

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第6712993号
(P6712993)**

(45) 発行日 令和2年6月24日(2020.6.24)

(24) 登録日 令和2年6月4日(2020.6.4)

(51) Int.CI.

F 1

A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0775	(2010.01)	C 1 2 N	5/0775
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/24
C 1 2 N	15/20	(2006.01)	C 1 2 N	15/20

請求項の数 11 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-509626 (P2017-509626)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月18日 (2015.8.18)
 (65) 公表番号 特表2017-525364 (P2017-525364A)
 (43) 公表日 平成29年9月7日 (2017.9.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2015/068942
 (87) 國際公開番号 WO2016/026854
 (87) 國際公開日 平成28年2月25日 (2016.2.25)
 審査請求日 平成30年8月6日 (2018.8.6)
 (31) 優先権主張番号 14181283.4
 (32) 優先日 平成26年8月18日 (2014.8.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 514121206
アプセト ゲーエムベーハー アンド ツ
エーオー. カーゲー
ドイツ, 81377 ミュンヘン, マック
スレーブシェーブラツツ 30
(74) 代理人 100088904
弁理士 厚司 隆
(74) 代理人 100124453
弁理士 資延 由利子
(74) 代理人 100135208
弁理士 大杉 載也
(74) 代理人 100152319
弁理士 曽我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫細胞を惹起及び／又は活性化するための免疫応答刺激性サイトカインを発現する遺伝子改変型間葉系幹細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子改変型間葉系幹細胞 (MSC) を含む腫瘍治療用薬剤であって、該MSCが1つ又は複数の外因性核酸分子を含み、該外因性核酸分子が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする1つ又は複数の領域を含み、前記2つ以上のサイトカインがIL-7と、IL-12及びIL-21の少なくとも1つとを含む、腫瘍治療用薬剤。

【請求項 2】

前記外因性核酸分子がさらにIL-15、IL-21、IFN 及びIFN からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインをコードする、請求項 1に記載の腫瘍治療用薬剤。

10

【請求項 3】

前記免疫応答刺激性サイトカインが、腫瘍組織内及び／又はその近傍の、免疫細胞の活性、生存率及び／又は細胞数を、維持する又は高める、請求項 1又は2に記載の腫瘍治療用薬剤。

【請求項 4】

前記外因性核酸分子が、
T細胞の増殖及び／又は分化を誘導する免疫刺激性分子をコードする領域を含む、又は
T細胞の増殖及び／又は分化を誘導する前記免疫刺激性分子としてCD28をコードする領域を含む、

請求項 1～3のいずれか一に記載の腫瘍治療用薬剤。

20

【請求項 5】

前記外因性核酸分子が、
少なくとも1つのケモカインをコードする、
少なくとも1つの炎症性ケモカインをコードする、
T細胞を惹起する走化性を有する少なくとも1つのケモカインをコードする、又は
ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド1、2、4、17、19、22、23(CCL1、CCL2、CCL4、CC
L17、CCL19、CCL22、CCL23)若しくは間質細胞由来因子1(SDF-1)の少なくとも1つをコ
ードする、
請求項1～4のいずれか一項に記載の腫瘍治療用薬剤。

【請求項 6】

10

前記治療が、該間葉系幹細胞と抗腫瘍免疫療法との併用投与を含む、請求項1～5のい
ずれか一項に記載の腫瘍治療用薬剤。

【請求項 7】

前記抗腫瘍免疫療法が免疫細胞の投与を含む、請求項6に記載の腫瘍治療用薬剤。

【請求項 8】

前記免疫細胞が、T細胞、マクロファージ、及び／又は単球である請求項7に記載の腫
瘍治療用薬剤。

【請求項 9】

前記免疫細胞が、人工的T細胞受容体又はキメラ抗原受容体(CAR-T)を含むT細胞であ
り、該T細胞受容体が腫瘍抗原に特異的に結合する、請求項8に記載の腫瘍治療用薬剤。

20

【請求項 10】

前記抗腫瘍免疫療法が1つ又は複数のチェックポイント阻害剤の投与を含む、又は
前記抗腫瘍免疫療法が1つ又は複数のチェックポイント阻害剤としてPD-L1阻害剤、PD-1
阻害剤及び／若しくはCTLA-4阻害剤の投与を含む、

請求項6に記載の腫瘍治療用薬剤。

【請求項 11】

前記抗腫瘍免疫療法が腫瘍抗原の投与を含む、

前記抗腫瘍免疫療法が患者由来の腫瘍材料の投与を含む、又は

前記抗腫瘍免疫療法が腫瘍特異的抗原を標的とする抗体若しくは抗体フラグメントの投
与を含む、

30

請求項6に記載の腫瘍治療用薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子改変型(genetically modified: 遺伝子組換え)間葉系幹細胞(MSC)
及び腫瘍の治療における医薬としてのその使用に関し、上記MSCは1つ又は複数の外因性
核酸分子を含み、上記外因性核酸分子は、プロモーター又はプロモーター／エンハンサー
の組合せに操作可能に連結する1つ又は複数の免疫応答刺激性又は免疫応答調節性のサイ
トカインをコードする領域を含む。本発明は更に、免疫刺激性分子をコードする領域を含
み、例えばT細胞の増殖及び／又は分化を誘導する、少なくとも1つの外因性核酸分子を含
む遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

40

【0002】

本発明は、免疫エフェクター細胞を惹起し、またメモリー表現型の活性化及び／又は受
入れを容易にするために、例えば、腫瘍微小環境を調節することにより腫瘍及び／又は腫
瘍疾患の治療における医薬としてMSCを使用することを包含する。本発明の一態様は、抗
腫瘍治療における上記MSCの使用であって、上記間葉系幹細胞と、免疫療法、例えばCTLA-
4、PD-1、PD-L1及び他の免疫共刺激分子に対する抗体を含むチェックポイント阻害剤、免
疫細胞、例えば人工的T細胞受容体を有するT細胞等のT細胞、例えばキメラ抗原受容体(C
AR-T)又は外因性T細胞受容体(TCR)を形質導入した細胞、NK細胞若しくはマクロファ
ージ／単球又は能動免疫療法剤(active immunotherapeutic drugs)、例えば腫瘍抗原、患

50

者由来の腫瘍材料並びに腫瘍又は腫瘍の特徴に対する免疫応答を活性化及び／又は指向させることを目的とする他の治療剤との併用投与を含む、使用に関する。

【背景技術】

【0003】

間葉系幹細胞（MSC）は骨髄及び他の組織にある非造血性由来の細胞である。MSCは通常、骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞等の限られた数の細胞系譜に分化する能力を有する多能性成体前駆細胞であると考えられている。骨修復の促進又は増大及び軟骨欠損の修復のためのMSCの使用を含む、上記の最終段階の表現型に直接分化する能力に基づいた治療物（therapeutic entity）としてMSCを使用する試験が行われている（非特許文献1及び非特許文献2）。多くの治療適応症のためのMSCの単離及び培養については、炎症関連障害の治療に対する有望なアプローチとして報告され、またそのようなアプローチとして存在している（例えば、特許文献1）。

【0004】

MSCは、患者に投与した後に免疫回避性を示すことが知られている。MSCは、同種ドナー材料を移植した場合、有益な免疫調節作用を示すことがわかっており（非特許文献3）、これにより発病の可能性のある同種反応及び拒絶反応を減少させる。MSC治療はまた、創傷治癒の治療的な役割を果たし得る。MSCの治療的送達が全身注射により行われた後、傷害部位へのMSCホーミング（homing：集積）及び傷害部位内の生着が行われ得る（非特許文献4）。MSCはまた、in vivoにおいて、腫瘍へのホーミングにおいて遊走性を示すことが知られている。

【0005】

遺伝子改変型MSCを用いたMSCをベースとした細胞療法は、患者体内の目的の特定の領域に治療遺伝子産物を送達することを可能にする。例えば、MSCが腫瘍等の炎症領域に遊走することにより、治療による影響を局所的に発揮することが示されている。MSCは通例、目的の領域において免疫抑制を生じることにより、炎症を調節又は減少させ、回復力を高める免疫調節作用を有する。しかし、本発明は、免疫応答を模倣することで炎症の標的領域、特に腫瘍に対するMSCの独自のホーミング能を利用し、それにより適切な免疫応答の活性化に基づいた局所的な治療効果を発揮する、免疫調節エフェクターを送達するための細胞ビヒクルとしてMSCを使用する。

【0006】

腫瘍成長には、腫瘍組織に指向する免疫応答の適切な活性化又は強化によって対抗することができる。しかし、不必要的全身の副作用を引き起こすことなく、このような免疫応答を局所的に高める手段が癌療法の分野において必要とされている。不必要的重度の副作用（例えば、発熱、肝臓酵素又は全身の炎症レベルの上昇、例えば致死に至る可能性のあるサイトカインストーム）を生じずに全身に投与することはできない癌治療剤が多く存在する。このような副作用を回避する選択肢の一つには、このような薬剤の用量を大幅に少なくして投与することがあるが、これは副作用を減らすことには有効であるが、多くの場合、標的部位の薬剤レベルは不十分であり、治療効果も不十分となる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2010/119039号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Vilquin and Rosset, Regenerative Medicine 2006; 1, 4, p 589

【非特許文献2】Veronesi et al, Stem cells and Development 2013; 22, p 181

【非特許文献3】Le Blanc et al, Lancet 2004; 363, p 1439

【非特許文献4】Kidd et al, Stem Cells 2009; 27, p 2614

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0009】

従来技術の観点から、本発明の基礎となる技術的な目的は、癌免疫療法に対する新規の方法を提供することである。特に、本発明の基礎となる目的は、対象の腫瘍組織に指向する免疫応答を局所的に刺激するのに適した手段を提供することである。本発明の基礎となる更なる目的は、不必要的副作用レベルを減少させ、標的組織にて有効な局所作用を提供する、治療剤、例えば免疫調節物質又は免疫刺激物質を有効用量投与する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0010】**

この目的は独立クレームの特徴により解決される。本発明の好ましい実施の形態は従属クレームにより示される。 10

【0011】

それゆえ、本発明は、腫瘍の治療における医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、上記MSCが1つ又は複数の外因性核酸分子を含み、上記外因性核酸分子がプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する1つ又は複数の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、上記治療が上記間葉系幹細胞と抗腫瘍免疫療法との併用投与を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0012】

併用投与は、上記免疫療法の前、その間及び／又はそれに続いて上記間葉系幹細胞の同時及び／又は連続した投与に関し得る。併用には、この治療のいずれの治療成分の複数回投与を含む併用治療法も含むものとする。併用投与の更なる実施の形態を本明細書において提供する。 20

【0013】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載のMSCの医学的利用、特に癌治療のための医学的利用、さらに腫瘍を有する対象を治療する方法又は腫瘍及び／又は腫瘍疾患を治療する方法を包含する。

【0014】

本発明はまた、特定の医学的利用とは別に本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞自身を包含する。

【0015】

本発明は、抗腫瘍免疫応答に関する細胞を刺激することにより、抗腫瘍免疫応答の局所的活性化、補助及び／又は強化が可能になる。本明細書に記載のMSCは、*in vivo*において、天然の又は操作のいずれかによる炎症領域にホーミングする能力によって腫瘍組織に遊走する。腫瘍組織（腫瘍間質）へのホーミング及び／又は生着が、免疫刺激性サイトカインの局所的発現を生じることで、局所の腫瘍環境における免疫細胞の量の増加及び／又は活性の増大を生じ、それによって患者の免疫系が腫瘍細胞を攻撃することができ、また併用した免疫療法も補助される。 30

【0016】

本発明は、有効及び治療関連用量の1つ又は複数の免疫刺激性サイトカインを、移植したMSCによる発現を介して投与することが可能である一方、或る適当な物質を標的としないサイトカインの全身投与固有の重度の副作用を回避することが可能である。それゆえ、本発明は、炎症領域における、好ましくは腫瘍組織内及びその近傍への免疫調節シグナル、好ましくは免疫刺激シグナルの局所送達を目的とした物質及び／又はビヒクルとしてのMSCの利用に関する。 40

【0017】

免疫療法の開発及び臨床使用での成功を決定的に制約するものに、免疫抑制された腫瘍微小環境が確立することによる、腫瘍の、腫瘍細胞に対する天然の免疫応答を回避し、抑制する能力がある。この現象は、腫瘍介在性免疫抑制として知られ、制御性表現型を示す腫瘍内に存在する免疫細胞によって、広範囲に抗炎症性サイトカインの分泌が介在する（例えば、制御性T細胞；TReg及び単球由来抑制細胞；MDSC）。それゆえ、本発明は、炎症 50

促進性となり、腫瘍に存在する免疫細胞の活性化並びに外因性免疫細胞の動員及び活性化を促進し、それにより腫瘍に対する免疫系の広範囲の活性化を容易にし及び／又は抗腫瘍免疫療法による治療効力を高める、腫瘍微小環境を調節する手段を提供する。

【0018】

一実施の形態において、免疫療法を促し、また助長するよう腫瘍微小環境を調節及びそのような状態にするために、免疫療法による治療の前に本明細書に記載のMSCを投与することができる。

【0019】

本発明は、免疫応答を模倣することで炎症の標的領域、特に腫瘍に対するMSCの独自のホーミング能を利用し、それにより適切な免疫応答の活性化に基づき局所的な治療効果を発揮する、免疫調節エフェクターを送達するための細胞ビヒクルとしてMSCを使用し、この場合、免疫応答は好ましくは宿主（対象）の天然の免疫応答に関連し、免疫応答により免疫療法、例えば二重特異性抗体、養子免疫療法、抗腫瘍ワクチン及び／又はチェックポイント阻害剤の効力及び治療効果を高める。10

【0020】

MSCは炎症促進シグナルに応答して種々の抗炎症性因子を発現することができる（例えば、トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ）。TGF- β において、いわゆる「活性化誘導細胞死」から細胞を保護するとして活性化したT細胞の生存率を高めることができることが知られている。驚くべきことに、MSCにおける炎症促進性サイトカインの発現は、T細胞内の活性化誘導細胞死（AICD）を誘導することなく、バイスタンダート細胞を標的とし、連続して活性化させる。本明細書に記載の細胞のこの性質は、MSCによって発現し、AICDを阻止する抗炎症性因子（例えば、TGF- β ）が存在することによる。MSCにより発現する抗炎症性因子と導入遺伝子炎症促進性サイトカインとの組合せは、腫瘍に対する免疫応答を刺激する際に有利となる予期せぬ技術的效果を生じる。20

【0021】

驚くべきことに、本明細書に記載の1つ又は複数の免疫応答刺激性サイトカインを用いて改変したMSCは、予期せぬことにin vitro及びin vivoの両方において、上記のサイトカインの良好な発現及び分泌を示す。当業者でも、これらの特定のサイトカインが十分な量を発現し、また自然応答又は（or）免疫療法のいずれかに基づいた所望の局所免疫応答を誘導し、又は高めるのに十分な量を細胞から放出することができたことは予期しなかっただろう。30

【0022】

本発明はまた、免疫エフェクター及びヘルパー細胞を惹起し、免疫活性化を誘導し、メモリー免疫細胞の成熟を促進し及び／又は抑制性及び／又は制御性免疫細胞の出現及び持続を抑制するために、本明細書に記載のMSCをベースとするアプローチを介して腫瘍内の免疫を活性化するサイトカイン及び／又はケモカインの組合せの発現を包含する。

【0023】

1つの実施の形態において、サイトカインの組合せを使用し、自然免疫応答及び獲得免疫応答、エフェクター、ヘルパー及び／又は抗原提示細胞を含む、様々な免疫応答群の活性化を促進する。40

【0024】

TNF- 等のサイトカインは多数の態様の免疫系を活性化させるが、この作用は抗腫瘍応答に必要となる特異性を欠如し得ることが想定される。

【0025】

一方、IL-2、IL-7、IL-15及びIL-21は、腫瘍細胞に特異的な応答を高める、T細胞及びNK細胞等の細胞毒性リンパ球を特異的に活性化させる。同様に、IL-12は細胞毒性リンパ球だけでなく単球及びヘルパー細胞も活性化させる。

【0026】

IL-12と、例えばIL-2、IL-7、IL-15及び／又はIL-21との組合せは、（i）腫瘍指向性細50

胞毒性細胞、(ii) 細胞毒性細胞の活性化を高めるヘルパー細胞及び/又は(iii)腫瘍に対して更なる免疫学的応答を生じることができる単球を活性化する作用を有する。それゆえ、サイトカインの組合せは天然の免疫応答に見られるように相乗効果を生じ、本発明において、治療効力を大きく増大させる。実際に、MSCをベースとした遺伝子導入アプローチを用いて高めることで、天然の免疫応答をミラーリングすることができ、又は同様に適用することができるという驚くべき結果となった。

【 0 0 2 7 】

それゆえ、本発明は、1つ又は複数のMSC内に免疫応答刺激性サイトカイン（複数の場合もある）をコードする導入遺伝子を組み合わせることにより、より効率的な局所的及び安全な抗腫瘍応答を得ることができるという驚くべき発見に基づく。MSCビヒクル内の多数のサイトカインの組合せは、局所の抗腫瘍応答を生じる免疫刺激性因子の独自の局所発現及び分泌を生じ、この因子は多数の免疫応答群を含み、腫瘍患者においてサイトカインを全身に負荷したときに多く見られる全身毒性を誘導することはない。

(0 0 2 8)

さらに、腫瘍組織にホーミングし、生着するMSCの独自の性質は、治療用サイトカイン因子の発現を維持し、治療効果に対する免疫応答を維持する。1つの実施の形態において、誘導性プロモーター、好ましくは腫瘍組織の近傍における若しくはその組織内又は炎症を起こした組織内に発現する誘導性プロモーターを使用することにより、局所及び腫瘍特異的サイトカイン発現が可能になり、続いて（その領域内の腫瘍（及びそれゆえ、好ましくは炎症）が減少した後に続いてその発現が減少する。

(0 0 2 9)

本発明はまた、遺伝子改変型間葉系幹細胞（MSC）であって、上記MSCは、1つ又は複数の外因性核酸分子を含み、上記外因性核酸分子は1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

〔 0 0 3 0 〕

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、外因性核酸が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、サイトカインはIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL21、IFN 及びIFN からなる群から選択されることを特徴とする。

[0 0 3 1]

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインが少なくともIL-12と、IL-2、IL-7、IL-15及び／又はIL-21の1つ又は複数とを含むことを特徴とする。

[0 0 3 2]

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインが少なくとも(at least) IL-7及びIL-21を含むことを特徴とする。

[0 0 3 3]

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインは少なくとも1つのケモカインを含み、少なくとも1つの免疫応答刺激性サイトカインはIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL21、IFN 及びIFN からなる群から選択されることを特徴とする。

[0 0 3 4]

いくつかの実施の形態において、本発明は、本明細書に記載の細胞のサイトカイン導入遺伝子の組合せ、特に本明細書に開示の個々のサイトカイン又はケモカインの任意の所与の特定の組合せ、好ましくは-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL21、IFN、IFN、CD28、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド1、2、4、17、19、22、23(CCL1、CCL2、CCL4、CCL17、CCL19、CCL22、CCL23)、間質細胞由来因子1(SDF-1)の2つ以上の任意の所与の特定の組

合せを包含する。

【0035】

2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインにより定義されたMSC、及び他の抗腫瘍免疫療法と組み合わせた1つ又は複数の免疫応答刺激性サイトカインにより定義されたMSCの投与を含む腫瘍の治療方法は、自然免疫系又は併用免疫療法のいずれかによる抗腫瘍免疫応答における局所免疫系の刺激に対する驚くべきかつ有益な概念が結びつけたものである。導入遺伝子免疫刺激性サイトカインをコードするMSCを、抗腫瘍応答を刺激する有効な抗腫瘍アジュvantとして使用することは予期せぬことであった。関連の従来技術は、直接の作用を有する（導入遺伝子）細胞毒性物質の局所投与におけるMSCビヒクルの使用についてのみ教示している。しかし、（多数の可能性のある）導入遺伝子免疫刺激性サイトカインをコードするMSCの使用又は局所の抗腫瘍免疫応答をブーストするこのようなMSCと抗腫瘍免疫療法との組合せは、本発明の特定の技術的特徴を表す。10

【0036】

驚くべきことに、本明細書に記載の多数のサイトカインを用いて改変したMSCは、*in vitro*及び*invivo*の両方において上記サイトカインの予期せぬ良好な発現及び分泌を示している。当業者でも、これらの特定のサイトカインが、自然応答又は免疫療法のいずれかに基づいて所望の局所的免疫応答を誘導し、又は亢進させるのに十分な量を発現し、十分な量を細胞から放出することができることを予測することはできない。

【0037】

それゆえ、本発明は1つ又は複数の外因性核酸分子を含む本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、上記外因性核酸分子は腫瘍の治療において医薬として使用する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。MSCによる治療若しくはMSCの医学的な投与若しくは適用の方法に対する、又は本明細書に記載の抗腫瘍免疫療法との併用投与に対する本明細書に開示の特徴はいずれも、少なくとも2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインの導入遺伝子材料を含むMSCに適用する。20

【0038】

本発明は、対象の腫瘍組織に指向した免疫応答を局所刺激するのに適した手段を提供する。これは、患者の天然の免疫応答及び腫瘍に免疫応答を指向させることを目的とする免疫療法の治療（例えば、チェックポイント阻害剤、腫瘍抗原に対するCAR-T及び他の腫瘍免疫療法）を含む。免疫応答のこのような補助又は誘導は、免疫応答を開始し、維持し、また多くの場合免疫応答の活性化を遮断する腫瘍介在性免疫抑制を回避するために、種々の臨床背景において有益となり得る。30

【0039】

本発明の細胞を使用し、対象内に既に存在する内因性免疫細胞の活性を高め及び／又はその量を増加させることができる。代替的に又は追加して、更なる免疫細胞（自己又は同種のいずれか）を、所望の治療のための免疫応答を高めるために、本発明のMSCと（例えば、同時に又は連続して）組み合わせて投与することができる。

【0040】

本明細書に記載の遺伝子改変型MSCの構築を当業者にとって既知の技法を用いて行うことができる。40

【0041】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、外因性核酸が例えば、ウイルス発現構築物の形態のウイルスベクター配列を含むことを特徴とする。

【0042】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、外因性核酸が非ウイルス発現構築物であることを特徴とする。

【0043】

本明細書において使用される、「核酸」は、DNA、RNA及びそれらのハイブリッド又は改50

変異体を含むが、それらに限定されない任意の核酸分子を意味するものとする。「外因性核酸」又は「外因性遺伝因子」は、細胞に導入される任意の核酸に関連するが、この核酸は細胞の「元々の」又は「天然の」ゲノムの一構成要素ではない。外因性核酸は標的間葉系幹細胞の遺伝子材料に組み込まれてもよく若しくは組み込まれることはなく、又は核酸を安定して形質導入することに関連する。

【0044】

任意の所与の遺伝子送達法は本発明により包含され、好ましくはウイルスベクター又は非ウイルスベクター及びトランスフェクションの生物学的若しくは化学的方法又はそれらの組合せに関する。本方法は、使用される系における安定した又は一時的な遺伝子発現のいずれかを得ることができる。

10

【0045】

遺伝子改変型ウイルスは遺伝子の幹細胞への送達に広く適用されている。アデノウイルス又はRNAウイルス、例えばレンチウイルス又は他のレトロウイルスを適用することができる。アデノウイルスを使用して、遺伝子治療及び細胞操作の分野における遺伝子導入のための一連のベクターを作製している。アデノウイルスベクターの初代を（ウイルス複製に必要とされる）E1遺伝子を欠失させ、4 kbのクローニング能を有するベクターを作製することによって作製した。更にE3（宿主の免疫応答に関与）を欠失させて、8 kbのクローニング能を可能にした。更なる世代は、E2及び／又はE4の欠失を含むよう作製された。任意の所与のアデノウイルスベクター、例えば上記のものによるものの使用は本発明により包含される。

20

【0046】

レンチウイルスは、レトロウイルス科のメンバーのウイルスである（M. Scherr et al., Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. Curr Gene Ther. 2002 Feb; 2(1): 45-55）。レンチウイルスベクターを、LTR及びcisが作用するパッケージングシグナルを除き、ウイルス配列全体を欠失することによって作製する。得られたベクターは約8 kbのクローニング能を有する。レトロウイルスベクター由来のこれらのベクターの顕著な特徴の1つは、分裂する細胞及び分裂していない細胞並びに最終分化細胞を形質導入する能力である。

【0047】

従来のプラスミド移行及びスクレアーゼをベースとした遺伝子編集、インテグラーゼ又はトランスポザーゼ技術の使用による標的遺伝子組込みの適用を含む代替的方法といった非ウイルス法も使用することができる。これらの方法は、組込みにおいて効率的及び多くの場合部位特異的の両方の利点を有するベクター形質転換アプローチを示す。ベクターを細胞に導入する物理的な方法は当業者に知られている。一例として、静電容量を超えることにより膜に一時的な孔を作製する短時間の高電圧電気パルスの使用によるエレクトロポレーションに関する。この方法の利点の1つは、ほとんどの細胞型における安定し、かつ一過性の遺伝子発現に対して利用することができるることである。代替法は、リポソーム又はタンパク質形質導入ドメインの使用に関する。適切な方法は当業者に知られており、本発明の実施の形態を限定することを意図しない。

30

【0048】

本発明は、遺伝子発現の任意の所与の関連因子を操作するために、2種以上のウイルスの使用又はウイルス及び他の遺伝子の編集作業若しくは遺伝子改変（mRNA、siRNA、miRNA等の遺伝子改変の使用を含む）を包含する。本発明のいくつかの実施の形態において、免疫応答刺激性サイトカインは、多数のサイトカイン及び／又はケモカイン又はそれらの組合せに関し得る。

40

【0049】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、プロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せが外因性核酸の構成的発現を生じることを特徴とする。全身投与後又は局所投与後に対象の体内での腫瘍に対するMSCの有益なホーミング特性により、1つ又は複数の免疫応答刺激性サイトカインの発現のための構成的ブ

50

口モーターを使用することが好ましい。

【0050】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがEF1プロモーター、例えばEF1Sプロモーターであることを特徴とする。

【0051】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがPGKプロモーターであることを特徴とする。

【0052】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがCMVウイルスプロモーター又はSV40ウイルスプロモーターであることを特徴とする

10

。

【0053】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがGAGプロモーターであることを特徴とする。

【0054】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがUBCプロモーターであることを特徴とする。

【0055】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、遺伝子改变型間葉系幹細胞が腫瘍組織又は腫瘍間質組織に近傍すると、免疫応答刺激性サイトカインを発現することを特徴とする。

20

【0056】

間葉系幹細胞が、正常及び疾患の状況における様々な組織の微小環境への選択的な遊走を示すことができることを考えると、組織特異的プロモーター又は特定の疾患の微小環境に結合する他のプロモーター又は動員された幹細胞内で開始された分化経路により誘導されたプロモーターの使用は本発明に包含され、特に定義された生物学的な内容において、治療遺伝子、例えば本明細書に記載のサイトカインの選択的発現を活発にするために使用することができる。

【0057】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せは上記の投与後の細胞の分化の際に誘導されることを特徴とする。投与後の分化の一例には内皮細胞の分化があり、MSCが生着した後、腫瘍組織内又はその近傍の内皮細胞又は内皮細胞様細胞に分化することができ、それにより局所的に刺激性サイトカインの発現を可能にする。

30

【0058】

他の組織ニッチに動員されるが、疾患領域（腫瘍環境）にない幹細胞は、治療遺伝子を発現しないはずである。このアプローチは、定義された微小環境内の治療遺伝子の選択的発現の制御の可能性が大幅に可能となり、それにより炎症促進性サイトカインの全身投与に関連する既知の毒性の発生の可能性を小さくし、血管新生中の治療遺伝子の発現の調節に適用することに成功している。このような遺伝子改変に対して考えられるアプローチは国際公開第2008/150368号及び特許文献1に開示され、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

40

【0059】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改变型間葉系幹細胞は、プロモーターがTie2プロモーターであることを特徴とする。

【0060】

炎症又は血管新生において選択的に調節されるプロモーターを導入することができる。これに関し、Tie2プロモーター、Flklプロモーター及びイントロンエンハンサー、エンドセリン-1プロモーター及びプレ-プロエンドセリン-1プロモーターの内皮細胞特異的発現が研究されている（Huss, R, von Luttichau, I, Lechner, S, Notohamiprodjo, M, Seligman, A, 2008, International Publication No. WO 2008/150368 A1）。

50

ger,C, Nelson, P (2004) [Chemokine-directed homing of transplanted adult stem cells in wound healing and tissue regeneration]. Verh Dtsch Ges Pathol 88: 170-173).

【0061】

本発明の別の実施の形態は、炎症性メディエーターにより誘導可能であり、刺激性サイトカイン（免疫応答刺激性サイトカイン）の転写を制御する、プロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せを含む間葉系幹細胞を提供する。これらの炎症性メディエーターを腫瘍の間質組織から放出することができ、その結果、間葉系幹細胞の細胞毒性タンパク質の発現が、幹細胞が腫瘍の間質組織に近傍するときに誘導される。炎症性メディエーターは、例えばTNF 又はIFN 等のサイトカインであってよい。特に、プロモーターは RANTESプロモーターであってよく、これはとりわけTNFOC又はIFN によって誘導することができる (Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, et al. Genomic organization and transcriptional regulation of theRANTES chemokine gene. J Immunol 1993; 151(5): 2601-12; von Luetichau I, Nelson PJ, Pattison JM, et al. RANTES chemokine expression in diseased andnormal human tissues. Cytokine 1996; 8(1): 89-98; Nelson PJ, Pattison JM, Krensky AM. Gene expression of RANTES. Methods Enzymol 1997; 287: 148-62; Duellie J, Casella DP, Burk RD, et al. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF-A, RANTES, and CCR5, and risk of pancreaticadenocarcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15 (4): 726-31; Marfaing-Koka, A., et al., Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. Journal of Immunology, 1995. 154(4): p.1870-8)。

10

【0062】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、プロモーターがRANTESプロモーターであることを特徴とする。「RANTES」プロモーターは当該技術分において「CCL5」プロモーターとしても知られる。

【0063】

炎症促進メディエーターにより誘導可能なプロモーターの更なる例としては、NF- κ B応答性要素及び一般に、TNFにより誘導されることができるプロモーターがある。

【0064】

30

さらに、抗炎症性メディエーター（例えば、TGF- β ）により活性化したプロモーターを使用して、間葉系幹細胞の細胞毒性タンパク質の標的発現を実現することができる。例として、Smad結合要素 (Smad-binding elements) を含有するプロモーターがある。炎症メディエーターにより誘導可能なプロモーターを用いて、まだ血管形成が行われていない腫瘍の選択的治療を可能にする。

【0065】

さらに、不必要的全身の作用を回避するために、癌性組織において活性化し、又は癌性細胞により放出されたシグナルにより活性化したプロモーターを本発明において使用し、患者内の関連位置において、コードされたサイトカインの選択的発現を実現することができる。癌において上方制御されるプロモーターの一例にHSP70プロモーターがある。HSP70タンパク質は主要なストレス誘導性熱ショックタンパク質であり、ヒト腫瘍及び腫瘍細胞株において多量にかつ優先的に発現するシャペロンタンパク質である。Hsp70の、広範囲のアポトーシス及び壞死による刺激から細胞を保護する能力により、Hsp70は腫瘍細胞に対して生存を助長し得ることが推測されている (Rohde et al., Genes Dev. Mar 1, 2005; 19(5): 570-582, Nylandsted et al., Ann N Y Acad Sci. 2000; 926: 122-5, Ramp et al., Histol Histopathol. 2007 Oct; 22(10): 1099-107, Ricaniadis et al., Eur J Surg Oncol. 2001 Feb; 27(1): 88-93)。それゆえ、HSP70プロモーターは本発明により包含される治療用サイトカインの選択的発現の一選択肢である。HSP70プロモーターにおける更なる情報は、Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, pp. 629-633, 1986から得ることができる。

40

50

【 0 0 6 6 】

炎症又は「癌様」状態下において優先的に発現又は誘導される「腫瘍特異的」プロモーター又はプロモーターの使用により、不必要的全身の作用の低減に対してMSCホーミング特性と組み合わせた相乗効果を示すことができる。本発明のMSCが炎症、特に腫瘍、組織に向かって遊走し、それにより患者の体内で、コードされたサイトカインの全身の発現を回避する有効な手段が提供される。炎症状態又は腫瘍組織に存在する状態下において優先的に発現するサイトカインの発現のためのプロモーターの使用は、相乗的に全身の発現の低減を更に高め、それにより本明細書に記載のサイトカインのMSCベース様式の投与における驚くべき利点が提供される。

【 0 0 6 7 】

10

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインが、腫瘍組織内又はその近傍の免疫細胞の活性、生存率及び／又は数を維持する又は高めることを特徴とする。

【 0 0 6 8 】

当該技術分野において既知の免疫応答刺激性サイトカインは、好ましくは抗原、例えば腫瘍抗原に指向する免疫応答の誘導、活性化及び／又は亢進を、直接又は間接的のいずれかにおいて導き又は生じる任意のサイトカインとして理解される。特に、本発明の免疫応答刺激性サイトカインは、腫瘍疾患の治療に有益な免疫応答の誘導、活性化及び／又は亢進を導くサイトカインとして見なされることが好ましい。

【 0 0 6 9 】

20

本明細書において使用される免疫応答調節性サイトカイン又は免疫応答関連サイトカインという用語は同義に使用することができ、免疫細胞の分化、成熟及び活性化による抗腫瘍活性を含む免疫応答及び／又は炎症反応に関与、改変、制御及び／又は調節する分子に関する。

【 0 0 7 0 】

サイトカインは、細胞間のメディエーターとして作用する多様な非抗体タンパク質グループの1つである。サイトカインは種々の障害の治療に対する生物学的応答調節因子として現在、臨床に使用されている。サイトカインという用語は大きなタンパク質グループを説明するために使用される一般的用語である。サイトカインの特定の種類には、モノカイン、すなわち単核の食細胞から産生されるサイトカイン、リンホカイン、すなわち活性化したリンパ球、特にTh細胞から産生されるサイトカイン、インターロイキン、すなわち白血球間のメディエーターとして作用するサイトカイン、及びケモカイン、すなわち白血球の遊走に主に関与する小型のサイトカインを含み得る。サイトカインシグナル伝達は順応性があり、保護応答及び障害応答の両方を誘導することができる。サイトカインシグナル伝達はカスケードを生じ、又は他のサイトカインの産生を亢進若しくは抑制することができる。サイトカインには種々の役割があるが、当業者であれば、サイトカインが免疫応答刺激性として見なされ、それゆえ本明細書に記載の腫瘍疾患の治療に適用し得ることがわかる。

30

【 0 0 7 1 】

サイトカインは免疫応答を調節する能力があり、多くの場合、腫瘍に対して利用され、免疫応答を増大させ、また免疫応答を操作することを可能にする。これらの免疫調節作用により、腫瘍に対する免疫応答を誘起する薬剤として使用することが可能となる。

40

【 0 0 7 2 】

以下のサイトカインは、免疫応答刺激性又は免疫応答調節性サイトカインと呼ばれることがある。

【 0 0 7 3 】

抗腫瘍療法に通常使用される2つのサイトカイングループは、インターフェロン及びインターロイキンである。

【 0 0 7 4 】

インターフェロンは、抗ウイルス応答に通常関与する免疫系により産生されるサイトカ

50

インであるだけでなく、癌の治療に有効性を示す。インターフェロン(IFN)には、I型(IFN及びIFN β)、2型(IFN γ)及び比較的最近発見されたIII型(IFN α)の3つのグループがある。IFN γ は、有毛細胞白血病、AIDS関連力ポジ肉腫、濾胞性リンパ腫、慢性骨髓性白血病及び悪性黒色腫の治療に適用されている。I型及びII型のIFNは広範囲に研究されており、両方が免疫系の抗腫瘍作用を促進させるが、I型のIFNのみが今までのところ、癌治療において臨床的効果を示している。IFN α は動物モデルにおいてその抗腫瘍作用が試験されており、有望であることが示されている。

【0075】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIFN α であることを特徴とする。

10

【0076】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIFN α であることを特徴とする。

【0077】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIFN α であることを特徴とする。

【0078】

本発明のいくつかの実施の形態によれば、免疫応答刺激性サイトカイン又は免疫応答調節性サイトカインはT細胞調節又はT細胞のエフェクター機能に関するもの(T細胞制御性サイトカイン)が好ましい。これらのサイトカインは、炎症促進の微小環境の誘導に対して所望の特性を示し、それにより腫瘍に対する免疫系の活性化を容易にし、及び/又は抗腫瘍免疫治療の効力を高める。このようなサイトカインは、T細胞等の免疫エフェクター細胞を惹起し、メモリー免疫細胞の成熟を促進することを可能とし得る。これらのサイトカインの例として、IFN α 、IL-2、IL-12、IL-23、IL-15及びIL-21がある(Kelley's Textbook of Rheumatology; Firestein et al., 8th ed. (ISBN978-1-4160-3285-4), p367「Cytokines」を参照)。

20

【0079】

本明細書に挙げられる特定の分子は好ましくは、ヒト対象への投与に適切であることから哺乳動物の分子、好ましくはヒト分子に関する。例えば、本明細書に挙げるサイトカイン及び/又はケモカインは、過度の試みを要せず、例えば、米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)により保持されている配列データベースから当業者により得ることができるとして、好ましくはヒト配列に関する。

30

【0080】

タンパク質配列又はタンパク質をコードする核酸配列を、通常知られている配列に対して、例えばタンパク質配列の保存アミノ酸置換を行うことにより、又は遺伝子コードの縮退を用いることによって改変し、コードされているタンパク質配列を変化させることなくコード配列を変化させることができる。当業者であればわかるように、生物学的分子の配列を標準的な技法により変化(突然変異)させ、それにより既知の元の配列に対してその生物学的分子の配列の特性を改善又は保持することができる。それゆえ、既知の配列の基本的な特性を維持し、又はその配列に機能的に類似する任意の改変されたサイトカイン配列は、本発明の範囲に包含される。

40

【0081】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIL-2であることを特徴とする。

【0082】

インターロイキン-2は免疫系の抗腫瘍活性を高めることができ、したがって癌の一治療法として使用することができるサイトカインの一例である。インターロイキン-2は、悪性黒色腫(商品名、プロロイキン(商標))及び腎細胞癌の治療に使用されている。正常な生理状態では、エフェクターT細胞(免疫応答を生じる細胞)及び制御性T細胞(免疫応答

50

を抑制する細胞)の両方を促進するが、癌治療におけるその正確な機構は知られていない。最近の研究では、癌治療におけるIL-2発現の有益な作用が示されている。T細胞の活性化を促進するために、IL-2を養子免疫療法、例えばCART療法と併用している。しかし、IL-2の全身投与は、CART療法に伴う毒性に寄与する広範囲の免疫活性化の危険を伴う。

【0083】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIL-7であることを特徴とする。

【0084】

インターロイキン7(IL-7)は骨髄及び胸腺の間質細胞によって分泌される造血成長因子である。IL-7は多能性(万能性)造血幹細胞のリンパ前駆細胞への分化を刺激する。免疫療法物質としてのIL-7が前臨床動物試験において試験され、更に最近において種々の悪性腫瘍において及びHIV感染中のヒト臨床試験において試験されている(Fry TJ, Mackall CL (June 2002). "Interleukin-7: from bench to clinic". Blood 99 (11): 3892-904)。

。

【0085】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIL-15であることを特徴とする。

【0086】

インターロイキン15(IL-15)はIL-2に構造上類似するサイトカインである。IL-2と同様、IL-15はIL-2 / IL-15受容体鎖(CD122)及び通常の鎖(-C、CD132)から構成される複合体に結合し、またその複合体を通してシグナル伝達される。IL-15は、主な役割がウイルスに感染した細胞又は癌性細胞を致死させる自然免疫系の細胞であるナチュラルキラー細胞の細胞増殖を誘導する。IL-15は、前臨床モデルにおいて、CD8+T細胞の抗腫瘍免疫性を高めることができることが示されている(Klebanoff CA, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (7): 1969-74)。

【0087】

好ましい実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがIL-21であることを特徴とする。

【0088】

インターロイキン-21(IL-21)は、ウイルスに感染した細胞又は癌性細胞を破壊することができるナチュラルキラー(NK)細胞及び細胞毒性T細胞を含む、免疫系の細胞に対する強力な調節作用を有するサイトカインである。IL-21は、転移性悪性黒色腫(MM)及び腎細胞癌(RCC)患者における第1相及び第2相の臨床試験において証明されている(SonderegardH, Skak K, Tissue Antigens 74 (6): 467-79)。副作用としてインフルエンザ様の症状を有するが、投与に対して安全であることが示されている。用量制限毒性には、リンパ球数、好中球数及び血小板数の減少並びに肝毒性がある。

【0089】

インターロイキン12(IL-12)は、抗原刺激に応答して樹状細胞、マクロファージ及びヒトB-リンパ芽球様細胞(NC-37)から天然に産生されるインターロイキンである。IL-12は、ナイーブT細胞のTh1細胞への分化に関与する。IL-12はT細胞刺激因子として知られ、T細胞の成長及び機能を刺激することができ、このことが本発明の構想となっている。IL-12は、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞からのインターフェロン- γ (IFN- γ)及び腫瘍壞死因子-TNF- γ (TNF- γ)の産生を刺激し、IL-4介在性のIFN- γ の抑制を減少させることができられている。IL-12はまた、既知の抗血管形成作用を有する。IL-12は、IFN- γ の産生を増加させるよう機能し、次いでIFN- γ の増加がケモカインCXCL10の産生を増加させる。

【0090】

インターロイキン-12(IL-12)は、特に癌細胞に対する免疫応答に対して、炎症応答、自然の感染抵抗性及び獲得免疫を調節することにより自然の免疫群と獲得した免疫群との間の相互作用の役割を果たす(Colombo et al., Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Apr

10

20

30

40

50

; 13(2): 155-68)。IL-12は、多くの病原体に対する、また移植可能な又は化学的に誘導された腫瘍に対する抵抗性に必要とされる。組換えIL-12による治療は、遺伝子改変型マウスにおける、移植可能な腫瘍に対して、化学的に誘導された腫瘍に対して及び自然発生的に生じる腫瘍における抗腫瘍作用を示すことが知られている。この能力により、IL-12は癌に対する強力なアジュバント作用を有する。

【0091】

しかし、現時点まで過度の臨床毒性及び軽度の臨床反応が臨床試験において観察されており、それによりIL-12の抗腫瘍作用に悪影響を与えることなく毒性を最小限にする新規のアプローチ及び投与方法が必要とされている。IL-12は、今日までに対象に非毒性の用量を全身投与することにより試験した腫瘍では、十分な作用を有することが示されていなかつた。10

【0092】

それゆえ、本発明は、外因性核酸がIL-12をコードする、本明細書に記載のMSC及びその医学的利用に関する。IL-12の部位特異的発現に対するMSCをベースとしたアプローチは、IL-12の全身投与固有の毒性の回避に対する新規及び有利なアプローチを示す。

【0093】

本発明は、本明細書に記載のMSCの免疫刺激性サイトカインの発現を介して、驚くべきかつ有利な抗腫瘍作用を可能にする。MSCによる本明細書に記載の刺激性サイトカインの発現は、抗腫瘍免疫応答を補助し、腫瘍の大きさ及び/又は成長の減少を生じ、当該技術分野において既知のこのようなサイトカインの全身投与により生じた副作用の明らかな減少及び/又は回避を示す。恶心及び嘔吐、口中又は口唇のピリピリとした痛み、下痢、眠気、アレルギー反応、発熱又は寒気、蕁麻疹、痒、頭痛、咳嗽、息切れ又は顔、舌若しくは喉の腫脹等の副作用を、本明細書に記載のMSCをベースとした療法により回避することができる。20

【0094】

それゆえ、本発明は、局所（すなわち局所に限定）の腫瘍特異的な作用を可能にすることにより、好ましくは細胞の全身投与により実現するが、適切な組織特異的状態下において上記サイトカインを含み、また発現するMSCを用いた細胞療法を介して組織特異的に発揮される、サイトカイン療法の副作用を減少させる手段及びサイトカインと免疫療法との併用を提供する。30

【0095】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、外因性核酸が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター/エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、サイトカインがIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL21、IFN 及びIFN からなる群から選択される、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0096】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、外因性核酸が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター/エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、上記サイトカインが少なくともIL-7及びIL-21、IL-12及びIL-2、IL-15及びIL-12、IL-7及びIL-12又はIL-21及びIL-12を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。40

【0097】

本発明はまた、外因性核酸分子を含む遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、上記外因性核酸分子がプロモーター又はプロモーター/エンハンサーの組合せに操作可能に連結する、T細胞の増殖及び/又は分化（及び/又はメモリー細胞への成熟及び腫瘍介在性免疫抑制の回避）を誘導する免疫刺激性分子（複数の場合もある）をコードする領域を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0098】

50

T細胞の増殖及び／又は分化を誘導する免疫刺激性分子は、本明細書に記載のサイトカイン又は別の免疫刺激性分子、例えばケモカイン若しくはサイトカインとケモカインとの組合せであってよい。組合せは、確実に、免疫細胞がケモカインにより適宜惹起され、（活性化を生じる適切なサイトカインにより）適宜活性化され、（メモリーエフェクター免疫細胞の成熟を促進する適切なサイトカインにより）メモリー表現型に指向させることができることが好ましい。

【0099】

好ましい実施の形態において、遺伝子改変型間葉系幹細胞は、T細胞の増殖及び／又は分化を誘導する免疫刺激性分子がCD28であることを特徴とする。CD28（分化抗原群28）は、T細胞の活性化に必要な共刺激シグナルを発する、T細胞上に発現するタンパク質の1つである。CD28はまた、好酸球顆粒球を刺激するが、このとき好酸球顆粒球と抗CD28との結合がIL-2、IL4、IL-13及びIFN の放出を生じることがわかっている。10

【0100】

好ましい実施の形態において、遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがケモカインであることを特徴とする。

【0101】

本発明はまた、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、外因性核酸が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、少なくとも1つの免疫応答刺激性サイトカインがケモカインである、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。20

【0102】

本発明はまた、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、外因性核酸が1つ又は複数のプロモーター又はプロモーター／エンハンサーの組合せに操作可能に連結する2つ以上の免疫応答刺激性サイトカインをコードする領域を含み、少なくとも1つの免疫応答刺激性サイトカインがケモカインであり、少なくとも1つの免疫応答刺激性サイトカインがIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL21、IFN 及びIFN からなる群から選択される、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0103】

1つの実施の形態において、遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインが炎症性ケモカインであることを特徴とする。30

【0104】

1つの実施の形態において、遺伝子改変型間葉系幹細胞は、免疫応答刺激性サイトカインがT細胞、例えばCCL1、CCL2及び／又はCCL17を惹起する走化特性を有するケモカインであることを特徴とする。

【0105】

ケモカインは、細胞から分泌されるサイトカイン（シグナル伝達タンパク質）の亜群を指す。サイトカインは、走化性サイトカインである近接の応答性細胞の走化性の指向を誘導する能力を有する。タンパク質は、小型（通例、およそ8キロダルトン～10キロダルトンの大きさ）及び3次元形状の形成に重要となる保存位置での4つのシステイン残基の存在等の共有の構造的特徴によりケモカインとして分類される。サイトカインは、SISファミリーのサイトカイン、SIGファミリーのサイトカイン、SCYファミリーのサイトカイン、血小板第4因子スーパーファミリー又はインタークリン等の別の定義において知られていることもある。ケモカインは、4つの主なサブファミリー：CXC、CC、CX3C及びXCに分類されている。これらのタンパク質は全て、標的細胞の表面に選択的に見つかる、ケモカイン受容体と呼ばれるGタンパク質結合膜貫通型受容体との相互作用により生物学的作用を発揮する。40

【0106】

ケモカインの主要な役割は、化学誘引物質として免疫細胞の遊走を誘導又は指向するよう作用することである。ケモカインにより惹起される細胞は、ケモカイン濃度増加のシグ50

ナルに従いケモカイン源に向かう。一部のケモカインは、リンパ球をリンパ節に指向する等の免疫監視機構プロセスにある免疫系の細胞を制御することから、これらの組織にある抗原提示細胞と相互作用させることによって病原体の侵入をスクリーニングすることができる。一部のケモカインは、発達に関する役割を有し、血管形成（新たな血管の成長）を促進し、又は細胞成熟に重要な特定のシグナルを発する組織に細胞を誘導する。他のケモカインは炎症性であり、細菌感染、ウイルス及び痛風に生じるシリカ又は尿酸結晶等の物理的障害を生じる物質に応答して多種多様な細胞から放出される。これらの放出は多くの場合、インターロイキン1等の炎症促進性サイトカインにより刺激される。炎症性ケモカインは主に、白血球の化学誘引物質として機能し、単球、好中球及び他のエフェクター細胞を血液から感染部位又は組織障害部位に動員する。或る特定の炎症性ケモカインは、細胞を活性化して、免疫応答を開始し、又は創傷治癒を促進する。

【0107】

ケモカインは一般に炎症促進性又は恒常性であると考えられている。炎症促進性サイトカインを免疫応答中に誘導し、免疫系の細胞を感染部位又は他の免疫標的、例えば腫瘍に動員することができるが、恒常性サイトカインは、組織の保持又は発達のプロセスにある細胞の遊走の制御に関与する。炎症サイトカイン及びケモカインは通例、病的状態下において（IL-1、TNF-、LPS又はウイルス等の炎症促進性の刺激において）産生され、免疫細胞を炎症部位に惹起する炎症反応に能動的に関与する。

【0108】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載の間葉系幹細胞であって、外因性核酸が炎症性ケモカインをコードする、間葉系幹細胞に関する。このようなケモカインは当業者に知られている。炎症性ケモカインの例としては、CXCL-8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11及びCXL10、CXCL1、CXCL2に関する。

【0109】

本発明の1つの実施の形態において、ケモカインは、ケモカインを発現するMSCの部位にT細胞（T-リンパ球）を誘導することができる。Tリンパ球の炎症部位への動員に関するケモカインの例は、CCL2、CCL1、CCL22及びCCL17である。これらのケモカインはT細胞の既知の誘引物質であり、それゆえ、患者の内因性T細胞を惹起し、又は養子免疫治療剤（例えば、CART）の腫瘍へのホーミングを高めるのに使用することができる。腫瘍における養子免疫治療剤（adoptive immunotherapy）のホーミングは、このような多くの治療剤に欠失しているものとして知られ、それゆえ、本発明は、ホーミング及びそれに続くCAR-T等の養子免疫療法の治療効力を大幅に高める可能性を有する。

【0110】

いくつかの実施の形態において、ケモカインはCXCケモカイン、好ましくはCXCL13である。

【0111】

CXCケモカインは、CXCケモカイン（又は-X-ケモカイン）の2つのN末端システインが「X」で表される1個のアミノ酸で分離しているケモカインに関する。通例、CXCケモカインには、CXCモチーフの第1のシステインの直前にグルタミン酸-ロイシン-アルギニンモチーフ（ELRモチーフ）を含むもの（ELRポジティブ）（ELR-positive）及びELRモチーフを含まないもの（ELRネガティブ）（ELR-negative）の2つのカテゴリーがある。ELRポジティブのCXCケモカインの一例は、インターロイキン-8（IL-8）であり、これは好中球を誘導して、血流に放出し、周辺組織に取り込ませる。ELRネガティブのケモカインの一例はCXCL13であり、これはリンパ球における化学誘引物質の特性を示す。

【0112】

本発明の1つの実施の形態において、ケモカインはCX3CL1であり、これはCX3Cケモカインと呼ばれるケモカインのグループに属する。CX3Cケモカインは、2つのシステインの間に3つのアミノ酸を有するケモカインに関する。CX3CL1は、CX3CL1を発現する細胞の表面に分泌及び連結の両方を行い、それにより化学誘引物質及び接着分子の両方として作用する。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

本発明のいくつかの実施の形態において、ケモカインは、間質細胞由来因子1 (SDF-1 ; CXCL12)、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド23 (CCL23 ; マクロファージ炎症性タンパク質3 (MIP-3))、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド19 (CCL19 ; EBI1 ; ELC又はマクロファージ炎症性タンパク質-3 (MIP-3)) 及びケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド4 (CCL4 ; マクロファージ炎症性タンパク質-1 (MIP-1)) からなる群から選択される。

【 0 1 1 4 】

間質細胞由来因子1 (SDF-1) はまた、C-X-Cモチーフケモカイン12 (CXCL12) として知られる。間質細胞由来因子1- 及び1- は、ケモカインファミリーに属する小型のサイトカインであり、そのメンバーは白血球を活性化し、多くの場合、リポ多糖、TNF又はIL1等の炎症促進性の刺激により誘導される。ケモカインは、2つのジスルフィド結合を形成する4つの保存システィンの存在を特徴とする。これらのケモカインを2つのサブファミリーに分類することができる。CCサブファミリーにおいて、システィン残基は互いに隣接する。CXCサブファミリーにおいて、これらのケモカインは干渉アミノ酸によって分離される。SDF1タンパク質はCXCサブファミリーの群に属する。SDF-1は、同じ遺伝子の選択的スプライシングにより2つの形態であるSDF-1 / CXCL12a及びSDF-1 / CXCL12bで産生される。それゆえ本発明は、本明細書に記載のMSCであって、外因性核分子は、SDF-1ケモカイン、例えはSDF-1 / CXCL12a及び / 又はSDF-1 / CXCL12b等のSDF-1ケモカインをコードする。

10

【 0 1 1 5 】

ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド23 (CCL23) はマクロファージ炎症性タンパク質3 (MIP-3) 及び骨髓性前駆細胞阻害因子1 (MPIF-1) としても知られるCCケモカインファミリーに属するサイトカインである。CCL23は、その大部分を肺及び肝組織に発現するが、骨髓及び胎盤においても見つかる。CCL23は、休止T細胞及び単球に対して走化性である。

【 0 1 1 6 】

ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド19 (CCL19) はCCケモカインファミリーに属するサイトカインであり、またEBI1リガンドケモカイン (ELC) 及びマクロファージ炎症性タンパク質-3 (MIP-3) としても知られる。CCL19は胸腺及びリンパ節において多量に発現し、気管及び結腸において中等度のレベル並びに胃、小腸、肺、腎臓及び脾臓において低レベルに発現する。CCL19は、胸腺のT細胞のトラフィッキングにおいて及び二次リンパ器官へのT細胞及びB細胞の遊走において重要な役割を果たすことが知られている。

30

【 0 1 1 7 】

CCL4はマクロファージ炎症性タンパク質-1 (MIP-1) としても知られているが、CCR5受容体に特異性を有するCCケモカインである。CCL4はナチュラルキラー細胞、単球及び種々の他の免疫細胞の化学誘引物質である。

【 0 1 1 8 】

全ての免疫療法は、免疫応答を局所的及び適時に活性化させることにあり、これはエフェクター細胞がかなり存在し、機能を発揮することによるものである。腫瘍の場合、この機能は腫瘍細胞の致死を生じる。しかし多くの場合、腫瘍に惹起される免疫エフェクター細胞の量は不十分なものでしかなく、免疫療法の効果が縮小される。

40

【 0 1 1 9 】

本明細書に記載のケモカインは、腫瘍疾患に対する免疫応答において有益であるT細胞を動員する特性を示すことができる。MSCをベースとする発現及び分子の送達においてこのようなケモカイン分子を使用することは、部位特異的T細胞の動員及びこのようなサイトカイン / ケモカインの全身投与により生じる非標的作用関連の副作用の減少に対して驚くべき効果を可能にする。

【 0 1 2 0 】

本発明の別の態様において、本発明に記載の、医薬としての遺伝子改変型間葉系幹細胞の使用は、上記治療が上記間葉系幹細胞とチェックポイント阻害剤との併用投与を含むこ

50

とを特徴とする。

【0121】

通常、癌性の可能性のある細胞は免疫系により破壊される。全ての癌細胞が隣接する細胞と異なる変化をし、その最も明らかな変化は抑制されることなく増殖することができる。癌細胞は通常の免疫系の制御を回避する機構を利用する。チェックポイントタンパク質は、癌性の可能性のある細胞が破壊されないよう免疫系に伝達するよう機能することが示されている。細胞が癌性であることをシグナル伝達する他の分子が存在し得るが、細胞表面上に十分なチェックポイントタンパク質が存在する場合、免疫系が癌性シグナルを見落とす可能性がある。

【0122】

癌治療における標的として研究されてきたリガンド - 受容体相互作用は、膜貫通型プログラム細胞死1タンパク質 (PD-1 ; CD279としても知られる) とそのリガンドであるPD-1リガンド1 (PD-L1)との間の相互作用のことである。正常な生理状態において、細胞表面のPD-L1は、免疫細胞の表面のPD1に結合し、この結合が免疫細胞の活性を阻害する。癌細胞表面のPD-L1が上方調節することにより、T細胞が阻害されることで宿主の免疫系を回避することが可能となり、T細胞の阻害がなければ腫瘍細胞を攻撃することができると思われる。PD-1又はPD-L1のいずれかと結合することで相互作用を遮断する抗体により、T細胞に腫瘍を攻撃させることができるとなる。

10

【0123】

チェックポイント阻害剤（免疫チェックポイント調節因子又はCPMとしても知られる）は、チェックポイントタンパク質の有効性を弱めるように設計されている。これらの阻害剤は種々の作用機序を有し得るが、有効であれば免疫系に癌細胞の表面の他の分子を認識させることができる。

20

【0124】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞の医学的利用は、チェックポイント阻害剤、好ましくはPD-L1及び／又はPD-1阻害剤と、上記のMSCとの併用投与を特徴とする。例として、ニボルマブ (BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、完全ヒト免疫グロブリンG4 (IgG4) モノクローナルPD-1抗体、ランプロリズマブ (MK-3475)、ヒト化モノクローナルIgG4 PD-1抗体及び完全ヒトIgG4 PD-L1抗体であるBMS-936559がある。

30

【0125】

1つの実施の形態において、本明細書に記載の遺伝子改変型間葉系幹細胞の医学的利用は、チェックポイント阻害剤、好ましくはCTLA-4阻害剤と、上記MSCとの併用投与を特徴とする。例として、CTLA-4に対する2つの完全ヒトモノクローナル抗体であるトレメリムマブ (Pfizer、米国ニューヨーク) 及びイピリムマブがある。

【0126】

チェックポイント阻害剤と合わせてT細胞の増殖及び／又は分化を誘導する免疫応答刺激性サイトカイン及び／又は免疫刺激性分子を発現するMSCの併用投与は、所望の抗癌作用に対して相乗効果を生じる。サイトカイン又は他の免疫刺激物質は、癌組織に対するT細胞の応答を局所的に亢進させるが、チェックポイント阻害剤も癌性組織をより効率的に攻撃及び破壊することが可能である。これらの2つの物質の効果を相乗的に組み合せることで、これらの物質単体を考慮したときのこれら2つの態様を合わせたものよりも大きな技術的効果が得られる。

40

【0127】

更なる実施の形態において、本発明は、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、免疫療法が腫瘍抗原の投与を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0128】

本発明を使用して、癌ワクチンの治療効力を高める。癌ワクチンは免疫系に指向し、体内的癌細胞に対する攻撃を高める。感染を予防するのに使用されるワクチンのように疾患

50

を予防する代わりに、ワクチンが免疫系を活性化し、既に存在する疾患を攻撃する。いくつかの癌治療用ワクチンは、癌細胞、細胞の一部又は純粋な抗原から作製される。中には患者自身の免疫細胞、例えばT細胞又は抗原提示細胞を取り出し、研究室においてこれらの物質に曝露させ、ワクチンを作製する。ワクチンが準備されると、体内に注射され、癌細胞に対する免疫応答を仲介する。ワクチンを、多くの場合免疫応答をより更にブーストさせることに役立つアジュバントと呼ばれる他の物質又は細胞と組み合わせる。癌ワクチンは、1つ又は複数の特異的抗原を用いて免疫系に細胞を攻撃させる。細胞の獲得免疫応答の活性化は免疫学的メモリーを生じ、その結果ワクチンが投与後長く作用し続けることができる事が期待される。多くの場合、腫瘍介在性免疫抑制が癌ワクチンの効力及び免疫活性化の妨げとなっていた。癌ワクチンと上記間葉系幹細胞との組合せは、免疫抑制を取り除き若しくは弱め、又は何らかの免疫抑制が持続していても、免疫活性化を促進することが期待される。

【0129】

それゆえ、本明細書に記載のMSCは、治療剤そのもの又は同時投与する免疫治療剤（単数又は複数）のアジュバントとして見なすことができる。

【0130】

本発明の更なる態様は、本明細書に記載の、医薬として使用するための遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、上記治療が上記間葉系幹細胞と免疫細胞との併用投与を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。免疫細胞の前に遺伝子改変型MSC（例えば、CART）を投与することにより、適切なケモカインが発現することでCART及び他の免疫エフェクター細胞の化学誘引が高まることは、本発明内に包含される。サイトカインを刺激する発現は、局所のみ、好ましくは腫瘍内又はその近傍のT細胞の活性化を高め、続いてメモリーエフェクター細胞表現型を生じ、それにより治療による治療効果を持続させる。

【0131】

病原体又は癌性組織に対する応答には、免疫応答に関与する多くの多様な細胞型の複雑な相互作用及び活性が統合されている。本明細書において使用される免疫細胞は、以下のプロセスにおいて説明される以下の細胞型のいずれかに関連し得る：自然免疫応答は防御のファーストライン（first line：一次治療）であり、病原体に曝露又は「異物」若しくは癌性物質に曝露した直後に生じる。自然免疫応答は好中球及びマクロファージ、細胞毒性ナチュラルキラー（NK）細胞及び顆粒球等の食細胞により行われる。続く獲得免疫応答には抗原特異的防御機構があり、作用するには数日かかることがある。獲得免疫に重要な役割を有する細胞型はマクロファージ及び樹状細胞を含む抗原提示細胞である。T細胞サブセット、B細胞及びマクロファージを含む種々の細胞型の抗原依存性の刺激は全て、宿主の防御において重要な役割を果たす。本明細書に記載の免疫細胞は、対象の免疫応答に関与する生物学的細胞に関する。免疫細胞は、T細胞、B細胞、樹状細胞、顆粒球、自然リンパ細胞（ILC）、巨核球、单球／マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、血小板、赤血球細胞（RBC）及び／又は胸腺細胞から選択されることが好ましい。

【0132】

間葉系幹細胞及び／又は免疫細胞を得る対象は、細胞を培養後に投与しようとする同一の対象であってよい。それゆえ、このような細胞は自己と見なされ得る。しかし、細胞は、投与しようとする患者とは別の対象から得られることもあり、それゆえ、同種と見なされる。本明細書において使用される細胞は、その細胞又はその前駆細胞のいずれも同種の別の対象に由来する場合、対象に対して「同種」となる。本明細書において使用される細胞は、その細胞又はその前駆細胞が同一の対象のものに由来する場合、対象に対して「自己」となる。好ましい実施の形態において、免疫細胞は医学的処置の対象に対して自己である。

【0133】

好ましい実施の形態において、免疫細胞はT細胞である。他の実施の形態において、免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CART）等の人工的T細胞受容体を含むT細胞であり、このT細胞受容体は、腫瘍抗原に特異的に結合する（Lee, DW et al., Clin Cancer Res; 2012;

10

20

30

40

50

18(10); 2780-90)。更なる実施の形態において、免疫細胞はマクロファージ、好ましくはM1マクロファージ及び／又は単球である。

【0134】

単球は白血球細胞（白血球）の一種である。単球は全ての白血球の中で最も大きい。単球は、全ての哺乳動物を含む（ヒトを含む）脊椎動物の自然免疫系の一部である。単球は造血幹細胞から分化する両能性細胞である、单芽球と呼ばれる前駆細胞から骨髄で産生される。単球は、約1日～3日間血流を循環した後、通常全身の組織に移動する。単球は血中の白血球の3パーセント～8パーセントを構成する。組織内では、単球は解剖学的に異なる位置にて様々な種類のマクロファージに成熟する。

【0135】

マクロファージは巨大食細胞とも呼ばれ、組織内の単球の分化によって産生される細胞である。単球及びマクロファージは食細胞である。マクロファージは、非特異的防御の機能（自然免疫）と脊椎動物の特異的防御機構（獲得免疫）の開始の補助との両方を行う。キラー表現型を発現するマクロファージの大部分は、M1マクロファージと呼ばれ、その一方で組織修復に関与するものはM2マクロファージと呼ばれる。マクロファージの役割は、静止している細胞又は動いている細胞のいずれかの細胞片及び病原体を食菌すること又は包囲した後に消化することである。マクロファージはまた、病原体に応答するようリンパ球及び他の免疫細胞を刺激する。マクロファージは異物、感染性微生物及び癌細胞を破壊及び取り込みにより攻撃する特定の食細胞である。

【0136】

1つの実施の形態において、それゆえ本発明は、癌細胞を攻撃するT細胞系細胞毒性応答を包含する、養子細胞移植を含む癌免疫療法及びアプローチに関する。

【0137】

癌免疫療法は、免疫系を刺激し、腫瘍を拒絶し、破壊することを試みるものである。最初、免疫療法による治療は、インターロイキン等のサイトカインの投与を含んでいた。その後、静脈内及び全身投与されたサイトカインの副作用のため、血液からリンパ球を抽出し、in vitroで腫瘍抗原に対してこれらの細胞を増殖させた後に、適切な刺激性サイトカインを有する細胞を注射する代替的アプローチの試みがなされた。その後、細胞は増大している腫瘍発現抗原を特異的に標的とし、破壊する。これらのアプローチにも関わらず、サイトカインを有するこの細胞の適切な刺激による方法は、納得のいく腫瘍減少を得るにはあまり効果的ではなかった。大量のサイトカインを必要とすることから顕著な副作用も生じた。

【0138】

免疫療法でのこれまでのこのような試みに対するアプローチの1つに、腫瘍を認識し、攻撃するよう患者自身の免疫細胞を操作するものがある。また、このアプローチは養子細胞移植（ACT）と呼ばれるが、これまでのところ臨床試験に限定されており、これらの操作した免疫細胞を用いた治療では、進行癌の患者において治療応答が得られている。

【0139】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載のMSCを併用投与する養子細胞移植を包含する。免疫細胞の前に遺伝子改変型MSC（例えばCART）を投与することにより、適切なケモカインが発現することで養子細胞移植中に投与されたCART及び他の免疫エフェクター細胞の化学誘引が高められることは、本発明内に包含される。刺激性サイトカインの発現により、T細胞の活性化が局所的にのみ、好ましくは腫瘍内又はその近傍において高められた後、メモリーエフェクター細胞の表現型を生じ、それによって処置の治療効果が持続する。

【0140】

養子細胞移植は、癌細胞を攻撃するT細胞系細胞毒性応答を用いる。患者の癌に対して天然に又は遺伝子操作して反応するT細胞をin vitroにて作製した後、癌患者に移植して戻す。自己の腫瘍浸潤リンパ球は、転移性悪性黒色腫の患者に対する効果的な治療として使用されている。このリンパ球は、患者の腫瘍とともに見つかったT細胞を取り出し、このT細胞に癌細胞を攻撃するよう学習させることにより得ることができる。これらのT細

10

20

30

40

50

胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）と呼ばれることがある。このようなT細胞をin vitroにて高濃度のIL-2、抗CD3及びアロ反応性フィーダー細胞を用いて刺激し、増殖させることができる。これまでには、このようなT細胞を次に外部からのIL-2の投与とともに患者に移植して戻し、抗癌活性を更にブーストする。

【0141】

1つの実施の形態において、本発明は、本明細書に記載の遺伝子改変型MSCを介したIL-2の投与を包含する。このアプローチを通して、IL-2の全身投与の副作用が回避される一方で、T細胞移植の有益な効果が維持される及び／又は高められる。同様の効果は、IL-12、IL-7、IL-21及び／又はIL-15の単独又はそれらの組合せにおいて得られ、免疫学的メモリーの活性化及び確立が実現する。

10

【0142】

それゆえ、本発明は、好ましくは細胞毒性T細胞及び／又はNK細胞により介在される、抗腫瘍免疫応答を刺激するための局所及び組織特異的サイトカインを産生する新規の手段を提供する。

【0143】

人工的T細胞受容体（キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、キメラ抗原受容体（CAR）としても知られる）は操作された受容体であり、これらの受容体は、任意の特異性を免疫エフェクター細胞に移植する。通例、これらの受容体を用いて、レトロウイルスベクターによってコード配列の転移が容易となったモノクローナル抗体の特異性がT細胞に移植される。

20

【0144】

1つの実施の形態において、遺伝子操作したT細胞は、患者の細胞を、腫瘍抗原を認識するよう特異したT細胞受容体（TCR）遺伝子のコピーを含有するウイルスに感染させることにより作製することができる。ウイルスは細胞内で再生することができないが、ヒトゲノムに組み込まれる。このことは、新たにTCR遺伝子がT細胞内で安定するには有益となる。患者自身のT細胞をこれらのウイルスに曝露させた後、非特異的に増殖又は遺伝子操作したTCRを用いて刺激する。次いで、細胞を患者に移植して戻し、腫瘍に対する免疫応答を準備させる。第2世代及び第3世代のCARは通例、一本鎖可変フラグメント（scFv）と呼ばれるモノクローナル抗体の断片からなり、T細胞膜の外側にあり、結合してT細胞内部を刺激する。scFv部分は細胞をその標的抗原に誘導する。T細胞がその標的抗原に結合すると、刺激性分子は、T細胞が完全に活性になるために必要なシグナルを送る。この完全な活性状態において、T細胞はより効率的に増殖することができ、癌細胞を攻撃することができる。

30

【0145】

免疫細胞、好ましくはT細胞、例えば本明細書に記載のものとともに、及び場合によりチェックポイント阻害剤と更に組み合わせて、T細胞の増殖及び／又は分化を誘導する免疫応答刺激性サイトカイン及び／又は免疫刺激性分子を発現するMSCを併用投与することは、所望の抗癌作用に対する相乗効果を生じる。チェックポイント阻害では、更に投与した免疫細胞の抗腫瘍作用を高めるため、刺激性サイトカインを発現するMSCを組み合わせることができ、それにより抗腫瘍治療において予期せぬ効力に関連した因子の組合せが得られる。

40

【0146】

更なる実施の形態において、本発明は、本明細書に記載の、医薬として使用される遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、免疫療法が患者由来の腫瘍材料の投与を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0147】

更なる実施の形態において、本発明は、本明細書に記載の、医薬として使用される遺伝子改変型間葉系幹細胞であって、免疫療法が腫瘍特異的抗原を標的とした抗体又は抗体フラグメントの投与を含む、遺伝子改変型間葉系幹細胞に関する。

【0148】

50

例えば、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）は、細胞を介在した免疫防御の機構であり、この機構により免疫系のエフェクター細胞が癌細胞等の標的細胞を活発に溶解し、この標的細胞の膜表面抗原が特異的抗体と結合している。これは、体液性免疫応答の一部として抗体が癌の成長を制限し、含有するよう作用することができる機構の1つである。これまでの報告では、ADCCが、腫瘍に対して、トラスツズマブ及びリツキシマブを含む治療用モノクローナル抗体の重要な作用機構であることが示されている。本明細書に記載のMSCと抗腫瘍抗体治療との併用投与は本発明により包含される。

【0149】

例えば、T細胞上の腫瘍特異的抗原及びCD3分子を同時に標的とする二重特異性抗体を抗腫瘍免疫療法として投与することができる。

10

【0150】

以下の図は、本発明の範囲又は本明細書に記載の概念を制限することなく、本発明の実施を示すことにより本発明の特定の実施形態を説明するために示している。

【図面の簡単な説明】

【0151】

【図1】in vitroにおいてサイトカインを発現する遺伝子改変型ヒトMSCを示したグラフである。

【図2】本発明の好ましいウイルス発現構築物を示した図である。

【図3-1】ウイルス発現構築物を形質導入した細胞の細胞内FACS選別を示したグラフである。

20

【図3-2】同上

【図3-3】同上

【図3-4】同上

【図3-5】同上

【図3-6】同上

【図4】遺伝子導入サイトカインのELISAによる検出を示したグラフである。

【0152】

図面の詳細な説明

図1：in vitroにおいてサイトカインを発現する遺伝子改変型ヒトMSC：グラフに示したサイトカイン及びpacピューロマイシン耐性遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを初代ヒトMSCに形質導入した（0.25のMOI）。形質導入後、形質導入したMSCを、ピューロマイシンを用いて選抜し、細胞当たりの平均ベクターコピー数をqPCRにより求めた。次いで、選択された細胞をELISA測定（ヒトIL-2 Thermo Scientific EH2IL2、ヒトIL-7 Thermo Scientific EHIL7、ヒトIL-21 ThermoScientific EHIL21）用に播種した。その播種の72時間後に 1×10^5 個の細胞を播種し、上清を回収した後、試験した。作製したデータを 10^5 個の細胞及び1回ベクターコピー数に対して正規化した。

30

【0153】

図2：本発明の好ましいウイルス発現の構築物。構築物を - レトロウイルス骨格（pSER11、欧州特許第2019134号）にクローニングした。全ての構築物を伸長因子短鎖（pEFS）プロモーターによって誘導する。インターロイキンはP2Aによって2つに分離されている。IL-12の鎖及び鎖はT2Aによって分離されることとなる。ヒトインターロイキン配列を使用する（IL-2 : GenBank : DQ861285.1、IL-7 : GenBank : EF064721.1、IL-12 : GenBank : AF101062.1、IL-12 : NCBI参照配列 : NM_002187.2、IL-15 : GenBank : AY720442.1、IL-21 : GenBank : BC066260.1）。pac遺伝子及びoPRE配列をIRES配列の後ろに配置する。構築物の5'-末端及び3'-末端上にはLTRがある。この骨格はLTRを含有し、LTRは構築物の5'-末端及び3'-末端上に配置されている。構築物の5'-末端のLTRは、SV40エンハンサー、R SVプロモーター、R領域及びU5領域を含有する。構築物の3'-末端のLTRは、U3領域、R領域、U5領域及びPolyAシグナルを欠失する。骨格は、細菌部分：lacZプロモーター、複製起点、bla遺伝子及びLacZ遺伝子（pUC19）を含有する。

40

【0154】

50

図3：ウイルス発現構築物を形質導入した細胞の細胞内FACS (ic-FACS) 選別。設計されたベクターをコードするウイルス粒子を293T細胞にトランスフェクションすることにより作製した。初代ヒトMSCを0.25のMOIにて形質導入した。形質導入した細胞をピューロマイシン (Sigma Aldrich、P9620-10ML、10 mg / mL、最終濃度 : 3 µg / mL) を用いて選抜した。選抜した細胞をic-FACSにより分析した。サイトカインの発現の検出を高めるため、細胞を、GolgiPlug (BD、555029) を用いて16時間処理し、タンパク質を富化させた。細胞を製造業者の説明書に従って、(BD、554722) を用いて透過処理を行い、その後HA-Tag特異的抗体 (Miltenyi、130-092-257) を用いてサイトカイン (染色用1.33 µL) を染色した。細胞をフローサイトメトリー (FC500、Beckman coulter) により分析した。

3A : 形質導入していない細胞

10

3B : IL7及びIL21を含む構築物、複製産物1

3C : IL7及びIL21を含む構築物、複製産物2

3D : IL2及びIL12を含む構築物、複製産物1

3E : IL2及びIL12を含む構築物、複製産物2

3F : IL15及びIL12を含む構築物、複製産物1

3G : IL15及びIL12を含む構築物、複製産物2

3H : IL7及びIL12を含む構築物、複製産物1

3I : IL7及びIL12を含む構築物、複製産物2

3J : IL21及びIL12を含む構築物、複製産物1

3K : IL21及びIL12を含む構築物、複製産物2

20

【0155】

図4：遺伝子導入サイトカインのELISA検出。ヒトMSCを上記の構築物を用いて形質導入した。この細胞は、ピューロマイシン選択性細胞であり、 1×10^5 個の細胞を6ウェルプレートに播種した。上清を72時間後に回収し、ELISAにより分析した。作製したデータを 10^5 個の細胞及びベクターコピー数に対して正規化した。上記で使用したELISAキットを製造業者の説明書に従い使用した：ヒトIL-2 (Thermo Scientific、EH2IL2)、ヒトIL-7 (Thermo Scientific、EHIL)、ヒトIL-15 (BioLegend、431707)、ヒトIL-21 (ThermoScientific、EHIL21)。

【発明を実施するための形態】

【0156】

30

免疫系の重要な役割は腫瘍を識別し、排除することである。腫瘍の形質転換した癌性細胞は、正常細胞では見つからない抗原を発現する。免疫系には、これらの抗原は異物であり、抗原が存在することで、免疫細胞に形質転換した腫瘍細胞を攻撃させる。腫瘍によって発現する抗原にはいくつかの発生源がある。子宮頸部癌を生じるヒトパピローマウイルスのような発癌性ウイルスに由来するものがある一方で、正常細胞で低レベルであるが、腫瘍細胞では高レベルとなる生体そのもののタンパク質のものもある。一例にチロシナーゼと呼ばれる酵素があり、これは高レベルで発現すると、或る特定の皮膚細胞（例えばメラニン細胞）を悪性黒色腫と呼ばれる腫瘍に形質転換させる。腫瘍抗原の考えられる第3の発生源は、通常は細胞成長及び生存の調節に重要であり、通常癌遺伝子と呼ばれる癌誘導分子に突然変異するタンパク質である。

40

【0157】

腫瘍に対する免疫系の主な応答は、キラーT細胞を用いて、時にはヘルパーT細胞の力を借りて異常な細胞を破壊することである。腫瘍抗原はウイルス抗原と同様にMHCクラスI分子において提示される。これにより、キラーT細胞が腫瘍細胞を異常であるとして認識することが可能になる。NK細胞は、特に腫瘍細胞が正常細胞より表面のMHCクラスI分子が少ない場合（腫瘍の一般的な現象）、同様に腫瘍性細胞を死滅させる。腫瘍細胞の中には例えば、マクロファージ及びリンパ球の活性を抑制するサイトカインTGF- β を分泌することにより免疫応答を阻害する産物を放出するものもある。

【0158】

それゆえ、本発明は、本明細書に記載の遺伝子改変型MSCから免疫刺激性サイトカイン

50

を発現させることによって抗腫瘍免疫応答を補助する手段を提供する。

【0159】

本発明において、免疫療法は、癌を治療するために免疫系を用いた任意の治療剤を包含すると理解される。免疫療法は、癌細胞が免疫系によって検出することができる表面の微妙に異なる分子を有することを利用する。これらの分子は癌抗原として知られ、最も一般的にはタンパク質であるが、糖質等の分子も含む。免疫療法は、これらの抗原を標的として利用することによって腫瘍細胞を攻撃する際に免疫系を誘起する又は高めるものである。

【0160】

免疫療法は、細胞療法及び抗体療法を包含するがそれらに限定されない。

10

【0161】

細胞療法は通例、血液から又は患者の腫瘍から単離した免疫細胞の投与を含む。治療対象の腫瘍に指向した免疫細胞を活性化し、培養し、患者に戻すが、この場合免疫細胞が癌を攻撃する。この方法に使用することができる細胞の種類は、ナチュラルキラー細胞、リンホカイン活性化キラー細胞、細胞毒性T細胞及び樹状細胞であるがそれらに限定されない。樹状細胞療法は、樹状細胞を腫瘍抗原に提示させることによって抗腫瘍応答を誘起させる。樹状細胞は抗原をリンパ球に提示し、この提示によりリンパ球が活性化し、リンパ球をプライミングし、抗原を提示する他の細胞を死滅させる。

【0162】

抗体は細胞表面の標的抗原に結合する、免疫系によって産生されるタンパク質である。癌抗原に結合するものを使用して、癌を治療することができる。細胞表面受容体は、抗体療法の一般的な標的であり、例えばCD20、CD274及びCD279がある。癌抗原に結合すると、抗体は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害を誘導し、補体系を活性化し又は受容体がリガンドと相互作用することを阻止することができ、これらは全て細胞死を生じ得る。アレムツズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ及びリツキシマブを含む多数の抗体は、癌を治療することが認められている。

20

【0163】

抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）は、抗体に標的細胞の表面に結合するよう指示する免疫系による攻撃の機構である。抗体は結合領域（Fab）と、Fc表面受容体を介して免疫細胞により検出することができるFc領域とから構成される。Fc受容体は、ナチュラルキラー細胞を含む多くの免疫系細胞に見つかる。ナチュラルキラー細胞が抗体被覆細胞に直面すると、後者のFc領域がそのFc受容体と相互作用し、パーフォリン及びグランザイムBを放出する。これら2つの化学物質は腫瘍細胞に細胞死（アポトーシス）をプログラムしている。有効な抗体にはリツキシマブ、オファツムマブ及びアレムツズマブがある。

30

【0164】

補体系には抗体が細胞表面に結合した後に細胞死を生じさせることができる血液タンパク質がある。一般に、この系は異物の病原体を処理するが、癌の治療用抗体を用いて活性化させることができる。この系は、抗体がキメラ、ヒト化又はヒトである場合、IgG1 Fc領域を含有する限り誘引され得る。補体は補体依存性細胞傷害（抗体依存性細胞介在性細胞傷害の亢進）及びCR3依存性細胞傷害として知られる、膜を攻撃する複合体を活性化させることにより細胞死を導くことができる。補体依存性細胞傷害が生じるのは、抗体が癌細胞表面に結合し、C1複合体がこれらの抗体に結合した後、癌細胞膜にタンパク質の孔を形成するときである。

40

【0165】

腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、好ましくは細胞又は抗体をベースとした抗腫瘍免疫療法の標的とすることができます、またこれらには、当業者にとって既知の抗原又は当業者により単独又は大部分が腫瘍細胞により発現し、免疫療法の標的となり得ることが同定可能であるような抗原を含むがそれらに限定されない。非限定的な例として、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、プロト癌遺伝子等の突然変異による異常な構造を有する、腫瘍細胞に産生されたタンパク質、ras遺伝子及びp53遺伝子の異常産物又は腫瘍細胞に関連する

50

他のタンパク質、例えば組織分化抗原、分化抗原群（多くの場合、CDと省略される）の細胞表面分子、突然変異タンパク質抗原、発癌性ウイルス抗原、癌精巣抗原及び血管特異的若しくは間質特異的抗原を包含する。糖タンパク質、糖脂質、糖質又は成長因子受容体も抗腫瘍免疫療法の標的として、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原と見なすことができる。

【0166】

本発明のMSCは、免疫応答を刺激する導入遺伝子サイトカインと、MSC固有の抗炎症特性とを組み合わせることから得られる独自の特性により、本明細書に記載の免疫療法を補助する及び／又は高めることができる。

【0167】

本明細書に記載の「腫瘍」は、前立腺腫瘍、肺腫瘍、扁平上皮癌、乳房腫瘍、悪性黒色腫、基底細胞癌、肝細胞癌、胆管細胞癌、精巣癌、神経芽細胞腫、神経膠腫又は悪性星状腫瘍、例えば多形膠芽細胞腫、結腸直腸腫瘍、子宮内膜癌、肺癌、卵巣腫瘍、子宮頸部腫瘍、骨肉腫、ラブド／平滑筋肉腫、滑膜肉腫、血管肉腫、ユーイング肉腫／PNET及び悪性リンパ腫を含むものとするが、それらに限定されない。これらは原発腫瘍及び転移性腫瘍（ともに血管性及び非血管性）を含む。

10

【0168】

本明細書に開示の「間葉系幹細胞」は、結合組織、骨、軟骨並びに循環系及びリンパ系の細胞に成長することができる。間葉系幹細胞は、疎充状（loosely packed）、紡錘状又は星状の未分化細胞からなる中胚葉の一部である間葉に見つかる。本明細書において使用される間葉系幹細胞は、CD34陰性幹細胞を含むが、それらに限定されない。

20

【0169】

本発明の1つの実施形態において、間葉系幹細胞は、プラスチック接着性細胞であり、いくつかの実施形態において、多能性間葉系間質細胞と定義され、また、CD34陰性細胞を含む。何らかの誤解を避けるため、間葉系幹細胞という用語は、間葉系細胞、MSC及びそれらの前駆細胞の部分集合（*in vivo*において多数の細胞型に分化可能な多能性又は万能性自己再生細胞から構成される）も含む多能性間葉系間質細胞を包含する。

【0170】

本明細書において使用されるCD34陰性細胞は、細胞表面にCD34を欠失している、又はCD34の発現量がほんのわずかしかない細胞を意味するものとする。CD34陰性細胞及びこのような細胞を単離する方法は、例えば、Lange C. et al., "Accelerated and safe expansion of human mesenchymalstromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine". *J. Cell Physiol.* 2007, Apr. 25.に記載されている。

30

【0171】

間葉系幹細胞は多くの指標物質により造血幹細胞（HSC）から分化することができる。例えば、HSCは培養液に浮遊し、プラスチック表面に接着しないことが知られている。対照的に、間葉系幹細胞はプラスチック表面に接着する。本発明のCD34陰性間葉系幹細胞は培養液中で接着する。

【0172】

本明細書に記載の遺伝子改変型細胞（複数の場合もある）は、固体、液体又はエアロゾル形態で投与されるかに応じて、また注射液のような投与経路において滅菌する必要があるかに応じて様々な種類の担体を含むことができる。本発明を、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞体内、粘膜内、心膜内、臍下（infraumbilically）、眼球内、経口、局所、局所的、吸入（例えば、エアロゾル吸入）、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸漬させる局所灌流、カテーテルを介して、洗浄を介して、クリームにおいて、脂質組成物（例えばリポソーム）において、又は当業者にとって既知である他の方法又は上記の任意の組合せによって投与することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990（引用することにより本明細書の一部をなす）を参照のこと）。

40

50

【0173】

本発明は、対象の血流に治療に有効な細胞数を導入することによる患者の治療を包含する。本明細書において使用される「対象の血流」に細胞を「導入する」とは、上記の細胞を、注射を介して対象の静脈又は動脈の一方に導入することを含むものとするが、それらに限定されない。このような投与は、例えば1回、複数回及び／又は1回若しくは複数回の長期間にわたり行うこともできる。単回の注射が好ましいが、いくつかの例において、経時的に複数回の注射（例えば、年4回、年2回又は年1回）は必要であってもよい。このような投与はまた、CD34陰性細胞と薬学的に許容可能な担体との混合物を用いて行われることが好ましい。薬学的に許容可能な担体は当業者にとって既知であり、0.01 M～0.1 M、好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液又は0.8 %の生理食塩水及び通常使用される専用の凍結保存媒体を含むが、それらに限定されない。10

【0174】

投与は、例えば対象の体内の腫瘍疾患に近傍の領域に注射によって局所的に行うこと也可以。MSCが癌性組織に向かって遊走することがわかっている。それに関わらず、本明細書に記載の細胞の局所投与は、そのような作用部位にて細胞を高濃度にすることができる。

【0175】

さらに、このような薬学的に許容可能な担体は、水溶液又は非水溶液、懸濁液及び乳濁液、最も好ましくは水溶液であってよい。水性担体には、生理食塩水及び緩衝媒体を含む水、アルコール／水溶液、乳濁液及び懸濁液がある。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液並びに不揮発性油がある。静脈内ビヒクルには、流体及び栄養補充剤、電解質補充剤、例えばブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖リンゲル液をベースとしたもの等がある。i.v.投与に通常使用される流体は、例えば、Remington: The Scienceand Practice of Pharmacy, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams S-Wilkins (2000) に見つかる。防腐剤及び他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等も含むことができる。20

【0176】

本明細書において使用される「治療に有効な細胞数」は、以下の量及び量の範囲を含むがそれらに限定されない：(i) 約 1×10^2 細胞／体重kg～約 1×10^8 細胞／体重kg；(ii) 約 1×10^3 細胞／体重kg～約 1×10^7 細胞／体重kg；(iii) 約 1×10^4 細胞／体重kg～約 1×10^6 細胞／体重kg；(iv) 約 1×10^4 細胞／体重kg～約 1×10^5 細胞／体重kg；(v) 約 1×10^5 細胞／体重kg～約 1×10^6 細胞／体重kg；(vi) 約 5×10^4 細胞／体重kg～約 0.5×10^5 細胞／体重kg；(vii) 約 1×10^3 細胞／体重kg；(viii) 約 1×10^4 細胞／体重kg；(ix) 約 5×10^4 細胞／体重kg；(x) 約 1×10^5 細胞／体重kg；(xi) 約 5×10^5 細胞／体重kg；(xii) 約 1×10^6 細胞／体重kg；及び(xiii) 約 1×10^7 細胞／体重kg。想定されるヒト体重には、約5 kg、10 kg、15 kg、30 kg、50 kg、約60 kg、約70 kg、約80 kg、約90 kg、約100 kg、約120 kg及び約150kgが含まれるが、それらに限定されない。これらの数値は、CD34+造血幹細胞の移植の前臨床動物実験及びヒト試験及び標準的なプロトコルに基づく。単核細胞(CD34+細胞を含む)は通常1:23000～1:300000のCD34陰性細胞を含有する。30

【0177】

本明細書において使用される、障害に罹患している対象を「治療する」とは、障害の進行を遅らせ、停止させ又は好転させることを意味するものとする。好ましい実施形態において、障害に罹患した対象を治療することは、障害の進行を、理想的には障害そのものを排除するという点で好転させることを意味する。本明細書において使用される、障害を改善することと障害を治療することとは、等価のことである。本発明の治療も又は代替的に上記の細胞の予防的な投与に関する。このような予防的な投与は、任意の所与の医学的障害の予防又は上記の障害の発症の予防に関し得ることであり、この予防又は予防法は絶対的な予防として全ての状態下において狭義に解釈されるものではない。予防又は予防法はまた、任意の所与の病態を発症する対象の、特に上記の病態の危険にある対象における危険を低減させることに關し得る。4050

【0178】

併用投与は、同時治療、併用治療（co-treatment）又は統合治療（joint treatment）を包含し、MSCの個々の配合物及び免疫療法、例えばチェックポイント阻害剤及び／又は免疫細胞の投与を含み、それにより治療はそれぞれが数分以内、同時間、同日、同週内又は同月内に行われることができる。併用剤（例えば、MSC、免疫細胞及び／又はチェックポイント阻害剤）の任意の所与の組合せの連続投与はまた、「併用投与」という用語によつて包含される。上記のMSCの1つ又は複数と別の免疫治療剤、例えばチェックポイント阻害剤及び／又は免疫細胞とを含む併用医薬も、単回の投与又は用量における種々の成分を併用投与するために使用することができる。

【0179】

併用免疫療法は、数分から数週間の範囲の間隔で遺伝子改変型幹細胞を用いた治療の前又は後に行うことができる。他の免疫治療剤及び遺伝子改変型幹細胞を目的の部位に個別に投与する実施形態において、一般的に、作用物質及び遺伝子改変型幹細胞が治療部位において有利に併用効果を発揮することができるよう、各送達時点間で長時間が経過しないことを確実にする。このような例において、互いに約12時間～24時間以内、より好ましくは互いに約6時間～12時間以内に（約12時間のみの時間差が最も好ましい）両方の作用物質と細胞とを接触させる療法が検討される。いくつかの状況において、治療時間を大きく延長させることができが、それぞれの投与と投与との間は、数日（2日、3日、4日、5日、6日又は7日）～数週間（1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間又は8週間）が経過する。

10

【0180】

本明細書において使用される用語「間質」は、通常、細胞外マトリクス（ECM）及び間質細胞から構成される、組織又は器官（又は腺、組織又は他の構造）の支持構造を指す。間質は、その器官の重要な機能的要素からなる実質とは別のものである。表皮（皮膚の最上層）に隣接する間質細胞（真皮層）は、細胞分裂を促進する成長因子を放出する。間質は非悪性の宿主細胞から構成される。間質はその表面上で腫瘍が成長し、又は存在を維持し、又は免疫環境から腫瘍そのものを分離することができる細胞外マトリクスをもたらす。

20

【0181】

本明細書において使用される「腫瘍微小環境」という用語は、腫瘍間質、周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、他の細胞、シグナル伝達分子及びECMを含む、任意の所与の腫瘍が存在する細胞環境に関する。

30

【0182】

本明細書において使用される「細胞の遊走」又は「ホーミング」は特定の化学的シグナル又は物理的シグナルに向かって細胞が移動することを意味することが意図される。細胞は多くの場合、化学的シグナル及び機械的シグナルを含む特定の外因性シグナルに応じて遊走する。本明細書に記載のMSCは腫瘍組織又は他の炎症シグナルにホーミングすることができる。

【0183】

走化性は、化学的な刺激に対する応答における細胞遊走の一例である。ボイデンチャンバーアッセイ等のin vitroでの走化性アッセイを用いて、細胞遊走が任意の所与の細胞に生じているか求めることができる。

40

【0184】

例えば、目的の細胞を精製し、分析することができる。走化性アッセイ（例えば、Falk et al., 1980 J. Immuno. Methods 33:239-247による）を、プレート（目的の細胞及び通過する細胞に対して特定の化学的シグナルを配置する）を用いて行った後、回収し、分析することができる。例えば、ボイデンチャンバーアッセイは、走化性の挙動の正確な決定に対するツールとして使用され、フィルターによって分けられたチャンバーを用いることを必要とする。これらのチャンバーの先駆的な型は、ボイデンにより構築された（Boyd en (1962) "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorp

50

honuclear leucocytes". J Exp Med 115 (3): 453)。運動性細胞を上部のチャンバーに入れ、同時に試験物質を含有する液体を下部のチャンバーに充填する。試験する運動性細胞の大きさで、フィルターの孔の大きさを決定するが、必然的に、能動的に通過する直径が選択される。in vivo条件のモデル化において、いくつかのプロトコルは、フィルターと細胞外マトリクスの分子（コラーゲン、エラスチン等）を含むことが好ましい。測定の効率は、マルチウェルチャンバーの開発により向上することができ（例えばニューロプローブ）、この場合24個、96個、384個のサンプルが同時に評価される。この変形例の利点は、いくつか並行して同一の条件でアッセイすることである。

【0185】

本明細書において使用される「生着」は、グラフト又は移植した組織又は細胞の宿主体内への組込みのプロセスに関する。生着はまた、移植した細胞の宿主組織への組込み、及びそれらの生存率並びにいくつかの条件での非幹細胞状態への分化に関し得る。

10

【0186】

生着と、それによる或る程度のMSCの遊走及び生体分布の両方とを評価する技法は、in vivo又はex vivoのいずれかの方法を包含することができる。in vivoでの方法の例として、生物発光（細胞を形質導入して、ルシフェラーゼを発現させた後、発光を生じるルシフェリンの代謝により画像処理することができる）、蛍光発光（細胞に蛍光染料の負荷又は形質導入のいずれかを行い、蛍光レポーターを発現させた後、これを画像処理することができる）、放射性核種標識（細胞に放射性核種を負荷し、シンチグラフィーを用いて局在させる）、ポジトロン断層法（PET）又は単一光子放射断層撮影（SPECT）及び核磁気共鳴画像法（MRI）（常磁性化合物（例えば、酸化鉄ナノ粒子）を負荷した細胞を、MRIスキャナーを用いてトレースする）がある。生体分布を評価するex vivoの方法には、定量PCR、フローサイトメトリー及び組織学的方法がある。組織学的方法には、蛍光標識した細胞のトラッキング；例えば、Y染色体及びヒト特異的ALU配列のinsituハイブリダイゼーション；並びに種特異的又は遺伝子導入したタンパク質、例えば細菌の-ガラクトシダーゼの組織化学染色がある。これらの免疫組織化学的方法は、生着の位置を識別するのに有用であるが、組織の切除を必要とする。これらの方法及び用途の更なる総括は、Kean et al., MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-TargetingStrategies, and Immune Modulation, Stem Cells International, Volume 2013 (2013)を参照されたい。

20

【0187】

30

本発明の間葉系幹細胞等の前駆細胞又は多能性細胞を、対象の体内の特定の組織又は領域における治療遺伝子産物の局在及び発現を必然的に可能にする遺伝子送達ビヒクルとして説明することができる。このような治療用の細胞は、他の治療に不応性の疾患の細胞療法となる可能性をもたらす。各種類の治療用の細胞において、最終的な目標は同じであり、細胞が遺伝子の特定のレパートリー、好ましくは治療遺伝子産物をコードする外因性核酸を発現し、それにより上記遺伝子産物を発現する細胞特性を改変し、免疫刺激効果等の治療効果を得るものとする。本発明の細胞は、in vitroで増殖したとき、CD34等のほとんどの分化マーカーを発現しない間葉系（間質）細胞子孫の複数の世代を含む、異種の集団を表す。これらの集団は、間葉系及び非間葉系系譜に沿って増殖能並びに末端分化及び成熟に対する応答が限定されていることを保持することができる。

40

【0188】

本明細書において使用される「誘導性発現」又は「条件付き発現」は、遺伝子発現の状態、複数の状態又は系に関し、この場合、1つ又は複数の分子（誘導因子）が存在し又は遺伝子発現させる細胞の他の一連の条件下にない限り、免疫刺激性サイトカイン等の目的の遺伝子を好ましくは発現しない、又はいくつかの実施形態において、取るに足らないレベル若しくは比較的低いレベルにて発現する。誘導性プロモーターは、特定の生物学的状態下において比較的高いレベルにて発現する天然のプロモーター又は任意の所与の誘導性要素を含む他の合成プロモーターのいずれかに関し得る。誘導性プロモーターは、特定の組織環境若しくは微小環境により誘導されるもの又は特定の組織環境若しくは微小環境に存在する生物学的シグナルの組合せ又は外部因子、例えば小型の薬剤分子若しくは他の外

50

部から適用されるシグナル分子の投与により誘導されたプロモーターを指し得る。

【0189】

本明細書において使用される組織に「近傍の」は、例えば、組織の50 mm、10 mm、5 mm、1 mm以内、組織の0.5 mm以内及び組織の0.25 mm以内を含む。

【0190】

本明細書に記載のサイトカインは、本明細書において指定したサイトカインに対応する任意の哺乳動物サイトカインに関し得る。好ましくは、サイトカインは、ヒトサイトカイン又はマウスサイトカインに関する。

【0191】

幹細胞が正常な及び疾患の状況における異なる組織の微小環境に対して選択的遊走を示すことができるとすると、動員された幹細胞において開始される分化経路に結合する組織特異的プロモーターの使用は本発明に包含され、理論的にこのプロモーターを使用して、生物学的に定義された内容においてのみ治療遺伝子の選択的発現を誘導することができる。他の組織ニッチに動員されたが、同じ分化プログラムを行わない幹細胞は、治療遺伝子を発現しないはずである。このアプローチは、定義された微小環境内において治療遺伝子の選択的発現の可能性をかなりの程度制御することが可能であり、血管新生中の治療遺伝子の発現の調節に適用することに成功している。このような遺伝子改変に対するアプローチの可能性については、国際公開第2008/150368号及び特許文献1に開示され、これらはその全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【実施例】

【0192】

以下の実施例は、本発明の実施の実行を例証することにより、実施及びいくつかの例において、本発明の好ましい実施形態を記載するためにあり、本発明の範囲又は本明細書に記載の概念を限定するものではない。

【0193】

実験モデル：

間葉系幹細胞をLange C. et al. ("Accelerated and safeexpansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium fortransplantation and regenerative medicine", J. Cell Physiol. 2007, Apr. 25) 又はSoleimani ("A protocol for isolationand culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow", Nat Protoc. 2009; 4(1): 102-6) のいずれかに従い抽出することができる。

【0194】

細胞は、細胞培養液中において接着してかつ連続して成長する。MSCは、サイトカインをコードする遺伝子配列を含むレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターを用いて形質転換することができる。IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、IFN γ 、IFN β 、SDF-1、CCL23、CCL19、CCL1、CCL2、CCL17、CCL22及び/又はCCL4及びそれらの組合せをコードする遺伝子を発現するウイルス構築物を標準的なプロトコルに従い操作し、作製することができる。

【0195】

形質転換した細胞を投与のために採取する前に更に選抜し、培養する。全てのベクターは、例えば抗生物質耐性遺伝子、例えばピューロマイシン耐性遺伝子を含むことができる。それゆえ、トランسفエクションした細胞を選抜するために0.1 μg/ml ~ 10 μg/ml又は好ましくは3 μg/ml ~ 5 μg/mlの濃度のピューロマイシンを使用することができる。マウス又は他の対象に注射する前に、細胞を培養フラスコから分離し、PBSを用いて2回洗浄し、PBS又は他の好適な緩衝液に再懸濁させる。

【0196】

好適な実験を、内因性マウス乳癌モデル（国際公開第2008/150368号に記載）又は同所性腫瘍モデル（特許文献1に記載）のいずれかにおいて行うことができる。並列実験において、腫瘍が成長したマウスに同系の対象から単離したT細胞及び/又はチェックポイント阻害剤と合わせて又は合わせずに、種々の操作をしたMSCを注射した。5日後、動物を屠

10

20

30

40

50

殺することができ、腫瘍を調べた。予備試験の結果は、適切な対照に比べ、上記の処置の対象において腫瘍の大きさ／成長の減少を示す。

【0197】

ヒト間葉系幹細胞の作製：

本実施例において、プラスチック接着性のヒトMSCを骨髄から単離し、成長培地、例えばPittenger, M.F. (2008) Mesenchymal stem cells from adult bone marrow, In D.J. P rockop, D.G. Phinney, B.A. Bunnell, Methods in Molecular Biology 449, Mesenchymal stem cells, Totowa: Humana Press) に記載のDMEMを含有するFBSにおいて培養した。

【0198】

サイトカイン及びケモカインの発現のためのベクターの作製：

10

免疫刺激因子又は免疫応答を補助する因子のためのプロモーター及び遺伝子（例えば、cDNA）からなる（consisting of）導入遺伝子発現力セットを、JuliaLodge, Peter Lund, Steve Minchin (2007) Gene Cloning, New York: Tylor and Francis Groupに記載の標準的なクローニング技法を用いて構築する。プロモーターは、CMVプロモーター又はPGKプロモーター等の構成的プロモーター又はTie2プロモーター、RANTESプロモーター又はHSP70プロモーター等の誘導性プロモーターであってよい。

【0199】

免疫刺激因子又は免疫応答を補助する因子をコードする遺伝子の例として、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12、IFN 、IFN 、SDF-1、CCL23、CCL19、CCL1、CCL2、CCL17、CCL22及び／又はCCL4 (Strengell et al., M, The Journal of Immunology, 2003, 170: 546 4-5469; Borish et al., J Allergy Clin Immunol. 2003 Feb; 111(2 補遺): S460-7) がある。遺伝子は、後に行う発現の検出が容易となるよう、タグ配列（例えば、ヘマグルチニンタグ又はHISタグ等のマーカータンパク質／ペプチド）と融合させてもよく、又は融合させなくてもよい (Hinrik Garoff, 1985, Annual Review of Cell Biology, Vol. 1: 403-445)。

20

【0200】

次いで、導入遺伝子を標準的なクローニング技法により好適なベクター系（例えば、レンチウイルスベクター又は レトロウイルスベクター）に挿入する。好適なベクターは、例えばBaum (欧洲特許出願公開第1757703号) により記載されている。ベクターは、プロセスの後半において遺伝子改変型細胞を富化させるよう、プロモーター及び選択可能なマーカー遺伝子（細胞表面マーカー又は耐性遺伝子、例えばピューロマイシン耐性となるpac遺伝子）からなる第2の導入遺伝子カセットを含んでもよく又は含まなくてもよい (David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, 2009, Biotechnology: Applying the Genetic Revolution, London: Elsevier)。

30

【0201】

本発明による好ましい構築物を図2に示す。

【0202】

間葉系幹細胞の遺伝子改変：

形質導入を、Murray et al., 1999 Human Gene Therapy. 10(11): 1743-1752及びDavis et al., 2004 Biophysical Journal Volume 86 1234-1242の記載の通りの改変を用いて行う。詳細は以下の通りである。

40

【0203】

6ウェル細胞培養プレート（例えば、Corning）を、ポリ-L-リジン（PLL）（例えば、Sigma-Aldrich、P4707-50ML）を用いてコーティングし、PLL溶液（0.01 %）を、PBSを用いて希釈して、最終濃度を0.0001 %～0.001 %にする。希釈したPLLの2 mlを各ウェルに使用する。プレートを少なくとも2時間、室温にてインキュベーションする。インキュベーション後、プレートを、PBSを用いて注意深く洗浄する。

【0204】

最終容量が2 mlのウイルスベクターの上清を各PLLコーティングしたウェルに添加する。粒子の数は、ウェル当たり 2×10^3 個及び 1×10^6 個であり、これにより0.25及び10の感染

50

多重度が得られる。この充填済のプレートを2000×g、30分間、4にて遠心分離する。その後、上清を廃棄し、ウェル当たり 1×10^5 個の間葉系幹細胞を播種する。プレートを37、5%CO₂にてインキュベーションし、次に使用する。

【0205】

MSCにおける導入遺伝子発現の分析：

フローサイトメトリー：

免疫刺激因子がMSCにおいて発現することを示すため、細胞内フローサイトメトリー アッセイを行う。形質導入から3日後に、MSC培地を1mlの培地当たり1μlのBD Golgi Plug (品番555029) を含有する培地に交換し、形質導入した細胞のゴルジ装置内に発現した因子を富化させる。細胞を37にて16時間インキュベーションした後、因子の発現に対して免疫染色を行う。MSCを採取し、BD Cytofix / Cytoperm細胞透過 / 固定溶液 (Becton Dickinson、554722) を用いて製造業者の説明書に従い透過処理し、標的タンパク質の細胞内染色を行う。フィコエリトリン (PE) (Milteny、120-002-687) を用いて標識したヘマグルチニンタグ特異的抗体を、発現した因子の検出に使用する。 2×10^5 個のMSCを100μlの抗体 (透過 / 洗浄溶液を用いて1:75に希釈、Becton Dickinson、554723) を用いて染色する。代替的に、因子に対して直接指向する抗体を製造業者の説明書に従い使用することができる (例えば、PEを用いて標識した抗IL2抗体、ebioscience 12-7029-41)。染色した細胞を洗浄し、PBSに再懸濁させる。次いで、細胞をFC500フローサイトメーター (Beckman Coulter) において分析する。

【0206】

サイトカイン導入遺伝子の発現を図3に示す。

【0207】

ELISA：

形質導入したMSCを6ウェルプレートに播種する (ウェル当たり 1×10^5 個のMSC)。形質導入したMSCはpacピューロマイシン耐性遺伝子を担持しており、ピューロマイシン選抜により富化する。このピューロマイシン (3 μg/ml培地) を培地に添加し、細胞を5日間にわたり37及び5%CO₂にて培養し、2日毎に培地を交換し、形質導入していない細胞を培養液から枯渇させる。その後、ピューロマイシン非含有培地を培養液に使用する。MSCをウェル当たり 1×10^5 個の細胞の定義された細胞数にて、6ウェルプレートに再播種し、48時間インキュベーションする。培地を回収し、製造業者の説明書に従い、定量のための免疫因子特異的ELISAに使用する (例えば、IL-7 ELISA : Thermo Scientific、EHIL7 ; IL-15 ELISA : Thermo Scientific、EHIL15)。

【0208】

サイトカイン導入遺伝子の発現を図4に示す。

【0209】

ELISAによるin vitroでのT細胞及びマクロファージ活性化のモニタリング：

末梢血単核細胞 (PBMC) をIvan J. Fuss, Marjorie E. Kanof, Phillip D. Smith, Hedd y Zola, 2009 Curr. Protoc. Immunol. 85: 7.1.1-7.1.8に記載の通りにficolli勾配遠心分離を用いてヒト血液から単離する。in vitroにおいてMSCに発現した因子の免疫刺激効果を評価するため、共培養アッセイを行う。 $1 \sim 5 \times 10^5$ 個のPBMCを、 $0.2 \sim 1 \times 10^5$ 個の形質導入したMSC、形質導入していないMSC (対照)とともに又はMSCを含まざる12ウェルのウェルに播種する。T細胞受容体の培養模擬増殖において、このT細胞を非特異的に最適下で刺激するため、細胞を播種する前に、プレートのウェルを、刺激性抗CD3抗体を用いて被覆することができる (例えば、OKT3、Janssen-Cilag)。抗体溶液は0.5 μg/mL ~ 0.1 μg/mLの濃度とする。代替的に、PHAを20 μg/mlの濃度の共培養液に添加することができる (Ngoumou et al., Cytokine25 (2004) 172-178)。ウェルを37及び5%CO₂にて2日~5日間にインキュベーションした後に分析する。

【0210】

形質導入していないMSCを含むウェル又はMSCを含まないウェルに比べ、免疫刺激因子を形質導入したMSCは、培養したT細胞の活性化を増大させる。T細胞の活性化状態を、T細胞

活性化の指標となる、培養中のサイトカインのINF の濃度を測定することにより評価する (Boehm et al., Annu Rev Immunol. 1997; 15: 749-95.)。単球の活性化状態を評価するため、培地を回収し、腫瘍壞因子 (TNFa) の放出を求める。培地を回収し、製造業者の説明書に従い定量のためのIFN 又はTNF 特異的ELISAに使用する (例えば、ELISA : IFN 、 ThermoScientific、 EHIFNG ; TNF ELISA : Thermo Scientific、 EH3TNFA)。

【0211】

フローサイトメトリーによるin vitroでのT細胞及びマクロファージの活性化のモニタリング :

末梢血単核細胞 (PBMC) をIvan J. Fuss, Marjorie E. Kanof, Phillip D. Smith, Hedy Zola, 2009 Curr. Protoc. Immunol. 85: 7.1.1-7.1.8 に記載の通りにficoll勾配遠心分離を用いてヒト血液から単離する。in vitroにおいてMSCに発現した因子の免疫刺激効果を評価するため、共培養アッセイを行う。1~5×10⁵個のPBMCを、0.2~1×10⁵個の形質導入したMSC、形質導入していないMSC (対照)とともに又はMSCを含まずに12ウェルのウェルに播種する。T細胞受容体の培養模擬増殖において、このT細胞を非特異的に最適下で刺激するため、細胞を播種する前に、プレートのウェルを、刺激性抗CD3抗体を用いて被覆することができる (例えば、OKT3、Janssen-Cilag)。抗体溶液は0.5 μg / mL ~ 0.1 μg / mLの濃度とする。代替的に、PHAを20 μg / mLの濃度の共培養液に添加することができる (Ngoumou et al., Cytokine25 (2004) 172-178)。ウェルを37 及び5 %CO₂にて2日~5日間でインキュベーションした後に分析する。

【0212】

形質導入していないMSCを含むウェル又はMSCを含まないウェルに比べ、免疫刺激因子を形質導入したMSCは、培養したT細胞及びマクロファージの活性化を増大させる。T細胞及びマクロファージの活性化状態を細胞内フローサイトメトリーにより評価する。細胞回収の24時間前に、細胞を1 mL培地当たり1 μLのBD Golgi Plug (品番555029) を含有する培地を用いて処理する。その後、細胞を採取し、製造業者の説明書に従いT細胞に特異的な蛍光体標識した抗体 (例えば、抗CD4、ebioscience 17-0048又は抗CD8、ebioscience 9017-0087) 又はマクロファージ / 単球に特異的な蛍光体標識した抗体 (抗CD14、ebioscience、9017-0149) を用いて染色する。次に、細胞を製造業者の説明書に従いBD Cytofix / Cytoperm 細胞透過 / 固定溶液 (Becton Dickinson、554722) を用いて透過処理し、IFNg (ebioscience、11-7319) 又はTNFa (ebioscience、11-7349) の細胞内染色を行う。抗体は製造業者の説明書に従って使用する。その後、細胞をFC500フローサイトメーター (Beckman Coulter) を用いて分析する。

【0213】

動物モデルにおけるMSC投与の抗腫瘍作用のモニタリング :

ヒト腫瘍細胞株由来の腫瘍を免疫欠損マウス (例えば、SCIDマウス)において2週間成長させ、操作したMSCを、例えば尾部静脈を介して静脈内投与する。その後、PBMCを静脈内投与する。次いで、腫瘍の大きさを、未処置の動物又はMSCのみを用いて処置した動物又はPBMCのみを用いて処置した動物の腫瘍の大きさと比べる。

【0214】

別の実験において、操作したMSCと併用したヒト腫瘍細胞株由来の腫瘍を免疫欠損マウス (例えば、SCIDマウス)において2週間成長させ、PBMCを静脈内投与する。次いで、腫瘍の大きさを未処理の動物又はMSCのみを用いて処置した動物又はPBMCのみを用いて処置した動物の腫瘍の大きさと比べる。

【0215】

上記の実験を行う一方で、PBMCの代わりに精製した細胞毒性Tリンパ球 (CTL) が使用され、又は腫瘍抗原に指向するCARを担持するCART細胞が腫瘍に存在している。同様に、チェックポイント阻害剤 (例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体) をMSC及びPBMC、又はMSC及びCTL、又はMSC及びCARTとともに使用することができる。

【0216】

上記の実験由来の腫瘍を組織学的に分析し、これらのサイトカインに反応性の抗体を用

10

20

30

40

50

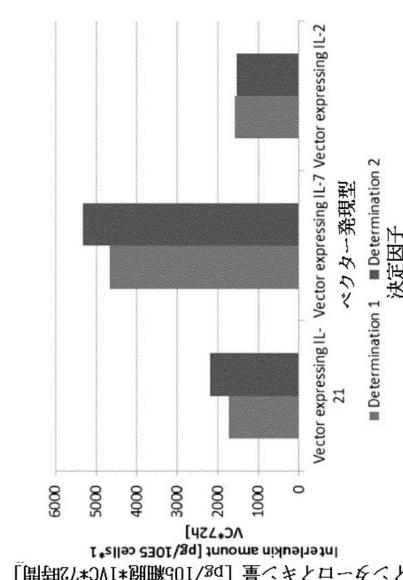
いることにより、MSCのサイトカイン及びサイトカインの組合せの発現量を評価する。PBM C、CTL及びCARTによる腫瘍の浸潤の程度をヘマトキシリン及びエオジン染色（H&E）を用いて評価する。T細胞による腫瘍の浸潤の程度を、CD3に対する抗体を用いた免疫組織化学を使用することにより評価することができる。単球による腫瘍の浸潤の程度をCD19に対する抗体を用いた免疫組織化学を使用することにより評価することができる。腫瘍内の浸潤したT細胞の活性化の程度を、CD69及びIFN γ に対する抗体を用いた免疫組織化学を使用することにより評価することができる。

【0217】

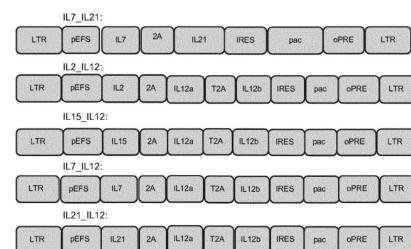
上記の実験を確認するため、これらの実験を、各腫瘍関連抗原に対する特異性を有する様々なヒト腫瘍細胞株及びCARTを用いて、成長させた様々な型の腫瘍を用いて繰り返している。

10

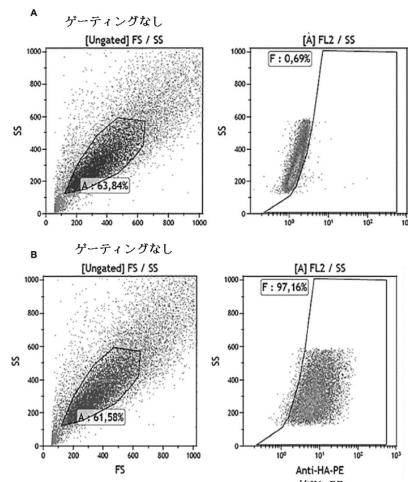
【図1】



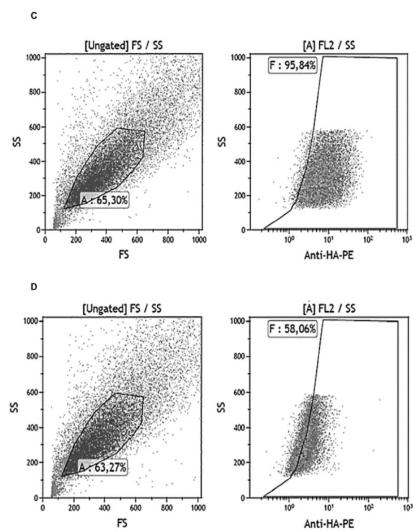
【図2】



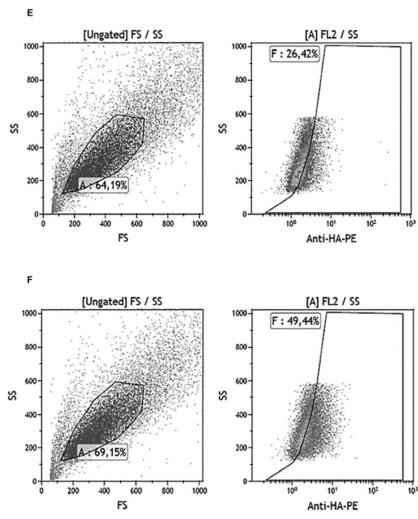
【図3-1】



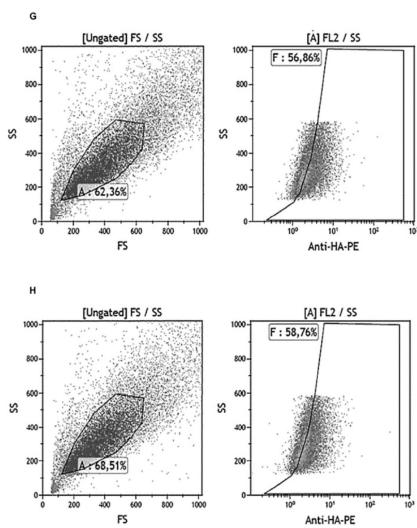
【図3-2】



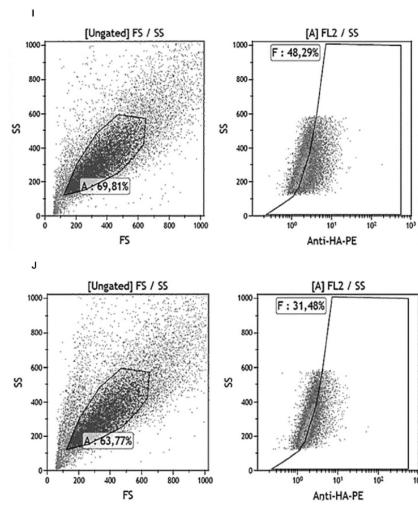
【図3-3】



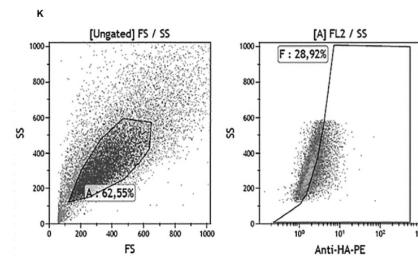
【図3-4】



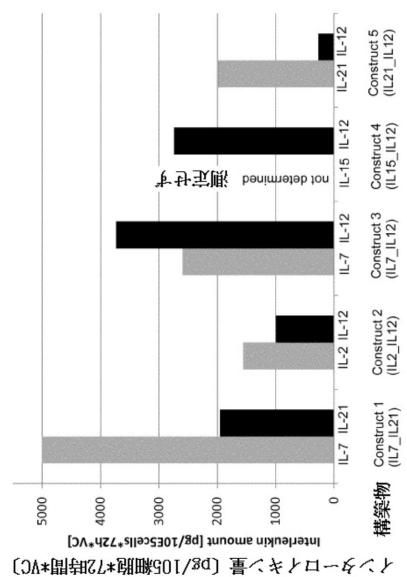
【図3-5】



【図3-6】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	15/19	(2006.01) C 1 2 N 15/19
C 1 2 N	15/12	(2006.01) C 1 2 N 15/12
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	35/17	(2015.01) A 6 1 K 35/17 A
A 6 1 K	35/15	(2015.01) A 6 1 K 35/15 Z
A 6 1 K	45/00	(2006.01) A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	39/00	(2006.01) A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K	39/395	(2006.01) A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K	35/13	(2015.01) A 6 1 K 39/395 E
		A 6 1 K 35/13

(72)発明者 ギュンター , クリストーネ
ドイツ , 8 1 4 7 9 ミュンヘン , ヘルテリッヒシュトラーセ 6 2 デー

(72)発明者 テオハリス , ステファノ
ドイツ , 8 0 7 9 6 ミュンヘン , ヘルツォークシュトラーセ 1 1 4

(72)発明者 ヘルマン , フェリクス
ドイツ , 8 1 3 7 5 ミュンヘン , ザールブルクシュトラーセ 2 5

(72)発明者 フス , ラルフ
ドイツ , 8 3 6 6 6 ヴァーアキルヒエン , ターガーンゼーア エステーエル . 7 8

審査官 星 功介

(56)参考文献 特表2 0 1 0 - 5 2 8 0 0 8 (J P , A)
特表2 0 1 2 - 5 2 3 2 4 3 (J P , A)
Immunology Letters , 2005, Vol.98 , p.216-224
Advanced Drug Delivery Reviews , 2012, Vol.64 , p.739-748

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8 , 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)