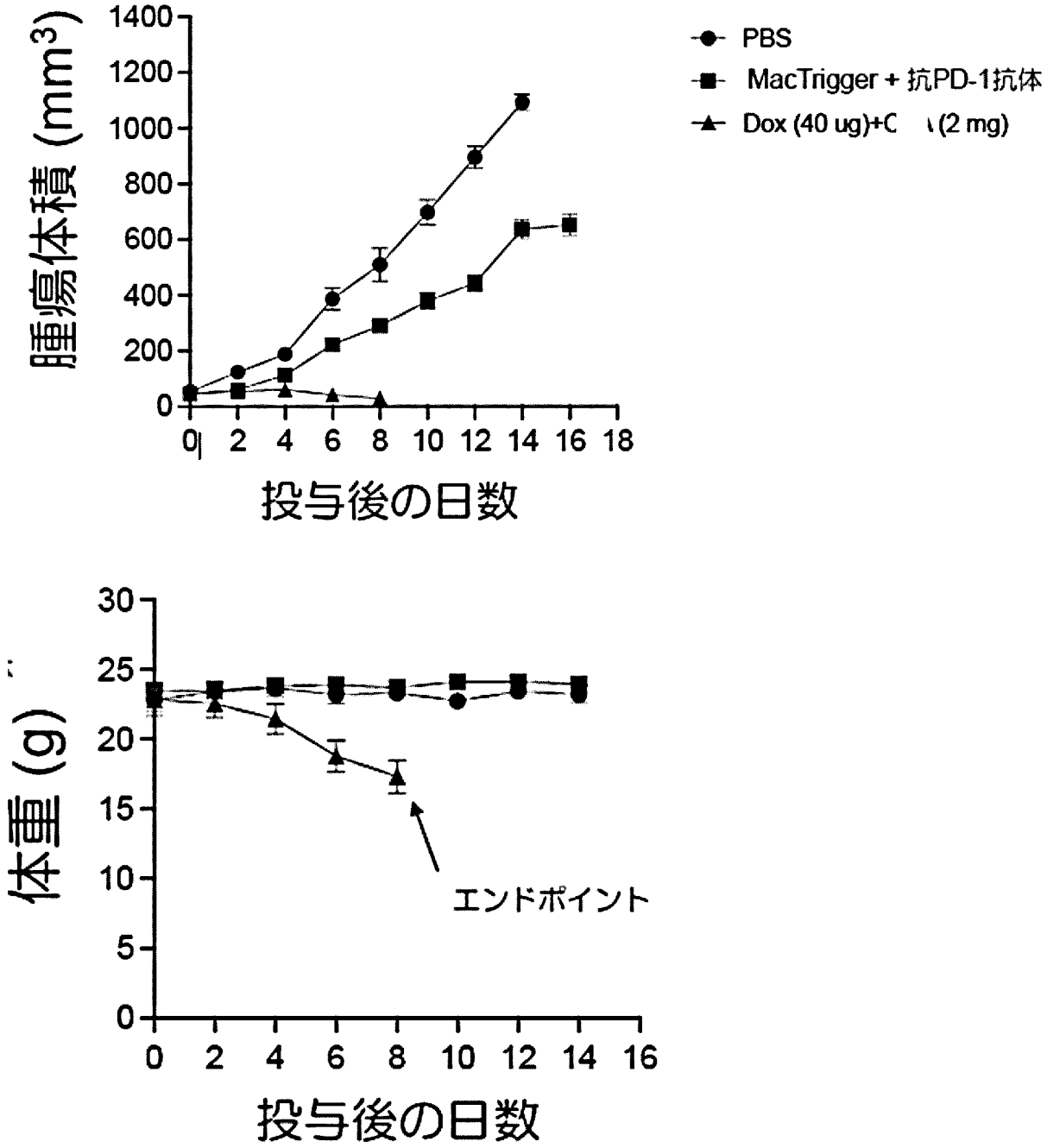

体重 (g)
30
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
投与後の日数

[図12D]

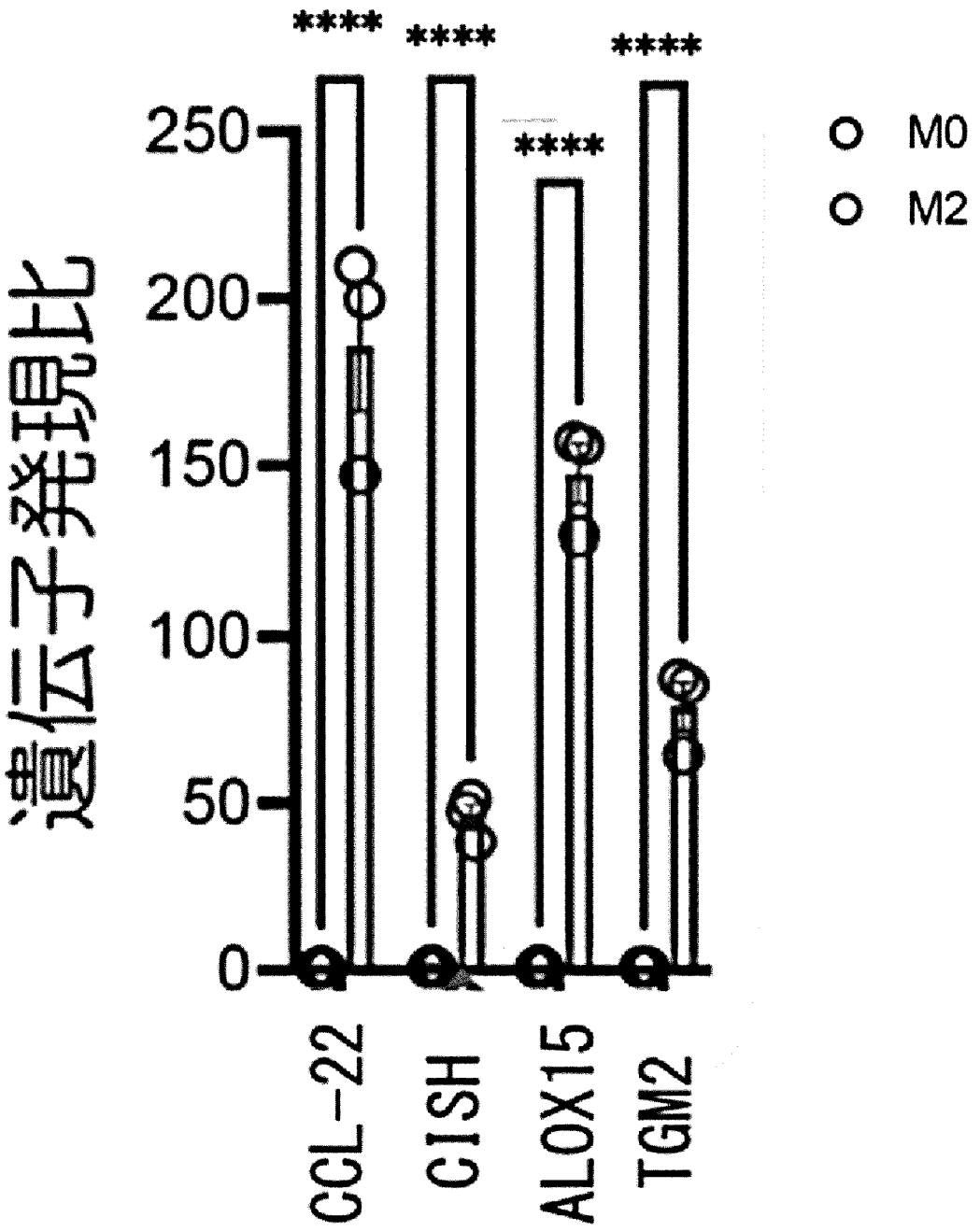

肝臓の重量 (%)
ns
ns
ns
10
8
6
4
2
0
PBS
抗PD-1抗体
MacTrigger
MacTrigger +
抗PD-1抗体


脾臓の重量 (%)
ns
ns
ns
10
8
6
4
2
0
PBS
抗PD-1抗体
MacTrigger
MacTrigger +
抗PD-1抗体

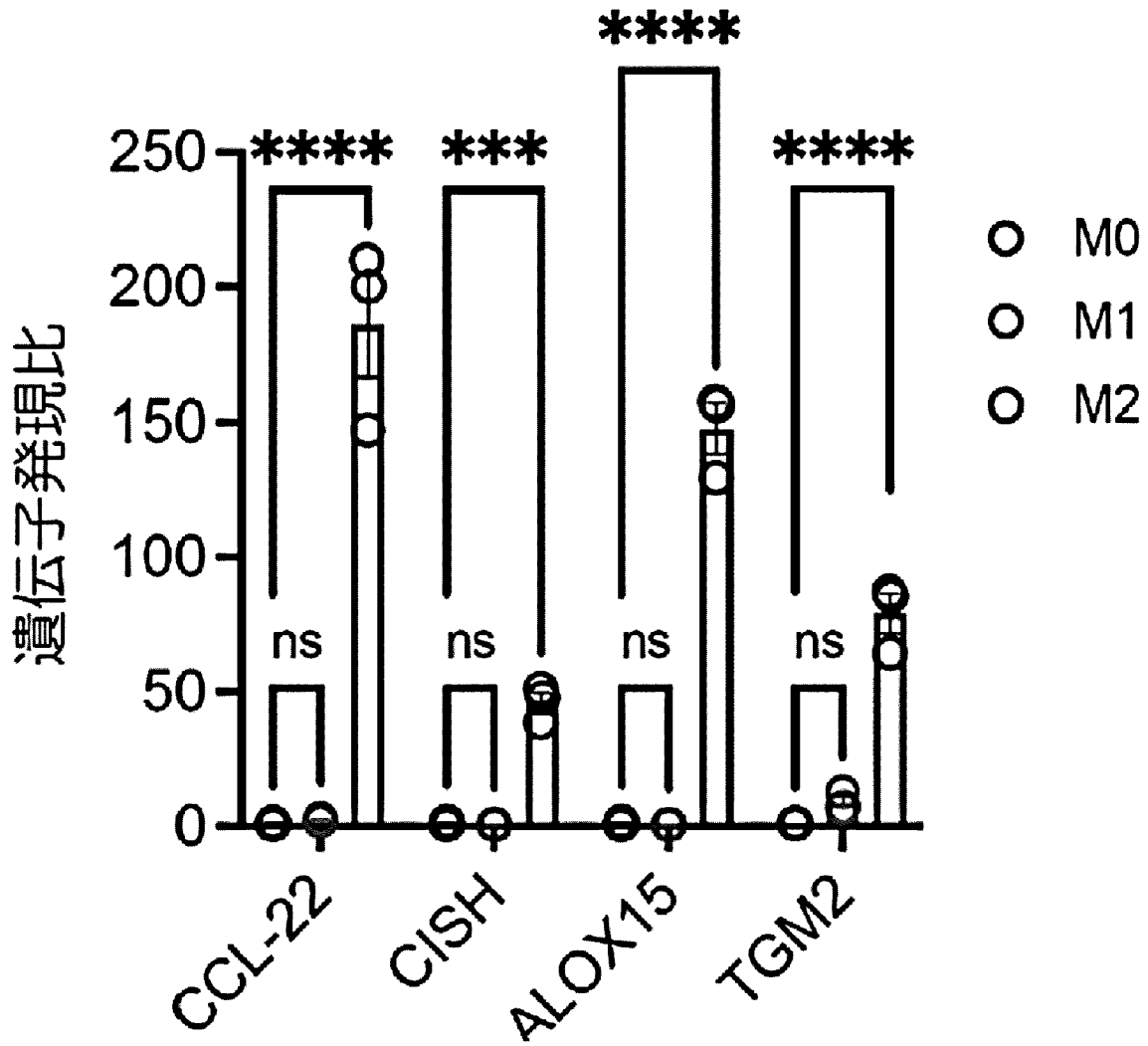
[図13]


腫瘍体積 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
投与後の日数
PBS
MacTrigger + 抗PD-1抗体
Dox (40 ug)+C (2 mg)
体重 (g)
30
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
投与後の日数
エンドポイント

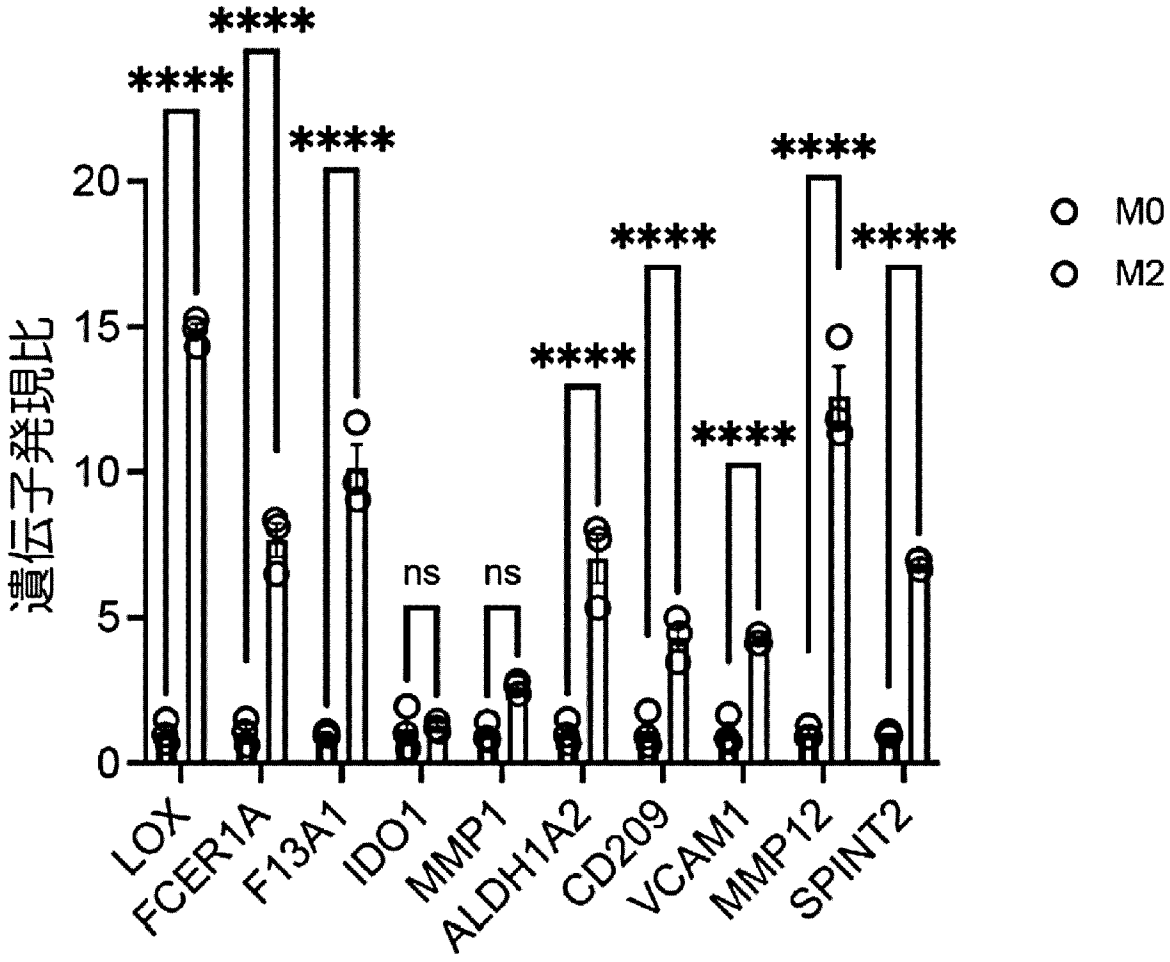
[図14A]



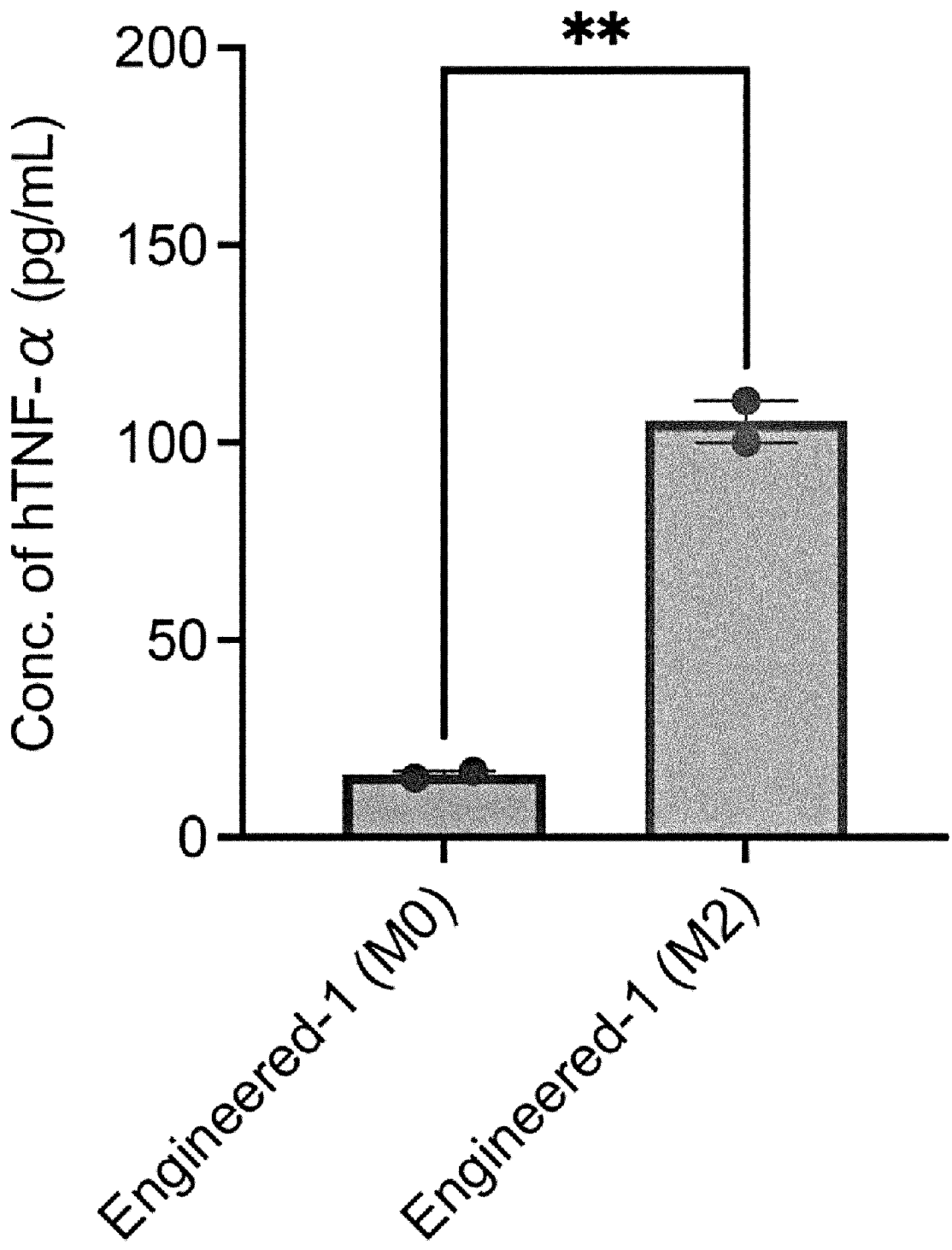
[図14B]


遺伝子発現比
250
200
150
100
50
0
****
***
****
****
ns
ns
ns
ns
M0
M1
M2
CCL-22
CISH
ALOX15
TGM2

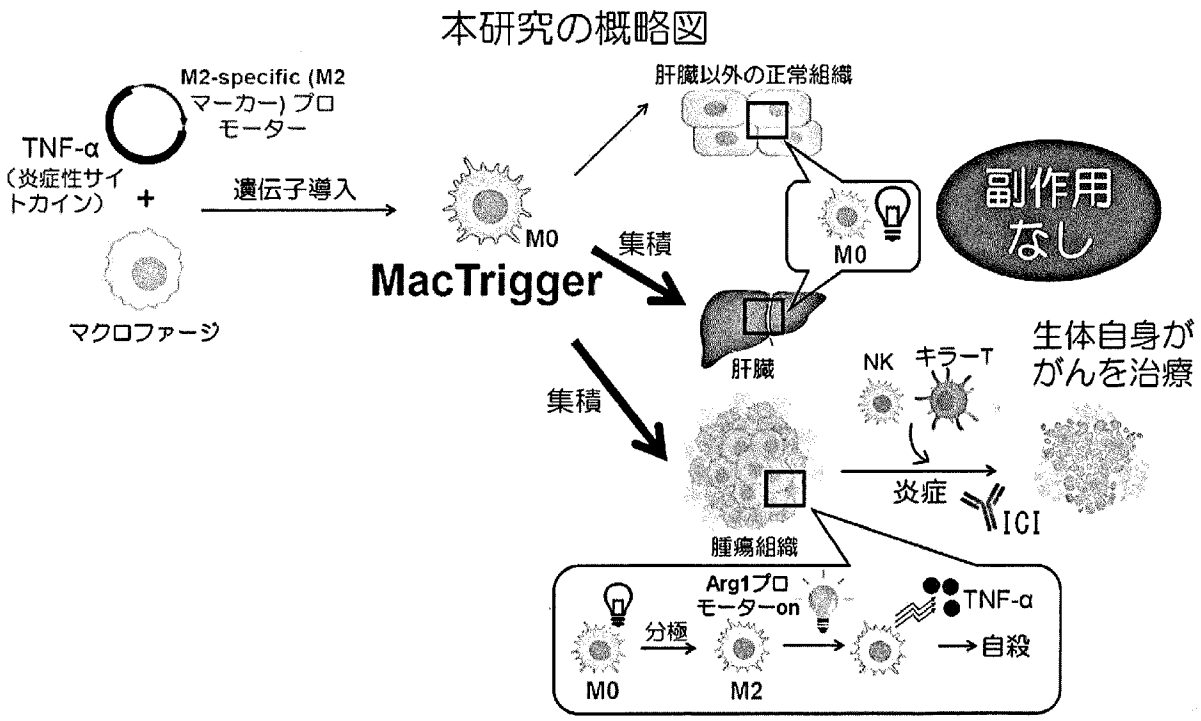
[図14C]


遺伝子発現比
0
5
10
15
20
****
****
****
ns
ns
****
****
****
****
****
LOX
FCER1A
F13A1
IDO1
MMP1
ALDH1A2
CD209
VCAM1
MMP12
SPINT2
M0
M2

[図15]


**
200
150
100
50
0
Conc. of hTNF-α (pg/mL)
Engineered-1 (M0)
Engineered-1 (M2)

[図16]


本研究の概略図
M2-specific (M2マーカー) プロモーター
TNF-α
(炎症性サイトカイン)
+
遺伝子導入
マクロファージ
M0
MacTrigger
集積
肝臓以外の正常組織
M0
副作用なし
肝臓
集積
NK
キラーT
生体自身ががんを治療
炎症
ICI
腫瘍組織
Arg1プロモーターon
TNF-α
分極
自殺
M0
M2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/004080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; ***A61K 35/15***(2015.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C12N 15/19***(2006.01)i; ***C12N 15/28***(2006.01)i; *C12N 5/0786*(2010.01)n
FI: C12N5/10 ZNA; A61K35/15; A61P35/00; C12N15/19; C12N15/28; C12N5/0786

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; A61P35/00; C12N15/19; C12N15/28; C12N5/0786

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2020-517261 A (OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L) 18 June 2020 (2020-06-18) claims, paragraph [0243], example 7, fig. 28-30	1-10
A	JP 2021-126113 A (YAMAGUCHI UNIVERSITY) 02 September 2021 (2021-09-02) entire text, all drawings	1-10
A	JP 2021-514619 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 17 June 2021 (2021-06-17) entire text, all drawings	1-10
A	WO 2021/138302 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 08 July 2021 (2021-07-08) entire text, all drawings	1-10

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
03 April 2024	**23 April 2024**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/004080

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/004080

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2020-517261 A	18 June 2020	US 2020/0078408 A1 claims, paragraph [0316], example 7, fig. 28-30 EP 3612624 A1 WO 2018/193119 A1 KR 10-2020-0020677 A CN 110785488 A	
JP 2021-126113 A	02 September 2021	WO 2021/161997 A1	
JP 2021-514619 A	17 June 2021	US 2021/0011006 A1 entire text, all drawings EP 3759494 A1 WO 2019/168948 A1 CN 111868234 A	
WO 2021/138302 A1	08 July 2021	US 2023/0058380 A1 EP 4084807 A1 JP 2023-508498 A KR 10-2022-0122636 A CN 115443141 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/004080

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; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/19(2006.01)i; C12N 15/28(2006.01)i; C12N 5/0786(2010.01)n
FI: C12N5/10 ZNA; A61K35/15; A61P35/00; C12N15/19; C12N15/28; C12N5/0786

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; A61P35/00; C12N15/19; C12N15/28; C12N5/0786

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2020-517261 A (オスペダーレ サン ラファエレ エス. アール. エル) 18.06.2020 (2020-06-18) 特許請求の範囲、［０２４３］、実施例７、図２８－３０	1-10
A	JP 2021-126113 A (国立大学法人山口大学) 02.09.2021 (2021-09-02) 全文、全図	1-10
A	JP 2021-514619 A (ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー) 17.06.2021 (2021-06-17) 全文、全図	1-10
A	WO 2021/138302 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 08.07.2021 (2021-07-08) 全文、全図	1-10

☐ 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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
03.04.2024	23.04.2024

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）
藤澤　雅樹 4B 5802
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/004080

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
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

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/JP2024/004080

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2020-517261 A	18.06.2020	US 2020/0078408 A1 請求の範囲、［０３１６］、実施例７、図２８－３０ EP 3612624 A1 WO 2018/193119 A1 KR 10-2020-0020677 A CN 110785488 A	
JP 2021-126113 A	02.09.2021	WO 2021/161997 A1	
JP 2021-514619 A	17.06.2021	US 2021/0011006 A1 全文、全図 EP 3759494 A1 WO 2019/168948 A1 CN 111868234 A	
WO 2021/138302 A1	08.07.2021	US 2023/0058380 A1 EP 4084807 A1 JP 2023-508498 A KR 10-2022-0122636 A CN 115443141 A	